

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة باجي مختار-غابية

BADJI MOKHTAR- ANNABA UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister
En Microbiologie

Option : Bioprocédés

SUJET

**Screening de microorganismes producteurs de
lipases : application dans la
biodécontamination de surface**

Présenté par :

M^{elle} RIHANI Alima

Devant le jury :

Président	SAKA Saâd	Professeur	Univ. Annaba
Directeur de mémoire	DJERIBI Ryad	Maître de conférences	Univ. Annaba
Examineur	DJEGHABA Zineddine	Professeur	Univ. Annaba
Examineur	MERAD Tarek	Maître de conférences	Univ. Annaba

Année 2012

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Remerciements

Je remercie vivement Dieu de m'avoir donnée la force et le courage pour accomplir ce mémoire.

Je voudrais également remercier mon encadreur Dr. Djeribi qui m'a guidé tout au long de mon mémoire de Magister. Je souhaiterais ici lui témoigner ma sincère reconnaissance pour tous les conseils et les remarques objectives qu'il m'a apportés et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour avoir encadré ces travaux et pour la confiance qu'il m'a témoignée au cours de ces années.

*Je tiens à remercier vivement les membres du jury de cette thèse qui ont accepté de consacrer leur temps pour évaluer ce travail : Mr le professeur SAKA Saâd pour avoir accepté de présider ce jury ; Mr MERAD Tarek de me faire l'honneur de juger mon mémoire
Mes plus vifs remerciements vont à Mr djeghaba et ses collaborateurs pour l'accueil chaleureux au sein de leur laboratoire.*

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail ;

J'exprime également toute ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe de laboratoire, Mille mercis à mes collègues Warda, Wafa, Samara, Nassma, Chahrazed ; Ismahen pour toutes les bonnes choses que nous avons vécues ensemble.

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement ma famille pour son soutien constant tout au long de mes études. Ma reconnaissance va également à ma mère pour ses immenses sacrifices.

Que toutes les personnes que j'aurais oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Dédicace

A mes parents adorés, pour tout leur soutien à mon égard,

A la mémoire de mon père que dieu lui apporte ses indulgences,

A mes frères et sœurs à qui je souhaite beaucoup de bonheur,

A vous tous, chez qui l'échange scientifique est un plaisir,

A ceux que j'aime et qui m'aiment...

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
1. Introduction.....	1
2. Généralité.....	3
2.1. Les enzymes lipolytiques.....	3
2.1.1. Définitions et caractéristiques :	3
2.2. Origines de lipase	5
2.2.1. Les lipases végétales.....	5
2.2.2. Les lipases de mammifères.....	7
2.2.2.1. Les lipases gastriques	7
2.2.2.2. Les lipases pancréatiques	8
2.2.2.3. La lipoprotéine lipase	9
2.2.2.4. La lipase hépatique	9
2.2.3. les lipases microbiennes	9
2.2.4. Les cutinases «Les lipases fongiques »	10
2.3. Classification des lipases bactériennes	10
2.4. Lipases comme biocatalyseurs	14
2.4.1. Réaction d'hydrolyse	14
2.4.2. Réaction de synthèse.....	14
2.4.2.1. La transestérification.....	14
2.5. Spécificité des lipases.....	17
2.6. Séquence, structure et mécanisme d'hydrolyse.....	19

2.6.1. Les α/β hydrolases.....	19
2.6.2. Mécanismes enzymatiques d'hydrolyse.....	20
2.6.3. Cinétique d'hydrolyse.....	23
2.6.3.1. L'activation interfaciale des enzymes lipolytiques.....	23
2.7. Facteurs influençant la production de lipase	26
2.7.1. Effet du pH et de la température sur les lipases	26
2.7.2. Stabilité en solvant organique.....	27
2.7.3. Effet d'ions du métal	27
2.8. Microorganismes producteurs de lipases	28
2.9. Applications biotechnologiques de lipase	32
2.9.1. Les lipases en tant qu'hydrolases.....	32
2.9.1.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire	32
2.9.1.2. Applications dans les détergents	33
2.9.1.3. Applications en bioremédiation	33
2.9.1.4 Applications en tannerie.....	33
2.9.1.5 Applications dans l'industrie du papier	34
2.9.2. En synthèse organique	34
2.9.2.1. Lipases en industries cosmétique	34
2.9.2.2 Application médicale et pharmaceutique	35
2.9.2.3. Résolution de mélanges racémiques	35
2.9.2.4. Production de polymères biodégradables	35

3. MATERIELS ET METHODES.....	37
3.1. Screening de microorganismes producteurs de lipase	37
3.1.1. Prélèvements et échantillonnages.....	37
3.1.2. Isollements des bactéries lipolytiques	37
3.1.2.1. Isolement des bactéries lipolytiques à partir des échantillons de sols	37
3.1.2.2. Isolement des bactéries lipolytiques à partir des échantillons d'huile	38
3.1.3. Production de lipase	38
3.1.3.1. Culture en milieu liquide.....	38
3.1.4. Etude de la croissance bactérienne	38
3.1.5. Etude de l'activité lipolytique en fonction du substrat.....	39
3.1.6. Mise en évidence de l'activité lipasique.....	40
3.1.6. 1. Sur milieu gélosé à base de tributyrine	40
3.1.6. 2. Sur milieu gélosé à base de Tween 80.	40
3.1.7. Dosage de l'activité lipasique.....	41
3.1.7.1. Dosage de l'activité lipasique par titration des AG.....	41
3.1.7.2. Dosage de l'activité lipasique par colorimétrie	41
3.1.8. Mesure de l'activité émulsifiante	43
3.1.9. Effet de la lipase sur l'adhésion du biofilm d'Acinetobacter baumannii.....	43
3.1.10. Identification des souches bactériennes productrices de lipases	43
4. RESULTATS ET DISCUSSION	44
4.1. Résultats du screening de souches bactériennes productrices de lipases	44
4.2. Etude de la croissance des souches isolées en présence du substrat	44
4.3. Effet de la concentration du substrat sur la croissance bactérienne	46
4.5. Etude de l'activité lipolytique en fonction du substrat	47
4.6. Mise en évidence de l'activité lipasique	48
4.6.1. Sur milieu gélosé	48
4.6.1. 1. Milieu gélosé à base de Tributyrine	48
4.6.1. 2. Milieu gélosé à base de Tween 80	49
4.7. Dosage de l'activité lipasique	50
4.7.1. Dosage par titration	50
4.7.2. Dosage par colorimétrie	52

4.8. Mesure de l'activité émulsifiante	55
4.9. Effet de l'action des lipases sur l'adhésion bactériennes.....	55

Conclusion.

Résumé.

Références bibliographiques.

Annexes.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Fig. 1	Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride.....	5
Fig. 2	Schéma présenté d'une lipase pancréatique du cochons	8
Fig. 3	Réactions catalysées par la lipase.....	16
Fig. 4	Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases	18
Fig. 5	Schéma de repliement α/β	20
Fig. 6	Structure de lipase de <i>Pseudomonas aerogenosa</i>	21
Fig. 7	Rreprésentation de conformation fermée (a) et ouverte (b) de lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	22
Fig. 8	Rreprésentation de conformation fermée (a) et ouverte (b) de lipase de <i>Candida rugosa</i>	23
Fig. 9	Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat exprimée en multiple de la saturation.....	24
Fig. 10	Représentation schématique du mécanisme d'activation interfaciale de lipase sur un substrat insoluble	25
Fig. 11	Réaction chimique de l'hydrolyse d'ester de <i>p</i> -nitrophényle.....	42
Fig. 12	Croissances des deux souches lipolytiques ainsi que du consortium bactérien isolées à partir de l'exploitation traditionnelle.....	45
Fig. 13	Variation du pH du milieu au cours de l'incubation.....	45
Fig. 14	Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la croissance bactérienne.....	46
Fig. 15	Cinétiques de croissance des souches isolées du sol sur les différents substrats (Figure a et b).....	47
Fig. 16	Aspects macroscopiques des souches isolées sur milieu à base de tributyrine.....	48
Fig. 17	Aspects macroscopiques des colonies bactériennes sur milieu à base de Tween 80 (formation des halos opaques autour de colonies).....	49
Fig. 18	Courbes de croissance et d'activité lipasique des souches isolées à partir des échantillons de sols (A) et des échantillons de l'exploitation.....	51

Fig. 19	Profil de la courbe de croissance et l'activité enzymatique des isolats dosée par colorimétrique	52
Fig. 20	Activité enzymatique des isolats dosée par colorimétrique en présence du tween 80 comme substrat.....	53
Fig. 21	Activité enzymatique du consortium dosée par colorimétrie en présence de la tributyrine comme substrat.....	54
Fig. 22	a) Courbe de croissance et l'activité émulsifiante pour des souches isolées à partir de maâsra. b) Courbe de croissance et l'activité émulsifiante pour des souches isolées à partir de sol.....	55
Fig. 23	Effet des surnageants de lipases sur la formation de biofilm d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	56
Fig. 24	Pourcentage d'inhibition de biofilm d' <i>Acinetobacter</i> en utilisant un surnageant de 48 heure d'incubation.....	57
Fig. 25	Effet de surnageant de lipase sur la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	57

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
Tableau N° 1	Classification de lipases bactériennes	12
Tableau N° 2	Criblage de microorganismes producteurs de lipases.....	29
Tableau N° 3	Quelques applications biotechnologiques de lipases.....	36

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Liste des principales abréviations

- AG : Acides gras.
- AE : Activité enzymatique.
- DO : Densité Optique.
- GA : La gomme arabique.
- p-NPA : *p*-nitrophényl acétate ou l'acétate de *p*-nitrophénol.
- rpm : rotation par minute.
- TG : triglycérides.
- UI/ml : unité internationale (umole/min/ml).
- umole : micromole.
- BN : Bouillon nutritif.
- Tween 80 : polyoxyethylene sorbitane monooléate.
- ESTA : Extrait du sol- tributyrine- Agar.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

1. Introduction

Bien que la production de l'olivier soit répartie sur les cinq continents, elle est surtout prédominante dans la zone du Bassin Méditerranéen qui représente 98% de la surface des arbres en production et 97% de la production totale d'olives. La production d'huile d'olive se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, Syrie, Tunisie, Maroc et Algérie. La production de ces pays représente 94% de la production mondiale [112].

Cependant, les huileries ainsi que les industries d'olive sont souvent confrontées à la problématique de traitement de leurs effluents [122]. Elles colorent les eaux, et leur très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer. La pollution peut s'étendre sur de très longues distances. Plus de 1,5 millions de tonnes d'acides gras sont produites annuellement à partir de différentes huiles et graisses. L'hydrolyse chimique conventionnelle est conduite en procédés lourds avec déroulement de réactions secondaires indésirables. La réaction enzymatique permet, donc, d'éviter ces inconvénients [121].

Le développement de nouvelles biotechnologies, bio-industries et bio-raffineries est un défi majeur pour l'avenir. Mais ces développements nécessitent la mise au point de biocatalyseurs (que ce soient des microorganismes ou des enzymes) de plus en plus performants mais aussi adaptés à une mise en œuvre dans des conditions industrielles [38].

Les matières grasses ou lipides sont des composés très énergétiques, insolubles et constitués principalement de triglycérides (TG) qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, mono insaturés ou polyinsaturés. Les lipides constituent une grande partie de la biomasse et les enzymes lipolytiques assurent le renouvellement métabolique de ces lipides [3].

Les lipases sont des enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, les champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Elles sont capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycérides en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non aqueux [37] [39].

Il existe de nombreuses lipases qui diffèrent par leur spécificité et par leur stabilité. Elles peuvent être en effet, spécifiques d'acides gras à chaînes ou ne pas présenter de préférence particulière. Actuellement, elles sont largement utilisées dans les produits de nettoyage ménagers. Un grand nombre de recherches est actuellement en cours pour le développement des lipases qui seront utilisées en milieu alcalin comme détergents [36].

Le présent travail a pour principal objectif l'isolement ainsi que la purification de nouvelles souches bactériennes possédant une activité lipasique et la détermination des facteurs culturaux nécessaires pouvant permettre une meilleure croissance microbienne en plus d'une production optimale de l'enzyme recherchée. En effet, cette recherche s'inscrit dans ce cadre général et s'intéresse plus particulièrement à la lipase utilisable dans la transformation et le biofaçonnement des matières grasses ou lipides. Par ailleurs, l'étude de l'inhibition de certains biofilms bactériens dits de dégradation, qui se forment dans les différentes installations des industries alimentaires, par cette enzyme sera également menée.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

2. Généralité

2.1. Les enzymes lipolytiques

2.1.1 Définitions et caractéristiques :

Les enzymes lipolytiques forment une classe d'enzymes parfaitement solubles dans l'eau. Elles sont responsables de l'hydrolyse des lipides. Elles agissent sur des substrats lipidiques insolubles dans l'eau mais qui s'organisent spontanément au contact de l'eau pour former des émulsions, des micelles, des liposomes ou des films mono moléculaires [3].

Les carboxylestérases (Carboxyl ester hydrolase) comprennent deux groupes d'enzymes, à savoir non spécifiques estérases (E C 3.1.1.1) et les lipases (E C 3.1.1.3) qui ont été différenciés sur la base de leur spécificité de substrat. Les estérases hydrolysent des solutions d'esters de chaîne acyl court soluble dans l'eau et sont inactifs contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau [22] [146]. Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique et dans le cytosol de différents tissus, mais elles sont abondantes dans le foie. Elles ont une large spécificité en substrat : amides, esters, thioesters et hydrolyse un grand nombre des composés de différentes structures. Elles ont un rôle important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques [71].

Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques, elles sont largement présentes chez les plantes et chez les animaux ainsi que chez les microorganismes [41]. Ces enzymes appartiennent au groupe des sérines hydrolases et n'exigent la présence d'aucun cofacteur nécessitant la régénération pour leur activité [121] [34].

D'après Jaeger et al. (2002); Les lipases sont définies comme étant des carboxyl-estérases catalysant l'hydrolyse et la synthèse d'esters formés de glycérine et des acides gras de longues chaînes [37]. Ces enzymes présentent une grande spécificité au substrat et dégradent souvent des esters du *p*-nitrophenyl de l'acyle, Tweens et phospholipides avec la sélectivité vis-à-vis de position, stéréo, et de la longueur de chaîne. Les lipases ressemblent aux estérases, mais elles se différencient par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau [45] [98].

Contrairement aux estérases qui ont un comportement cinétique de Michaelis, les lipases sont faiblement actives en présence d'une solution monomérique vraie d'esters. Quand on augmente la concentration en substrat, l'activité de la lipase est considérablement accrue avec un substrat insoluble (comme l'émulsion). Les lipases ont été définies également comme une catégorie spéciale d'estérases efficaces dans l'hydrolyse de molécules agrégées [5] [121].

Les lipases catalysent, à l'interface eau - lipide, l'hydrolyse des liaisons esters formées par des acides gras et du glycérol [36] [37]. Dans le milieu eau /solvant organique immiscible, elles sont également capable de catalyser la réaction réversible de synthèse et échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actives (**Figure 1**). Certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques [41] [5].

L'estérase au contraire agit sur les esters dissous et elle est incapable d'attaquer les esters émulsifiés [71]. L'étude de ces enzymes a contribué à l'élaboration d'une enzymologie interfaciale, la catalyse se produit en milieu hétérogène à l'interface huile-eau. Il en résulte que les propriétés biochimiques de ces enzymes dépendent autant de la qualité de cette interface que de certains paramètres classiques tels que le pH ou la force ionique [3].

Les lipases et les estérases sont des biocatalyseurs importants et sont particulièrement adaptés pour des applications industrielles, comme ils sont très stables et actif dans des solvants organiques [86].

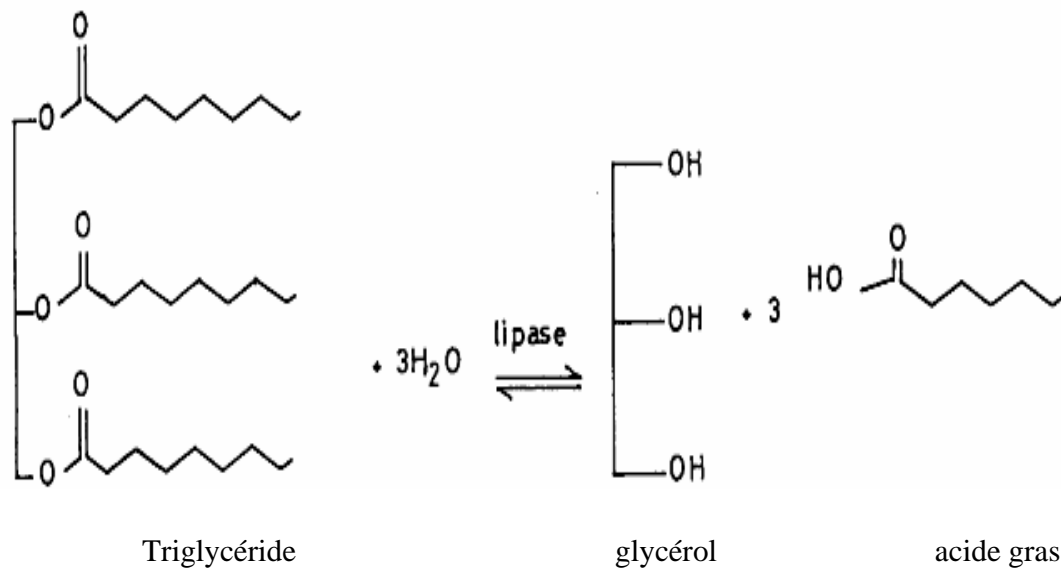


Figure 1 : Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride [1] [75].

2.2. Origines des lipases

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 des nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires [71] [5].

2.2.1. 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 (*oil bodies*). Sous l'action de lipase ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante [5].

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes. Le premier groupe est constitué par les triacylglycérols hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de

l'altération des graines pendant le stockage. Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes 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 monoglycérides lipases. Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D [147].

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 [5].

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 [147] [5].

2.2.2. 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 [42] [5].

Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et leur absorption. Il s'agit de la lipase gastrique, de la lipase pancréatique, de la lipoprotéine lipases et de la lipase hépatique. Des études de la structure de leurs gènes suggèrent que ces différents enzymes dérivent d'un ancêtre commun [5].

2.2.2.1. Les lipases gastriques :

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 proche de 1 et elle est résistante à la pepsine ainsi qu'aux protéases gastriques [146].

2.2.2.2. Les lipases pancréatiques :

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. Au niveau jéjunal, les sels biliaires émulsifient les triglycérides alimentaires liposolubles, afin de permettre à la lipase pancréatique hydrosoluble d'agir sur l'interface lipide-eau. Il se produit ainsi une lipolyse destinée à permettre la résorption intestinale des graisses [42].

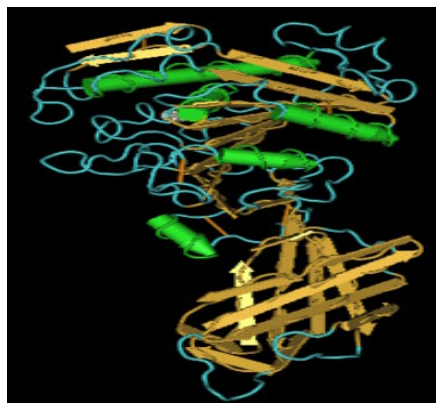


Figure 2 : Schéma présenté d'une lipase pancréatique du cochons.

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 présence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'interface lipide / eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques [142].

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 [42] [140].

2.2.2.3. La lipoprotéine lipase :

Elle joue un rôle dans le métabolisme intermédiaire des lipides. Elle permet l'hydrolyse et l'adsorption, par les tissus, des triglycérides transportés dans le sang sous forme de lipoprotéines (*VLDL, LDL, HDL*) [145].

2.2.2.4. La lipase hépatique :

Elle 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 transestérification entre glycérides [5].

2.2.3. Les lipases microbiennes :

Les lipases sont largement ré pondues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram (+) telles que celles de genres *Bacillus* et *Staphylococcus que* par des bactéries Gram (-) telles que *Pseudomonas*. Elles sont également largement ré pondues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotricum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* [136].

L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années, principalement en raison du grand nombre d'application qu'elles offrent dans des domaines très variés [2]. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animal et d'autre part, d'avoir une 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] [44].

2.2.4. Les cutinases :

Les cutinases sont des enzymes produites par différents champignons pathogènes et phytopathogènes tels que *Fusarium solani*, qui est l'agent responsable de la formation de mycétome chez l'homme ou tels que *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* qui est responsable de la pourriture de la racine et du collet chez de tomate et certaines céréales. Elles sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et estérases à la différence qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces. Comme elles sont actives aussi bien en solution moléculaire vraie qu'en système biphasique, les cutinases sont en quelque sorte le lien entre estérases et lipases [79] [5].

Les cutinases sont capables de dégrader la cuticule des végétaux en clivant les liaisons esters des polymères de cutine. Elles sont également capables d'hydrolyser des triglycérides à courtes chaînes d'acides gras avec une efficacité comparable à celle de lipase pancréatique [135].

2.3. Classification des lipases bactériennes :

Les lipases microbiennes ont été regroupées en plusieurs sous-familles sur la base de leurs séquences en acides aminés ainsi que des propriétés biologiques fondamentales [53]. Cette classification permet de prédire les caractéristiques structurales comme les résidus du site catalytique ou la présence de ponts disulfures, le mécanisme de sécrétion et l'exigence d'une protéine chaperonne spécifique à certaines lipases, et les relations potentielles avec d'autres familles d'enzymes [43]. Elle permet aussi une identification plus facile et plus rapide de nouvelles enzymes lipolytiques microbiennes [142].

Cependant la découverte constante de nouvelles lipases ainsi que leurs caractérisations conduiront à l'évolution de cette classification. Récemment, l'analyse de la relation séquence-structure – fonction de 1367 séquences protéiques correspondant aux 806 lipases répertoriées dans la base de données *LED (lipase Engineering Database)* à permis de les classer en 16 superfamilles et 38 familles homologues [43] [5]. Dans cette banque de données sont intégrées des informations sur la séquence, la structure et la fonction des lipases, des estérases et des protéines apparentées [82] [142] (**Tableau 1**).

La famille I : elle comprend un total de 22 membres divisé en 7 sous-familles [44]. Les sous-familles I-1 et I-2 : les lipases de *Pseudomonas* de groupe I et II sont codées ensemble dans un opéron avec leur analogue chaperonne intramoléculaire qui ont été désignés *Lif* (*lipase spécifique foldases*) [1].

Ces lipases sont secrétées via le chemin de type II tandis que ceux appartenant à la sous-famille I-3 utilisent le chemin de sécrétion de type I [48].

Les lipases de *Bacillus* regroupées en sous-famille I-4 sont les plus petites connues avec une masse moléculaire de 19.6 KDa. Elles semblent être bien adaptées pour les applications de la biotechnologie c'est comme la lipase de *B. thermocatenulatus* appartenant à la sous-famille I-5 [114]. La lipase de *Staphylococcus hyicus* et *S. aureus* appartiennent aux meilleures lipases provenant des bactéries Gram positives [82] [138].

La famille II : elle a été décrite auparavant comme une nouvelle famille des enzymes lipolytiques avec une fonction inconnue. Jaeger K. E. et al. (1993) ont ajouté à cette famille l'estérase qui est située dans la membrane externe de *P. aeruginosa* [52].

La famille III : Les membres de famille III contiennent les lipases extracellulaires de *Streptomyces sp.* et la souche psychrophile de *Moraxella sp.* [51].

La famille IV : Les membres de cette famille appartiennent au groupe de lipases de bactéries psychrophiles adaptées au froid (*Moraxella sp.*, *Pseudomonas sp.*) [54]. Leurs lipases montrent une similitude aux lipases de mammifères sensibles aux hormones. **La famille V** présente des analogies structurelles aux : déhalogénases, haloperoxydases et époxydes hydrolases, qui exprime probablement le plie α/β hydrolases comme une caractéristique de structure tertiaire [82].

La famille VI : Elle classe les estérases qui ont été identifiées à partir de séquences génomiques (*Synechocystis sp.*, *chlamydia trachomatis*). Ces petites protéines sont probablement situées dans le cytoplasme bactérien avec une similarité au lysophospholipases de mammalien [82].

Tableau N° 1 : Classification de lipases bactériennes [82] [44].

Famille	sous famille	souches productrices d'enzyme	N° accession	Similitude %	Propriété
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa (LipA)</i>	D50587	100	Lipase vraie
		<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Pseudomonas aeruginosa (LipC)</i>	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	
		<i>Chromobacterium viscosum</i>	Q05489	35	
		<i>Burkholderia cepacia</i>	M58494	33	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens SIKW1</i>	D11455	14	
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	
	4	<i>Bacillus subtilis (LipA)</i>	M74010	16	
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	
		<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	
		<i>Bacillus subtilis (LipB)</i>	C69652	17	
	5	<i>Geobacillus stearothermophilus L1</i>	U78785	15	
		<i>Geobacillus stearothermophilus P1</i>	AF237623	15	
		<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	
		<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	AF134840	14	
	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	Phospholipase
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	14	
		<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14		
	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	U80063	14		

II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100	o.m.-bound esterase
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31	Acyltransferase
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17	o.m.-bound esterase
	<i>Photobacterium luminescens</i>	P40601	17	
	<i>Streptomyces scabies</i> ^a	M57297	15	
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i> ^a	M86351	100	Extracellular lipase
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82	
	<i>Moraxella sp.</i>	X53053	33	Lipase 1
IV	<i>Moraxella sp.</i>	X53868	100	Lipase 2
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28	Carboxylesterase
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25	
	<i>Pseudomonas sp. B11-1</i>	AF034088	24	
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24	
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	Esterase
V	<i>Moraxella sp.</i>	X53869	100	Lipase 3
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34	PHA-depolymerase
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34	Putative esterase
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	25	Esterase
VI	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	15	Esterase
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a	S79600	100	Esterases
	<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	24	

2.4. Lipases comme biocatalyseurs :

Les lipases peuvent catalyser un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification sans oublier les réactions d'alcoolyse et d'acidolyse. Cette particularité des lipases de catalyser diverses réactions en fonction du microenvironnement de l'enzyme, ainsi que leurs spécificités et leurs conditions douces de réactions, les rendent intéressantes du point de vue industriel [5] [37].

Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse tel que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres, nucléophiles tels que des amines ou des thiols (**Figure 3**) [112].

2.4.1. Réaction d'hydrolyse :

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles et des graisses. L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras, ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification [82] [38].

2.4.2. Réaction de synthèse :

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters : la quantité d'eau du milieu détermine le type de la réaction favorisée. Dans les réactions d'estérification à l'aide de biocatalyseurs, l'eau est un produit de la réaction. A partir d'une certaine teneur, elle affecte l'équilibre de la réaction entraînant la réaction inverse : l'hydrolyse [1] [54].

2.4.2.1. La transestérification :

La transestérification comprend trois réactions qui sont: interestérification, alcoolyse et acidolyse. Elle implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) [37] [38].

A) Interestérisation :

Lors de la réaction d'interestérisation un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras [1]. Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'applications à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardio- vasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérisation). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industries de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains [47] [112].

L'utilisation des solvants en interestérisation nécessite une désodorisation du produit final, en revanche l'interestérisation enzymatique réalisée en absence de solvants organiques, est une très bonne alternative. De plus l'utilisation de lipases spécifiques des positions sn 1 et sn 3 des triglycérides, permet d'obtenir des produits avec des caractéristiques qui ne pourraient pas être obtenues par interestérisation chimique [38].

B) Alcoolyse : C'est une réaction d'un ester avec un alcool monovalent tel que l'éthanol et butanol ou un alcool polyvalent tel que la glycérine pour produire un ester avec des différents groupes d'alkyl [112] [81].

c) Acidolyse : C'est une réaction d'un ester avec un acide qui mène à un changement de groupe acyle (un groupe acyle est transféré à un acide gras) [81].

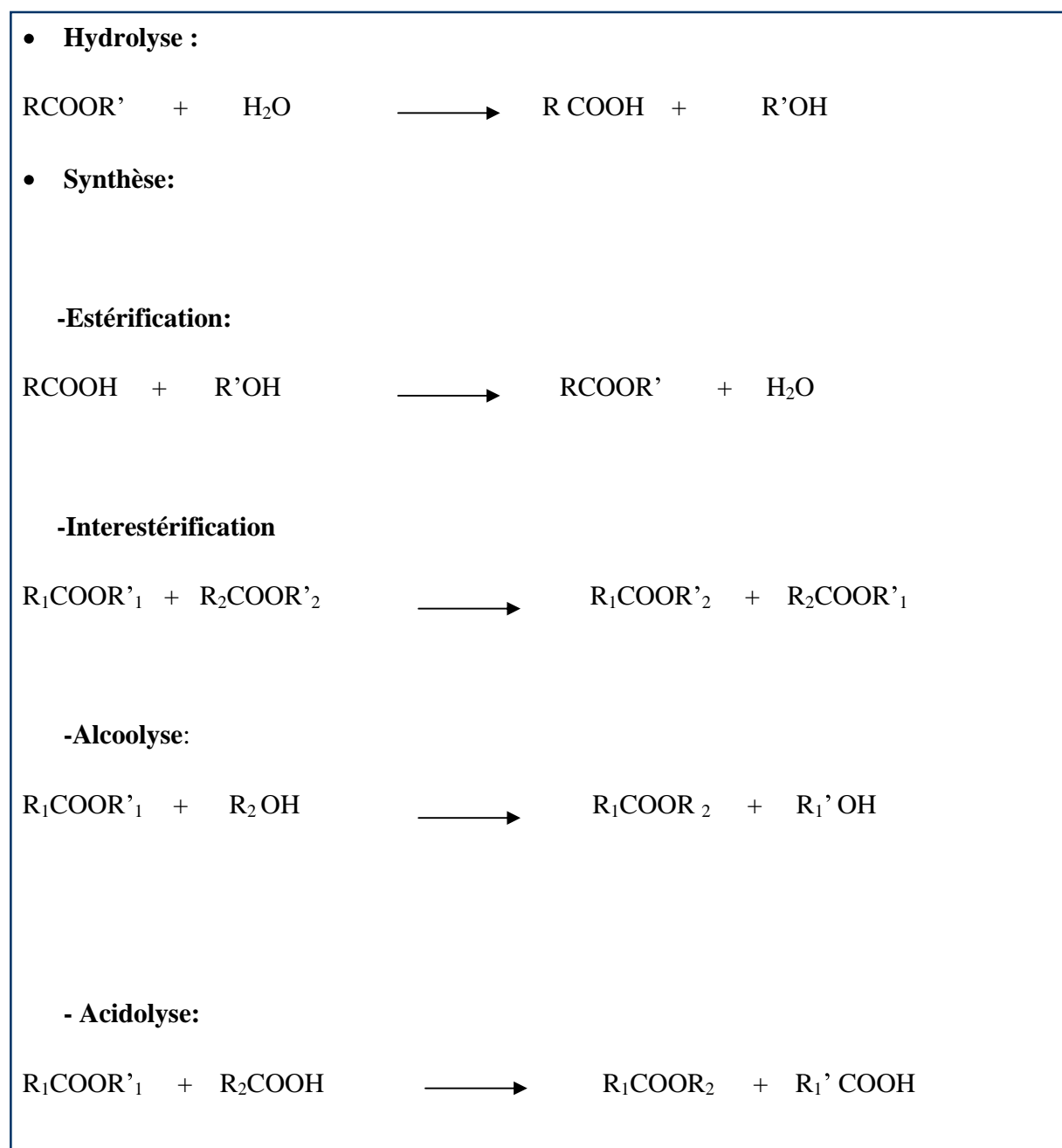


Figure 3 : Réactions catalysées par les lipases [47] [40].

2.5. Spécificité des lipases

La spécificité d'action des lipases par rapport aux triacylglycérols fait appel à trois notions différentes :

2.5.1. La typosélectivité :

La typosélectivité ou spécificité par rapport à un type d'acide gras donné, les lipases peuvent être également spécifiques vis-à-vis de l'acide gras. La lipase de *Geotrichum candidum* est spécifique des acides cis-9 insaturés, et ceci quelque soit leur position sur le glycérol [134] [53] [142] et celle de *Penicillium requeforti* est spécifique des acides gras à courte chaîne [5].

2.5.2. La régiosélectivité :

La régiosélectivité ou spécificité de position ; qui représente le pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les esters primaires (en position externe sn-1 ou sn-3) ou secondaires (en position interne sn-2) des triacylglycérols [49]. La lipase pancréatique humaine (HPL), la lipase pancréatique porcine (PPL) et la lipase de *Rhizopus arrhizus* (RAL) sont ainsi régiosélectives vis-à-vis des esters d'alcools primaires en position sn-1 et sn-3 des triglycérides [53]. Les lipases de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus acnes* et de *Chromobacterium viscosum* hydrolysent indifféremment les positions sn-1, sn-2, sn-3 tandis que celles de *Pseudomonas geniculata* et de *P. fragi* sont spécifiques de la position sn-1 et sn-2. Les lipases de *Pseudomonas glumae* et de *Pseudomonas fluorescens* semble quant à elles être spécifiques de la position sn-2 [5]

L'hydrolyse de groupements esters en position sn-2 est catalysée par très peu d'enzymes et seule la lipase de *Candida antarctica* a montré une préférence nette pour cette position [134].

Certaines lipases hydrolysent indifféremment tous types de liaisons esters des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* et de *P. cepacia* (**Figure 4**) [53] [38] [5].

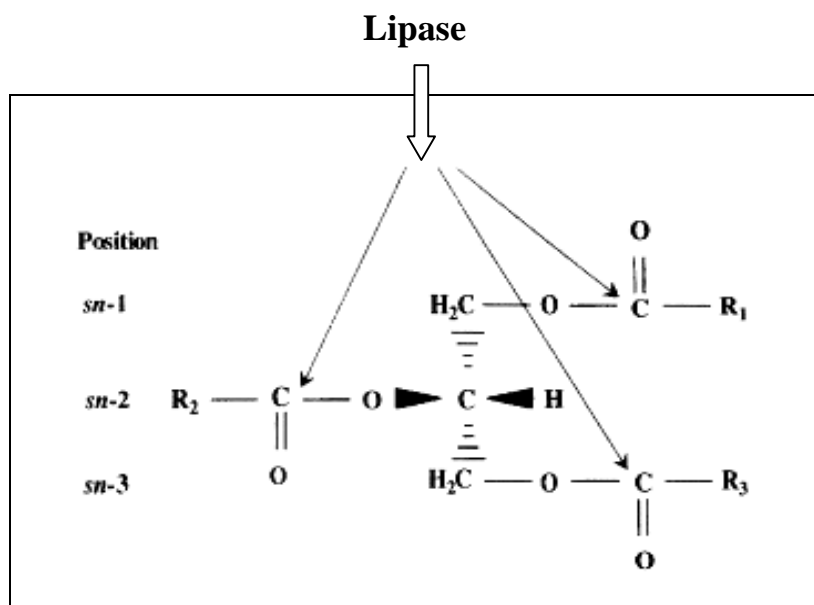


Figure 4 : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases [49].

2.5.3. Enantiosélectivité :

L'énantiosélectivité c'est la capacité d'une lipase à discriminer entre deux énantiomères d'un mélange racémique, dans le cas d'une molécule chirale (par exemple des triacylglycérols comportant trois acides gras différents) [45]. Dans le cas de molécules prochirales (triacylglycerols comportant trois acides gras identiques), la stéréosélectivité représente la capacité de discriminer un groupement stéréo hétérotopique mais homomorphique par rapport à l'autre (positions *sn*-1 contre *sn*-3) [133] [144].

2.6. Séquence, structure et mécanismes d'hydrolyse :

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique [111].

Les lipases sont des enzymes très variables de par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 KDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 KDa. Les premières structures cristallographiques publiées ont été celles de lipases du champignon filamentueux *Rhizomucor miehei* et de lipase pancréatique humaine [5] [140].

Bien que les séquences peptidiques montrent très peu des similitudes entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle [5].

2.6.1. Les α/β hydrolases :

Le repliement α/β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la diènelactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins β connectés par 6 hélices α formant un repliement dit : α/β (Figure 5).

Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que la spécificité de substrats. Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu) dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est : Ser – Asp / glu-His [36] [43].

De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans la penta peptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable. Ce penta peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5^{ème} brin β et immédiatement suivi d'une hélice α . L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxyle-terminale du dernier brin de feuillet constituant le repliement α/β tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7^{ème} brin, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6^{ème} brin [43] [5].

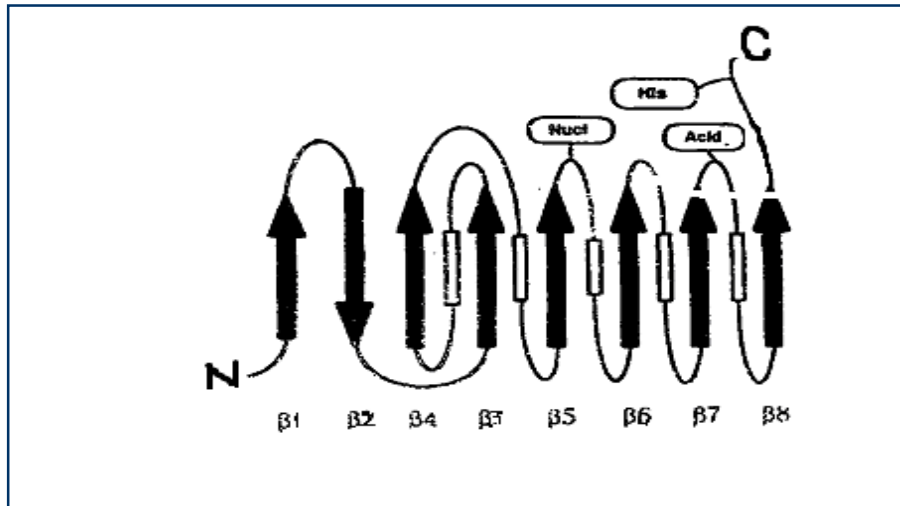


Figure 5 : Schéma de repliement α/β [53].

2.6.2. Mécanismes enzymatiques d'hydrolyse :

Le mécanisme enzymatique des lipases montre quelques similitudes avec celui des protéases à sérine active. Contrairement aux autres hydrolases, le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice α amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet (*lid*). Lorsque cette hélice α recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette conformation, la face hydrophobe de cette hélice amphiphile est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site actif tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Le substrat ne peut donc pas être en interaction avec la triade catalytique [5].

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme et suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y a un déplacement de l'hélice constituant le volet. La face hydrophobe de l'hélice orientée auparavant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau / corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible aux substrats [37].

La résolution de structures cristallographiques des lipases de *R. miehei*, de *Geotrichum candidum* et de la lipase pancréatique humaine [140], a permis de mettre en évidence l'existence de cette hélice amphiphile recouvrant le site catalytique. Cependant, Certaines lipases sont capables d'hydrolyser des lipides en dessous de leur concentration micellaire critique et il a montré que l'augmentation de leur concentration au-delà de leur *CMC* n'entraîne pas une brusque augmentation de la lipolyse. Pour

expliquer cette observation, l'hypothèse la plus plausible est qu'il existe, en solution aqueuse, un équilibre entre forme ouverte et forme fermée de l'enzyme et que le passage vers la forme ouverte correspond au déplacement de cette hélice α amphiphile recouvrant le site actif [53].

D'un autre côté, il a été démontré que même en deçà de leur CMC, Les molécules de substrat ont tendance à former de petits agrégats formant des micelles transitoires pouvant conduire au mécanisme d'activation interfaciale [5].

D'autre part, des études cinétiques et structurales d'enzymes lipolytiques telle que la cutinase de *Fusarium solani*, des lipases de *Candida antarctica*, de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 6**) et de *Bacillus subtilis* ainsi que de la lipase pancréatique du cochon d'Inde ont montré d'une part, qu'elles étaient actives sur des esters carboxyliques partiellement solubles en phase aqueuse (Tributyryne, butyrate de *p*-nitrophényl) et d'autre part, qu'elles ne présentaient pas de mécanismes d'activation interfaciale [146]. Pour certaines de ces enzymes, les analyses cristallographiques ont mis en évidence l'absence de l'hélice amphiphile recouvrant le site actif. En conséquence, ces lipases sont plutôt classer comme étant des estérases bien qu'étant capables d'hydrolyser des triglycérides à longues chaîne d'acides gras insolubles en phase aqueuse [134].

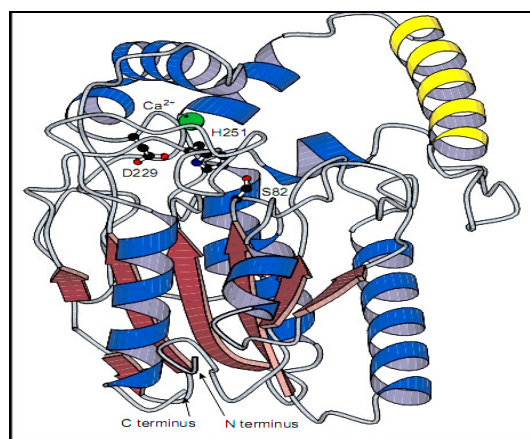


Figure 6 : Structure de la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Sur la base de données cristallographique, certains résidus, différent de ceux de la triade catalytique, semble être importants dans le mécanisme catalytique. Ces résidus forment ce que l'on

dénomme le trou de l'oxydation. Leur rôle serait essentiellement de stabiliser des intermédiaires tétraédriques. Pour la lipase de *Humicola lanuginosa*, l'azote des fonctions amides de *Ser* 83 et de *Leu* 147 ainsi que le groupement hydroxyle de la *Ser* 83 forme des liaisons hydrogène avec les intermédiaires tétraédriques. Dans le cas de la lipase de *Candida rugosa*, ce sont les azotes des fonctions amides des *Gly* 123 et *Gly* 124 ainsi que l'*Ala* 210 qui semble remplir la même fonction (**Figures 7 et 8**) [75].

L'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique peut se décomposer en six grandes étapes. Tout d'abord, le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (*Asp.*, *Glu*). Il résulte la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou de l'oxyanion. Par la suite il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme et attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau. Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou de l'oxyanion. Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale [4] [5].

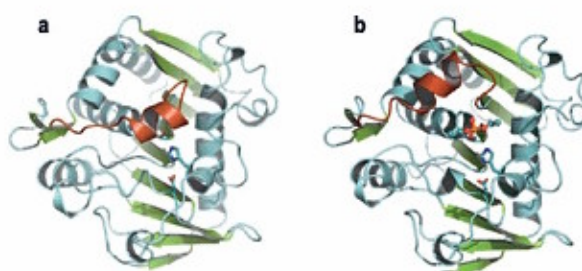


Fig. 7 : Représentation de conformation fermée (a) et ouverte (b) de la lipase de *Rhizomucor miehei* [48].

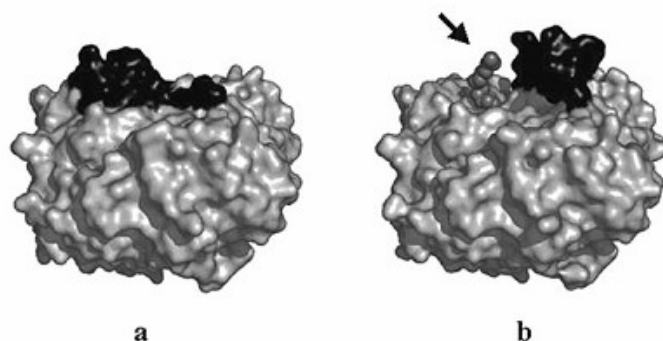


Figure 8 : Représentation de conformation fermée (a) et ouverte (b) de la lipase de *Candida rugosa* [43].

Le mécanisme d'action de la lipase pancréatique met en œuvre des phénomènes très complexes. Une Co-lipase est nécessaire pour assurer la fixation de l'enzyme sur le substrat. Le mécanisme d'activation interfaciale est dans ce cas sujet à controverse. En effet, **Hermoso et ses collaborateurs** ont démontré en 1997 que le système lipase-colipase-micelle (=sels biliaires) est activé dans l'eau avant de rejoindre l'interface [5].

2.6.3. Cinétique d'hydrolyse

2.6.3.1. L'activation interfaciale des enzymes lipolytiques

L'une des caractéristiques cinétiques la plus typique des enzymes lipolytiques est bien l'activation interfaciale. Ce phénomène a été décrit dès 1936 par *Holwerda* puis en 1945 par *Schonheyder* et *Volqvartz*. Ces derniers auteurs ont montré très clairement, en utilisant de la tricaproïne comme substrat pour la lipase pancréatique, la très faible hydrolyse d'une solution moléculaire vraie de ce substrat mais par contre une activité hydrolytique très élevée pour des concentrations en tricaproïne supérieures à sa limite de solubilité dans l'eau. En 1958, *Sarda* et *Desnuelle* ont établi une différence fondamentale entre un ester classique et la lipase pancréatique selon leurs capacités respectives à hydrolyser à une plus grande vitesse les substrats insolubles dans l'eau [3] [5].

Au contraire de l'estérase, qui possède un comportement classique de type Michaëlis -Menten, la lipase catalyse très faiblement l'hydrolyse du même substrat en solution monomérique vraie [148].

Cependant, au-delà de la limite de solubilité dans l'eau de la triacétine ; on observe une augmentation très importante de l'activité enzymatique sur le même substrat à l'état émulsifié. Apparemment, les estérases sont seulement actives sur les esters solubles dans l'eau tandis que les lipases constituent une catégorie particulière d'estérases capables d'hydrolyser rapidement des esters agrégés [1] [3]. Ce phénomène d'activation interfaciale est illustré sur la figure 9.

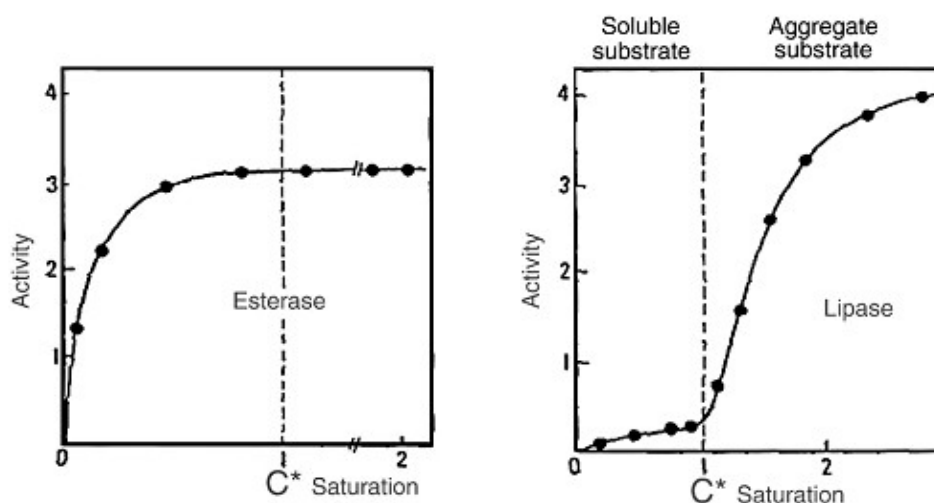


Figure 9 : Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat exprimée en multiple de la saturation [3] [5] [37].

Il a déjà été mentionné que les lipases agissent sur des composés insolubles en phase aqueuse et que la réaction se déroulait à l'interface eau/corps gras. De ces propriétés atypiques résulte une cinétique d'hydrolyse particulière. **La première étape** consiste en l'adsorption de l'enzyme à l'interface eau/l'huile selon un isotherme de Langmuir. La réaction se déroulant dans un système biphasique, la vitesse d'hydrolyse dépend non seulement de la quantité de substrat présent dans le milieu mais également de l'aire interfaciale [37] [141].

Cette adsorption provoquant l'activation de l'enzyme par déplacement de l'hélice α amphiphile recouvrant son site actif. **La seconde** consiste en la formation d'un complexe enzyme /substrat qui, après hydrolyse, conduit aux produits de la réaction. Cette seconde étape peut être décrite par un modèle de Michaelis-Menten « interfaciale » dans lequel les concentrations en substrat sont exprimées en mode par unité de surface plutôt qu'en mole par unité de volume [3] [1] [5].

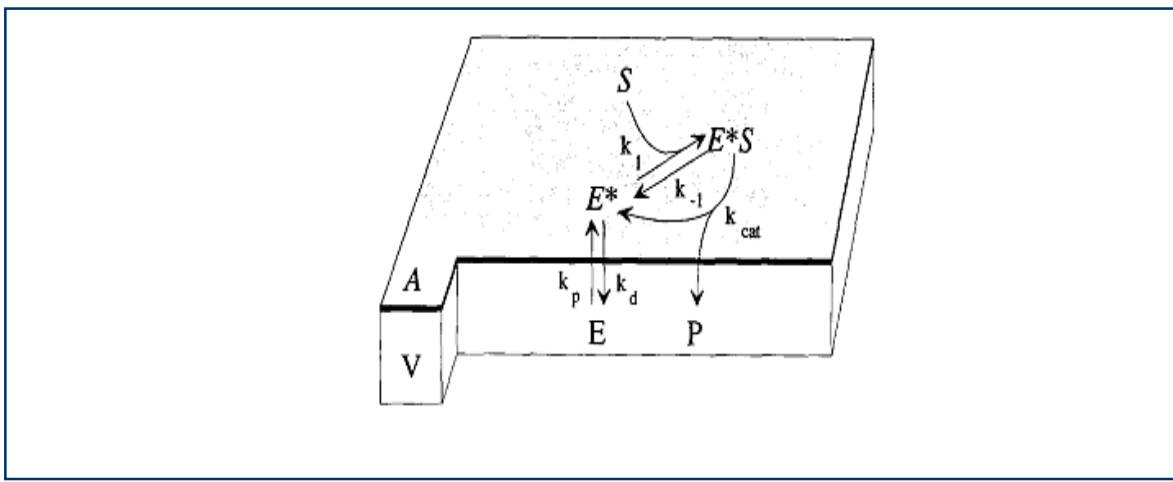


Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme d'activation interfaciale de lipase sur un substrat insoluble. [3][37] [101].

Dans ce mécanisme, il y a dans un premier temps fixation du substrat A sur l'enzyme pour former le complexe EA avec libération du premier produit. Le second substrat nucléophile B se fixe sur le complexe acyl-enzyme E' pour aboutir au complexe E' B. Ce dernier subit un réarrangement pour libérer le second produit Q et l'enzyme E régénérer (**Figure 10**) [1] [37].

2.7. Facteurs influençant la production de lipase :

Des études quantitatives sur la production de lipase et les facteurs modifiant la libération de l'enzyme dans le milieu de croissance, ont été décrites chez de nombreux microorganismes [2].

L'influence de la composition du milieu sur la production de quelques lipases est bien connue. Dans la majorité des cas, les milieux complexes comme le bouillon nutritif, les bouillons à peptones ou à l'hydrolyse de caséine additionnés d'extrait de levure, sont révélés d'excellents supports pour la croissance et la production de lipase chez de nombreux microorganismes : *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus freudenreihii*. Parfois l'addition d'une petite quantité de glucose semble nécessaire, notamment chez *Candida lipolytica* ; par contre, ce même composé à concentration trop élevée devient inhibiteur pour la production de l'enzyme. Cet effet a été également illustré chez *Geotrichum candidum* et chez *Pseudomonas fluorescens* [1] [145].

2.7.1. Effet du pH et de la température sur les lipases :

Le pH optimum de l'activité lipasique est généralement autour de 7. Le pH agit non seulement sur l'activité enzymatique mais aussi sur les propriétés de l'interface dans un système multiphasique, sur la solubilité des réactifs dans le milieu, ainsi que sur le partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et l'interface. Les lipases bactériennes ont généralement un pH optimum légèrement basique (8 – 8,5), alors que les lipases d'origine fongique ont un pH légèrement acide, avec par exemple, un pH optimum de 6,0 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica*, 6,5 pour la lipase de *Geotrichum candidum*, et 5,6 pour la lipase de *Rhizopus delemar*. Cependant, il existe des lipases possédant une activité à des pH plus extrêmes, comme la lipase gastrique qui est stable et active jusqu'à pH 2,0. Les lipases de *Pseudomonas fragi*, *Mucor javanicus* ont un pH optimum situé entre 8 et 10 tandis que la lipase de *Torulopsis sp.* conserve 80% de son activité à pH 3,0 [121] [2].

D'autre part, certaines lipases sont stables et actives dans une large gamme de valeurs de pH. La lipase de *Pseudomonas cepacia* [149] conserve 100% de son activité après son incubation pendant 24 h à 30°C pour une gamme de pH variant de 3 à 11 tandis que celle de *Fusarium heterosporum* est stable dans une gamme de pH variant de 4 à 10 [121] [39].

La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40°C. En général, les lipases d'origine végétale ou animale sont peu thermostables contrairement aux lipases microbiennes. En

effet, *Humicola lanuginosa* produit une lipase dont l'activité optimale est de 45°C tandis que pour certaines souches de *Pseudomonas fragi*, elle est de 75°C. D'autres lipases sont adaptées aux plus basses températures. C'est le cas de *Aspergillus niger* qui a une température optimale de 25°C ainsi que celle de *Pseudomonas fluorescens* qui possède encore 30% de son activité maximale à 1°C. [2]. La stabilité thermique est uniquement pour les espèces de *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* [45] [39].

2.7.2. Stabilité en solvant organique :

La plupart des lipases microbiennes sont stables dans de nombreux solvants organiques et ne requièrent pas de cofacteur pour être actives. On peut les utiliser en tant qu'hydrolase ou comme catalyseur en synthèse organique. La stabilité dans les solvants organiques est désirable dans la réaction de synthèse. En littérature disponible, les lipases sont généralement stables dans les solvants organiques, avec un peu d'exceptions de stimulation ou d'inhibition [39] [56].

- L'acétone, l'éthanol et méthanol ont augmenté l'activité de la lipase de *B. thermocatenuatus*. Par contre, l'acétone est un inhibiteur pour la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* YS-7 et l'hexane pour la lipase de *Bacillus* [117]. La lipase de *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 est très instable avec plusieurs solvants organiques [59].

2.7.3. Effet d'ions du métal

L'hydrolyse catalysée par une lipase peut être affectée par la présence de différents cations (Ca^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , K^+) et activée en présence de sels biliaires [2]. Les cofacteurs ne sont pas exigés généralement pour l'activité de lipase, mais les cations bivalents tels que le calcium stimulent souvent l'activité enzymatique [53] [45].

Les lipases stimulées par le calcium ont été rapportées dans le cas de *B. subtilis*, *B. thermoleovorans* ID, *P. aeruginosa* EF2, *S. aureus* 226, *S. hyicus*, *C. viscosum* et *Acinetobacter. sp.* Par contre, la lipase de *P. aeruginosa* 10145 est inhibée par la présence d'ions du calcium [39].

2-8 Microorganismes producteurs de lipases :

De nombreux microorganismes sécrètent des lipases dans le milieu de culture. *Hou* et *Johnston* (1992) ont criblés 1229 bactéries, levures, actinomycètes et champignons sur des plaques d'agar contenant de l'huile de Soja et de la rhodamine B et ils ont trouvé qu'environ 25 % de ces microorganismes présentent une activité lipolytique. La présence de lipases chez de nombreux micro-organismes leur permet d'utiliser des «sources non-conventionnelles» de carbone comme les triglycérides ou d'autres lipides contenant des liaisons ester [2] [142]. Quelques exemples de microorganismes lipolytiques sont rassemblés et regroupés dans le **Tableau 2**.

Yarrowia lipolytica est généralement considérée comme l'espèce de levure le plus lipolytique. Trois lipases ont été isolées chez cette espèce ; Un est exocellulaire et deux sont liées à la paroi. La production de ces trois lipases est induite par l'acide oléique. Elles ont une activité optimale à pH 8 et à 37°C suivant les levures ces systèmes enzymatiques sont capables d'hydrolyser spécifiquement des acides gras de longueurs différentes [36] [112]. La production de lipases extracellulaires peut être constitutive comme pour *Calvatia gigantea*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Rhodotorula glutinis*, mais elle peut aussi être induite par des substrats lipidiques comme chez *Candida rugosa*, *Geotrichium candidum* et *Yarrowia lipolytica* [142].

Dans le passé, la sélection et l'isolement des microorganismes producteurs de lipases à partir des échantillons du sol ou d'autres matières biologiques a été portée le plus fréquemment dans un milieu solide contenant des triglycérides simples comme substrat, l'activité lipasique a été détectée par des zones claires due à l'hydrolyse de triglycérides [41].

D'autres méthodes de criblages font l'usage des méthodes titrimétriques [7] [151]. Screening de l'activité lipasique utilisant milieu solide qui contient le tween 80 en combinaison avec Nile-bleu a aussi été décrit [2]. Récemment, le système de criblage utilisant des substrats chromogènes a été décrit [76]. Cependant, ces systèmes de screening ne détectent pas toujours des lipases à partir de consortiums. De plus, quelques-uns de ces substrats ne sont pas convenables de détecter les lipases vrais parce qu'ils sont aussi hydrolysés par des estérases. La Rhodamine B a été employée pour le criblage des lipases bactériennes par UV [10].

Tableau N° 2 : Criblage de microorganismes producteurs de lipases.

La source de la lipase	Genres	Espèces	Références
Bactéries (Gram positives)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	[34]
		<i>B. stearothermophilus</i>	[97]
		<i>B. subtilis</i>	[155]
		<i>B. sp CR 179</i>	[18]
		<i>B. lickniformis</i>	[94]
		<i>B. coagulans</i>	[100]
		<i>B. thermoleovorans</i>	[114]
	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus zalihae</i>	[96]
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. hyicus</i>	[138]
		<i>S. saprophyticus</i>	[33]
<i>S. xylosus</i>		[6]	
<i>S. warneri</i>		[120]	
<i>S. epidermidis</i>		[1]	
<i>Micrococcus</i>	<i>M. freudenreichii</i>	[136]	
<i>Propionibacterium</i>	<i>Pr. freudenreichii</i>	[115]	
<i>Clostridium</i>	<i>C. tetanomorphum</i>	[98]	
<i>Halobacteria</i>	<i>Halobacteria sp.</i>	[101]	
<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	[153]	

Bactéries (Gram négatives)	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp.</i> <i>Bu. glumae</i>	[24] [58]
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fragi</i>	[62] [136]
		<i>P. mendocina</i>	[62]
		<i>P. putida 3SK</i>	[88]
		<i>P. monteilli</i>	[90]
		<i>P. aeruginosa</i>	[60]
		<i>P. cepacia</i>	[149]
		<i>P. fluorescens</i>	[150]
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Aci. pseudoalcaligenes</i>	[73]
		<i>Aci. calcoaceticus</i>	[59]
<i>Aci. lwoffii</i>		[91]	
<i>Aeromonas</i>	<i>Ae. hydrophila</i>	[124]	
	<i>Ae. sobria LP004</i>	[93]	
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	[57]	
<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas maltophila</i>	[119]	
Actinomycètes	<i>Streptomyces</i>	<i>Str. coelicolor</i>	[27]
		<i>Str. cinnamomeus</i>	[51]
		<i>Str. fradiae</i>	[137]
Champignons	<i>Penicillium</i>	<i>Pe. cyclopium</i>	[70]
		<i>Pe. citrinum</i>	
		<i>Pe. roqueforti</i>	
		<i>Pe. fusiculosum</i>	
		<i>Pe. camambertii</i>	
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. nidulans</i>	[113]
<i>A. flavus</i>			
<i>A. niger</i>			
<i>A. oryzae</i>			
<i>A. carneus</i>			
<i>Mucor</i>	<i>Mucor miehei</i> <i>Mucor mucido</i>	[61]	

levures	<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum sp.</i> <i>G. candidum</i>	[83] [134]
	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	[118] [130]
	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. cylindracea</i>	[152] [154] [64] [154]
	<i>Thermomyces</i>	<i>T. lanuginosus</i>	[89]
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	[132][112] [142]
	<i>Issatchenkia</i>	<i>I. orientalis</i>	[87]
	<i>Humicola</i>	<i>H. lanuginosa</i>	[154]

2.9. Applications biotechnologiques de lipase :

Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel. Cet intérêt provient principalement du fait d'une part, que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre pour les produire sont relativement simple [2] [154].

Elles présentent une large gamme de spécificité de substrat et une grande énantiosélectivité. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés. Quelques applications de l'utilisation des lipases sont résumées dans **le tableau 3**.

2.9.1. Les lipases en tant qu'hydrolases

2.9.1.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire :

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes, y compris le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras ; ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur [142]. Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis) [79].

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages. L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l'enzyme utilisé, à la libération d'acides gras à courte chaîne (C_4 - C_6) ou à plus longue chaîne (C_{12} - C_{14}), ce qui donne des arômes plus au moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'interestérisation d'huile et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels [2] [5].

2.9.1.2. Applications dans les détergents

Les taches d'huile et de graisse ont toujours été difficiles à enlever. Souvent, on n'y parvenait qu'en cuisant le linge. Mais bon nombre de textiles modernes doivent être lavés à températures modérées, ce qui rend la tâche plus ardue encore. Les lipases apportent une aide précieuse dans ce domaine. Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases [4] [142].

Elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, par exemple de rouge à lèvres, de beurre, d'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules [2] [5].

2.9.1.3. Applications en bioremédiation :

Les milieux aquatiques d'eau douce ou d'eau salée, ainsi que les sols, sont fréquemment contaminés par les huiles minérales. Ces contaminations constituent un problème environnemental et écologique majeur [142].

Les lipases sont utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agro-alimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut entraîner le colmatage des canalisations. L'addition de lipases ou la culture dans ces effluents, permet d'en réduire la charge en lipide. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures. La bioremédiation est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués [40] [79].

2.9.1.4. Applications en tannerie

Les lipases sont également couramment utilisées en tannerie. Avant le tannage, les peaux sont lavées dans des bains alcalins (pH 8-13) en présence de lipases de façon à pouvoir éliminer les graisses sous cutanées. L'utilisation de lipases permet de diminuer la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques [79] [5].

2.9.1.5. Applications dans l'industrie du papier

Actuellement, le premier ennemi dans l'industrie du papier est la poix. Ce mélange mou et collant, à base de résine et de goudrons végétaux, produit durant la fabrication de la pâte de bois, nuit à la qualité du papier. Ce sont en majorité les TG, le sitostérol et les esters de sitostérol qui posent des problèmes dans la fabrication mécanique de la pâte à papier à partir des résineux. L'entreprise japonaise a développé un procédé d'hydrolyse de ces esters par addition de lipases, ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier. Ce procédé est utilisé à une échelle de plusieurs centaines de tonnes de bois par jour [2] [4] [79] [154].

2.9.2. En synthèse organique

Les lipases sont devenues un des groupes les plus importants d'enzymes pour ses applications dans les synthèses organiques [43].

Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras poly insaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final. Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyl laurate) est utilisé en industries cosmétiques [2].

2.9.2.1. Les lipases en industries cosmétique :

Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arôme soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7-octadien-1-ol qui présentent un arôme de rose ou soit par estérification directe. En effet, de nombreux esters de faibles masses moléculaires tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle sont des constituants d'arôme. Ils sont obtenus à partir de l'alcool et de l'acide correspondant en système non aqueux en présence de lipases de *C. antarctica* ou de *R. miehei* sous forme immobilisée. Les rétinoïdes (vitamine A et dérivés) sont de grand potentiel commercial dans les produits de beauté et de médicaments tels que produits du soin de la peau. Les dérivés du rétinol solubles dans l'eau ont été préparés par réaction catalytique de lipase immobilisée [44] [79].

2.9.2.2. Application médicale et pharmaceutique :

Les lipases sont largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse des médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif. C'est le cas de la nikkomycin-B, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de certains agents antimoraux, de certains antibiotiques ou vitamines. Par exemple, le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont l'énantiomère (S) est 28 fois plus actif que l'énantiomère R [44].

Les Lipases de *Candida rugosa* ont été utilisées pour synthétiser lovastatin, une drogue qui diminue le taux de cholestérol du sérum. L'hydrolyse asymétrique de 3-phenylglycidic ester acide qui est une clef intermédiaire dans la synthèse d'hydrochloride du diltiazem, un vasodilatateur coronaire largement utilisé, a été emportée avec *S. marcescens* [79].

Les lipases de *Burkholderia plantarii* et de *Serratia marcescens* sont utilisées aussi pour la production de (2R, 3S)-3-(4-méthoxyphényle) méthyle glycidate employés dans la synthèse d'un antagoniste du calcium: le Diltiazem TM [4][112].

2.9.2.3. Résolution de mélanges racémiques :

Parmi les enzymes hydrolytiques, les lipases sont les plus couramment utilisées pour la résolution des mélanges racémiques visant à obtenir des molécules de haute pureté optique. Les lipases sont ainsi impliquées dans un nombre croissant d'étapes de synthèse et concurrencent diverses techniques plus classiques parmi lesquelles nous pouvons citer la recristallisation fractionnée avec des sels chiraux, la résolution chimique par condensation de réactifs asymétriques ou la séparation sur des colonnes de chromatographie préparative chirale [2] [79].

2.9.2.4. Production de polymères biodégradables :

Lipases peut être utilisé comme biocatalyseur dans la production des composés biodégradables utiles. L'oléate du butyle a été produit par estérification direct de butanol et d'acide oléique pour diminuer la viscosité de biodiesel dans l'usage hivernal. Les esters Trimethylol propane ont aussi été synthétisés de la même façon comme lubrifiants. Lipases peut catalyser des synthèses d'ester et des transestérifications. Les polyesters aromatiques peuvent être synthétisés par des biocatalyseurs de lipases [2] [44] [79].

Tableau N° 3 : Quelques applications biotechnologiques de lipases [3].

Domaine d'application	Action principale	Utilisation
<p><u>Alimentation :</u></p> <p>-laiterie et boulangerie.</p> <p>-Brasserie.</p> <p>-boucherie, poissonnerie.</p> <p>-Huilerie.</p>	<p>-Hydrolyse des lipides.</p> <p>-Hydrolyse des lipides.</p> <p>-Hydrolyse des lipides.</p> <p>-Inter estérification des huiles naturelles.</p>	<p>-Modification de la saveur et conservation.</p> <p>-modification de l'arôme et accélération de la fermentation.</p> <p>-Développement de la saveur et l'élimination de l'excès de graisse.</p> <p>-Formulation des huiles, margarines et beurres.</p>
<p><u>Chimie fine :</u></p> <p>-Corps gras.</p> <p>-chimie analytique.</p> <p>-détergents ; dépollution.</p> <p>-cosmétique.</p>	<p>-Hydrolyse.</p> <p>-Estérification.</p> <p>-Hydrolyse des lipides.</p> <p>-Hydrolyse des lipides.</p> <p>-Hydrolyse des lipides.</p>	<p>-Production d'acides gras, mono et diglycérides.</p> <p>-Production d'esters et résolution de mélanges racémiques.</p> <p>-Dosage des glycérides et analyse de la distribution des acides gras.</p> <p>-Elimination des tâches, traitement des eaux grasses et dégraissage des cuirs.</p> <p>-Elimination de graisses et formulation.</p>
<p><u>Médecine et pharmacie</u></p>	<p>Hydrolyse des lipides.</p>	<p>-Traitement d'insuffisance pancréatique (malabsorption des graisses).</p> <p>-Analyse des triglycérides plasmatiques.</p> <p>-Synthèse stéréospécifique de produits pharmacologiquement actifs.</p>

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Screening de microorganismes producteurs de lipase :

3.1.1. Prélèvements et échantillonnages

Les échantillons destinés à l'isolement des microorganismes lipolytiques, ont été prélevés à partir de sites longuement et régulièrement contaminés par des substances lipidiques en l'occurrence de l'huile d'olive brute et/ou des déchets issus du processus de traitement des olives. Ainsi, plusieurs prélèvements ont été réalisés au niveau de petites exploitations traditionnelles implantées dans les régions de Azaba (Wilaya de Skikda) et également au niveau de la région de Oued Fragha (Wilaya de Guelma). En outre, des échantillons de sols, également contaminés par de l'huile d'olive, ont été prélevés aux alentours directs des exploitations.

3.1.2. Isolements des bactéries lipolytiques :

Selon l'origine du prélèvement, deux milieux gélosés ont ainsi été utilisés pour l'isolement des microorganismes lipolytiques. Il s'agit des milieux de culture ESTA (Extrait du sol- tributyrine-Agar) ainsi que la gélose nutritive à base de tween 80 qui ont été utilisés, respectivement, pour les isolements à partir des échantillons de sols et de l'huile d'olive.

3.1.2.1. Isolement des bactéries lipolytiques à partir des échantillons de sols :

L'isolement des bactéries lipolytiques à partir des différents échantillons de sols [25], a donc été effectué sur milieu *ESTA* (voir composition en annexes) [50].

Pour rappel, l'extrait du sol a été préparé par autoclavage à 120°C pendant 20 min d'un mélange de sol tamisé (100 g) et de Ca CO_3 (0.2 g). Afin de clarifier l'extrait obtenu, celui-ci est préalablement filtré puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à l'aide d'une centrifugeuse de type « NUVE N° 615 France » [16] [33].

3.1.2.2. Isolement des bactéries lipolytiques à partir des échantillons d'huile :

L'isolement des bactéries lipolytiques à partir des échantillons d'huile d'olive, a été réalisé cette fois-ci, sur milieu gélosé à base de Tween 80 (voir composition en annexes). Le pH est ajusté à 7, puis le milieu gélosé est autoclavé à 120 °C pendant 20 mn. Après stérilisation, le milieu de culture est, aseptiquement, additionné de 10 ml /l de Tween 80 stérile [23] [7].

3.1.3. Production de lipase :

Les souches bactériennes isolées sur les deux milieux de culture, précédemment cités, ont été individuellement testées pour la production d'enzymes lipolytiques.

3.1.3.1. Culture en milieu liquide :

Pour la production de lipases, le choix d'un milieu de fermentation approprié est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. Les bactéries isolées à partir des échantillons de sols ont ainsi été cultivées dans un milieu exclusivement minéral composé de : K_2HPO_4 (0.8g/L), KH_2PO_4 (6g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2g/L), $CaCl_2$ (0.05 g/L), NaCl (3g /L) et $FeSO_4$ (0.0001 g/L) [11] [16].

Ainsi, 10 ml d'une suspension bactérienne de 24h (DO=0,1), préalablement préparée, sont inoculés dans 50 ml du milieu de culture minéral stérile contenu dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml. Le substrat (huile d'olive), préalablement stérilisé par filtration à l'aide de filtres millipores (0,45 μ m de diamètre), est additionné au milieu à raison de 30 ml /L [96]. Puis, les erlenmeyers sont incubés pendant 72 heures à 30 °C sous agitation à 180 rpm [12] [15].

3.1.4. Etude de la croissance bactérienne :

L'étude de la croissance des souches bactériennes isolées a été réalisée dans le but de quantifier la production de lipases en fonction des différentes phases de croissance. Elle a été réalisée dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture semi synthétique liquide.

2 ml du substrat (huile d'olive) sont, ainsi, ajoutés au milieu de culture comme unique et seule source de carbone. L'incubation est réalisée à 30° C pendant 72 h à 180 rpm. Les cultures cellulaires (DO) sont mesurées à une longueur d'onde de 600 nm [65].

Compte tenu de la nature insoluble de l'huile dans l'eau [109], les mesures ont été effectuées selon la technique décrite par Heravi *et al* (2008). Ainsi, 1 ml de chacune des cultures bactériennes est aseptiquement prélevé puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min. Le culot obtenu est suspendu dans 1 ml de tampon phosphate (0.01M) à pH 7 [34].

La densité des cellules bactériennes est mesurée à 600 nm (DO_{600} nm) à l'aide d'un spectrophotomètre « modèle Secomam ». Elle a été suivie toutes les 4 heures pendant une période de 72 heures.

Par ailleurs, la croissance cellulaire a également été suivie par la mesure des poids secs de la biomasse au cours de la période d'incubation citée précédemment. Ainsi, 5 ml de chaque suspension bactérienne sont centrifugés à 5000 pendant 10 mn. Les culots obtenus sont remis en suspension dans 5 ml de tampons phosphate puis déposés dans des coupelles en aluminium. Celles-ci sont pesées puis soigneusement déposées dans un four pasteur pour séchage à 105°C pendant une nuit. A l'issue du séchage, les coupelles sont pesées une seconde fois. La différence de poids obtenue entre les deux pesées correspond au poids sec de la biomasse bactérienne [60].

3.1.5. Etude de l'activité lipolytique en fonction du substrat :

La capacité des bactéries isolées à utiliser une variété de substrats comme seule et unique source de carbone a été étudié en milieu liquide. Outre l'huile d'olive, les substrats ; tributyrine et tween 80 ont également été testés comme seul et unique source de carbone pour les souches bactériennes isolées [29].

Ainsi, 10 ml d'une suspension bactérienne de 24h ($DO=0,1$), préalablement préparée, sont inoculés dans 50 ml du milieu de culture minéral stérile contenu dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml. Le substrat préalablement stérilisé par filtration à l'aide de filtres millipores (0,45 μ m de diamètre), est additionné au milieu à raison de 40 ml /L. Puis, les erlenmeyers sont incubés pendant 72 heures à 30 °C sous agitation à 180 rpm [12] [15].

L'évolution de l'activité lipolytique ainsi que la densité optique ont été suivies toutes les 4 heures pendant une période de 72 heures [34].

3.1.6. Mise en évidence de l'activité lipasique

3.1.6. 1. Sur milieu gélosé à base de tributyrine :

Des tests de diffusion de la tributyrine dans le milieu gélosé ont été réalisés pour l'étude de l'activité lipolytique des souches isolées. Une émulsion de triglycéride à 1% est préparée après émulsification d'une solution de tributyrine à 50% par de la gomme arabique à 5%. Le mélange est homogénéisé pendant 3 min puis l'émulsion obtenue est autoclavée pendant 20 min à 121°C. Puis 15 ml de l'émulsion obtenue sont aseptiquement incorporés dans de la gélose nutritive préalablement fondue et refroidie [63].

L'activité lipolytique des souches est appréciée par la présence d'une zone de lyse autour de la colonie [77]. Le taux de clarification de l'émulsion permet d'évaluer le taux d'hydrolyse des triglycérides. Une méthode semi-quantitative peut être établie, en établissant une relation entre la largeur des zones de clarification et la quantité d'enzyme appliquée [89].

3.1.6. 2. Sur milieu gélosé à base de Tween 80 :

Le milieu décrit par Sierra (1957) a été utilisé pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel le monooléate sorbitane polyoxyéthylène (tween 80) est utilisé comme substrat lipidique [123] [89].

Le principe de cette méthode repose sur la précipitation des cristaux du sel de calcium de l'acide gras sous l'influence d'une lipase [77] [69]. Si la souche bactérienne possède une enzyme lipolytique, la précipitation des cristaux de savon calcique sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies. En outre, si l'activité lipasique est intense, la précipitation apparaît sous forme de cristaux visibles à l'œil nu. Ainsi, ces derniers peuvent être détectés aisément au microscope [55].

Les souches bactériennes sont doncensemencées sur de la gélose nutritive à base de Tween 80. Le substrat est additionné dans le milieu de culture, préalablement stérilisé, à une concentration de 10 ml /L [68].

L'apparition des précipitations opaques autour des colonies bactériennes a lieu au bout de 24 h à 72 h d'incubation à 30°C [55]. Les colonies isolées sont prélevées puis repiquées sur de la gélose nutritive inclinée en tubes. Leur entretien est assuré par une série de repiquages toutes les quatre semaines.

3.1.7. Dosage de l'activité lipasique :

De nombreuses méthodes destinées à mesurer l'activité lipasique ont été décrites dans la littérature. La plupart sont basées, soit sur la disparition des triglycérides ou bien sur la production des acides gras (AG) [117] [41].

Au cours de cette présente étude, l'activité lipasique a été mesurée, dans un premier temps, à l'aide du test quantitatif de titration des acides gras libérés par l'enzyme au sein d'une émulsion de triglycérides. Dans un deuxième temps, l'activité a été mesurée à l'aide d'un test colorimétrique, selon la méthode quantitative décrite par *Kordel* (1991) [66].

La solution enzymatique précédemment obtenue (section 3.1.3.1) a été utilisée pour le dosage de l'activité lipolytique.

3.1.7.1. Dosage de l'activité lipasique par titration des AG:

L'activité lipolytique a été déterminée, à l'aide d'un pH-mètre, à pH= 8 par titration des acides gras libérés avec une solution de Na OH (0.1N). Le substrat utilisé est une émulsion d'huile d'olive à 10 % (10 ml d'huile d'olive dans 90 ml de gomme arabique à 10 %) [14] a. Elle est obtenue au bout de 3 passages successifs du mélange dans un mixeur modèle Ultra-Turrax. Enfin, l'échantillon destiné au dosage de l'activité enzymatique est composé de 100 µl d'émulsion dilués dans 10 ml d'une solution contenant : 0.1M NaCl, 0.1M CaCl₂ et 1 mM Tris-HCl [144].

L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale (UI). Une unité d'activité lipolytique correspond à la libération d'une micromole d'acide gras par minute Gargouri *et al.* (1986) [42].

3.1.7.2. Dosage de l'activité lipasique par colorimétrie :

L'activité des lipases se résume à l'hydrolyse des esters d'acides gras. Les substrats permettant la détection de ces enzymes sont multiples. Certains sont incolores (huile d'olive), tandis que d'autres libèrent des radicaux colorés au cours de l'hydrolyse [108]. Cependant, un troisième groupe de substrats concerne ceux qui libèrent, après hydrolyse, un produit terminal pouvant être révélé par

des réactions colorées [117] [41]. Il est donc possible de rendre compte de l'attaque enzymatique en suivant par colorimétrie la disparition du substrat dans le milieu ou, mieux encore, l'apparition d'un des produits libérés par hydrolyse. Le choix du substrat, au cours de cette présente étude, a été porté sur le *p*-NPA [69].

Par ailleurs, des esters solubles comme le tween 20 et l'acétate de *p*-nitrophenol peuvent se substituer aux triglycérides. Une étude récente a révélé deux techniques de dosage de l'activité lipasique qui préconisent l'emploi d'esters dissous sachant que l'enzyme agit exclusivement sur les esters émulsifiés [63] [41].

L'activité lipolytique a été mesurée selon la méthode décrite par *Kordel* (1991) [66]. Différents esters de *p*-nitrophényle, sont hydrolysés, en présence de lipases, en *p*-nitrophénol et l'acide correspondant (figure 11). La libération du *p*-nitrophénol se traduit par l'apparition d'une coloration jaune qui est détectée à une longueur d'onde de 410 nm. Une cinétique enzymatique a donc été conduite à 37° C à l'aide d'un spectrophotomètre « modèle Secomam ».

Ainsi, la solution réactionnelle est composée d'un mélange de deux solutions : solution **A** (1 volume) et solution **B** (9 volumes).

La solution **A** est préparée à de *p*-NPA (50 mM) dissous dans 10 ml d'isopropanol à l'aide d'un sonicateur (6 min).

La solution **B** correspond à du tampon préparé à base de phosphates de potassium (50 mM ; pH=7). Ce tampon est utilisé en raison de l'instabilité du *p*-NPA aux pH supérieurs à 7 [84].

Une fois préparée, la solution réactionnelle est stable pendant 2 semaines à 4°C.

Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme capable de libérer une μ mole de *p*-nitrophénol par minute dans les conditions décrites ci-dessus [66] [27].

Pour chaque échantillon, la valeur de l'activité enzymatique mentionnée correspond à une moyenne de trois mesures effectuées.

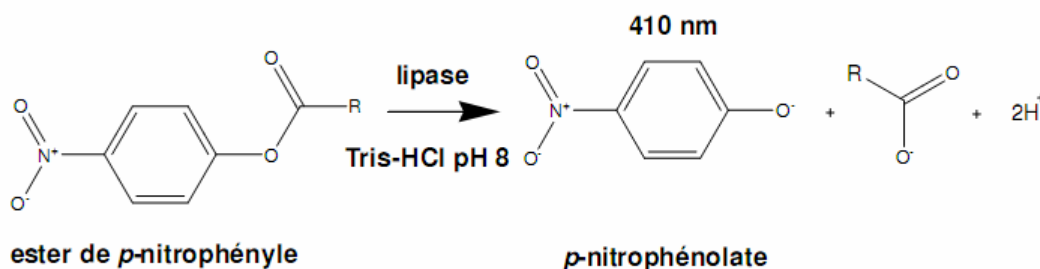


Figure 11 : Réaction chimique de l'hydrolyse d'ester de *p*-nitrophényle [144].

3.1.8. Mesure de l'activité émulsifiante :

L'activité émulsifiante a été mesurée à 610 nm au cours de la croissance de la culture mixte en système biphasique l'huile d'olive-milieu minéral dérivé de la méthode décrite par *Ryu et al. (1995)*. 2 ml de la culture sont centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse pendant 15 min. on prélève 1 ml du surnageant auquel on ajoute 20 micro-litre.

Le mélange est fortement agité pendant plusieurs secondes jusqu'à l'obtention d'une parfaite émulsion de la phase organique. La densité optique (DO) est lue à 630 nm à T_0 (juste après l'agitation) et à $T_{10 \text{ minute}}$. C'est cette dernière valeur qui est prise en considération pour le suivi de l'activité émulsifiante durant la fermentation.

3.1.9. Effet de la lipase sur l'adhésion du biofilm d'*Acinetobacter baumannii* :

L'étude d'une éventuelle action des lipases bactériennes sur l'adhésion bactérienne a été menée vis-à-vis du biofilm d'*Acinetobacter baumannii*.

Ainsi, 5 ml d'une suspension bactérienne (DO =0,1) a été préparée à partir d'une culture de 24 heures et mise en incubation dans des tubes en polystyrène à 37°C en présence d'1 ml d'une solution enzymatique précédemment obtenue (section 3.1.3.1). Après 24 heures d'incubation, la densité du biofilm formé sur la paroi des tubes de cultures est révélée selon la méthode de coloration par le cristal violet [125] [126].

3.1.10. Identification des souches bactériennes productrices de lipases :

A l'issus des examens macroscopiques (caractères cultureux) et microscopiques (gram, et morphologie), l'ensemble des souches bactériennes (gram-) ayant révélé une activité lipolytiques ont été soigneusement purifiées par repiquages successifs sur gélose nutritive pour une éventuelle identification biochimique des espèces purifiées. Celle-ci a été menée à l'aide de galeries biochimiques miniaturisées : ApI 20E et ApI 20 NE (biomérieux, France) [143].

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

4. RESULTATS ET DESCUSSION

4.1. Résultats du screening de souches bactériennes productrices de lipases :

A l'issus des différentes tentatives d'isolements effectuées sur milieu ESTA et sur gélose nutritive à base de Tween 80, six souches bactériennes ont donc été isolées puis identifiées à l'aide de galeries biochimiques ApI 20 E et ApI 20 NE (biomérieux, France). Trois souches : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Aeromonas hydrophila* ont été isolées à partir des échantillons de sol contaminés et trois souches : *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* et *Serratia liquefaciens* ont, quant à elles, été isolées à partir d'échantillons recueillis à proximité d'une exploitation traditionnelle.

4.2. Etude de la croissance des souches isolées en présence du substrat :

Dans le but de révéler le comportement de certaines souches isolées en présence de l'huile d'olive utilisé comme seule et unique source de carbone, l'étude de la croissance a été réalisée uniquement pour les souches bactériennes isolées à partir des échantillons recueillis à proximité de l'exploitation traditionnelle. La figure 12 révèle, dans un premier temps, une croissance cellulaire maximale après 24 h d'incubation à 30°C (phase exponentielle de croissance). Cette croissance optimale concerne également, en plus des souches *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas sobria*, la culture mixte constituée à partir des trois souches préalablement isolées. Cependant, *Aeromonas hydrophila* semble exhiber le développement, en termes de densité bactérienne, le plus important compte tenu de la valeur de la DO enregistrée.

Par ailleurs, la phase stationnaire de croissance semble être atteinte à partir de la 28^{ème} heure et la 32^{ème} heure d'incubation respectivement pour les souches *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas sobria*. Le consortium mixte semble atteindre également la phase stationnaire à partir de la 32^{ème} heure d'incubation.

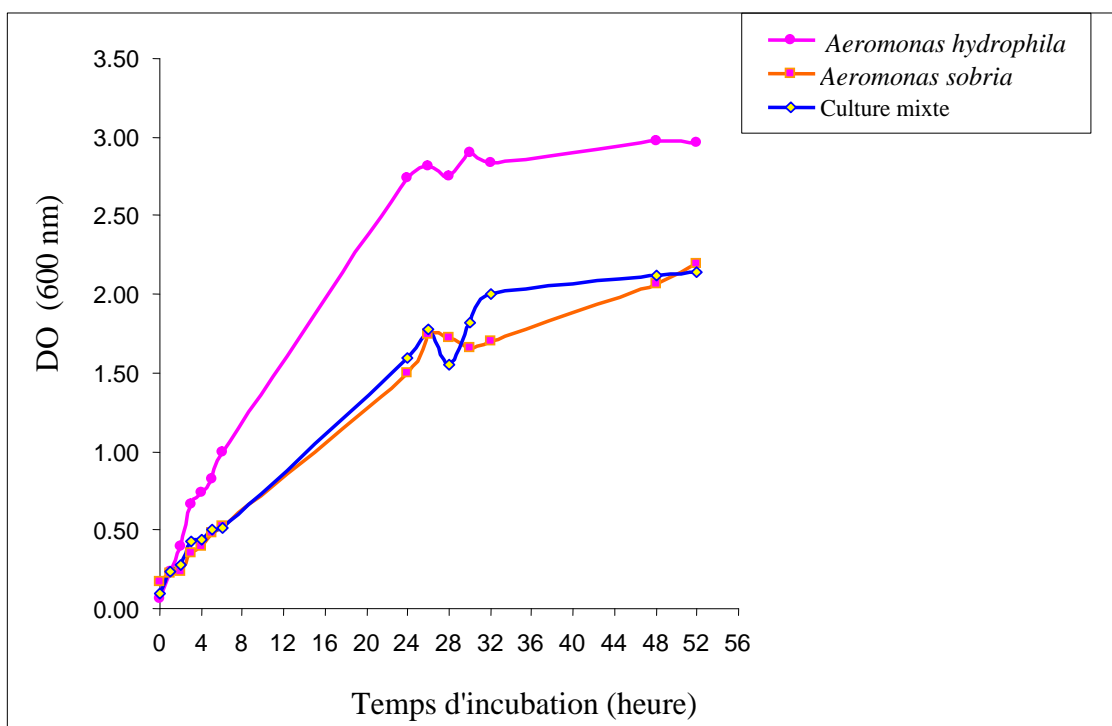


Figure 12 : Croissances des deux souches lipolytiques ainsi que du consortium bactérien isolées à partir de l'exploitation traditionnelle.

En outre, la figure 13 révèle une diminution du pH du milieu au cours de l'incubation. Cette diminution est consécutive, sans aucun doute, à l'hydrolyse, sous l'action des lipases, du substrat et libération d'AG responsables de l'acidification du milieu.

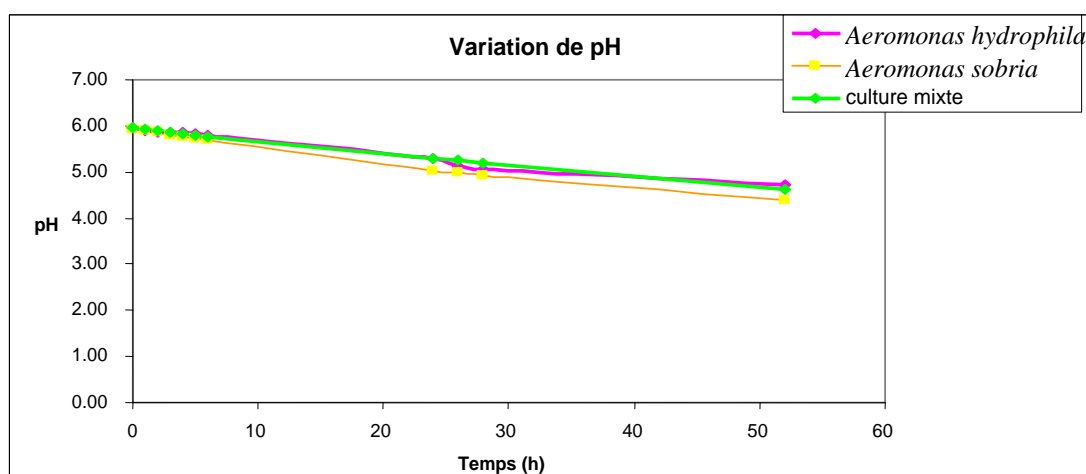


Figure 13 : Variation du pH du milieu au cours de l'incubation.

4.3. Effet de la concentration du substrat sur la croissance bactérienne :

Dans le but d'étudier l'effet de la concentration du substrat sur le développement des souches lipolytiques isolées, deux concentrations en huile d'olive ont donc été testées : 1% et 4 %. Notons que cette étude a été réalisée avec les souches mixtes après 24 h d'incubation. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 14. Il semble que l'utilisation d'huile d'olive comme seule source de carbone à la concentration de 1% induit fortement la croissance bactérienne et évidemment la production de lipase. En effet, *Sidhu et al. (1998)* ont montré que le taux d'enzyme diminuait avec l'augmentation de la concentration du substrat. Ce phénomène est probablement dû à l'augmentation du taux des AG accumulés lors de l'hydrolyse du substrat avec répression de la synthèse de lipases [65].

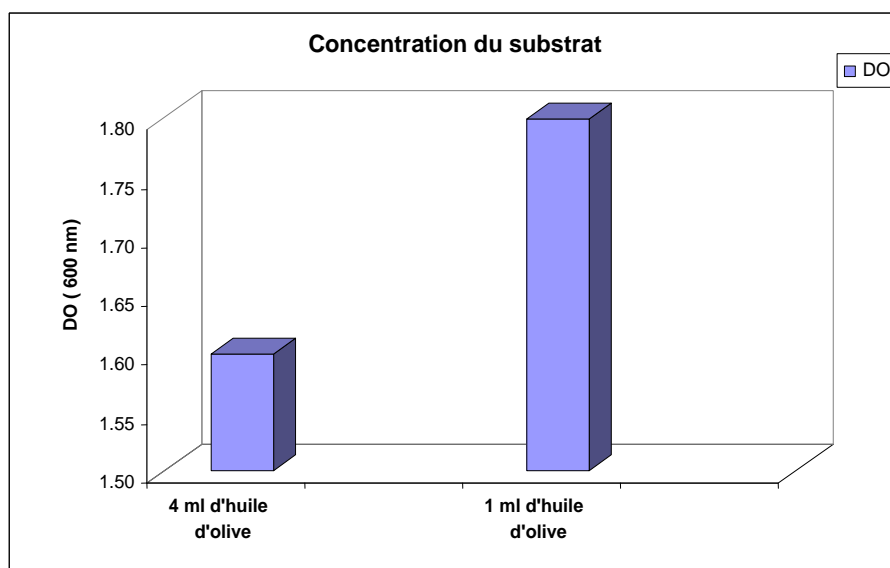


Figure 14 : Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la croissance bactérienne.

D'autre part, l'effet de la concentration des triglycérides sur la production de lipase a été, également, confirmé par Immanuel *et al.* (2008). Les auteurs ont constaté une baisse d'activité observée avec de grandes concentrations de substrat (7% (v / v) d'huile d'olive) ce qui est probablement dû à l'inhibition par le substrat lui-même présent en excès dans le milieu [128].

4.5. Etude de l'activité lipolytique en fonction du substrat :

Les résultats obtenus suite aux essais de croissances réalisés avec trois substrats différents sont illustrés par la figure 15 (a et b). Il semble que les souches sélectionnées (*Pseudomonas Putida*, *Pseudomonas fluorescens* et *Aeromonas hydrophila*), cette fois-ci à partir des échantillons de sols contaminés, ont révélés leurs aptitudes à utiliser chacun des trois substrats additionnés dans le milieu comme seule et unique source de carbone. Cependant, une plus forte croissance bactérienne a été obtenue avec la tributyrine (figure 15, a).

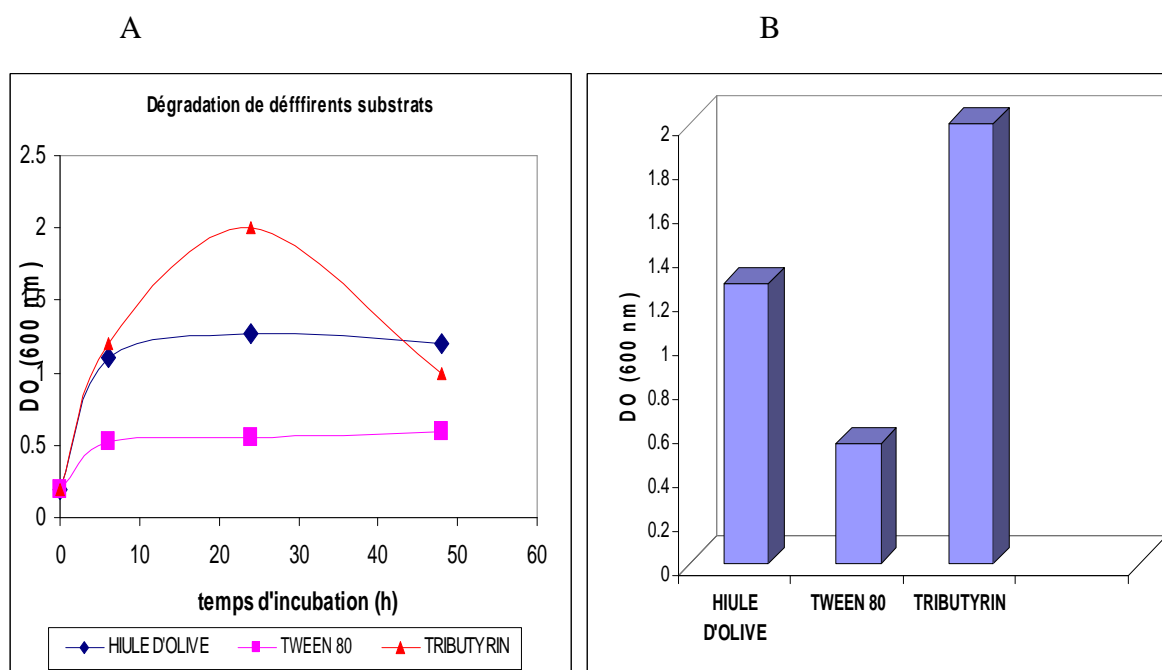


Figure 15 : Cinétiques de croissance des souches isolées du sol en présence des différents substrats (Figure a et b).

Les travaux de Cardenas *et al.* (2001), ont montré que les lipases bactériennes ont tendance à révéler une meilleure activité hydrolytique contre la tributyrine comparée à celle obtenue avec de l'huile d'olive [14] a.

4.6. Mise en évidence de l'activité lipasique :

4.6.1. Sur milieu gélosé :

4.6.1. 1. Milieu gélosé à base de Tributyrine :

Les résultats de la mise en évidence de l'activité lipasique (milieu à base de Tributyrine) des souches isolées à partir des échantillons prélevés à proximité de l'exploitation traditionnelle, sont illustrés par la figure 16. Les souches isolées ont révélé une croissance rapide au bout de 24 heures. L'aspect macroscopique de *Aeromonas hydrophila* a révélé des colonies rouges à pourtour irrégulier alors que l'aspect macroscopique de *Aeromonas sobria* a révélé de grandes colonies jaunes à pourtour irrégulier.

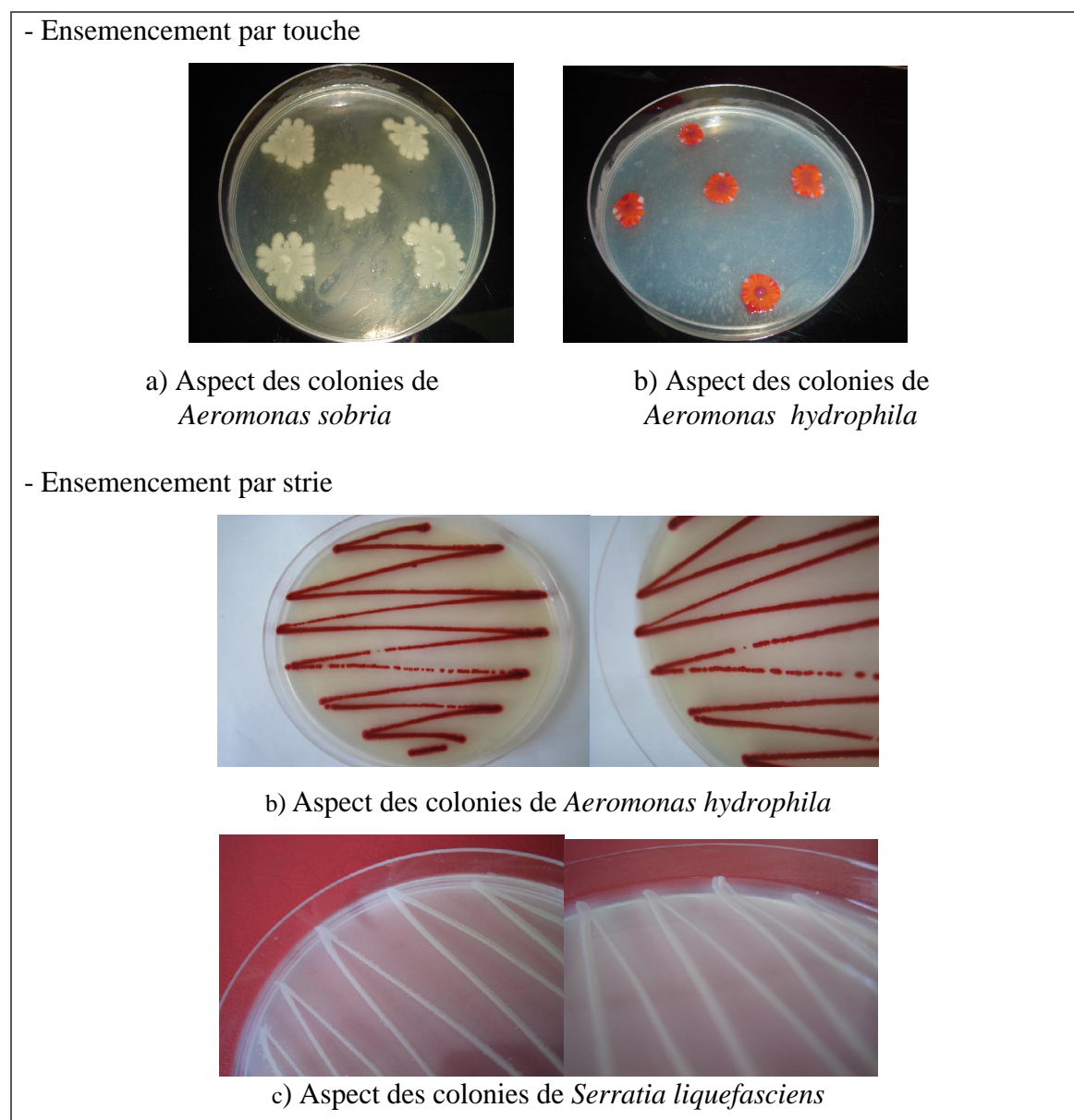
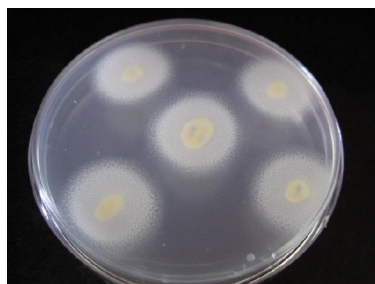


Figure 16 : Aspects macroscopiques des souches isolées sur milieu à base de tributyrine.

4.6.1. 2. Milieu gélosé à base de Tween 80 :

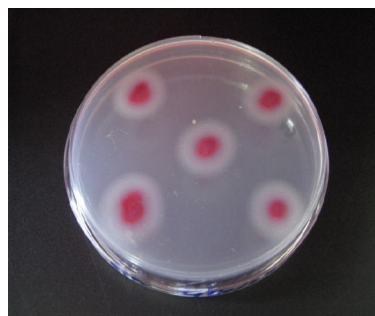
Les résultats de la mise en évidence de l'activité lipasique (milieu à base de Tween 80) des souches isolées à partir des échantillons prélevés à proximité de l'exploitation traditionnelle, sont illustrés par la figure 17. Les colonies des microorganismes producteurs de lipases apparaissent entourées d'un halo opaque dû à la formation de cristaux de sel de calcium.



a) Colonies de *Aeromonas sobria* sur milieu à base de Tween 80



b) Colonies de *Serratia liquefaciens* sur milieu à base de Tween 80.



c) Colonies de *Aeromonas hydrophila* sur milieu à base de Tween 80.

Figure 17 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes sur milieu à base de Tween 80 (formation des halos opaques autour de colonies).

4.7 Dosage de l'activité lipasique :

4.7.1. Dosage par titration :

L'activité lipasique des surnageants des différentes cultures bactériennes a été détectée après augmentation des concentrations des acides gras libres présents dans le milieu de fermentation. Rappelons que les acides gras sont libérés suite à l'hydrolyse du substrat réalisée par les enzymes lipolytiques. Les résultats du dosage des activités enzymatiques sont illustrés par la figure 18.

A première vue, l'allure des courbes obtenues indique clairement que les activités enzymatiques des souches bactériennes isolées à partir des échantillons prélevés à proximité de l'exploitation traditionnelle en comparaisons avec celles isolées à partir du sol, se révèlent être plus précoces au cours de la croissance de ces bactéries. En effet, l'activité enzymatique maximale, de deux souches bactériennes parmi les trois isolées, semble être atteinte après seulement **6 heures** d'incubation à 30°C. Par ailleurs, *Aeromonas hydrophila* semble exhibée la plus forte activité enzymatique avec 28 UI/ml, même si celle-ci est obtenue après 18 h d'incubation. Quant à *Aeromonas sobria* et *Serratia liquefaciens*, leurs activités respectives ont été estimées à 14 UI/ml et 25 UI/ml après 6 heures d'incubation. En revanche, les activités lipasiques des souches bactériennes isolées à partir des échantillons de sol s'avèrent être relativement tardives. En effet, le maximum d'activité n'a été atteint qu'après **24 heures** d'incubation à 30°. Cette différence constatée serait sans aucun doute due au fait que les souches bactériennes isolées à partir des échantillons prélevés à proximité de l'exploitation traditionnelle seraient plus acclimatées et/ou adaptées à la dégradation du substrat (huile d'olive) que celles présentes dans les échantillons de sols. Ces dernières ont quant à elles exhibé des activités estimées à (*Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas putida*).

Cependant, si les activités des souches issues des échantillons de l'exploitation, s'avèrent être précoces comparativement avec celles des souches issues des échantillons du sol, elles exhibent néanmoins des activités nettement inférieures à celles-ci. En effet, *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas fluorescens* isolées à partir des échantillons du sol ont révélé des activités respectives estimées à 70 UI/ml et 80 UI/ml. Alors que la plus forte activité, parmi celles révélées chez les souches isolées à partir des échantillons de l'exploitation, et qui a été obtenue avec une fois de plus *Aeromonas hydrophila* n'a pas dépassé 28 UI/ml.

Par ailleurs, la diminution de l'activité lipasique constatée au cours de la phase stationnaire de croissance est probablement due à l'augmentation de la concentration de l'acide oléique dans le milieu de fermentation résultant de la dégradation de l'huile d'olive. Elle peut également être le résultat de l'action de protéases libérées dans le milieu [114] [65].

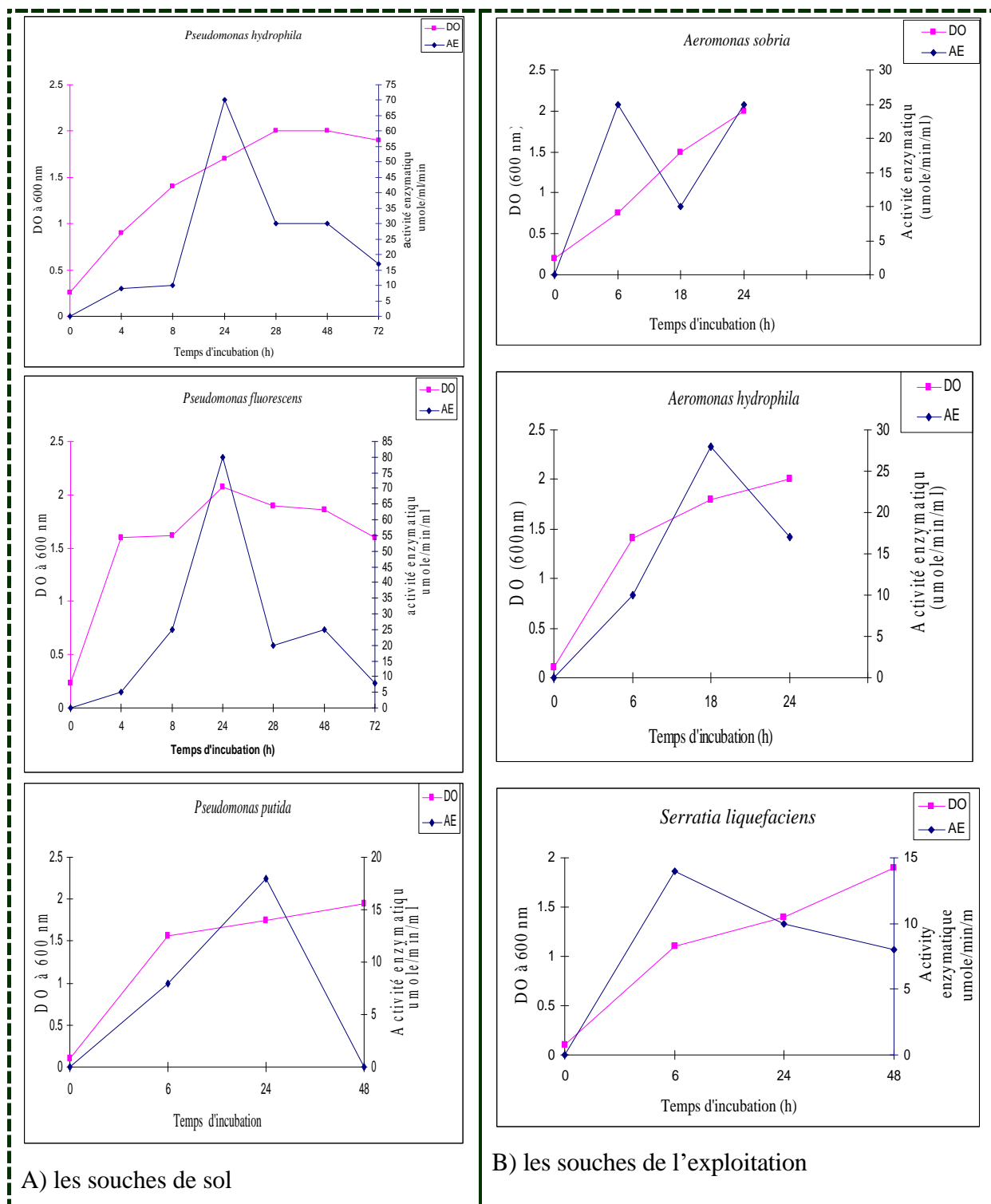


Figure 18 : Courbes de croissance et d'activité lipasique des souches isolées à partir des échantillons de sols (A) et des échantillons de l'exploitation (b).

4.7.2. Dosage par colorimétrie

Les quantifications des activités lipasiques à l'aide de cette méthode ont été menées seulement chez un consortium bactérien constitué des souches isolées à partir des échantillons de sols.

- En présence de l'huile d'olive comme substrat :

Les résultats du dosage des activités enzymatiques sont illustrés par la figure 19. Rappelons que l'hydrolyse de l'huile d'olive est quantifiée par la neutralisation des AG libérés sous l'action de lipase. L'allure de la courbe de l'activité lipasique révèle une présence assez rapide voir précoce de l'enzyme dans le milieu de fermentation. En effet, le maximum de l'activité a été obtenu après seulement 28 h d'incubation à 30°C. Cependant le taux de l'activité reste relativement faible comparé avec celui obtenu lors du dosage réalisé à l'aide de la méthode de titration.

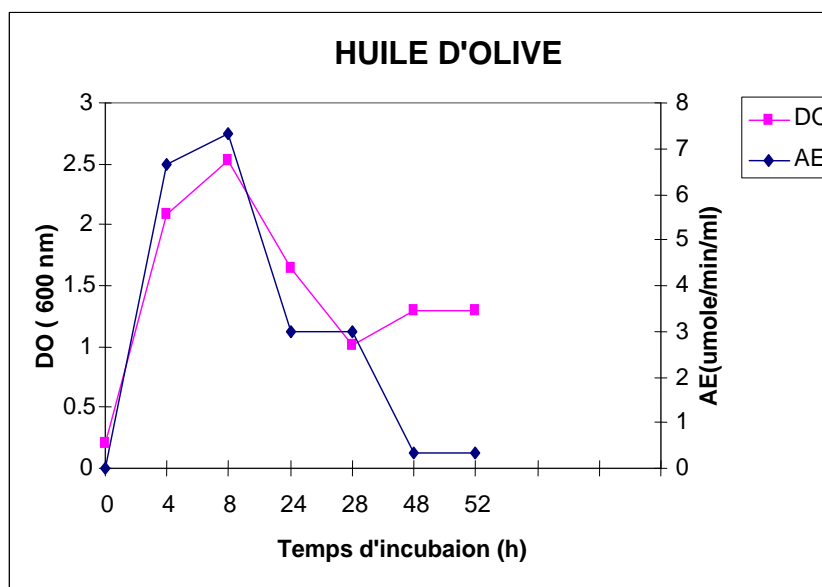


Figure 19 : Profil de la courbe de croissance et l'activité enzymatique des isolats dosée par colorimétrie.

- En présence du Tween 80 comme substrat :

Les résultats du dosage des activités enzymatiques en présence du tween 80 sont illustrés par la figure 20. Selon l'allure de la courbe, le maximum de l'activité enzymatique n'a été obtenu,

cette fois-ci, qu'après **28 heures** d'incubation. Ceci peut être expliqué, à priori, par la croissance assez lente du consortium bactérien en présence du tween 80. En effet, le maximum de croissance (DO) n'a été atteint qu'après **52 heures** d'incubation de la culture. Alors qu'en présence de l'huile d'olive, la culture a atteint une croissance maximale au bout de **8 heures** seulement.

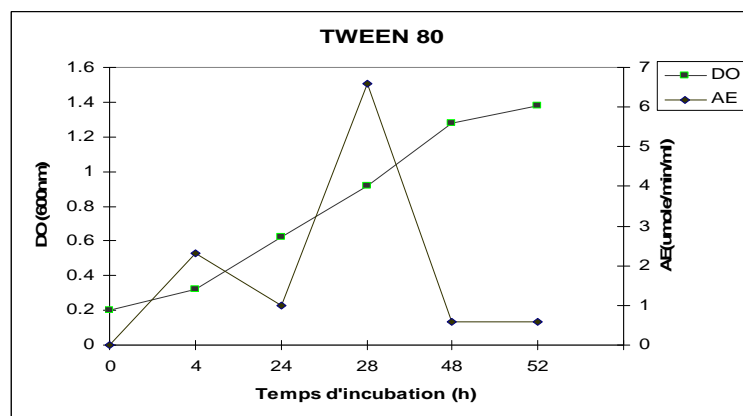


Figure 20 : Activité enzymatique des isolats dosée par colorimétrie en présence du tween 80 comme substrat.

Ces résultats obtenus en présence du Tween 80 au cours de cette étude, ne semble pas être en accord avec ceux obtenus par Iftikhar *et al.* (2002). Au contraire, leurs travaux ont démontré que le tween 80 additionné dans le milieu à la concentration de 1% peut être considéré comme une meilleure source de carbone comparé aux autres substrats. En effet, une forte production de lipase (61,79 u/g) a été obtenue au bout de 48 heures d'incubation seulement [130]. Par ailleurs, Immanuel *et al.* (2008) ont noté, quant à eux, que la production de lipase par les microorganismes pourrait être induite par l'addition des tweens. Tous les surfactants testés ont montré une influence positive sur la production de lipase [128].

En outre, les travaux de Costas *et al.* (2004) ont démontré également que l'addition de surfactants au milieu de culture augmenterait la sécrétion des enzymes lipolytiques pour un grand nombre des microorganismes. L'augmentation peut être due à un changement de la perméabilité de la paroi cellulaire ou bien encore à la liaison qui pourrait exister entre paroi et enzyme [87].

Enfin, il semble que les surfactants n'augmentent pas toujours la production des enzymes lipolytiques et leur effet différent d'un microorganisme à l'autre.

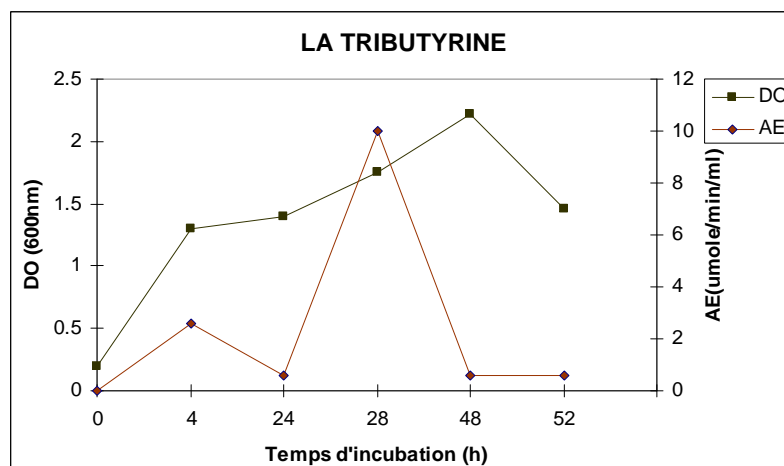
- En présence de la tributyrine :

Figure 21 : Activité enzymatique du consortium dosée par colorimétrie en présence de la tributyrine comme substrat.

Les résultats du dosage des activités enzymatiques en présence de la tributyrine sont illustrés par la figure 21. De même que pour le tween 80, le maximum de l'activité enzymatique n'a été obtenu qu'après **28 heures** d'incubation. Ceci peut être expliqué, une fois de plus, par la croissance assez lente du consortium bactérien constatée en présence de la tributyrine.

Les travaux de Costas M. *et al.*, (2004) ont rapporté que la tributyrine peut être efficacement utilisée afin d'augmenter la production de lipase par plusieurs microorganismes comme *Serratia marcescens*, *Alternaria brassicicola*, *Lactobacillus casei* ou *Pseudomonas sp* [87].

Enfin, la plus forte activité enzymatique a été obtenue lorsque la tributyrine est additionnée dans le milieu comme inducteur. Elle semble donc constituer un substrat de choix comparé à l'huile d'olive et au tween 80.

4.8. Mesure de l'activité émulsifiante :

L'étude de l'activité émulsifiante a été conduite dans le but d'estimer l'aptitude ainsi que le degré d'adaptation des différents consortiums bactériens sélectionnés à partir des deux échantillons vis-à-vis du substrat carboné (huile d'olive). Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 22 (a et b).

Ainsi, l'activité émulsifiante du consortium constitué des souches isolées à partir des échantillons prélevés à proximité de l'exploitation traditionnelle semble atteindre son niveau maximal après seulement **18 heures** d'incubation en présence du substrat dans le milieu. En revanche, celle du consortium composé des souches isolées à partir des échantillons de sol, elle n'atteint son maximum qu'après 32 voir 35 heures d'incubation à 30°C. Une fois de plus, il semblerait que cette différence d'activités est due sans aucun doute au niveau d'adaptation des souches en présence du substrat. Ce dernier est présent, aux alentours directs de l'exploitation, non seulement en quantités importantes mais également pendant de longues périodes comparé aux quantités du même substrat pouvant existées au niveau du sol.

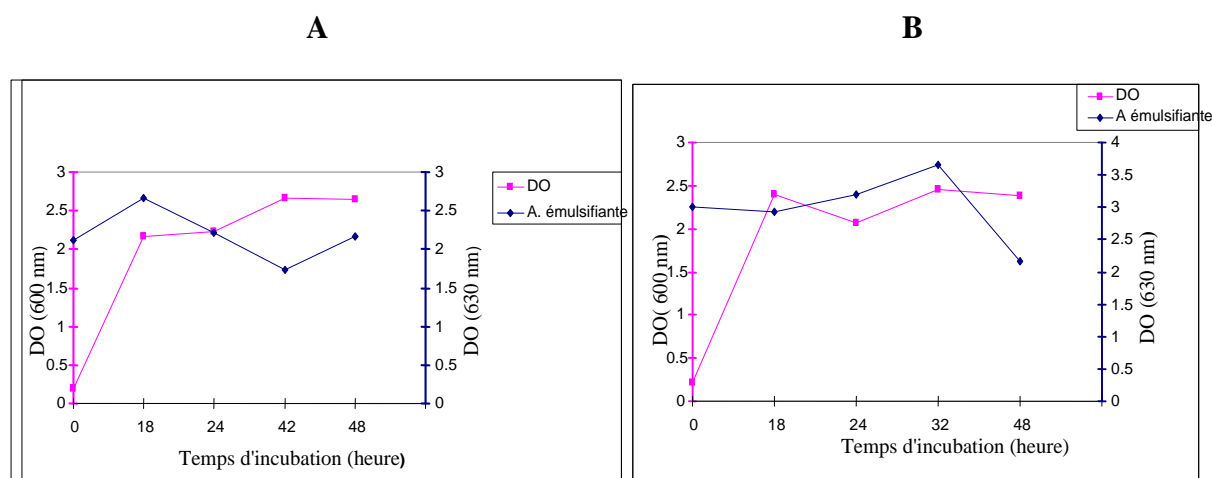


Figure 22 : a) Courbe de croissance et l'activité émulsifiante pour des souches isolées à partir de maâsra. b) Courbe de croissance et l'activité émulsifiante pour des souches isolées à partir de sol.

4.9. Effet de l'action des lipases sur l'adhésion bactériennes (formation de biofilms) :

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence une éventuelle action des lipases bactériennes sur l'adhésion de deux bactéries potentiellement pathogènes. Pour cela, deux souches préalablement isolées et identifiées au laboratoire ; *Acinetobacter baumannii* (Gram -) et *Staphylococcus aureus* (Gram +) ont été mises en présence chacune avec deux surnageants

provenant de cultures, conduites à différents temps d'incubation, des deux consortiums bactériens producteurs de lipases (ceux isolé du sol et également à partir de l'exploitation traditionnelle). Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 23 et 25.

A priori, il semble, dans un premier temps, que les surnageants obtenus, à partir des cultures des deux consortiums producteurs de lipases, présentent des actions assez controversées vis-à-vis de l'adhésion d'*Acinetobacter baumannii*. Les surnageants obtenus à partir des cultures de 48 heures semblent présenter une action inhibitrice sur l'adhésion de la bactérie. En revanche, ceux obtenus après 72 heures d'incubation semblent avoir un effet contraire en favorisant la formation du biofilm. Cependant, les surnageants obtenus après 24 heures ne semblent pas présenter un quelconque effet sur l'adhésion de la souche (figure 23).

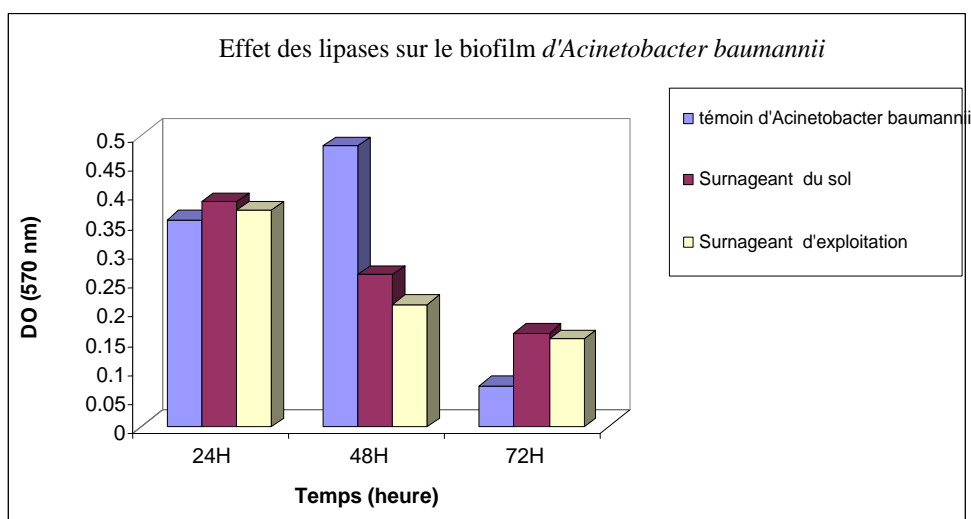


Figure 23 : Effet des surnageants de lipases sur la formation de biofilm d'*Acinetobacter baumannii*.

Les pourcentages d'inhibition de l'adhésion de la souche pathogène ont été estimés, après 48 heures d'incubation, à plus de 50% et à environs 60 % respectivement pour le surnageant obtenu à partir de la culture du consortium obtenu à partir de l'exploitation traditionnelle et celui obtenu à partir de la culture du consortium obtenu à partir du sol (figure 24).

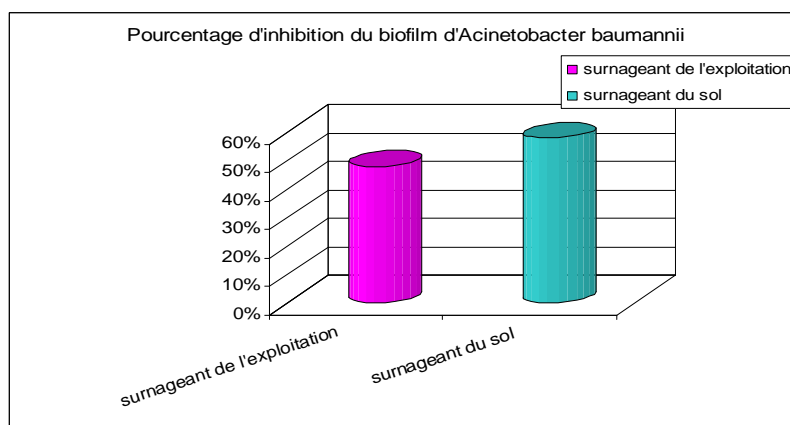


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du biofilm d'*Acinetobacter* en utilisant un surnageant de 48 heure d'incubation.

Un constat identique peut être réalisé, selon la figure 25, pour ce qui de l'effet des surnageants obtenus, à partir des cultures des deux consortiums producteurs de lipases sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus*. Les surnageants obtenus à partir des cultures de 48 heures semblent présenter une action inhibitrice sur l'adhésion de la bactérie. Par contre, ceux obtenus après 72 heures d'incubation semblent favoriser l'adhésion de *Staphylococcus aureus*. Cependant, les surnageants obtenus après 24 heures semblent présenter des actions.

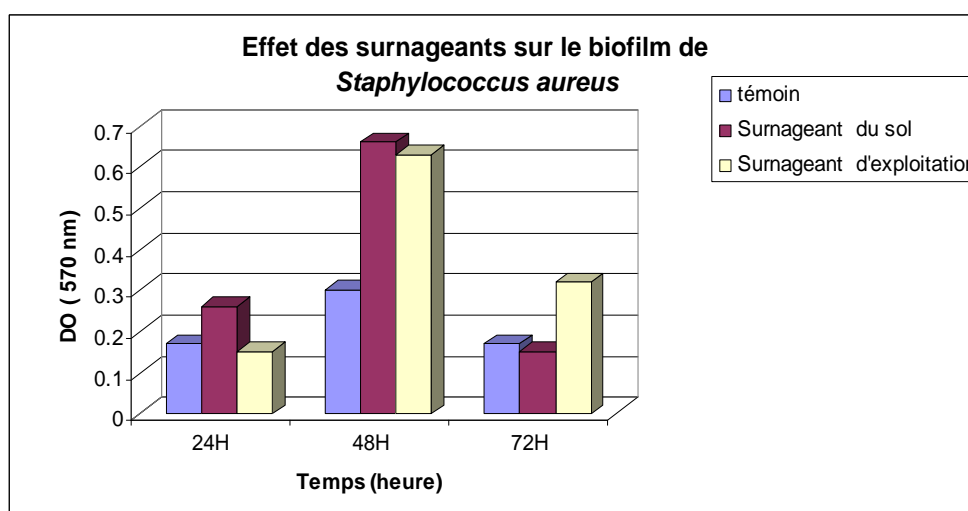


Figure 25 : Effet de surnageant de lipase sur la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus*.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Conclusion

Cette étude a été réalisée dans le but d'identifier des souches bactériennes productrices d'enzymes lipolytiques. Le screening bactériens réalisés à partir de deux types d'échantillons de différentes origines a permis d'identifier six souches bactériennes toutes aptes à dégrader les différents substrats lipidiques additionnées dans le milieu de fermentation. Parmi les substrats testés l'huile d'olive semble être un bon inducteur de la production de lipase quand elle est utilisée comme seule source de carbone dans le milieu de culture. En outre, la production de lipase se trouve être associée à la croissance bactérienne et sa sécrétion débute lorsque la cellule bactérienne est en phase de croissance exponentielle. Cependant les résultats obtenus ont montré que la période de production enzymatique peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon l'espèce bactérienne et également selon les conditions environnementales de la bactérie (origine de l'isolement).

Au vu des résultats préliminaires obtenus, ces études doivent être poursuivies et approfondies en ciblant une production qualitative et quantitative des lipases suivie d'une caractérisation de celles-ci. Il serait également important d'étudier l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la production des lipases par les souches bactériennes isolées.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Résumé

Les lipases restent parmi les plus importants biocatalyseurs à effectuer des réactions dans les milieux aqueuses et non aqueux. Cela est principalement dû à leur capacité à utiliser un large éventail de substrats, une grande stabilité à des températures élevées, au pH ainsi les solvants organiques.

Le but de ce travail de recherche a été de réaliser un screening de souches lipolytiques ainsi que le dosage de leurs activités lipasiques respectives. Différents échantillons prélevés à partir de sources variées (exploitation traditionnelles et sols) ont été utilisés pour l'isolement de souches bactériennes lipolytiques.

Le dosage par colorimétrie et l'estimation des acides gras libres par titration sont les méthodes utilisées au cours de cette présente étude pour le dépistage des producteurs de lipases et l'estimation de l'activité lipasique.

Les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de l'huile d'olive induirait fortement la production de lipase par les souches provenant de l'exploitation. La capacité des bactéries du sol à utiliser une variété des substrats a été également démontrée.

En outre, les résultats ont également révélés que les souches isolées ont révélé une bonne activité lipasique et émulsifiante, leur permettant l'assimilation du substrat lipidique présent dans le milieu.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, ces études doivent être poursuivies et approfondies en ciblant une production qualitative et quantitative des lipases suivie d'une caractérisation de celles-ci. Il serait également important d'étudier l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la production des lipases par les souches bactériennes isolées.

Abstract

Lipases remain among the most important biocatalysts to carry out reactions in the mediums aqueous and no aqueous. That is mainly due to their capacity to use a broad range of substrates, a great stability at high temperatures, at the pH thus at the organic solvents.

The goal of this research task was to carry out a screening of lipolytic strains as well as the proportioning of their respective lipase activity. Various samples taken starting from varied sources (exploitation traditional and soils) were used for the insulation of lipolytic bacterial strains. Proportioning by colorimetric and the estimate of the free fatty acids by titration are the methods used at the court of this present study for the screening of the lipase producers and the estimate of the lipase activity.

The results obtained revealed that the use of the olive oil would strongly induce the production of lipase by the strains coming from the exploitation. The capacity of the bacteria of the soil to use a variety of the substrates was also shown. Moreover, the results also revealed that these isolates revealed a good lipolytic and emulsifying activity, allowing them the assimilation of the lipid substrate present in the medium.

Within sight of the preliminary results obtained, these studies must be continued and deepened by targeting a qualitative and quantitative production lipases followed by a characterization of those. It would be also important to study the effect of certain physicochemical parameters on the production of lipases by the insulated bacterial strains.

ملخص

يبقى إنزيم الليباز من بين أهم المحفزات الحيوية لإنجاز التفاعلات في الوسطين المائي و اللامائي . و هذا راجع لقدرتها على استعمال عدد هائل من المواد ، استقرارها الكبير عند درجة الحرارة العالية ، عند ال pH و كذلك عند المذيبات العضوية.

كان الهدف من هذا البحث هو الحصول على الكائنات المجهرية القادرة على تفكيك الدسم وكذلك قياس نشاطها الإنزيمي. من أجل ذلك ، عدة عينات مأخوذة من مصادر متنوّعة " مثل التربة و المصنع التقليدي " ، استعملت لعزل البكتيريا المفككة للدسم.

المعايرة باستعمال طريقة الكلورمتر و تقدير الأحماض الدسمة المتحررة بالتقطير كانت من أبرز التقنيات المستعملة في هذه البحث من أجل الكشف عن البكتيريا المفرزة لإنزيم الليباز وكذا قياس نشاطها الإنزيمي.

بينت النتائج المحصل عليها أن استعمال زيت الزيتون حفز على إنتاج إنزيم الليباز من طرف البكتيريا الناتجة من المصنع التقليدي ، كما أبدت البكتيريا الترابية قدرتها كذلك على استعمال مواد مختلفة.

فضلا عن ذلك، كشفت النتائج بأن البكتيريا المعزولة أظهرت نشاط إنزيمي و مستحلي كبير سمح لها باستعمال المواد الدسمة الموجودة في الوسط.

نظرا للنتائج الأولية المتحصل عليها، فإن هذه الدراسات ينبغي أن تعمق و تفصل فيما يخص الإنتاج الكمي و الكيفي لإنزيم الليباز مع دراسة خواصها. و يكون من المهم كذلك دراسة تأثير بعض العوامل الكيميائية على الإنتاج الإنزيمي من طرف هذه البكتيريا المعزولة.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

-
- [1] Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews*. 15:29-63.
- [2] Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. (2001). Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances*. 19: 627-662.
- [3] Verger R. (1985). Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. *Hydrolases et dépolymérase*s. *Enzymes d'intérêt industriel*. Paris, Edition : Gauthier Villars. 313-329.
- [4] Jaeger K. E. & Reetz M. T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol.* 16: 396-403.
- [5] Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.
- [6] Mosbah H., Sayari A., Majdoub H., Dhoub H. & Gargouri Y. (2005). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochemical & biophysical Acta*. 1723: 282-291.
- [7] Loperena L., Ferrari M.D., Diaz A. L., Inglood G., Pérez L. V., Carvallo F., Travers D., Menes R.J. & Lareo C. (2008). Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. *Bio resource technology*. pp 5
- [8] Cutchins E. C., Doetsch R. N. & Peleczar M. J. (1951). The influence of medium on the production of bacterial lipases. 63:269-272.
- [9] Alford J. A., Pierce D.A., Suggs F. G. (2008). Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. *Journal of lipid research*. 5:390-394.
- [10] Kouker G. & Jaeger K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental Microbiology*. 53: 211-213.
- [11] Mourey A. & Kilbertus G. (1976). Simple media containing stabilized Tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. Appl. Bact.* 40:47-51.
- [12] Vargas V.A., Delgado O. D., Hatti-Kaul R. & Mattiasson B. (2004). Lipases-producing microorganisms from Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*. 26: 81-86.
- [13] Jarvis G. N. & Thiele J. H (1997). Qualitative Rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligatory anaerobic bacteria. *Journal of microbiological methods*. 29: 41-47.
- [14] a Cardenas F., Alvarez E., Castro -Alvarez M.S., Sanchez- Montero J.M., Valmaseda M., Elson S.W. & Sinisterra J.V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 14:111-123.

- [14] b Cardenas F., Alvarez E., Castro –Alvarez M.S., Sanchez- Montero J.M., Valmaseda M., Elson S.W. & Sinisterra J.V. (2001). Novel microbial lipases: Catalytic activity in reaction in organic media. *Enzyme and microbial technology*. 28: 145-154.
- [15] Haider M.A. & Pakshirajan K. (2007). Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by soil microorganism using statistically designed experiments. Copyright Humana press Inc. *Applied biochemistry and biotechnology*. 141: 377-390.
- [16] Ko W. H., wang I. T. & Ann P. J. (2005). A simple methods for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil biology & biochemistry*. 37: 597-599.
- [17] Ho W. C. & Ko W. H. (1982). Characteristics of soil microbiostasis. *Soil Biol. Biochem*. 14:589-599.
- [18] Ruiz C., Pastor F. I. J. & Diaz P. (2005). Isolation of lipid and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus sp. CR-179*. *Letters in applied microbiology*. 40:218-227.
- [19] Leuschner R.G., Kenneally P.M. & Arendt E. K. (1997). Methods for the rapid quantitative detection of lipolytic activity among food fermenting microorganisms. *International journal of food microbiology*. 37: 237-240.
- [20] Haba E., Bresco O., Ferrer C., Marqués A., Busquets M., Mnresa A. (2000). Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and microbial technology*. 26: 40-44.
- [21] Carvalho N. B., Souza R. L., Castro H. F, Zanin G. M., Lima A. S. & Soares C. M. F. (2008). Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 150: 25-32.
- [22] Singh R., Gupta N., Goswami V. K. & Gupta R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterase. *Appl. Microbial. Biotechnol*. 70: 679-682.
- [23] Ertugrul S., Donmez G. & Takaç S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*. 149: 720-724.
- [24] Matsumiya y., Wakita D., Kimura A., Sanpa S. & Kubo M. (2007). Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103: 325-330.
- [25] Hamaki T., Suzuki M., Fodou R. Jojima Y., Kajiura T., Tabushi A., Sen K. & Shibai H. (2005). Isolation of novel bacteria and *Actinomycetes* using soil extract agar medium. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 99: 485-492.

- [26] Tom R.A. & Crisan E. V. (2005). Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine substrates. *Applied Microbiology*. 29: 206-210.
- [27] Côté A., Shareck F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3₍₂₎. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 381-388.
- [28] Chang W. J., Moon Y. H. & Koo Y. H. (1997). Mathematical modelling for the estimation of lipase activity by agar diffusion method. *Journal of chem. Eng.* 14: 179-183.
- [29] Shabtai Y. (1991). Isolation and characterization of a lipolytic bacterium capable of growing in low water content oil water emulsion. *Applied and environmental microbiology*. 57: 1740-1745.
- [30] Liu C. H., Chem W. M., Chang J. S. (2007). Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: feasibility studies and novel activity assay protocols. *World Journal Microbial Biotechnology*. 23: 633-640.
- [31] Abed Samad M. Y., Abed Razak C. N., Salleh A. B., Zin wan yunus W. M., Ampon K. & Basri M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 9: 51-56.
- [32] Fakhreddine L., Kademi A., Aït-Abdelkder N. & Baratti J. C. (1998). Microbial growth and lipolytic activities of moderate Thermophilic bacterial strains. *Biotechnology letters*. 20: 879-883.
- [33] Fang Y., Lu Z., Lv F., Bie X., Liu S., Ding Z., Xu W. (2006). A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M 36 produced organic solvent stable lipase. *Current Microbiology*. 53: 510-515.
- [34] Heravi K. M., Eftekhar F., Yakhchali B. & Tabandeh F. (2008). Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus sp.* from soil. *Pakistan Journal of Biological Science*. 11: 740-745.
- [35] Pedro M.S., Haruta S., Nakamura K., Hazaka M., Ishii M. & Igarashi Y. (2003). Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field scale composter. *Journal of bioscience and Bioengineering*. 95: 368-373.
- [36] Garde V. L. (2000). *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tec. Doc.
- [37] Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R. (2008). Lipases at interfaces: A review. *Advances in colloid and interface science*
- [38] Alloue W. A. M., Aguedo M., Destin J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J. P. & Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leur application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 57-68
- [39] Gupta R., Gupta N. & Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.
- [40] Gandhi N. N. (1997). Applications of lipase. *Review*. 74: 621-634.

- [41] Pabai F. (1997). Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179.
- [42] Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R. & Sarda L. (1984). Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. Journal of lipid research. 25: 1214-1221.
- [43] Lotti M. & Alberghina L. (2002). Lipases: Molecular structure and function. Industrial enzymes. 16: 263-281.
- [44] Jaeger K. E. & Eggert T. (2002). Lipases for biotechnology. Current opinion in biotechnology. 13: 390-397.
- [45] Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20: 433-437.
- [46] Chahinin H., Nini L., Biotard E., Dubès J. P., Comeu L. C & Sarda L. (2002). Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. Lipids. 37: 653-662.
- [47] Wu X. Y., J?skelainen S. & Linko Y. Y. (1996). An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme and microbial Technology. 19: 226-231.
- [48] Angkawidjaja C. & Kanaya S. (2006). Family I. 3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system. Cellular and molecular life science. 63: 2804-2817.
- [49] Muralider R. V., chiromamilla R. R., Marchan R., Ramachandran V. N., Ward O. P. & Nigan P. (2002). Understanding lipase stereo selectivity. World journal of microbiology & biotechnology. 18: 81-97.
- [50] Haward T. D. & Rivars R. (1977). A survey of soil microorganisms with particular reference to the *Actinomycetes* as source of substances toxic to *Heliothis virescens*. Journal of invertebrate pathology. 31: 118-122.
- [51] Sommer P., Bormann C. & G?tz F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extra cellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. Applied and environmental microbiology. 63: 3553-3560.
- [52] Jaeger K. E., Ransac S., Koch H. B., ferrato F. & Dijkstra B. W. (1993). Topological characterization and modelling of the 3 D structure of lipase from *Pseudomonas aerogenosa*. Federation of European biochemical societies. 332: 134-149.
- [53] Davranov K. & Khalameiser V. B. (1997). Current state of the study of microbial lipases. Chemistry of natural compounds. 33: 113-126.

- [54] Joseph B., Ramteke P. W., Thomas G. & Shrivastava N. (2007). Standard review cold-active microbial lipases: A versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and molecular biology review*. 2: 39-48.
- [55] Delmotte A. (1958). L'activité lipolytique microbienne décelée par la méthode de *SIERRA* avec référence spéciale au *M. pyogenes*. 309-330.
- [56] Benamia F., Djeghaba Z. & Tahar A. (2008). Etude de l'influence des solvants organiques sur l'activité lipasique dans les réactions d'alcoolyse. JNC 15 Yasmine Hamammet. PP 76.
- [57] Abdou A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychotropic *Serratia marcescens* lipase. *J. Dairy. sci.* 86: 127-132.
- [58] Boekema B. H. H. L., Beselin A., Breuer M., Haier B., Koster M., Rosenau F., Jaeger K.E. & Tommassen J. (2007). Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *App. & Environ. Micro.* 73: 3838-3844.
- [59] Kok R.G., Nudel C. B., Gonzalez R. H., Nugtern-Roodzent I. M. & Hellingwerf K. J. (1996). Physiological factors affecting production of extracellular lipase (lip A) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid repression of lip A expression and degradation of lip A. *Journal of bacteriology*. 178:6025-6035.
- [60] Ito T., Kikuta H., Nagamori E., Honda H., Ogino H., Ichikawa H. & Kobagachi T. (2001). Lipase production in two step fed batch culture of organic solvent tolerant *Pseudomonas aerogenosa* LST-03. *Journal of bioscience and bioengineering*. 91:245-250.
- [61] Stern A.M., Ordal Z. J. & Halvoron H. O. (1953). Utilisation of fatty acids by and lipolytic activities *Mucor mucido*. 24 -27.
- [62] Alford J. A. & Pierce D.A. (1963). Production of lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium. 86: 24-29.
- [63] Wilhelm S., Tommassen J. & Jaeger K. E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aerogenosa*. *Journal of bacteriology*. 181: 6977-6986.
- [64] Lakchmi B.S., Kanguane P., Abraham B. & Pennathur G. (1999). Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031) .*Applied microbiology*. 29: 66-70.
- [65] Sidhu P., Scharma R., Soni S.K. & Gupta J. K. (1998). Production of extra cellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus sp.* *Folia microbial*. 43: 51-54.
- [66] Kordel M., Hofmann B., Schomburg D. & Schmid R. D. (1991). Extra cellular lipase of *Pseudomonas sp* strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of bacteriology*. 173: 4836-4841.

- [67] Ruchi G., Anshu G. & Khare S. K. (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aerogenosa* strain: production optimisation by response surface methodology and application. *Bioresource technology*. 99: 4796-4802.
- [68] Helistö P. & Korpela T. (1998). Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitro phenyl alkanoate esters method. *Enzyme and microbial technology*. 23: 113-117.
- [69] Plou F. G., Ferrer M., Nuero O. M., Calvo M. V., Alcalde M., Reyes F. & Ballesteros A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology techniques*. 12: 183-186.
- [70] Vardanega R., Remonato D., Arbter F., Polloni A., Rigo E., Ninow J. L., Treichel H., Oliveira D. & Diluccio M. (2008). A systematic study on extraction of lipase obtained by solid state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium sp.* *World journal of chemistry*. 3: 55-60.
- [71] Gilham D. & Lehner R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 36: 139-147.
- [72] Stuer W., K. E & Winkler U. V. (1986). Purification of extra cellular lipase from *Pseudomonas aerogenosa*. *Journal of bacteriology*. 168: 1070-1074.
- [73] Snellman E. A., Colwell R.R. (2004). *Acinetobacter* lipases: Molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J. Ind. Microbial. biotechnol.* 31: 391-400.
- [74] Béraud J. (2001). *Le technicien d'analyses biologiques. Guide théorique et pratique.* Edition technique & documentation. Pp 931.
- [75] Benjamin S. & Pandey A. (1998). *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast*. 14: 1069–1087.
- [76] Sentaniello E., Ciuffreda P., Casati S. & El-Sayed H. (2006). Design of new chromogenic substrates for the spectrophotometric assay of lipolytic activity of lipases. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* .40: 76-80.
- [77] El marrakchi A., Tantaoui-Elaraki A., Hamama A. & Grini A. (1988). La flore microbienne du smen marocain. Flore lipolytique et caséolytique. *Le lait*. 68: 333-348.
- [78] Allen D. K. & Tao B. Y. (2007). Kinetic characterization of enhanced lipase activity on oil bodies. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30:271–279.
- [79] Hasan F., Ali Shah A. & Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235–251.

- [80] Chen L., Daniel R. M. & Coolbear T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*. 13: 255–275.
- [81] Gunstone F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1535-1549.
- [82] Jaeger K. E., Dijkstra B. W. & Reetz M. T. (1999). Bacterial, biocatalysts: Molecular biology, three dimensional structure and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- [83] Ota Y., Sawamoto T. & Hasuo M. (2000). Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the Sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum sp.* FO401B. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2497-2499.
- [84] Dharmsthiti S. & Kuhusuntisuk B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aerogenosa* LP602: Biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 21: 75–80.
- [85] Li Y. & Chrost R. J. (2006). Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and microbial technology*. 39: 568-572.
- [86] Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. & Bornscheuer U. T. (2004). Directed evolution of Lipases and Esterases. *Methods in enzymology*. 388: 199-207.
- [87] Costas M., Dieve F. J. & Longo M. A. (2004). Lipolytic activity in submerged cultures of *Issantchankia orientalis*. *Process biochemistry*. 39: 2109-2114.
- [88] Lu J. Y. & Liska B. J. (1969). Lipase from *Pseudomonas fragi*. II- Properties of the enzyme. *Applied microbiology*. 18: 108-113.
- [89] Janda K. (2005). The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. *International Bio deterioration & Biodegradation*. 55:149–152.
- [90] Wag S. L., Lin Y. T., Liang T. W., Chio S. H., Ming L. J. & Wu P.C. (2009). Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*. 36: 65–73.
- [91] Breuil C., Shindler D. B. , Sijher J. S., & Kushner D. J. (1978). Stimulation of Lipase Production during Bacterial Growth on Alkanes. *Journal of bacteriology*. 133: 601-606.
- [92] Marsudi S., Unno H. & Hori H. (2008). Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aerogenosa*. *App. Microbial. Biotechnol.* 78:955–961.

- [93] Lotrakul P. & Dharmsthiti S. (1997). Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 13: 163-166.
- [94] Chakraborty K. & Paul Raj R. (2008). An extracellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC6824: Purification and biochemical characterization. *Food chemistry*. 109: 727-736.
- [95] Trussell R. E. & Weed L.A. (1936). The lipolytic action of *Staphylococci* on some pure triglycerides. 381-388.
- [96] Rahman R., Leow T. C., Salleh A. B. & Basri M. (2007). *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC Microbiology*. 7: 77.
- [97] Abed el moniem Abada E. (2008). Production and characterization of mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB1. *Pakistan journal of biological science*. 11:1100-1106.
- [98] Petersen M. & Daniel R. (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphom*. *World journal of microbiology & Biotechnology*. 22: 431-435.
- [99] Sharon C., Nakazato M., Ogawa H. & Kato Y. (1998). Lipase induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 21: 292-29
- [100] Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S. & Gupta R.(2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*. 41: 38-44.
- [101] Bhatnager T., Boutaiba S., Hacene H., Cayol J. L., Fardeau M. L., Ollivier B. & Baratti J.C.(2005). Lipolytic activity from *Halobacteria*: screening and hydrolyse production. *FEMS Microbiology letters*. 248: 133-140.
- [102] Lie E., Person A. & Molin G. (1991). Screening for lipase-producing micro organisms with a continuous cultivation system. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 35: 19-20.
- [103] El-Bastway E., El-Masry M. H. & El-Adl N.E.(2005). The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World journal of microbiology & biotechnology*. 21: 815-822.
- [104] Niu C., Graves J. D., Mokuolu F. O., Gilbert S.E. & Gilbert E. S.(2005). Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *Journal of microbiology methods*. 62: 129-132.

- [105] Sorokin O. Y. & Jones B. E.(2009). Improved method for direct screening of true lipase-producing micro organisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology*. 78:125-130.
- [106] Hermansyah H., Wijanarko A., Dianursanti, Gozan M., Wulan P. P. D. K., Arbianti R., Soemantojo R.W., Utami T.S., Yuliusman, Kubo M., Shibasaki-Kitakawa N. & Yonemoto T. (2007). Kinetic model for triglyceride hydrolysis using lipase: Review. 11: 30-35.
- [107] KoKusho Y., Machida H. & Iwasaki S.(1982). Studies on alkaline lipase: Isolation and identification of lipase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1159-1164.
- [108] Kown D. Y. & Rhee J. S. (1986). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Technical*. 63: 89-92.
- [109] Hachaichi-Sadouk Z., Tazerouti A. & Hacene H. (2008). Production d'esters d'alkyle d'acides gras par bioconversion d'une l'huile végétale. *Journal de la société Algérienne de chimie*. 18: 173-183.
- [110] Silva W.O.B., Mitidieri S., Schrank A. & Vainstein M.H. (2005).Production and extraction of an extracellular lipase from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process biochemistry*. 40: 321-326.
- [111] Sexena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. (2003).Purification Strategy for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*. 52: 1-18.
- [112] Alloue W.A.M. (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. Pp 165.
- [113] Brito-Madurro A. G., Prade R. A., Madurro J. M., Santos M.A., Peres N. T. A., Cursino-Santos J. R., Martinez-Rossi N.M. & Rossi A. (2008). A Single Amino Acid Substitution in One of the Lipases of *Aspergillus nidulans* Confers Resistance to the Antimycotic Drug Undecanoic Acid. *Biochem. Genet.* 46: 557–565.
- [114] Castro-ochoa L.D., Rodrigez-Gomez C., Valerio-Alfaro. & Ros R. O. (2005). Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans CCR11*. *Enzyme and microbial technology*. 37:648-654.
- [115] Dupuis C., Corre C. & Boyaval P. (1993). Lipase and Esterase Activities *Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii*. *Applied and environmental microbiology*. 59: 4004- 4009
- [116] Taipa M. A., Aires-Bmos M. R. & Cabrai, J. M. S. (1992). Purification of lipases. *J. Biotechnol.* 26: 111-142.
- [117] Sugihara A., Tani T. & Tominaga Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* *J. Biochem.* 109: 211–216.

- [118] Iftikhar T., Niaz M., Afzal M., Haq I. & Rajoka M. I. (2008). Maximization of Intracellular Lipase Production in a Lipase-Overproducing Mutant Derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A Kinetic Study. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 402–412.
- [119] Hooker A. D., Hardy J. & Stacey K. A. (1997). Is induction of the exocellular lipase of *Xanthomonas maltophila* NK7 by fats and detergents simply the result of continual detachment from the cell surface? *World journal of microbiology & biotechnology.* 13: 677-681.
- [120] Volpato G., Rodrigues R. C., Heck J. X. & Ayub M. A. Z. (2009). Effects of oxygen volumetric Mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 14:105-111.
- [121] Gargouri M., Akacha N.B., Kotti F. & Ben Rajeb I. (2008). Voie de la lipoxgénase valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de saveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12:185-202.
- [122] Parades C., Bernal M. P., Roig A. & Cegarra J. (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agro industrial and urban wastes. *Biodegradation.* 12: 225–234.
- [123] Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Lecuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23:15-22.
- [124] Singh L., Ram M.S., Agarwal M. K. & Alam S. I. (2000). Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains and their evaluation for biodegradation of night soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 16: 625-630.
- [125] Tomaras A. P., C. W. Dorsey, R.E. Edelman, L. A. Actis.(2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone - usher pili assembly system. *Microbiology.* 149: 3473 – 3484.
- [126] Lee H. W., Koh Y. M., Kim J., Lee J.C., Lee Y. C., Seol S. Y., Cho D.T. & Kim J. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 14: 49–54.
- [127] Grimont F. & Grimont P. A. D. (2006). The Genus *Serratia*. *Prokaryotes.* 6: 219–244.
- [128] Immanuel G., Esakkiraj P., Jebadhas A., Iyapparaj P. & Palavesam A.(2008). Investigation of Lipase Production by Milk Isolate *Serratia rubidaea*. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 60–65.
- [129] Quax W. J. (2006). Bacterial Enzymes. Chapter 3.4. *Prokaryotes.* 1: 777–796.
- [130] Iftikhar T., & Hussain A. (2002). Effect of nutrients on the extracellular lipase production by mutant strain of *Rhizopus oligosporus*. *Biotechnology.* 1: 15-20.
- [131] Lakshmi B.S., Kanguane P. & Pennathur G. (1999). Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). *Letters in applied microbiology.* 29: 66-70.

- [132] Babu I. S. & Rao H. (2007). Optimisation of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Research journal of microbiology. 1: 88-93.
- [133] Verger R. & de Haas G. H. (1976). Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5: 77-117.
- [134] Schrag J.D. & Cygler M. (1993). 1.8 A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.* 230: 575-591.
- [135] Longhi S. & Cambillau C. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1441: 185-196.
- [136] Lawrence R.C., Fryer T. F. & Reiter B. (1967). The Production and Characterization of Lipases from a *Micrococcus* and a *Pseudomonad*. *J. gen. Microbial.* 48: 401-418.
- [137] Largea K. P., Mirjalili N., Osborne M., Peacock L. M., Zormpaidis V., Walsh M., Cavanagha M.E., Leadlay P. F. & Ison A. P. (1999). Lipase activity in *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology.* 25: 569-575.
- [138] Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D. & Renault P. (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* Lipase in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology.* 66: 588-598.
- [139] Chappe P., Mourey A. & Manem J. (1994). La microflore de boues aérobies acclimatées en graisse. *Revue de science de l'eau.* 7 :395-404.
- [140] Winkler F. K., D'arcy A. & Hunziker W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 343: 771-774.
- [141] Reis P., Holmberg K., Miller R., Leser M. E., Raab T. & Watzke H.J. (2008). Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. *C. R. Chimie.* 1-8.
- [142] Najjar A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
- [143] Leyral G. & Joffine J. N. (1998). *Microbiologie technique* 2^{ème} édition.
- [144] Dicko M. H. (2010). Travaux pratique. Biochimie structurale & Enzymologie .Licence de Biochimie DUT- Contrôle Qualité- IAA- 2^{ème} Année, TP. Licence Biochimie, DUT-CQA- 2^{ème} Année.
- [145] Tsuzuki W., Kitamura Y., Suzuki T. & Mase T. (1999). Effects of glucose on lipase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochim.* 63: 1467 - 1470.

- [146] Chahinian H. & Sarda L. (2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein. Pept. Lett.* 16: 1149-1161.
- [147] Hills M. J. & Mukherjee K. D. (1990). Triacylglycérol lipase from rape (*Brassica napus*) suitable for biotechnological purposes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26: 1-10.
- [148] Chahinian H., Nini L., Boitard E., Dubès J.P., Comeau L.C. & Sarda L. (2002). Distinction between Esterases and Lipases: A Kinetic Study with Vinyl Esters and TAG. *Lipids.* 37: 653-661.
- [149] Pencreac'h G. & Baratti J.C. (1997). Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 47: 630-635.
- [150] Luo Y., Zheng Y., Jiang Z., Ma Y. & Wei D. (2006). A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:349–355.
- [151] Gopinath S. C. B., Anbu P. & Hilda A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience.* 46:119–126.
- [152] Dominguez de Maria P., Sanchez-Montero J. M., Sinisterra J. V. & Alcantara A. R. (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances.* 24 : 180– 196.
- [153] Moraleda-Munoz A. & Shimkets L. J. (2007). Lipolytic Enzymes in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology.* 183: 3072 –3080.
- [154] Singh A. K. & Mukhopadhyay M. (2012). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 486–520.
- [155] Acharya P. & Rao N.M.(2003). Stability Studies on a Lipase from *Bacillus subtilis* in Guanidinium Chloride. *Journal of Protein Chemistry.* 22: 51-60.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

ANNEXE 1-

La composition de milieu de culture ESTA : Milieu solide à base de tributyrine et extrait du sol (Extrait du sol- tributyrine- Agar) [11] :

Extrait du sol	750 ml
Extrait de levure.....	1 g
K ₂ HPO ₄	0.4 g
Polyvinyle alcohol	1 g
Tributyryne.....	10 ml
Le tout est mélangé jusqu'à obtenir une émulsion. Après on va ajouter :	
Agar.....	15 g
Extrait du sol.....	250 ml

ANNEXE 2-

Les ingrédients de milieu gélosé à base de Tween 80 sont :

Bouillon nutritif	8 g/L
Na Cl	5 g/L
Ca Cl ₂0.1 g/L
Agar	15 g/L

Le pH est ajusté à 7. Après stérilisation à autoclave, ce milieu est additionné de tween 80 stérile à 10 ml /L [20].

ANNEXE 3-

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées à partir d'échantillons recueillis à proximité d'une exploitation traditionnelle.

Les caractères	<i>Aeromonas Hydrophila</i> (S.R)	<i>Aeromonas sobria</i> (S.J.C)	<i>Serratia liquefasciens</i> S.B.
Aspect des colonies	Lisse, ronds	Lisse, ronds	Lisse, ronds
Coloration de Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
La forme de cellule	coccobacille	coccobacille	Coccobacille
Pigmentation	Rose	Jaune citron	Blanche
Oxydase	Négative	Positive	Négative
Catalase	+	+	+
Hydrolyse de :			
- Tween 80	+	+	+
- Tributyrine	-	-	-
-Huile d'olive	+	+	+

ANNEXE 4-

Identification des souches :

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques, en utilisant le kit biochimiste API 20 NE et AP 20 E des isolats testés positifs.

Six isolats bactériens ont été identifiés sur la base des caractéristiques phénotypiques de l'échantillons isolés du sol et de l'exploitation traditionnelle.

Les caractéristiques phénotypiques :

Les souches observées au microscope sont apparues sous forme des coccobacilles très courtes.

Les caractéristiques biochimiques :

Elles sont des souches à Gram (-), psychrophiles facultatives, lipolytiques et ont un fort pouvoir de dégrader des triglycérides à longues chaînes d'AG.



Fig. 1 Résultats de la lecture de la galerie de souche *Serratia liquefaciens* par AP 20 E.



Fig.2 Résultats de la lecture de la galerie de souche *Aeromonas sobria* par AP 20 NE



Fig.3 Résultats de la lecture de la galerie AP 20 NE de souche *Pseudomonas putida* par AP 20 NE.



Fig.4 Résultats de la lecture de la galerie de souche *Aeromonas hydrophila* par AP 20 NE.

ANNEXE 5-

Résultats de la lecture de la galerie des souches provenant d'une exploitation traditionnelle.

Les caractères	AP 20 NE		AP 20E	
	CR	CJC	caractères	Cb
No ₃	+	+	ONPG	+
TRP	+	-	ADH	-
Glu	+	+	LDC	+
ADH	-	+	ODC	+
URE	-	-	CTE	+
ESC	+	+	H ₂ S	-
GEL	+	+	URE	-
PNPG	+	+	TDA	+
GLU	+	+	IND	-
ARA	-	+	VP	+
MNE	+	+	GEL	+
MAN	+	+	GLU	+
NAG	+	+	MAN	+
MAL	+	+	INO	+
GNT	+	+	SOR	+
CAP	+	+	RHA	-
ADI	-	-	SAC	+
MLT	+	+	MEL	+
CIT	+	+	AMY	+
PAC	-	+	ARA	+
Oxydase	+	+	OX	-
Catalase	+	+	Catalase	+
Identification	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	

ANNEXE 6-

Résultats de la lecture de la galerie des souches provenant du sol.

Les caractères	SOUCHES DE SOL		
	S3	Sv	S4
NO ₃	-	+	+
TRP	-	-	-
Glu	-	+	+
ADH	+	+	+
URE	+	+	+
ESC	-	+	+
GEL	-	+	-
PNPG	-	-	+
GLU	+	+	+
ARA	-	+	+
MNE	+	+	+
MAN	-	+	+
NAG	+	+	+
MAL	-	+	+
GNT	+	+	+
CAP	+	+	+
ADI	-	-	-
MLT	+	+	+
CIT	+	+	+
PAC	+	+	+
OX	+	+	+
Catalase	+	+	+
Identification	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Glossaire

- **Acide gras** : il s'agit d'un acide carboxylique R-COOH dont le radical R est une chaîne d'hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe. Un acide gras peut être saturé, mono-insaturé ou poly- insaturé.

- **Acide gras mono-insaturé** : le radical comporte une seule double liaison. On retrouve ce type d'acide gras notamment dans l'huile d'olive.

- **Acide gras poly-insaturé** : le radical comporte plusieurs doubles liaisons. On retrouve ce type d'acide gras par exemple dans les huiles de poissons.

- **Acide gras saturé** : le radical ne comporte aucune double liaison. On retrouve ce type d'acide gras essentiellement dans les lipides d'origine animale.

Acétate de p-nitrophenol : p-NPA a pour formule brute $C_8H_7NO_4$ et Poids moléculaire de 181.14788 g/mole.

Densité : rapport de la masse volumique d'un corps sur la masse volumique d'un autre corps (généralement l'eau) pris comme référence.

Emulsifiant : les émulsifiants, aussi appelés molécules tensio-actives, sont constitués d'ions ou d'atomes formant des chaînes allongées. Ils sont caractérisés par une tête hydrophile et une queue hydrophobe, mais qui est lipophile.

Emulsion : il s'agit d'une dispersion d'un liquide dans un autre liquide au départ non miscible avec le premier.

Graisse : matières grasses sous forme solide à la température ambiante.

Huile : matières grasses sous forme liquide à la température ambiante.

Hydrophile : c'est exactement l'inverse d'hydrophobe.

Hydrophobe : se dit d'une combinaison d'atomes qui n'a aucune affinité pour l'eau.

Molécules ou parties de molécules qui n'aiment pas l'eau, qui ne peuvent pas se lier à celle-ci par des liaisons hydrogènes.

Interphase : zone de contact entre deux liquides non miscibles, où se crée un film constitué des molécules tensio-actives de l'huile.

Lipides : ce sont les matières grasses. Ils se trouvent dans l'alimentation sous la forme de triglycérides, de cholestérol et de phospholipides.

Triglycérides : se sont des (tri) esters naturels des acides gras et du glycérol. L'hydrolyse de ce triester fournit un glycérol et 3 acides gras (identiques ou différents).

Tributyryne : (**tributyrate de glycérol**) est trois l'uns des isomérique glycerylique esters d'acide butyrique.

Tween 80 polysorbate 80. Détergent non ionique couramment utilisé en laboratoire.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.