

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA-BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème

Semi-purification et caractérisation d'une lipase Actinobactérienne

Présenté par : *AMOKRANE Dalia et MERADJI Yamina*

Soutenu le : 25/06/2023

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------------|-----|--------------|
| Mr. BETTACHE Azzedine | Pr | Président |
| M ^{me} .DJINNI Ibtissem | MCA | Examinatrice |
| M ^{me} .BOUCHERBA Nawel | Pr | Encadreur |

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement

Nous exprimons notre profonde gratitude envers le Tout-Puissant pour nous avoir permis de mener à bien ce travail. Nous souhaitons également exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont apporté leur contribution, qu'elle soit directe ou indirecte, à la réalisation de ce travail, plus précisément :

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre profonde gratitude aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail :

Professeur BETTACHE Azzedine a eu l'honneur de nous faire en présidant ce jury et d'apporter ses appréciations sur ce travail.

Mme DJENNI Ibtissem a bien voulu s'intéresser à ce travail et l'examiner. Nous sommes très honorés de sa présence dans ce jury.

Madame BOUCHERBA Nawel, qui nous a accordé une grande marge de manœuvre dans l'exécution de ce travail, tout en nous guidant vers des pistes de réflexion vastes et prometteuses.

Monsieur BENHOULA Mohamed pour son sens de l'écoute et surtout pour son assistance précieuse et éclairée qui a été d'une grande valeur pour nous.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance envers toutes les personnes remarquables du "Laboratoire de microbiologie appliquée" (LMA) de l'Université de Bejaia, en particulier Mlle SARAH & Mr AMGHAR Zahir pour leur courtoisie.

Nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance à tous nos professeurs pour la qualité exceptionnelle de l'enseignement dispensé tout au long de notre parcours de cinq ans à l'université.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui quels, que soient les termes embarrassés je n'arriverai jamais à leurs exprimé mon amour sincère, ma famille, mes parents, qui m'ont doté d'une éducation digne, mon petit frère ainsi que ma sœur qui ont étaient toujours là pour moi, leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement à mon père, pour le gout à l'effort qu'il a suscité en moi de par sa rigueur.

À toi maman, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

À vous mon très cher frère SALAH et ma très chère sœur NIHEB qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études, j'aurai aimé que vous puissiez assisté à ce jour si important pour moi.

Une pensée particulière à ma très chère petite nièce ELINE qui nous a rejoint y a deux mois.

À mon beau-frère LAMINE qui est toujours présent pour moi.

Une autre pensée à mon ami MOULOUD et mon amie ASMA qui ont toujours étaient là pour moi.

À ma binôme YAMINA qui est une personne magnifique.

Au doctorant MOUHAMED BENHOULA qui m'a soutenu durant la manipulation au laboratoire.

DALIA

Dédicaces

À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À la mémoire de mon père qui nous a quittés très tôt.

Que Dieu repose son âme en paix. Tous les mots ne me suffisent pas pour dire combien il me manque.

À celle qui a sacrifié toute sa jeunesse pour nous, qui m'a toujours encouragé, qui m'a soutenue durant toute la longue durée de mes études et qui m'a donnée une bonne éducation. Au bonheur de ma vie ma mère qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, merci pour ta confiance et ton amour

Que dieux te protège et t'accorde une longue vie pleine

De santé et de bonheur.

À les plus chères, mon frère Yacine et ma sœur Sara.

À toute ma famille, mes cousines, mes très chères amies.

À ma toute la promotion Master II biotechnologie microbienne.

À tous ceux qui M'ont connu de près ou de loin.

À tous ceux dont l'oublié de la plume n'est pas celui du cœur.

YAMINA

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Partie I Synthèse bibliographique | |
| I. Actinobactérie | 3 |
| I.1 Généralités | 3 |
| I.2 Taxonomie des actinobactéries..... | 4 |
| I. 3 Importance des actinobactéries..... | 5 |
| I. 3. 1 Domaine écologique..... | 5 |
| I. 3. 2 Domaine biotechnologique..... | 6 |
| I. 3.3 Domaine pharmaceutique..... | 6 |
| I. 4 Caractéristiques physiologiques des actinobactéries | 6 |
| I. 5 Production d'enzyme chez les actinobactéries..... | 7 |
| II. Les lipases | 9 |
| II. 1 Généralités sur les enzymes..... | 9 |
| II. 2 Historique et définitions | 9 |
| II. 3 Origine des lipases..... | 9 |
| II. 3. 1 Origine végétale..... | 10 |
| II. 3. 2 Origine animale..... | 10 |
| II. 3. 3 Origine microbienne | 10 |
| II. 4 Différents mécanismes de catalyse lipasique | 13 |
| II. 4. 1 Réaction d'hydrolyse | 13 |
| II. 4. 2 Réaction de la synthèse..... | 13 |
| II. 5 Intérêt industriel des lipases..... | 15 |

Partie II Matériels et méthode

| | |
|---|-----------|
| I. Matériels | 18 |
| I. 1 Matériel analytique..... | 18 |
| I. 2 Matériel biologique..... | 18 |
| II. Méthode..... | 18 |
| II. 1 Revivification de la souche | 18 |
| II. 2 Préparation de la solution sporale..... | 18 |
| II. 3 Test d'activité lipasique | 18 |
| II. 4 Cinétique de croissance et de production de la lipase | 20 |
| II. 5 Semi-purification des lipases..... | 20 |
| II. 5. 1 Préparation de l'extrait lipasique..... | 20 |
| II. 5. 2 Précipitation fractionné au sulfate d'ammunium (40-70 %) | 21 |
| II. 5. 3 Dialyse | 21 |
| II. 5 .4 Méthode analytique | 22 |
| II.6 Caractérisation biochimique de la lipase semi-purifiées..... | 22 |
| II. 6. 1 Effet de la température sur l'activité de la lipase et mesure de thermostabilité..... | 22 |
| II. 6. 2 Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la lipase | 23 |
| II. 6. 3 Effets des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de la lipase..... | 23 |
| II. 6. 4 Effets des ions métalliques sur la stabilité et l'activité lipasique | 23 |
| II. 6. 5 Effet des inhibiteurs et des détergents sur la stabilité et l'activité de la lipase | 23 |

Partie III Résultats Et Discussions

| | |
|--|-----------|
| I. 1 Repiquage de la souche | 24 |
| I. 2 Test d'activité lipasique..... | 24 |
| I. 3 Suivi de la croissance et de la production d'enzyme | 25 |
| I. 4 Purification partielle de la lipase..... | 20 |
| I. 4. 1 Précipitation au sulfate d'ammonium (40 -70 %)..... | 20 |
| I. 4. 2 Paramètres de purification..... | 20 |
| I. 5 Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme | 21 |
| I. 6 Mesure de la thermostabilité | 21 |
| I. 7 Effet du pH sur la stabilité de la lipase..... | 22 |
| I. 7 Effet des solvants organique sur la lipase..... | 23 |
| I. 8 Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique | 24 |
| I. 9 Effet des détergents et des inhibiteurs sur l'activité lipasique | 25 |
| Conclusion..... | 36 |

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Photographie au microscope électronique à balayage de différents isolats d'actinobactéries | 12 |
| Tableau 2 : Application des lipases dans l'industrie alimentaire | 16 |
| Tableau 3 : Résultat de la semi purification de la souche <i>Streptomyces</i> sp. 22 dz. | 20 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Photographies au microscope électronique à balayage de différents isolats d'actinobactéries. a - <i>Micromonospora</i> sp. b - <i>Streptosporangium</i> sp. c - <i>Saccharopolyspora</i> . d - <i>Actinosynnema</i> sp. e - <i>Streptomyces</i> sp..... | 4 |
| Figure 2 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du Gène codant l'ARNr 16S..... | 5 |
| Figure 3 : Réactions catalysées par les lipases | 14 |
| Figure 4 : Aspect de l'isolat de la souche <i>Streptomyces</i> sp. 22 dz après revivification sur milieu ISP2..... | 24 |
| Figure 5 : Virage de couleur vers le rose après l'ajout de soude. | 24 |
| Figure 6 : l'observation des spores à l'aide d'un microscope optique avec grossissement x40. | 25 |
| Figure 7 : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. 22dz. | 25 |
| Figure 8 : Effet de la température sur l'enzyme. | 21 |
| Figure 9 : étude de la thermo stabilité de l'enzyme. | 22 |
| Figure 10 : effet du pH sur la stabilité de l'enzyme. | 23 |
| Figure 11 : Effet des solvants organique sur l'activité lipasique. | 24 |
| Figure 12 : Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique..... | 25 |
| Figure 13 : Effet des inhibiteurs sur l'activité lipasique. | 26 |

LISTE DES ABREVIATIONS

NaOH : L'hydroxyde de sodium

Rpm : Rotations par minute

V/V : Volume par volume

L : Litre

M : Molaire

GC% : Pourcentage en Guanine-Cytosine

°C : Degré Celsius

pH : Potentiel d'hydrogène

UFC : Unité formant colonie

H : Heure

Min : Minute

% : Pourcentage

mM : Millimolaire

μmol : Micromolaire

mL : Millilitre

N : normal

p/v : poids par volume

G : gramme

AGL : acide gras libre-AGL : acide gras libérés

SDS : Dodécylsulfate de sodium

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra-Acétique

AS : Activité spécifique

ISP2 : International *Streptomyces* Project

Introduction

Introduction

Le sol est un environnement qui a été largement exploré en raison de son rôle d'habitat pour les microorganismes producteurs de composés naturels biologiquement actifs (**Kumar et al., 2010**). Les substances bioactives ont passionné les chercheurs, de par le monde en quête de nouvelles molécules (**Gomath et al., 2016**). Les micro-organismes les plus productifs en termes de molécules bioactives sont généralement des bactéries à Gram positif, qui se distinguent par leur variété de formes. Parmi eux, le genre *Streptomyces* est particulièrement connu depuis les soixante-dix dernières années pour sa capacité à produire de nombreux composés bioactifs. Ces molécules sont largement utilisées en tant qu'antibiotiques, agents anti tumoraux, immunosuppresseurs et enzymes (**Prashanthi et al., 2018**).

Aujourd'hui, notre quotidien repose largement sur l'utilisation de produits biotechnologiques tels que les médicaments, les détergents, les aliments et les produits cosmétiques. Cependant, la fabrication de ces produits biologiques dépend de la plupart des cas de la présence et de l'action des enzymes (**Lagrari, 2019**).

Parmi ces enzymes, nous retrouvons les lipases qui sont une classe diversifiée en raison de leurs origines, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes. Elles sont synthétisées sous forme de protéines extracellulaires. La grande diversité des propriétés catalytiques et la polyvalence réactionnelle des lipases en font des candidates privilégiées pour de multiples applications industrielles citées ci-dessus. Cependant, pour utiliser les lipases dans ces divers secteurs, une étape cruciale est la formulation préalable, qui implique de réaliser une préparation enzymatique, soit un extrait brut ou un extrait brut semi-purifié car la majorité des industries utilise ce type de préparation (**Alloue et al., 2008**).

Le principal objectif de cette étude est centré sur la semi purification et la caractérisation biochimique de la lipase des actinobactéries en milieu liquide. Pour atteindre cet objectif, notre recherche est divisée en parties distinctes, qui se concentrent sur les aspects suivants :

Premièrement, les généralités sur les actinobactéries et les lipases ont été abordées dans la synthèse bibliographique.

Deuxièmement, le protocole expérimental de la semi-purification et de la caractérisation des lipases produites par une souche d'actinobactérie appelée *Streptomyces* sp. 22 dz a été élaboré.

Ensuite, les résultats obtenus ont été discutés et la conclusion a été présentée pour clôturer notre mémoire.

Synthèse bibliographique

I. Actinobactérie

I.1 Généralités

Le terme "actinobactéries" trouve son origine étymologique dans les mots grecs "Aktis" signifiant "rayon" et "mykes" signifiant "champignon". Ainsi, il peut être interprété comme faisant référence à des champignons qui rayonnent ou qui ont une apparence en forme de rayons (**Labeda et al., 1984**).

Les actinobactéries sont des microorganismes présents dans la plupart des écosystèmes, ce qui les rend omniprésentes. La majorité d'entre elles se trouvent dans le sol, mais elles sont capables de coloniser de nombreux autres habitats tels que l'air, les composts, les eaux, les fourrages, les fumiers, les grains de céréales, les systèmes de climatisation, la poussière domestique, le foin et les pailles, les résidus fibreux de canne à sucre, le pollen des plantes ainsi que d'autres substrats. Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, caractérisées par un contenu en GC supérieur à 55% et une tendance à former des filaments ramifiés qui peuvent se développer en un véritable mycélium. La longueur des filaments peut varier considérablement, allant de très courts à très développés, tandis que leur diamètre se situe entre 0,5 μm et 2 μm . Parfois, la fragmentation des filaments peut donner des formes coccoïdes. Les spores peuvent être isolées ou regroupées en chaînettes. Chez les Actinoplanaceae, les spores peuvent être mobiles ou non, et se trouvent dans une structure appelée sporange. Les bactéries en question ont pour particularité de générer des métabolites secondaires intéressants, notamment des agents antimicrobiens, des enzymes et des antioxydants (**Lecterch et al., 1983**).

Comparées à d'autres bactéries, ces dernières se développent plus lentement avec un temps de génération moyenne de 2 à 3 heures (**Kitouni, 2007**).

Malgré leur statut de microorganismes procaryotes, les actinobactéries présentent une morphologie qui rappelle celle des microorganismes eucaryotes, notamment les champignons filamenteux (**Osada, 1998**). Les actinobactéries colonisent le sol, les environnements marins et d'autres écosystèmes dits extrêmes (**Mincer et al., 2002**).

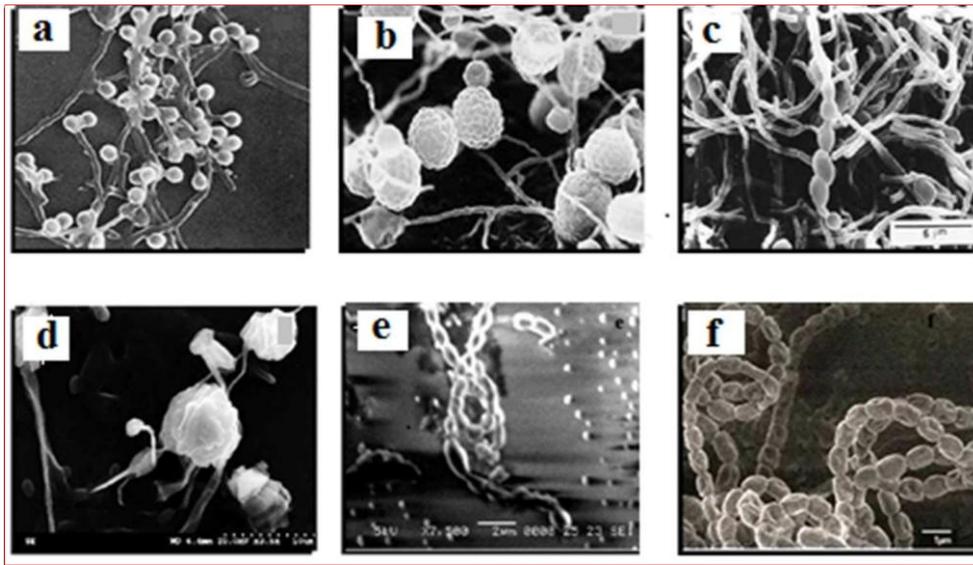


Figure 1 : Photographies au microscope électronique à balayage de différents isolats d'actinobactéries. a - *Micromonospora* sp. b - *Streptosporangium* sp. c - *Saccharopolyspora*. d - *Actinosynnema* sp. e - *Streptomyces* sp (**Anandan et al., 2016**).

.1 I.2 Taxonomie des actinobactéries

L'analyse des gènes d'ARNr 16S et 23S a permis d'établir la classification des actinobactéries (**Ludwig et al., 2012**).

Les actinobactéries constituent l'une des unités taxonomiques les plus importantes des 18 lignées majeures actuellement identifiées dans le domaine des bactéries. Elles sont composées de 5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres (**Barka et al., 2015**). L'ordre des Actinomycetales fait partie de la classe Actinobacteria qui est désormais restreinte aux membres de la famille *Actinomycetaceae*. Cela signifie que sur les 43 familles du phylum Actinobacteria, seules 10 familles font partie des cinq autres classes, alors que les 33 autres sont classées dans la classe Actinobacteria (**Mohammadipanah et al., 2017**). La figure suivante donne la classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant l'ARNr 16S.

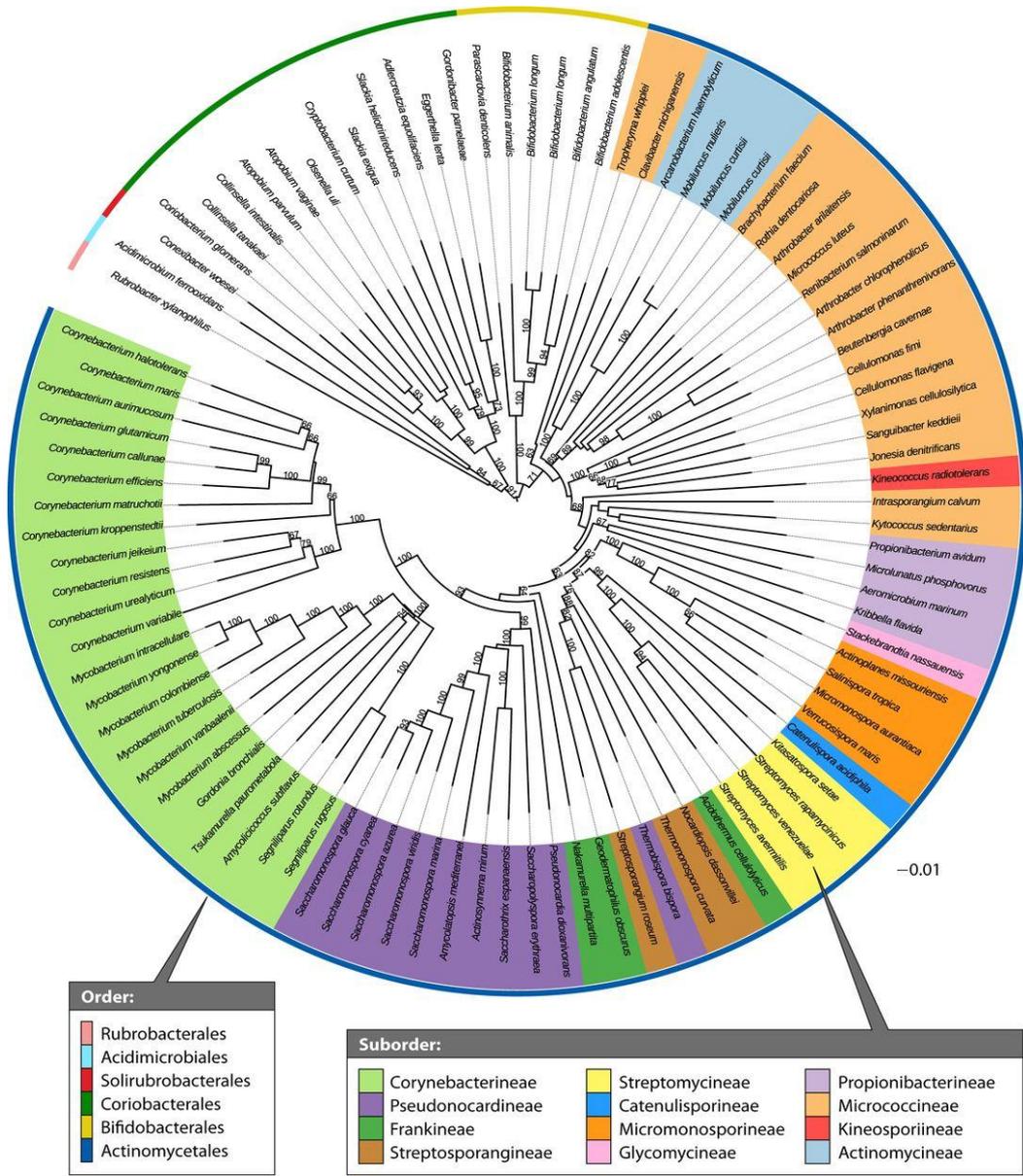


Figure 2 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du Gène codant l'ARNr 16S (*Barka et al., 2015*).

2 I. 3 Importance des actinobactéries

Les actinobactéries sont un groupe de bactéries largement répandues dans la nature et qui jouent un rôle important dans l'industrie. Ces bactéries se distinguent par leur remarquable aptitude à synthétiser un large éventail de composés, tels que des enzymes, des antibiotiques, des pigments, des agents anti-tumoraux et des immunosuppresseurs. Il est estimé qu'environ 70% des antibiotiques utilisés en médecine proviennent de dérivés ou de produits issus des actinobactéries (*Genilloud, 2017*).

.2.1 I. 3. 1 Domaine écologique

Les actinobactéries jouent un rôle crucial dans les écosystèmes en raison de leur importance écologique diversifiée.

- **Décomposition de la matière organique :** Les actinobactéries sont impliquées dans la dégradation de divers matériaux organiques, tels que les résidus végétaux, les feuilles mortes, le bois et les déchets animaux. Leur activité enzymatique contribue à la conversion de ces matériaux en éléments nutritifs, favorisant ainsi le recyclage des nutriments dans les écosystèmes (**Grzyb et al., 2020**).

- **Formation de complexes symbiotiques :** Certaines actinobactéries établissent des relations symbiotiques avec des plantes, formant des associations bénéfiques connues sous le nom de mycorhizes à actinobactéries. Ces interactions facilitent l'absorption des nutriments du sol par les plantes et renforcent leur résistance aux stress biotiques et abiotiques (**Freitas et al., 2017**).

Par exemple : l'actinobactérie *Frankia* établit une relation symbiotique avec certaines espèces de plantes, telles que les arbres fixateurs d'azote, formant des nodules racinaires spéciaux.

- **Production de métabolites bioactifs :** les actinobactéries sont célèbres pour leur capacité à produire une large gamme de métabolites bioactifs, tels que les antibiotiques, les antifongiques, les anti tumoraux et les antiviraux. Ces métabolites peuvent jouer un rôle important dans la défense des plantes contre les pathogènes (**Berdy, 2012**).

.2.2 I. 3. 2 Domaine biotechnologique

La bioremédiation, qui relève de la biotechnologie environnementale, implique l'utilisation d'organismes vivants pour éliminer les contaminants présents dans le sol, l'eau ou les eaux usées (**EPA, 2002**). Des recherches sont en cours pour évaluer l'efficacité des membres du phylum actinobacteria dans la bioremédiation des pesticides et les métaux lourds. En outre, il convient de noter que les actinobactéries sont des producteurs remarquables d'enzymes ayant de nombreuses applications biotechnologiques (**Polti et al., 2015**).

.2.3 I. 3.3 Domaine pharmaceutique

Les actinobactéries ont été la source de nombreux composés bioactifs présentant une gamme variée d'activités biologiques, notamment des antibiotiques, des antifongiques, des agents anticancéreux et antitumoraux, des anti-inflammatoires et des antioxydants (**Lam, 2006**).

.3 I. 4 Caractéristiques physiologiques des actinobactéries

Les actinobactéries sont généralement des microorganismes mésophiles, qui préfèrent une température de croissance comprise entre 25 et 30°C. Toutefois, il existe des espèces thermophiles, notamment dans le genre *Thermoactinomyces*, qui a une température optimale de croissance plus élevée, située entre 50 et 60°C (**Rangaswami et al., 2004**).

Concernant le pH, les actinobactéries sont neutrophiles et se développent bien dans un environnement dont le pH se situe entre 5 et 9. Cependant, il existe certaines souches de *Streptomyces* qui sont acidophiles et qui préfèrent des pH compris entre 3,5 et 6,5, ce qui leur permet de se développer abondamment dans les sols acides (**Aouar, 2012**).

.4 I. 5 Production d'enzyme chez les actinobactéries

Les actinobactéries sont connues pour leur capacité à produire un large éventail d'enzymes. Ces micro-organismes sont souvent utilisés dans l'industrie biotechnologique et pharmaceutique en raison de leur potentiel enzymatique. Voici quelques exemples d'enzymes produites par les actinobactéries

- **Amylases**

Les actinobactéries sont une source importante d'amylases, des enzymes qui dégradent l'amidon en sucres plus simples. Elles peuvent être utilisées dans diverses applications industrielles, telles que la production d'enzymes pour l'amélioration de la texture des aliments ou la conversion de l'amidon en biocarburants (**Winkler et al., 2019**).

- **Protéases**

Les actinobactéries produisent également des protéases, des enzymes qui décomposent les protéines en acides aminés. Ces enzymes sont utilisées dans la production de détergents, la transformation de la viande et la clarification des jus de fruits **(Rao et al., 1998)**.

- **Cellulases**

Les actinobactéries sont également reconnues pour leur capacité à produire des cellulases, des enzymes qui dégradent la cellulose, principal constituant des parois cellulaires des plantes. Les cellulases trouvent des applications dans la production de biocarburants à partir de la biomasse végétale **(Lynd et al., 2002)**.

Il existe de nombreuses autres enzymes produites par les actinobactéries, telles que les lipases, les estérases, les pectinases, les chitinases, etc. Ces enzymes présentent un potentiel prometteur pour diverses applications industrielles et médicales.

Concernant des lipases, les détails sont donnés dans la partie suivante.

II. Les lipases

.5 II. 1 Généralités sur les enzymes

La vie dans toutes ses formes, qu'il s'agisse de végétaux, d'animaux ou de microorganismes, repose sur un réseau complexe de réactions chimiques catalysées par des enzymes. Ces réactions sont essentielles pour la croissance et la maintenance cellulaires (McAuliffe, 2012). Les enzymes sont des macromolécules, majoritairement, de nature protéique. Elles sont des polypeptides de masses moléculaires élevées situées entre 10 à 1000 kDa (Jarrar, 2011). La plupart de ces catalyseurs naturels (et probablement presque tous à l'avenir) sont produits par fermentation de matières d'origine biologique (Hasan et al., 2006).

Les enzymes lipolytiques peuvent être classées en trois grands groupes sur la base de leur fonction et de leurs spécificités, les carboxylesterases (EC 3.1 .1.1), les lipases (EC 3.1.1.3) et les phospholipases (EC 3.1.1.4) (Charbonneau, 2014).

.6 II. 2 Historique et définitions

En 1856, Claude Bernard a découvert pour la première fois la lipase dans le suc pancréatique comme un enzyme qui hydrolyse les gouttelettes d'huile insolubles et les convertit en produits solubles (Ilesanmi et al., 2020).

Les lipases font partie de la classe des hydrolases (EC3). Elles agissent spécifiquement sur les liaisons ester (EC3.1) présentes dans les esters carboxyliques (EC3.1.1). Elles hydrolysent les triacylglycérols en acides gras, diacylglycérols, monoacylglycérols et glycérol et sont connues sous le nom de triacylglycérol acylhydrolases (EC3.1.1.3). En plus de leur activité d'hydrolyse, elles ont des capacités d'interstérification, d'estérification, d'aminolyse et d'alcoololyse, qui sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels (Joseph et al., 2008 ; Chandra et al., 2020) (figure 3).

.7 II. 3 Origine des lipases

Les lipases affichent une grande diversité de caractéristiques et sont présentes de manière ubiquitaire tant chez les végétaux que chez les animaux et les micro-organismes (Gupta et al., 2004).

.7.1 II. 3. 1 Origine végétale

Chez les plantes, les lipases se trouvent dans les graines ou les céréales, les fruits, les feuilles, entre autres. Cependant, la principale source de l'enzyme est les graines, où elles présentent également une activité hydrolytique plus importante, car les graines contiennent généralement une concentration élevée d'huile, qui servira de source d'énergie pour le développement ultérieur de la plante. Les lipases végétales ont un coût de production faible et constituent une bonne alternative pour l'utilisation des coproduits agricoles, en plus de présenter une bonne stabilité dans les réactions d'interestérification (Filho et al., 2019).

.7.2 II. 3. 2 Origine animale

Les lipases d'origine animale sont générées par des cellules spécialisées qui synthétisent ces enzymes, ou bien elles sont présentes chez d'autres animaux hôtes dans le tractus gastro-intestinal. Leur rôle principal consiste à faciliter la digestion des graisses et des lipides (Filho et al., 2019).

Les lipases présentes chez les mammifères peuvent être regroupées en trois catégories distinctes :

- Le premier groupe comprend les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguales, pharyngées, gastriques et pancréatiques.
- Le deuxième groupe comprend les lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux.
- Enfin, le troisième groupe comprend les lipases produites par les glandes galactogènes qui sont responsables de la production du lait maternel.

(Fickers et al., 2008).

.7.3 II. 3. 3 Origine microbienne

Les lipases microbiennes sont extraites de différentes sources telles que les champignons, les levures et les bactéries. Elles ont suscité un intérêt plus marqué de la part des industriels que les lipases d'origine végétale et animale. Ces lipases présentent de nombreux avantages significatifs, tels qu'une abondance accrue, des rendements de production plus élevés, une facilité de modification génétique et une croissance rapide

dans des milieux peu coûteux, ce qui contribue à la réduction des coûts de production. De plus, elles se distinguent par leur grande diversité de caractéristiques et de spécificités. Par conséquent, elles sont plus facilement produites et étudiées (**Geoffry et al., 2018 ; Filho et al., 2019**).

Les lipases bactériennes extracellulaires sont d'une importance primordiale dans le domaine commercial en raison de leur facilité de production à grande échelle. Bien qu'il existe plusieurs sources bactériennes capables de produire des lipases, seules quelques-unes sont exploitées commercialement, soit sous leur forme sauvage, soit sous forme recombinante. Les microorganismes producteurs sont, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas*. Les lipases de *Pseudomonas* sont largement utilisées dans diverses applications biotechnologiques (**Gupta et al., 2004**).

➤ **Les actinobactéries productrices de la lipase :**

Parmi les actinomycètes, *Streptomyces* sp. Est un groupe d'organismes d'une grande importance industrielle, Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses Gram-positives que l'on trouve généralement dans le sol. Ce microorganisme est principalement connu pour sa capacité à synthétiser de nombreux antibiotiques et autres métabolites secondaires. Il produit également un grand nombre d'enzymes telles que des lipases. Quelques genres d'actinobactéries connus pour leur capacité à produire des lipases :

- ***Streptomyces*** : Les espèces de *Streptomyces* sont largement étudiées pour leur production de lipases. Par exemple, *Streptomyces rochei* (**Soares et al., 2012**).
- ***Nocardia*** : Certains membres du genre *Nocardia* sont également connus pour leur production de lipases (**Sharma et al., 2014**).
- ***Amycolatopsis*** : Les *Amycolatopsis* sont des actinobactéries productrices de lipases. Par exemple, d'*Amycolatopsis mediterranei* (**Hassan et al., 2020**).

Tableau 1 : Photographie au microscope électronique à balayage de différents isolats d'actinobactéries (**alloue et al., 2008**).

| Source de la lipase | Forme | Société | Rôle et application | Références |
|---|-------------|--|---|---|
| <i>Candida rugosa</i> | Poudre | Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma | Hydrolyse des lipides | Knezevic et al., 2004 |
| <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60) | Immobilisée | Novo Nordisk | Synthèse des lipides et d'ester de sucres | Ward et al., 1997 Chen et al., 200 |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax) | Poudre | Genencor | Hydrolyse (industries des détergents) | Jaeger et al., 1998 |
| <i>Rhizomucor miehei</i> (Palatase) | Liquide | Novo Nordisk | Hydrolyse(développement des arômes dans le fromage) | Tarahomjoo et al., 2003 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase) | Poudre | Novo Nordisk | Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaires) | Destain, 1998 |
| Lipase (E.C.3.1.1.3) <i>Yarrowia lipolytica</i> | Poudre | Artechno S.A. | Hydrolyse des Graisses | |
| <i>Streptomyces sp</i> | | Novozymes | Biodiesel Production | (Mander et al., 2012) |

.8 II. 4 Différents mécanismes de catalyse lipasique

.8.1 II. 4. 1 Réaction d'hydrolyse

La lipase est responsable de la catalyse de l'hydrolyse des lipides, également connue sous le nom de lipolyse. Ce processus implique la séparation des molécules de lipides ou d'esters en acides gras et en molécules de glycérol correspondantes (**Fatima et al., 2021**). L'hydrolyse permet la production d'acides gras qui peuvent ensuite être convertis en alcools gras ou utilisés dans des réactions d'estérification ou de transestérification (**Chandler, 2001**). Les réactions lipasiques sont d'une importance considérable dans la synthèse de nombreux produits commerciaux, notamment dans les industries des huiles naturelles et des graisses. Ces réactions occupent une place centrale dans les processus industriels de transformation des lipides, permettant ainsi la création d'une variété étendue de produits finis (**Jaeger et al., 1999 ; Fatima et al., 2021**).

Au cours de la réaction d'hydrolyse, on pourra distinguer les lipases par leurs régiosélectivité, typo-sélectivité ou encore énantiosélectivité (**Lafaquière, 2010**).

.8.2 II. 4. 2 Réaction de la synthèse

Les lipases, outre leur rôle essentiel dans l'hydrolyse, présentent la capacité de catalyser une diversité de réactions de synthèse dans des conditions thermodynamiques favorables, caractérisées par une faible activité de l'eau. Ces réactions se divisent principalement en deux types : l'estérification et la transestérification (**Gupta et al., 2004**).

➤ Estérification

L'estérification est une réaction de double déplacement entre les alcools et les acides carboxyliques, donnant naissance à des esters et de l'eau (figure 3).

L'estérification catalysée par la lipase gagne de plus en plus d'importance dans la production d'esters organiques, car elle présente l'avantage de ne produire que de l'eau comme sous-produit. Des exemples significatifs incluent l'utilisation de la lipase obtenue à partir de *Candida antarctica* pour catalyser la réaction d'estérification entre les acides lactiques ou carboxyliques et les alcools. De même, les lipases obtenues à partir de *Rhizomucor meihei* et *Candida antarctica* ont été utilisées dans le processus d'estérification de l'acide dihydroxystéarique. De plus, la lipase obtenue à partir de *Staphylococcus aureus*, immobilisée sur des nanoparticules magnétiques, a été utilisée

pour la synthèse d'esters à partir de déchets d'huile de friture (Alloue et al., 2008 ; Sarmah et al., 2018 ; Fatima et al., 2021).

➤ **La transestérification**

Divers produits chimiques d'importance commerciale sont synthétisés par transestérification, impliquant l'alcoololyse, l'acidolyse et l'interesterification, respectivement représentées par les équations de la (figure 3), où le groupe organique d'un ester est remplacé par celui d'un alcool, d'un acide et d'un ester. La transestérification catalysée par une lipase est considérée comme une méthode efficace pour produire des biocarburants à partir d'huiles usagées de l'industrie alimentaire. Ces réactions offrent l'avantage de produire un biodiesel respectueux de l'environnement et économiquement viable, avec une consommation d'énergie réduite et une récupération facile des produits.

La figure qui suit montre les réactions catalysées par les lipases.

(Borrelli et al., 2015).

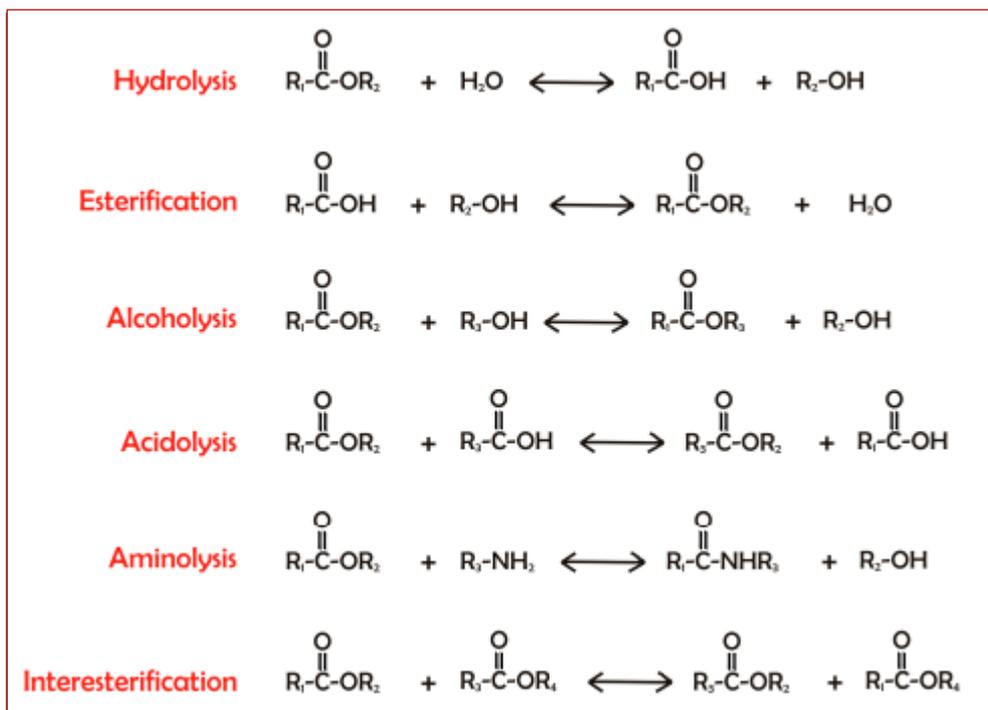


Figure 3 : Réactions catalysées par les lipases(Borrelli et al., 2015).

.9 II. 5 Intérêt industriel des lipases

L'utilisation commerciale de la lipase constitue un marché lucratif qui génère chaque année des milliards de dollars, en raison des nombreux avantages qu'elle offre aux grandes industries. Ces enzymes se distinguent par leur polyvalence exceptionnelle en tant que biocatalyseurs, ce qui les rend indispensables dans divers secteurs tels que l'industrie alimentaire, l'oléochimie, la pharmacie, la chimie fine, la cosmétique, la production de pâte et de papier, l'industrie du cuir, les biosenseurs, ainsi que dans le traitement des eaux usées contenant des huiles et des graisses (**Jaeger et al., 2002 ; Contesini et al., 2020 ; Garcíaoliva et al., 2022**).

Les lipases peuvent être utilisées comme additifs ou comme biocatalyseurs dans la fabrication d'ingrédients alimentaires. En tant qu'additifs, ces enzymes sont utilisées pour modifier les arômes en synthétisant des esters d'acides gras à chaîne courte et des alcools, qui sont des composés aromatiques bien connus. En tant que biocatalyseurs, les lipases jouent un rôle important dans l'industrie des lipides car elles peuvent être exploitées pour la restructuration des huiles végétales et animales (**Ferreira-Dias et al., 2013**).

Le tableau suivant montre quelques exemples qui mettent en évidence certaines des nombreuses applications des lipases dans l'industrie alimentaire :

Tableau 2 : Application des lipases dans l'industrie alimentaire (Aravindan et al., 2007).

| Industrie alimentaire | Action | Produit de l'application |
|----------------------------|---|--|
| Produits laitiers | Hydrolyse des graisses du lait, maturation du fromage, modification des graisses du beurre. | Développement d'agents aromatisants dans le lait, le fromage et le beurre. |
| Produits de boulangerie | Amélioration du goût | Prolongation de la durée de conservation. |
| Boissons | Amélioration de l'arôme | Boissons alcoolisées, par exemple le saké, le vin. |
| Aliments | Amélioration de la qualité | Mayonnaise, sauces et crèmes |
| Aliments santé | Transestérification | Aliments santé. |
| Viande et poisson | Développement des saveurs | Produits à base de viande et de poisson, élimination des graisses. |
| Matières grasses et huiles | Transestérification, hydrolyse | Beurre de cacao, margarine, acides gras, glycérol, mono et diglycérides. |

Les lipases microbiennes sont largement utilisées dans l'industrie des détergents (Sharma et al., 2017). Par exemple, la lipase de *C. antarctica* a été développée sous forme d'enzyme recombinante pour être utilisée dans la formulation de détergents (Joseph et al., 2008). La conversion de l'huile végétale en esters de méthyle ou d'autres alcools à chaîne courte peut être catalysée par une seule réaction de transestérification en utilisant des lipases dans des solvants organiques (Jaeger et al., 2002 ; Grady et al., 2016).

Un exemple concret est la formulation liquide dérivée de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* commercialisée par Novozymes sous le nom commercial Eversa. Cette formulation est spécifiquement conçue pour une production économique et compétitive de biodiesel (Monteiro et al., 2021).

Les profènes (acides 2-arylpropioniques), qui sont un groupe important de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, sont synthétisés par une réaction d'estérification énantiosélective catalysée par les lipases provenant de *C. antarctica* et *C. rugosa*. Ces lipases jouent un rôle clé dans la production de profènes en permettant la formation de la conformation spécifique requise pour leur activité pharmacologique **(Sarmah et al., 2018)**.

La bioremédiation pour l'élimination des déchets est un domaine émergent de la biotechnologie des lipases. Les microorganismes psychrophiles producteurs de lipases sont particulièrement prometteuses pour des applications telles que le traitement des eaux usées, la bioremédiation dans les environnements froids contaminés par les graisses et la synthèse de composés actifs dans des conditions froides **(Joseph et al., 2008)**.

Les lipases sont capables de dégrader efficacement les contaminants et les polluants, certaines espèces de bactéries, comme *Pseudomonas protegens*, ont démontré leur potentiel dans la biodégradation des polyuréthanes **(Chandra et al., 2020)**.

Matériels et méthode

I. Matériels

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) de la faculté des sciences de la vie et de la nature de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia pendant une période de trois mois. Les matériels nécessaires pour mener nos expériences nous ont été mis à disposition. Les isolats d'actinobactéries utilisés dans cette étude ont été fournis par le doctorant BENHOULA Mohammed et ont été isolés à partir de la région de Souk El Ténine et Aokas, wilaya de Bejaia. Par la suite, ils ont été conservés à -80 °C.

.10 I. 1 Matériel analytique

L'appareillage, les réactifs et milieux de culture utilisés dans cette étude sont cités en Annexe 1.

.11 I. 2 Matériel biologique

L'isolat d'actinobactérie utilisé dans notre étude appartient à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université de Bejaia (LMA). La souche appartient au genre *Streptomyces*, nommée *Streptomyces* sp. 22 dz (**Benhoula et al., 2023**)

II. Méthode

.12 II. 1 Revivification de la souche

L'isolat conservé à -80°C a été revivifié sur un milieu préconisé pour les actinobactéries (ISP2).

.13 II. 2 Préparation de la solution sporale

La préparation des suspensions sporales est réalisée en récupérant les spores à partir de cultures d'actinomycètes cultivées sur milieu ISP2 dans des boîtes de Pétri. Ensuite, 10 ml d'eau distillée stérile sont ajoutés dans chaque boîte de Pétri. Les suspensions sporales sont obtenues en grattant délicatement la surface de la gélose à l'aide d'une anse de platine stérile (**Machehalek et al., 2015**).

.14 II. 3 Test d'activité lipasique

Après la culture de l'isolat microbien, 1 ml de bouillon de culture a été centrifugé à 4000 tours par minute pendant 30 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type ROTINA

380 R. Le surnageant a été récupéré dans des tubes à essais propres. Ce surnageant a été utilisé immédiatement comme source de lipase brute pour les essais titrimétriques, qui ont permis de mesurer l'activité des lipases (**Sirisha et al., 2010**).

Pour évaluer l'activité de la lipase, la méthode de titrimétrie a été choisie en utilisant de l'huile d'olive comme substrat, à un pH de 7. L'analyse a été réalisée en suivant la méthode de (**Aly et al., 2012**). Dans des Erlenmeyers, le milieu réactionnel a été préparé en ajoutant 0,5 ml de surnageant à un mélange contenant 5 ml d'huile d'olive émulsionnée dans de la gomme arabique à une concentration de 10% (m/v) (annexe 2), ainsi que 5 ml de tampon phosphate à une concentration de 0,2 M et un pH de 7,2.

En parallèle, un témoin a été préparé en remplaçant le surnageant par 0,5 ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel ainsi que le témoin ont été incubés dans un Shaker à 150 rpm. Après 30 minutes, la réaction a été stoppée et les acides gras libres sont extraits en ajoutant 1 ml d'une solution d'acétone éthanol (v/v) et en agitant vigoureusement le contenu. Ensuite, 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine (utilisé comme indicateur coloré de pH) ont été ajoutées à chaque mélange réactionnel ainsi qu'au témoin. Enfin, une solution de NaOH à une concentration de 0,2 N a été ajoutée goutte à goutte jusqu'à ce que la couleur vire au rose clair à un pH neutre (figure 4).

L'activité lipasique est calculée selon la formule :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol/l. min}) = (V_R - V_B) \cdot N \cdot 1000 / V_E \cdot t$$

V_R : volume de NaOH consommé pour le titrage de volume réactionnel.

V_B : volume de NaOH consommé pour le titrage de témoin (blanc).

N : normalité de NaOH.

1000 : facteur de conversion de mmol au μmol .

V_E : volume réactionnel (0,5 ml).

T : temps de la réaction (30 min).

Une unité (U) de lipase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmol d'acides gras par minute dans les conditions de réaction spécifiées (**Pinsirodom et al., 2001**).

.15 II. 4 Cinétique de croissance et de production de la lipase

La cinétique de la biomasse et la production de lipases sont suivies en mesurant l'activité lipasique toutes les 24 heures pendant une période de 10 jours. L'incubation est réalisée à une température de 37°C avec une agitation à 150 rpm. Parallèlement, un comptage des spores est effectué en utilisant une cellule de Malassez.

➤ **Dénombrement des spores**

Le comptage des spores a été effectué en réalisant une dilution de 1/5 de la solution mère. La méthode de comptage utilisée est basée sur l'utilisation d'une cellule de Malassez (**Hamrouni, 2019**). Cette cellule est composée de carrés subdivisés sur la surface d'une lame. Une goutte de suspension a été déposée sur la surface de la cellule de Malassez, puis recouverte d'une lamelle. Le dénombrement des spores a été réalisé au microscope optique avec un grossissement de 400, avec la formule de comptage sur la cellule de Malassez

$$N (S/ml) = \frac{\sum n}{a.v} \times Fd$$

- **N** : nombre de spores /ml de la suspension initiale.
- **S** : spores
- **n** : nombre moyen des spores dans 1 cellule de Malassez.
- **v** : Volume d'une unité de comptage.
- **a** : Nombre d'unités de comptage dénombrées.
- **Fd** : facteur de la dilution.

.16 II. 5 Semi-purification des lipases

.16.1 II. 5. 1 Préparation de l'extrait lipasique

Dans le but de produire une quantité maximale de lipase, des cultures ont été lancées en prenant en compte les conditions standards de production des lipases. Les cellules

bactériennes issues des cultures de la souche *Streptomyces* sp. 22 dz sont éliminées par centrifugation à 9000 rpm pendant 30 min et à 4 °C. Le surnageant récupéré, contenant l'activité lipasique, est gardé en vue de la semi-purification.

Ce surnageant présente une activité lipasique de 3,7 U/ml. Le protocole expérimental de semi-purification de lipase comporte deux étapes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40-70%) suivie d'une dialyse.

.16.2 II. 5. 2 Précipitation fractionné au sulfate d'ammunium (40-70 %)

La précipitation de la lipase et d'autres protéines par le sulfate d'ammonium est une technique couramment utilisée en raison de son faible coût, de sa grande solubilité et de son effet protecteur sur les enzymes (**Kanwar et al., 2002**).

100 ml du surnageant récupéré, contenant l'activité lipasique est mélangé délicatement avec des petites quantités de sulfate d'ammonium solide jusqu'à atteindre une saturation de 40% (en utilisant une quantité de sulfate d'ammonium de 29 g, basée sur la table de références adaptée de (Dawson et al., 1986). Ce mélange est agité doucement et maintenu à 4°C pendant 1h30 à 2 heures. Ensuite, le mélange est centrifugé à une vitesse de 9000 tours par minute pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu est mélangé avec du sulfate d'ammonium solide jusqu'à ce que la saturation atteigne successivement 50%, 60% puis 70%, en utilisant une quantité d'environ 32 g de sulfate d'ammonium. Après 2 heures d'agitation à chaque niveau de saturation jusqu'à atteindre une saturation de 70%, la solution est soumise à une centrifugation à une vitesse de 6000 tours par minute pendant 25 minutes à une température de 4°C. Le précipité obtenu est immédiatement récupéré dans un minimum de tampon phosphate afin de procéder à la dialyse.

.16.3 II. 5. 3 Dialyse

Afin de se débarrasser du sulfate d'ammonium lié aux protéines présentes dans le culot récupéré, une dialyse a été réalisée. La fraction contenant le sulfate d'ammonium a été placée dans un boudin de dialyse avec un seuil de coupure de 16 kDa et dialysée contre un tampon phosphate de 0,2 M, à un pH de 7, pendant une durée de 2 à 4 heures, en utilisant un agitateur magnétique à une température de 4°C sous faible agitation. Après 4 heures, le tampon a été remplacé par un tampon frais pour que la concentration en sels à l'intérieur du boudin atteigne le niveau minimum et la dialyse a été poursuivie pendant la nuit (15 heures) à une température de 4 °C. Une fois la dialyse terminée, l'échantillon

récupéré a été ensuite soumis à un dosage de l'activité lipasique et la teneur en protéines a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm (Bradford, 1976).

.16.4 II. 5 .4 Méthode analytique

La méthode de Bradford (1976) est une méthode colorimétrique utilisée pour estimer la quantité de protéines présente dans un extrait en utilisant comme réactif le bleu de coomassie. 800 µl de la solution protéique des 3 échantillons sont mélangés avec 200 µl de réactif de Bradford. Le mélange est agité et incubé pendant 15 minutes à l'obscurité. Ensuite, l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible. La quantité de protéines est évaluée en se référant à une courbe de référence établie à partir de l'albumine du sérum bovin (ASB) (courbe réalisée par le doctorant).

.17 II.6 Caractérisation biochimique de la lipase semi-purifiées

Afin de caractériser biochimiquement les ou la lipase, nous avons étudié l'influence de certains paramètres, à savoir l'étude de l'effet de la température, du pH, des inhibiteurs et des détergents, des ions métalliques et des solvants organiques, sur l'activité lipasique.

.17.1 II. 6. 1 Effet de la température sur l'activité de la lipase et mesure de thermostabilité

Pour déterminer la température optimale de la réaction enzymatique, la préparation semi-purifiée a été incubée dans le tampon A (tampon phosphate 0,2 M à pH 7) à des températures allant de (20 à 70) °C, avec une valeur de pH constante à 7,0. L'activité enzymatique a été déterminée dans des conditions d'essai standard.

L'activité lipasique la plus élevée a été considérée comme étant de 100 %, Pour la détermination de la thermostabilité de la préparation enzymatique, nous l'avons pré-incubée dans le tampon A à la même plage de température pendant 6 heures. Des prélèvements sont faits chaque 20 min afin de déterminer l'activité lipasique résiduelle selon les conditions du protocole précédemment décrit. L'activité lipasique initiale a été considérée de 100 %.

La thermostabilité en présence du substrat a été estimée par l'incubation des mélanges réactionnels à différentes températures (40, 50, et 60°C) pendant 6 heures. Des prélèvements ont été faits chaque heure afin d'estimer l'activité résiduelle.

.17.2 II. 6. 2 Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la lipase

La valeur optimale du pH pour l'activité lipasique a également été étudiée en testant l'activité dans divers tampons à différents pH (3,0-9,0) pendant 30 minutes à 37° C, l'acétate de sodium (50 mM, pH 3,0-5,0), phosphate de sodium monobasique (50 mM, pH 6,0-7,0) et Tris-HCl (50 mM, 8,0-9,0) ont été utilisés comme tampons, pour le test de stabilité du pH, la préparation enzymatique a été pré-incubée dans différents tampons de pH 3,0 à 9,0 pendant 6,0 heures. Ensuite, l'activité résiduelle a été déterminée toutes les heures, comme décrit précédemment.

.17.3 II. 6. 3 Effets des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de la lipase

L'effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité des lipases a été étudié en mélangeant différents solvants organiques avec l'enzyme dans le tampon A à 50 % (v/v) pendant 1 et 3 jours. Le mélange a été incubé à 37 °C sous agitation 150 rpm, et le groupe témoin (sans solvants organiques) a également été préparé dans le tampon A. L'activité lipasique a été mesurée dans des conditions standard.

.17.4 II. 6. 4 Effets des ions métalliques sur la stabilité et l'activité lipasique

L'effet des ions métalliques sur la stabilité et l'activité de la préparation enzymatique a été étudié. L'activité lipasique a été mesurée en pré-incubant la préparation enzymatique avec chaque additif.

Les réactifs ont été préparés dans le tampon A, avec chaque ion métallique à une concentration finale de 10 et 20 mM, les mélanges réactionnels ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes. L'activité lipasique sans ajout d'ions métalliques a été définie comme étant de 100 %, et l'activité résiduelle a été déterminée par rapport à celle de l'échantillon de référence.

.17.5 II. 6. 5 Effet des inhibiteurs et des détergents sur la stabilité et l'activité de la lipase

L'effet des inhibiteurs et des détergents sur la stabilité de l'activité de l'extrait brut a été étudié.

L'activité lipasique a été mesurée en pré-incubant l'extrait enzymatique avec chaque additif.

Matériels et méthodes

Les réactifs ont été préparés dans 5ml de Tampon A, avec chaque détergent et inhibiteur a une concentration finale de 10%, les mélanges réactionnels ont été incubés 1 heure à température ambiante. L'activité lipasique sans ajout d'additifs a été définie comme étant de 100 % et l'activité lipasique a été déterminée par rapport au témoin.

*Résultats et
Discussions*

I. Résultats et Discussions

.18 I. 1 Repiquage de la souche

Le résultat de revivification de la souche *Streptomyces* sp. 22 dz sur milieu ISP2 a montré que la souche est pure (figure 5), les colonies sont grosses et incrustées dans la gélose, elles sont poudreuses grises à contour régulier, avec formation du mycélium et des spores.



Figure 4 : Aspect de l'isolat de la souche *Streptomyces* sp. 22 dz après revivification sur milieu ISP2.

.19 I. 2 Test d'activité lipasique

Résultats de test d'activité après l'ajout de soude



Figure 5: Virage de couleur vers le rose après l'ajout de soude.

.20 I. 3 Suivi de la croissance et de la production d'enzyme

L'objectif de cette étude est de repérer le jour optimal de la production des lipases par la souche *Streptomyces* sp. 22 dz d'un côté, et de mettre en évidence la corrélation éventuelle avec la biomasse produite dans le milieu de culture liquide d'un autre côté.

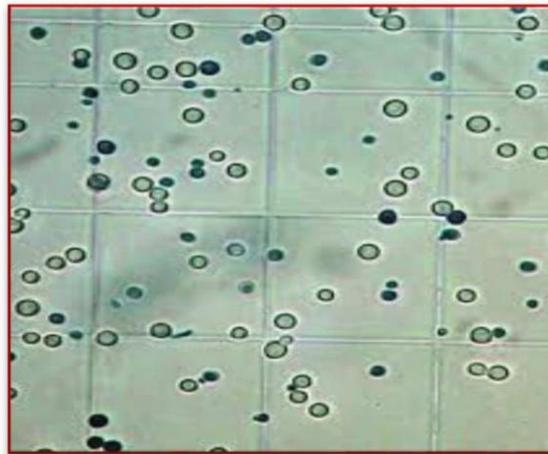


Figure 6 : l'observation des spores à l'aide d'un microscope optique avec grossissement x40.

La cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche de *Streptomyces* sp. 22 dz est illustré dans la figure 7

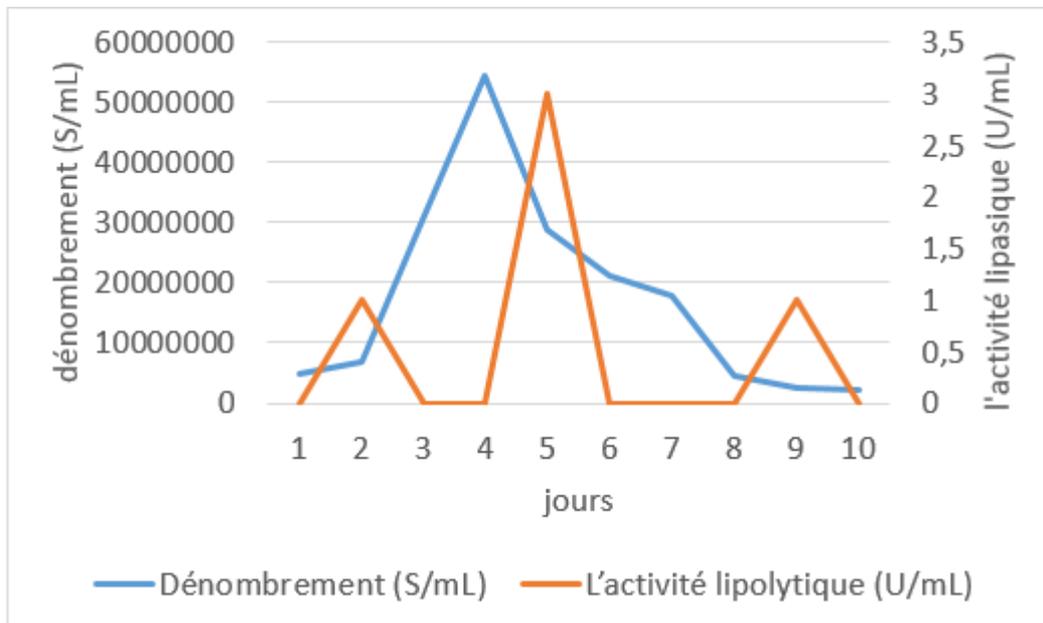


Figure 7 : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche *Streptomyces* sp. 22dz.

La production des lipases par la souche sélectionnée était partiellement liée à sa croissance. En effectuant un suivi chronologique de la sécrétion de lipases et de la croissance bactérienne, nous avons observé que la lipase était sécrétée dès le début de la phase de latence, suivie immédiatement par une phase de croissance au cours de laquelle la souche atteignait son niveau maximal d'activité (3 U/ml) après 5 jour d'incubation. Pendant ce temps, la croissance cellulaire atteint son maximum au quatrième jour d'incubation à 37°C.

Nous avons également observé que la production de lipase augmentait avec l'augmentation de la durée d'incubation. Cependant, à un certain stade, la production de lipase a commencé à diminuer avec une période d'incubation plus longue. Cette diminution de la production de lipase peut être attribuée à la dégradation protéolytique du système enzymatique (**Ire et al., 2014**).

D'après les résultats obtenus ont montré que l'activité optimale de la lipase était atteinte après une période d'incubation de 5 jours, et avec une taille d'inoculum de $5,44 \times 10^7$ (spores/mL).

Des niveaux de production comparables ont été obtenus par **Rajanikanth et collaborateur (2016)** dont la croissance de la biomasse a été constatée comme étant progressive jusqu'au sixième jour d'incubation, mais par la suite, la croissance a drastiquement diminué.

Il est supposé que cette variation est due à l'utilisation de souches différentes. De plus, il peut être noté que cette variation est directement liée à la durée d'incubation et au volume d'inoculum (**Korayem et al., 2015 ; Rajanikanth et al., 2016**).

.21 I. 4 Purification partielle de la lipase

.21.1 I. 4. 1 Précipitation au sulfate d'ammonium (40 -70 %)

Beaucoup de sels sont utilisés pour effectuer la précipitation des protéines telles que les enzymes, par le phénomène de relargage (Salting out). Cependant, le sulfate d'ammonium est le produit le plus utilisé pour sa forte solubilité, son faible coût et son pouvoir non dénaturant (**Laiche, 2019**), les lipases précipitent à 40%.

.21.2 I. 4. 2 Paramètres de purification

- **La concentration des protéines** : les protéines sont estimées par la méthode de Bradford (U/mL).
- **L'activité spécifique (AS)** : $AS (U/mg) = \text{Activité totale (U)} / \text{Protéines totales (mg)}$
- **Le rendement en activité (R)** : $R (\%) = (\text{Activité totale de l'étape de purification} / \text{Activité totale de l'étape initiale}) \times 100$.
- **Le taux de purification (TP)** : $TP = \text{Activité spécifique de l'étape de purification} / \text{Activité spécifique de l'étape initiale}$.

Tableau 3 : Résultat de la semi purification de la souche Streptomyces sp. 22 dz.

| Les fractions | Concentration des protéines (En U/mg) | L'activité Lipasique total (mg) | L'activité spécifique de la lipase (mg) | Rendement (%) | Facteur de purification |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--|---------------|-------------------------|
| L'extrait enzymatique brut | 3,4 | 4,5 | 1,3 | 100 | 1 |
| La fraction précipitée à 40% | 2,6 | 7,7 | 2,9 | 11,17 | 2,23 |
| La fraction dialysée | 2,5 | 4,7 | 1,9 | 10,44 | 1,46 |

L'extrait brut présente une activité lipasique de 4,5 U/ml et une activité spécifique de 1,3 U/mg. Après la précipitation de l'extrait brut avec du sulfate d'ammonium à 40 % de saturation, un facteur de purification de 2,23 est obtenu, avec un rendement de 11,71 %.

La dialyse ultérieure a conduit à un facteur de purification de 1,46 et un rendement de 10,44 %, cette technique permet d'améliorer la séparation de la substance d'intérêt en éliminant les sels de sulfate d'ammonium du milieu et les petites molécules comme le glucose (**Ugur et al., 2014 ; Ayaz et al., 2015**).

Après avoir effectué la précipitation et la dialyse, nous avons procédé à l'élimination des débris, tels que les protéines, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de lipase dans notre solution. En conséquence, le rendement de l'extrait purifié est supérieur à celui de l'extrait brut initial. Au cours de la précipitation, nous avons observé une augmentation du rendement brut, due à l'ajout de sulfate d'ammonium. Par la suite, la solution précipitée a été soumise à une dialyse afin de se débarrasser des sels de sulfate d'ammonium et d'autres débris, ce qui explique la diminution du rendement de l'extrait dialysé par rapport à la solution précipitée.

Selon l'étude menée par (**Ugur et al., 2014**), la précipitation des lipases de *Streptomyces* avec du sulfate d'ammonium à 90 % a conduit à une quantité totale de protéines de 1,80 mg, une activité spécifique de 83,21 U/mg et un facteur de purification de 2,47 fois. De manière similaire, (**Ayaz et al., 2015**) ont réalisé une étude sur une souche de *Streptomyces* sp. 22 dz et ont également réalisé une purification de la lipase par sulfate d'ammonium à 80 %, avec un facteur de purification de 4,70 fois et une activité spécifique de 57,97 U/mg.

(**Mhetras et al., 2009**) ont examiné la lipase d'*Aspergillus* sp, ils ont réalisé une précipitation de la lipase brute en utilisant du sulfate d'ammonium à une saturation de 90 %. Avant la précipitation, la lipase brute présentait une activité totale de 1700 U/ml et une activité spécifique de 39,47 U/mg. Après la précipitation, la lipase a été purifiée 4,29 fois, atteignant une activité spécifique de 220,0 UI/mg, avec un rendement de 99,05 %.

Nos résultats sont similaires à l'étude menée par (**Ugur et al., 2014 ; Ayaz et al., 2015**), qui ont également travaillé avec le genre *Streptomyces*. Ces études ont abouti à des conclusions similaires aux nôtres, par conséquent, nos résultats sont cohérents avec la littérature existante et confirment la fiabilité de notre approche de purification.

.22 I. 5 Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

Les données présentées dans la figure 8 montrent de manière évidente que la souche a atteint sa production maximale de lipase à une température d'incubation de 40°C après 180

minutes. Des températures inférieures à 40°C ont été associées à une légère diminution de la production enzymatique, par conséquent on note une diminution à des températures élevées.

L'optimisation de la température est essentielle pour favoriser la sécrétion des enzymes lors des fermentations en bioréacteur agité, car une concentration plus élevée de biomasse de lipase a été constatée à une température de 37 °C (Bharathi et al., 2019). Des études ont démontré qu'une légère augmentation de la température jusqu'à 38 °C stimule la production de lipases. En revanche, une température plus basse entraîne une diminution de la production de lipase, tandis qu'une température plus élevée a également un impact sur la fonction des enzymes (De Souza et al., 2019).

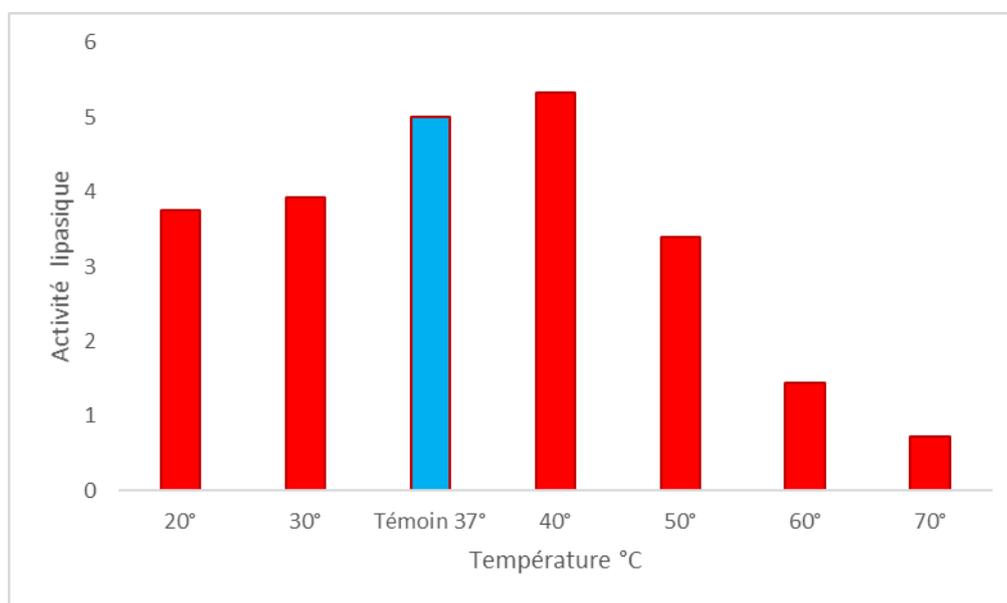


Figure 8 : Effet de la température sur l'enzyme.

.23 I. 6 Mesure de la thermostabilité

Les résultats mentionnés sur la (Figure 9) montrent que l'enzyme a gardé la moitié de son activité pendant 40 premières minutes à 40° et 50°C et une activité moyenne à 60°C, on observe également que l'activité diminue fortement au bout de la 1ère heure et durant les 5 heures suivantes, l'activité ne cesse de diminuer petit à petit, (Akmoussi, 2020) a ajouté 2 mM de CaCL₂ et ses résultats ont démontré que l'enzyme a gardé son activité à 50% après 9 heures d'incubation à 60°, alors qu'en absence de CaCL₂ son enzyme a gardé 50% de son activité que 7h après l'incubation, il a été observé que le CaCL₂ améliore de temps de demi-vie et la thermostabilité de l'enzyme.

La température peut avoir un impact négatif en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire, ce qui à son tour peut influencer la sécrétion des enzymes

extracellulaires (Veerapagu et al., 2013). Les activités biochimiques de divers microorganismes sont considérablement influencées par la température d'incubation (Moreira et al., 2002).

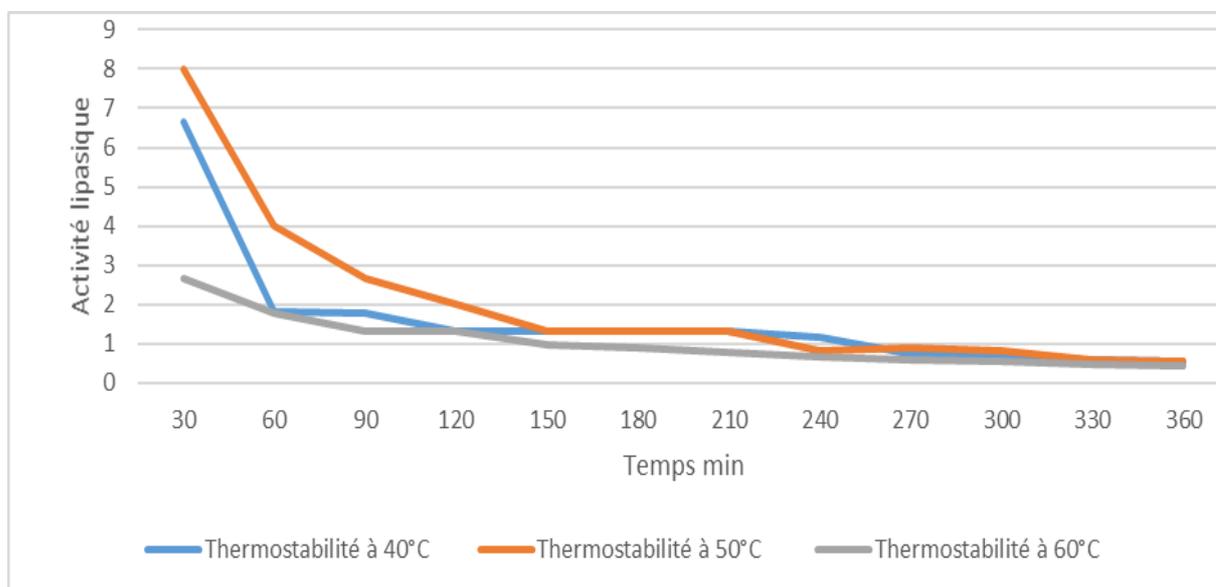


Figure 9 : étude de la thermo stabilité de l'enzyme.

.24 I. 7 Effet du pH sur la stabilité de la lipase

Pour le test de stabilité du pH, la préparation enzymatique a été pré-incubée dans différents tampons de pH allant de 3,0 à 9,0 pendant 6,0 heures. Ensuite, l'activité restante a été déterminée toutes les heures, comme décrit précédemment. Les activités lipasiques ont été déterminées et les résultats obtenus sont montrés sur la (figure 10).

On note que la lipase semble être instable à pH 3 et 4 avec une activité moyenne allant de 3 à 5, et est pratiquement stable à des pH allant de 5 à 7 avec une très faible activité. La lipase atteint son activité maximale à des pH alcalins de 8 et 9, on déduit alors que la lipase d'actinobactérie est hautement active et stable dans une gamme de PH (8 à 9) après 6h d'incubation. L'activité de l'enzyme et la structure de la protéine sont impactées par les changements de pH, tandis que la stabilité de la lipase à différents pH dépend principalement de la stabilité de sa structure secondaire. (Dueramae et al.,2017).

En général, les lipases bactériennes ont un pH alcalin ou neutre. Des chercheurs ont prouvé une augmentation de la production de lipase par les cellules bactériennes et de levure dans des conditions de pH alcalin et neutre (Bharathi et al., 2019). En revanche, la production de lipase fongique était plus élevée à un pH acide. Des chercheurs ont constaté

une augmentation de la production ainsi que de l'activité de la lipase à un pH de 4 dans le milieu réactionnel (De Souza et al., 2019).

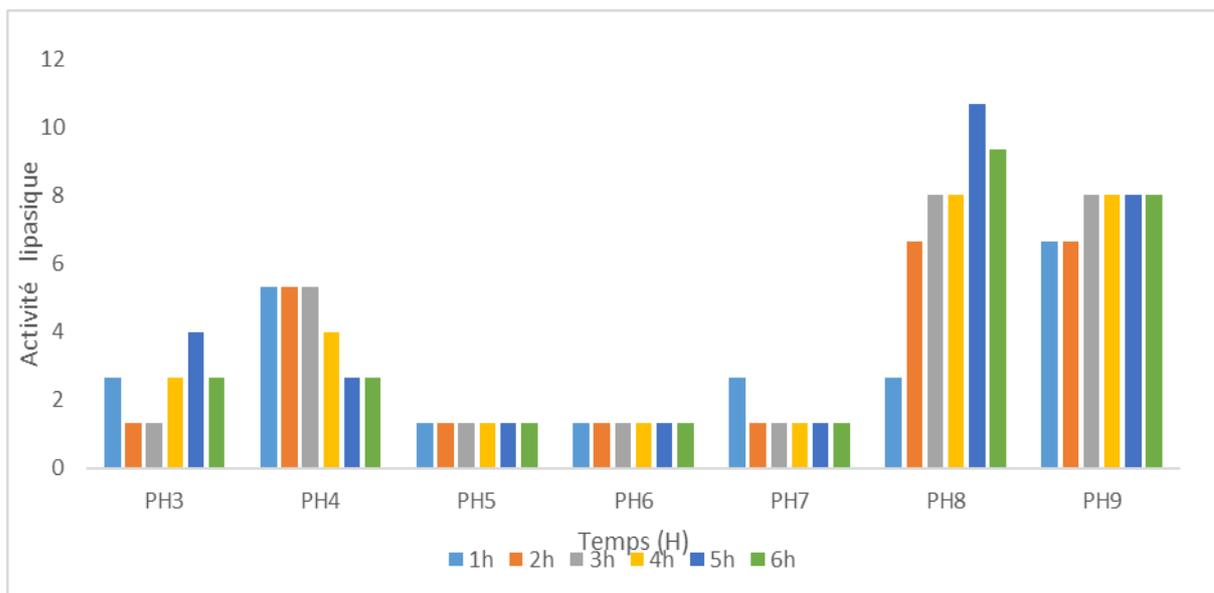


Figure 10 : effet du pH sur la stabilité de l'enzyme.

.25 I. 7 Effet des solvants organique sur la lipase

Les résultats d'effet des solvants organiques sur l'activité sont rapportés sur (la figure 11). L'activité est stimulée dans certains solvants organiques hydrophiles, tels que le méthanol et le Petroleum. Après une période d'incubation de 72 heures, l'activité de l'enzyme continue d'augmenter par rapport à l'état initial. Cependant, les résultats de cette étude montrent aussi que la présence de certains solvants organiques tel que l'Acétonitrile, le Glycérol, le Formaldéhyde ont un impact négatif sur l'activité.

Une dénaturation et une inactivation facile de nombreux enzymes peuvent être entraînées par la présence de solvants organiques. Ainsi, des stratégies telles que l'ingénierie des protéines, l'immobilisation, la modification et l'emprisonnement ont été développées pour stabiliser les enzymes dans des environnements contenant des solvants organiques (Adlercreutz, 2013 ; Badillo et al., 2015).

Une enquête bibliographique a révélé que les enzymes extracellulaires sécrétées par des microorganismes tolérants aux solvants organiques pour leur croissance sont stables en présence de solvants organiques (Rahman et al., 2005).

Résultats et Discussions

Dans le but d'évaluer l'impact des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de la lipase semi-purifiée, une étude a été entreprise. Cette étude consistait à mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme après une incubation de 72 heures à 37 °C dans des solvants organiques à une concentration de 50% (v/v).

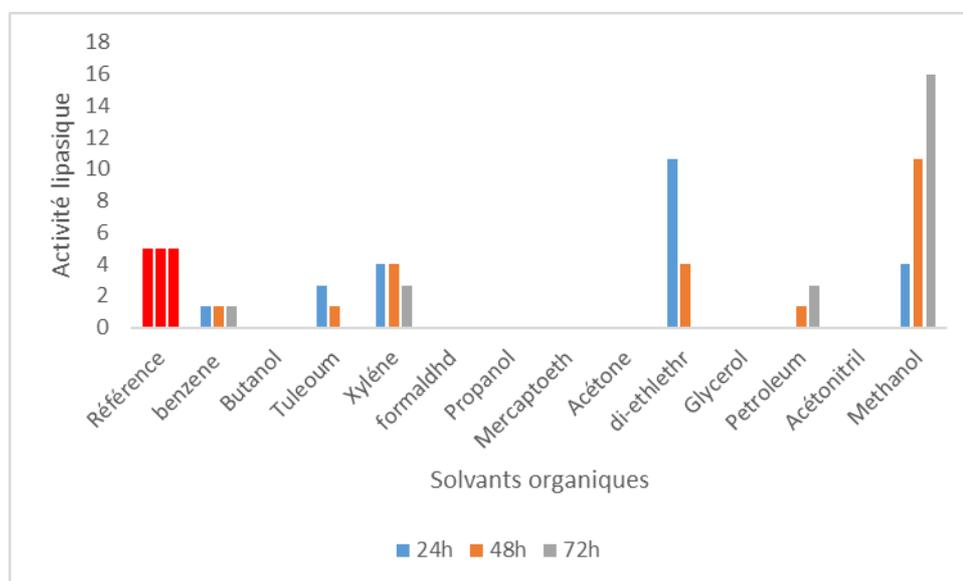


Figure 11 : Effet des solvants organique sur l'activité lipasique.

.26 I. 8 Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

Ces résultats indiquent que l'enzyme a besoin de potassium, zinc à une concentration de 10mM, et du plomb à une concentration de 20mM pour une activité optimale, ces résultats indiquent également que cette enzyme a besoin des ions de fer, du calcium et du magnésium à des concentrations de 10 mM pour une activité moyenne. De nombreuses lipases ont montré des activités accrues en présence de Calcium et du Magnésium (Li et al., 2014). Le Cobalt, le Manganèse et l'Azote entravant la stabilité de la lipase et on constate que l'activité est modérément inhibée.

Ces résultats indiquent que l'enzyme a besoin de potassium, zinc à une concentration de 10mM, et du plomb à une concentration de 20mM pour une stabilité d'activité optimale, ces résultats indiquent également que cette enzyme a besoin d'ions de fer, du calcium et du magnésium à des concentrations de 10 mM pour une activité moyenne (figure 12).

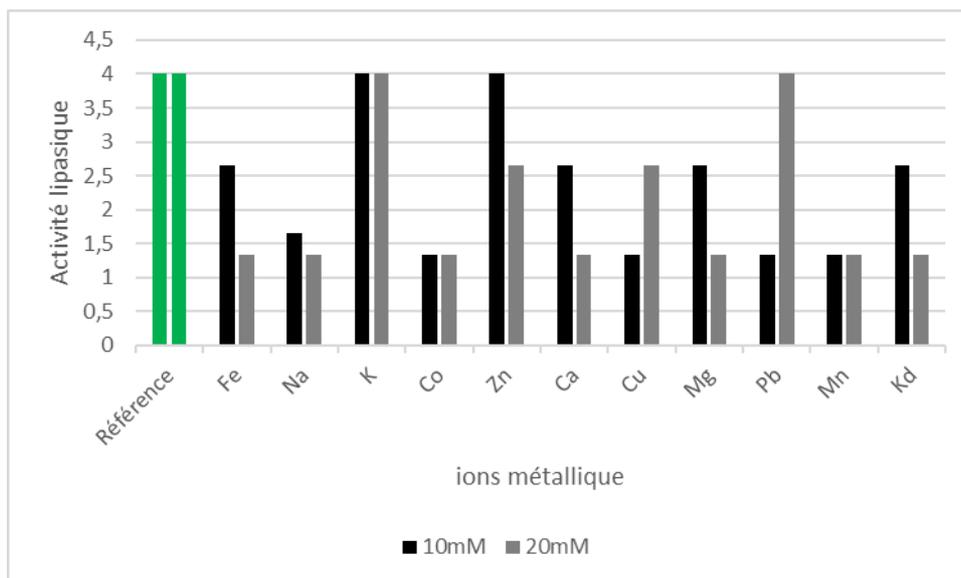


Figure 12 : Effet des ions métalliques sur l'activité lipasique.

De nombreuses lipases ont montrés des activités accrues en présence de Calcium et du Magnésium (**Li et al., 2014**). Le Cobalt, le Manganèse et l'Azote entravent la stabilité de la lipase et on constate que l'activité est modérément inhibée.

Les ions métalliques ont tendance à former des complexes avec les acides gras ionisés, ce qui entraîne des changements de solubilité et de comportement à l'interface. La libération des acides gras dans le milieu joue un rôle crucial dans la vitesse de réaction et peut être influencée par la présence d'ions métalliques. Toutefois, les effets spécifiques des ions métalliques dépendent de la lipase en question. Il est plus facile d'étudier directement les effets des ions métalliques sur l'activité enzymatique en utilisant des lipases bactériennes que la lipase pancréatique, qui nécessite la présence d'une protéine cofacteur (**Hasan et al., 2009**).

.27 I. 9 Effet des détergents et des inhibiteurs sur l'activité lipasique

Les lipases peuvent être catégorisées en fonction de leur sensibilité à différents inhibiteurs. Les effets inhibiteurs associés à divers composés testés sont répertoriés dans la Figure 13.

L'activité lipasique est modérément inhibée par l'EDTA (qui agit comme un agent inhibiteur dans cette expérience) et l'H₂O₂, (qui est un agent oxydant inhibiteur), cela a provoqué une diminution de l'activité lipasique. On observe qu'en présence de Tween 80

Résultats et Discussions

l'activité est moyennement élevée. La lipase est parfaitement résistante en présence de SDS et du TritonX100.

Les détergents ont un fort impact sur la physico-chimie des interfaces lipides-eau soit en diminuant la tension interfaciale et en favorisant la dispersion du substrat sous forme d'émulsions huile-dans-eau, soit en formant des micelles mixtes (Delorme et al., 2011). C'est le cas du SDS et du TritonX100 qui intensifient l'activité enzymatique (Pocalyko et al., 1998 ; Li et al., Li et al., 2005).

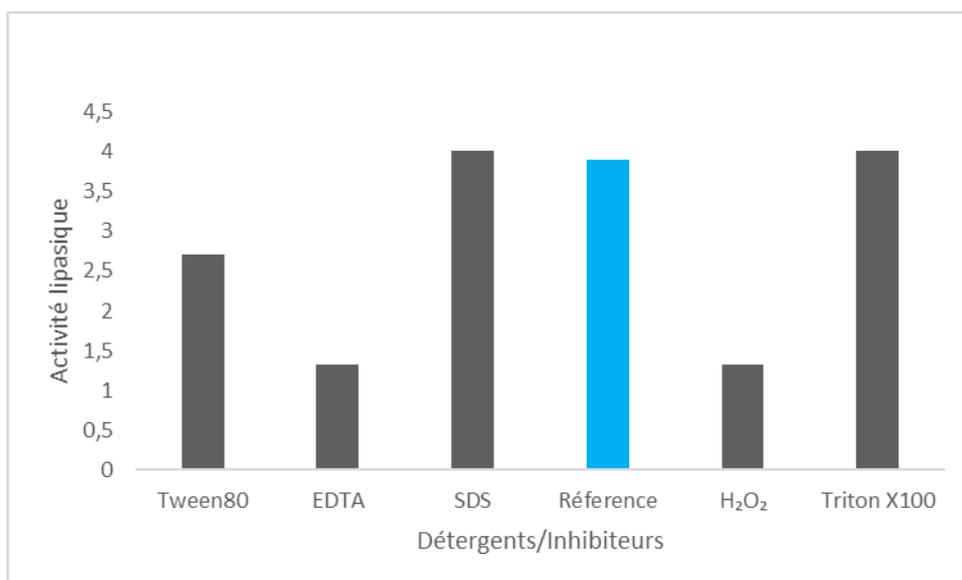


Figure 13 : Effet des inhibiteurs sur l'activité lipasique.

Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

Notre étude est réalisée dans le but de faire une semi purification ainsi qu'une caractérisation de lipases d'actinobactérie, la comparaison de nos résultats avec les données de littérature scientifique a révélé que la souche a atteint sa production maximale de lipase après 180 minutes d'incubation à une température de 40°C. Durant les 40 premières minutes à 40°C et 50°C, elle a conservé la moitié de son activité, tandis qu'elle a présenté une activité moyenne à 60°C. Au fil de la première heure, l'activité a continué de diminuer tout au long des 5 heures. Les résultats de la semi-purification de la lipase ont également mis en évidence que l'extrait brut initial présentait une activité lipasique de 4,5 U/ml et une activité spécifique de 1,3 U/mg. Suite à la précipitation avec du sulfate d'ammonium à une saturation de 40%, un facteur de purification de 2,23 a été obtenu avec un rendement de 11,71%. Par la suite, une dialyse a été réalisée, conduisant à un facteur de purification de 1,46 et un rendement de 10,44%. Cette méthode de purification permet d'améliorer la séparation en éliminant les sels de sulfate d'ammonium présents dans le milieu. Il est important de noter que la précipitation effectuée à une saturation de 70% a permis de précipiter des protéines qui ne produisent pas de lipase, c'est pourquoi cette fraction n'a pas été utilisée lors de la dialyse.

La précipitation et la dialyse permettent d'éliminer les débris, notamment les protéines, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de lipase dans la solution purifiée. Par conséquent, le rendement de l'extrait purifié est supérieur à celui de l'extrait brut initial.

L'ajout de sulfate d'ammonium pendant la précipitation contribue à augmenter le rendement brut. Ensuite, la solution précipitée est soumise à une dialyse afin d'éliminer les sels de sulfate d'ammonium et autres débris, ce qui explique la diminution du rendement de l'extrait dialysé par rapport à la solution précipitée.

Les lipases ont démontré une stabilité et une activité optimale dans une plage de pH alcalin allant de 8 à 9, sur une durée de 6 heures. Elle a également conservé une activité moyenne à des pH acides de 3 et 4. Cependant, elle s'est révélée instable avec une activité très faible dans des pH compris entre 5 et 7.

Par contre, certains ions métalliques, comme le cobalt, a stimulé son activité, tandis que d'autres, comme le fer, l'ont inhibée.

En ce qui concerne les surfactants, certains ont stimulé l'activité de notre enzyme, notamment le SDS, tandis que d'autres, comme l'EDTA, l'ont inhibée.

Conclusion et prescriptive

L'incubation de notre enzyme pendant 72 heures dans différents solvants organiques a montré un effet stimulant dans certains solvants hydrophiles, tels que le méthanol. Cependant, la présence de certains solvants organiques a eu un impact négatif sur l'activité de notre enzyme, l'inhibant complètement.

En prescriptives, il serait intéressant d'approfondir l'étude par :

- Une purification en utilisant des méthodes chromatographiques couplées à un système de séparation en phases aqueuses, ce procédé est compatible avec d'éventuelle applications industrielles.
- Réaliser une caractérisation complète en déterminant le point isoélectrique, la masse moléculaire, le zymogramme, les paramètres cinétiques ainsi que la séquence N terminal.
- Pour une meilleure activité, il est recommandé de travailler dans des conditions spécifiques de facteurs physico chimiques suivants : une plage de température comprise entre 37 et 40°C, à des ph alcalins.
- Pour une amélioration de la production enzymatique il est conseillé de réaliser des plans statistiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). **Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review.**,52, Braz J Microb,1257-1269.
- Adlercreutz P. **Immobilisation and application of lipases in organic media.** ChemSoc Rev. 2013;42(15):6406–36.
- Adlercreutz P. **Immobilisation and application of lipases in organic media.** Chem Soc Rev. 2013;42(15):6406–36.
- Agobo, K. U., Arazu, V. A., Uzo, K., & Igwe, C. N. (2017). **Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review.** Ferment Technol, 6(144), 2.
- Agobo, K. U., Arazu, V. A., Uzo, K., & Igwe, C. N. (2017). **Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review.** Ferment Technol, 6(144), 2.
- Agobo, K. U., Arazu, V. A., Uzo, K., & Igwe, C. N. (2017). **Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review.** Ferment Technol, 6(144), 2.
- Akmoussi-Toumi, S. (2020). *Isolement et caractérisation de microorganismes halophiles à partir d'écosystèmes aquatiques salins et recherche de lipase d'intérêt environnemental et industriel* (Doctoral dissertation, Université M'hamad Bougara: Faculté des Sciences).
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023). **The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review.** *Microorganism*, 11(2), 510.
- Alloue, W.A.M., M. Aguedo, J. Destin, H. Ghalfi, C. Blecker, J.P. Wathelet and P. Thonart, 2008. **Les lipases immobilisées et leur application.** Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12: 57-68.

Références bibliographiques

- Alloue, W.A.M., M. Aguedo, J. Destin, H. Ghalfi, C. Blecker, J.P. Wathelet and P. Thonart, 2008. **Les lipases immobilisées et leur application.** Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12: 57-68.
- Aly M.M., Tork S., Al-Garni S.M. & Nawar L. (2012). **Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil.** Afr J Microb Res, 6, 1125-37.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). **An introduction to actinobacteria. In Actinobacteria-basics and biotechnological applications.** IntechOpen.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., & Viruthagiri, T. (2007). **Lipase applications in food industry.** Indian J Bio-Technol
- Azandegbe, A. (2010). **Etude de la structure des communautés bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans deux sites ostréicoles** (Doctoral dissertation, Université Européenne de Bretagne).
- Badillo-Zeferino GL, Ruiz II L, Oliart-Ros RM, Sanchez-Otero MG. **Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase.** Biotechnol Appl Biochem. 2015. doi:10.1002/bab.1444.
- Badillo-Zeferino GL, Ruiz II L, Oliart-Ros RM, Sanchez-Otero MG. **Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase.** Biotechnol Appl Biochem. 2015. doi:10.1002/bab.1444.
- Barka, EA, Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., van Wezel, GP (2015). **Taxonomie, physiologie et produits naturels des actinobactéries.** Rev Microb Biomol, 80(1), 1-43.
- Benhoula, M., Azzouz, Z., Bettache, A., Le Roes-Hill, M., Djoudi, W., Maibeche, R., ... & Boucherba, N. (2023). **Olive mill wastewater biodegradation for bacterial**

Références bibliographiques

- lipase production using a response surface methodology.** *Biomass Convers Biorefin*, 1-14.5-614.
- Benouague ni S. (2015). **Recherche de nouvelles souches d'actinomycètes productrices demolécules antifongiques (cas des eaux du lac Mellah d'El Kala).** Thèse De Doctorat enmicrobiologie. Université Badji Mokhtar-Annaba.
 - Bérdy, J. (2012). **Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading.** *J Antibiot*, 65(8), 385-395.
 - Bharathi, D., Rajalakshmi, G., and Komathi, S. (2019) *J. King Saud Univ. Sci.*31, 898–901.
 - Borrelli, G. M., &Trono, D. (2015). **Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications.***Intern J Mol Sci*, 16(9), 20774-20840.
 - Borrelli, G. M., &Trono, D. (2015). **Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications.***Int J Mol Sci*, 16(9), 20774-20840.
 - Boudjellal-bencheikh F. (2012) **Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophilesd'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par Actinoalloteichussp. AH97.** Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Ecole nationale supérieure agronomiques El-harrach, Alger. P:26.
 - Cambon, E., Rodriguez, J. A., Pina, M., Arondel, V., Carrière, F., Turon, F., ... & Villeneuve, P. (2008). **Characterization of typo-, regio-, and stereo-selectivities of babaco latex lipase in aqueous and organic media.** *Biotechnol Lett*, 30, 769-774.
 - 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.***J MolCatal B: Enzym.* 14:111-123.

Références bibliographiques

- Castillo, E., Casas-Godoy, L., & Sandoval, G. (2016). **Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity.** *Biocatalysis*, 1(1), 178-188
- Chandler, I. C. (2001). **Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions.** *J Am Oil ChemSoc*, 78(7), 737-742
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). **Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review.** *Microbial cell factories*, 19, 1-42.
- Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). **Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review.** *Microb Cell Fact*, 19(1), 169.
- Charbonneau, D. (2014). *Éléments structuraux essentiels à la thermostabilité de nouvelles enzymes lipolytiques* (Doctoral dissertation, Université du Québec à TroisRivières).
- Contesini, F. J., Davanço, M. G., Borin, G. P., Vanegas, K. G., Cirino, J. P. G., Melo, R. R. D., ... & Carvalho, P. D. O. (2020). **Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry.** *Catal*, 10(9), 1032.
- Delorme, V., Dhouib, R., Canaan, S., Fotiadu, F., Carrière, F., & Cavalier, J. F. (2011). **Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition.** *Pharm Res*, 28(8), 1831-1842.
- Derewenda, Z. S., & Derewenda, U. (1991). **Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases.** *BiochemCell Bio*, 69(12), 842-85
- De Souza, C. E. C., Ribeiro, B. D., & Coelho, M. A. Z. (2019). **Characterization and application of *Yarrowialipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry.** *ApplBiochemBiotechnol*, 189, 933-959.

Références bibliographiques

- El Alaoui, M. (2015). **Développement de tests enzymatiques applicables au criblage des activités et/ou inhibiteurs de (phospho) lipases** (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- **EPA, (2016). United States Environmental Protection Agency.**
- Essaid A. B., Parul V., Lisa S., Nathalie G.V, Cedric J., &Van W. (2015) **.Taxonomy,Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. MicrobMolBiol Rev. 80(1). 1–43.**
- Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F. A., &Parvaiz, A. (2021). **Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. BiotechnolApplBiochem, 68(3), 445-458**
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., & Valero, F. (2013). **The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. Electron J Biotechnol, 16(3), 12-12.**
- Fickers, P., Destain, J., &Thonart, P. (2008). **Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. BiotechnolAgronSoc Environ, 12(2).**
- Filho, D. G., Silva, A. G., &Guidini, C. Z. (2019). **Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. ApplMicrobiolBiotechnol, 103, 7399-7423.**
- Freitas S, et al. (2017).**Actinobacteria as plant growth-promoting bacteria: Applications in agriculture. In: Maheshwari DK, editor. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Springer Int Publ. p. 165-194.**
- García-Oliva, C., Perona, A., Rumbero, Á., Hoyos, P., &Hernáiz, M. J. (2022). **Enzymatic synthesis and molecular modelling studies of rhamnose esters using lipase from pseudomonas stutzeri. International Journal of Molecular**

Références bibliographiques

- García-Oliva, C., Perona, A., Rumbero, Á., Hoyos, P., & Hernáiz, M. J. (2022). **Enzymatic synthesis and molecular modelling studies of rhamnose esters using lipase from pseudomonas stutzeri.** *Int J MolSci*, 23(4), 2239.
- Genilloud, O. (2017). **Actinobacteria: still a source of novel antibiotics. Critical reviews in microbiology**, 43(3), 299-315.
- Geoffroy, K., & Achur, R. N. (2018). **Screening and production of lipase from fungal organisms.** *BiocatalAgric Biotechnol*, 14, 241-253.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, S. (1996). **Microbial lipases: production and applications.** *SciProg* (1933-), 119-157.
- Gomathi, A., & Gothandam, K. M. (2016). **Ocean Dwelling Actinobacteria as Source of Antitumor Compounds.** *Braz Arch BiolTechnol*, 59.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). **Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review.** *Microb Cell Fact*, 15, 1-
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). **Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review.** *Microb Cell Fact*, 15, 1-18.
- Grzyb, A., Wolna-Maruwka, A., & Niewiadomska, A. (2020). **Environmental factors affecting the mineralization of crop residues.** *Agron*, 10(12), 1951.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties.** *ApplMicrobiolBiotechnol*, 64, 763-781.
- harbonneau, D. (2014). **Éléments structuraux essentiels à la thermostabilité de nouvelles enzymes lipolytiques**(Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). **Industrial applications of microbial lipases.** *Enzyme MicrobTechnol*, 39(2), 235-251.

Références bibliographiques

- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). **Methods for detection and characterization of lipases : à comprehensive review.** *BiotechnolAdv*, 27(6), 782-798.
- Hassan, G. M., et al. (2020). **Isolation, purification and characterization of lipase from *Amycolatopsismediterranei* GY119.***Prep BiochemBiotechnol*, 50(6), 60
- Idris, A., & Bukhari, A. (2012). **Immobilized *Candida antarctica* lipase B:Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis.** *BiotechnolAdv*, 30(3), 550-563.
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020). **Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil.** *SciAf*, 8, e00279.
- Ire F.S. & Ike V.C. (2014). **Screening and Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Submerged Fermentation by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) IMI 366159** *Annual Research & Review in Biology*. 4(16): 2587-2602.
- 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.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). **Lipases for biotechnology.** *CurrOpinBiotechnol*, 13(4), 390-397.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F., & Dijkstra, B. W. (1993). **Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*.** *FEBS Lett*, 332(1-2), 143-149.).
- Jarrar, H. (2011). **Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles.** Thèse de doctorat. Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). **Bacterial lipases: a review on purification and characterization.***ProgBiophysMolBiol*, 132, 23-34.

Références bibliographiques

- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). **Bacterial lipases: a review on purification and characterization.***ProgBiophysMolBiol*, 132, 23-34.
- Joseph, B., Ramteke, P. W., & Thomas, G. (2008). **Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments.** *BiotechnolAdv*, 26(5), 457-470.
- Karpushova, A. A. (2004). **Screening, nucleotide sequencing and biochemical characterisation of novel lipolytic enzymes from Bacillus sp. 01-855 associated with marine sponge Aplysinaaerophoba.** Institut de Technique de Biochemie, Université Stuttgart.
- Kitouni M. (2007). **Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées.** Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie
- Lafaquière, V. (2010). **Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases.** Doctoral dissertation, Toulouse, INSA.
- Lagrari, C. (2019). **Production améliorée des lipases à partir du Rhizopusoryzae NRRL 1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de fermentation liquide.** Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- Lam KS. (2006). **Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes.** *Curr.Opin. Microbiol.* 9, 245–251.
- Lamari L. (2006). **Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, Saccharothrixalgeriensis.** Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Larpent J-P, Larpent-Gourgand M. (1985). **Éléments de microbiologie.** Des sciences et des arts. p 264.
- **Lecterc H., Izard D. And Wattré P. (1983). Microbiologie générale. Paris. 39**

Références bibliographiques

- Li, H., & Zhang, X. (2005). **Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1.** *Protein Expression Purif*, 42(1), 153-159.
- Li, J., Shen, W., Fan, G., & Li, X. (2018). **Screening, purification and characterization of lipase from *Burkholderia pyrrocinia* B1213.** *3 Biotech*, 8, 1-12.
- Li, X., & Yu, H. Y. (2014). **Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production.** *Folia Microbiol*, 59, 455-463.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, ME, Kämpfer, P. et Whitman, WB (2012). **Feuille de route du phylum des Actinobactéries.** *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 1–28.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 506-577.
- McAuliffe, J.C. (2012). **Industrial enzymes and biocatalysis.** *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W. (2002). **Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments.** *Appl Environ Microbiol*, 68(10), 5005-5011.
- Mohammadipanah, F., & De hagh, M. (2017). **Classification et taxonomie des actinobactéries.** *Biol Biotechnol*, 51–77.
- Monteiro, R. R., Arana-Peña, S., da Rocha, T. N., Miranda, L. P., Berenguer Murcia, Á., Tardioli, P. W., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2021). **Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?** *Renewable Energy*, 164, 1566-1587
- Monteiro, R. R., Arana-Peña, S., da Rocha, T. N., Miranda, L. P., Berenguer-Murcia, Á., Tardioli, P. W., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2021). **Liquid lipase**

Références bibliographiques

- preparations designed for industrial production of biodiesel.** Is it really an optimal solution? *Renew Energy*, 164, 1566-1587.
- Moreira KA., Albuquerque BF., Teixeira MFS., Porto ALF., Lima Filho JL. 2002. **Application of protease from *Nocardia* sp. as a laundry detergent additive.** *World J Microbiol Biotechnol*, 18, 307-312.
 - Mswaka, A. Y., & Magan, N. (1998). **Wood degradation, and cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe.** *Mycol Res*, 102(11), 1399-1404.
 - Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999). **α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing** *Curr Opin Struct Bio.*, 9(6), 732-737.
 - Neang, P. (2013). **Identification et caractérisation fonctionnelle de nouvelles lipases/acyltransférases de levures.** Doctoral dissertation, Montpellier SupAgro.
 - Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., ... & Goldman, A. (1992). **The α/β hydrolase fold.** *Protein Eng Design Select*, 5(3), 197-211.
 - Osada H. 1998. **Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control.** *J Anti Biot* 51 :973-981.
 - Pascoal, A., Estevinho, L. M., Martins, I. M., & Choupina, A. B. (2018). **Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms.** *Physiol Mol Plant Pathol*, 104, 119-126.
 - Pinsirodom P. & Parkin K.L. (2001). **Lipase assays. Current protocols in food analytical chemistry.**
 - Pocalyko, D. J., & Tallman, M. (1998). **Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani* lipase.** *Enzyme Microb Technol*, 22(7), 647-651
 - Polti M., Aparicio JD., Benimeli CS., Amoroso MJ. (2014). **Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria.** *Int Biodet Biodegrad.* 88, 48-55.

Références bibliographiques

- Prashanthi, K., Suryan, S., &Varalakshmi, K. N. (2015). **In vitro Anticancer Property of Yellow Pigment fromStreptomycesgriseoaurantiacus** JUACTION 01. *Braz Arch BiolTechnol*, 58(6), 869-876.
- Rahman RN, Baharum SN, Basri M, Salleh AB. (2005). **High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas sp. strain S5**. *Anal Biochem.* ;341(2):267–74.
- Rahman RN, Baharum SN, Basri M, Salleh AB. (2005). **High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas sp. strain S5**. *Anal Biochem.* ;341(2):267–74.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**.*MicrobiolMolBiol Rev*, 62(3), 597-635.
- Rouillard, H. (2012). **Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde**. Doctoral dissertation, Université de La Rochelle.
- Rouillard, H. (2012). **Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde**. Doctoral dissertation, Université de La Rochelle.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., &Sumana, C. (2018).**Recent advances on sources and industrial applications of lipases**. *BiotechnolProg*,34(1), 5-28.
- Schmid, R. D., Menge, U., Schomburg, D., &Spener, F. (1995). **Towards novel biocatalysts via protein design: the case of lipases**. *FEMS Microbiol Rev*, 16(23), 253-257.
- Sefha F. (2011). **Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée**. Doctoral dissertation, Université Yahia Farès de Médéa.
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., &Handa, S. (2017). **Purification and characterization of lipase by Bacillus methylotrophicus PS3 under submerged**

Références bibliographiques

- fermentation and its application in detergent industry.** *J Gen EngBiotechnol*, 15(2), 369-377.
- Sharma, R., et al. (2014). **Lipase production by Nocardia species: optimization of process parameters.***Ind J Microbiol*, 54(2), 211-216.
 - Simons J.W., Adams H., Cox R.C., Dekker N., Götz F., Slotboom A.J., Verheij H.M.1996. The lipase from *Staphylococcus aureus*. **Expression in *Esherichia coli*, large-scale purification and comparaison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase.***Eur J Biochem*, 242, 760-769
 - Sirisha, E., Rajasekar, N., &Narasu, M. L. (2010). **Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils.** *AdvBiol Res*, 4(5), 249-252.
 - Soares, C. M. F., et al. (2012). **Isolation and characterization of a thermostable lipase from *Streptomyces rochei*.***J MolCatal B: Enzym*, 74(3-4), 250-256.
 - Svendsen, A. (2000). **Lipase protein engineering.** *BiochimBiophys Acta*, 1543(2), 223-238.
 - Trodler, P., Schmid, R. D., &Pleiss, J. (2009). **Modeling of solvent-dependent conformational transitions in Burkholderiacepacia lipase.***BMC StructBiol*, 9(1), 1-13.
 - Winkler, M., &Lüthi, E. (2019). **Bacterial α -Amylases and Their Industrial Applications.***Ind Enzyme* (pp. 155-186). Springer.

Annexes

Annexe 1

Matériel utilisé

1. Appareillages

3. Balance (SARTORIUS VWR124).
4. Bain Marie (GFL 1003 – Gemini).
5. Centrifugeuse (ROTINA 380 R).
6. pH-mètre (BANTE).
7. Spectrophotomètre (RAYLEIGH UV 1800).
8. Plaque chauffante agitatrice (VELP SCientifica, Trade Raypa).
9. Vortex (TOP-MIX 94323).
10. Shaker (S1500 incubator).

2. Verrerie

- Tubes à essai.
- Pipette Pasteur.
- Epprouvettes, falcons, bécher, pipettes

Annexe 2

1. Préparation de la solution substrat

Dans un bécher d'un litre, on porte à l'ébullition 1L d'eau distillé. Sous agitation, 20g de la gomme arabique est versée en pluie. Quand la gomme arabique est dispersée, la solution est laissée sous agitation dans un cristalliseur remplie de glace jusqu'à ce que la solution soit clarifiée.

L'émulsion d'huile d'olive est préparée par l'ajout de 10 ml d'huile d'olive dans 90 ml de la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois pendant 1 minute en Matériel

et Méthodes 21 s'arrêtant 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion (Cardenas,2001 ; Sefha ,2011).

2. Milieu liquide pour la production de lipase

KH₂PO₄.....0.4g

K₂HPO₄.....0,1g

MgSO₄.....0.2g

CaCl₂.....0.002g

NH₄NO₃.....0.5g

Eau distillé.....1L

Substrat lipidique.....2%

Annexe3:

| Colonne1 | 24h | 48h | 72h |
|-------------|-------|-------|------|
| benzene | 1,33 | 1,33 | 1,33 |
| Butanol | 0 | 0 | 0 |
| Tuleoum | 2,66 | 1,33 | 0 |
| Xyléne | 4 | 4 | 2,66 |
| formaldhd | 0 | 0 | 0 |
| Propanol | 0 | 0 | 0 |
| Mercaptoeth | 0 | 0 | 0 |
| Acétone | 0 | 0 | 0 |
| di-ethlethr | 10,66 | 4 | 0 |
| Glycerol | 0 | 0 | 0 |
| Petroleum | 0 | 1,33 | 2,66 |
| Acétonitril | 0 | 0 | 0 |
| Methanol | 4 | 10,66 | 16 |

Résumé

L'objectif de notre étude était de réaliser la semi-purification et la caractérisation des lipases produites par la souche *Streptomyces* sp. 22 dz. L'activité lipasique a été mesurée par méthode titrimétrique. Pour la semi-purification de la lipase, la précipitation avec du sulfate d'ammonium a été utilisée, suivie d'une étape de dialyse. Ces étapes ont permis l'élimination des débris et l'augmentation de la concentration de lipase dans la préparation enzymatique. Une activité maximale de 7.7 U/ml a été détectée. Il a été constaté que l'activité optimale des lipases était atteinte à une température de 40°C et à un pH alcalin compris entre 8 et 9. Des effets ont également été observés sur son activité en présence de certains ions métalliques, tandis que certains surfactants la stimulaient. Des effets variables ont été constatés sur l'activité de la lipase lors de son incubation dans différents solvants organiques.

Mots clé : Lipase, actinobactéries, méthode de dosage, semi purification

Abstract :

The aim of our study was to semi-purify and characterize lipases produced by the *Streptomyces* sp. 22 dz. Lipase activity was measured using a titrimetric method. For the semi-purification of the lipase, precipitation with ammonium sulfate was employed, followed by a dialysis step. These steps allowed for the removal of debris and an increase in the concentration of lipase in the enzymatic preparation. A maximum activity of 7.7 U/ml was detected. It was observed that the optimal activity of the lipases was achieved at a temperature of 40°C and an alkaline pH between 8 and 9. Effects on its activity were also noted in the presence of certain metal ions, while some surfactants stimulated it. Variable effects on lipase activity were observed during incubation in different organic solvents.

Keywords: Lipase, actinobacteria, titration method, semi-purification