

**COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux**

**FORMULATION ET IMMOBILISATION DE LA LIPASE
DE *YARROWIA LIPOLYTICA***

Wazé Aimée Mireille ALLOUE épouse BORAUD

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Prof. Philippe Thonart
Dr. Jacqueline Destain

2008

ALLOUE Wazé Aimée Mireille (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. (Thèse de Doctorat). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique., 165p., 20 tabl., 22fig.

Résumé: La lipase de *Yarrowia lipolytica* (EC.3.1.1.3) est une enzyme appartenant à la classe des hydrolases. La non pathogénicité et le caractère hyperproducteur en lipase de cette levure lui confère une place de choix au sein de l'unité de Bio-industries du Centre Wallon de Biologie Industrielle.

Ce présent travail s'inscrit dans le cadre général du développement industriel de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et concerne plus particulièrement le traitement post-culture de l'enzyme afin de réaliser des formes liquides, poudres atomisées, immobilisées et enrobées à l'aide des polymères acryliques.

L'atomisation de la lipase en présence ou en absence de poudre de lait a permis l'acquisition de poudres fluides, stables à 4 et 20°C et présentant des températures de transition vitreuse comprises entre 51 et 79°C. L'activité d'eau de conservation des poudres était ≤ 0.4 .

La stabilisation de l'enzyme sous forme de liquide concentré réalisée avec le monopropylène glycol (MPG), les inhibiteurs de protéases et l'irradiation aux rayons gamma ont révélé que le MPG à 50% et la technique d'irradiation au rayon gamma permettaient la stérilisation et la préservation de l'activité enzymatique. Par ailleurs, l'immobilisation de cette enzyme par trois techniques (adsorption, inclusion et liaison covalente) a révélé une amélioration de ses propriétés caractéristiques telles que la thermostabilité et la résistance aux solvants. La technique d'immobilisation par adsorption et par liaison covalente a permis une utilisation multiple de l'enzyme.

L'étude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de *Y. lipolytica* a montré la capacité de cette enzyme à être mise sous forme de comprimés et de poudres encapsulées. La comparaison réalisée *in vitro* entre le Créon 150mg (produit pharmaceutique) et les formes galéniques à base de la lipase a montré des temps de gastro-résistance et de délitage similaires.

Ces différentes formules de la lipase posent des jalons nécessaires pour leurs applications dans des secteurs agroalimentaires, environnementaux et pharmaceutiques.

ALLOUE Wazé Aimée Mireille (2008). Formulation and immobilization of lipase from *Yarrowia lipolytica* (PhD Thesis)., Agricultural University of Gembloux Belgium, 165p., 20 tabl., 22fig.

Abstract: *Yarrowia lipolytica* lipase (EC.3.1.1.3) is an enzyme which belongs to the class of hydrolases. Nonpathogenicity and the high-lipase producing character of this yeast have emphasised its use within the laboratory of Bio-industry of the Walloon Center of Industrial Biology.

The present work lies within the general scope of the industrial development of the lipase from *Yarrowia lipolytica*. More particularly it relates to the post-culture treatment of the enzyme in order to obtain liquid forms, atomized powders, immobilized and coated enzymes using acrylic polymers.

The atomization of lipase in presence or absence of milk powder allowed the achievement of flowing, stable powders at 4 and 20°C, with glass transition temperatures ranging between 51 and 79°C. The water activity of preservation of the powders was ≤ 0.4 .

Stabilization of the enzyme under the form of concentrated liquid carried out with monopropylene glycol (MPG), proteases inhibitors and gamma irradiation revealed that MPG (50%) and gamma irradiation allowed sterilization and conservation of the enzymatic activity. In addition, the immobilization of the enzyme through three techniques (adsorption, inclusion and covalent bond) revealed an improvement of some properties such as thermostability and resistance to solvents. Immobilization by adsorption and covalent bond allowed multiple uses of the enzyme.

The preliminary study of feasibility of galenic forms containing the lipase from *Y. lipolytica* showed the capacity of this enzyme to be put under the form of tablets and encapsulated powders. The *in vitro* comparison of Creon 150mg (pharmaceutical product) and galenic forms containing the lipase, showed similar times of acid-resistance and of disintegration.

These various formulas of the lipase constitute milestones necessary for their applications in food, environmental and pharmaceutical industries.

Copyright Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

Dédicace

Avec toute ma gratitude et ma reconnaissance à tonton Blaise (1952-2000)

A mes parents et famille proche, à mon époux et à mon fils adoré Yann...

Remerciements

Au terme de ce travail, il me tient à cœur de remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur P. Thonart, promoteur, pour m'avoir donné les possibilités de réaliser cette recherche au sein de son unité, m'avoir prodigué ses conseils judicieux.

Je remercie très sincèrement Madame le Docteur Jacqueline Destain Co-promoteur, pour son encadrement, sa disponibilité, son dévouement, sa bonne humeur, ses conseils de tous les jours, et pour m'avoir fait partager son expérience.

Il m'est agréable de remercier le Professeur Karim Amighi de l'université libre de Bruxelles de me faire l'honneur de juger cette thèse, pour l'attention accordée à cette étude et pour avoir permis la réalisation des techniques d'enrobage dans son unité.

Ma gratitude s'adresse aussi aux autres membres du jury, en particulier à Mr G. Lognay de me faire l'honneur de juger cette thèse, et à Messieurs C. Blecker, F. Bera, B. Wathelet pour leur disponibilité.

C'est avec un immense plaisir que je remercie tout le personnel du bureau 22.73 en particulier Mme Dominique Roblain et Dr. Robin Dubois-Dauphin pour leurs aides et leurs conseils de tous les jours.

Je tiens à remercier également tout particulièrement le personnel du secrétariat du CWBI, Marina, Marguerite, Suzanne et Cécile pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité, et leur bonne humeur quotidienne.

Je remercie très sincèrement tout le personnel scientifique et technique du CWBI, en particulier Frank, Marc, Jean-Marc, Hakim, Magali, Lamia, Christophe, Samuel, Benoît, Martine, Annick, Cathy, Pascale, Danielle, Laurent, Frédéric, Pol, Thami, et Slim pour leur aide, leur amitié et pour toutes ces années formidables passées ensemble.

Ma gratitude s'adresse également à Dr. Mario Aguedo de l'unité de la Chimie organique pour son aide et pour sa disponibilité.

Ce travail de thèse a été subsidié par le gouvernement de Côte D'ivoire que je souhaite remercier pour m'avoir soutenu financièrement durant ces six années d'études passées en Belgique.

Mes remerciements s'adresse également à tous les doctorants avec lesquels j'ai passé des journées durant ces quatre années au CWBI de Gembloux : Antoine Assamoi, Francine Aké, Philomène Kabran, Ibourahema Coulibaly, Privat Kouakou, Eugène Karenzi, Ana Aguilargalvez, Mohamed Cissé, Charles Yapou, Michel Musoni, Michel Diop, Annick Lejeune, Venant Nihoriméré, Roland Foma, Khady Ba, Guillaume Henry, Geralda Manigat, Mohamed Alchihab et Thambi Kar pour leur amitié et sympathie.

Je remercie L'ASBL planète Femme et en particulier Mesdames Michelle Moreau et Françoise Decamp pour leurs aides et soutiens, je n'oublierai jamais.

Je remercie également les membres de l'association des étudiants ivoiriens en Belgique (ASETIB) et plus particulièrement ceux de la section de Gembloux pour leur convivialité, leur respect et leur disponibilité à mon égard.

Toujours dans cette communauté des ivoiriens, je tiens à remercier Dr. Tiébré Marie Solange (Mariso) pour m'avoir encouragé à faire cette étude doctorale en Belgique, que Dieu te le rendes au centuple mon amie et soeur.

Je remercie très sincèrement les membres du groupe de prière des étudiants catholiques de la paroisse de Gembloux « Onction Divine » Augustin, Evelyne, Olga, Innocent, Maxime, Marie Michel et Abbé Florent pour leurs soutiens spirituels et Que Dieu vous bénisse.

Ma reconnaissance va également à l'endroit de la famille Bassenda (Marthe, Esaïe, Aurore John et Axel) pour leur amitié, leur disponibilité et leur aide sans faille.

Enfin je voudrais dire un grand merci à mon époux Maxime Boraud à mon fils Yann David Boraud pour leur patience, ainsi qu'à mes parents et famille proche pour leur soutien de tous les jours.

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

Liste des abréviations

AC	: acide
AG	: acide gras
Aw	: water activity
CCM	: chromatographie sur couche mince
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
CWBI	: Centre wallon de Biologie industrielle
DBO	: demande biologique en oxygène
DCO	: demande chimique en oxygène
DE	: Dextrose Equivalent
DSC	: Differential Scanning Calorimetry
GA	: gum arabic
I.Y	: immobilization yield
MEH	: matière extractible à l'hexane
MD	: maltodextrine
MGD	: matière grasse décantée
MP	: milk powder
MPG	: monopropylène glycol
pO ₂	: pression partielle en oxygène
T _g	: glass transition temperature
rpm	: rotation par minute
vvm	: volume d'air par volume du milieu
v/v	: volume /volume
w/v	: poids /volume
γ- irradiation:	gamma irradiation
<i>Y.L</i>	: <i>Yarrowia lipolytica</i>

Table des matières

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre 1: Synthèse bibliographique.....	9
--	----------

Publication I: Les lipases immobilisées et leurs applications	10
Résumé	11
1. Généralités sur les lipases	15
1.1 Introduction	15
1.2. Différentes formes d'enzyme	16
2. Immobilisation des lipases	20
2.1 Immobilisation par inclusion.....	20
2.2 Immobilisation par adsorption	22
2.3 Immobilisation par liaison covalente	23
3. Applications des lipases immobilisées	26
3.1 Réaction d'hydrolyse.....	26
3.2 Réaction de synthèse	27
4. Interestérisation enzymatique de matières grasses: exemple d'une stratégie globale pour une meilleure maîtrise du procédé.....	32
4.1 L'interestérisation de matières grasses alimentaires	32
4.2 Stratégies pour une meilleure maîtrise de l'interestérisation.....	33
4.3 Recherche de lipases mieux adaptées aux réactions d'estérisation	34
5. Conclusions	35
6. Références bibliographiques	36

Objectif du travail	47
----------------------------------	-----------

Chapitre 2: Formulation solide de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	51
--	-----------

Publication II: Storage of <i>Yarrowia lipolytica</i> lipase after spray drying in presence of additives	52
Résumé.....	53
1 Introduction	55
2 Materials and methods	57
3. Results and discussion.....	59
4. Conclusions	64
5. References	65

Chapitre 3: Formulation liquide de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	68
---	-----------

Publication III: Effect of monopropylene glycol and gamma irradiation on <i>Yarrowia lipolytica</i> lipase stabilization	69
Résumé.....	70
Introduction	73
Materials and methods	74
Results	76

Discussion	80
References	81

Chapitre 4: Immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*..... 85

Publication IV: Comparison of <i>Yarrowia lipolytica</i> lipase immobilization yield of entrapment, adsorption and covalent bond techniques.....	86
Résumé.....	87
Introduction	90
Materials and methods	91
Results and discussion.....	95
Conclusion.....	107
References	107

Chapitre 5: Etude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de *Yarrowia lipolytica* 110

I Introduction.....	111
II. Matériel et méthodes	113
II.1 Les gélules	113
II.2 Comprimés.....	114
II.2.1 Fonctionnement de la comprimeuse Korsh	114
II.2.2 Préparation de la formulation pour réaliser les comprimés	114
II.3 Microencapsulation de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	114
II.3.1 Procédé d'encapsulation de la lipase <i>Yarrowia lipolytica</i> sans solvant organique	115
II.3.2 Procédé d'encapsulation de la lipase <i>Yarrowia lipolytica</i> en présence de solvant	115
II.4 Enrobage	116
II. 4.1 Préparation de la dispersion d'enrobage des gélules par la méthode de trempage	116
II .4.2 Préparation de la dispersion d'enrobage par la méthode du lit d'air fluidisé ...	116
II. 5 Tests et essais galéniques	117
III. Résultats et discussion.....	118
III.1 Etude comparative entre le Créon et les gélules à base de lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	118
III.2 Etude comparative entre le Créon et les comprimés à base de lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	119
III.3 Etude comparative entre le Créon et les poudres encapsulées à base de lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	120
IV. Conclusions et perspectives	121
V. Références bibliographiques	121

Chapitre 6: Application de la lipase de *Yarrowia lipolytica* dans le traitement d'effluents..... 123

Publication VI : Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives.....	124
Résumé.....	125
1 INTRODUCTION.....	127
2 MATERIEL et METHODES.....	129
2.2 Préparation des déchets gras.....	130
2.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.....	130
2.4 Mesure de la proportion d'acides gras libres des MEH.....	131
2.5 Dérivatisation des acides gras.....	131
2.6 Procédures analytiques.....	132
2.7 Essai en bioréacteur de 2l.....	133
3 RESULTATS.....	134
3.1 Caractérisation de l'effluent.....	134
3.2 Pourcentage d'acides gras libres dans les MEH.....	134
3.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.....	134
3.4 Caractérisation qualitative de la matière grasse des effluents.....	135
3.5 Dégradation de la MGD en bioréacteur aéré.....	138
4 DISCUSSION.....	140
5 CONCLUSION.....	141
6 REFERENCES.....	142

Chapitre 7: Discussion générale et conclusions..... 145

7.1 Formulation liquide de la lipase (chapitre 3).....	148
7.2 Immobilisation de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> (chapitre 4).....	150
7.3 Etude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> (chapitre 5).....	154
7.4 Application de la lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> dans le traitement d'effluent (chapitre 6).....	156
7.5 Conclusion générale.....	156
7.6 Perspectives.....	159
7.7 Références bibliographiques.....	161

Introduction générale

Introduction générale

Les réserves fossiles sont non seulement une source d'énergie mais une matière première de base importante pour l'industrie. Le vent, les marées constituent des énergies alternatives mais ils ne seront jamais des sources de carbone quand le pétrole sera rare.

La transformation de la biomasse végétale ou produits dérivés énergétiques est la solution obligée d'autant plus qu'elle contribue à la réduction de l'effet de serre par capture du CO₂ pour la photosynthèse.

Le développement de ces nouvelles biotechnologies, ces bio-industries, ces bio-raffineries est un défi majeur pour l'avenir. Mais ces développements nécessitent la mise au point de biocatalyseurs (que ce soient des microorganismes ou des enzymes) de plus en plus performants mais aussi adaptés à une mise en œuvre dans des conditions industrielles. Notre recherche s'inscrit dans ce cadre général et s'intéresse plus particulièrement à la formulation d'une lipase utilisable dans la transformation et le biofaçonnement des matières grasses ou lipides.

Les matières grasses ou lipides sont des composés très énergétiques, insolubles et constitués principalement de triglycérides (TG) qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés.

Parmi ces acides gras, certains sont essentiels car non synthétisés par notre organisme : l'acide linoléique (C_{18:2}) et l'acide linoléique (C_{18:3}). Les acides polyinsaturés ont de nombreux rôles structuraux et fondamentaux dans la croissance, la reproduction, la structure des membranes (tissus nerveux), la protection de la peau, la formation de certaines hormones, la protection et la prévention des maladies cardio-vasculaires.

De nos jours, les médecins recommandent de privilégier les matières grasses riches en acides gras insaturés (graines de lin, noix, tournesol, olives, avocat, poissons gras, graines de

sésame..), et de limiter les apports en acides gras saturés (viandes, produits laitiers, oeufs, huile de palme, de coprah...) car ils sont directement liés à des problèmes de santé graves lorsqu'ils sont consommés en excès.

Les graisses et huiles produites à l'échelle mondiale, représentent une masse annuelle de 60 millions de tonnes dont une part importante (plus de 2 millions de tonnes) est utilisée dans des processus chimiques consommant beaucoup d'énergie tels que l'hydrolyse et les réactions de transestérification et d'interestérification. Les produits qui en résultent sont souvent instables et exigent à nouveau la distillation pour éliminer les impuretés et les produits de dégradation.

Beaucoup de matières grasses polyinsaturées sont à l'état liquide à température ambiante, sensibles à l'oxydation, à la chaleur et à la lumière.

Face à ce problème, les industriels ont développé des technologies qui permettent de conserver les huiles plus longtemps. Les méthodes utilisées débutent à l'extraction et consistent à chauffer la matière première (graines, fruits) en présence d'un solvant.

De plus, les industriels transforment les matières grasses liquides pour les rendre solides à la température ambiante par hydrogénation, processus qui consiste à rajouter des atomes d'hydrogène (H) aux insaturations des acides gras polyinsaturés. Cette modification fait d'une huile polyinsaturée une huile plus saturée, huile qui a donc un point de fusion plus élevée. Les acides gras ayant subi une hydrogénation sont définis comme des acides gras trans (cette dénomination existe pour les acides gras naturels comme ceux du rumen).

Des études récentes ont montré le caractère légèrement nocif de ces graisses, dont la consommation augmente. Les acides gras trans agissent de la même manière que les acides gras saturés sur le mécanisme du développement des maladies dites "lipidiques" pouvant mener à des maladies cardiovasculaires.

Ces acides gras trans se retrouvent dans les plats préparés, les biscuits, les confiseries, les viennoiseries, les pâtes à tarte, les pâtes à tartiner, les chocolats, les céréales, le beurre d'arachide, la margarine et dans certains aliments "santé" ou "diététiques" des rayons de supermarchés. Une directive européenne oblige de préciser si les huiles ont subi une hydrogénation. Mais, les industriels ne sont pas tenus de préciser le taux d'acides gras trans, ni de citer le terme d'acides gras trans dans la composition des produits.

L'application de la catalyse enzymatique aux réactions chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs pour l'homme et pour l'environnement. Les enzymes offrent de nombreux avantages dus à leur spécificité, leur biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits lors des réactions....

Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être stable et compatible avec le milieu réactionnel. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée.

Parmi les hydrolases, les lipases sont de plus en plus utilisées dans des secteurs industriels.

Les lipases sont des enzymes présentes chez tous les organismes vivants et elles jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. Elles sont impliquées dans la digestion des aliments et favorisent non seulement le transfert des lipides mais aussi la mobilisation des graisses qui constitue un réservoir énergétique. Leur déficience provoque des troubles digestifs sérieux tels que la pancréatite chronique, la mucoviscidose, la stéathorrhée etc.

Les lipases sont capables de catalyser de nombreuses réactions : hydrolyse de matière grasse, transestérification et interestérification, synthèse d'esters à partir d'acide gras et d'alcool. Les applications industrielles les plus importantes actuellement concernent la production d'acide gras, la transformation des matières grasses. Mais à l'avenir, de nombreux autres secteurs

visant à valoriser les ressources renouvelables tels que la production du biodiesel à partir de l'huile ou la synthèse de bio-surfactants nécessiteront leur emploi. Les lipases d'origine microbienne sont de plus en plus utilisées compte tenu de leur coût de production et de leur diversité.

Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme, présentent des limites d'applications à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés.

Afin d'élargir l'utilisation commerciale de ces huiles végétales, l'interestérisation enzymatique réalisée en absence de solvants organiques, permet d'aboutir à des produits aux propriétés modifiées. Lors de la réaction d'interestérisation un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras au sein des triglycérides du milieu.

La Lipozyme IM60 et la Lipozyme TLIM de Novozyme sont des lipases immobilisées commerciales utilisées pour la production de triacylglycerols modifiés, en milieux micro-aqueux et sans solvants.

Le beurre de cacao est une matière première importante dans la fabrication du chocolat et pour les industries relatives de confiserie. Sa consistance et ses qualités, dérivant de la composition en acides gras de ses triglycérides, sont très recherchées par le consommateur. Mais l'offre limitée et la forte demande entraînent la flambée des prix sur le marché. Un substitut de beurre de cacao avec une composition en triacylglycérols semblable au beurre de cacao peut être préparé à partir de graisses ou d'huiles bon marché.

Certaines études récentes ont montré qu'une lipase immobilisée par adsorption sur une résine macroporeuse, a permis la synthèse d'un substitut de beurre de cacao par transestérisation d'huile de graines de thé, stéarate de méthyle et palmitate de méthyle (Wang *et al.*, 2005). La transestérisation implique l'échange entre un groupe acyle et un alcool (alcoololyse) ou avec le glycérol (glycérolyse).

Actuellement, des recherches fondamentales s'orientent vers l'obtention par transestérification à l'aide de lipases immobilisées des TG renfermant des acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 9), réputés anti-inflammatoires, anti-thrombiques et réducteurs de la pression sanguine (Akimoto, 2004).

La Côte d'Ivoire, premier producteur mondial du cacao, produit par ailleurs environ 276.000 tonnes d'huile de palme brute (sur une superficie de 190.000 ha de palmier à huile par an).

Les deux sociétés Blohorn-Unilever et Cosmivoire utilisent 85% de l'huile de palme brute produite. Les valeurs d'exportation d'huile brute, d'huile raffinée et d'huile de palmiste représentent environ 50 milliards de FCFA (76 millions d'euros). En aval de la production, les deux transformateurs Blohorn-Unilever et Cosmivoire dominent le marché ivoirien des produits dérivés de l'huile de palme (corps gras et cosmétiques) obtenus très souvent par des processus chimiques. Compte tenu du coût élevé des enzymes, le processus utilisant les biocatalyseurs s'avère peu exploité.

Notre collaboration avec ces sociétés transformatrices consistera à la mise au point de techniques de production des lipases microbiennes pour la modification de la matière grasse du cacao servant à la fabrication de substitut de beurre de cacao à partir de l'huile de palme. Les procédés de transestérification et interestérification enzymatique à partir d'huile végétale ou animale permettent également de produire du biodiesel ou biogazole. Le biodiesel étant une alternative au diesel classique, sa production constitue un champ d'application potentiel des lipases de très grande envergure. Les plus gros producteurs actuels de biodiesel sont les États-Unis, l'Allemagne et la France.

La Côte d'Ivoire se penche également sur la production du biocarburant à partir de l'huile de palme. L'utilisation des lipases dans cette nouvelle voie pourrait être envisageable.

Un autre domaine d'application des lipases concerne l'obtention d'arômes : l'application de lipases pré-gastriques ou microbiennes accélèrent le développement d'arômes lors de la

maturation de certains fromages. Une telle application industrielle des lipases est limitée aux fromages italiens (Mozzarella, Romano, Provolone) et à quelques autres comme le Cheddar, la Feta, l'Emmenthal, le Gouda et le Parmesan. La préparation enzymatique commercialisée sous le nom de Palatase par la firme Novo Nordisk procure un type "Camembert" à partir d'une crème et d'une émulsion de beurre, ceci par libération d'acides gras volatils (Tomasini *et al.*, 1993).

Les lipases sont également utilisées dans le domaine pharmaceutique.

L'exemple type est l'utilisation des lipases de *Burkholderia plantarii* et de *Serratia marcescens* pour la production de (2R, 3S)-3-(4-méthoxyphényle) méthyle glycidate employée dans la synthèse d'un antagoniste du calcium: le Diltiazem TM (Shibatani, 1990; Jaeger et Reetz, 1998). La firme Glaxo Welcome (actuellement GSK) a développé, au début des années 90, un agent anti-leucémique par acylation de la purine à l'aide de la lipase immobilisée de *Candida antarctica* (Novozyme 435, Novo Nordisk, Danemark). Ce procédé a rendu le produit plus soluble et donc plus bio-disponible (Rasor et Voss, 2001).

Le groupe Novozyme a mis au point le Créon (extrait pancréatique) pour le traitement des insuffisances pancréatiques exocrines.

Le domaine environnemental concerne les huileries et les industries de l'oliviculture qui sont confrontées à la problématique du traitement de leurs effluents. Les processus de traitement des effluents sont très souvent : physique, physico-chimique ou biologique. Les traitements physiques et physico-chimiques incluent les processus thermiques (évaporation et incinération), floculation/clarification, ultrafiltration et osmose inverse permettent de déplacer la pollution. Les traitements biologiques quant à eux peuvent être effectués en anaérobie ou en aérobie. La société Eurobio SA est spécialisée dans le traitement des pollutions par voie microbiologique. La législation impose d'implanter un système de prétraitement (pas toujours

très efficace) qui a pour but de retenir les graisses qui sont ensuite pompées par des professionnels et détruites par incinération pour éviter les relargages dans les réseaux.

Eurobio a développé des traitements biologiques *in situ* des graisses en provenance des industries agro-alimentaires : bacs à graisses, stations d'épuration, réseaux d'égout et fosses de relevage. Ces procédés de biodégradation des graisses associent les biosurfactants (produits par les bactéries sur le site même, ils facilitent le contact entre les bactéries et les graisses), les microorganismes (particulièrement adaptés à la dégradation des graisses agro-alimentaires ou triacylglycérols) et les nutriments (soutiennent et assurent un travail biologique complet). Ces procédés assurent ainsi un coût de traitement des graisses inférieur à ceux des moyens traditionnels.

Dans la problématique des bacs à graisse, les lipases ont été utilisées pour hydrolyser les lipides en glycérol et en acides gras, afin d'accélérer le processus de dégradation et de réduire le problème de colmatage causé par les graisses. (Thonart *et al.*, 1997).

Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt des différents microorganismes dont la levure de *Yarrowia lipolytica* dans le traitement de biodégradation aérobie et de détoxification des effluents graisseux. Papanikolaou et Aggelis (2002) ont particulièrement indiqué *Y. lipolytica* comme un bon candidat pour la purification des effluents et la réduction de la pollution.

Dans l'optique de traitement biologique des effluents, la possibilité d'utilisation d'un starter composé de *Y. lipolytica* et de sa lipase pourrait permettre la dégradation rapide des graisses.

D'autres enzymes sont actuellement largement utilisés dans les produits de nettoyage ménagers. Un grand nombre de recherches est actuellement en cours dans le développement des lipases qui travailleront en milieu alcalin comme détergents.

L'état de Côte d'Ivoire, comme bien d'autres pays est confronté aux problèmes de la dégradation des matières grasses des effluents. L'utilisation de la combinaison de la lipase et de sa levure serait une solution pour la dégradation des déchets gras.

L'étude de la production de lipases a été initiée au Centre Wallon de Biologie Industrielle depuis plus d'une dizaine d'années. La levure *Y.lipolytica* fut désignée comme microorganisme modèle notamment, en raison de sa grande capacité d'excrétion de protéines et son caractère GRAS (Generally Recognized As Safe). Les travaux réalisés à l'Unité de Bio-industries (Destain, 1998) ont permis d'isoler par mutagenèse chimique sur la souche CBS 6303, plus de 400 mutants hyperproducteurs d'enzyme. Parmi ceux-ci, la souche LGx6481 est capable de produire 40 fois plus de lipase extracellulaire que la souche sauvage. La caractérisation de l'enzyme ainsi que sa production en fermenteur ont été approfondies. En vue d'améliorer le caractère hyperproducteur d'enzyme, Fickers en 2004 a isolé la souche de *Y. lipolytica* JMY1105 par mutation sur le gène (LIP2) de régulation de la lipase extracellulaire chez la souche LGx6481. L'étude du downstream processing de ces surnageants de lipase a été amorcée en vue de développer l'enzyme au stade industriel. Les premiers travaux ont permis de mettre au point un procédé d'atomisation de l'enzyme en présence de poudre de lait écrémé.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre général du développement industriel de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et concernent plus particulièrement le traitement post-culture de l'enzyme afin de mettre au point des formulations liquides, solides ou immobilisées adaptées à différentes applications dans les secteurs agroalimentaire, environnemental et pharmaceutique

Chapitre 1: Synthèse bibliographique
Les lipases immobilisées et leurs applications

Publication I:

Les lipases immobilisées et leurs applications

Wazé Aimée Mireille Alloue, Mario Aguedo, Jacqueline Destain, Hakim Ghalfi, Christophe Blecker, Jean-Paul Wathelet, Philippe Thonart

Publication parue dans *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*

Résumé

Titre : les lipases immobilisées et leurs applications

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

Les lipases immobilisées et leurs applications

Wazé Aimée Mireille Alloue*¹, Mario Aguedo², Jacqueline Destain¹, Hakim Ghalfi¹,

Christophe Blecker³, Jean-Paul Wathelet², Philippe Thonart¹

1 : Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) Unité de Bio-industries, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

2 : Unité de Chimie Organique, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

3 : Unité de Technologie des industries agro-alimentaires, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

Corresponding author: Tel: +32/ 8162273, Fax: +32/81614222

E-mail address: allouewaze.a@fsagx.ac.be

Résumé

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

Mots clés: lipases, immobilisation, hydrolyse, transestérification, interestérification

Abstract

Lipases are able to catalyse the hydrolysis of glyceridic esters in aqueous media and the synthesis of esters in non-aqueous media. They are thus able to catalyse numerous reactions of industrial interest. Whether it is by inclusion, by adsorption or by covalent link, the immobilisation of lipases aims at conferring them a good stability that enables a reuse of the enzymes after a reaction and the development of continuous processes. The reactions of triglycerides hydrolysis constitute main applications for immobilised lipases, however their use in different types of esterification reactions has also arose: there exist processes involving reactions of transesterification, of interesterification or of esters synthesis. The production of structured lipids by interesterification is one example. Although the reaction conditions dissent from those of hydrolysis, the same lipases have been used in both cases. A lipase specifically adapted for esterification though would be a highly capable tool: a series of strategies is in progress in order to reach this goal.

Keywords: lipases, immobilization, hydrolyse, transesterification, interesterification

1. Généralités sur les lipases

1.1 Introduction

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3), les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface entre lipide et eau (Mats *et al.*, 1994). Ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse tel que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols.

Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différentes espèces. Les lipases extracellulaires de *Cinnamomea antrodia* (Shu *et al.*, 2005) et de *Penicillium aurantiogriseum* ont un pH optimum de 8, tandis que celle d'*Aspergillus carneus* est de 9 (Lima *et al.*, 2004). D'autres lipases d'origine fongique ont généralement un pH optimum neutre ou légèrement acide: 7 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica* (Destain *et al.*, 1997). Les lipases peuvent être actives sur une large gamme de pH, ainsi la lipase de *Y. lipolytica* conserve au moins 60% de son activité à pH 4 et 8 (Destain *et al.*, 1997).

Concernant la température, de nombreuses lipases microbiennes ont une activité maximale située entre 30 et 40°C. Les lipases d'*Aspergillus carneus* et de *Y. lipolytica* par exemple, ont une activité maximale à 37°C (Saxena *et al.*, 2003, Destain *et al.*, 1997). Il existe cependant des enzymes actives à des températures extrêmes: *Cinnamomea antrodia* (Shu *et al.*, 2005),

Pseudomonas sp (Gaoa *et al.*, 2000) produisent des lipases qui ont une activité maximale à 45°C et elles restent très actives à des températures allant jusqu'à 80°C.

Les triglycérides sont les substrats préférentiels de la plupart des lipases. Certaines lipases hydrolysent indifféremment tout types de liaisons ester des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* (Stocklein *et al.*, 1993) et de *Pseudomonas cepacia* (Sonnet *et al.*, 1993). D'autres en revanche présentent des spécificités vis à vis du substrat, hydrolysant préférentiellement les liaisons esters en positions sn1 et sn3 du triglycéride. La lipase de *Thermomyces lanuginosa* en est un exemple, elle est toutefois non sélective vis-à-vis de la longueur de chaîne des acides gras ou des espèces triglycéridiques (Rønne *et al.*, 2005).

Cette sélectivité entraîne l'apparition d'une concentration équimolaire en diglycérides 1,2 et 2,3 lors de la réaction. L'hydrolyse plus complète entraîne l'apparition de monoglycérides, puis de glycérol et des acides gras.

La polyvalence réactionnelle des lipases et la diversité de leurs propriétés catalytiques leur confèrent une place de choix pour des applications industrielles potentielles, telles que la confection de produits alimentaires, de détergents, de produits pharmaceutiques et cosmétiques. L'utilisation des lipases dans ces nombreux secteurs nécessite une formulation préalable. Les différentes formulations existantes pour les enzymes sont énumérées dans le paragraphe suivant.

1.2. Différentes formes d'enzyme

La formulation consiste à ajouter à la solution enzymatique concentrée différents composés tels que des protéines, des sucres ou des polyols ayant pour effet de stabiliser l'enzyme et de faciliter l'étape suivante de déshydratation.

Ceci permet d'aboutir à différents types de produits, selon l'objectif visé: une poudre, un liquide concentré, une enzyme enrobée ou sous forme de microgranulés.

Des polyols (glycérol, sorbitol ou mannitol), des disaccharides (lactose) ou des sels (NaCl, MgSO₄), sont principalement utilisés afin de stabiliser les enzymes commercialisées sous la forme d'une solution liquide concentrée (Kristjansson *et al.*, 1991). Le tableau 1 montre différents polyols ou autres composés anti-microbiens utilisés dans la formulation des enzymes pour le secteur agroalimentaire.

Tableau 1 : Proportion des composés chimiques et bactériostatiques utilisés dans la formulation en agroalimentaire (Alloue, 2003)

Composés	Concentration	Intérêt en agroalimentaire	Références
Glycérol	20 à 50% (w : v) 0.5 à 1M	Stabilisant de la protéine en empêchant le déploiement et utilisé comme lyoprotectant pendant la lyophilisation. Réducteur de l'activité de l'eau.	(Kristjansson <i>et al.</i> , 1991) (Carpenter <i>et al.</i> , 1990)
Sorbitol	20 à 50% (w : v) 0.5 à 1M	Stabilisant dans les confitures ainsi que des enzymes Stabilisant protéique utilisé comme lyoprotectant pendant la lyophilisation. Réducteur de l'activité de l'eau.	(Kristjansson <i>et al.</i> , 1991) (Carpenter <i>et al.</i> , 1990)
Tréhalose ou lactose	0.5 à 1M	Stabilisants des protéines en empêchant le déploiement et utilisé comme lyoprotectant pendant la lyophilisation. Réducteur de l'activité de l'eau.	(Carpenter <i>et al.</i> , 1990)
Benzoate de sodium Sorbates de sodium Ascorbates de sodium	0.1% à 0.2% (w : v)	Bactériostatiques	(Kristjansson <i>et al.</i> , 1991)

Les préparations sous forme de poudre sont obtenues soit par atomisation, soit par lyophilisation. Ces opérations requièrent au préalable l'ajout à la préparation d'enzyme d'agents protecteurs, tels que amidon, maltodextrines, gomme arabique, sels (atomisation) ou sucres, polyéthène glycol, propylène glycol, polyols, acides aminés (lyophilisation). *LipolaseTM* (Novo Nordisk), *LumafastTM* et *LipomaxTM* (Genencor International) sont des exemples de préparations commerciales lipasiques en poudre utilisés dans les détergents (Jaeger et Reetz, 1998).

La lipase de *Y. lipolytica* est une enzyme en cours de développement au Centre Wallon de Biologie Industrielle. La formulation et la stabilisation de cette lipase sous forme de liquide concentré a été réalisée en utilisant soit des polyols ou soit des techniques de radiations aux rayons gamma (Alloue *et al.*, 2007a). Son séchage par atomisation et par lyophilisation en présence de matières de charges aboutit à des poudres qui se conservent très bien durant un an (Alloue *et al.*, 2007b), Fickers *et al.*, 2006). La société Artechno sa, commercialise cette enzyme sous forme de poudre pour des applications environnementales. Dans le tableau 2 les différentes formulations de lipase existant dans le monde industriel et leur origine sont résumées.

Tableau 2 : Différente forme de lipase, leur origine et leur application

Source de la lipase	Forme	Société	Rôle et application	Référence
<i>Candida rugosa</i>	Poudre	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma	Hydrolyse des lipides	Knezevic <i>et al.</i> , (2003)
<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides, et d'esters de sucres	Ducret <i>et al.</i> , (1995)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides, et d'esters de sucres	Ferrer <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)	Immobilisée	Novo Nordisk,	Synthèse des lipides, et d'esters de sucres	Ward <i>et al.</i> , (1997) Chen <i>et al.</i> , (2005)
<i>Pseudomonas mendocina</i> (Lumufast)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et Reetz, (1998)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et Reetz, (1998)
<i>Rhizomucor miehei</i> (Palatase)	Liquide	Novo Nordisk	Hydrolyse (développement des arômes dans le fromage)	Tarahomjoo et Alemzadeh (2003)
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase)	Poudre	Novo Nordisk	Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaire)	(Destain ,1998)
Lipase (E.C.3.1.1.3.) de <i>Yarrowia lipolytica</i>	poudre	Artchecno sa	Hydrolyse des graisses	
Extrait pancréatique de Porc (Créon)	Granule enrobé	Solvay pharma	Digestion des lipides (industrie pharmaceutique)	

2. Immobilisation des lipases

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum, et l'affinité pour le substrat ont été observés (Balcão *et al.*, 1996; Ivanov *et al.*, 1997). Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode d'immobilisation. Le paragraphe suivant passe en revue les différentes techniques d'immobilisation.

2.1 Immobilisation par inclusion

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

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou Phaeophyceae, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'acide alginique. L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques: acides α -L-guluronique et β -D-mannuronique (Ertesvag *et al.*, 1998) (Figure1).

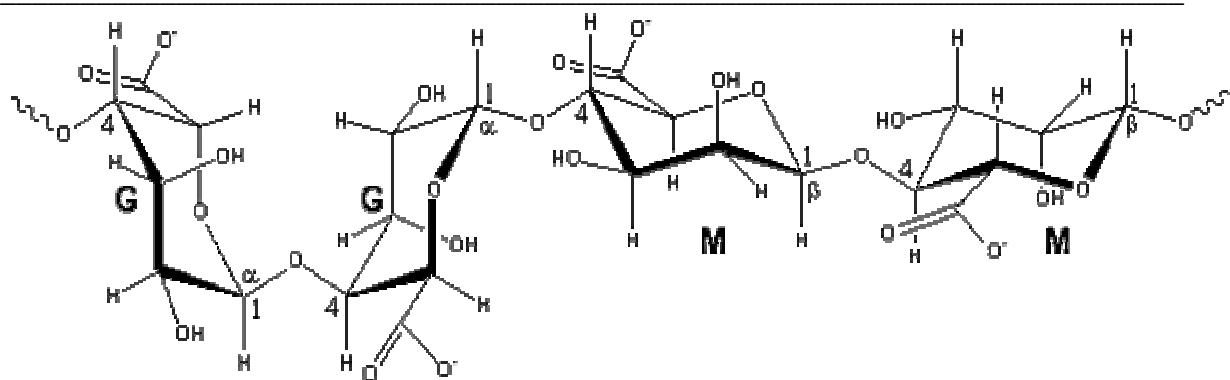


Figure 1 : Structure de l'alginate. G : acide guluronique M : acide mannuronique

Les acides uroniques sont dérivés de monosaccharides simples dans lesquels le groupe hydroxyle primaire en C6 a été oxydé en acide carboxylique correspondant. Par exemple, l'acide D-mannuronique est dérivé du D-mannose. L'alginate est principalement extrait à partir de *Macrocystis pyrifera*. L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisés pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès. Les lipases de *Candida rugosa* (Betigeri *et al.*, 2002, Won *et al.*, 2005) a été immobilisée par inclusion dans l'alginate.

Le chitosan est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée par β -(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine, un composé particulièrement abondant dans les carapaces de crustacés (Figure. 2).

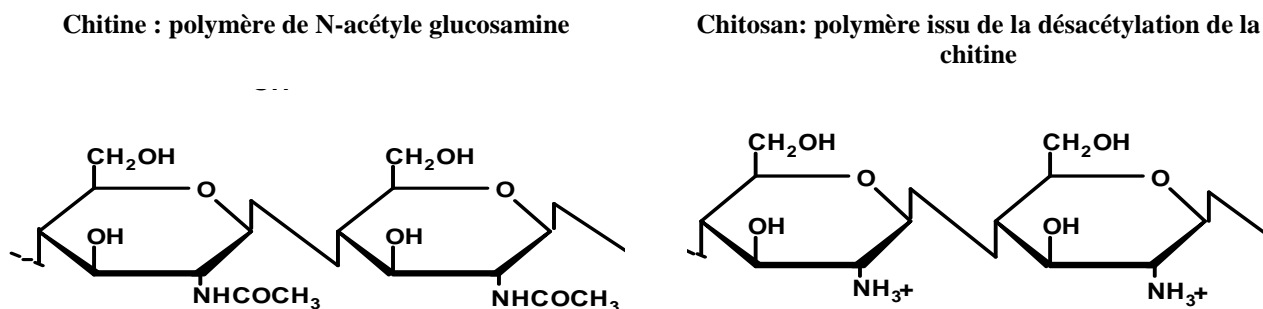


Figure 2 : Formule chimique du chitosan

Pour permettre à la molécule d'être soluble dans la plupart des acides, la désacétylation libère les groupes amines (NH₂) et confère au chitosan une nature "cationique" en milieu acide, ce qui est particulièrement intéressant du fait que la plupart des polysaccharides du même type sont le plus souvent neutres ou négativement chargés. Betigeri *et al.* (2002) ont ainsi immobilisé la lipase de *Candida rugosa* dans du chitosan.

2.2 Immobilisation par adsorption

Parmi les diverses techniques d'immobilisation, l'adsorption demeure la méthode la plus simple et la plus rentable. Différents supports, tels que la silice, les billes de verre poreux, l'alumine, la terre diatomée, la célite et le charbon actif ont déjà été exploités pour l'immobilisation d'enzymes. Différents types de liaisons interviennent dans les réactions d'adsorption à savoir l'échange d'ions, les interactions de Van Der Waals et la liaison hydrogène. La concentration en enzyme, le temps de contact, le pH et la quantité du support sont des paramètres qui influencent l'adsorption.

La célite est utilisée comme support d'adsorption dans la plupart des applications industrielles des lipases et ce, en raison de son caractère poreux. Les lipases de *Rhizomucor japonicus* (Khare *et al.*, 2000) *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae* et *Chromobacterium viscosum* (Kaewthong *et al.*, 2005) ont été immobilisées par simple adsorption sur la célite.

Le gel de silice compte parmi les principales substances adsorbantes et se prête à de nombreuses applications. C'est une forme d'acide silicique composée de granulés irréguliers et poreux. Les produits de base pour sa fabrication sont essentiellement le silicate de sodium et l'acide sulfurique. Ces substances sont exposées à une réaction chimique et produisent un gel de silice très riche en SiO_2 . Ganapati *et al.* (2005) ont immobilisé les lipases de pancréas de porc, de *Pseudomonas cepacia*, de *Candida antarctica*, sur la silice mesoporeuse hexagonale par simple adsorption. Le gel de silice est compatible avec tous les matériaux à l'exception des substances fortement alcalines et l'acide fluorhydrique.

2.3 Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et supports. Pour la réalisation de la liaison covalente il faut une activation préalable soit du support soit de l'enzyme car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation des supports d'adsorption qui a fait l'objet de nombreuses études car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme.

Un carbodiimide est un groupe fonctionnel de type $\text{N}=\text{C}=\text{N}$. En chimie organique synthétique, les composés contenant la fonctionnalité de carbodiimide sont des agents de déshydratation et sont souvent employés pour activer les acides carboxyliques vers la formation d'amide ou d'ester et ont l'avantage d'avoir une très faible toxicité pour l'enzyme.

La lipase de *Candida rugosa* a été immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan dont les groupements hydroxyles ont été préalablement activés par le carbodiimide (Shao-Hua *et al.*, 2004). La lipase du pancréas de porc a été immobilisée sur polyacrylamide activé par le carbodiimide et a ainsi été appliquée à l'hydrolyse de l'huile d'olive (Bagi *et al.*, 1997).

Le glutaraldéhyde (dialdéhyde comportant cinq atomes de carbone) est également utilisé pour former des liaisons covalentes. C'est un liquide visqueux et incolore qui se présente

normalement en une solution aqueuse limpide et incolore. Pour l'immobilisation par liaison covalente, le glutaraldéhyde ayant deux sites réactifs, va servir de pont entre les fonctions -NH₂ du support et de l'enzyme. Les films de chitosan activés par le glutaraldéhyde ont été utilisés pour l'immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* et de *Syncephalastrum racemosum* (Amorim *et al.*, 2003). D'autres méthodes chimiques existent et sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résumé des principales méthodes d'activation

Enzymes	Support	Méthodes d'activation
-NH ₂	-COOH	Carbodiimide Azoture Chlorure d'acide
-NH ₂	-OH	Halogénéation Chlorotriazine BrCN ClCN Silanes
-NH ₂	-NH ₂	Glutaraldéhyde
-NH ₂	-Anhydride d'acide	Réaction directe
-COOH	-NH ₂	Carbodiimide Isothiocyanate
-Tyrosine	-Noyau aromatique-NH ₂	Isothiocyanate Thiocyanate Sels de diazonium
-SH	-SH	Ponts disulfures

Certains supports tels que la carboxyméthylcellulose sont obtenus par action de l'acide chloroacétique sur la cellulose. Celle-ci a permis d'immobiliser plusieurs enzymes après activation par le carbodiimide, l'azoture, les triazines etc. Les lipases de *Mucor javanicus* et de *Rhizopus oryzae* ont été immobilisées sur la carboxyméthylcellulose afin d'être appliquées à la synthèse d'ester (Dalla Vecchia *et al.*, 2005). Le tableau 4 présente les différents supports utilisés dans la technique par liaison covalente.

Tableau 4 : Supports utilisés pour l'immobilisation par covalence avec leurs groupes réactifs

Substances organiques		Groupes réactifs
Polyosides	Cellulose	OH
	Carboxyméthylcellulose (CMC)	COOH
	Diéthylaminocellulose (DEAE)	OH
	p.aminobenzylcellulose	-NH ₂
	Dérivés de la cellulose	-NH ₂ , OH, CHO
	Dextrans et agarose	OH
	Amidon dialdéhyde	CHO
Protéines	Anthranilates	OH
	Collagène	COOH
Polymères synthétiques	Polyaminoacides,	NH ₂ , COOH
	Ethylène anhydride maléique	φNH ₂ , COOH
	Polyacrylamides	anhydride
	Copolymères d'acrylamides	NH ₂
	Polyacrylates	Variable
	Copolymères d'acide méthacryliques	COOH
	Polystyrènes et dérivés	φ-X
Substances minérales	Polyamides	NH ₂
	Verre poreux	OH
	Alumino-silicates	OH
Supports mixtes	Oxydes métalliques	OH
	Supports magnétiques	Variable
	Supports organo-minéraux	variable

L'immobilisation des enzymes permet de développer des réacteurs. Les problèmes liés à l'inactivation de l'enzyme libre et à sa séparation du produit d'une réaction, ont amené les chercheurs à s'orienter vers l'idée de ne plus mélanger l'enzyme libre au substrat mais de faire passer le substrat sur l'enzyme, ce qui permet de conduire les réactions enzymatiques de façon continue et avec possibilité de réutilisation des enzymes. Pour cela, l'enzyme libre ou immobilisée peut être emprisonnée (Balcão *et al.*, 1996) à l'aide d'une membrane sur laquelle passe le substrat. Il existe plusieurs types de réacteur à membrane: les réacteurs à membrane porteuse d'activité et les réacteurs à membrane sans activité. Ces réacteurs ont fait l'objet de nombreuses études (Deng *et al.*, 2005 ; Hilal *et al.*, 2006).

3. Applications des lipases immobilisées

3.1 Réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles, des graisses mais également de la matière grasse du lait (Balcão et Malcata, 1998 a) . L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras, ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification. La lipase de *Candida cylindracea* immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan a été utilisée pour l'hydrolyse du suif de bœuf (Sakakibara *et al.*, 1993); la lipase de *Candida rugosa* immobilisée sur du polypropylène microporeux a également été utilisée pour l'hydrolyse du suif de bœuf et pour l'hydrolyse de l'huile de palme, mais immobilisée sur les fibres creuses de cuprophane (Knezevic *et al.*, 2004). Toujours par leur capacité à hydrolyser les graisses, les lipases trouvent des applications importantes dans le domaine des détergents et entrent ainsi dans la composition des lessives industrielles et domestiques. Il est estimé qu'environ 35% de la vente totale de cette enzyme est dévolue à ce secteur. Environ 1000 tonnes de lipases sont ajoutées aux 13 milliards de tonnes de produits détergents manufacturés chaque année (Jaeger et Reetz, 1998; Sharma *et al.*, 2001).

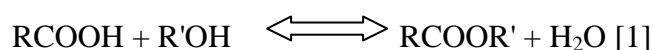
Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipases pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages (Kazlauskas et Bornscheuer, 1998; Kilcawley *et al.*, 1998; Akin *et al.*, 2003). D'un point de vue industriel, une telle application des lipases est limitée aux fromages italiens (Mozzarella, Romano, Provolone) et à quelques autres comme le Cheddar, la Feta, le Bleu, l'Emmental, le Gouda et le Parmesan (Kilcawley *et al.*, 1998). La préparation enzymatique commercialisée sous le nom de *Palatase* par la firme Novo Nordisk

procure un type "Camembert" à partir d'une crème et d'une émulsion de beurre, ceci par libération d'acides gras volatils (Tomasini *et al.*, 1993).

3.2 Réaction de synthèse

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters: la quantité d'eau du milieu détermine le type de la réaction favorisée.

Dans les réactions d'estérification à l'aide de biocatalyseurs, l'eau est un produit de la réaction [1]. A partir d'une certaine teneur, elle affecte l'équilibre de la réaction entraînant la réaction inverse: l'hydrolyse.



Par conséquent, l'eau générée au cours de l'estérification enzymatique doit être éliminée afin de poursuivre la réaction (Chamouleau *et al.*, 2001). L'eau joue également dans la structure du biocatalyseur un rôle que l'on peut qualifier de «lubrifiant» qui confère à l'enzyme la flexibilité nécessaire à la catalyse (Blecker, 1993). Ainsi, une teneur en eau en dessous d'un certain seuil (0,5%) ne permet pas l'hydratation nécessaire de la lipase et entraîne une diminution du rendement de la réaction (Secundo et Carrea, 2002). Le contrôle de l'hydratation de l'enzyme est dès lors un facteur important lors d'une réaction (Chowdary et Prapulla, 2002; Pirozzi et Greco, 2004). Les figures 3 et 4 résument les différentes réactions de la lipase en milieu aqueux ou non: l'hydrolyse (Figure3) ou la synthèse, qui regroupe les réactions de transestérification (alcoolyse) et d'interestérification (acidolyse) (Figure 4).

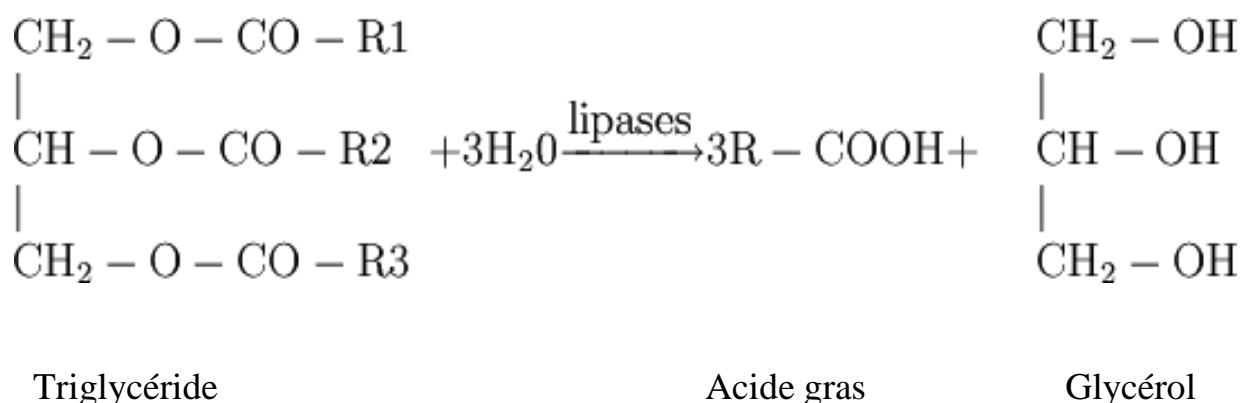


Figure 3 : R\u00e9action d'hydrolyse catalys\u00e9e par la lipase en milieu aqueux

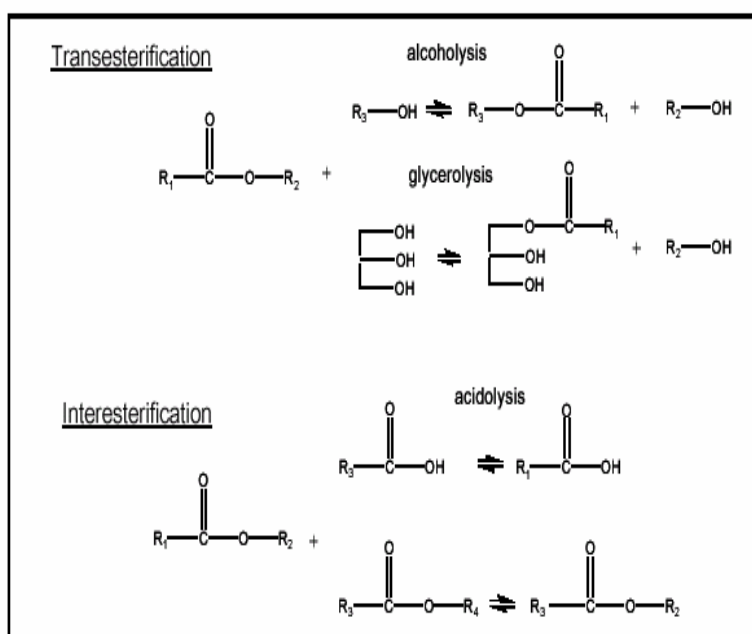


Figure 4 : Diff\u00e9rents types de r\u00e9actions de synth\u00e8se catalys\u00e9es par les lipases, en milieu microaqueux

3.2.1 La transest\u00e9rification

La transest\u00e9rification implique la r\u00e9action d'un groupe acyle avec un alcool (alcoololyse) ou avec le glyc\u00e9rol (glyc\u00e9rolyse). Il existe plusieurs applications industrielles de la transest\u00e9rification par la lipase, telles que la production des \u00e9quivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras polyinsatur\u00e9s, des substituts de mati\u00e8re grasse du lait et des

huiles de basse valeur calorique (Lancelot *et al.*, 2002). L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final.

Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyl laurate) est utilisé en industries cosmétiques. La réaction se déroule entre du vinyl laurate en présence du 1-octanol donnant lieu à un octyl laurate et un aldéhyde est représenté à la figure 5.

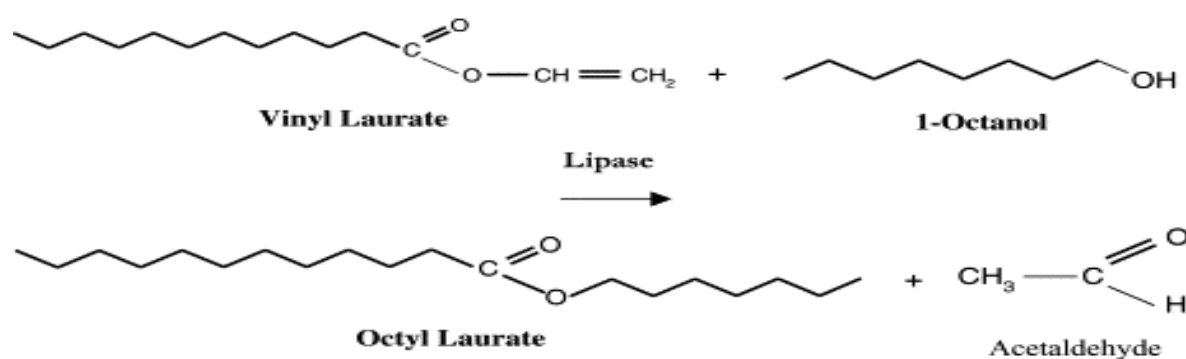


Figure 5 : Transestérification de l'octanol et du vinyl laurate par la lipase de *Burkholderia cepacia* (El Rassy *et al.*, 2004)

Les procédés de transestérification enzymatique permettent également de produire du biodiesel ou biogazole, carburant obtenu à partir d'huile végétale ou animale (Noureddini *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003). Le biodiesel étant une alternative au diesel classique, sa production constitue un champ d'application potentiel des lipases de très grande envergure. Les plus gros producteurs actuels de biodiesel sont les États-Unis, l'Allemagne et la France; en Belgique, le biodiesel est produit par les sociétés Oléon et Biofuel.

3.2.2 L'interestérification

Lors de la réaction d'interestérification un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras (Jaeger *et al.*, 1994). Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'applications à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardio-

vasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérisation). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains.

L'utilisation des solvants en interestérisation nécessite une désolvantation du produit final, en revanche l'interestérisation enzymatique réalisée en absence de solvants organiques, est une très bonne alternative. La Lipozyme IM60 et la Lipozyme TL IM de Novozyme sont des lipases immobilisées commerciales utilisées pour la production de triacylglycerols modifiés, dans des conditions ne demandant pas de solvants. De plus l'utilisation de lipases spécifiques des positions sn1 et sn3 des triglycérides, permet d'obtenir des produits avec des caractéristiques qui ne pourraient être obtenues par interestérisation chimique (Pal *et al.*, 2001).

Dans le but de modifier les compositions de certaines huiles afin de faciliter leur utilisation, l'interestérisation de l'huile de palme et de l'huile de palmiste avec d'autres huiles a fait l'objet de plusieurs études (Ghazali *et al.*, 1995; Liew *et al.*, 2001). La lipase de *Pseudomonas sp* immobilisée sur de la céélite et celle de *Rhizomucor miehei* immobilisée sur une résine échangeuse d'anions (Lipozyme IM60) ont été utilisées pour l'interestérisation de l'huile de palme, l'huile de palmiste ou le mélange des deux (Chen *et al.*, 2005). Le beurre de cacao est une matière première importante dans la fabrication du chocolat et pour les industries relatives de confiserie. Sa consistance et ses qualités, dérivent de la composition en acides gras de ses triglycérides et sont très recherchées par le consommateur. Mais l'offre limitée et la forte demande entraînent la flambée des prix sur le marché. Un substitut de beurre de cacao avec une composition en triacylglycerols semblable au beurre de cacao est préparé à partir des graisses et des huiles bon marché. Wang *et al.*, (2006) ont utilisé une

lipase immobilisée par adsorption sur une résine macroporeuse, pour la synthèse d'un substitut de beurre de cacao par l'interestérification d'huile de graines de thé, le stéarate de méthyle et le palmitate de méthyle.

Le biodiesel peut également être produit par interestérification entre un triglycéride et l'acétate de méthyle, catalysée par la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435) (Figure 6) (Xu *et al.*, 2005).

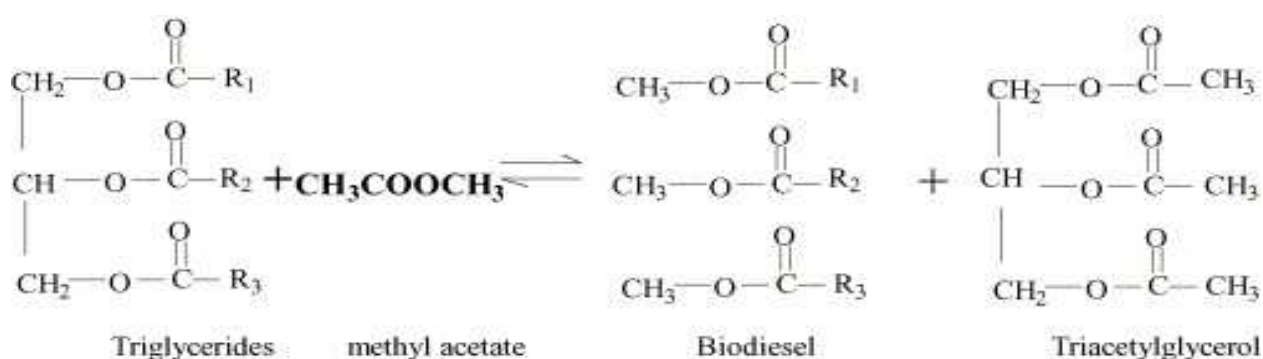


Figure 6 : Schéma de l'interestérification de triglycérides et de méthyle acétate pour la production de biodiesel

3.2.3. La synthèse d'esters

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes pour ces utilisations industrielles, puisqu'elles peuvent être facilement manipulées. Une large gamme d'esters d'acide gras est maintenant produite commercialement en utilisant une lipase immobilisée, en présence de solvants non aqueux. Par exemple, des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne (12-20 atomes de carbone) et d'alcools à courte chaîne, afin de servir dans la confection de produits alimentaires ou cosmétiques, tandis que ceux issus d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à longue chaîne sont utilisés dans la fabrication de plastifiants et de lubrifiants (Gandhi *et al.*, 1995). Ainsi la lipase de *Candida*

rugosa immobilisée sur du nylon a permis la synthèse butyrate de butyle à partir d'acide butanoïque et de n-butanol en présence de hexane.

En dépit de ce potentiel d'applications, le nombre de processus industriels impliquant l'estérification à l'aide de lipases est limité. Un exemple type reste l'utilisation des lipases de *Burkholderia plantarii* et de *Serratia marcescens* pour la production de (2R, 3S)-3-(4-méthoxyphényle) méthyle glycidate employée dans la synthèse d'antagonistes de calcium: Diltiazem[™] (Shibatani, brevet N° EP 362556 1990; Jaeger et Reetz, 1998). La firme Glaxo Welcome (actuellement GSK) a développé, au début des années 90, un agent anti-leucémique par acylation de la purine à l'aide de la lipase immobilisée de *Candida antarctica* (Novozyme SP 435, Novo Nordisk, Danemark). Ce procédé a rendu le produit plus soluble et donc plus bio-disponible (Rasor et Voss, 2001). Un exemple d'interestérification enzymatique de matières grasses est donné dans le paragraphe suivant.

4. Interestérification enzymatique de matières grasses: exemple d'une stratégie globale pour une meilleure maîtrise du procédé

4.1 L'interestérification de matières grasses alimentaires

Les caractéristiques physico-chimiques des matières grasses, simples ou en mélanges, peuvent être modifiées par l'action de lipases. Il en résulte une restructuration des espèces triglycéridiques, qui peut aboutir à un produit aux propriétés exclusives de cette technique dans le cas de l'utilisation d'une lipase spécifique de certaines positions du triglycéride. Le but de telles opérations est d'obtenir par des techniques « douces » de nouvelles matières grasses, pouvant répondre aux critères rhéologiques et nutritionnels demandés par le consommateur. Dans cette optique, de nombreuses réactions ont été décrites, concernant notamment la modification de la matière grasse laitière (MGL) (Balcão et Malcata, 1998). On peut citer les exemples d'interestérification enzymatique de la MGL avec de l'huile de soja

(Pal *et al.*, 2001), de l'huile de palmiste (Liew *et al.*, 2001), de l'huile de colza (Rønne *et al.*, 2005) ou plus récemment, de l'huile de lin (Aguedo *et al.*, 2007). Dans ces différentes réactions, l'introduction de résidus d'acides gras insaturés à longue chaîne d'origine végétale au sein de la MGL aboutit à une matière grasse avec une température de fusion abaissée et un degré d'insaturation accru, ce qui est intéressant des points de vue rhéologique et nutritionnel. L'utilisation d'une lipase immobilisée commerciale telle que la Lipozyme TL IM (Novo Nordisk) permet de réaliser ces interestérifications en conditions micro-aqueuses, sans solvants, constituant ainsi une technologie propre (Yang *et al.*, 2003). Cette enzyme est immobilisée sur des granules de silice ce qui facilite sa récupération et réutilisation. La température de réaction est de 60°C à 80°C, la teneur du milieu en enzyme est généralement de 10% et le degré d'interestérification du mélange réactionnel atteint un état de quasi-équilibre après 4-6h en mode batch (Aguedo *et al.*, 2007 ; Osório *et al.*, 2006). Il a été déterminé que cette enzyme conserve 90% de son activité d'interestérification après 15 réutilisations successives en batch (Criado *et al.*, 2007) et qu'elle présente une activité résiduelle de 25-30% après 200 h d'utilisation en continu (Osório *et al.*, 2006). La faible quantité d'eau naturellement présente dans le milieu, est « consommée » dans des réactions d'hydrolyse qui sont à l'origine de la présence d'environ 1% d'acides gras libres dans le milieu (Rønne *et al.*, 2005), qu'il est nécessaire d'éliminer ultérieurement afin de garantir la qualité de la matière grasse obtenue (Rønne *et al.*, 2006).

4.2 Stratégies pour une meilleure maîtrise de l'interestérification

La maîtrise de telles réactions passe par une compréhension approfondie des mécanismes réactionnels de la lipase en interestérification, qui demeurent moins bien compris (car moins étudiés) que les mécanismes hydrolytiques de ces mêmes enzymes. L'activité catalytique de la lipase est liée à l'activité de l'eau (a_w) du milieu. Il a été montré que des préparations

commerciales de lipases de *Candida antarctica* (Novozym 435[®]) (Barahona *et al.*, 2006) et de latex de *Carica papaya* (Caro *et al.*, 2002) ont toutes deux une activité optimale en estérification pour une a_w de 0,2. Elle diminue ensuite rapidement pour des a_w supérieures, l'activité hydrolytique devenant alors dominante.

Lors des réactions d'estérification en milieu micro-aqueux, la faible quantité d'eau présente dans le milieu doit toutefois être suffisante pour assurer une hydratation minimale de l'enzyme permettant le maintien de sa structure tridimensionnelle et le fonctionnement du site catalytique (Bridelli *et al.*, 2002). L'optimisation et le contrôle de l' a_w de l'enzyme et du milieu réactionnel sont donc des points fondamentaux de la maîtrise de l'interestérification.

L'accès des triglycérides au site catalytique est contrôlé par un volet ou « lid » de nature amphiphile, structure commune à toutes les lipases. Les modifications de conformation possiblement induites par le milieu réactionnel hydrophobe, notamment au niveau du « lid », demeurent inconnues. Les techniques de bioinformatique, permettant d'obtenir des modélisations tridimensionnelles à partir de la séquence en acides aminés d'une protéine, devraient permettre d'apporter des informations concernant la structure spatiale de la lipase dans un environnement hydrophobe et l'interaction avec les molécules du substrat. (Fuentes *et al.*, 2004). Il semble également intéressant d'appliquer ces techniques afin d'obtenir des précisions sur les interactions entre les protéines et le support sur lequel elles sont immobilisées. A terme, la bioinformatique devrait également permettre de proposer des mutations de séquences de l'enzyme dans le but d'obtenir des lipases présentant des performances accrues.

4.3 Recherche de lipases mieux adaptées aux réactions d'estérification

Si les lipases commercialisées ont été optimisées pour une utilisation dans les réactions d'hydrolyse, elles ne l'ont pas forcément été pour les réactions de synthèse. Il n'est pas exclu

que certaines enzymes s'avèrent plus efficaces en interestérisation qu'elles ne le sont en hydrolyse. Il semble donc intéressant de tester pour leur capacité à interestériser certaines des lipases existantes, mais également de tenter d'isoler de nouvelles espèces qui s'avèreraient efficaces dans ce type de réaction. A cette fin, la métagénomique constitue un outil intéressant qui permet selon une approche moléculaire, d'isoler des enzymes nouvelles issues de l'énorme diversité des génomes présents dans l'environnement (Schloss et Handelsman, 2003) ; un simple échantillon de sol peut ainsi donner naissance à des enzymes trouvant des applications biotechnologiques (Elend *et al.*, 2006).

Un test rapide d'interestérisation devra permettre la réalisation d'un criblage, les enzymes les plus performantes pourront ainsi être sélectionnées. Suite à cette étape, il restera à produire et à immobiliser les enzymes sur un support. Le support lui-même pourra être choisi pour une meilleure adaptation aux conditions particulières de la réaction d'interestérisation, afin d'optimiser le contact entre le milieu hydrophobe et l'enzyme, par exemple.

5. Conclusions

Les lipases, de par leur capacité à hydrolyser et à estérifier, trouvent des applications dans différents secteurs industriels. Toutefois l'utilisation de ces enzymes continue à présenter de nombreuses potentialités à exploiter. L'immobilisation est une des stratégies qui permet d'élargir le champ d'utilisation de ces enzymes. La biocatalyse à l'aide de lipases constitue une alternative aux procédés purement chimiques et permet de réduire l'utilisation de solvants. Une illustration de ceci est donnée, avec l'exemple de l'interestérisation enzymatique de matières grasses. Une meilleure maîtrise de l'utilisation de lipases immobilisées dans ce type de réaction reste à atteindre. Différentes stratégies devraient permettre d'aboutir : il s'agit d'un travail conséquent d'optimisation en amont de la réaction

d'interestérification, toutefois indispensable pour l'obtention d'outils moléculaires adaptés spécifiquement pour des conditions réactionnelles particulières.

Remerciements

Mireille Alloue Wazé et les autres auteurs remercient le gouvernement de Côte d'Ivoire pour son soutien financier.

6. Références bibliographiques

Aguedo M., Hanon E., Danthine S., Paquot M., Lognay G., Thomas A., Vandebol M., Thonart P., Wathelet J.-P., Blecker C. (2007). Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oil through enzymatic interesterification. *Submitted for revision in J. Agric. Food Chem.*

Akin N., Aydemir S., Koçak C., Ildiz M.A. (2003). Changes of free fatty acid contents and sensory properties of White Pickled cheese during ripening. *Food Chem.* **80**, p.77-83.

Alloue WAM. (2003) Concentration, séchage de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et caractérisation de ses propriétés après formulation. DEA .Gembloux: FUSAGx, 67 p.

Alloue WAM., Destain J., Ongena M., Blecker C., Thonart P. (2007a). Effect of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stabilization. *Accepted for publication in Prep. Biochem. Biotechnol.*

Alloue WAM., Destain J., Amighi K., Thonart P. (2007 b). Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in presence of additives. *Process Biochem.* **42**, p.1357-1361.

Amorim RVS., Melo ES., Carneiro-da-Cunha MG., Ledingham WM., Campos-Takaki GM. (2003). Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresour. Technol.* **89** (1), p.35-39.

Bagi K., Simon LM., Szajani B. (1997). Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, p.531-535.

Balcão VM., Malcata, FX. (1998 a). Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor Javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues *Enzyme Microb. Technol.* **22**, p.511-519.

Balcão VM., Malcata FX. (1998 b). Lipase catalysed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.* **16**, p.309-341.

Balcão VM., Paiva AL., Malcata FX.(1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, p. 392-416.

Barahona D., Pfromm PH. Rezac ME. (2006). Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid [bmim]PF₆. *Biotechnol Bioeng.* **93**, p. 318-324.

Betigeri S., Neau SH. (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterial*. **23**, p.3627-3636.

Blecker C. (1993). La catalyse enzymatique en milieu organique: potentialités d'utilisation des lipases. *Bull. Rech Agron. Gembloux* **28**, p.51-85.

Bridelli MG., Capelletti R., Maraia F., Mora C., Pirola L. (2002). Initial hydration steps in lipase studied by means of water sorption isotherms, FTIR spectroscopy and thermally stimulated depolarization currents. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35**, p.1039–1048.

Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D.V., Attwool P., Graille J. (2002). Plant lipases: biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, p.693-703.

Carpenter JF., Crowe JH. Arakawa T. (1990). Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.* **73**, p.3627–3636.

Chamouleau F., Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (2001). Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11**, p.949-954.

Chen CW., Chong CL., Ghazali HM., Lai OM. (2005). Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. *Food Chem.* **100** (1), p.178-191.

Chowdary GV., Prapulla SG. (2002). The influence of water activity on the lipase catalysed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.* **38**, p.393-397.

Criado M., Hernández-Martín E., Otero C. (2007). Optimized interesterification of virgin olive oil with a fully hydrogenated fat in a batch reactor: effect of mass transfer limitations *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, p.474–485.

Deng H., Xu Z., Liu Z., Wu J., Ye P. (2005). Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, p. 437-443.

Dalla-Vecchia R., Sebrão D., Nascimento M .da G., Soldi V. (2005). Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. *Process Biochem.* **40**, p. 2677–2682.

Destain J. (1998). Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse doct. sci. agron., Fac.univ. Sci. agron., Gembloux, Belgique, 211p.

Destain J, Roblain D, Thonart P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 1997; 19: 105–7.

Ducret A., Giroux A., Trani M. Lortie R. (1995). Enzymatic preparation of biosurfactants from sugar or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol Bioeng.* **48**, p.214-221.

Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.-L., Jaeger KE., Streit WR. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, p.3637–3645.

El Rassy H., Perrard A., Pierre AC. (2004). Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: bi-bi ping-pong kinetics. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **30**, p.137-150.

Ertesvag H., Valla S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, p.85–91.

Ferrer M., Soliveri J., Plou F., Lopez-Cortés N., Reyes-Duarte D., Christensen M., Copapatino, J., Ballesteros, A. (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica B*, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, p.391-398.

Fickers P., Ongena M., Destain J., Weekers F., Thonart P. (2006). Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb Technol.* **38**, 756–59.

Fuentes G., Ballesteros A., Verma CS. (2004). Specificity in lipases: a computational study of transesterification of sucrose. *Protein Sci.* **13**, p.3092-3103.

Ganapati DY., Sachin RJ. (2005). Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. *Microporous Mesoporous Mater.* **86**, p.215-222.

Gandhi NN., Sawant SB., Jyeshtharaj JB., Mukesh D. (1995). Lipozyme deactivation by butanol and temperature. *Enzyme Microb. Technol.* **17** (4), p.373-380.

Gao X., Cao S., Zhang K. (2000). Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb. Technol.* **27**(1-2), p.74-82.

Ghazali HM., Hamidah S., Che M. (1995). Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1, 3-specific lipases. *JAACS.* **72**, p. 633–639.

Hilal N., Kochkodan V., Nigmatullin R., Goncharuk V., Al-Khatib L. (2006). Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation. *J. Membr. Sci.* **268** (2), p.198-207.

Ivanov AE., Schneider MP. (1997). Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **3**, p.303-309.

Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O. (1994). Bacterial lipases. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiol. Reviews*, **15**, 29-63.

Jaeger K.E. and Reetz M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. , **16**, 396-403.

Kaewthong W., Sarote S., Poonsuk P., Aran H. (2005). Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem.* **40**, p.1525-1530.

Kazlauskas R.J. and Bornscheuer U.T. (1998). Biotechnology: biotransformations with lipases. *Rehm H.J., Reed G., Pühler A., Stadler P.J., Kelly D.R. Edition*, **8**, 37-191.

Kilcawley KN., Wilkinson M., Fox PF. (1998). Enzyme-modified cheese. *Int. Dairy J.* **8**, p.1-10.

Khare SK., Nakajima M. (2000). Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chem.* **68**, p.153-157.

Knezevic Z., Kukic G., Vukovic M., Bugarski B., Obradovic B. (2004). Operating regime of a biphasic oil/aqueous hollow-fibre reactor with immobilized lipase for oil hydrolysis. *Process Biochem.* **39**(11), p.1377-1385.

Kristjansson MM., Kinsella, J.E. (1991). Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. Food Nutr. Res.* **35**, p.237–258.

Lancelot WK., Luke M., John SR., Ignatious N. (2002). Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. *Indus. Crops Prod.* **16**, p.237-244.

Lima VMG., Krieger N., Mitchell DA., Fontana JD. (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng.* **18**(1), p.65-71.

Liew MYB., Ghazali HM., Long K., Lai OM., Yazid AM. (2001). Physical properties of palm kernel olein-anhydrous milk fat mixtures transesterified using mycelium-bound lipase from *Rhizomucor miehei*. *Food Chem.* **72**, p. 447-454.

Mats M., Karl H. (1994). Kinetics of triglyceride lipase. In: Wooley P. and Petersen S.B. (Eds), *Lipases*. Cambridge University Press, Great Britain, p.159-180.

Osório NM., Fonseca MMR., Ferreira-Dias S. (2006). Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, p.545–553.

Pal PK., Bhattacharyya DK., Ghosh S. (2001). Modifications of butter stearin by blending and interesterification for better utilization in edible fat products. *JAOCS.* **78**, p.31-36.

Noureddini H., Gao X., Philkana RS. (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.* **96** (7), p.769-777.

Pirozzi D., Greco G. (2004). Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme Microb. Technol.* **34**, p.94-100.

Rønne TH.; Pedersen LS.; Xu X. (2005) Triglyceride selectivity of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *JAACS.* **82**, p.737-743.

Rønne TH., Yang T., Mu H., Jacobsen C., Xu X. (2006). Deodorization of lipase-interesterified butterfat and rapeseed oil blends in a pilot deodorizer. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, p.182-192.

Tarahomjoo S., Alemzadeh I. (2003). Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme Microb. Technol.* **33**,p.33-37.

Tomasini A., Bustillo G., Lebeault J. (1993). Fat lipolysed with commercial lipase for the production of Blue cheese flavor. *Int. Dairy Products* **3**, p.117-127.

Rasor JP. and Voss E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catal. A*, **221**, p.145-158.

Sakakibara M., Okada F., Takahashi K., Tokiwa T. (1993). Hydrolysis of beef tallow by immobilized lipase in a biphasic organic-aqueous system. *Nippon Kagakukaishi (Japon)* p.1292–1294.

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, p.627-662

Saxena RK., Davidson WS., Sheoran A., Giri B. (2003). Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem.* **39**, p.239-247.

Schloss PD., Handelsman J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, p.303–310.

Secundo F., Carrea G. (2002). Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **19-20**, p.93-102.

Shao-Hua C., Wen-Teng W. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterial.* **25** (2), p.197-204.

Shu CH., Xu, CJ., Lin GC. (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* **41**, p.734-738.

Sonnet PE., Fogia TA., Fearheller SH. (1993). Fatty acid selection of lipases: erucic acid from rapeseed oil. *JAACS.* **70**, p.387-391.

Stocklein W., Sztajer V., Menge V., Schmidt R.D. (1993). Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochem. Biophys. Acta* **1168**, p.181-189.

Wang H., Hou W., Chi-Tang H., Weng X. (2006). Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chem.* **97** (4), p.661-665

Ward O.P., Fang J., Li Z. (1997). Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, p.52-56.

Won K., Kim S., Kim K., Hong W.P., Moon S. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* **40**, p.2149-215

Xu Y., Du W., Liu D. (2005). Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **32** (5-6), p.241-245.

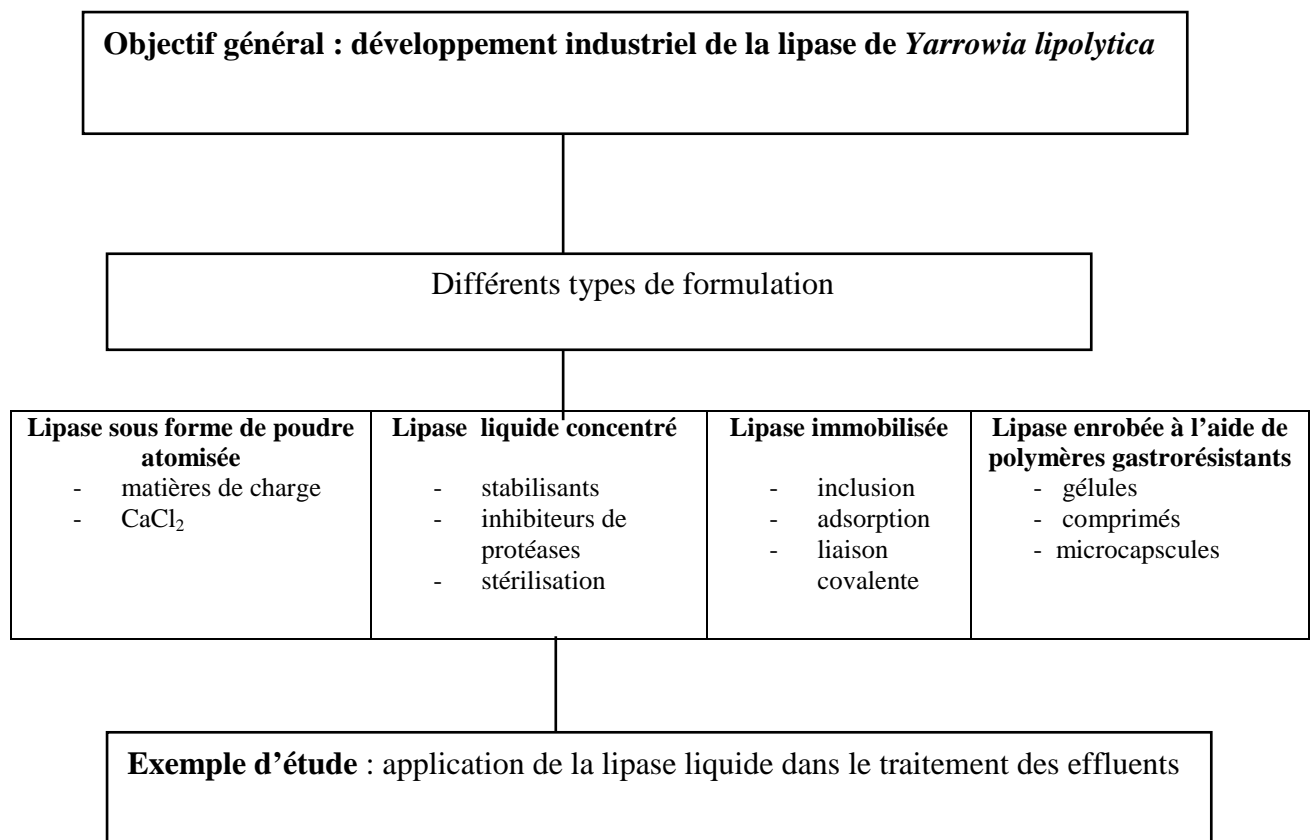
Xu Y., Du W., Liu D., Zeng J. (2003). A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnol. Lett.* **25** (15), p.1239-41.

Yang T., Fruekilde M.-B., Xu X. (2003). Applications of immobilized *Thermomyces lanuginose* lipase in interesterification. *JAACS.* **80**, p.881-887.

Objectif du travail

Objectif du travail

Comme nous l'avons énoncé dans l'introduction, notre travail s'inscrit dans le cadre général du développement industriel de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et concerne plus particulièrement le traitement post-culture de l'enzyme afin de mettre au point des formulations adaptées à différentes applications dans les secteurs agroalimentaire, environnemental et pharmaceutique. Ce travail présente quatre objectifs spécifiques et un exemple d'application. Les objectifs de ce travail sont présentés à travers le schéma suivant :



Parmi les matières de charges utilisées pour l'atomisation en agroalimentaire, la poudre de lait écrémé constitue un composant de choix. Cependant, il présente des limites car il engendre des problèmes de digestion chez les individus déficients en β -galactosidase notamment chez les populations africaines. Des alternatives sont proposées dans le premier objectif spécifique (chapitre 2) : celui-ci présente les résultats de nos travaux sur les formulations solides exemptes de poudre de lait écrémé ainsi que la caractérisation des différentes poudres obtenues.

Le deuxième objectif (chapitre 3) concerne la formulation liquide de la lipase et l'étude des paramètres importants pour assurer une bonne conservation de la préparation.

En plus de sa fonction d'hydrolyse, la lipase peut catalyser des réactions de synthèse en milieu non aqueux. Mais la dénaturation de l'enzyme en présence des solvants organiques et sa réutilisation nécessitent son immobilisation sur une matrice ou dans un polymère. C'est dans cette optique que les recherches visées dans le troisième objectif (chapitre 4) ont été menées.

La lipase de *Y.lipolytica* est plus stable en milieu acide que basique. Cependant, elle n'est suffisamment résistante à bas pH que pour être utilisée comme enzyme digestive sans protection. Le quatrième objectif (chapitre 5) s'est donc consacré à cette application. L'enrobage des formes galéniques de lipase (comprimés, microcapsules et gélules) à l'aide d'Eudragit L30D-55 (polymères gastrorésistants) a été réalisé. Les tests de résistance à pH (1) (acide (HCL 0.1N)) et de délitage à pH 6.8 (tampon phosphate) de ses produits en comparaison avec l'enzyme digestive pharmaceutique (Créon) ont été réalisés in vitro.

Enfin un domaine d'application des lipases a été investigué : le secteur environnemental. Confrontés aux problèmes de dégradation de leurs effluents, les industries oléicoles ont

recours à différentes techniques qui s'avèrent coûteuses et peu efficaces. Le chapitre 6 propose un exemple de traitement d'effluents à base de *Y. lipolytica* et de sa lipase.

Chapitre 2:

Formulation solide de la lipase de *Yarrowia lipolytica*

Publication II:

***Storage of Yarrowia lipolytica lipase after spray drying
in presence of additives***

Wazé Aimée Mireille Alloue, Jacqueline Destain, Karim Amighi,
Philippe Thonart

Publication parue dans Process Biochemistry (42 (2007) 1357-1361)

Résumé

Titre : Conservation de la lipase de *Yarrowia lipolytica* après séchage par atomisation en présence des additifs.

Résumé : La lipase de *Yarrowia lipolytica* est une enzyme qui présente de nombreuses potentialités pour des applications biotechnologiques. Ce travail décrit la mise au point des poudres obtenues après atomisation de surnageants de la lipase de *Yarrowia lipolytica* LGx6481. Deux formulations ont été étudiées : une formulation avec la poudre de lait écrémé et la gomme arabique, et l'autre avec de la maltodextrine, le chlorure de calcium (10, 20, 30 g/l) et la gomme arabique. Après le séchage, les poudres ont été stockées à 4°C et à 20°C dans des sacs aluminium hermétiques en vue d'évaluer leur stabilité durant un an. L'influence de l'activité de l'eau et la température de transition vitreuse (Tg) sur le stockage des poudres ont été également étudiées.

Deposited on BICTEL with the pleasant authorization of Elsevier. The original article can be consulted with the address:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/422857/description#description).

Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in presence of additives

Waze Aimée Mireille Alloue^{a,*}, Jacqueline Destain^a, Karim Amighi^b, Philippe Thonart^a

a : Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) Unité de Bio-industries Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

b : Laboratoire de Pharmacie galénique et de Biopharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la plaine, Boulevard du triomphe CP207, 1050 Bruxelles, Belgique.

Corresponding author: Tel: +32/ 8162273, Fax: +32/81614222

E-mail address: allouewaze.a @fsagx.ac.be

Abstract

Lipase from *Yarrowia lipolytica* is an enzyme that presents numerous potentialities for biotechnological applications. This work describes the development of powders obtained by atomization of supernatants lipase from *Yarrowia lipolytica* LGx6481. Two formulations were studied: one formulation with skim milk powder and gum arabic, and the other with maltodextrin, calcium chloride and gum arabic. After drying, powders were stored at 4°C and 20°C in aluminium hermetic bags to evaluate their stability over a period of one year. The influence of water activity and glass transition temperature (T_g) on the powder's storage were also studied.

Keywords: *Yarrowia lipolytica* lipase, formulation, spray drying, storage

1 Introduction

Lipases (E.C.3.1.1.3) constitute a group of enzymes having the ability to hydrolyse triglycerides at lipid water interfaces [1]. This reaction is reversible, so that these enzymes also catalyse the formation of acylglycerols from glycerol and free fatty acids. Over the last few years, there has been an increasing interest in the development of new applications for lipases in products and processes, particularly in the food, medical, and chemical industries. Extracellular microbial lipases can be produced relatively easily by fermentation and are available in large quantities for industrial use [2]. Spray-drying has been used for the dehydration of many enzymes, such as proteases or cellulases, and offers cost advantages compared to freeze-drying. However, dehydration by spray-drying causes a stress to proteins and their unfolding by thermal denaturation, leading to the loss of enzymatic activity. This unfolding is usually minimized by using additives, such as polysaccharide, some proteins and salts [3]. Spray-drying is a simple, fast, and economic technique to obtain a powder from a solution or a liquid suspension (e.g., an enzyme suspension). Powders which have dry matter content higher than 90% are easier to handle and preserve than liquid preparations. Unlike freeze-drying, spray-drying is generally considered as an attractive method for the preparation of large quantities owing to the low cost and complexity of the process [4]. Additives such as lactose contents in skim milk showed enzyme stabilizing abilities in several studies, mainly due to a readily attainable amorphous form [5,6,7] which reportedly enhances the preservation of activity of several enzymes upon spray-drying due to the increased initial skim milk total solids content. Maltodextrins are low converted starch products, with a DE-value range from 2 to 20. They are intermediate between starch and corn syrups; unlike starch, they are soluble in cold water, but unlike syrups, they are non-sweet. Consequently they have found wide application in the food industry as bodying agents, coatings, and carriers for flavours, fragrances and oils in cosmetics [8]. However, the use of the DE value has been shown to be

inadequate to predict product performance in various applications [9]. Gum arabic is the most often used as a flavour-encapsulating material. Its solubility, low viscosity, emulsification characteristics and good retention of volatile compounds make it very versatile for most encapsulation methods. In addition, its wall material is ideally suited for the encapsulation of lipid droplets as it fulfils the role of both surface-active agent and drying matrix, and thus preventing the loss of volatiles compounds in contact with the atmosphere. However, its application within the food industry is limited because gum arabic is more expensive than maltodextrin [10,11] and its availability and cost are subject to fluctuations, hence there is a need to evaluate alternatives. Mixtures of gum arabic and maltodextrin have shown to be promise as high solid carriers, giving acceptable viscosity in studies of microencapsulation of oil by spray-drying [12]. Lipase from *Yarrowia lipolytica* presents many potential applications for the food industry, pharmacology, and for the environment. The enzyme is efficient for the hydrolysis of natural oils and fats, and keeps active while at low temperatures (4°C) and low pH (3- 4) [13]. Indeed, the activator effect of calcium ion (Ca^{2+}) on lipase was proven in this study. The lipase production process in a large bioreactor, as previously described by [14], used a mutant of *Yarrowia lipolytica* obtained by mutagenesis with an N'methyl N'nitro N nitrosoguanidine from wild strain CBS 6303 [15]. The mutant strain called LGx6481 produces 50 folds more activity than the wild strain. The preceding downstream process investigated included centrifugation to eliminate biomass, an ultrafiltration to concentrate the supernatant, and a spray-drying in the presence of milk powder and gum arabic. This study [14] indicated that after adding 12% (w/v) of milk powder alone, lipase recovery was highest, while adding 12% of milk powder and 3% (w/v) of gum arabic produced a fluent powder more compatible with commercial product standards. This paper also presents others formulations without lactose designed for people with lactase deficiencies and a characterization of different lipase powders related to their composition and

their storage time (enzyme activities, dry matter, water activities, and glass transition temperature).

2 Materials and methods

2.1 Lipase solution

Lipase was produced in 500 l and 2000 l bioreactors (LSL Biolafitte, Poissy, France) in the same conditions as described previously [14]. Culture fluids were centrifuged on a BTPX205 continuous centrifuge (Alfa Laval, Sweden) at 12000 g, at a flow rate of 500 lh⁻¹. The supernatant was then clarified through a plate filter with 50 plates (SAPQ7, Filtreclair, France) of 2 µm porosity before being concentrated on a Niro UF/MF ultrafiltration apparatus equipped with 10 m² polysulfone membranes (cut off of 10 KDa, Kolding Denmark). The concentrated supernatant was supplemented with loading materials for spray-drying.

2.2 Spray-drying of enzyme solution

Samples of concentrated supernatant produced in a 2000 l bioreactor (16000 Uml⁻¹) in a ratio of concentration (950 l: 36 l) were supplemented with skim milk powder 120 gl⁻¹, and gum arabic 60 gl⁻¹ (Roquette, France). They were spray-dried in a pilot spray dryer Niro Mobile Minor (Niro, Denmark) with inlet and outlet temperatures of 160 and 85°C respectively, at a flow rate of 12 lh⁻¹. Samples of non-concentrated culture supernatant produced in the 500 l bioreactor (3600 Uml⁻¹) were supplemented with maltodextrin (DE 12) 120 gl⁻¹ (Roquette, France), gum arabic 60 gl⁻¹ and 0, 10, 20, or 30 gl⁻¹ of calcium chloride (VWR Prolabo, Belgium). They were spray dried in the same spray dryer with inlet and outlet temperatures of 160 and 85°C respectively, at a flow rate of 14 lh⁻¹.

2.3 Storage of dried powders

Effects of temperature

After separation from the cyclone and collection, dried powders were transferred into aluminium foil-lined plastic bags (Seal Pack Euro Bag, Belgium), sealed under vacuum to prevent rehydration [16], and stored at either 4°C or 20°C.

Effects of water activity

Samples of powders not sealed in aluminium bags were stored in different desiccators and measured at intervals time for water activity. Equilibrium RH (or a_w) that the powders achieved when exposed to the saturated salts solutions (VWR Prolabo, Belgium) was obtained. The salt solutions were as follows (a_w): lithium chloride (0.11), potassium acetate (0.23), magnesium chloride (0.33), potassium carbonate (0.43) sodium chloride (0.75), and potassium chloride (0.85). After three weeks equilibration, the enzymatic activity of powders was determined by titrimetric method.

2.4 Analytical procedure

Lipase activities were measured by the titrimetric method previously described by [13,14]. One unit of lipase is the amount of enzyme able to catalyse the release of 1 μmol of fatty acid per min at pH 7 and 37°C. Dry matter of liquid and solid were measured after desiccation at 105°C over a period of 48 h until a stable weight was obtained. Water activity (a_w) of the powders was determined after storage. A sample of powder was placed in a plastic cup and loaded into an osmometer (Aqualab CX3, Decagon Devices, USA), and a reading was taken after equilibration.

Glass transition temperatures (T_g) were determined for the powders produced with skim milk and calcium chloride using a Perkin Elmer DSC-7 differential scanning calorimeter / TAC-7 thermal analysis controller with a intracooler-2 cooling system (Perkin Elmer Instruments, USA). Perforated aluminum sealed 50 μl pans containing 2-5 mg powder samples were

heated at a scanning rate of $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, between 10 to 120°C , using nitrogen as blanket gas. Empty sealed pans were used as reference cells (no thermal transition). Calibration was performed using cyclohexane and indium as standards. The glass transition temperature was determined using Pyris software ver. 3.81 (Perkin Elmer Instruments, USA) by considering the mid point temperature (T_{mid}) at the inflection point of the endothermic transition peak (average of three measurements).

3. Results and discussion

3.1 Effects of additives on lipase activity during spray-drying

The formulation carried out with skim milk powder was the first formulation most often used during the lipase downstream processing on pilot scale. In this study, non concentrated culture supernatant formulated with maltodextrin gum arabic and CaCl_2 was compared to concentrated supernatant formulated with skim milk and gum arabic. This research was directed towards the combined effect of the two additives: milk powder 12% (w/v) and gum arabic 6% (w/v) in the first formulation. After addition of milk powder and gum arabic, the lipase concentrate formulated with an activity of 24000Uml^{-1} produces a powder with an activity of 55800Ug^{-1} , which represents a yield of 64% from dehydration.

Table 1: Effect of additives on lipase activity and spray drying yield.

Concentration of additives (%)				Relative activity (%) before spray drying	Spray drying Yield (%)
Milk powder	maltodextrin	gum arabic	CaCl_2		
0	0	0	0	100	100
12	0	6	0	146 ± 8	64
	12	6	0	95 ± 9	95
	12	6	1	103 ± 6	143
	12	6	2	98 ± 3	100
	12	6	3	93 ± 6	100

Table 1 show that the additives had a positive effect on the enzyme and led to an increase in lipase activity by 1.46 fold. The activation of lipase could be due to different compounds

present in the additives such as calcium, lactose and proteins. The activator effects of Ca^{2+} on the lipase from *Y. lipolytica* in this report are in accordance with previous reports on the lipase from *Candida paralipolytica* [17, 18]. It has been suggested that the role of calcium ions is to reduce the electrical charge of the fatty droplets and remove fatty acids formed during the hydrolysis of triglycerides as insoluble calcium soaps. Crystallographic data shows that many lipases have a Ca^{2+} binding motif around the catalytic site [19] and that the presence of calcium increases the thermo-stability or the catalytic activity of some bacterial lipases [20, 21]. This positive effect has also been observed with the extracellular lipase from *Y. lipolytica*. Proteins have the ability to bond hydrogen to the lipase and facilitate the interaction with hydrophobic substrates at the lipid-water interface [22]. Gum arabic, a well-known coating agent, might make the enzyme more rigid; lactose, more hydrophilic than gum arabic, might reduce the hydrophobia of the enzyme and increase water mobility in the product [23]. According to this report, gum arabic would form a protective coating to preserve the surface of the product from a possible oxidation. Our results are in accordance with those showed by others authors [14]. According to those authors, milk powder and gum arabic were found more suitable for the formulation of the *Y. lipolytica* lipase. In addition to its low cost, milk powder presents the advantage to be a source of both casein and calcium ions.

Without additives, it is impossible to obtain a fluent powder by spray-drying. In fact, the dry matter from the supernatant is too low and residues of the nutrient medium (corn steep liquor, yeast extract) generate a sticky powder. Using maltodextrin, gum arabic, and CaCl_2 (or without CaCl_2), the atomisation did not generate a loss of enzymatic activity. After formulation, the lipase with an activity of approximately 3600 Uml^{-1} gave a powder of 27000 Ug^{-1} , which represents a yield of 100% from dehydration. The presence of calcium in the formulation increased lipase activity. Likewise, maltodextrin (DE 12) gave the best protection of lipase during dehydration treatment as evidenced in Table 1. The recovery of enzymatic

activity after dehydration and its conservation during time were higher than those observed for other hydrolase with maltodextrin, polyethyleneglycol (PEG6000) as additives [24].

3.2 Effects of temperature on powder stability during storage

All the powders obtained by spray-drying were stable during storage. Powders produced from enzyme formulated by milk powder and gum arabic were stored for 18 months at 4°C or 20°C without loss of activity. For these powders, the dry matter was also measured during storage and didn't show important variations. It seems that these additives are better suited to avoid humidity renewal (Table 2).

Table 2: Dry matters of lipase powders with milk powder stored at 20°C and 4°C

Storage time (weeks)	Dry matters (%)	
	20°C	4°C
0	95.88± 0.12	95.88± 0.12
8	95.65± 0.05	95.65± 0.05
12	94.15± 0.05	94.30± 0.10
16	94.45± 0.01	94.60± 0.10
24	93.27± 0.02	93.74 ± 0.02
80	90.55± 0.15	90.55± 0.15

Powders produced from an enzyme solution supplemented with maltodextrin, gum arabic and, both with and without calcium chloride, were also stored for 12 months at 4°C or 20°C without loss of activities (Figure 1).

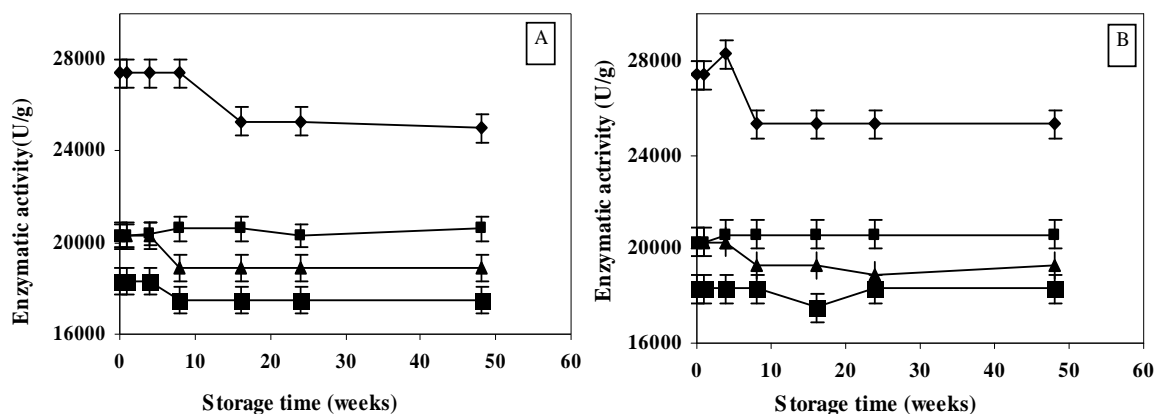


Figure 1. Enzymatic activity of lipase powders contained maltodextrin, gum arabic and CaCl₂ stored at 4°C (A) and 20°C (B). (♦) 10g/l of CaCl₂ (■) 20g/l of CaCl₂, (▲) 30g/l of CaCl₂, (■) without CaCl₂

The presence of 10 gl⁻¹ of calcium chloride in the treatment increased enzyme activity during storage. We noted that the absence or high concentration (up to 10gl⁻¹) of calcium chloride could have some modification on lipase characteristics. The mechanism by which Ca²⁺ regulates enzymes has yet been determined [25]. In all cases additives used to stabilize lipase allowed for longer periods of storage at two temperatures.

3.3 Influence of the glass transition temperature on lipase storage

Glass transition temperature is a physical parameter which characterises molecular changes into the products during heating process. Therefore, the higher is the temperature, the weaker is water into product. Since the temperature is in correlation with water activity, it gives some information on the powder stability.

Table 3: Characterisation of lipase powders after 8 months storage at 20°C

Additives	Enzymatic Activities (Ug-1)	Dry Matter (%)	Glass transition temperature (Tg)	Water activity (aw)
GA + MD without CaCl ₂	18300 ± 1700	96.69± 0.02	76.1°C ± 0,2	0.130
GA + MD + 10gl ⁻¹ CaCl ₂	27400 ± 851	98.44 ± 0.02	79.4°C ± 0,1	< 0.063
GA+ MD + 20gl ⁻¹ CaCl ₂	20600 ± 651	96.61 ± 0.19	68.7°C ± 0,4	< 0.064
GA+ MD+ 30gl ⁻¹ CaCl ₂	20300 ±1250	95.6± 0.07	51.3°C ± 0,6	0.103
GA + MP	55800 ± 2735	93.27± 0.05	76.2°C ± 0,1	0.084

GA: gum arabic, MP: milk powder, MD: maltodextrin

The results presented in Table 3 show that when the concentration of CaCl₂ increases, the glass transition temperature (Tg) decreases. The reference without CaCl₂ has a high Tg. This result is explained by the hygroscopic character of the chloride ion. These results are in accordance with those obtained by authors [26] who show that a lactic bacterial powder with water activity (0.1) and a value of Tg superior to 20°C preserve well their efficiency. They have explained that a powder will be stored well if the difference between its temperature of storage (20°C for this research) and its glass transition temperature is higher than 25°C. For this case, all the powders have got their Tg superior to 25°C. Thus they have demonstrated enzyme stability during storage. Interestingly enough, powders containing milk powder and gum arabic on one hand and 10 gl⁻¹ of CaCl₂, maltodextrin, and gum arabic on the other hand, remain the best formulation.

3.4 Effect of water activity

Powder samples were stored in different atmospheres and water activity was controlled as described in the materials and methods. The stability of enzymatic activity per gram of dry matter is correlated to the water activity of the dry powders (Figure 2).

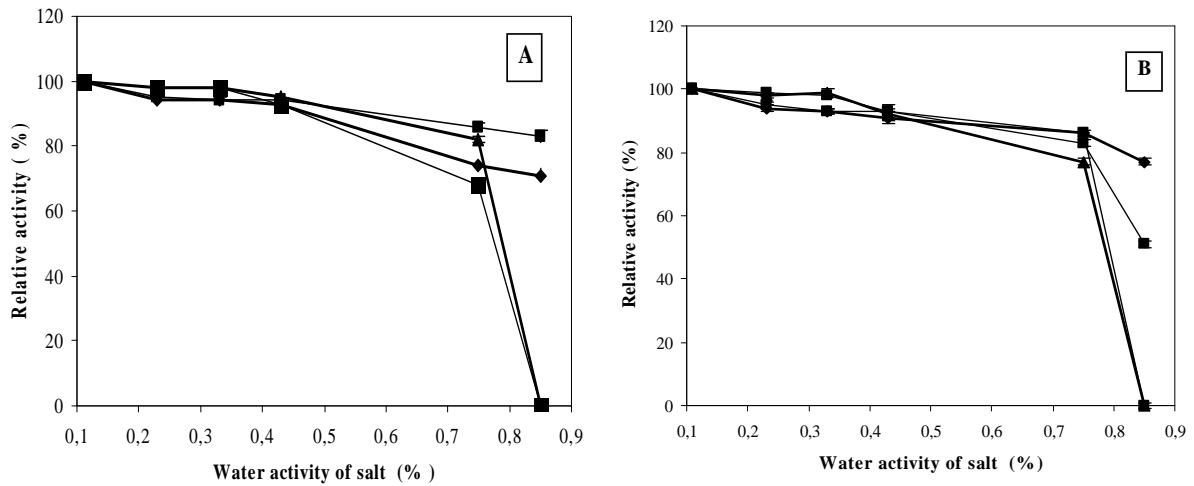


Figure 2. Influence of water activity on relative enzymatic activity of lipase powders with (milk powder, gum arabic) (A) and (10 g/l CaCl₂, maltodextrin, gum arabic) (B) stored at 20°C. (◆) 1month (■) 2months, (▲) 3months (■) 6 months

The powder formulated with milk powder and gum arabic is stable at 0.4 a_w . When the a_w increases to 0.75, enzymatic activity decreases. The powder formulated with maltodextrin and 10 g l⁻¹ CaCl₂ (Figure 2) shows the same evolution: loss of activity when the enzyme is stored at a_w equal to 0.75. This fact is due to the water content which disorganizes the protein conformation during storage [27].

4. Conclusions

The spray-drying process is an efficient method to dehydrate lipase from *Yarrowia lipolytica* in the presence of additives. The present study deals with stability of lipase powder during storage in order to use it in several applications. This study suggests that the use of additives and spray-drying should therefore be considered as an efficient method of enzyme preservation. In further studies it would be important to test the additives alone with the enzyme. The lipase temperature of glass transition is located around 79 and 51°C. The maximal water activity for the stability of the enzyme is located around 0.4. Among all

formulations tested, those containing 10 g^l⁻¹ of CaCl₂ would be used for people affected by a lactase deficiency.

Acknowledgement

We thank the government of Ivory Coast for their financial support to carry out this study.

5. References

- [1] Noel M, Combes D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of solubles additives. *Enzyme Microb Technol* 2003; 33: 299 –08.
- [2] Lamikanra O, Watson MA. Storage effects on activity in fresh-cut cantaloupe Melon. *J Food Sci* 2004; 69: 126 –30.
- [3] Werner L, Latzko F, Hampel W. Spray drying of yeast-lytic enzymes from *Arthrobacter sp.* *Biotechnol Tech* 1993; 7: 663–6.
- [4] Bare G, Diakiese A, Zgoulli S, Sarri A, Gerday C, Thonart P. Modification of the thermo resistance to spray-drying of a cold-adapted subtilisin by genetic engineering. *App Biochem Biotechnol* 1999; 79: 857– 65.
- [5] Suzuki T, Imamura K, Yamamoto K, Satoh T, Okazaki M. Thermal stabilization of freeze-dried enzymes by sugars. *J Chem Eng Jpn* 1997; 30: 609 – 13.
- [6] Millqvist-Fureby A, Malmsten M, Bergenstahl B. Spray drying of trypsin surface characterization and activity preservation. *Int J Pharm* 1999a; 188: 243 –53.
- [7] Millqvist-Fureby A, Malmsten M, Bergenstahl B. Surface characterization of freeze-dried protein/carbohydrate mixtures. *Int J Pharm* 1999b; 191:103 –14.

- [8] Dokic P, Jakovljevic J, Dokic-Baucal LJ. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloids Surf A* 1998; 141: 435 – 40.
- [9] Kenyon MM. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: *Encapsulation Control Release of Food Ingredients*. ASC Symposium Series 590. Washington, DC: American Chemical Society. 1995. p.43–50.
- [10] Chronakis IA. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Crit Rev Food Sci* 1998; 38:599– 37.
- [11] Shiga H, Yoshii H, Nishiyama T, Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. *Drying Technol* 2001; 19: 1385–95.
- [12] Sankarikutty B, Sreekumar MM, Narayanan CS, Mathew AG. Studies on encapsulation of cardamom oil by spray-drying technique. *J Food Sci Technol* 1988; 25: 352–56.
- [13] Destain J. Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. PhD. Thesis. Gembloux, Belgium : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux ; 1998. p.211.
- [14] Fickers P, Ongena M, Destain J, Weekers F, Thonart P. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb Technol* 2006; 38: 756–59.
- [15] Destain J, Roblain D, Thonart P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 1997; 19: 105–7.
- [16] Laroche C, Fine F, Gervais P. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *Int J Food Microbiol* 2005; 97: 307–15.
- [17] Paquot M, Deleu M, Beaufils C, Blecker C. Electrical microenvironment influence on the hydrolytic activity of free and immobilised *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnol Lett* 1996; 18: 73-78.
- [18] Ota Y, Yamada K. Lipase from *Candida paralipolytica*- Part 1: anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol. *Agric Biol Chem* 1966; 30:351–8
- [19] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem* 1999; 343:177–83.
- [20] Tanaka A, Sugimoto H, Muta Y, Mizuno T, Senoo K, Obata H. Differential scanning calorimetry of the effects of Ca²⁺ on the thermal unfolding of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 207–10.

- [21] Kim H, Choi H, Kim M, Sohn C, Oh T. Expression and characterization of Ca²⁺ independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1583: 205–12.
- [22] Brockerhoff H. On the function of the bile salts and proteins as cofactor of lipase. *J Biol Chem* 1971; 246: 5828–31.
- [23] Minemoto Y, Hakamata K, Adachi S, Matsuno R. Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. *J Microencapsulation* 2002; 19:181 – 89.
- [24] Belghith H, Ellouz Chaabouni S, Gargouri A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme Microb Technol* 2001; 28: 253 –58.
- [25] Hernández JA, Aguilar AB, Portillo B, López-Gómez E, Beneyto JM, García-Legaz MF. The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. *Funct Plant Biol* 2003; 30:1127–37.
- [26] Beal C, Foncesca F, Corrieu G. Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant les bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors du stockage. Patent. INRA. 2829147. 2003.
- [27] Lamikanra O, Watson MA. Mild heat and calcium treatment effects on fresh-cut cantaloupe melon during storage. *Food chem* 2007; 102:1383-88.

Chapitre 3:

Formulation liquide de la lipase de *Yarrowia lipolytica*

Publication III:

Effect of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stabilization

Alloue Wazé Aimée Mireille, Destain Jacqueline, Ongena Marc, Blecker
Christophe, Thonart Philippe

Acceptée pour publication dans *Preparative Biochemistry and Biotechnology*

Résumé

Titre : L'effet du monopropylène glycol et de l'irradiation au rayon gamma sur la stabilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*.

Résumé : Ce travail avait pour but d'étudier les effets du monopropylène glycol, d'inhibiteur de protéases, et de l'irradiation au rayon gamma sur la stabilité de la lipase de *Yarrowia lipolytica* durant la conservation. La stabilisation liquide de l'enzyme a été réalisée par l'addition du monopropylène glycol (MPG) aux concentrations respectives de 50, 75 et 90%, des inhibiteurs de protéases (PI 2714 et PI 8215) à 0.1% d'une part, et d'autre par stérilisation à l'irradiation au rayon gamma à des doses de 10 kGy, 15 kGy, et 25 kGy. Dans tous les cas, les résultats ont montré que le monopropylène glycol limitait la croissance des micro-organismes et entraînait la baisse de l'activité enzymatique à des concentrations élevées (supérieure à 50%) à 20 et 4°C.

L'enzyme sans le MPG stockée à 20°C perdait 80% de son activité après deux mois. Cette perte a été attribuée à l'effet des protéases. À cette température, les activités des protéases ont été limitées par les inhibiteurs spécifiques.

Parmi les techniques utilisées, la technique d'irradiation au rayon gamma semblait stabiliser la lipase sous forme liquide.

Effect of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stabilization

**Alloue¹, Wazé Aimée Mireille ; Destain¹, Jacqueline ; Ongena¹, Marc ; Blecker²,
Christophe Thonart¹, Philippe**

1 : Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) Unité de Bio-industries, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

2 : Unité des Technologies Agroalimentaires, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

Corresponding author: Tel: +32/ 8162273, Fax: + 32/81614222

E-mail address: allouewaze.a@fsagx.ac.be

Abstract

This work investigated the effects of monopropylene glycol, protease inhibitor, and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stability during storage.

Enzyme liquid stabilization was achieved by addition of monopropylene glycol (MPG) at respective concentrations of 50, 75 and 90%, the proteases inhibitors (PI 2714 and PI 8215) at 0.1% and the gamma irradiation with 10 kGy, 15 kGy, and 25 kGy doses. In any case, the results showed that monopropylene glycol limited the microorganism growth and decreased the enzymatic activity at high concentration (up to 50%) at two temperatures (20 and 4°C). Enzyme stored at 20°C loss its activity by 80% after two months. This loss was attributed to the protease's effect. At this temperature, the proteases activities have been limited by the specific inhibitors. Among the techniques used, gamma irradiation technique seems to stabilize lipase liquid from *Yarrowia lipolytica*. The stabilization of lipase liquid from *Yarrowia lipolytica* was not reported previously.

Keywords: *Yarrowia lipolytica* lipase, enzymatic activity, formulation, monopropylene glycol, proteases inhibitors, irradiation

Abbreviations :

CWBI, Centre Wallon de Biologie Industrielle ; MPG monopropylene glycol ; *Y. lipolytica*

Yarrowia lipolytica

Introduction

Stabilization of commercial preparations of enzymes is not new. In the 1960s and 1970s, several protocols, many of them empirical, were patented. Nowadays some of the mechanisms of enzyme stabilization are better understood and a rational screening of different stabilizing agents for a given enzyme can be carried out successfully (1). Diverse alternatives for enzyme stabilisation exist among which genetic engineering, chemical modification or immobilisation. However from an industrial perspective, the simplest and cheapest method to achieve enhanced enzyme stability is the addition of stabilising agents. Polyhydric alcohols are additives commonly employed for enzyme stabilization and formulation (2). The polyols are known for their stabilizing effect on various enzymes (3, 4). Irradiation of food up to an overall dose of 10 kGy is accepted in several countries for commercial food processing (5). Gamma irradiation has been employed for decontamination and/or sterilization of dehydrated vegetables (6), seasonings (7) and animal foods (8-11) and then to prolong the storage period of irradiated food without deterioration of its quality (12, 13). A combination of hurdles can ensure stability, microbial safety and sensory quality of food (14). To date, a large number of microbial lipases have been studied; the most producing microorganisms belonging to the *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Candida*, and *Rhizomucor* species (15). *Yarrowia lipolytica* lipase, a 38Kda protein is efficient for hydrolysis of natural oils and fats and retains significant activities at low temperature (4°C) and low pH (3-4) (16). In addition *Y. lipolytica* is dimorphism yeast that secretes several relatively large proteins (reviewed by (17)). Of these, the alkaline extracellular protease (AEP) is the major protein secreted by many strains (18) and at least one acid extracellular protease (AXP) is secreted (11, 19). This new lipase thus presents high potential for applications in the food industry, in pharmacology and in waste treatment such as industrial olive sewage (20). This paper evaluates the effects of chemical and gamma irradiation techniques on *Y. lipolytica* lipase liquid stabilization during storage.

Materials and methods

Lipase solution

Lipase from mutant strain of *Y. lipolytica* LGx6481 was produced in 2000 l bioreactor (LSL Biolafitte, Poissy, France) in the same conditions as described by (21). The production culture was centrifuged on a BTPX205 continuous centrifuge (Alfa Laval, Sweden) at 12000 g, at a flow rate of 500 l h⁻¹. The supernatant was then clarified through a plate filter with 50 plates (SAPQ7, Filtreclair, France) of 2 µm porosity before being concentrated on a Niro UF/MF ultrafiltration apparatus equipped with polysulfone membranes (cut off of 10 kDa, Kolding Denmark).

Liquid formulation of lipase

Glycerol, sorbitol, lactose (0.25 M) (Merck, Germany) and the monopropylene glycol (Holvoet Chemistry Leuven, Belgium) are used to stabilize enzyme liquid. Different concentrations of MPG have been tested (40%, 50 %, (v/v) 75%, and 90%). After formulation the solutions were stored at 4°C and 20°C.

Growth and media composition

A numbering of microorganisms was achieved on 868 medium which contained (w/v): Glucose monohydrate 2%, yeast extract (Organotechnie, France) 1%, Peptone casein (Organotechnie, France) 1%, Agar (Merck, Germany) 1.5 %. The whole mixture is autoclaved at 121°C during 20 min.

Protease test

Protease presence was determined by two techniques: on selective medium and by measurement protease activity. Composition of protease medium: yeast extract 1% (w/v), peptone casein 1% (w/v) agar 1.5 % (w/v) 10.5 g of skim milk in 350 ml water and carried to 600 ml distilled water. The whole mixture is autoclaved at 121°C during 20min. On medium flowed in petri dishes, the presence of proteases marks itself of a transparent halo of substrate

lye after incubation to 30°C during 16 h. Protease activity was measured by Sumkuti method using casein as substrate.

Two inhibitors of protease had been tested in lipase supernatants: protease inhibitor cocktail for general use PI 2714 (Sigma Aldrich, Belgium) and protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells PI 8215 (Sigma Aldrich, Belgium). Different concentrations of inhibitors have been tested. The concentration of 0.1% (w/v) was chosen after preliminary test.

Irradiation

Gamma (γ) irradiation was carried out in a cobalt-60 small laboratory irradiator (Compact Cell, dose rate = 25kGy/120mn, Sterigenics, Fleurus, Belgium). Samples are brought in the radiation area with the aid of lift. The dose they receive depends on the exposure to radiation which is determined by mechanical clock. The applied dose levels were 10, 15, 25 kGy.

Analytical procedure

Lipase activities were measured by a titrimetric method previously described by (16). One unit of lipase is the amount of enzyme able to catalyse the release of 1 μ mol of fatty acid per min at pH 7 and 37°C. Protein quantity was determined by Folin-Ciocalteu method.

Superficial tension was determined by TVT1 device (Lauda Königshagen, Germany) described by (22). Lipase solutions with or without MPG were diluted in milliQ water. Dynamic measurements were performed at 25°C. The ray of the capillary is of 1,055mm, a syringe (Lauda KA) of 2.5ml have been used. Superficial tension and time of drop formation are determined by the average of at least two measurements. The coefficients of variations are as well lower to 1% for the interfacial tension (or superficial) as for the time of drops formation.

Results

Stabilizing effect of monopropylene glycol

Lipase from *Y. lipolytica* was obtained after concentrated lipase supernatants product in bioreactor. In preliminary studies, the ability of glycerol, sorbitol, lactose and monopropylene glycol (MPG) to stabilize lipase during storage at 20°C was compared. In liquid formulation with glycerol sorbitol and lactose, enzyme lost 60 to 80% of its activity after 6 months storage (Fig.1).

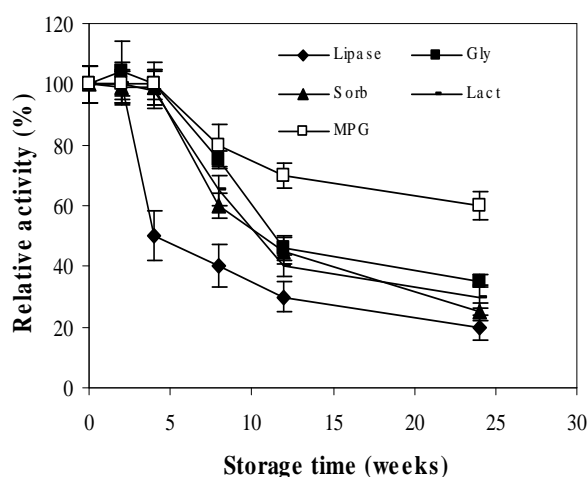


Figure 1: Effects of various additives (0.25 M (gly, sorb lact) and 40% MPG on lipase stability storage at 20°C

Lipase: lipase without MPG, gly: glycerol, sorb: sorbitol, lact: lactose, MPG: monopropylene glycol

In contrast, formulation with 40% MPG provided a significant gain of its activity during storage. This stabilizing agent was thus selected for further studies where it was added at different concentrations of 30% and 40% (v/v). With these concentrations, lipase activities were maintained but, microbial growth was not limited (Data not shown). Therefore, other concentrations of MPG were tested to avoid development of microorganisms in the liquid medium. MPG at 50, 75, and 90% (v/v) was used to formulate the liquid enzyme before storage at 4 and 20°C. Figure 2 showed that the non formulated lipase maintained its activity at 4°C for 24 weeks but lost 80% of its activity. Addition of MPG at a final concentration of

50%, protected lipase from degradation both at 4°C and 20°C (Fig. 2). However higher MPG concentrations seem to have a negative impact on enzyme stability.

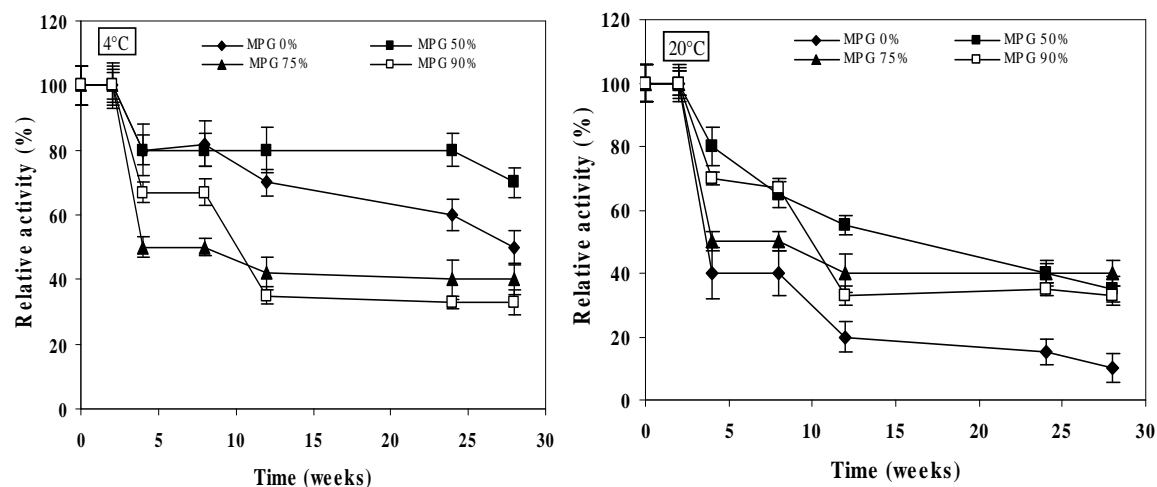


Figure 2: Effect of MPG concentration (v/v) on lipase stability during storage at two temperatures (4 and 20°C)

MPG 0%: lipase without MPG, MPG 50%: lipase formulated with 50% MPG, MPG 75%: lipase formulated with 75% MPG, MPG 90%: lipase formulated with 90% MPG

Effect of monopropylene glycol on microbial growth in the formulated products

In liquid medium, certain contaminants such as bacteria and yeasts are not controlled thus requiring the use of antimicrobial agents. The effect of monopropylene glycol has been tested on microbial growth especially *Yarrowia lipolytica* and contaminated microorganisms in liquid formulation. As shown in figure 3, MPG concentrations from 50% to 90% allowed limiting cell development during storage of the ultrafiltrated lipase product at 4 and 20°C. Final cell concentration in the formulations with 50, 75 and 90% MPG were 5.10^5 to 6.10^2 CFUml⁻¹ respectively. Additional measurements revealed that MPG decreased microbial growth by decreasing the water activity of the medium from 1 to 0.8 (data not show).

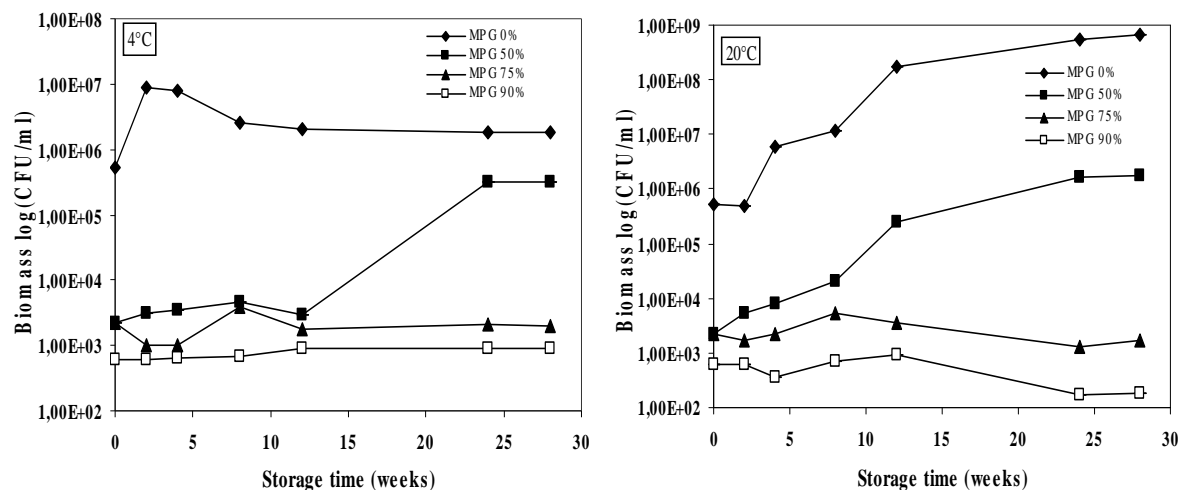


Figure 3: Effect of MPG on contaminated cells (bacteria and yeast) at two temperatures (4 and 20°C) MPG 0%: lipase liquid without MPG, MPG 50%: lipase formulated with 50% MPG, MPG 75%: lipase formulated with 75% MPG, MPG 90%: lipase formulated with 90% MPG

Effect of MPG on interfacial tension of lipase

In order to understand the negative effect of high MPG concentrations on lipase activity, two main hypotheses may be raised. The first is that MPG influences the enzyme on its interface and the second is that it disorganizes its conformation. Measurements of the interfacial tensions (air /water) were performed on 50% and 90% MPG samples and showed that the polyol does not significantly influence this parameter (Table 1).

Table 1: Effect of monopropylene glycol on interfacial tension of lipase

Formulation	Samples	Superficial tension (mN/m)	
		Assay 1	Assay2
50% of MPG	MPG alone	70.12±0.02	69.49±0.07
	Enzyme alone	36.65±0.01	36.90±0.00
	MPG + enzyme	36.86±0.01	36.58±0.01
90% of MPG	MPG alone	69.76±0.05	69.85±0.03
	Enzyme alone	40.01±0.02	41.02±0.01
	MPG + enzyme	39.73±0.03	39.62±0.01

MPG: monopropylene glycol, MPG alone: MPG without enzyme, Enzyme alone: enzyme without MPG

Our results therefore suggest that the negative effect of the MPG is not related to interfacial phenomena. One can indicate that this negative effect is rather related to the interaction of the MPG with the enzyme which will affect its conformation.

Effect of protease inhibitors

Proteolytic measurements in the formulations showed that protease specific activity increased from 0.11 to 1.5 Umg⁻¹ in lipase solution formulated with 50% MPG and without MPG respectively. The presence of protease activity explain why lipase loss 60% of its activity during storage at 20°C (Fig.2). To solve protease problems at this temperature, two inhibitor cocktails have been added to lipase supernatants: the protease inhibitor cocktail for general use PI 2714 and the protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells PI 8215. The protease inhibitor effect on enzymes activities was investigated. Figure 4 shows that PI 2714 did not affected lipase activity and inhibited 80% of the protease activity (Fig. 4(a, b)) at 20°C, more efficiently than the second inhibitor cocktail PI 8215.

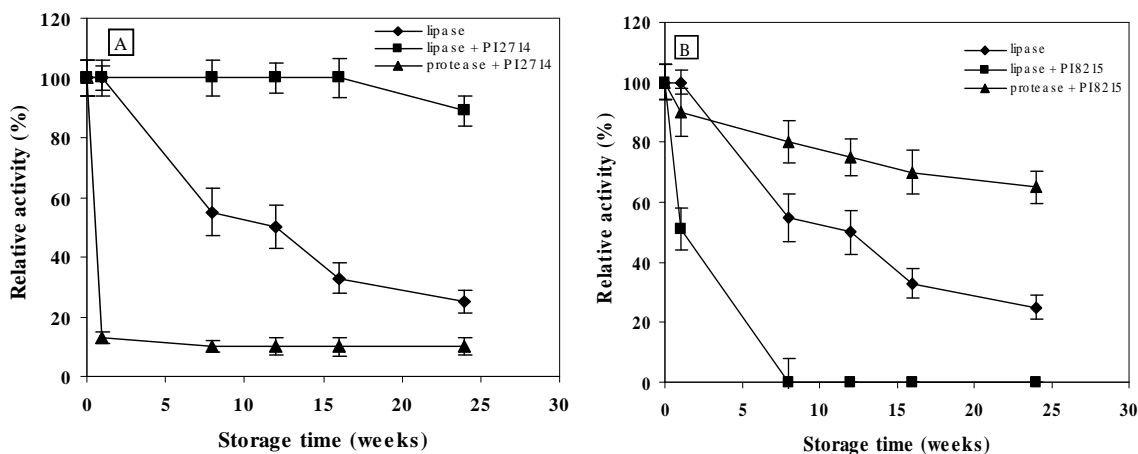


Figure 4: Effect of protease inhibitor on enzymes (protease and lipase) activities at 20°C

A: Lipase: enzyme without protease inhibitor, lipase + PI 2714: lipase adding with protease inhibitor PI 2714,

B: Lipase + PI 8215: lipase adding with protease inhibitor PI 8215, protease + PI 2714: effect of PI 2714 on protease activity

Effect of γ - irradiation on lipase stabilization

Gamma irradiation may be used to ensure microbial safety in product without altering their quality. Three doses of irradiation (10, 15 and 25 kGy) were applied on fresh liquid lipase with an initial 18000 Uml⁻¹ activity and containing 4.5 x 10⁵ cells of yeast from *Y. lipolytica* per ml. After treatment, the irradiated lipase products were stored at 20 and 4°C for six months (Table 2). At the end of this period, our measurements showed that the initial enzyme activity was fully maintained for all doses of gamma irradiation and that no microbial growth occurred.

Table 2: Effect of gamma irradiation on lipase stability after storage from 4 to 20°C

Storage time (weeks)	Dose of gamma irradiation (kGy)					
	10		15		25	
	Enzymatic activity (U/ml)	Biomass total (CFU/ml)	Enzymatic activity (U/ml)	Biomass total (CFU/ml)	Enzymatic activity (U/ml)	Biomass total (CFU/ml)
0	18000±2000	4.5 x 10 ⁵	18000±2000	4.5 x 10 ⁵	18000±2000	4.5 x 10 ⁵
2	18133±1827	0	18333±2333	0	17666±3333	0
4	18266±1733	0	18666±2666	0	18000±2000	0
12	18266±1733	0	18400±1600	0	18000±1700	0
24	18200 ±1800	0	18300±2000	0	18000±2100	0

Discussion

The purpose of this study was to stabilize liquid lipase during storage and we show that the reduction of the microbial growth before formulation using polyols could be an adequate solution. The use of monopropylene glycol at low concentrations has not prevented proteases production in the enzymatic solution stored at 20°C. At these temperatures proteases secretion is not inhibited. Inversely, MPG used at higher concentration (>50%) could limit cell growth and decrease protease activity both at 20 and 4°C. Polyhydric alcohols are well known to have high ability to form hydrogen bonds, increase the organisation of water molecules and preserve the protein hydration status (2, 23). But at these concentrations of MPG lipase activity were decreased. Certain authors noted that *Y. lipolytica* yeast that secretes several

relatively large proteins such as proteases (24). The proteases are the major problem for the enzyme stabilization. The use of protease inhibitor is temporally well but, not advantageous in industrial use. That is why in the future it would be desirable to remove the gene that codes for proteases in *Y.lipolytica* genome and prevent the contamination for others microorganisms. This study concluded that the enzyme liquid stabilisation would be improved by limiting microbial cell growth via the γ -irradiation techniques. Our results are in accordance with those already reported showing that a dose of 10 kGy accepted by Codex Alimentarius commission (World health Organisation, 1994) is very effective in microbial decontamination and does not adversely affect the nutritional quality of the product (25). For enzyme liquid stabilization, it is important to maintain a low concentration of cell. Finality our study conclude that γ -irradiation technique would be the one technique from lipase liquid stabilization.

Acknowledgement

We thank the government of Ivory Coast for their financial support. The authors also thank the Sterigenics, company to Fleurus Belgium, for their technical support with gamma irradiation treatments.

References

1. Combes, D., Yoovidhya, T., Giral, E., Willemot, R., Monsan, P. Mechanism of enzyme stabilisation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987, 501, 59–62.
2. Noël, M., Lozano, P., Combes, D. polyhydric alcohol protective effect on *Rhizomucor miehei* lipase deactivation enhanced by pressure and temperature treatment. Bioprocess Biosys. Eng. 2005, 27, 375–380.

3. Kristjansson, M.M., Kinsella, J.E. Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. food Nut. Res.* 1991, 35, 237–258.
4. Carpenter, J.F., Crowe J.H., Arakawa, T. Comparison of solute-Induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and Dried States. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 3627– 3636.
5. Lacroix, M., Quattara, B. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products-a review, *Food Res. Int.* 2000, 33, 719–724.
6. Zhou, Q.C., Jin, R.H., Wei, J.Y., Fu J.K., Xiong L.D., Irradiation preservation and its dose control for dehydrated vegetables. *Acta Agriculturae Zhejiangensis.* 1996, 8, 255–256.
7. Chen, Q.X., Xu, P.S., Chen, H., Chen, L.H., Dong, S.B. Study on process control and acceptability of irradiated seasonings. *Radiat. Phys. Chem.* 1993, 42, 323–326.
8. Chwla, S.P., Kim, D.H., Jo, C., Lee, J.W., Song, H.P., Byun, M.W., Effect of gamma irradiation on the survival of pathogens in *Kwamegi*, a traditional Korean semidried seafood. *J. Food. Prot.* 2003, 66 (11), 2093–2096.
9. Fu, J., Shen, W., Bao, J., Chen, Q. The decontamination effects of gamma irradiation on the edible gelatin. *Radiat. Phys. Chem.* 2000, **57**, 345–348.
10. Kamat, A., Warke, R., Kamat, M., Thomas, P. Low-dose irradiation as a measure to improve microbial quality of ice cream. *Inter. J. food Microbiol.* 2000, 62, 27–35.

11. Yang, S.F., Perng, F.S., Liou, S.E Wu, J.J., Effects of gamma irradiation on chromophores and volatile components of grass shrimp muscle. *Radiat. Phys. Chem.* 1993, 42, 319–322.
12. Lacroix, M., Jobin, M., Hamel, S., Stahl, V., Gagnon, M., Couverelle, C. Effects of 3 and 7kGy gamma irradiation doses on odor and flavor of fresh chicken breast. *Microbiol. Aliment Nut.* 1991, 9, 375-379.
13. Olson, D.G. Irradiation of food. *Food Technol.* 1998, 52, 56-56.
14. Leistner, L. Basics aspects of food preservation by hurdle technology. *Inter. J.food Microbiol.* 2000, 55, 89-96.
15. Stocklein, W., Sztajer, H., Menge, U., Schmid, R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1168, 181–189.
16. Destain, J., Roblain, D., Thonart, P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 1997, 19, 105–107.
17. Heslot, H, Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. *Advin. Biochem. Eng. / Biotechnol.* 1990, 43, 43–73.
18. Ogrydziak, D.M., Scharf, S.J. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B. *J. Gen. Microbiol.* 1982, 128, 1225–1234.

19. Nelson, G., Young, T.W. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. J. Gen. Microbiol. 1987, 133, 1461–1469.
20. Alloue, M., Aldric, J-M., Destain, J., Boutahir, Y., Thonart, P. Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives. Trib de l'eau. 2005, 58, N°636/4, 37–43.
21. Fickers, P., Ongena, M., Destain, J., Weekers, F., Thonart, P. Production and downstream-processing of extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Enzyme Microb. Technol. 2006, 38, 756–759.
22. Blecker, C. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. PhD thesis 1998; 200pp.
23. Lozano, P, Combes, D., and Iborra, J.L. Effect of polyols on α -chymotrypsin thermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilisation. *J Biotechnol* 1994, 35, 9–18.
24. Yamada, T., Ogrydziak, D.M., Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. J. Bacteriol. 1983,154, 23–31.
25. Aziz, N.H, Souzan, R.M., Shahin, Azza A. Effect of γ -irradiation on the occurrence of pathogenic microorganisms and nutritive value of four principal cereal grains. Appl. Radiat. Isot. 2006, 64, 1555–1562.

Chapitre 4:
Immobilisation de la lipase de *Yarrowia*
lipolytica

Publication IV:

Comparison of Yarrowia lipolytica lipase immobilization yield of entrapment, adsorption and covalent bond techniques

Wazé Aimée Mireille Alloue, Jacqueline Destain, Thami El Medjoub, Hakim

Ghalfi, Philomène Kabran, Philippe Thonart

Publication parue dans Applied Biochemistry and Biotechnology

Résumé

Titre : Comparaison du rendement d'immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica* par inclusion, adsorption et par liaison covalente.

Résumé : Le but de cette étude était d'immobiliser la lipase du *Yarrowia lipolytica* par trois méthodes comprenant l'inclusion, l'adsorption, et la liaison covalente afin d'étudier le rélargage d'enzymes, le stockage et les propriétés catalytiques. L'alginate de sodium et le chitosan étaient les polymères choisis pour immobiliser la lipase par inclusion. Les billes d'alginate et de chitosan ont été séchées par lyophilisation et par fluidisation. Les résultats ont montré que le chitosan est adapté à l'immobilisation par inclusion de la lipase. Quoique lyophilisé l'activité des billes était faible comparée à celle des billes fluidisées. Le procédé de lyophilisation semblait être approprié pour les billes car il permet une bonne conservation à 4 et à 20°C. L'immobilisation par adsorption a été effectuée sur la cérite et le gel de silice. Le rendement maximum d'immobilisation de 76% a été obtenu avec la cérite suivi de 43% avec le gel de silice. L'enzyme adsorbée sur les deux supports a montré une plus grande stabilité à la température (50°C) et en présence de solvants apolaires (isooctane, n-Heptane et n-Hexane). En outre, la lipase immobilisée par liaison covalente a maintenu 70% de son activité résiduelle. Cette enzyme immobilisée par liaison covalente a montré une plus meilleure efficacité (80%) après 5 mois de stockage.

Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption and covalent bond techniques

Wazé Aimée Mireille Alloue,*¹ Jacqueline Destain¹, Thami El Medjoub,² Hakim Ghalfi,¹

Philomène Kabran,¹ Philippe Thonart,^{1,2}

1: Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Unité de Bio-industries, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Passage des Déportés, 2-B-5030 Gembloux, Belgique.

2: Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Unité de Technologie microbienne, Université de Liège Start-Tilman, B40, B -4000 Liège, Belgique

Corresponding author: Tel: +32/ 8162273, Fax: + 32/81614222

E-mail address: allouewaze.a @fsagx.ac.be

Abstract

The purpose of this study was to immobilize lipase from *Yarrowia lipolytica* using three methods including inclusion, adsorption, and covalent bond to study enzyme leaching, storage and catalytic properties. Sodium alginate and chitosan were the polymers selected to immobilize lipase by inclusion. The beads of each polymer were dried by freeze drying and fluidization. The results show that chitosan was more adapted to the inclusion of lipase. Even though freeze dried beads activity was low compared to this of fluidized beads. Freeze drying process seems produce suitable beads for storage at 4 and 20°C. The immobilization by adsorption was carried out on both celite and silica gel. Maximum immobilization yield of 76% was obtained with celite followed by 43% in silica gel. The enzyme adsorbed on the two supports exhibited greater stability at temperature (50°C) and in non polar solvents (Isooctane, n-Heptane and n-Hexane). In addition, the lipase immobilized by covalent bond retained residual activity equivalent to 70%. It was demonstrated that the enzyme immobilized by covalent bond showed greater activity (80%) after 5 months of storage.

Keywords: *Yarrowia lipolytica* lipase, enzymatic activity, immobilization, Reusability

Introduction

Enzymes present numerous potentialities of applications in many sectors: food technology, environmental, and pharmaceutical. Lipases or triacylglycerol acylhydrolases (EC 3.1.1.3), are particular catalysts able to catalyse the hydrolysis reactions of triacylglycerol esters in aqueous medium and ester syntheses in non aqueous medium and are able to preserve their catalytic activity in organic solvents, biphasic systems and in micelles solutions. Many interesting applications have been found for lipases (1, 2) however, these applications in many cases are limited for economic reasons. In order to use them more economically and efficiently, their stability and biological activity can be improved by immobilization (3-6). Many methods have been developed for lipases immobilization and a lot of effort is still being devoted to the search for new support materials and novel techniques. The use of a judicious immobilization method can reduce significantly process costs involving lipases. Various techniques have been proposed including chemical and physical attachment to solid surfaces (7-9). Inclusion in polyanionic or polycationic polymers by addition of multivalent covalent counter-ions is a simple and common method of enzyme immobilization. Gels prepared from natural and synthetic polymers have been successfully employed and these offer one of the simplest methods because relatively milder conditions are required for enzymes immobilization. The adsorption shows to be the easily and less expensive method. However, the adsorption is generally not very strong, and some of the adsorbed protein will be desorbed during washing. Different supports have already been exploited to immobilize the enzyme as the silica gel, the beads of porous glass, alumina, and the celite (10). The immobilization by covalent bond has been developed to get very strong links between enzymes and supports, but have the disadvantage of denaturizing the native enzyme during the binding process. Before realization of the covalent bond a previous activation is necessary. The activation of the adsorption supports is subject of numerous studies because the activation of the functional

groups of the enzyme can denature the enzyme. The present paper deals with immobilization of *Yarrowia lipolytica* (*Y.L*) lipase by three different methods: inclusion, adsorption and covalent bond. Catalytic activities of the immobilized and free enzymes in the three systems were compared and stability of the immobilized enzyme was tested in several hydrolysis cycles.

Materials and methods

Materials

Lipase from *Y. lipolytica* LGx6481 was produced in 2000 l bioreactor (LSL Biolafitte, Poissy, France) in the same conditions as described by (11,12). The broth produced was centrifuged on a BTPX205 continuous centrifuge (Alfa Laval, Sweden) at 12,000 x g, at a flow rate of 500 l h⁻¹ and the supernatant was freeze dried for further studies. Sodium alginate, celite 535 and silica gel were obtained from Fluka Biochemika (Switzerland). Chitosan and Trizma acid were purchased from Sigma Aldrich (Belgium), column HiTrapTM NHS-activated HP from Pharmacia Wikstroms (Sweden), calcium chloride, sodium tripolyphosphate and all other chemicals used were from Merck (Germany) and were of analytical grade.

Methods

Immobilization by inclusion

Alginate beads

Alginate, CaCl₂ and lipase solutions were prepared in Tris HCl buffer pH 7.2, 0.05 mM. Alginate solution with 4% (w/v) was prepared by dissolving sodium alginate powder in buffer and stirring continuously into complete dissolution. Lipase powder (1.2 g) was dissolved in 20 ml buffer. The two preparations were mixed and stirred with a magnetic bar to ensure complete mixing. As soon as the mixed solution (alginate and lipase) was added dropwise into 400 ml of CaCl₂ solution (0.3 M) at a rate of 70 ml h⁻¹, accomplished using a 10 ml plastic

syringe and peristaltic pump (101U/R Watson-Marlow Cornwall, England), Ca-alginate beads were formed. After 20 min of hardening, the beads were separated from the calcium chloride solution by simple filtration. They were washed two times with 30 ml of Tris HCl buffer and the beads were used as such or freeze dried and fluidized for further studies. Beads have been dried by freeze drying with the freezer Koeltechnik (Belgium). The freeze drying protocol was previously described (13). Beads were also dried by fluidization. The bed fluidizer is a device of Niro Aeromatic, (Denmark). The product is introduced in the vat of the bed and is dried by barbotage. The temperature of air entry that crosses the layer of the product is 50°C and the temperature inside the product is 37°C at the end of the drying. After drying, beads were stored at 4 and 20°C. The decanted CaCl₂ solution and the two washings were collected for lipase activity determination.

Chitosan beads

Chitosan solution with concentration of 3% (w/v) was prepared by dissolving chitosan powder in 1% (v/v) acetic acid. To 80 ml of the chitosan preparation, 20 ml of lipase solution, prepared previously by dissolving 1.2 g of lipase powder in acetic acid (0.5% v/v), was added. The contents were stirred gently to ensure complete homogenization. This solution was then extruded dropwise through a syringe and peristaltic pump into a beaker containing 200 ml of 0.136 mM sodium tripolyphosphate (Na₅P₃O₁₀) solution which was prepared in 0.05 mM Tris HCl (pH 7.2). After 75 min, the formed beads were recuperated by simple filtration and washed two times using 30 ml of 0.05 mM Tris HCl (pH 7.2). Afterwards, they were used as such or freeze dried and fluidized for further studies. After drying, beads were stored at 4 and 20°C. The decanted Na₅P₃O₁₀ solution and the two washings were collected for lipase loss measurements.

Beads morphology

The surface and cross-sectional morphology of the freeze-dried and fluidized beads were examined using electron microscopy. All samples were sputter-coated with gold prior to observation. Micrographs were obtained using a scanning electron microscope (JSM-7500-F, JEOL, Belgium). Bead size measurements were determined by using the same electron microscopy. Measurements were carried out for 15 beads.

Immobilization by adsorption

Immobilization of lipase on celite 535

Yarrowia lipolytica lipase was immobilized on celite by adsorption following the method described by (14). An appropriate amount of support (20 g) was mixed thoroughly with 1.2 g of lipase in 100 ml phosphate buffer (pH 7.5), and kept stirring for 4h. The immobilized lipase is freeze-dried and stored at 4°C for further studies.

Immobilization on silica gel 60 G

The same protocol described earlier for immobilization on celite 535 is applied for silica gel. However in this case, the quantity of support is different. 6 g of support was mixed thoroughly with 1.2 g of lipase in 100 ml phosphate buffer (pH 7.5) and kept stirring for 4 hours followed by freeze drying. The freeze dried preparation was stored at 4°C for further use.

Immobilization by covalent bond

The immobilization by covalent bond was achieved on the HiTrap™ NHS-activated HP column (Pharmacia, Wikstroms Sweden). This column is constituted from sepharose linked to the matrix by the epichlorhydrin. Before establishing the suitable method of lipase immobilization, the column was activated by the N-hydroxysuccinimide according the

method described in the notice. Lipase solution with concentration of 10 mgml^{-1} was prepared by dissolving lipase powder in NaHCO_3 (0.2 M) and NaCl (0.5 M). Before introducing lipase preparation (1ml) to the column with a peristaltic pump, the isopropanol contained in the column was eliminated with 6 ml of HCl (1 mM). After 30 min, the column was washed to eliminate the excess of lipase which was not immobilized. After immobilization, the column was stored at 4°C .

Assay of lipase activity

The hydrolytic activities of free and immobilization lipase were measured by a titrimetric method previously described by (11) using olive oil (Extra Vierge Bertolli, Italy) as substrate . Activities are expressed in international units (IU), where one unit of lipase is amount of enzyme able to catalyse the release of $1\mu\text{mol}$ of fatty acid per min at pH 7 and at 37°C . For lipase immobilized by covalent bond, activity was measured by spectrophotometer using para-nitrophenyl acetate (PNPA) as substrate to avoid the colmatage problem. All the assay of activity were repeated 3 times.

Immobilization yield

Immobilization yield was defined as follows:

$$\text{Immobilization yield } \% = \left(\frac{a_{imm}}{a_{free}} \right) \times 100 \quad (15)$$

Where, a_{imm} : total activity of immobilized enzyme (U/g) and a_{free} : total activity of the initial enzyme preparation (U/g).

pH activity profile

The effect on the enzyme activity of free and immobilized preparations was checked in hydrolysis of olive oil in phosphate (0.1M) or Tris HCl (0.05M) buffer at pH ranging from 2.0 to 12.0. Lipases activities were measured by incubating the samples at 37°C for 15 min.

Reusability of immobilized lipase

For beads

To evaluate the reusability of the immobilized lipase, beads were washed with water and buffer and were resuspended in a fresh reaction mixture to measure the enzymatic activity. The procedure was repeated until the enzyme lost 50% of its total activity.

For column

The study of reusability of immobilized lipase by adsorption was achieved using a glass column (P1 NS 12.5 2.5 mm Merck, Belgium). The column contained 10 g of lipase powder immobilized on celite and silica gel. Initially, the powder was washed and hydrated by distilled water (30 ml). The esterase test was carried out for the enzyme activity according to the following protocol: a solution containing 10 ml of distilled water, 4 ml of PNPA (0,1M) prepared in methanol diluted 100 times and 4 ml of phosphate buffer was prepared. This solution rate at 3 drops by min on the column using a peristaltic pump. The solution is analyzed with the spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys Unicam, USA) at 400 nm.

Thermal stability

Free and immobilized enzymes were placed in the buffer solution of optimum pH and incubated at 50°C for different time intervals (0-7 h). Enzyme activity was determined as described earlier (11).

Effect of the solvents on immobilized lipase by adsorption

Three solvents were used: n-heptane, n-hexane and isooctane. Free (1 g) and immobilized lipases on the celite and the silica gel were dissolved in these 20 ml of three solvents. afterwards, the solutions are maintained in room temperature (20°C), then lipase activity was measured out at intervals of 1 hour for 4 hours.

Results and discussion

Entrapment enzyme by inclusion

In order to investigate effects of support amount on loading efficiency, inclusion of enzyme in alginate was carried out using two quantities of alginate (3.2 and 6.4 g). The immobilization yield and lipase loss in CaCl₂ solution and the two washings were compared in tabl.1. The results suggest that the loading yield of enzyme in sodium alginate beads increases significantly with the amount of the polymer which is in agreement with earlier reports (16). Indeed, percent of enzyme entrapped was increased from 38.8 to 66.2 % for 3.2 and 6.4g respectively. It has also been demonstrated that the enzyme losses in CaCl₂ and washings solutions were limited considerably by increases in alginate amount. For further studies, alginate amount of 6.4g was retained. In addition, the percent of lipase entrapped in chitosan was examined. In this case, only one amount of support was tested. The results were summarized in table 1. As can be seen from the data in table 1, lipase entrapped in chitosan gave an immobilization yield of 23 %. However, the loss in Na₅P₃O₁₀, used for chitosan beads preparation, seems to be inferior (19.7 %) to those noted during manufacturing process in alginate beads (29.2 %) even though that the curing time of chitosan beads was 75 min, which was almost four times the 20 min curing time for alginate beads. It should be noted that these losses in the manufacturing process has been reported by several other workers (17).

Table 1. Immobilization yield of entrapment *Y.L* lipase in alginate and chitosan

	Fresh alginate beads		Fresh chitosan beads	Washing sol Tris-HCl			CaCl ₂		Na ₅ P ₃ O ₁₀
	M1	M2		M1	M2	C	M1	M2	
Enzymatic activities (Ug ⁻¹ of beads)	150 ±23	152 ±35	167 ±12	42±24	42±12	63±12	102 ±12	66 ±12	92 ±24
Immobilization yield (%)	38.8±5.2	66.2±2.4	23±5	8±2	2.7±2.1	43±3	52.2±6.2	29.2±4.6	19.7±2.7

M1 = method 1 corresponds ratio 1.2 lipase /3.2 alginate

M2 = method 2 corresponds ratio 1.2 lipase /6.4 alginate

C = chitosan

In washing (Tris-HCl) and polymerization (CaCl₂ or Na₅P₃O₁₀) solution activity is expressed in Uml⁻¹

Drying of beads and storage

The results of drying of fresh alginate and chitosan beads by freeze-drying and fluidization were summarized in table 2. The immobilization yield of chitosan beads was higher compared to the alginate beads dried in the same conditions which is in agreement with earlier reports (13).

Table 2: Residual activity of immobilized *Y.L* lipase storage at 4 and 20°C

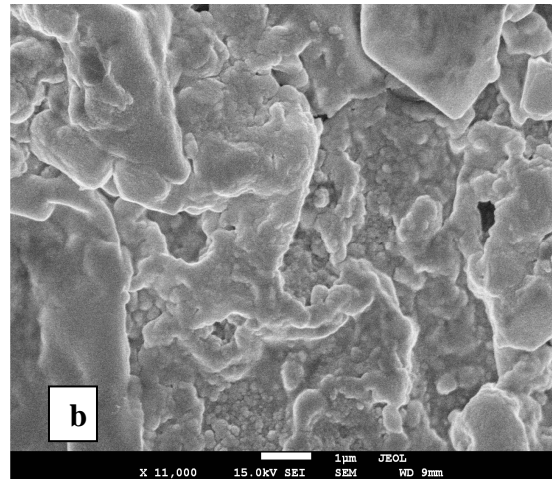
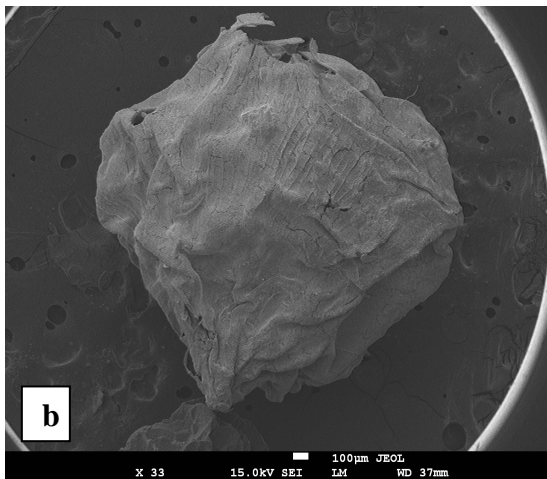
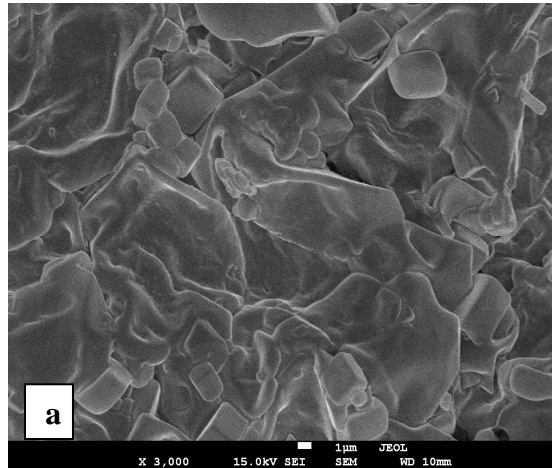
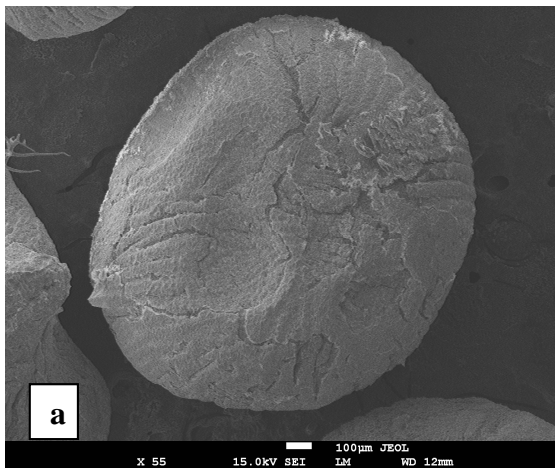
Polymers	Drying method (I.Y %)	Dry matter (%)	T (°C)	0	1 month	2 months	3 months	4 months
Chitosan	Freeze dried (54)	94.88±0.02	4	100	98±4	94±6.1	90±5	88±6
			20	100	96±6	90±5.2	90±6	84±4
	Fluidized (57)	85.59±0.05	4	100	71±9	54±4	48±4.2	34±6
			20	100	57±5	38±4	28±3	22±4.1
Alginate	Freeze dried (36.1)	93.03±0.04	4	100	98±6	94±3	90±5	85±5
			20	100	96±6.2	88±6	86±5	80±2
	Fluidized (39.2)	86.69±0.02	4	100	71±7.1	58±5	44±4	33±6.2
			20	100	63±4.5	30±7	14±2	14±2.1

I.Y = immobilization yield *Y.L* = *Yarrowia lipolytica*

Thus, as compared to alginate beads, chitosan beads were more adapted to the inclusion of lipase produced by *Y. lipolytica*. According to this author, some ionic polymers including sodium alginate decrease the activity of lipase. The freeze-dried beads show a lower immobilization yield compared to fluidized beads, which is probably the result of the amount of enzyme lost to the bead surface during freeze-drying process (no significant loss of activity for alginate and chitosan beads). Other studies suggested that the initial process of freezing might be the process where the major part of the lipase was lost (13). This is because the freezing of water might have led to lipase remaining on the surface of the beads, while the water froze. In addition, the immobilization yield in the case of alginate beads was found to decline after drying even though it was higher in fresh alginate beads compared to fresh chitosan beads. This can be possibly explained by the fact that alginate is more hydrophilic than chitosan and therefore, water could be drawn in more rapidly which causes a leaching of

enzyme from beads. Determination of dry matter of dried beads (Table.2) suggested that freeze-drying process allowed producing suitable beads for storage at 4 or 20°C. Indeed, the results (Table.2) showed that freeze-drying process allowed to retain more than 80 % of lipase activity after 4 months of storage at 4 and 20°C while that the activity do not exceed 34 % in fluidized beads. Thus, freeze-drying process was retained for further studies.

Beads morphology



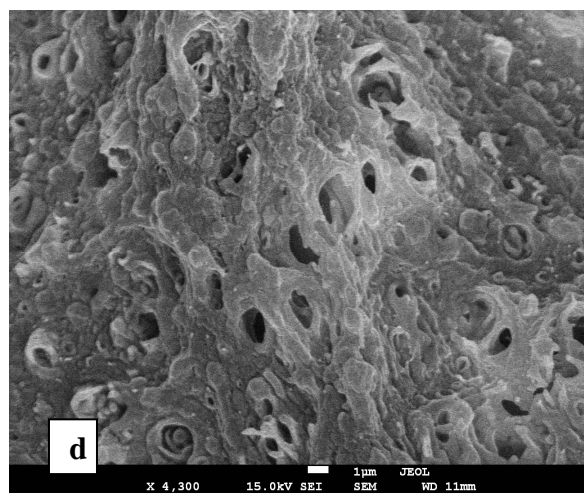
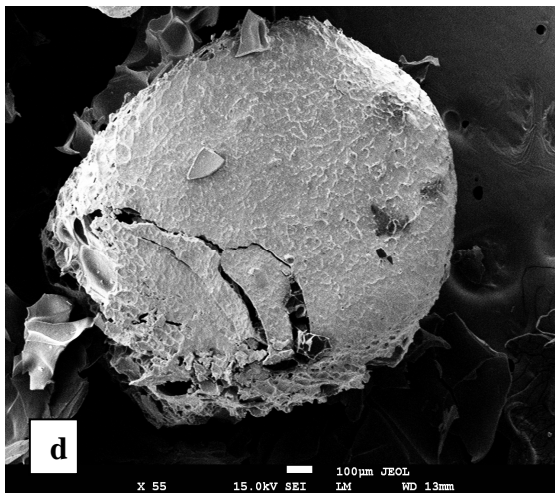
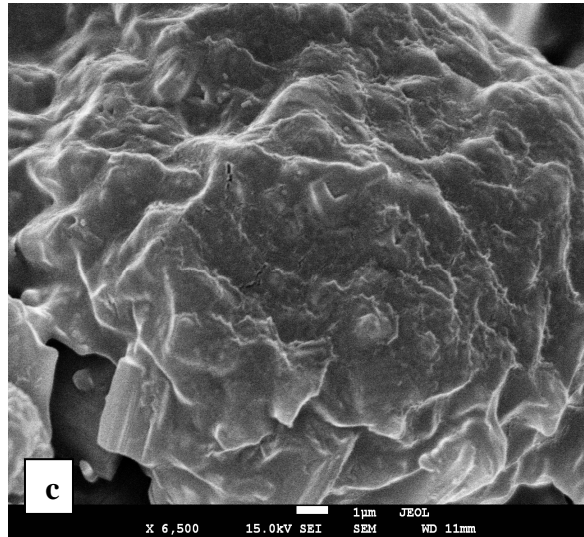
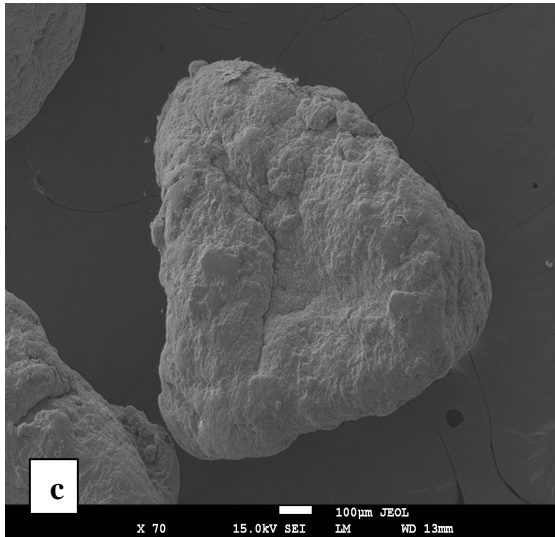


Figure 1. Microphotographs of the beads obtained from: (a) Alginate fluidized (b) alginate freeze-dried (c) Chitosan fluidized; and (d) chitosan freeze-dried

Figure 2. Microphotographs of the beads surface obtained from: (a) Alginate fluidized; (b) alginate freeze-dried (c) Chitosan fluidized; and (d) chitosan freeze-dried

The results of figures 1 and 2 relating to the morphology of the beads show a significant difference between the microscopic aspects of two polymers. The drying process has an effect on the beads morphology. Comparatively to fluidization, drying by freeze-drying of the beads makes them more friable which could be the cause of enzyme leakage and limit their reuse. In addition, the average bead size measured was 1.41 ± 0.11 , 2.43 ± 0.01 , 1.19 ± 0.01 and 1.50 ± 0.05 mm for alginate fluidized beads, alginate freeze-dried beads, chitosan fluidized beads and chitosan freeze-dried beads, respectively. Immobilisation yield of lipase immobilized in fluidized beads was higher than freeze dried beads (Table 2). As expected,

activities of lipase entrapped in the beads decreased as the bead size increased. Other workers have also reported that activity of immobilized enzyme decreases with increasing bead size due to mass transfer resistance (18, 19). The chitosan shows relatively irregular pores of an approximate size of 0.70 μm . This could explain partially brittleness of the chitosan. Certain authors (20) stipulate that the formation of the pores is due to the viscosity of the polymer which prevents a complete interaction with the complexing agent. Alginate on the other hand seems to have a strong structure and does not have any macro-porous structure.

Optimum pH and thermal stability of lipase immobilized by inclusion

Lipase activity of various enzyme preparations (free and immobilized) was measured at 37°C at different pH values ranging from 2 to 12. The results are shown in fig.3.

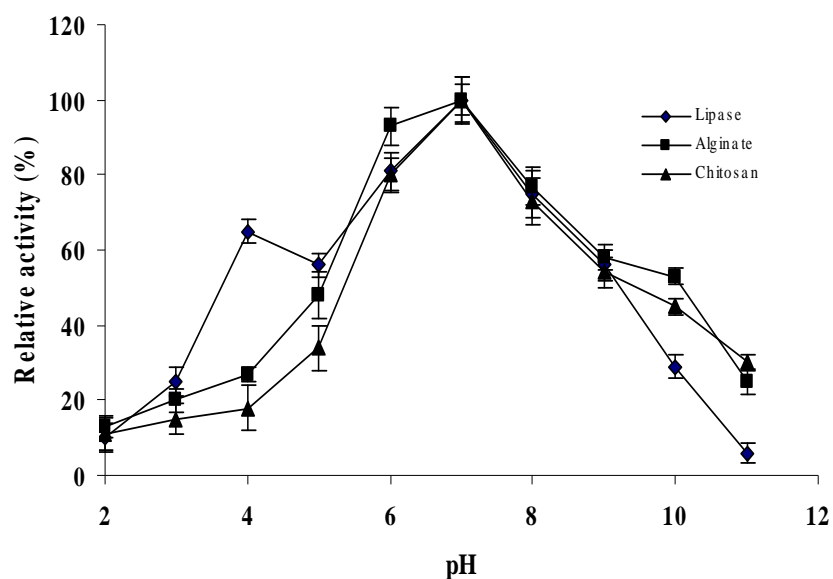


Fig. 3 Optimum pH of free and immobilized lipases by inclusion

The pH activity profiles of lipase immobilized in chitosan and alginate gel were relatively similar to the soluble enzyme. The optimum pH of all preparations was 7. However, the immobilization seems to have a protective effect on the lipase at alkaline pH. In addition,

thermal stability of the free and immobilized lipase was examined by pre-incubating these preparations at the specified temperature (50°C) for 4 hours in absence of the substrate. These enzyme preparations were then equilibrated at the respective temperature and pH optimum for their activity before starting the assay.

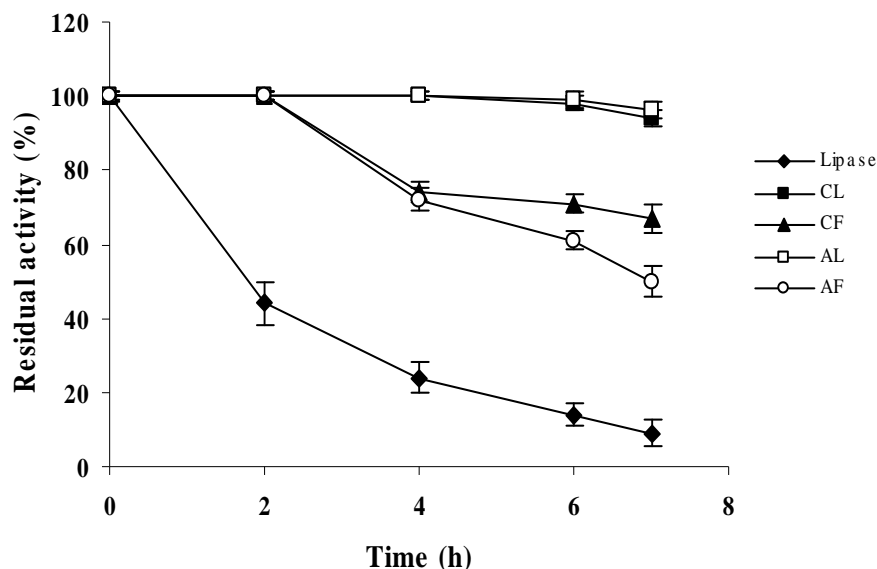


Fig. 4 Thermal stability (50°C) of free and immobilized *Y.L* lipases by inclusion (AL: alginate freeze-dried; AF: alginate fluidized; CL: chitosan freeze-dried; CF: chitosan fluidized)

The results presented in fig. 4 show that lipase activity was improved by immobilization. The free enzyme lost 80 to 90 % of its activity at 50°C for 7 hours. In contrast, freeze-dried and fluidized entrapped enzyme conserves more than 80 and 60 % of their activities, respectively. The greater stability of the immobilized enzyme may be ascribed to the stabilizing effects of immobilization (21, 22).

Repeated use of lipase-entrapped beads

In order to test the stability of lipase entrapped in the alginate and chitosan beads, the freeze-dried and fluidized beads were used three times for the hydrolysis reaction. Each run lasted 15 min after which the beads were separated and washed with 30 ml of 50 mM Tris HCl buffer

(pH 7.2). The reaction medium was then replaced with fresh medium. The activity of freshly prepared beads in the first run was defined as 100 %.

Table 3: Repeated use of immobilized *Y.L* lipase

	Alginate beads freeze drying	Alginate beads fluidizing	Chitosan beads freeze drying	Chitosan beads fluidizing
Relative activity (%) First use	100	100	100	100
Relative activity (%) Second use	44±6	56±5.2	36±4	52±6.2
Relative activity (%) Third use	15±3.5	30±5	10±2	35±6

Table 3 summarizes the results of repeated use of lipase-entrapped chitosan and alginate beads. Repeated use brought about activity loss (40 to 50 %) in all cases. This might be mainly due to enzyme leakage from the beads. Another possible explanation is damage of the beads during repeated use (15). Those authors suggest the coating of beads surface with polymeric materials. According to them, lipase entrapped in the coated beads retained higher activity than lipase entrapped in the uncoated beads.

Immobilization by adsorption

Lipase immobilization by adsorption was carried out using several supports (celite, amberlite, silica gel and the active carbon) (data not shown). Highest activities immobilization yield of 76 and 43 % were obtained with celite and silica gel, respectively (Tabl. 4).

Table 4: Yield of *Y.L* lipase immobilization by adsorption and covalent bond

Immobilization method	Support	Relative activity of Free lipase (%)	Immobilization yield (%)	
			Method 1	Method 2
Adsorption	Celite	100	Method 1	Method 2
			57±2	76±5
	Silica gel		43±5	35±4.5
Covalent bond	Sepharose	100	70±4	

Method 1 = ratio (1.2/6)

Method 2 = ratio (1.2/20)

The superior activity with celite has been attributed to greater affinity of lipase for celite than for silica gel or to lipase deactivation upon adsorption on silica gel. Wang and al (14) reported 22.3 % of lipase activity immobilized on celite compared to 14.8 % for silica gel.

Optimum pH and thermal stability of lipase immobilized by adsorption

The activity of the free lipase and enzymes immobilized is measured at different pH in the phosphate buffer. The profiles of activity of free lipase and immobilized enzymes towards the pH 2 to 7 (Fig. 5) are similar, where maximum activities were found.

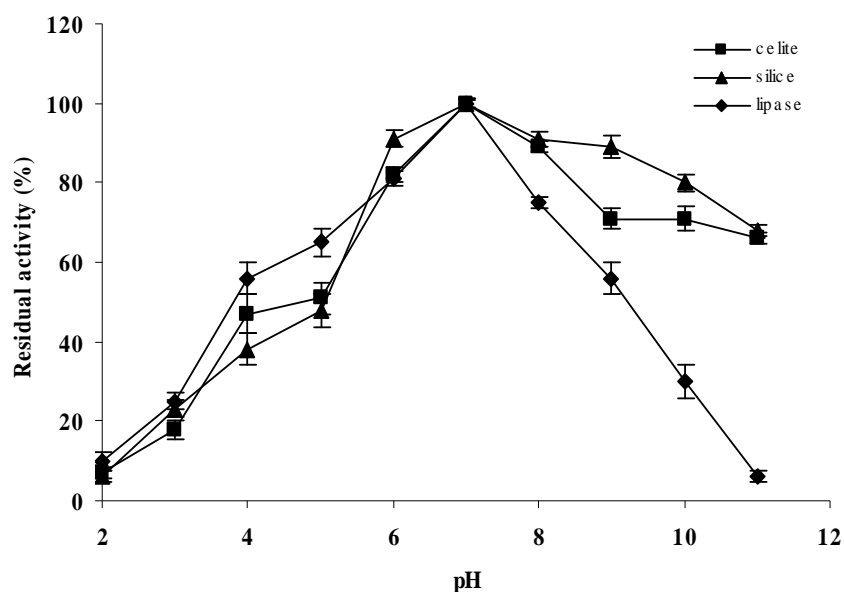


Fig. 5 Optimum pH of free and immobilized *Y.L* lipases by adsorption

The immobilization improves lipase activity to the alkaline pH. In order to study the thermal stability, the free and immobilized enzyme preparations were incubated at 50°C during 4 hours and residual activities were determined in the periodically withdrawn samples (1hour). Results obtained are illustrated in figure 6.

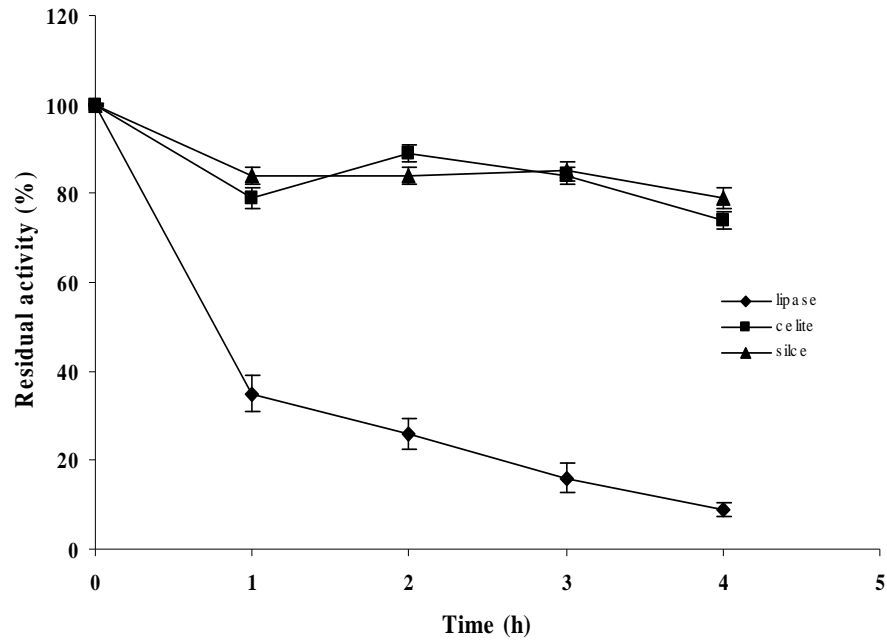


Fig.6 Thermal stability of free and immobilized *Y.L* lipase by adsorption at 50°C

A significant improvement in the thermal stability of immobilized enzyme over the native form was observed. Indeed, free lipase lost about 90 % of its activity after 4 hours whereas immobilized enzymes retain more than 80 % of their activity. According to authors (23), the immobilization by adsorption seems to play an important role in the stabilization of the enzymatic protein conformation and its resistance to the thermal denaturation.

Effect of solvents

Inclusion technique leads to enzyme leakage for this reason the lipase immobilized by adsorption was retained to study the effect of solvents.

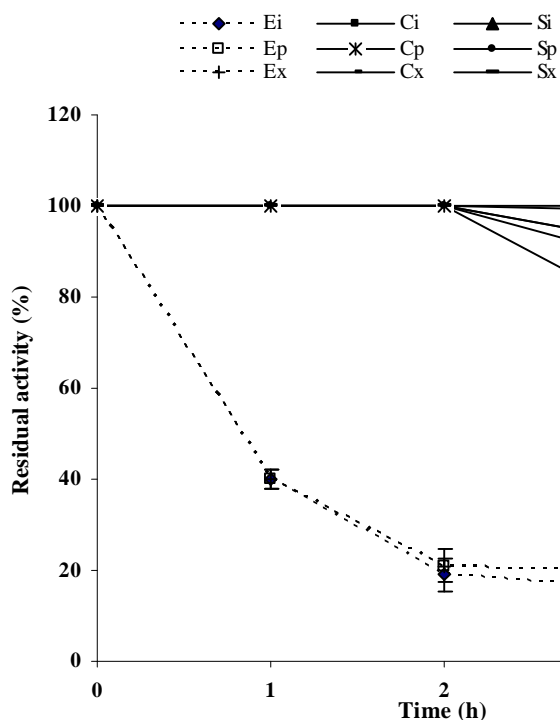


Fig.7 Effect of three solvents on immobilized and free *Y.L* lipases; Ei, Ep, Ex free enzyme in Isooctane, n-Heptane and n-Hexane respectively, Ci, Cp, Cx immobilized enzyme on celite in Isooctane, n-Heptane and n-Hexane, Si, Sp, Sx immobilized enzyme on silica gel in Isooctane, n-Heptane and n-Hexane.

Figure 7 summarizes the effect of various three solvents on immobilized and free lipase. The lipase exhibits higher activities when it was immobilized on silica gel and celite compared to free form. Free lipase loses 80 % of its activity in isooctane, n-hexane and n-heptane while immobilized enzymes retain 80 % of their activities after 4 hours in the solvents which is in agreement with earlier studies (24). In fact, it is well known that the polarity of the organic solvents employed for the esterification reaction affects negatively the enzyme activity (25). It is generally recommended to use solvents with a $\log P > 4.0$ (non-polar). The higher enzymatic activity in the non-polar solvent may be attributed to the minimum distortion of the hydration layer around the enzyme by the solvent, whereas the polar solvent, due to its high affinity for water, might remove the essential hydration layer around the enzyme, thus in decreasing enzyme activity.

Immobilized enzyme Reactor

In order to study the use of column in synthesis reaction, esterase activity of the immobilized enzymes (celite and silica gel) has been measured in reactor column by the hydrolyze of a para-nitrophenyl acetate solution. The reusability of immobilized enzymes was examined by using the same enzyme preparation repeatedly, with a fresh amount of substrate (para-nitrophenyl acetate). Adsorbed enzymes showed a light gradual decrease in activity with increasing number of cycles. 80 % of activity could be retained, even after five repeated cycles. Thus, a major drawback of free enzymes could be addressed by immobilization; however, storage of the column at ambient temperature seems to be difficult as immobilized enzymes loss about 50 % of their activities after 4 days of use (data not shown).

Covalent bond: immobilized lipase and storage

From table 4, it can be seen that sepharose column can be employed as support material for a lipase produced by *Y. lipolitica*. An amount of 70 % of free enzyme was immobilized on a proactive column. It is well known that chemical methods including covalent attachment are highly stable (26). However, some authors suggest that these methods have the disadvantage of denaturing the native enzyme during the binding process.

In addition, after repeated use, the immobilized activity only slowly decreased. These catalyst was found to be stable (activity higher than 80 % of the initial immobilized activity) during 5 months (data not shown). Similar results were obtained for immobilization of lipase from *Candida rugosa* in previous work (27). The establishment of covalent bound between the support and the lipase attributes immobilized lipase good stability conformation that permits a long conservation.

Conclusion

Effects of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization techniques on loading efficiency, thermostability, resistance to solvents and ability to reuse were investigated. Three techniques were tested: (a) inclusion in alginate gel and chitosan, (b) adsorption in celite and silica gel and (c) immobilization by covalent bound. Lipase activity at alkaline pH, thermo stability and resistance to solvents were enhanced by immobilization. In addition, lipase immobilization by inclusion does not allow multiple reuses of immobilized enzymes. This might be improved by coating the surface of beads with polymeric materials. However, adsorption and covalent bound allow a multiple reuse of the immobilized enzymes during a long period. These results are very promising for the use of the enzyme in interesterification or transesterification processes.

Acknowledgements

The authors thank the government of Ivory Coast for the financial support of this work via the scholarship. We also wish to thank Prof. Yves Poumay, Mr Yves Houbion, and Mr Renaud Vigneron of Scanning Electron Microscopy services at University of Namur (Belgium) for their valuable support and technical assistance.

References

1. DeSantis, G., Jones, J.B. (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 324-330.
2. Mozhaev, V.V. (1993), *Trends Biotechnol.* **11**, 88-95.
3. Telefoncu, A., Dinckaya, E., Vorlop, K.D. (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **26**, 311-317.
4. Pencreac'h, G., Leullier, M., Baratti, J.C. (1997), *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 181-189.
5. Balcão, V.M., Paiva, A.L., Malcata, X.F. (1996), **18**, 392-416.

6. Ivanov, A.E., Schneider, M.P. (1997), *J.Mol.Catal. B: Enzym* **3**,303-309.
7. Bellezza, F., Cipiciani, A., Costantino, U. (2003), *J. Mol. Catal. B: Enzym* **26**, 47-56.
8. Gandhi, N.N., Iyyalakshmi, V.V., Sawant, B., Joshi, J.B. (1996), *Chem. Eng. J.* **61**, 149-156.
9. Bryjak, J., Bachmann K., Pawłow B., Maliszewska I., Trochimczuk A., Kolarz M.N. (1997), *Chem. Eng. J.* **65**, 249-256.
10. Khare, S.K., Nakajima M. (2000), *Food Chem.* **68**,153-157.
11. Destain, J., Roblain, D., Thonart, P. (1997), *Biotechnol. Lett.* **19**,105-107.
12. De Oliveria, D., Feihmann, A.C., Dariva, C., Cunha, A.G., Bevilaqua, J.V., Destain, J., Vladimir Oliveira, J., Freire, D.M.G. (2006), *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **39**, 117-123.
13. Betigeri, S., Neau, S.H. (2002), *Biomaterial.* **23**, 3627-3636.
14. Wang, H., Hou, W., Chi-Tang, H., Weng, X. (2006), *Food Chem.* **97**, 661-665.
15. Won, K., Kim S., Kim, K-Je., Park, H.W., Moon, S-Jin (2005), *Process Biochem.***40**, 2149-2154.
16. Durand, G., Monsan, P. Hermando, S (1974), *Biotechnol.* 342pp.
17. Patil, R.T., Speaker, T.J. (1997), *J. microencapsul* **14**, 469-474.
18. Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., Bugarski, B, (2002), *Process Biochem* **38**, 313-318.
- 19 Fadnavis, N.W., Sheelu, G., Kumar, B.M., Bhalerao, M.U., Deshpande, A.A. (2003), *Biotechnol Prog* **19**, 557-564.
20. Fernández-Hervás, M.J., Holgado, M.A., Fini, A., Fell, J.T. (1998), *Int J Pharm* **163**, 23-34.
21. Munjal, N., Sawhney, S.K. (2002), *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 613-619.

22. Matsumoto, M., Ohashi, K. (2003), *Biochem. Eng. J.* **14**, 75-77.
23. Deng, H., Xu, Z., Liu, Z., Wu, J., Ye, P. (2004), *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 437-443.
24. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987), *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87.
25. Hari Krishna, S., Divakar, S., Prapulla, S.G., Karanth, N.G. (2001), *J. Biotechnol.* **87**, 193-201.
26. Hilal, N., Nigmatullin, R., Alpatova, A. (2004), *J. Membr. Sci.* **238**, 131-141.
27. Bayramoglu, G., Kaya, B., Arica, M.Y. (2005), *Food Chem.* **92**, 261-268.

Chapitre 5:

Etude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de *Yarrowia lipolytica*

I Introduction

Une nouvelle ligne d'enzymes microbiennes est développée par Solvay Pharma et Novozyme pour le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine (IPE). Le but de cette coopération est de lancer une série d'enzymes digestives de la nouvelle génération, en complément de la gamme actuelle de Solvay Pharma. Les travaux en sont au stade initial avec la préparation des premières études toxicologiques, qui seront suivies par des études cliniques. Solvay possède une expertise en matière d'enzymes pancréatiques avec le Créon®, qui est la préparation d'enzymes pancréatiques la plus prescrite au monde. Le Créon® est une gélule à microgranules gastrorésistantes d'extrait d'enzymes pancréatique de porc. Les microgranules de Créon® ont été enrobés à l'aide de phtalate de méthylhydroxypropylcellulose (polymère entérique). Le Créon® contribue à une meilleure digestion et aide les patients qui souffrent d'insuffisance pancréatique exocrine en raison de la mucoviscidose, d'une pancréatite chronique ou suite à une intervention chirurgicale sur le pancréas. Cependant, l'utilisation d'extrait animal en médecine humaine est de moins en moins tolérée, en raison des problèmes de contamination que cela comporte. Une voie très prometteuse suivie actuellement est le remplacement de ces lipases d'origine porcine par des lipases d'origine microbienne résistantes aux protéases, actives en milieu acide et en présence de sels biliaires. Jusqu'à présent, seules les lipases de *Rhizopus arrhizus* et celle d'*Aspergillus niger* sont utilisées dans le traitement de la pancréatite chronique. Cependant, ces enzymes ont comme inconvénient majeur d'être partiellement inactivées par les sels biliaires et d'être sensibles aux protéases. C'est dans cette problématique que se situe cette partie de notre travail qui vise à utiliser la lipase extracellulaire de *Y. lipolytica* comme substitut de lipase pancréatique. Cette enzyme est plus stable en milieu acide que basique. Cependant, elle n'est pas suffisamment résistante à bas pH que pour être utilisée comme enzyme digestive sans protection. Ce chapitre propose

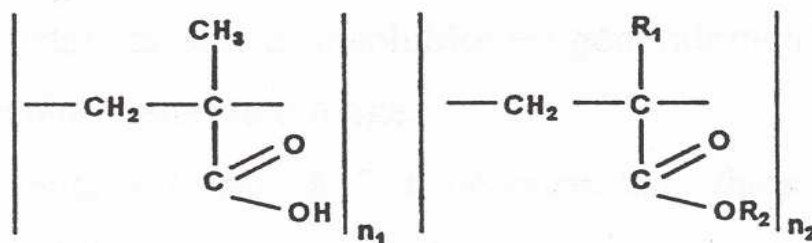
une technique d'enrobage de la lipase à l'aide de polymères acryliques tels que les Eudragits entérosolubles. En effet les polymères acryliques et leurs dérivés, collectivement connus sous le nom commercial d'Eudragit®, sont les principaux polymères synthétiques utilisés pour l'enrobage des formes galéniques. Pour former des films sur les surfaces des formes pharmaceutiques, ils sont appliqués en tant que solutions ou de dispersions de polymères. Les propriétés physiques des dispersions filmogènes peuvent potentiellement exercer une influence dans les étapes du processus d'enrobage (Lehmann et Dreher, 1973; Ghebressellassie *et al.*, 1997). Parmi les additifs qui sont incorporés aux dispersions de polymères aqueuses filmogènes, le plastifiant est le composant le plus important. L'incorporation d'un plastifiant pour des formulations des dispersions d'enrobage est fonction des températures de transition vitreuse des polymères (Fukumori *et al.*, 1988). L'Eudragit® L30D-55 faisant l'objet de notre étude dans ce chapitre est un copolymère d'acide méthacrylique pouvant être appliqué sous forme de latex dans des conditions douces de travail. Avec l'addition d'un plastifiant approprié à 10–20%, même à la température ambiante une bonne formation de film peut être obtenue (Lehmann, 1997). Des études ont porté sur l'utilisation des dispersions d'Eudragit pour l'enrobage et l'immobilisation des lipases (Bryjak *et al.*, 1997).

Ce chapitre s'est consacré plus particulièrement à la réalisation des formes galéniques (comprimés, gélules et microcapsules) à base de lipase de *Yarrowia lipolytica*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Pharmacie galénique de l'Université libre de Bruxelles.

Le tableau 1 montre les différents types de polymères acryliques entérosolubles et leurs propriétés.

Tableau 1 : Structure chimique et quelques propriétés des copolymères d'acide méthacrylique

(Amighi, 1995)



Copolymères d'acide méthacrylique

Nom scientifique	$n_1:n_2$	PM	R_1	R_2	Comportement dans les liquides du TGI	Nom commercial
Poly (acide méthacrylique, ethylacrylate)	1:1	250.000	H	C_2H_5	Entérosoluble, pH >5.5	Eudragit® L30D-55, L100-55
Poly (acide méthacrylique, méthylméth-acrylate)	1:1	135.000	CH_3	CH_3	Entérosoluble, pH >6.0	Eudragit® L100
Poly (acide méthacrylique, méthylméth-acrylate)	1:2	135.000	CH_3	CH_3	Entérosoluble, pH >7.0	Eudragit® S 100, FS30D

TGI : Tractus gastrointestinal

II. Matériel et méthodes

Différents formes galéniques ont été préparées à partir d'une poudre de lipase de *Yarrowia lipolytica* LGx6481: les gélules, les comprimés et les poudres encapsulées. Les gélules ont été d'abord testées car elles consomment peu de produits.

II.1 Les gélules

Les gélules ont été remplies à l'aide du système ProFill de remplissage de gélules. La masse totale d'une gélule après remplissage était de 400mg.

II.2 Comprimés

II.2.1 Fonctionnement de la comprimeuse Korsh

La fabrication des comprimés à base de lipase de *Y.l* s'est réalisée à l'aide d'une comprimeuse alternative Korsh EKOD (Korsh, Berlin, Allemagne). La comprimeuse est munie d'un quartz piézo-électrique, qui fournit la mesure de la force reçue par le poinçon inférieur lors de la compression ; ce quartz est relié à un système d'amplification linéaire de charge Kistler 5007 (Kistler Instrument, Suisse) qui convertit les charges apparues sur le quartz en une différence de potentiel qui l'amplifie.

II.2.2 Préparation de la formulation pour réaliser les comprimés

Pour 60 g de poudre totale, 30 g de lipase en poudre (97% de MS) (dilution à 50%) sont additionnés de 2.5 g de polyplasdone XL (GAF, Angleterre) (agent de désintégration), 0.2 g d'aérosil 200 (silice colloïdale, Degussa AG, Allemagne) (agent d'écoulement), et enfin de 26.3 g de lactose DCL11 (DMV, Hollande). L'ensemble est mélangé dans un mortier, homogénéisé dans un mélangeur Turbulat (SOHATZ, Suisse) pendant 15min et ensuite additionné de 1g de stéarate de magnésium (Merck, Allemagne) (lubrifiant). La poudre finale est mise dans la comprimeuse alternative Korsh EKOD pour la fabrication des comprimés (36 comprimés /min) en utilisant des poinçons convexes de 5 mm de diamètre.

II.3 Microencapsulation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*

La microencapsulation est un procédé par lequel on emprisonne un composé dans des microparticules. La taille des microparticules varie de 1 µm à plus de 300 µm. La technique permet non seulement d'emprisonner l'enzyme dans une particule qui l'isole du milieu et la

protège, mais permet également (pour une application pharmaceutique) de contrôler la libération de l'enzyme soit par dissolution de la capsule, soit par diffusion lente et progressive à travers la particule. Les microcapsules peuvent également être séparées d'un milieu de réaction par filtration puis réutilisées. Ces techniques développées pour l'immobilisation des enzymes sont comparables à celles appliquées à l'immobilisation des protéines, des anticorps, et des hormones.

Deux techniques de microencapsulation ont été réalisées : une technique sans solvant et l'autre avec l'isopropanol.

II.3.1 Procédé d'encapsulation de la lipase *Yarrowia lipolytica* sans solvant organique

La méthode 1 basée sur celle de Krasaekoopt et *al* (2003), réalisée sans solvant organique a utilisé une dispersion composée de lipase (50 ml), d'huile de paraffine (2%), du Tween 80 (0.2%) et d'Eudragit L30D-55 (20 ml). Après lyophilisation, la poudre obtenue a été utilisée pour des tests de résistance à pH acide (2-4).

II.3.2 Procédé d'encapsulation de la lipase *Yarrowia lipolytica* en présence de solvant

L'Eudragit L100 -55 (6 g) est mis en suspension dans 100 ml d'isopropanol en présence de 0.5 g du diethyl phtalate. 6 g de lipase sont mises en suspension dans le mélange Eudragit L100 -55 - isopropanol. Le tout est séché à l'aide d'un atomiseur Spray Dryer (Büchi B-191, Switzerland) avec un débit de 3 g/min. La température d'entrée et de sortie de l'air pour les deux essais sont de (80, 35°C) et (100, 65°C) compte tenu du fait qu'en présence du plastifiant la température de transition vitreuse de l'Eudragit (110°C) diminue.

II.4 Enrobage

Les différents polymères acryliques pour enrobage, commercialisés sous forme de dispersions colloïdales aqueuses ou de poudres, dont les propriétés sont décrites dans le tableau 1 ont été fournis par la firme Evonik Degussa (Darmstadt, Allemagne).

II. 4.1 Préparation de la dispersion d'enrobage des gélules par la méthode de trempage

Les gélules ont été dans un premier temps enrobées par trempage à l'aide d'un dispositif Feton SA International (Bruxelles, Belgique) dans une dispersion contenant 50/50 isopropanol/acétone (Merck, Belgique), 10% de diethyl phatalate (Merk, Allemagne) et de 7% d' Eudragit® S100 ou d'Eudragit® L100-55.

Le dispositif Feton étant strictement réservé à un usage à l'échelle du laboratoire, l'utilisation du lit d'air fluidisé (Uni Glatt, Glatt® GmbH, Allemagne) de contenance maximale d'environ 1.5kg et équipé d'un système de pulvérisation par le bas de type Wurster a été envisagé pour la suite des nos travaux.

II .4.2 Préparation de la dispersion d'enrobage par la méthode du lit d'air fluidisé

Dans un premier temps, on prépare une suspension contenant les différents composants de la formulation d'enrobage, à l'exception de l'agent filmogène acrylique et du plastifiant. L'agent anti-adhérent (talc) (Aldrich Chemical Ltd, GB) est dispersé, à l'aide d'un Ultra-Turrax (type T45, max. 10.000 tr/min, IKA-Werk), dans une quantité suffisante d'eau distillée (min. 400 g) en présence de l'émulsion de silicone (Vel S.A.) (agent anti-mousse). L'addition du polymère entérosoluble, l'Eudragit L30D-55 (environ 333 g) se fait sous agitation. Le plastifiant diethyl phthalate (Merk, Allemagne) est additionné, lentement et sous faible agitation magnétique, à la

dispersion polymérique. Enfin, le mélange total est amené au poids désiré (800 g) avec de l'eau distillée.

L'enrobage est réalisé par la méthode du lit d'air fluidisé avec les températures d'entrée et de sortie de l'air (45 et 30°C) en raison de 6 g /min de dispersion. Avant et après enrobage les échantillons sont pesés afin de déterminer le pourcentage de film d'enrobage.

II. 5 Tests et essais galéniques

Les comprimés ou gélules produits sont soumis à différents tests décrits selon la Pharmacopée Européenne (4^{ème} édition, 2002).

Test de dureté

Le test de dureté est réalisé à l'aide du duromètre de type Computest (Zurich, Allemagne). La dureté d'un comprimé est appréciée par rapport aux tests de friabilité et de désagrégation dans l'eau.

Test de l'uniformité de masse

Le test de l'uniformité de masse s'est réalisé sur 20 comprimés selon (Pharmacopée Européenne, 2002). L'écart limite doit être de 10% pour les comprimés de masse inférieure à 80mg.

Test d'effritement ou de friabilité

Le test d'effritement ou de friabilité est effectué sur 10 comprimés à l'aide d'un tambour rotatif (25±1tr/min). La friabilité doit être inférieure à 1%.

Test de désagrégation dans l'eau

Les tests de désagrégation des comprimés non enrobés dans l'eau sont réalisés sur 6 comprimés. Le temps nécessaire à la désagrégation du comprimé ou de la gélule est mesuré et comparé aux normes de la Pharmacopée; pour la plupart des composés il doit être de 15

minutes au maximum. Six comprimés ou gélules sont placés dans un appareil approprié selon les normes de la Pharmacopée Européenne, 2002

Test de gastro-résistance et de délitage en milieu intestinal.

Les comprimés ou gélules enrobés sont placés dans un appareil approprié (Pharmacopée Européenne 2002). Six comprimés ou gélules sont placés dans les tubes du dispositif qui contenaient une solution d'acide chlorhydrique (250 ml) à 0.1mol/l à 37°C. Au terme d'une période de fonctionnement de 2 heures, les échantillons sont observés.

Pour le test de délitage, la solution d'acide est remplacée par un tampon phosphate de pH 6.8. Six comprimés ou gélules sont placés dans les tubes du dispositif qui contenaient le tampon pendant une période de fonctionnement de 60min.

III. Résultats et discussion

III.1 Etude comparative entre le Créon et les gélules à base de lipase de *Yarrowia lipolytica*

Rappelons que le Créon est le produit de référence composé d'enzymes digestives dont la lipase. Le tableau 2 montre une étude comparative des tests enzymatiques et galéniques entre le Créon (enzyme digestive pharmaceutique) et les gélules de lipase

Tableau 2: Test comparatif entre la lipase et le Créon réalisé *in vitro*

Produits	Act enzy U/g initiale	Test de gastrorésistance pH 1 (min)	Test de délitage au pH 6.8 (min)	Act enzy après test acide U/g (pH =7)	Act enzy après 8mois à 20°C
Gélule de <i>Y.l</i> 300 mg	13000±2102	+120 Vr =120	17±1 Vr = 60	13000±1600	13200±1800
Créon 150 mg	6800±200	+120	16±2	6800±250	6800±205
Lipase simple	13000±2000	0	-	0	13005±1650

Act enzy : activité enzymatique, Vr = valeur de référence, - = pas de test de délitage

Les résultats obtenus montrent que l'enrobage est très efficace et homogène car les gélules résistent au pH acide pendant plus de 2h. Par contre la lipase simple perd la quasi-totalité de son activité. Les résultats des tests galéniques de gélule de lipase sont proches de ceux observés avec le Créon 150 mg commercialisé.

Après 8 mois de conservation à la température ambiante, les gélules conservent leur activité enzymatique. Les gélules enrobées ne peuvent pas être extrapolées au niveau industriel, d'autres formes galéniques ont été envisagées: comprimés ou microcapsules.

III.2 Etude comparative entre le Créon et les comprimés à base de lipase de *Yarrowia lipolytica*

Les résultats des tests galéniques sont représentés dans le tableau 3

Tableau 3 : Tests galéniques réalisés sur les comprimés

Produit	Test de dureté (N)	Uniformité de masse (mg)	Test de perte effritement	Test de désagrégation à l'eau (min)
Lipase en comprimés non enrobés	10±3	60.5± 0,08 Velr =10%	0 Vr < 1%	6±1 Vr = 15

Velr : valeur écart limite de référence Vr = valeur de référence

Le tableau 3 montre que les comprimés sont conformes aux normes décrites par la Pharmacopée Européenne. Pour permettre leur utilisation en tant que complément d'enzymes digestives, les comprimés ont été enrobés par l'Eudragit L30D-55. Après l'enrobage des comprimés les résultats des tests sont représentés dans le tableau 4

Tableau 4 : Test comparatif entre la lipase en comprimés et le Créon150mg

Produits	Activité enzy initiale U/g	Test de gastrorésistance pH 1 (min)	Test de délitage au pH 6.8 (min)	Activité enzy après test acide U/g	Activité enzy après 8mois à 20°C
Comprimés de <i>Y.l</i> 30 mg	13000±2102	+120	18±2	13000±2000	13500±1650
Créon 150 mg	6800±200	+120	16±1	6800±185	6700±215
Lipase simple	13000±1800	0	-	0	12700±1550

Les résultats montrent que la lipase de *Yarrowia lipolytica* sous forme de poudre peut être comprimable en présence des excipients utilisés. L'enrobage s'est avéré positif car les comprimés résistent au pH gastrique (1) et l'enzyme garde son activité après le test de gastrorésistance. Les résultats sont proches du Créon 150 mg.

Après 8 mois de conservation les comprimés gardent leurs activités enzymatiques. Cela peut laisser croire que l'activité lipolytique n'est pas détruite en présence des excipients.

III.3 Etude comparative entre le Créon et les poudres encapsulées à base de lipase de *Yarrowia lipolytica*

Les essais réalisés sur les poudres de lipase obtenus par la méthode 1 (sans solvants organique) ont montrés que la lipase encapsulée conservait 20% de son activité à pH 2. Les résultats n'étant pas très satisfaisants, notre étude s'est donc axée sur la recherche d'une technique d'encapsulation plus fiable.

Le tableau 5 montre une étude comparative entre les poudres encapsulées et le Créon

Tableau 5 : Test comparatif entre la lipase encapsulée et le Créon réalisé *in vitro*

Produits (T° entrée de l'air et de sortie)	Activité enzy (U/g) de la poudre encap	Test de gastrorésistance pH acide (min)	Activité après test acide (U/g)	Activité enzy après 8mois à 20°C
Poudre 1 (80°C, 35°C)	10300±1250	+120	8300±700	6000±300
Poudre 2 (100°C, 65°C)	11650±1350	+120	11000±1150	12000±1200
Créon 150 mg	6800±210	+120	6800±185	6700±200
Lipase simple brute	18000±2100	0	0	18500±1550

Les résultats du tableau 5 montrent que la température d'entrée et de sortie de l'air respectivement 100 et 65°C semble être plus appropriées pour l'encapsulation de la lipase de *Y.l* car le rendement en activité est de 65% (11650/18000). Ce rendement en activité s'explique par le fait qu'il y a une légère destruction de l'enzyme au cours du séchage et en

présence du solvant car l'effet de l'isopropanol sur l'activité enzymatique a montré une perte d'environ 33%.

IV. Conclusions et perspectives

L'étude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de *Yarrowia lipolytica* a montré que cette enzyme présente des capacités à se mettre sous certaines formes galéniques : comprimées, gélules, et microcapsules. Cette enzyme en comprimé conserve son activité après 8 mois en présence des excipients utilisés. Ces résultats devraient être extrapolables à l'échelle industrielle car les essais réalisés in vitro sont similaires à ceux obtenus avec le Créon 150 mg déjà commercialisé.

En vue de permettre l'utilisation de cette lipase sous forme de comprimés pharmaceutiques, il serait très important de réaliser une étude de la stabilité des formes galéniques selon les normes internationales ICH (International Conferences on Harmonisation) dans des conditions de température et d'humidité standardisées. De plus, une optimisation des formulations et des procédés de fabrication, ainsi qu'une validation des méthodes analytiques devraient être effectuées avant d'envisager une évaluation in vivo par la suite.

Sur les poudres microencapsulées, l'étude de la détermination des résidus de solvants devrait être réalisée par CPG.

V. Références bibliographiques

Amighi, K. (1995) Etude de l'influence des paramètres de formulation, de fabrication et de conservation sur les propriétés de formes orales multiunitaires à libération prolongée, enrobées à l'aide des dispersions aqueuses de polymères acryliques. Thèse de Doctorat. Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, Université libre de Bruxelles. 299p

Bryjak, J. Bachmann, B. Pawlow, I. Melizewska, A. Trochimczuk and M.N. Kolarz, (1997). Immobilization of lipase on various acrylic copolymers, *Chem. Eng. J.* **65**, 249–256.

Fukumori, Y., Yamaoka, Y., Ichikawa, H., Takeuchi, Y., Fukuda, T., Osako, Y. (1988). Coating of pharmaceutical powders by fluidized bed process. IV. Softening temperature

Of acrylic polymers and its relation to film-formation in aqueous coating. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 427–493.

Ghebre-Sellassie, I., Nesbitt, R.U., Wang, J. (1997). Eudragit aqueous dispersions as pharmaceutical controlled release coatings. In: McGinity, J.W. (Ed.), aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms. Marcel Dekker, New York, 267–286.

Lehmann, K. (1997). Chemistry and application properties of polymethacrylate coating systems. In: McGinity, J.W. (Ed.), aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms. Marcel Dekker, New York, 101–176.

Lehmann, K., Dreher, D (1973). The use of aqueous synthetic polymer dispersions for coating pharmaceutical dosage forms. *Drugs Germany* **19**, 126–136.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* **13**, 3-13.

Chapitre 6:

**Application de la lipase de *Yarrowia lipolytica* dans
le traitement d'effluents**

Publication VI :

Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives

M. ALLOUE, J-M. ALDRIC, J. DESTAIN, Y.BOUTAHIR, P.THONART

Publication parue dans Tribune de l'eau vol 58-N° 636/4 (2005)

Résumé

Titre : Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives

Résumé : Cette étude met en évidence un essai de traitement biologique aérobie de la fraction grasse d'un effluent de l'industrie des olives.

Les matières grasses décantées de l'effluent contiennent 38 % de matières extractibles à l'hexane et sont composées principalement de glycérides. Des essais en réacteur de 2 l agité et aéré ont permis de démontrer la capacité de *Yarrowia lipolytica* et de sa lipase à éliminer les matières grasses. La vitesse d'élimination des matières grasses dans le réacteur inoculé à la concentration 10^5 cellules/ml est faible ($0,07 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) mais est nettement améliorée lors de l'adjonction de la lipase de *Y. lipolytica* ($0,14 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Pour une densité d'inoculum de 10^7 cellules/ml, la vitesse moyenne d'élimination est plus importante ($0,24 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et est encore légèrement améliorée par ajout de la lipase ($0,30 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives

M. ALLOUE J-M. ALDRIC J. DESTAIN Y.BOUTAHIR P.THONART

Centre Wallon de Biologie Industrielle Unité de Bio-industries Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2B-5030 Gembloux, Belgique.

Correspondance de l'auteur: Tel: +32/ 81622305, Fax: + 32/81614222

Adresse e-mail: bioindus@fsagx.ac.be

Résumé

Cette étude met en évidence un essai de traitement biologique aérobie de la fraction grasse d'un effluent de l'industrie des olives.

Les matières grasses décantées de l'effluent contiennent 38 % de matières extractibles à l'hexane et sont composées principalement de glycérides. Des essais en réacteur de 2 l agité et aéré ont permis de démontrer la capacité de *Yarrowia lipolytica* et de sa lipase à éliminer les matières grasses. La vitesse d'élimination des matières grasses dans le réacteur inoculé à la concentration 10^5 cellules/ml est faible ($0,07 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) mais est nettement améliorée lors de l'adjonction de la lipase de *Y. lipolytica* ($0,14 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Pour une densité d'inoculum de 10^7 cellules/ml, la vitesse moyenne d'élimination est plus importante ($0,24 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et est encore légèrement améliorée par ajout de la lipase ($0,30 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Mots clés: Effluent, matière grasse, lipase, *Yarrowia lipolytica*, starter

Abstract

This study lies within the scope of an aerobic biological treatment of the fatty fraction of a sewage of the industry of olives.

The elutriated fat of the sewage contain 38% of MEH to the hexane and are composed mainly of glycérides. Experiments in a 2 l stirred batch reactor and made it possible to show the capacity of the *Yarrowia lipolytica* and its lipase to eliminate the fat content from the OMW. The rate of elimination of the fat content in the reactor inoculated with the concentration 10^5 cells/ml is less significant ($0,07 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) but it is clearly improved at the time of the addition of lipase from *Y. lipolytica* ($0,14 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). For a density of inoculum of 10^7 cells/ml, the rate of elimination is more significant ($0,24 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and is slightly improved by addition of lipase ($0,30 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Key words: Sewage, fat matter, lipase, *Yarrowia lipolytica*, chokes

1 INTRODUCTION

Bien que la production de l'olivier soit répartie sur les cinq continents, elle est surtout prédominante dans la zone du Bassin Méditerranéen qui représente 98% de la surface des arbres en production et 97% de la production totale d'olives. La production d'huile d'olive se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, Syrie, Tunisie et Maroc. La production de ces pays représente 94% de la production mondiale (Dagga *et al*, 2000).

Les huileries et les industries d'olive sont confrontées à la problématique de traitement de leurs effluents. Les margines notamment sont des eaux très polluantes. Elles colorent les eaux et leur très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer. La pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Benyahia et Zein, 2003).

Les processus de traitement des effluents peuvent être : physique, physico-chimique ou biologique. Les traitements physiques et physico-chimiques incluent les processus thermiques (évaporation et incinération), floculation/clarification, ultrafiltration et osmose inverse. Les traitements biologiques quant à eux peuvent être effectués en anaérobie ou en aérobie. Les premiers exploitent des microorganismes qui n'exigent pas d'oxygène pour dégrader les polluants alors que les autres font appel à une source d'oxygène (Rozzi et Malpei, 1996).

Y. lipolytica est une levure aérobie stricte que l'on trouve dans le sol, les effluents, les matières riches en lipides et en protéines tels les fromages et les saucissons. Son métabolisme est exclusivement respiratoire (Finogenova, 1995). Elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats : alcanes, lipides, acides gras, alcools, sucres, comme seule source de carbone. A partir de ces substrats carbonés, *Y. lipolytica* est capable de produire de la biomasse, des acides organiques tels que l'acide citrique, ainsi que des enzymes extracellulaires : protéases alcaline et acide, RNAses, phosphatases, ainsi que des lipases et des estérases (Barth et Gaillardin, 1997). Les travaux réalisés au laboratoire du Centre Wallon de Biologie Industrielle par Destain (1998) ont montré une augmentation des rendements de production de l'enzyme par modification de la souche sauvage 6303 de *Y. lipolytica* par mutagenèse non dirigée. Ces travaux ont permis d'isoler le mutant LGx 6481 produisant, en fermenteur, une activité enzymatique de 1000U/ml de surnageant de culture. La mutation semble avoir agi au niveau du système de régulation de l'expression de l'enzyme.

Fickers en 2004 a isolé la souche de *Y. lipolytica* JMY1105 par mutation sur le gène (LIP2) de régulation de la lipase extracellulaire chez la souche LGx6481. Dans la problématique des bacs à graisse les lipases hydrolysant des lipides en glycérol et en acides gras, ont accéléré le processus de dégradation et réduit le problème de colmatage causé par les graisses. (Thonart *et al* ; 1997).

Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt des différents microorganismes dont la levure de *Yarrowia lipolytica* dans le traitement de biodégradation aérobie et de détoxification des margines. Lanciotti *et al.* (2005), Papanikolaou et Aggelis (2002) ont particulièrement indiqué *Y. lipolytica* comme un bon candidat pour la purification des effluents et la réduction de la pollution.

L'objet du présent travail consiste à tester l'aptitude de la levure de *Y. lipolytica* JMY1105 isolée dans le laboratoire du Centre Wallon de Biologie Industrielle d'une part à dégrader les matières grasses d'un effluent de l'industrie des olives dans un bioréacteur de 2l, d'autre part à étudier l'effet synergique de sa lipase dans le processus de dégradation.

2 MATERIEL et METHODES

2.1 Culture de *Yarrowia lipolytica*

La souche utilisée *Y. lipolytica* JMY1105 est issue de la collection du CWBI.

Des précultures sont préparées dans des fioles de 250ml contenant 100 ml de milieu 863 stérile (Glucose monohydrate, (2%) ; Extrait de levure (1%) ; Peptone de caséine (1%)) inoculées à partir d'une cultures sur milieu solide. Ces précultures sont incubées à 30°C sous agitation à 130 rpm pendant 16h.

Ensuite, des fioles de 2 l contenant 500ml de milieu 863 stérile sont inoculées avec les précultures précédentes et sont incubées dans les mêmes conditions pendant 48h. Les cultures sont ensuite centrifugées et les culots obtenus sont lavés à l'eau physiologique avant de les utiliser pour inoculer le réacteur

2.2 Préparation des déchets graisseux

2.2.1 Echantillonnage des déchets graisseux

Les déchets graisseux sont issus de l'industrie des olives. Ils ont été prélevés en tête de station d'épuration.

2.2.2 Fractionnement des déchets graisseux

Après homogénéisation des échantillons de 1Kg sont pesés dans des berlins gradués et portés à 70°C. Le contenu décante jusqu'à la séparation en trois phases distinctes. La phase supérieure contenant les matières grasses constitue la matière grasse décantée (MGD), la phase du milieu étant constituée essentiellement d'eau, la phase inférieure est formée d'un culot de matières décantables

La matière grasse décantée constitue la matière première mise en œuvre dans les réacteurs.

2.2.3 Extraction des matières grasses

L'extraction à l'hexane se fait en présence de 50 g de matière grasse décantée (MGD) dans 60ml d'hexane (VWR International Prolabo Leuven Belgique) durant 30 minutes. La phase d'hexane est ensuite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à une température de 60°C. Le ballon taré est refroidi et la matière extractible à l'hexane (MEH) est déterminée par pesée. Cette extraction est réalisée deux fois de suite.

2.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl

A 2g de chaque échantillon, on ajoute une pastille de catalyseur Kjeldahl, 10ml d'acide sulfurique concentré et 2ml d'eau oxygénée. Ces échantillons sont digérés dans un minéralisateur par chauffage, selon le programme de température suivant : 20 min à 100°C, 25 min à 185°C, 20 min à 265°C, 30 min à 335°C, 30 min à 440°C.

Après minéralisation, les tubes en verre contenant les échantillons sont refroidis avant d'y ajouter 25 ml d'eau distillée. La distillation est réalisée pendant 5 min en présence de 50ml d'une solution de 500g/l de NaOH. Le distillat est recueilli dans 20 ml d'acide borique (VWR) à 4 %. L'ammoniac recueilli, est titré par H₂SO₄ 0,01N (VWR) en présence du mélange de Tashiro (rouge de méthyle à 0,02% et de bleu de méthylène à 0,1%) comme indicateur.

2.4 Mesure de la proportion d'acides gras libres des MEH

Le dosage des acides gras libres s'est fait par neutralisation au moyen d'une base forte. 50 ml d'éthanol technique neutralisés sont ajoutés à une masse connue de l'échantillon avant titration par NaOH 0,1N, en présence de phénophtaléine, Le pourcentage d'acides gras libres est estimé par la formule suivante :

$$\text{Acides gras libres (\%)} = \text{Volume base} \times N_{\text{NaOH}} \times 282 \times 10^{-1} / (\text{Masse échantillon})$$

282 correspond à la masse molaire de l'acide oléique.

N: Normalité du NaOH.

2.5 Dérivatisation des acides gras

10 mg de MEH sont introduits dans un tube Sovirel ; 0,2 ml d'hexane et 0,5 ml du mélange de transestérification Méthanol-BF₃/Hexane/Méthanol (Sigma B-1252) selon les proportions 25/20/55 (v/v/v) sont ensuite ajoutés et placés sous agitation à 70°C pendant 1h30. Après refroidissement, les esters méthyliques d'AG sont extraits par 8ml d'hexane, 0,2 ml d'H₂SO₄, 0,5ml de NaCl saturé. 1 µl de la phase hexane est injectée en CPG.

2.6 Procédures analytiques

2.6.1 Chromatographie sur couche mince

100mg de la MEH sont dissous dans 5ml de chloroforme. 4 μ l de ce mélange sont déposés pour élution par CCM. Les couches minces sont éluées par l'éluant (éther de pétrole (60-80)/éther diéthylique/acide formique 60/40/1,5 (v/v/v)) (VWR) et séchées à l'air libre. La révélation se fait par aspersion de 2,7 dichlorofluorescéine (2% en solution dans l'éthanol) sur la couche mince.

2.6.2 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur un chromatographe de type HP 5890 séries II muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire utilisée est polaire (HP-INNOWAX) de 30m de longueur, de 0,25 mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de 0,25 μ m. L'injecteur est de type cool on column et le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1ml/min.

Le programme de température du four appliqué est le suivant :

- 55°C à 150°C à raison de 30°C/min ;
- 150°C à 250°C à raison de 5°C/min ;
- 250°C pendant 10 minutes.

La température de l'injecteur suit la même évolution exception faite que la température de l'injecteur est toujours supérieure de 3°C à la température du four.

Les témoins utilisés sont les suivants : acide butyrique (C₄) acide heptanoïque (C₇), acide caprique (C₁₀), acide laurique (C₁₂), acide palmitique (C₁₆), acide stéarique (C₁₈), acide oléique (C_{18:1}), acide linoléique (C_{18:2}) et acide arachidique (C₂₀). Dans cette présente étude, l'acide arachidique, a été choisi comme étalon interne.

Le facteur de réponse de chacun des acides gras par rapport à l'étalon interne est déterminé selon la formule suivante :

$$K = ([X] / \text{Aire X}) \times (\text{Aire acide arachidique} / [\text{acide arachidique}])$$

Il permet la détermination de la concentration en acide gras dans chaque échantillon.

K = facteur de réponse

[X] = concentration massique de chaque acide gras

Aire X = surface de réponse mesurée sur le chromatogramme

2.7 Essai en bioréacteur de 2l

Les essais de biodégradation ont été réalisés en réacteur (Biostat B) de 2l, agité à 130 rpm, doté d'un mobile d'agitation de type TD 6 et aéré (1 vvm). La température est maintenue à 30°C. La quantité de matière grasse décantée ajoutée dans le milieu est telle qu'on se trouve à une concentration proche de 10 g/l en acide gras totaux.

Des quantités d'azote et de phosphore sont ajoutées sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ de manière à respecter un rapport DCO/N/P de 100/2,8/0,6 (g/g/g).

Les réacteurs testés sont inoculés respectivement à l'aide de deux concentrations cellulaires (10^5 et 10^7 cellules/ml de *Y. lipolytica*). Dans le deuxième temps, les mêmes concentrations de cellule sont testées mais en présence, de l'enzyme produite par la souche avec une activité lipolytique de l'ordre de 15.000 U/ml.

1 unité est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour former 1 μmole d'acide gras par minute dans les conditions opératoires choisies de températures: 37°C et pH 7.

Les réacteurs sont suivis en effectuant des prélèvements d'environ 10ml. Ils sont pesés avec précision et additionnés d'acide arachidique en concentration connue (50mg). L'échantillon

est ensuite incubé à 85°C pendant 10 minutes sous agitation puis est ensuite extrait par 20ml d'hexane technique.

La phase hexane est récupérée dans un ballon taré. L'extraction est réalisée deux fois et la totalité de l'hexane est évaporée sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif. La quantité de matière grasse récupérée est pesée et reprise dans de l'hexane de manière à se retrouver dans des concentrations proches de 50 mg/ml. L'échantillon est dérivatisé comme décrit plus haut et injecté en CPG.

3 RESULTATS

3.1 Caractérisation de l'effluent

L'effluent a été caractérisé sous deux formes :

La matière grasse décantée est la fraction grasse flottante du déchet graisseux. Les matières extractibles à l'hexane peuvent être assimilées à la fraction de lipides présents dans l'échantillon. Cette fraction représente $38,6 \% \pm 2,1 \%$ de la matière grasse décantée. Le pH de l'effluent est de 5,7. Ce pH convient parfaitement à la culture de *Yarrowia lipolytica* car elle se développe sur des milieux dont les pH varient de 3 à 8 (Barth et Gaillardin, 1997)

3.2 Pourcentage d'acides gras libres dans les MEH

Le pourcentage d'acides gras libres présents dans les MEH est de 2,4 % ; ce qui indique que la majeure partie de la matière grasse se trouve sous forme de tri et di-glycérides. Ce résultat concorde avec ceux obtenus sur couche mince (figure 1)

3.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl

La mesure de la teneur en azote de la matière grasse décantée permet de nous renseigner sur la nécessité d'un supplément d'azote lors des essais de dégradation de la matière grasse de

manière à respecter le rapport massique DCO/N/P de 100/2,8/0,6 conseillé par Canler (2001).

Les résultats expérimentaux sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Teneur en azote de la matière grasse décantée

N total	0,750 ± 0,01 mg N/g éch.
N ammoniacal	0,068 ± 0,002 mg N/g éch.

Les résultats montrent une faible teneur en azote de la matière grasse décantée. 100 g de matière grasse décantée contiennent environ 40 g de matière extractible à l'hexane ce qui correspond à 115,6 g de DCO. (1g de lipides = 2,89 g de DCO), et 0,075 g d'azote. Il y a donc lieu de rajouter 2.7g d'azote pour respecter le rapport préconisé par Canler, 2001.

3.4 Caractérisation qualitative de la matière grasse des effluents

Deux échantillons de l'effluent sont comparés à un mélange témoin de diglycérides, acides gras libre et triglycérides à l'aide de la chromatographie sur couche mince.

Les résultats de la figure 1 montrent que la matière grasse étudiée est présente sous forme de triglycérides, diglycérides, et acides gras. La taille importante du spot correspondant aux triglycérides par rapport aux autres composés, montre que ceux-ci sont présents en quantité importante. Les triglycérides représentent donc une fraction majoritaire de la matière grasse des effluents.

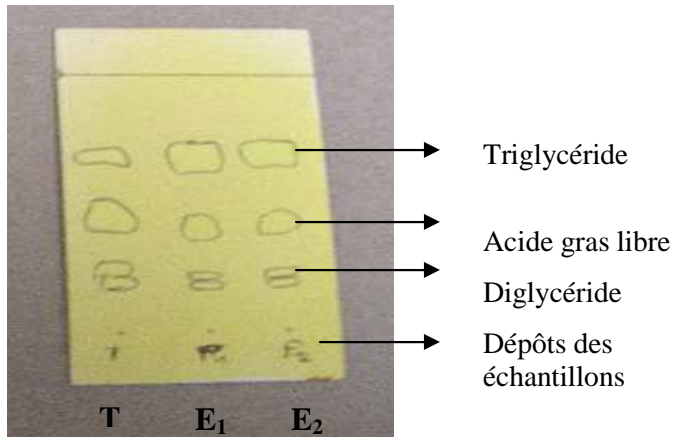


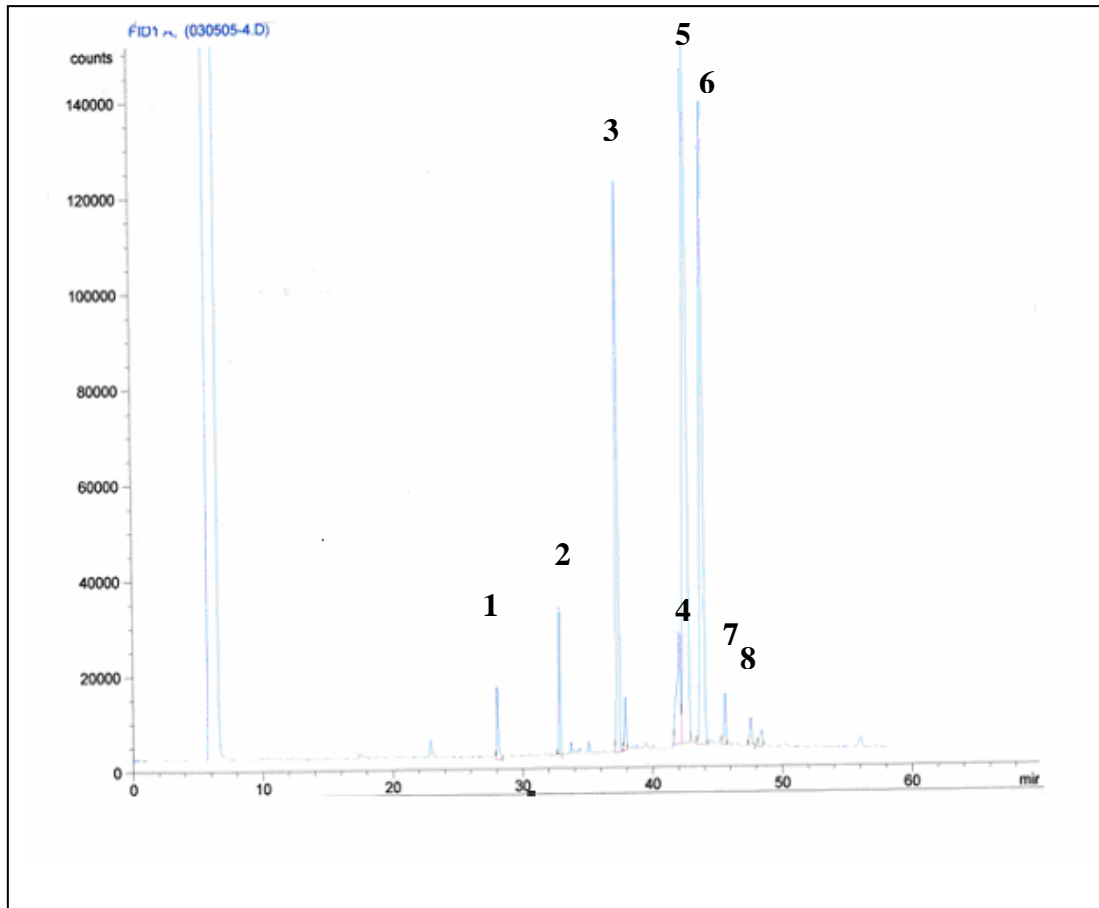
Figure 1 : CCM de la matière grasse décantée issue de l'effluent d'industrie d'huile d'olive par rapport à un mélange des témoins

E₁ et E₂ = échantillons de matière grasse décantée de l'effluent

T = témoin composé de di-triglycerides et acides gras

3.5 Analyse qualitative des matières extractibles à l'hexane : Composition en acide gras.

La chromatographie en phase gazeuse a permis de caractériser la composition totale en acides gras présents dans les matières extractibles à l'hexane (MEH).



La figure 2 : Chromatogramme des acides gras totaux présents dans la matière grasse.

(1) C₁₂ : Acide laurique, (2) C₁₄ Acide myristique, (3) C₁₆ : Acide palmitique, (4) C₁₈ : Acide stéarique
(5) C_{18:1} : Acide oléique, (6) C_{18:2} : Acide linoléique, (7) C_{18:3} : Acide linoléique, (8) C₂₀ : Acide arachidique

La figure 2 présente le chromatogramme des acides gras totaux (voir légende) présents dans la matière grasse. Elle met en évidence quatre acides gras majoritaires : l'acide palmitique (C₁₆), l'acide stéarique (C₁₈), l'acide oléique (C_{18:1}) et l'acide linoléique (C_{18:2}).

Le tableau 2 présente la proportion relative de chacun d'entre eux par rapport à la totalité des acides gras majoritaires et par rapport à la MGD.

Tableau 2: Pourcentage massique des acides gras par rapport à la matière grasse décantée (MGD)

	Ac. palmitique	Ac. stéarique	Ac. oléique	Ac. linoléique	Total des Ac gras majoritaires
% massique des acides gras/ MGD	1,3	0,4 %	11, 2	7,6	20.5
Proportion en acides gras majoritaires (%)	6,5	1,9 %	54,6	36,9	100

De la fraction grasse (MEH) à partir de la matière grasse décantée (38.6%) les acides gras majoritaires représentent 20.5%.

L'acide oléique et linoléique y sont prépondérants, ils représentent respectivement 54,6 et 36,9 %. En réacteur, les essais de dégradations de la matière grasse ont été envisagés en suivant l'évolution des quatre acides gras majoritaires.

3.5 Dégradation de la MGD en bioréacteur aéré

Le premier objectif était de déterminer l'aptitude de *Y. lipolytica* à dégrader seule la matière grasse. Ainsi deux concentrations cellulaires ont été testées, à savoir : 10^5 et 10^7 cellules/ml.

Le deuxième objectif était de suivre la dégradation des matières grasses avec les mêmes concentrations mais en présence de l'enzyme produite par la même souche. La concentration de matières grasses décantée dans le réacteur est de 10g/l et 2.79g/l d'azote.

Quatre types de réacteurs ont été mis en oeuvre. Le profil de dégradation des acides gras totaux dans les différents réacteurs est représenté à la figure 3 et dans le tableau 4.

La figure 3 illustre pour chaque réacteur les taux d'élimination des acides gras totaux sur une durée de 48 heures d'essai.

Le tableau 3 résume pour chaque réacteur les taux (%) d'élimination des acides gras majoritaires obtenus après 16 heures ainsi que la vitesse moyenne d'élimination pendant les 16 premières heures.

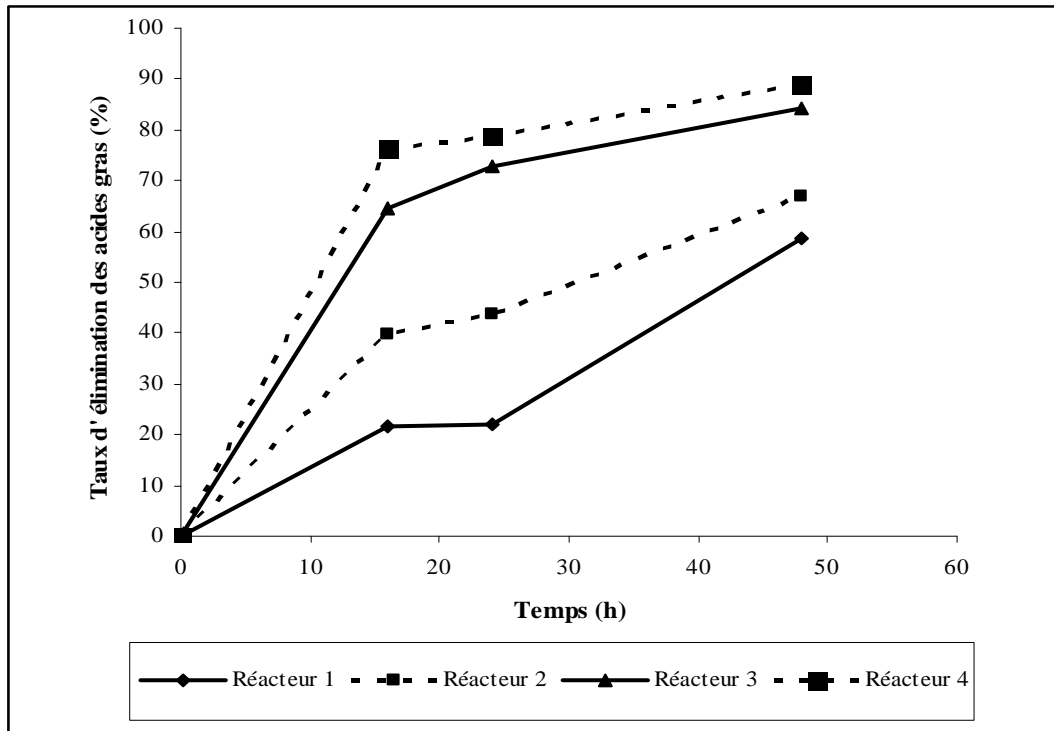


Figure 3: Comparaison des taux d'élimination des acides gras totaux pour les différents types de réacteurs mise en œuvre

- (1) : réacteur inoculé à la concentration de 10^5 cellules/ml ;
- (2) : réacteur inoculé à la concentration de 10^5 cellules/ml + lipase (15.000 U/ml) ;
- (3) : réacteur inoculé à la concentration de 10^7 cellules/ml ;
- (4) : réacteur inoculé à la concentration de 10^7 cellules/ml + lipase (15.000 U/ml).

La figure 3 montre que la dégradation est d'autant plus importante que la densité de l'inoculum est élevée. L'addition de lipase permet d'accélérer le processus de dégradation et de l'augmenter. Au cours des 16 premières heures le taux d'élimination des acides gras passe de 21% à 39 % pour le réacteur1 et de 64 % à 76 % pour le réacteur 3.

Tableau 3 : Bilan des essais de dégradation de la matière grasse

	Réacteur 1	Réacteur 2	Réacteur 3	Réacteur 4
Vitesse de dégr. ($\text{g l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,07	0,14	0,24	0,30
% ac. oléique éliminé	21,73	51,44	60,91	77,18
% ac. Linoléique éliminé	24,10	28,25	74,59	81,14
% ac. palmitique éliminé	4,44	39,13	47,61	53,84
% ac. stéarique éliminé	23,07	31,57	29,41	53,33

L'élimination des quatre acides gras majoritaires montre que les acides gras insaturés (oléique et linoléique) sont nettement plus éliminés que les deux acides gras saturés (palmitique et stéarique).

4 DISCUSSION

Les résultats de cette présente étude démontrent que la souche de *Yarrowia lipolytica* utilisée est capable de se maintenir, de croître dans la matière grasse décantée issue d'un effluent riche en huile et de dégrader cette charge polluante.

Au cours de nos expérimentations deux facteurs ont été étudiés : la concentration de l'inoculum et l'adjonction complémentaire de la lipase.

Les résultats d'élimination des matières grasses décantées par *Y. lipolytica* à la concentration de 10^5 cellules/ml, l'inoculum semble trop faible pour assurer des rendements d'élimination efficace, résultat nettement amélioré par adjonction de lipase au réacteur.

En effet, la lipase accélère l'hydrolyse des glycérides, qui constituent la fraction la plus importante de la matière grasse de l'effluent, en acides gras libres et glycérol et donc facilite l'assimilation subséquente des acides gras par la levure.

En revanche avec la concentration de 10^7 cellules/ml, l'élimination des matières grasses est plus importante.

Les acides gras insaturés (oléique et linoléique) sont mieux éliminés que les deux acides gras saturés (palmitique et stéarique). Papanikolaou et Aggelis (2002) ont mis en évidence une affinité de *Y. lipolytica* pour les mêmes acides gras.

Les courbes d'élimination des matières grasses montrent une élimination rapide au début plus lente ensuite. Conformément à nos observations, Papanikolaou et Aggelis (2002) ont répertorié trois phases distinctes dans les courbes de dégradation. D'abord, ils ont observé une diminution importante des acides gras présents dans le milieu, correspondant à l'accumulation de ceux-ci par *Y. lipolytica*. Une phase de diminution de la quantité d'acides gras consommé par la levure, pour ses réserves lipidiques au cours de cette période. La dernière phase correspond à une légère reprise de consommation des acides gras dans le milieu.

Les résultats de la présente étude sont supérieurs à ceux obtenus par Papanikolaou et Aggelis qui ont travaillé à une température de 29°C sur des essais réalisés en fioles. Cette amélioration des résultats pourrait être due en grande partie à la performance intrinsèque de la souche, à l'aération du réacteur (*Yarrowia lipolytica* est aérobic stricte), et à l'adjonction de la lipase.

5 CONCLUSION

Le traitement des effluents réalisé avec la levure de *Yarrowia lipolytica* montre que cette souche présente une aptitude à dégrader les matières grasses et à assimiler les acides gras libérés lors de leur hydrolyse. Cette étude a montré que la densité de l'inoculum de la souche sélectionnée est un facteur important permettant d'accroître substantiellement le taux d'élimination de la matière grasse par rapport à l'effluent non traité avec la levure. Une densité de 10^7 cellules/ml semble être suffisante pour atteindre des vitesses de dégradation importantes.

L'effet synergique de la lipase sur la biodégradation des matières grasses a également pu être montré. L'enzyme permet l'hydrolyse rapide des triglycérides et accélère le processus de dégradation par le microorganisme.

Enfin, comparativement à la littérature, il a pu être démontré qu'une aération importante au moyen d'un réacteur agité améliore l'efficacité du procédé.

La présente étude pose donc les jalons nécessaires à la mise au point d'un starter mixte original (enzyme –microorganisme) pouvant être utilisé dans un procédé de traitement des effluents gras industriels.

6 REFERENCES

AL-ZUHAIR S., HASAN M. and RAMANCHANDRAN K.B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis palm oil by lipase. *Process Biochem*, 38, pp: 1153-1163.

BARTH G. and GAILLARDIN C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, pp : 219-237.

BENYAHIA N. et ZEIN K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse). 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II). Lausanne, Suisse.

CANLER J.P. (2001). Performances des systèmes de traitement biologique aérobie des graisses. FNDAE n° 24. Document technique. Cemagref Editions.

DESTAIN J. (1998). Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique.

DESTAIN J., ROBLAIN D., THONART Ph. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 19, pp: 105-107.

DI GIOIA D., FAVA F., BERLIN L. and MARCHETTI L. (2001). Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, pp: 619-626.

DI GIOIA D., BARBERIO C., SPAGNESI S., MARCHETTI L. and FAVA F. (2002). Characterization of four olive mill wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 178, pp: 208-217.

FICKERS P. (1999). Optimisation de la production en fermenteur d'une lipase par la levure *Yarrowia lipolytica*. Travail de fin d'études. Université de Liège, Belgique.

FICKERS P. (2004). Etude des lipases extracellulaires de la levure de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Université de Liège, Belgique 118p.

FINOGENOVA T.V. (1995). Oxidative metabolism of *Yarrowia lipolytica* during the growth on alkanes and ethanol and metabolite oversynthesis. In: Proceedings of first *Yarrowia lipolytica* Meeting. Paris-Grignon.

LANCIOTTI R., GIANOTTI A., BALDI D., ANGRISANI R., SUZZI G., MASTROCOLA D. and GUERSONI M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater Biores Technol. 96, pp: 317-322.

PAPANIKOLAOU S. AGGELIS G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Biores Techno. 82, pp: 43-49.

ROZZI A., PASSINO R. and LIMONI N. (1989). Anaerobic treatment of olive mill effluents on polyurethane foam bed reactors. Process Biochem. 24, pp: 68-74.

ROZZI A. and MALPEI F. (1996). Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents. Internat Biodeterio & Biodegrad, pp: 135-144.

SCIOLI C. and VALLARO L. (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. Wat. Res. Vol. 31, No. 10, pp: 2520-2524.

THONART P., DESTAIN J., ANTOINE P. (1997). La problématique de la matière grasse : aspect théorique. Trib de l'eau, 50, n°586/2, pp: 3-9.

THONART P., DESTAIN J., ZGOULI S., ANTOINE P., GODEFROID J. et EVRARD P. (1997). Les bacs à graisse. Une solution aux problèmes des matières grasses pour les PME. Trib de l'eau, 50, n°586/2, pp : 41-46.

Chapitre 7:
Discussion générale et conclusions

Chapitre 7 : Discussion générale et conclusions

Cette étude s'inscrit dans le cadre général du développement industriel de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et concerne plus particulièrement le traitement post-culture de l'enzyme afin de mettre au point des formulations liquides, solides ou immobilisées adaptées à différentes applications dans les secteurs agroalimentaire, environnemental et pharmaceutique.

L'enzyme utilisée dans cette étude a été produite en fermenteur de 500 ou 2000 l à partir de la souche LGx6481 sur un milieu mis au point antérieurement (Destain et al, 1997). Le premier chapitre du travail constitue la synthèse bibliographique. Ce chapitre met l'accent sur les applications des lipases immobilisées.

La formulation de la lipase sous forme de poudre atomisée (chapitre 2) a été inspirée des travaux de Destain (1998) qui avait montré l'intérêt de l'ajout de matières de charges comme la poudre de lait écrémé pour activer l'enzyme et éviter les pertes d'activités durant le séchage et la conservation.

Notre stratégie a été de proposer une formulation exempte de poudre de lait écrémé destinée aux populations déficientes en lactase (Alloue *et al.*, 2007).

Au cours de notre recherche, le chlorure de calcium (0,10, 20 et 30 g/l), la maltodextrine (120 g/l) et la gomme arabique (60 g/l) testés comme additifs se sont avérés adéquats pour obtenir des poudres fluides sans perte d'activité durant le séchage et assurant une bonne conservation durant 48 semaines à 20°C et à 4°C.

La présence du chlorure de calcium dans la formulation a permis une activation de l'activité enzymatique des poudres par rapport aux autres sans chlorure de calcium. L'effet activateur du Ca²⁺ sur la lipase de *Y lipolytica* est en accord avec ceux rapportés sur la lipase de *Candida paralipolytica* (Paquot *et al.*, 1996 ; Ota *et al.*, 1966). En effet, ces auteurs ont suggéré que le rôle des ions calcium est de réduire la charge électrique des gouttelettes lipidiques et

d'éliminer les acides gras formés pendant l'hydrolyse des triglycérides sous forme de savons insolubles. Les données cristallographiques prouvent que beaucoup de lipases possèdent l'ion Ca^{2+} autour de leur site catalytique (Arpigny *et al.*, 1999) et que la présence du calcium augmente la thermostabilité ou l'activité catalytique de quelques lipases bactériennes (Tanaka *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2002).

La protection de la lipase durant le séchage et le stockage serait due à la gomme arabique car selon Minemoto *et al.*, (2002) la gomme arabique, formerait une couche protectrice pour préserver la surface de l'enzyme d'une oxydation possible. En effet la gomme arabique est un polysaccharide fortement ramifié servant principalement d'émulsifiant, spécialement pour les huiles, de colloïde protecteur dans les émulsions et de support pour les arômes.

Les maltodextrines dérivent de l'hydrolyse de l'amidon (blé, maïs, pomme de terre..). Elles sont donc constituées de différents sucres directement issus de cette réaction, dans des proportions qui dépendent du degré de l'hydrolyse. Elles sont largement utilisées dans l'industrie comme support (aromatique...), ou agent de charge. Elles ont un pouvoir sucrant très faible car présentant un dextrose équivalent sensiblement égal à 20 et peuvent avoir une fonctionnalité (amélioration de la solubilité, de la texture).

Plus le D.E. représentant le dextrose équivalent est élevé, plus l'hydrolyse est poussée, et donc plus la proportion en sucres simples (à chaîne courte) composant la maltodextrine est élevée. Un D.E. de zéro représenterait l'amidon lui-même, un D.E. de 100 représenterait du dextrose pur, soit un amidon totalement transformé.

La maltodextrine utilisé dans notre formulation (DE 12) a permis d'obtenir des poudres fluentes et d'assurer la stabilisation de l'activité enzymatique. L'effet stabilisant de la maltodextrine sur d'autres hydrolases a été confirmé par d'autres auteurs (Belghith *et al.*, 2001).

La température de transition vitreuse d'un matériau (Tg), est la température en-dessous de laquelle les molécules ont une faible mobilité relative ou autrement dit, à la plus grande capacité de déformation. La température de transition vitreuse (Tg), est habituellement utilisée pour les phases totalement ou partiellement amorphes telles que les verres et les plastiques. Les analyses des poudres atomisées ont montré une température de transition vitreuse (comprise entre 51 et 79°C) nettement plus élevée que la température de conservation (20°C). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Béal *et al.*, (2003). En effet ces auteurs ont montré que la température de transition vitreuse de poudre de bactéries lactiques était en corrélation avec une bonne conservation des poudres lorsque la différence entre la température de transition vitreuse et la température de stockage était supérieure à 25°C. Les résultats de nos travaux concordent bien avec ceux observés par ces auteurs dans la mesure où toutes les poudres présentent des températures de transition vitreuse supérieure à 25°C. L'activité d'eau exprimant l'eau liée dans les produits est également un facteur très important dans la stabilité des poudres de lipase. Lorsque cette activité d'eau est très élevée (supérieure à 0.4), l'enzyme perd sa stabilité. Cette perte serait due selon Lamikanra *et al.*, (2007) à la déformation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Nos résultats ont également montré que le chlorure de calcium en très forte concentration (supérieure à 20g/l) aurait un impact sur la stabilité de l'enzyme et sur les paramètres étudiés. Une activité d'eau plus élevée entraînerait une température de transition vitreuse plus faible.

7.1 Formulation liquide de la lipase (chapitre 3)

La formulation liquide concentrée de l'enzyme a été envisagée car elle nécessite peu de traitement et devrait permettre de développer des produits finaux peu coûteux notamment pour les applications dans les secteurs environnementaux. Cependant ce type de formulation est plus difficile à stabiliser du point de vue microbiologique et exige généralement une chaîne de froid pour préserver la qualité du produit.

La présence de cellules de *Y. lipolytica* après centrifugation et concentration ne gêne pas la formulation de l'enzyme. Même si elle est capable de produire des protéases (Ogrydziak et Scharf, 1982 ; Yamada et Ogrydziak, 1983; Nelson et Young, 1987), les concentrations cellulaires et le pH voisin de la neutralité empêchent la production de ces métabolites gênants. Par contre la contamination bactérienne est nettement plus gênante et doit être limitée afin d'assurer la conservation de la lipase concentrée.

Les recherches réalisées ont montré les limites d'efficacité de l'ajout du monopropylène glycol et des inhibiteurs de protéases (qui pourraient être produites par les contaminants).

La stratégie proposée au cours de cette recherche, a été de tester divers stabilisants (glycérol, le sorbitol, le lactose et du monopropylène glycol) afin de choisir l'additif adéquat.

Les mesures de l'activité enzymatique effectuées sur la formulation liquide réalisée respectivement avec du sorbitol, du lactose, et du glycérol, ont montré une perte de 60 à 80% après 24 semaines de stockage à 20°C. En revanche, la formulation avec le MPG n'engendre pas de perte d'activité durant la conservation. Cet agent stabilisant a été ainsi choisi pour d'autres études où il a été utilisé à différentes concentrations de 30% et de 40% (v/v). En présence de ces quantités en MPG, la lipase maintenait son activité mais, la croissance microbienne n'était pas limitée. Par conséquent, d'autres concentrations du MPG ont été utilisées (50, 75, et 90% (v/v)) afin d'éviter le développement des micro-organismes dans la solution de lipase. Les résultats ont montré que la lipase sans le MPG maintenait son activité à 4°C pendant 24 semaines mais perdait 80% de son activité à 20°C. L'addition du MPG à une concentration finale de 50%, a permis de protéger la lipase de la dégradation à 4°C et à 20°C. Des concentrations plus élevées de MPG ont un impact négatif sur la stabilité enzymatique.

Afin de comprendre l'effet négatif des concentrations élevées en MPG sur l'activité de la lipase, deux hypothèses principales ont été émises. La première était que le MPG pourrait influencer l'enzyme à son interface et la seconde était qu'elle désorganiserait sa conformation.

Des mesures des tensions interfaciales (air / eau) ont été effectuées sur des échantillons de 50% et de 90% de MPG et ont montré que le MPG n'influçait pas de manière significative ce paramètre. Nos résultats suggèrent donc que l'effet négatif du MPG ne soit pas lié aux phénomènes interfaciaux. Cet effet négatif serait plutôt lié à l'interaction entre le MPG et l'enzyme qui affecterait sa conformation.

Il faut retenir que le monopropylène glycol (50, 75 et 90%) limite la croissance des contaminants mais n'empêche pas la production des protéases. Parmi les inhibiteurs de protéases testés le cocktail d'utilisation générale (PI 2714) s'est avéré efficace mais les coûts d'utilisations à grandes échelles posent des problèmes. Un autre cocktail (PI 8215) ciblant les levures et moisissures contenant du DMSO (dimethyl sulfoxide) a un effet négatif sur la lipase.

Une autre technique visant à éliminer les microorganismes, l'irradiation aux rayons gamma a été testée à raison de trois doses 10, 15 et 25 kGy. Les résultats ont montré une préservation de l'activité enzymatique et une limitation de la croissance microbienne en conformité avec ceux obtenus par Olson (1998). Rappelons que l'irradiation aux rayons gamma des aliments est acceptée jusqu'à une dose globale de 10 kGy dans plusieurs pays pour la transformation commerciale des produits alimentaires (Lacroix et Quattara, 2000). Cette technique offre une solution au compromis recherché entre la conservation de l'activité enzymatique et la stérilisation de la solution enzymatique.

7.2 Immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica* (chapitre 4)

Dans cette partie du travail, la notion d'enzyme libre et d'enzyme immobilisée sera très récurrente car cela permettra de trouver un sens à la technique d'immobilisation.

L'immobilisation est une technique qui permet notamment de piéger une enzyme libre ou une cellule à l'aide des liaisons ioniques ou non ioniques sur un support ou dans un polymère. La technique d'immobilisation facilite la séparation de l'enzyme du milieu réactionnel et offre la

possibilité de réutilisation répétée d'un même échantillon d'enzyme dans divers réacteurs. Cette technique entraîne généralement une augmentation de la stabilité de l'enzyme.

Dans ce chapitre, la recherche s'est orientée vers trois techniques d'immobilisation : l'immobilisation par inclusion, par adsorption et par liaison covalente.

Au cours de cette recherche certains paramètres tels que la quantité du polymère, la technique de séchage, la thermostabilité et la résistance aux solvants ont été étudiés.

L'immobilisation de la lipase par inclusion dans l'alginate et le chitosan consiste à l'emprisonnement de l'enzyme dans la matrice du polymère. Les propriétés physiques des matrices d'alginate ou du chitosan sont déterminées par le contenu en acide α -l-gulonique et par le degré de déacétylation. L'étude réalisée sur l'immobilisation par inclusion dans les billes d'alginate et de chitosan a montré que le rendement d'immobilisation de la lipase par inclusion dans l'alginate de sodium augmentait avec la quantité de ce polymère. En effet, ce rendement est passé de 38,8% à 66,2% lorsque la quantité d'alginate est doublée. Conformément à ces observations, Durand (1974) a montré qu'en augmentant la quantité du polymère, la quasi-totalité de l'enzyme pouvait être immobilisée.

L'activité résiduelle des billes fraîches d'alginate était de 66,2 % par rapport à la lipase libre et était supérieure à celle des billes fraîches de chitosan (23%). Cependant après séchage par lyophilisation et par fluidisation le rendement d'immobilisation des billes de chitosan était nettement supérieur à celui des billes d'alginate séchées dans les mêmes conditions. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Betigeri *et al.*, (2002) concernant l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* où ils ont obtenu 42% avec le chitosan et 9% avec l'alginate. La raison de ce faible rendement d'immobilisation pouvait être dû, selon ces auteurs, à une interaction entre le polymère et la lipase. Selon eux, certains polymères ioniques, comme l'alginate de sodium, seraient capables de diminuer l'activité des lipases contrairement aux polymères neutres.

Le séchage par lyophilisation produisant des billes plus stables avec 95% de MS a été retenu pour le reste de nos travaux.

Il faut ajouter que la technique de séchage a un effet sur la morphologie des billes. Cette morphologie observée au microscope électronique a montré que les billes étaient de tailles variables : 1.41 ± 0.11 , 2.43 ± 0.01 mm, (alginate fluidisée et lyophilisée) 1.19 ± 0.01 et 1.50 ± 0.05 mm (chitosan fluidisée et lyophilisée), et que la surface des billes présentait de grands enchevêtrements (alginate) et des diamètres de pore (0.7 et 1 μ m) (chitosan) qui favoriseraient le phénomène de relargage de l'enzyme. En effet la lipase immobilisée dans les billes d'alginate et de chitosan offre une faible possibilité d'utilisation répétée car elle ne conserve que la moitié de son activité après trois utilisations. Selon Won *et al.*, (2005), la perte d'activité serait due au relargage de la lipase des billes, à la destruction des billes par la réhydratation et la réutilisation. Dans leurs travaux, ils ont comparé les résultats de la réutilisation des billes d'alginate et ceux des billes d'alginate enrobées dans du chitosan. L'activité résiduelle des billes d'alginate enrobées dans du chitosan était meilleure que celle des billes non enrobées.

Des études récentes réalisées au sein de notre laboratoire ont trait à l'utilisation d'autres supports tels que le lactosérum, la combinaison alginate-chitosan, en vue de palier au problème de relargage de l'enzyme. Les premiers résultats montrent une réutilisation plus importante de l'enzyme immobilisée dans du lactosérum ou dans la combinaison alginate-chitosan que lorsqu'elle est libre ou immobilisée simplement dans l'un des polymères. Ces travaux sont toujours en cours de finalisation.

Il faut retenir que l'inclusion dans les billes d'alginate et de chitosan améliore la stabilité thermique de la lipase. Les travaux de Matsumoto *et al.*, (2003) ont montré que la lipase de *Candida rugosa* immobilisée dans l'alginate était plus stable à 50°C par rapport à celle de la lipase libre.

Notre étude a également porté sur l'immobilisation par adsorption.

Dans cette partie, quatre supports (charbon actif, amberlite, célite et gel de silice) ont été testés parmi lesquels deux supports (céliste et le gel de silice) se sont avérés meilleurs pour l'immobilisation de la lipase. Il faut noter que l'augmentation de la quantité du support améliore le rendement d'immobilisation avec la céliste contrairement au gel de silice dont le rendement d'immobilisation diminue dans ces mêmes conditions. Ce rendement passe de 57 à 76% avec la céliste et de 45 à 35% avec le gel de silice. Ceci vient confirmer les travaux de Wang *et al.*, (2006) qui ont réussi à immobiliser 22% de la lipase pancréatique sur de la céliste contre 14% sur du gel de silice. Concernant les propriétés catalytiques de l'enzyme, il faut retenir que la technique d'absorption ne modifie pas la température (37°C) et le pH (7) optimum de l'enzyme mais par contre améliore l'activité de l'enzyme immobilisée aux pH alcalins, la stabilité thermique et la résistance aux solvants. En effet, les enzymes immobilisées sur ces deux supports préservent plus de 80% de leur activité après 4 heures à 40, 45, et 50°C contrairement à la lipase libre qui perd 40 à 90% de son activité aux mêmes températures. Selon Deng *et al.*, (2004), l'immobilisation semblerait jouer un rôle important dans la stabilisation de la conformation de la protéine enzymatique et sa résistance à la dénaturation thermique.

La lipase immobilisée par adsorption sur les deux supports résiste aux solvants organiques apolaires tels que l'isooctane, le n-heptane et le n-hexane (solvants pour l'estérification) contrairement à la lipase libre qui perd 80% de son activité. Un solvant polaire (isopropanol) a été également étudié, les résultats sont similaires à ceux observés avec les solvants apolaires.

L'immobilisation par adsorption répond également au souci de la réutilisation de la lipase car au bout de 5 cycles d'utilisation elle conserve encore 80% de son activité, ce qui est un facteur économique important. Cependant la conservation du réacteur réalisé avec les lipases

immobilisées sur de la célite et du gel de silice, à 20°C est malaisée car l'activité de cette lipase immobilisée diminue de moitié au bout de seulement 1 semaine d'utilisation.

La lipase de *Y. lipolytica* peut être immobilisée efficacement par liaison covalente car le rendement d'immobilisation de cette lipase sur la colonne préactivée constituée de sepharose était de 70 % contre 63% obtenus dans la littérature (Hwang *et al.*, 2004). L'immobilisation par liaison covalente permet la réutilisation de la lipase sur une longue période. En effet, 80% de l'activité de cette lipase immobilisée sont retrouvés au bout de 5 mois (10 cycles) de conservation. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bayramoglu *et al.*, (2005) qui ont obtenu 67% de la lipase de *Candida rugosa* au bout de 3 mois de conservation à 4°C. Ils stipulent que l'établissement de liaison covalente entre le support et la lipase confère à la lipase immobilisée une conformation très stable.

7.3 Etude préliminaire de faisabilité des formes galéniques à base de la lipase de *Yarrowia lipolytica* (chapitre 5)

La lipase de *Y. lipolytica* est plus stable en milieu acide que basique. Cependant, elle n'est pas suffisamment résistante à pH très acide que pour être utilisée comme enzyme digestive sans protection. Rappelons que cette enzyme conserve environ 25% de son activité à pH 2 après 5h or, la digestion gastrique se réalisant en milieu très acide et pendant 2h, la problématique de cette partie du travail trouve son utilité. Les polymères acryliques (Eudragit® L 30 D-55, L 100-55, FS 30 D, S100) sont très souvent utilisés pour enrober les formes entériques en industrie pharmaceutique. Ces polymères sont solubles à des pH au niveau intestinal.

La stratégie exposée dans ce chapitre propose de se focaliser sur la réalisation de trois formes galéniques de lipase enrobée avec l'Eudragit® L30D-55 d'une part et d'autre part sur le test in vitro de cette enzyme en réalisant une étude comparative avec le Créon 150mg qui est

une association d'enzymes digestives utilisée pour le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine. Les résultats ont permis d'aboutir à différentes formes galéniques: les gélules, les comprimés et les poudres encapsulées utilisables par voie orale.

Le test *in vitro* des différentes formes de lipase révèle une bonne résistance au pH acide (HCL 0.1N) et un temps de délitage au pH 6.8 similaire à ceux obtenus avec le Créon 150 mg. Cette partie met en évidence la capacité de cette lipase à être comprimable ou encapsulable et à montrer une stabilité en présence des différents excipients utilisés pour réaliser ces produits pharmaceutiques. En vue de permettre l'utilisation de cette lipase en industrie pharmaceutique, il serait très important de réaliser une étude de la stabilité des formes galéniques selon les normes internationales ICH (International Conferences on Harmonisation) dans des conditions de température et d'humidité standardisées. Le test *in vivo* de cette enzyme sous toutes ces formes enrobées devrait être envisagé.

7.4 Application de la lipase de *Yarrowia lipolytica* dans le traitement d'effluent (chapitre 6)

Cette partie du travail a déjà été amorcée dans le chapitre 3. En effet, ces deux chapitres se complètent dans la mesure où la stabilisation de la lipase liquide trouve son application en environnement, plus précisément dans le traitement des effluents gras.

Les industries notamment d'olive sont confrontées à la problématique du traitement de leurs effluents. Les eaux très polluantes et colorées ont une forte charge en matières organiques empêchant une autoépuration. La pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Benyahia et Zein, 2003). Notre étude s'inscrit dans la problématique de traitement de ce type d'effluents. Elle a un double objectif: l'utilisation de la levure de *Y. lipolytica* dans la dégradation et l'utilisation de la combinaison de la levure de *Y. lipolytica* et de sa lipase.

La concentration de la biomasse, l'adjonction de la lipase et l'utilisation d'un réacteur agité ont été des éléments importants autour desquels s'est circonscrit ce chapitre. Les résultats de

ces travaux démontrent que la souche de *Y. lipolytica* utilisée est capable de se maintenir, de croître dans la matière grasse issue de l'effluent riche en huile et de dégrader cette charge polluante. L'élimination des matières grasses par *Y. lipolytica* à la concentration de 10^5 CFU/ml semble être trop faible pour assurer des rendements d'élimination efficaces, résultat nettement amélioré par adjonction de la lipase en réacteur. En effet, la lipase accélère l'hydrolyse des glycérides (la fraction la plus importante de la matière grasse de l'effluent), en acides gras libres et glycérol. Par conséquent elle facilite l'assimilation subséquente des acides gras par la levure. Avec la concentration de 10^7 CFU/ml, l'élimination des matières grasses est plus importante. Les acides gras insaturés (oléique et linoléique) sont mieux éliminés que les deux acides gras saturés (palmitique et stéarique). Papanikolaou et Aggelis (2002) ont mis en évidence une affinité de *Y. lipolytica* pour les mêmes acides gras. Les résultats de la présente étude nous semblent plus importants que ceux obtenus par ces auteurs qui ont travaillé à une température de 29°C sur des essais réalisés en fioles. Cette amélioration des résultats pourrait être due en grande partie à la performance intrinsèque de la souche, à l'aération du réacteur (*Y. lipolytica* est aérobic stricte) et à l'adjonction de la lipase.

7.5 Conclusion générale

L'objectif de ce travail a concerné l'étude du traitement post culture de la lipase de *Y. lipolytica* afin de mettre au point des formulations liquides, solides ou immobilisées adaptées à différentes applications dans des secteurs industriels.

Les problématiques de cette étude ont été abordées et des expériences d'amélioration ont été réalisées. La conclusion de ce travail reprendra donc les cinq points décrits précédemment.

1. La formulation sous forme de poudre atomisée de la lipase consistait à la mise au point d'une forme de lipase exempte de lait écrémé. Cette formulation composée de CaCl_2 de maltodextrine et de gomme arabique a permis l'acquisition de poudres de lipase présentant de bonnes caractéristiques, telles la température de transition vitreuse (51-79°C), des matières

sèches respectives (95-97%) et la conservation à 4°C et 20°C durant plus d'un an. Ces poudres peuvent se conserver à des activités d'eau ≤ 0.4

Il faut retenir que sans additifs, il est impossible d'obtenir une poudre fluente par le séchage par atomisation. En fait, la matière sèche du surnageant est trop basse et les résidus du milieu nutritif (corn steep, extrait de levure, glucose) produisent une poudre collante.

2. L'objectif fixé dans le chapitre 3 était de formuler la lipase sous forme liquide. Notre travail conclut que la stabilisation de l'enzyme liquide n'est pas très aisée, mais le monopropylène glycol pourrait être employé à 50% pour limiter la croissance de cellules et empêcher l'activité de protéases à 4°C. La formulation liquide peut être stabilisée par le traitement à l'irradiation aux rayons gamma. L'utilisation de la technique d'irradiation aux rayons gamma à partir de 10 kGy pourrait être retenue comme une technique qui permet de trouver un compromis entre la stabilisation de l'enzyme et la limitation de la croissance des microorganismes.

3. L'immobilisation de la lipase de *Y. lipolytica* par inclusion, par adsorption et par liaison covalente, l'étude de certaines propriétés de ces enzymes et leur mise en œuvre ont été les objectifs spécifiques de cette partie (chapitre 4).

La première étape de ce chapitre a traité de l'immobilisation de la lipase de *Y. lipolytica* par inclusion dans les billes d'alginate et de chitosan suivi du séchage des billes par lyophilisation ou fluidisation. La lyophilisation permet de mieux déshydrater ces billes et par conséquent assure une meilleure conservation des enzymes immobilisées à 4°C et à 20°C. L'immobilisation a amélioré la thermostabilité de l'enzyme à 50°C.

Le chitosan et l'alginate sont deux polymères qui permettent d'immobiliser efficacement la lipase de *Y. lipolytica*. Cependant la réutilisation des enzymes immobilisées s'avère difficile compte tenu du relargage de l'enzyme.

La seconde étape correspondant à l'immobilisation de la lipase par adsorption sur de la célite et le gel de silice, montre que l'immobilisation par adsorption améliore l'activité de la lipase

aux pH alcalins et la stabilité thermique par rapport à l'enzyme libre. L'immobilisation par adsorption permet de réaliser un réacteur offrant une utilisation multiple des enzymes immobilisées contrairement à l'immobilisation par inclusion.

La troisième et dernière étape de cette étude a concerné l'immobilisation par liaison covalente de la lipase. La colonne préactivée HiTrap NHS- activated HP (Pharmacia Wikstroms, Sweden) a permis d'obtenir un bon rendement d'immobilisation. Le sepharose activé par le N-hydroxysuccinimide peut établir des liaisons covalentes très solides avec les molécules enzymatiques car la colonne, essentiellement constituée de sepharose activé a gardé quasiment 80% de son efficacité au bout de 5 mois.

De façon générale, l'immobilisation de la lipase permet d'améliorer les propriétés caractéristiques de l'enzyme (pH, stabilité thermique, résistance aux solvants).

4. L'enrobage de la lipase (chapitre 5) pose des bases nécessaires à la mise au point d'une forme galénique à base de lipase de *Y. lipolytica* comme substitut de lipase pancréatique. Les résultats réalisés in vitro sont similaires à ceux obtenus avec le Créon 150 mg.

5. Le traitement des effluents (chapitre 6) réalisé avec la levure de *Y. lipolytica* montre que cette souche présente une aptitude à dégrader les matières grasses et à assimiler les acides gras libérés lors de leur hydrolyse. Cette étude a montré que la densité de l'inoculum de la souche sélectionnée est un facteur important permettant d'accroître substantiellement le taux d'élimination de la matière grasse par rapport à l'effluent non traité avec la levure. Une densité de 10^7 cellules/ml semble être suffisante pour atteindre des vitesses de dégradation importantes. L'effet synergique de la lipase sur la biodégradation des matières grasses a également pu être montré. L'enzyme permet l'hydrolyse rapide des triglycérides et accélère le processus de dégradation par le microorganisme.

Enfin, comparativement à la littérature, il a pu être démontré qu'une aération importante au moyen d'un réacteur agité améliore l'efficacité du procédé.

7.6 Perspectives

Le présent travail ouvre de nouvelles perspectives d'approfondissement des connaissances relatives aux cinq chapitres abordés: la formulation solide, la formulation liquide, l'immobilisation, l'enrobage de la lipase de *Yarrowia lipolytica* et son exemple d'étude dans le traitement des effluents.

La formulation solide de la lipase nécessiterait l'étude du comportement de l'enzyme et des matières de charges après remise en solution.

Concernant la formulation liquide, la filtration sur une cartouche de 0.2 μm de la solution enzymatique devrait permettre d'éliminer les microorganismes gênants (bactéries). Par ailleurs, l'utilisation d'autres agents antimicrobiens (propionate de Na et le benzoate de Na) et l'irradiation aux rayons gamma à raison de 10 à 15 kGy par dose devraient être envisageables pour la stabilisation des solutions enzymatiques à petite échelle.

A la suite de l'étude concernant l'immobilisation de la lipase, différents travaux doivent être approfondis tant au niveau de la technique d'immobilisation qu'au niveau des choix des supports à utiliser.

A propos de l'immobilisation par inclusion, une étude approfondie viserait à pallier au relargage de la lipase des billes et à permettre une utilisation multiple de l'enzyme immobilisée. L'enrobage des billes d'alginate dans du chitosan devrait limiter la diffusion de l'enzyme. L'utilisation d'autres composés tels que le lactosérum pourrait constituer une autre solution car les premiers travaux réalisés dans ce sens au sein de l'Unité de Bio-industries semblent montrer des résultats satisfaisants. Enfin, l'étude des interactions entre enzyme-polymères pourrait être également réalisée en utilisant des méthodes telles que la calorimétrie différentielle ou la calorimétrie de titration isotherme.

A propos de l'immobilisation par adsorption, l'optimisation concernerait plus particulièrement le taux d'immobilisation par gramme de support en étudiant les interactions

enzyme support, la taille des particules, la concentration de la préparation enzymatique utilisée.

Au niveau de la liaison covalente, d'autres méthodes pourraient être investiguées comme l'activation des supports par le glutaraldéhyde ou le carbodiimide.

Les propriétés catalytiques des systèmes les plus performants seraient ensuite approfondies : stabilité, résistance aux pH, à la température, aux solvants etc.

La mise en œuvre de ces lipases immobilisées dans différentes applications (estérification, interestérification, transestérification) pourrait être envisagée en optimisant les conditions de réaction, comme il est notamment prévu dans le cadre du projet intradépartemental en cours dans notre Faculté.

L'utilisation de l'enzyme comme substitut de lipase pancréatique demande des études complémentaires. Cette recherche nécessitera l'utilisation d'une lipase purifiée et la réalisation à l'échelle pilote des formes enrobées de lipases à l'aide de l'Eudragit L 30D-55 : les comprimés, les microgranules et les microcapsules. Différents essais de granulation pourrait être réalisés en vue d'obtenir des particules de taille souhaitée (0.1 à 0.6 mm) afin de préparer des gélules. Sur les poudres microencapsulées, l'étude de la détermination des résidus de solvants sera réalisée par CPG en vue de respecter les normes requises.

En vue de permettre l'utilisation de cette lipase sous formes galéniques, il serait très important de réaliser une étude de la stabilité des formes galéniques selon les normes internationales ICH (International Conferences on Harmonisation) dans des conditions de température et d'humidité standardisées. Après avoir démontré la stabilité des formes galéniques, l'étude in vivo devrait être envisagée et permettrait de mesurer la résistance de l'enzyme aux sels biliaries et son efficacité sur la digestion des graisses. D'autres Eudragits tels que l'Eudragit FS 30D (dissolution à pH >7) pourraient être testés. Ces travaux pourraient

être réalisés en collaboration avec le laboratoire de Pharmacie galénique de l'Université libre de Bruxelles.

Enfin, l'application de la lipase dans le traitement d'effluents a posé les jalons nécessaires à la mise au point d'un starter mixte original (lipase–microorganismes) pouvant être utilisé dans un procédé de traitement des effluents graisseux industriels. Des essais en site réel devraient démontrer l'intérêt de ce système de traitement de polluants récalcitrants.

7.7 Références bibliographiques

Akimoto K., Sumida M. (2004). Process for producing fat comprising triglyceride containing highly unsaturated fatty acid. Brevet N° US2004171127.

Alloue, W.A.M, Destain, J., Amighi, K., Thonart P. (2007) Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in presence of additives. *Process Biochemistry* **42**, 1357–1361

Arpigny, J.L, Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry* **343**, 177–83.

Bayramoglu, G., Kaya, B., Arica, M.Y. (2005), Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly (GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. *Food Chemistry* **92**, 261–268.

Beal, C., Foncesca, F., Corrieu, G. (2003) Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant les bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors du stockage. Brevet. WO/2003/018778.

Belghith, H., Ellouz Chaabouni, S., Gargouri, A. (2001) Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme Microbial Technology* **28**, 253–258

Benyahia N et Zein K. (2003) Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse). In 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II). Lausanne, Suisse.

Betigeri, S., Neau, S.H. (2002), Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials* **23**, 3627–3636.

Deng, H., Xu, Z., Liu, Z., Wu, J., Ye, P. (2004) Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 437–443.

Destain, J. (1998) Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Gembloux Fusagx., 211p.

Destain J., Roblain, D. Thonart, P. (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* **19**, 105–107.

Durand, G., Monsan, P. (1974) les enzymes immobilisées. *Biotechnologie*. 341pp.

Hwang S., Lee K., Park J., Min B., Haam S., Ahn I., Jung J. (2004) Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. *Biochemical Engineering Journal* **17** (2), 85–90.

Kim, H, Choi, H, Kim, M, Sohn, C, Oh, T. (2002) Expression and characterization of Ca²⁺ independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica Biophysica Acta* **1583**, 205–212.

Lacroix, M. and Quattara, B. (2000) Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products-a review, *Food Research International* **33**, 719–724.

Lamikanra, O., Watson M.A. (2007) Mild heat and calcium treatment effects on fresh-cut cantaloupe melon during storage. *Food chemistry* **102**, 1383–1388.

Matsumoto, M., Ohashi, K. (2003) Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* **14**, 75–77.

Minemoto, Y., Hakamata, K., Adachi, S., Matsuno, R. (2002) Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. *Journal of Microencapsulation* **19**, 181–189.

Nelson, G. and Young, T.W. (1987) Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *Journal of General Microbiology* **133**, 1461–1469.

Ogrydziak, D.M and Scharf, S.J. (1982) Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B. *Journal of General Microbiology* **128**, 1225–1234.

Olson, D.G. (1998) Irradiation of food. *Food Technology* **52**, 56–56.

Ota, Y., Yamada, K. (1966) Lipase from *Candida paraliopolytica*- Part 1: anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry* **30**, 351–358.

Papanikolaou, S. Aggelis, G. (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology* **82**, 43–49.

Paquot, M., Deleu, M., Beaufils, C, Blecker, C. (1996) Electrical microenvironment influence on the hydrolytic activity of free and immobilised *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology Letters* **18**, 73-78.

Tanaka, A, Sugimoto, H, Muta, Y, Mizuno, T, Senoo, K, Obata, H (2003). Differential scanning calorimetry of the effects of Ca²⁺ on the thermal unfolding of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **67**, 207–310.

Thonart P., Destain J., Zgouli S., Antoine P., Godefroid J. et Evrard P. (1997). Les bacs à graisse. Une solution aux problèmes des matières grasses pour les PME. *Tribune de l'eau*, **50**, n°586/2, pp: 41-46.

Rasor JP. and Voss E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: general*, **221**, p.145-158.

Wang, H., Hou, W., Chi-Tang, H., Weng, X. (2006) Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*. **97**, 661–665.

Won, K., Kim S., Kim, K-Je., Park, H.W., Moon, S-Jin (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry* **40**, 2149–2154.

Yamada, T. and Ogrydziak, D.M. (1983). Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Journal of Bacteriology* **154**, 23–31.