

Les lipases immobilisées et leurs applications

Wazé Aimée Mireille Alloue ⁽¹⁾, Mario Aguedo ⁽²⁾, Jacqueline Destain ⁽¹⁾, Hakim Ghalfi ⁽¹⁾, Christophe Blecker ⁽³⁾, Jean-Paul Wathelet ⁽²⁾, Philippe Thonart ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) Unité de Bio-industries. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : allouewaze.a@fsagx.ac.be

⁽²⁾ Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Unité de Chimie organique. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

⁽³⁾ Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Unité de Technologie des Industries agro-alimentaires. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 3 septembre 2007, accepté le 13 novembre 2007.

Les lipases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycéridiques en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non-aqueux. Elles sont de ce fait capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel. Que ce soit par inclusion, par adsorption ou par liaison covalente, l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité, permettant une réutilisation des enzymes après une réaction et le développement de procédés en continu. Les réactions d'hydrolyse de triglycérides constituent l'application première des lipases immobilisées, mais leur utilisation dans divers types de réactions d'estérification s'est également mise en place : il existe des procédés faisant intervenir des réactions de transestérification, d'interestérification ou de synthèse d'esters. La production de lipides structurés par interestérification 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.

Immobilized lipases and their applications. 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 telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acétyle 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., 2006) 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'*A. carneus* et de *Y. lipolytica* par exemple, ont une activité maximale à 37 °C (Destain et al., 1997 ; Saxena et al., 2003). Il existe cependant des enzymes actives à des températures extrêmes : *C. antrodia* (Shu et al., 2006), *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 tous 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'enzymes

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 antimicrobiens utilisés dans la formulation des enzymes pour le secteur agroalimentaire. 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)

Tableau 1. Proportion des composés chimiques et bactériostatiques utilisés dans la formulation en agroalimentaire — *Proportion of chemical and bacteriostatic compounds used in agroalimentary* (Alloue, 2003).

Composés	Concentration	Intérêt en agroalimentaire	Références
Glycérol	20 à 50 % (w:v)	Stabilisant de la protéine en empêchant le déploiement et utilisé comme lyoprotectant pendant la lyophilisation	Kristjansson et al., 1991
	0,5 à 1 M	Réducteur de l'activité de l'eau	Carpenter et al., 1990
Sorbitol	20 à 50 % (w:v)	Stabilisant dans les confitures ainsi que des enzymes	Kristjansson et al., 1991
	0,5 à 1 M	Stabilisant protéique utilisé comme lyoprotectant pendant la lyophilisation. Réducteur de l'activité de l'eau	Carpenter et al., 1990
Tréhalose ou lactose	0,5 à 1 M	Stabilisants des protéines en empêchant le déploiement et utilisés comme lyoprotectant pendant la lyophilisation Réducteur de l'activité de l'eau	Carpenter et al., 1990
Benzoate de sodium Sorbates de sodium Ascorbates de sodium	0,1 % à 0,2 % (w:v)	Bactériostatiques	Kristjansson et al., 1991

sont des exemples de préparations commerciales lipasiques en poudre utilisées dans les détergents (Jaeger et al., 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 ont été réalisées en utilisant soit des polyols 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 (Fickers et al., 2006 ; Alloue et al., 2007b). La société Artechno S.A. 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.

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 autres l'alginate, le chitosan, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés dans l'immobilisation par inclusion.

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou *Phaeophyceae*, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magné-

Tableau 2. Différentes formes de lipase, leur origine et leur application — *Different forms of lipase, their origin and their application.*

Source de la lipase	Forme	Société	Rôle et application	Références
<i>Candida rugosa</i>	Poudre	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma	Hydrolyse des lipides	Knezevic et al., 2004
<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ducret et al., 1995
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ferrer et al., 2005
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ward et al., 1997 Chen et al., 2005
<i>Pseudomonas mendocina</i> (Lumufast)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et al., 1998
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et al., 1998
<i>Rhizomucor miehei</i> (Palatase)	Liquide	Novo Nordisk	Hydrolyse (développement des arômes dans le fromage)	Tarahomjoo et al., 2003
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase)	Poudre	Novo Nordisk	Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaires)	Destain, 1998
Lipase (E.C.3.1.1.3.) de <i>Yarrowia lipolytica</i>	Poudre	Artechno S.A.	Hydrolyse des graisses	
Extrait pancréatique de porc (Créon)	Granule enrobé	Solvay pharma	Hydrolyse (industrie pharmaceutique)	

sium) 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) (**Figure 1**). 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 utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès. Les lipases de *Candida rugosa* (Betigeri et al., 2002 ; Won et al., 2005) ont été immobilisées par inclusion dans l'alginate.

Le chitosan est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée par β -(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine, un composé particulièrement abondant dans les carapaces de crustacés (**Figure 2**). Pour permettre à la molécule d'être soluble dans la plupart des acides, la désacétylation libère les groupes amines (NH_2) 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 *C. rugosa* dans du chitosan.

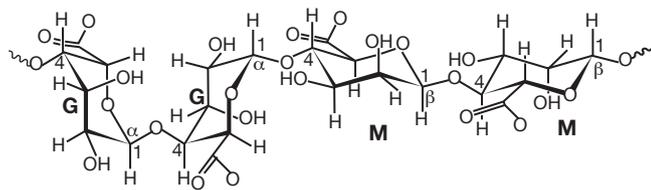


Figure 1. Structure de l'alginate — *Structure of alginate*
G : acide guluronique — *acid guluronic*. M : acide mannuronique — *acid mannuronic*.

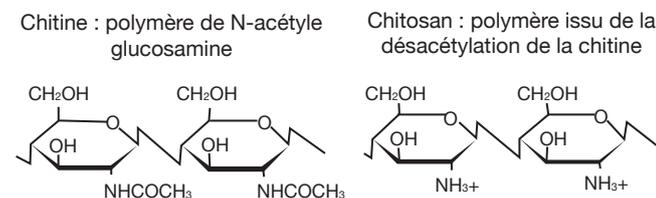


Figure 2. Formule chimique du chitosan — *Chemical formula of chitosan*.

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*, *C. rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *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 composé de granulés irréguliers et poreux. Les produits de base sont essentiellement le silicate de sodium et l'acide sulfurique. Ces substances sont exposées à une réaction chimique et produisent un gel de silice très riche en SiO_2 . Ganapati et al. (2005) ont immobilisé les lipases de pancréas de porc, de *P. cepacia*, de *Candida antarctica* sur la silice mésoporeuse hexagonale par simple adsorption. Le gel de silice est compatible avec tous les matériaux à l'exception des substances fortement alcalines et l'acide fluorhydrique.

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 *C. 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 $-NH_2$ du support et de l'enzyme. Les films de chitosan activés par le glutaraldéhyde ont été utilisés pour l'immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* et de *Syncephalastrum racemosum* (Amorim et al., 2003). D'autres méthodes chimiques existent et sont résumées dans le **tableau 3**.

Certains supports tels que la carboxyméthylcellulose sont obtenus par l'action de l'acide chloroacétique sur la cellulose. Celle-ci a permis d'immobiliser plusieurs enzymes après activation par le carbodiimide, l'azoture, les triazines, etc. Les lipases de *M. javanicus* et de *R. oryzae* ont été immobilisées sur la carboxyméthylcellulose afin d'être appliquées à la synthèse d'ester (Dalla Vecchia et al., 2005). Le **tableau 4** présente les différents supports utilisés dans la technique par liaison covalente. 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 réacteurs 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., 2004 ; Hilal et al., 2006).

3. APPLICATIONS DES LIPASES IMMOBILISÉES

3.1. Réactions 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 al., 1998a). L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras ou employés

Tableau 4. Supports utilisés pour l'immobilisation par covalence avec leurs groupes réactifs — *Supports used for the covalence immobilization with their reactive groups.*

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
	Anthranilates	OH COOH
Protéines	Collagène	NH_2 , COOH
Polymères synthétiques	Polyaminoacides,	φNH_2 , COOH
	Ethylène anhydride maléique	anhydride
	Polyacrylamides	NH_2
	Copolymères d'acrylamides	Variable
	Polyacrylates	COOH
	Copolymères d'acide méthacryliques	COOH
Substances minérales	Polystyrènes et dérivés	$\varphi-X$
	Polyamides	NH_2
	Verre poreux	OH
Supports mixtes	Alumino-silicates	OH
	Oxydes métalliques	OH
	Supports magnétiques	Variable
	Supports organo-minéraux	Variable

Tableau 3. Résumé des principales méthodes d'activation — *Summary of the principal methods of activation.*

Enzyme	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
$-SH$	$-SH$	Sels de diazonium Ponts disulfures

dans des réactions d'estérification ou de transestérification. La lipase de *C. 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 *C. 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 al., 1998 ; Sharma et al., 2001).

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes des lipases exogènes (lipases pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages (Kazlauskas et al., 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. Réactions 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]. À 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 al., 2002). Le contrôle de l'hydratation de l'enzyme est dès lors un facteur important lors d'une réaction (Chowdary et al., 2002 ; Pirozzi et al., 2004). Les figures 3 et 4 résument les différentes réactions de la lipase en milieu aqueux ou non : l'hydrolyse (Figure 3) ou la synthèse, qui regroupe les réactions de transestérification (alcoololyse) et d'interestérification (acidolyse) (Figure 4).

La transestérification. La transestérification implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoololyse) ou avec le glycérol (glycérolyse). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras poly-insaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique (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.

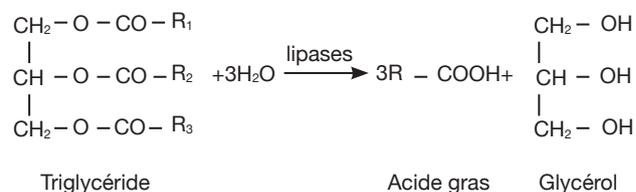


Figure 3. Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieu aqueux — *Hydrolysis reaction catalysed by lipase in aqueous medium.*

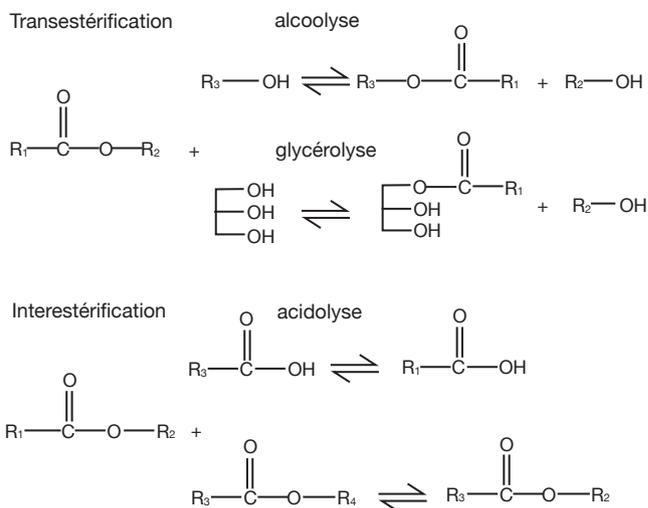


Figure 4. Différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux — *Various types of synthesis reactions catalysed by lipases in micro aqueous medium.*

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

Les procédés de transestérification enzymatique permettent également de produire du biodiesel ou bio-gazole, carburant obtenu à partir d'huile végétale ou animale (Xu et al., 2003 ; Noureddini et al., 2005). 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.

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'application 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 (interestérification). 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 interestérification entraîne la nécessité d'une désodorisation du produit final, en revanche l'interestérification enzymatique réalisée en l'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 triacylglycérols modifiés, dans des conditions ne demandant pas de solvants. De plus, l'utilisation de lipases spécifiques des

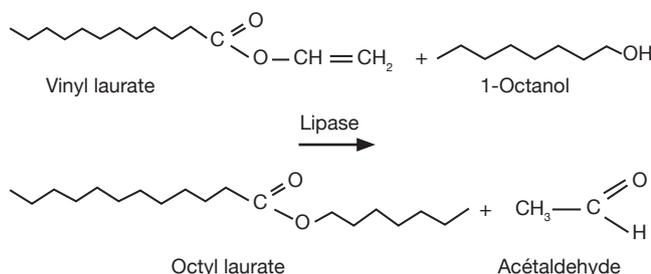


Figure 5. Transestérification de l'octanol et du vinyl laurate par la lipase de *Burkholderia cepacia* — *Transesterification of octanol and vinyl laurate by lipase from Burkholderia cepacia* (El Rassy et al., 2004).

positions sn1 et sn3 des triglycérides permet d'obtenir des produits avec des caractéristiques qui ne pourraient être obtenues par interestérification chimique (Pal et al., 2001).

Dans le but de modifier les compositions de certaines huiles et ainsi faciliter leur utilisation, l'interestérification 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'interestérification 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, 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 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, de méthyle stéarate et de méthyle palmitate.

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

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

En dépit de ce potentiel d'applications, le nombre de processus industriels impliquant l'estérification

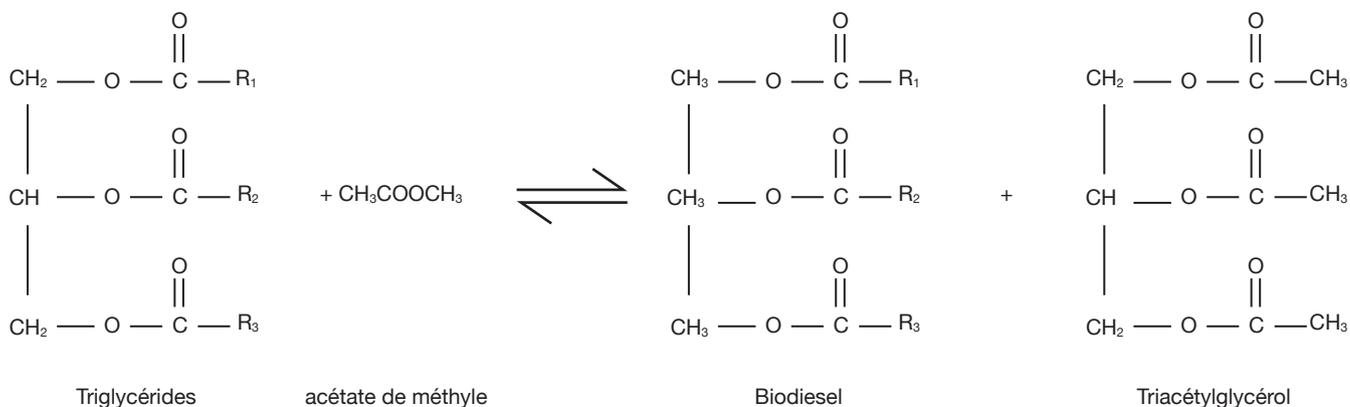


Figure 6. Schéma de l'interestérification de triglycérides et d'acétate de méthyle pour la production de biodiesel — *Interesterification diagram of the methyl acetate and triglyceride for the production of biodiesel* (Xu et al., 2005).

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 : DiltiazemTM (Shibatani et al., 1990 ; Jaeger et al., 1998). La firme Glaxo Wellcome (actuellement GSK) a développé, au début des années 1990, un agent anti-leucémique par acylation de la purine à l'aide de la lipase immobilisée de *C. antarctica* (Novozyme SP 435, Novo Nordisk, Danemark). Ce procédé a rendu le produit plus soluble et donc plus bio-disponible (Rasor et al., 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 al., 1998b). 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., 2008). 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 4-6 h en mode *batch* (Osório et al., 2006 ; Aguedo et al., 2008). 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

biens 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 *C. 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 microaqueux, 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. À 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 interestérification qu'elles ne le sont en hydrolyse. Il semble donc intéressant de tester, pour leur capacité à interestérifier, certaines des lipases existantes mais également de tenter d'isoler de nouvelles espèces qui s'avèreraient efficaces dans ce type de réaction. À 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 al., 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'interestérification 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'interestérification, afin d'optimiser le contact entre le milieu hydrophobe et l'enzyme, par exemple.

5. CONCLUSION

Les lipases, 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'interestérification 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

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

Bibliographie

- Aguedo M. et al., 2008. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oil through enzymatic interesterification. Accepted for publication in *J. Agric. Food Chem.*
- Akin N., Aydemir S., Koçak C. & Iildiz M.A., 2003. Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. *Food Chem.*, **80**, 77-83.
- Alloue W.A.M., 2003. *Concentration, séchage de la lipase de Yarrowia lipolytica et caractérisation de ses propriétés après formulation*. Mémoire : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Alloue W.A.M. et al., 2007a. Effect of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica*

- lipase stabilization. Accepted for publication in *Prep. Biochem. Biotechnol.*
- Alloue W.A.M., Destain J., Amighi K. & Thonart P., 2007b. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in presence of additives. *Process Biochem.*, **42**, 1357-1361.
- Amorim R.V.S. et al., 2003. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresour. Technol.*, **89**(1), 35-39.
- Bagi K., Simon L.M. & Szajani B., 1997. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 531-535.
- Balcão V.M. & Malcata F.X., 1998a. Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 511-519.
- Balcão V.M. & Malcata X.M., 1998b. Lipase catalysed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.*, **16**, 309-341.
- Balcão V.M., Paiva A.L. & Malcata X.F., 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 392-416.
- Barahona D., Pfromm P.H. & Rezac M.E., 2006. Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid [bmim]PF₆. *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 318-324.
- Betigeri S. & Neau S.H., 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*, **23**, 3627-3636.
- Blecker C., 1993. La catalyse enzymatique en milieu organique : potentialités d'utilisation des lipases. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **28**, 51-85.
- Bridelli M.G. et al., 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**, 1039-1048.
- Caro Y. et al., 2002. Plant lipases: biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. *Biotechnol. Bioeng.*, **77**, 693-703.
- Carpenter J.F., Crowe J.H. & Arakawa T., 1990. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.*, **73**, 3627-3636.
- Chamouleau F., Coulon D., Girardin M. & Ghouil M., 2001. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **11**, 949-954.
- Chen C.W., Chong C.L., Ghazali H.M. & Lai O.M., 2005. Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. *Food Chem.*, **100**(1), 178-191.
- Chowdary G.V. & Prapulla S.G., 2002. The influence of water activity on the lipase catalysed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.*, **38**, 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**, 474-485.
- 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**, 2677-2682.
- Deng H. et al., 2004. Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 437-443.
- 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 P., 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 105-107.
- 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**, 214-221.
- El Rassy H., Perrard A. & Pierre A.C., 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: Enzymatic*, **30**, 137-150.
- Elend C. et al., 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3637-3645.
- Ertesvag H. & Valla S., 1998. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degradation Stab.*, **59**, 85-91.
- Ferrer M. et al., 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**, 391-398.
- Fickers P. et al., 2006. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 756-759.
- Fuentes G., Ballesteros A. & Verma C.S., 2004. Specificity in lipases: a computational study of transesterification of sucrose. *Protein Sci.*, **13**, 3092-3103.
- Ganapati D.Y. & Sachin R.J., 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**, 215-222.
- Gandhi N.N., Sawant S.B., Jyeshtharaj J.B. & Mukesh D., 1995. Lipozyme deactivation by butanol and temperature. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**(4), 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), 74-82.
- Ghazali H.M., Hamidah S. & Che M., 1995. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and

- 1, 3-specific lipases. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **72**, 633-639.
- Hilal N., 2006. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation. *J. Membrane Sci.*, **268**(2), 198-207.
- Ivanov A.E. & Schneider M.P., 1997. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **3**, 303-309.
- Jaeger K.E. & Reetz M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **16**, 396-403.
- Jaeger K.E. et al., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 29-63.
- Kaewthong W., Sarote S., Poonsuk P. & Aran H., 2005. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem.*, **40**, 1525-1530.
- Kazlauskas R.J. & Bornscheuer U.T., 1998. Biotransformations with lipases. In: Rehm H.J. et al., eds, *Biotechnology-series 8a*. Weinheim (Germany): Wiley-VCH, 37-191.
- Khare S.K. & Nakajima M., 2000. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chem.*, **68**, 153-157.
- Kilcawley K.N., Wilkinson M. & Fox P.F., 1998. Enzyme-modified cheese. *Int. Dairy J.*, **8**, 1-10.
- Knezevic Z. et al., 2004. Operating regime of a biphasic oil/aqueous hollow-fibre reactor with immobilized lipase for oil hydrolysis. *Process Biochem.*, **39**(11), 1377-1385.
- Kristjansson M.M. & Kinsella J.E., 1991. Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. Food Nutr. Res.*, **35**, 237-258.
- Lancelot W.K., Luke M., John S.R. & Ignatious N., 2002. Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. *Ind. Crops Prod.*, **16**, 237-244.
- Liew M.Y.B. et al., 2001. Physical properties of palm kernel olein-anhydrous milk fat mixtures transesterified using mycelium-bound lipase from *Rhizomucor miehei*. *Food Chem.*, **72**, 447-454.
- Lima V.M.G., Krieger N., Mitchell D.A. & Fontana J.D., 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng.*, **18**(1), 65-71.
- Mats M. & Karl H., 1994. Kinetics of triglyceride lipase. In: Wooley P. & Petersen S.B., eds. *Lipases*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 159-180.
- Noureddini H., Gao X. & Philkana R.S., 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.*, **96**(7), 769-777.
- Osório N.M., Fonseca M.M.R. & 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**, 545-553.
- Pal P.K., Bhattacharyya D.K. & Ghosh S., 2001. Modifications of butter stearin by blending and interesterification for better utilization in edible fat products. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **78**, 31-36.
- Pirozzi D. & Greco G., 2004. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme Microb. Technol.*, **34**, 94-100.
- Rasor J.P. & Voss E., 2001. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Appl. Catal. A: Gen.*, **221**, 145-158.
- Rønne T.H., Pedersen L.S. & Xu X., 2005. Triglyceride selectivity of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **82**, 737-743.
- Rønne T.H. et al., 2006. Deodorization of lipase-interesterified butterfat and rapeseed oil blends in a pilot deodorizer. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **108**, 182-192.
- Sakakibara M., Okada F., Takahashi K. & Tokiwa T., 1993. Hydrolysis of beef tallow by immobilized lipase in a biphasic organic-aqueous system. *Nippon Kagakukai*, **11**, 1292-1294.
- Saxena R.K., Davidson W.S., Sheoran A. & Giri B., 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem.*, **39**, 239-247.
- Schloss P.D. & Handelsman J., 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 303-310.
- Secundo F. & Carrea G., 2002. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **19-20**, 93-102.
- Shao-Hua C. & Wen-Teng W., 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, **25**(2), 197-204.
- Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, **19**, 627-662.
- Shibatani T. & Nakamichi K., 1990. *Method to preparing optically active 3-phenylglycidic acid esters*. Brevet N° EP 36255.
- Shu C.H., Xu C.J. & Lin G.C., 2006. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.*, **41**, 734-738.
- Sonnet P.E., Fogia T.A. & Fearheller S.H., 1993. Fatty acid selection of lipases: erucic acid from rapeseed oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **70**, 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**, 181-189.
- Tarohomjoo S. & Alemzadeh I., 2003. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**, 33-37.

- Tomasini A., Bustillo G. & Lebeault J., 1993. Fat lipolysed with commercial lipase for the production of Blue cheese flavor. *Int. Dairy Prod.*, **3**, 117-127.
- 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), 661-665.
- Ward O.P., Fang J. & Li Z., 1997. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 52-56.
- Won K. et al., 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.*, **40**, 2149-2154.
- 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), 1239-1241.
- 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: Enzymatic.*, **32**(5-6), 241-245.
- Yang T., Fruekilde M.B., Xu X., 2003. Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **80**, 881-887.

(74 réf.)