**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

# AVIS DE SOUTENANCE

# THESE DE DOCTORAT

Présentée par

**Mme : ASMAE MISBAH**

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie

**Sujet de la thèse** : Production, caractérisation, purification et immobilisation de la lipase de *Proteus vulgaris* OR34 isollée à partir des déchets oléicoles : évaluation de sa performance dans les formulations détergentes et dans la synthèse organique.

**Formation Doctorale** : Sciences et Génie de la matière, de la Terre et de la Vie.

**Thèse présentée et soutenue le samedi 05 décembre 2020 à 10h au Centre des conférences devant le jury composé de :**

| Nom Prénom | Titre | Etablissement | |
|---|---|---|---|
| Saad IBNSOUDA KORAICHI | PES | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Président |
| Abdeslam ASEHRAOU | PES | Faculté des Sciences - Oujda | Rapporteur |
| Noureddine EL MTILI | PES | Faculté des Sciences de Tetouan | Rapporteur |
| Mohammed MERZOUKI | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès | Rapporteur |
| Naima EL GHACHTOULI | PES | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Examinateur |
| Abdellatif HAGGOUD | PES | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Examinateur |
| Soumya EL ABED | PH | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Examinateur |
| Mohammed Ali TAHRI JOUTI | PES | Faculté des Sciences et Techniques – Fès | Directeur de thèse |

Laboratoire d'accueil : Biotechnologies Microbienne.

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

**Titre de la thèse :** Production, caractérisation, purification et immobilisation de la lipase de Proteus vulgaris OR34 isollée à partir des déchets oléicoles : évaluation de sa performance dans les formulations détergentes et dans la synthèse organique

**Nom du candidat :** Asmae MISBAH

**Spécialité :** Biotechnologie

## Résumé de la thèse

L'objectif de cette étude consiste d'une part en l'isolement de microorganismes producteurs d'enzymes hydrolases à intérêt biotechnologique à partir des déchets oléicoles et d'autre part en la sélection de bactéries productrices de lipases applicables dans le domaine de la détergence et dans la synthèse organique.

Au cours de ce travail nous avons prélevés trois échantillons à partir d'une usine de trituration d'olives située à Fès-Maroc: eau de rinçage d'olives (OR), margines (OM) et grignons d'olives (OP). Un total de 81 isolats a été purifié à partir de ces échantillons et a constitué une banque microbienne formée de 35 bactéries, 41 levures et 5 champignons. Le criblage de leurs activités enzymatiques a montré que 68 isolats sont capables de produire au moins une enzyme parmi celles testées. L'activité pectinase était la plus dominante (39,51 %), suivie de l'activité cellulase (34,57 %), lipase (27,16 %), amylase (11,11 %), protéase (9,88 %) et tannase (6,17 %).

A partir de cette banque microbienne, deux bactéries OR34 et OM2 ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des lipases extracellulaires en milieu liquide. Elles ont été identifiées respectivement comme *Proteus vulgaris* (MN622879) et *Serratia marcescens* (MN622880), par PCR et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Les deux souches ont exhibé des activités lipases maximales de l'ordre de 11 et de 9 $U.mL^{-1}$, respectivement, en utilisant la Tributyrine TC4 comme substrat, à l'aide de la technique du pH-stat. Les deux lipases produites sont des enzymes alcalines avec une activité optimale à pH 9 et à des températures de 55 et 50 °C, respectivement. Après caractérisation biochimique, il s'est avéré que les deux lipases sont stimulées lorsqu'elles sont incubées avec les ions $Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$, tandis que les ions $Fe^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Cu^{2+}$ et $Mn^{2+}$ réduisent leur stabilité.

Pour une finalité, entre autres, d'être incorporées en tant que bio-additifs dans les formulations détergentes, la stabilité des deux lipases vis-à-vis les ingrédients chimiques des détergents a été investiguée. Certes, les deux ont montré une stabilité appréciable, mais la lipase de *Proteus vulgaris* OR34 s'est montrée plus attrayante, du fait qu'elle a été stimulée par les tensioactifs non ioniques (Tween-80, Tween-20 et Triton X-100), elle a été totalement stable en présence de l'agent oxydant ($H_2O_2$) et de l'agent de blanchiment (NaClO) et elle a été relativement résistante aux tensioactifs ioniques (SDS et CTAB) et à l'agent chélatant (EDTA). De plus, elle est compatible avec certains détergents commerciaux solides et liquides. Fait intéressant, elle a éliminé efficacement une tache d'huile à partir d'un tissu de coton, lorsqu'elle est additionnée à la formulation du détergent solide Ariel®.

La lipase de *Proteus vulgaris* OR34 sélectionnée lors de cette étude, a été purifiée 94,64-fois avec un rendement final de 9,11 % et une activité spécifique de 3232,58 ou 1777,92 $U.mg^{-1}$, en utilisant respectivement la TC4 ou l'émulsion d'huile d'olive. La lipase pure a montré une bande homogène de 31 kDa sur gel de polyacrylamide. Elle a pu hydrolyser plusieurs variétés de substrats, avec une préférence de l'huile de palme et des acides gras à courte chaîne (TC4). De plus, elle s'est montrée partiellement dépendante aux ions calcium et stable à des fortes concentrations en sel biliaire (NaDC). Il s'agit d'une lipase à sérine, puisqu'elle a été inhibée par le THL-Orlistat®.
L'immobilisation de la lipase pure de *Proteus vulgaris* OR34 par adsorption physique sur le $CaCO_3$ a donné un rendement maximal de 90 % et les propriétés biochimiques et fonctionnelles de l'enzyme immobilisée ont été améliorées. Cette dernière s'est montrée plus active et plus stable que l'enzyme libre à un large spectre de pH et de températures. Elle a conservé 60 % de son activité après 10 mois de stockage à 4 °C, alors que durant la même période l'enzyme libre n'a conservé que 10 % d'activité. La lipase immobilisée a montré également une stabilité contre différents solvants organiques polaires et apolaires, ce qui fait d'elle un biocatalyseur attrayant dans les réactions de synthèse organique, telles que l'estérification. En fait, l'estérification des acides oléiques et du méthanol par la lipase OR34 immobilisée, en présence de l'hexane, a révélé un rendement de conversion maximal de 67 % après 12 h et ce rendement a été maintenu fixe après réutilisation de l'enzyme pendant 6 cycles successifs.

**Mots clés**: Déchets oléicoles, Enzyme, Lipase, *Proteus vulgaris* OR34, *Serratia marcescens* OM2, Purification, Caractérisation, Immobilisation, Formulation détergente, Synthèse organique.