

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bakr Belkaïd - Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie



Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique

MEMOIRE

Présenté par

Mr : SEFRAOUI OUALID

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences Biologiques

Option

Biochimie

Thème

Contribution à l'optimisation d'activité enzymatique à partir des déchets de la maïserie de Tafna – Maghnia

Soutenu le 18/10/2020, devant le jury composé de :

Présidente	Pr. Sari Lamia	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	Pr. Rahmoun Mohammed Nadjib	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	Dr. Bedrane Mohammed El Amine	Maitre-assistant A	Université de Tlemcen
Encadrante	Dr. Benmansour Meriem	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019 – 2020

Dédicace

A ceux qui m'ont donné sans rien en retour,

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles,

À mes très chers parents Missoum et Fatima

Vous êtes la source de mes joies et le secret de ma force. Vous serez toujours le modèle de la détermination, de force d'honnêteté de bonté, de patience et d'amour. Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies.

Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie.

Puisse mon Dieu, le tout puissant, vous protéger et vous accorder meilleure santé et longue vie.

À mes chères sœurs Amel et Ahlem et mes frères Amine et Salim

À mes adorables nièces Radia, Kholoud et Abir et mon neveu Ayoub

Que Dieu vous procure continuellement santé, bonheur et tranquillité.

À mes chers amis, Alae Eddine, Abdel Wadoud, Oussama, Oussama Y., Amine, Abdel Hadi, Seddik et Nabila

À ma chère fiancée Meriem

Merci pour ces années formidables remplies de bonheur à vos côtés, Puisse Dieu renforcer les liens d'amitié qui nous unissent.

Je dédie ce modeste travail...

Remerciements

L'information et la formation ne sont que directives mais le fruit et l'épanouissement en sont la résultante.

Ce travail a atteint son terme grâce à l'assistance de nombreuses personnes. Je profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin ou de près ont contribué.

Je tiens à remercier mon encadreur Mme Bennmansour Meriem, Maître de conférences B au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, pour son soutien permanent, ses conseils, ses orientations, sa disponibilité, son aide et sa solidarité. C'est un plaisir et un honneur de travailler à vos côtés. Je garderai de vous l'image d'un maître dévoué et serviable et d'une femme généreuse avec un grand cœur.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme Sari Lamia, Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury d'examen de mémoire.

Mes remerciements vont également à Mr Rahmoun Mohammed Nadjib, Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, qui me fait l'honneur et le plaisir d'avoir accepté d'être examinateur de ce manuscrit de mémoire.

Je tiens à remercier également Mr Bedrane Mohammed El Amine, maître assistant A au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime également ma reconnaissance à Mme Brikci-Nigassa Amal, Maître de conférences B au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen » pour ses conseils avisés dans la partie *in silico*.

Je remercie également, le technicien de laboratoire Mr Habi Salim pour son aide et sa disponibilité.

Résumé

Les lipases ou triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes ubiquitaires largement répandues dans la nature. Elles appartiennent à la superfamille des α / β hydrolases qui sont capables de catalyser l'hydrolyse des esters carboxyliques au sein des triglycérides en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non-aqueux, avec une très grande régio, chimio et énantiosélectivité. De ce fait, ces enzymes sont polyvalentes en biotechnologie et sont largement appliquées dans de nombreuses industries telles que l'agroalimentaire, la pharmacie, le détergent, le biodiésel, l'oléochimique, ...

La présente étude vise à valoriser deux déchets différents qui proviennent de la maïserie de Tafna – Maghnia afin d'optimiser une nouvelle source de la lipase végétale. Les déchets sont premièrement caractérisés par leurs teneurs en eau et en matière grasse. Ensuite, l'activité lipolytique est détectée par chromatographie sur couche mince puis mesurée par titration des acides gras libérés. Afin de mieux comprendre la structure de la lipase du maïs, le travail s'est poursuivi à une échelle moléculaire en se basant sur l'analyse séquentielle multiple de cette protéine en utilisant des programmes bioinformatiques.

Nos résultats montrent que les deux déchets présentent des teneurs en eau et en matières grasses de 3,7 % et de 9 %, respectivement pour le premier et des teneurs de 1,4 % et 1,5 %, respectivement pour le deuxième. L'analyse de la chromatographie sur couche mince montre qu'après l'addition des extraits des déchets, de nouveaux composés sont apparus dans le milieu réactionnel et qui migrent avec des rapports frontaux similaires à ceux des acides gras libres et du 1,3-diacylglycérol dans le système solvant utilisé. Les deux extraits présentent également une activité lipolytique de 43,18 UI et 14,6 UI respectivement. L'alignement de séquences multiples réalisé à l'aide du programme Clustal W, indique un motif conservé spécifique de la superfamille de GX SXG lipases ainsi qu'une triade catalytique conservée.

Mots clés : lipase, maïs, activité hydrolytique, alignement, séquences multiples.

Abstract

Lipases or triacylglycerol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) are ubiquitous enzymes widely responded in nature. They belong to the superfamily of α / β hydrolases which are capable of catalysing the hydrolysis of carboxylic esters within triglycerides in aqueous medium and the synthesis of esters in non-aqueous medium, with a very high regio, chemo and enantioselectivity. As a result, these enzymes are versatile in biotechnology and are widely applied in many industries such as food, pharmaceutical, detergent, biodiesel, oleochemical, ...

The present study aims to recover two different wastes that come from the corn mill of Tafna - Maghnia in order to optimize a new source of vegetable lipase. The wastes are primarily characterized by their water and fat content. Then, the lipolytic activity is detected by thin layer chromatography and then measured by titration of the fatty acids released. In order to better understand the structure of corn lipase, work continued on a molecular scale based on multiple sequential analysis of this protein using bioinformatics programs.

Our results show that the two wastes have water and fat contents of 3,7 % and 9 %, respectively for the first and contents of 1,4 % and 15 %, respectively for the second. The analysis of the thin layer chromatography shows that after the addition of the waste extracts, new compounds have appeared in the reaction medium, which migrate with frontal reports similar to those of free fatty acids and 1,3-diacylglycerol in the solvent system used. The two extracts also exhibit lipolytic activity of 43,18 IU and 14,6 IU respectively. Alignment of multiple sequences by the Clustal W program indicates a conserved motif specific for the GX SXG lipase superfamily as well as a conserved catalytic triad.

Key words : lipase, maize, hydrolytic activity, alignment, multiple sequences.

ملخص

إن الليباز أو ثلاثي الغلiserين أسيل هيدرولاز (EC 3.1.1.3) عبارة عن إنزيمات واسعة الانتشار في الطبيعة. وهي تنتمي إلى عائلة α/β هيدرولاز القادرة على تحفيز التحلل المائي للإسترات الكربوكسيلية داخل الدهون الثلاثية في وسط مائي أو توليفها في وسط غير مائي، مع معدل عالٍ من الانتقائية الموضعية، الكيميائية والتماتلية. نتيجة لذلك، فإن هذه الإنزيمات متعددة الاستخدامات في التكنولوجيا الحيوية ويتم تطبيقها على نطاق واسع في العديد من الصناعات مثل المواد الغذائية، الأدوية، المنظفات، الديزل الحيوي، الكيماويات الزيتية، ...

تهدف الدراسة الحالية إلى استخلاص نوعين مختلفين من نفايات مصنع الذرة تافنة - مغنية من أجل البحث عن مصدر جديد للليباز النباتي. تم تحديد أولاً محتويات الماء والدهون في النفايات. بعد ذلك، تم الكشف عن نشاط التحلل الدهني بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، ثم قياسه بمعايرة الأحماض الدهنية المتحررة. من أجل فهم بنية ليباز الذرة بشكل أفضل، استمر العمل على المقياس الجزيئي بناءً على تحليل التراصف التسلسلي المتعدد لهذا البروتين باستخدام برامج المعلوماتية الحيوية.

أظهرت نتائجنا أن للنفايات محتويات ماء ودهون بنسبة 3,7% و 9% على التوالي للنوع الأول ومحتويات بنسبة 1,4% و 1,5% على التوالي للنوع الثاني. يوضح تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أنه بعد إضافة مستخلصات النفايات، ظهرت مركبات جديدة في وسط التفاعل، والتي تهجر بنسب أمامية مماثلة لتلك الخاصة بالأحماض الدهنية الحرة و 1.3- ثنائي الغلiserين في نظام المذيبات المستخدم. أظهر المستخلصان أيضاً نشاطاً لتحلل الدهون تبلغ قيمته UI 43,18 و UI 14,6 على التوالي. يبرز التراصف التسلسلي المتعدد بواسطة برنامج Clustal W نمط محفوظ خاصة بعائلة GX SXG ليباز بالإضافة إلى موقع فعال محفوظ.

الكلمات المفتاحية : الليباز، الذرة، النشاط المائي، التراصف، التسلسلات المتعددة.

Liste des figures

Figure 1 : Publications (de 1952 à janvier 2019) contenant « lipase » et « biocatal* » ou « biotransform* ». Source, Web of Science.	6
Figure 2 : Réactions catalysées par les lipases.	7
Figure 3 : Le repli alpha / bêta-hydrolase.....	9
Figure 4 : Mécanisme d'activation de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> dans les interfaces formées entre les phases aqueuse et organique.	10
Figure 5 : Structure de lipase de <i>Bacillus subtilis</i> (a), de <i>Burkholderia cepacia</i> (b) et de <i>Candida antarctica</i> A (c) avec détermination de la position des résidus de la triade catalytique.....	10
Figure 6 : Etapes du mécanisme catalytique de la lipase.	11
Figure 7 : Réactions catalysées par la lipase dans les systèmes aqueux et organiques.	13
Figure 8 : Régiosélectivité des lipases. Liaisons ester potentiellement hydrolysées par les lipases dans un triglycéride.....	14
Figure 9 : Régiosélectivité des lipases. Produits de différentes réactions.....	15
Figure 10 : Estérification enzymatique du rac-ibuprofène par la lipase de <i>C. rugosa</i>	21
Figure 11 : Requête pour la base de données UniProtKB.	33
Figure 12 : Fonctionnement du serveur BLAST.	35
Figure 13 : Fonctionnement de Clustal W.....	36
Figure 14 : Téléchargement du fichier d'ASM.	36
Figure 15 : Interface du serveur web Esript 3.0.	37
Figure 16 : Indice d'acide des trois huiles d'olives choisis pour servir de substrats.....	40
Figure 17 : Chromatogramme des milieux réactionnels.....	41
Figure 18 : Activité lipolytique des extraits de lipase brute.	42
Figure 19 : Séquence de la lipase du maïs Mo17 au format FASTA.	42
Figure 20 : Alignement de séquences multiples de la lipase du maïs Mo17 avec ses homologues structuraux issus de PDB.	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des données structurales disponibles pour certaines lipases.	8
Tableau 2 : Source et régiospécificité de certaines lipases animales et végétales non commercialisées.....	18
Tableau 3 : Source et régiospécificité des lipases commerciales communes.	19
Tableau 4 : Exemples de lipase appliquée en agroalimentaire.....	20
Tableau 5 : Utilisation des lipases dans les préparations pharmaceutiques.	21
Tableau 6 : Contenus et adresses de certaines banques de données.....	26
Tableau 7 : Certains algorithmes utilisés pour l’alignement de séquences multiples.....	27
Tableau 8 : Caractéristiques des échantillons.	39
Tableau 9 : Homologues structuraux de la lipase du maïs Mo17.	43
Tableau 10 : Homologues structuraux de la lipase du maïs Mo17 à partir de PDB.	44

Liste des abréviations

Å :	Angstrom
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGL :	Acides gras libres
Ala :	Alanine
ASM :	Alignement de séquences multiples
Asp :	Aspartate
BLAST :	Basic Local Alignment Search Tool
CCM :	Chromatographie sur couche mince
D1 :	Premier déchet de la maïserie
D2 :	Deuxième déchet de la maïserie
DAG :	Diacylglycérol
DATEM :	Diacetyl Tartrate Ester of Monoglyceride
DDBJ :	DNA Data Bank of Japan
EC :	Enzyme Commission
EMBL :	European Molecular Biology laboratory
EPD :	Eukaryotic Promoter Database
ESPrpt :	Easy Sequencing in PostScript
FASTA :	Fast alignement
GDB :	Genome Database
Glu :	Glutamate
Gly :	Glycine
His :	Histidine
ISO :	International Organization for Standardization
Lys :	Lysine
mbar :	Millibars
MGI :	Mouse Genome Informatics

NCBI :	National Center for Biotechnology Information
NF :	Norme française
PC :	Phosphatidylcholine
PDB :	Protein Data Bank
pH :	Potentiel hydrogène
PIR :	Protein Information Resource
PRF :	Protein Research Foundation
SCOP :	Structural Classification of Protein
Ser :	Serine
SL :	Stérols libres
TG :	Triglycérides
UI :	Unité internationale

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	4
Partie 1 : Les lipases	5
1. Généralités :.....	6
2. Structure et mécanisme catalytiques des lipases :.....	7
2.1. Repliement α/β hydrolase :	8
2.2. Activation interfaciale :	9
2.3. Mécanisme catalytique :	10
3. Lipase comme biocatalyseur :.....	12
3.1. La réaction de l'hydrolyse :	12
3.2. La réaction de synthèse d'esters :	12
4. Propriétés de sélectivité des lipases :	14
4.1. La chimiosélectivité :.....	14
4.2. La régiosélectivité :.....	14
4.2.1. Lipases 1,3-spécifiques :.....	15
4.2.2. Lipases non spécifiques :.....	15
4.2.3. Lipases spécifiques des acides gras :.....	15
4.3. Enantiosélectivité :.....	16
5. Sources de lipases :	16
5.1. Source végétale :.....	16
5.2. Source Animale :	16
5.3. Source microbienne :	17
5.3.1. Lipase bactérienne :.....	17
5.3.2. Lipase fongique :	18
6. Application industrielle des lipases :.....	19
6.1. Agroalimentaire :	19
6.2. Médical et pharmaceutique :.....	20
6.3. Détergent :.....	22
6.4. Biodiesel :	22
6.5. Oléochimique :.....	23
6.6. Cosmétique :	23
Partie 2 : Analyse des protéines <i>in silico</i>	24

1. Généralités :.....	25
2. Les bases de données :	25
2.1. Les banques de données généralistes :.....	25
2.2. Les banques de données spécialisées :.....	26
3. Alignement de séquences multiples :.....	27
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	28
1. Caractéristiques des échantillons :	29
1.1. Teneur en eau :.....	29
1.2. Teneur en matière grasse :	29
2. Préparation de l'extrait brut de lipase (la poudre d'acétone) :	30
3. Détermination de l'activité de la lipase :.....	30
3.1. Choix des substrats :	30
3.2. Test de l'activité lipolytique par chromatographie sur couche mince (CCM) : ...	31
3.3. Mesure de l'activité lipolytique des extraits :.....	32
4. Alignement de séquences multiples :.....	33
Chapitre 3 : Résultats et discussion	38
1. Caractérisation des échantillons :.....	39
2. Indice d'acide des substrats choisis pour tester l'activité :	39
3. Détection de l'activité lipolytique des extraits par CCM :.....	40
4. Détermination de l'activité hydrolytique des extraits :	41
5. Alignement de séquences multiples :.....	42
Conclusion	46
Références bibliographiques.....	48

Introduction

Les enzymes sont des macromolécules protéiques fonctionnant comme des catalyseurs spécialisés des réactions chimiques. Elles sont produites par tous les systèmes vivants et jouent un rôle critique dans la régulation de la fonction cellulaire (Li *et al.*, 2012 ; Madhu et Chakraborty, 2017 ; Hewitt et Butler, 2018).

Les lipases ou triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes largement répandues chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Elles font partie de la superfamille des α/β hydrolases qui interviennent dans l'hydrolyse des triacylglycérols à longue chaîne, substrats physiologiques des lipases (Javed *et al.*, 2018). Ces dernières hydrolysent les liaisons ester carboxylique dans des conditions aqueuses pour générer les di- ou mono-glycérides, acides gras et glycérol. Cependant et depuis plusieurs années, il s'est avéré que ces acyl-hydrolases sont également capables d'effectuer les réactions inverses allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoololyse tout en gardant une stabilité aux conditions extrêmes de pH, de température et de solvant (Mehta *et al.*, 2017), d'où l'intérêt de leurs applications dans les différents domaines biotechnologiques (Shuai *et al.*, 2017).

Parmi ces enzymes, les lipases végétales dérivées des graines semblent susciter le plus de travaux puisqu'ils représentent environ 42 % de l'ensemble des publications sur ce sujet (Mazou *et al.*, 2016). En effet, ces dernières présentent une meilleure spécificité et une large disponibilité à un faible coût (Seth *et al.*, 2014 ; Mishra et Kandali, 2019). De plus, ces biocatalyseurs sont plus faciles à obtenir que celles dérivées de micro-organismes, et ne doivent pas nécessairement être purifiées pour effectuer un processus enzymatique. (Kouteu *et al.*, 2017 ; Tavares *et al.*, 2018). Par conséquent, les lipases d'origines végétales ont une grande importance et peuvent être utilisées majoritairement dans les industries agroalimentaire, cosmétique, médicale et autres (Ding *et al.*, 2019).

Actuellement, la bioinformatique, nouvelle discipline émergente, soutient les découvertes *in vitro* grâce à l'analyse des séquences d'acides aminés. En effet, l'étude de similarité par alignement des séquences multiples avec des programmes informatiques, permet d'identifier les résidus essentiels au fonctionnement de ces protéines (Sharma *et al.*, 2018 ; Payá-Tormo *et al.*, 2019 ; Hou *et al.*, 2020).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans la présente étude à évaluer l'activité lipasique à partir des déchets de la maïserie de Tafna – Maghnia. Pour cela, comme premier objectif, un test de l'activité lipolytique est réalisé par une

chromatographie sur couche mince (Moussavou M *et al.*, 2016). Ensuite, une titration des acides gras libres est menée pour mesurer cette activité (Avelar *et al.*, 2013).

Le deuxième objectif s'est intéressé à la caractérisation de la lipase du maïs à l'aide d'outils informatiques. L'alignement et l'analyse de la séquence protéique est réalisée à l'aide de deux programmes Clustal W et ESPrit 3.0 (Kumar *et al.*, 2020).

Cette étude commence par une introduction générale, présentant la problématique du sujet, suivi de trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, une revue bibliographique constituée de deux parties :
 - La première définit les lipases avec leurs principales caractéristiques structurelles et réactionnelles, ainsi que leurs sources et applications industrielles.
 - La deuxième partie aborde la notion de la bioinformatique et de son utilité en biologie, les bases de données et l'état de l'art des différents programmes informatiques utilisés dans ce travail.
- Le deuxième chapitre expérimental explique les méthodes et techniques bioinformatiques appliquées dans ce travail.
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus des différents tests réalisés et leur interprétation.

Enfin, cette étude se termine par une conclusion générale.

Chapitre 1

Etude bibliographique

Partie 1 : Les lipases

1. Généralités :

Au cours des dernières décennies, les lipases ont attiré beaucoup d'attention en tant que biocatalyseur (Rodrigues *et al.*, 2019) (**Figure 1**). Elles sont parmi les enzymes les plus étudiées après les carbohydrases et les protéases, depuis plus de 300 ans (Kavitha, 2016 ; Chioke *et al.*, 2018). Les premières lipases ont été observées en 1856 par le physiologiste Claude Bernard dans le suc pancréatique, puis en 1901 par le microbiologiste Christiaan Eijkman dans certaines bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (dénommées maintenant *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus fluorescens*, respectivement) (Momsia et Momsia, 2013).

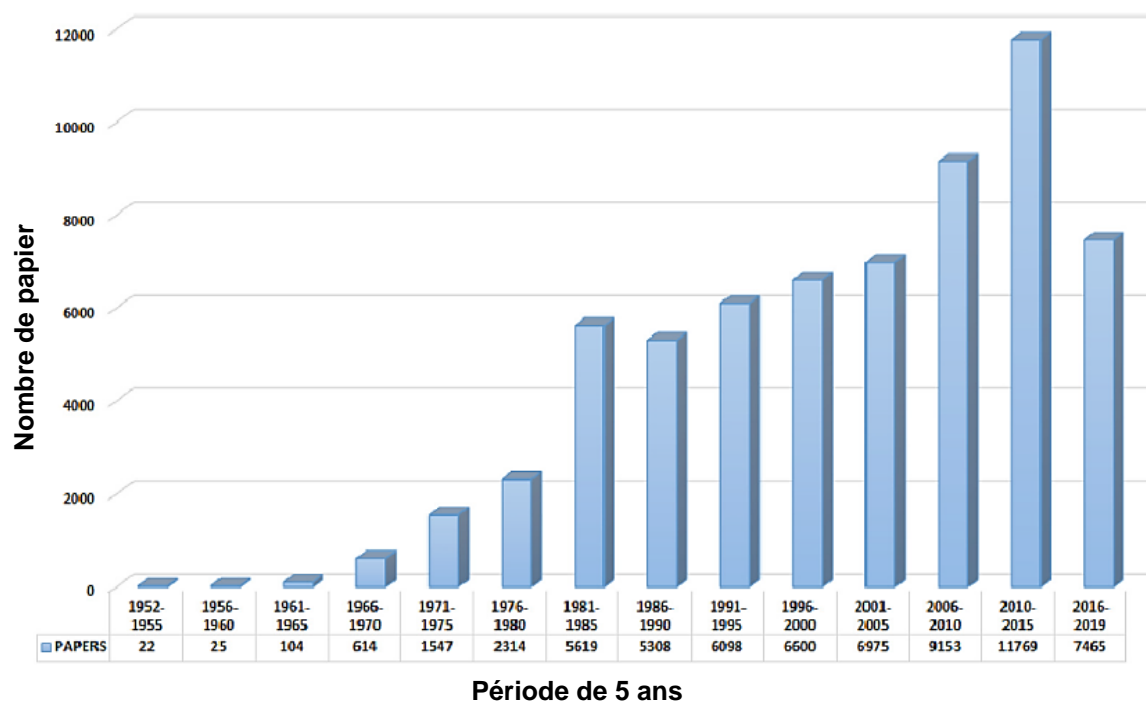


Figure 1 : Publications (de 1952 à janvier 2019) contenant « lipase » et « biocatal* » ou « biotransform* ». Source, Web of Science (Rodrigues *et al.*, 2019).

Les lipases ou triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3) appartiennent à la superfamille des α / β hydrolases spécifiques des esters carboxyliques (EC 3.1.1) (Zan *et al.*, 2019). Le rôle physiologique de ces enzymes hydrosolubles est la conversion catalytique des triglycérides, insolubles dans l'eau, en di- ou mono-glycérides, acides gras et glycérol sous l'interface formée entre les phases aqueuse et huileuse (Stergiou *et al.*, 2013 ; Köse *et al.*, 2017 ; Nataningtyas *et al.*, 2019) (**Figure 2**).

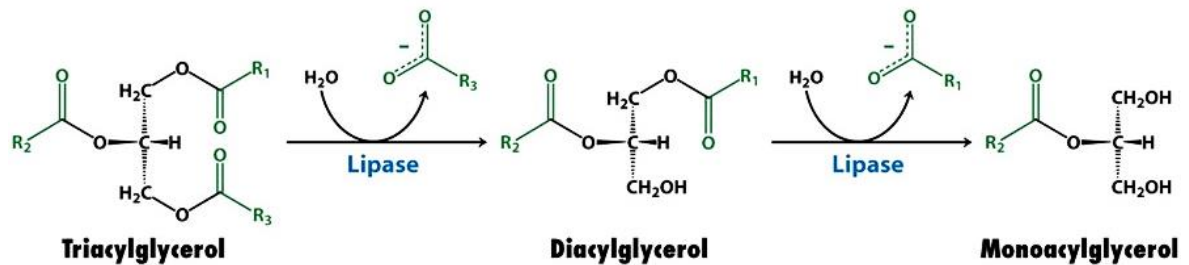


Figure 2 : Réactions catalysées par les lipases (Berg *et al.*, 2012).

En raison de leur grande stabilité aux températures extrêmes et aux solvants organiques, de leurs capacités à se réutiliser et à réaliser une grande variété de transformations chimio, régio et énantiosélectives, de leur large tolérance au substrat, ... (Kumar *et al.*, 2016), les lipases se retrouvent impliquées dans de nombreux domaines industriels tels que l'agroalimentaire, la pharmacie, les détergents, le biodiesel, l'oléochimie, la cosmétique et la parfumerie ou encore la papeterie, etc. (Carvalho *et al.*, 2015 ; Guerrand, 2017 ; Jayaraman *et al.*, 2019 ; Patel *et al.*, 2019).

2. Structure et mécanisme catalytiques des lipases :

Les études de la structure tridimensionnelle et du mécanisme catalytique des lipases ont commencé à susciter de l'intérêt depuis 1990 (Wei *et al.*, 2020). Les structures de la lipase du champignon *Rhizomucor miehei* et de la lipase pancréatique humaine ont été les premières résolues et publiées en 1990 (Brady *et al.*, 1990 ; Winkler *et al.*, 1990).

Les principales caractéristiques des structures de lipase illustrées comprennent le repli α / β -hydrolase, un site actif formé par la triade Ser-His-Asp / Glu, un trou oxyanion et, généralement, un couvercle formé par une hélice α qui recouvre le site actif (Bansode et Rathod, 2017). Le tableau 1 résume les données structurales disponibles pour certaines lipases largement étudiées.

Tableau 1 : Résumé des données structurales disponibles pour certaines lipases selon (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Lipase	Entré PDB	Couvercle	Triade catalytique	Trou oxyanion
<i>Candida antarctica B</i>	1TCA	-	S105, D187, H224	T40, Q106
<i>Candida rugosa</i>	1CRL	E66 - P92	S209, E341, H449	G124, A210
<i>Rhizomucor miehei</i>	1TGL	S83 - P96	S144, D203, H257	S82, L145
<i>Rhizopus oryzae</i>	1TIC	N84 - F95	S145, D204, H257	T83, L146
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1TIB	R84 - F95	S146, D201, H258	S83, L147
<i>Yarrowia lipolytica</i>	3O0D	T88 - L105	S162, D230, H289	T88, L163
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2Y6U	T174 - P190	S145, E169, His323	-
Lipase pancréatique humaine	1N8S	-	S153, H264, D177	F78, L154

- ❖ PDB : banque de données sur les protéines.
- ❖ Lettres : code des acides aminés à une lettre

2.1. Repliement α/β hydrolase :

Les lipases appartiennent aux membres catalytiques caractérisés par la présence d'un repli alpha / bêta-hydrolase conservé, qui est largement étendu dans différentes enzymes hydrolytiques, telles que les acétylcholinestérases, les carboxylestérases, les thioestérases, les cutinases, ... (Lenfant *et al.*, 2012).

Le repli α/β hydrolase est généralement composé d'une feuille β centrale parallèle de huit brins bêta, à l'exception de β_2 , qui est antiparallèle par rapport aux autres. La feuille centrale présente une torsion superhélique à gauche, générant un angle de 90 ° entre le premier et le dernier brin (Anobom *et al.*, 2014). Les brins β_3 à β_8 sont reliés par des hélices α disposées sur les côtés de la feuille β centrale (Mancheño *et al.*, 2003). Certaines variations du repli α / β se retrouvent au sein des différentes familles de lipases. Il convient de noter que la présence de ponts disulfures au sein de la structure des lipases améliore la thermostabilité de l'enzyme tout en maintenant son efficacité catalytique (Le *et al.*, 2012) (**Figure 3**).

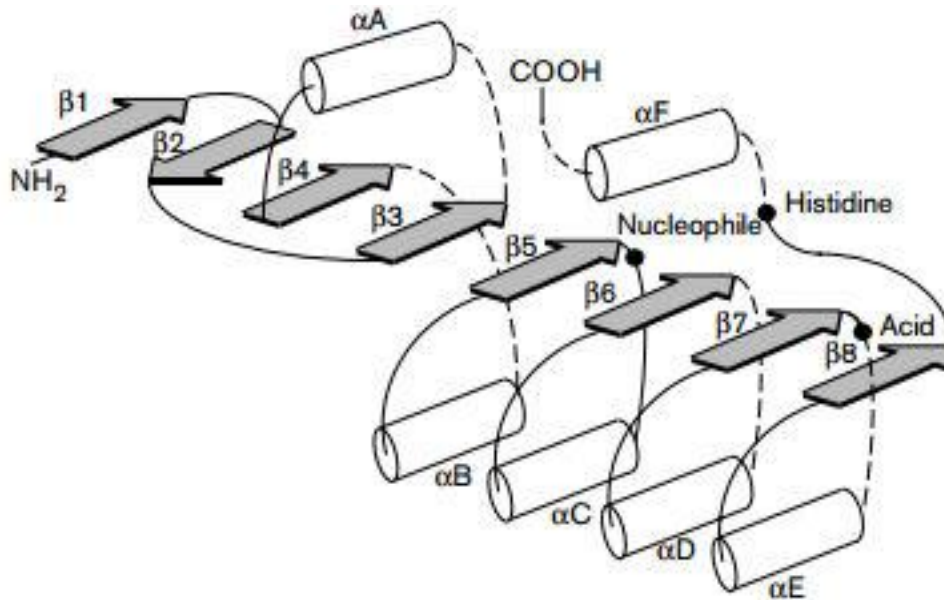


Figure 3 : Le repli alpha / bêta-hydrolase (Jaeger *et al.*, 1999).

2.2. Activation interfaciale :

Les lipases sont des enzymes hydrosolubles qui catalysent l'hydrolyse des lipides. Cependant, les lipides étant pour la plupart hydrophobes, ces enzymes sont ainsi adaptées pour fonctionner aux interfaces des systèmes biphasiques, ce phénomène est connu sous le nom de l'activation interfaciale (Melani *et al.*, 2020).

L'analyse structurale des lipases a montré que la majorité des acides aminés hydrophobes de la surface protéique sont situés au niveau des régions spécifiques, appelées couvercle et clapet (Cheng *et al.*, 2018), reliées à l'enzyme par des structures flexibles et mobiles (Casas-Godoy *et al.*, 2018). Ces régions assurent l'orientation du site actif vers l'interface huile-eau pour activer l'enzyme (Cheng *et al.*, 2018).

Le couvercle protège le site actif de la lipase. Dans les milieux aqueux purs, il est principalement fermé, l'entrée du site actif est ainsi bloquée et l'enzyme est inactive (Casas-Godoy *et al.*, 2018). Tandis qu'en présence d'une interface lipide-eau, cette région est partiellement ouverte pour libérer le site actif générant un changement de la conformation et permettant ainsi l'accès du substrat au site actif (Gupta *et al.*, 2015 ; Khan *et al.*, 2017) (**Figure 4**).

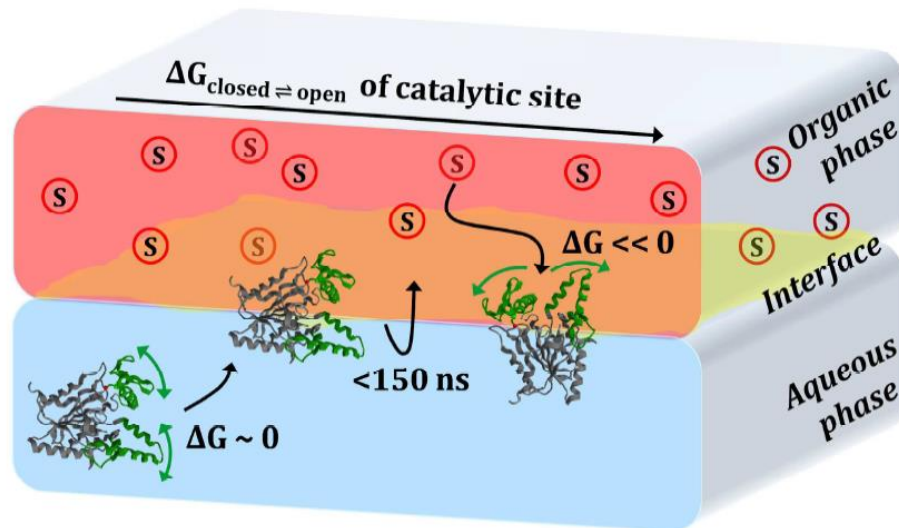


Figure 4 : Mécanisme d'activation de lipase de *Burkholderia cepacia* dans les interfaces formées entre les phases aqueuse et organique (de Oliveira *et al.*, 2017).

2.3. Mécanisme catalytique :

Les lipases appartiennent à la famille des sérines hydrolases (Pascoal *et al.*, 2018). Les réactions catalysées par ce groupe d'enzymes se produisent par un mécanisme bi-bi ping-pong, avec un intermédiaire réactionnel acylenzyme (de Miranda *et al.*, 2015). Elles fonctionnent ainsi selon un mécanisme classique d'une triade catalytique hautement conservée : Serine (résidu nucléophile), Aspartate ou Glutamique (résidu acide catalytique) et Histidine (Cen *et al.*, 2019 ; Gonçalves Filho *et al.*, 2019) (**Figure 5**). Le résidu nucléophile étant toujours situé au sommet d'un "γ-turn" entre le brin β5 et l'hélice α suivante (le coude nucléophile) comme montré précédemment dans la figure 3 (Lenfant *et al.*, 2012).

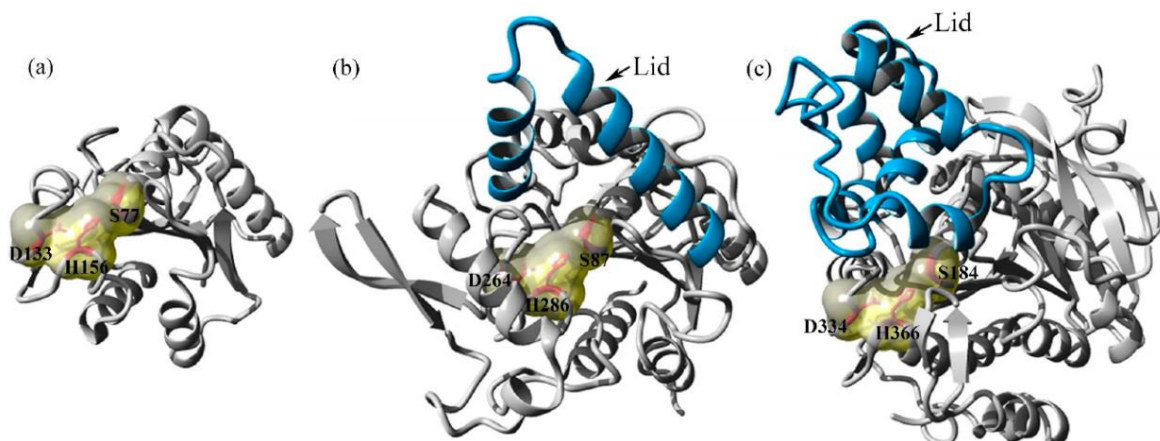


Figure 5 : Structure de lipase de *Bacillus subtilis* (a), de *Burkholderia cepacia* (b) et de *Candida antarctica A* (c) avec détermination de la position des résidus de la triade catalytique (Albayati *et al.*, 2020).

Le mécanisme de catalyse se déroule en deux étapes successives (**Figure 6**) :

Une acylation consiste en le transfert d'un proton entre les résidus aspartate, histidine et sérine de la lipase, provoquant l'activation du groupe hydroxyle de la sérine catalytique (Casas-Godoy *et al.*, 2018). En conséquence, le résidu hydroxyle de la sérine attaque le carbone carbonyle de la liaison ester, formant un intermédiaire acylenzyme covalent et chargé négativement sur l'oxygène du groupe carbonyle, et libérant l'alcool après qu'il accepte un proton, c'est-à-dire le diacylglycérol serait libéré après la formation d'un groupe hydroxyle dans une molécule de triacylglycérol (de Miranda *et al.*, 2015 ; Casas-Godoy *et al.*, 2018). Cet intermédiaire tétraédrique est stabilisé par les résidus du trou oxyanion (Barriuso *et al.*, 2016) en formant des liaisons hydrogène entre leur proton amide de squelette et l'oxygène du groupe carbonyle du substrat (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

L'étape de désacylation consiste en une deuxième attaque nucléophile de l'intermédiaire par une molécule d'eau, formant ainsi un acide carboxylique et libérant l'enzyme (Mehta *et al.*, 2017). De nombreux composés différents peuvent agir comme donneurs d'acyle et de même, en plus de l'eau, de nombreux composés nucléophiles peuvent jouer le même rôle et briser l'intermédiaire acylenzyme notamment l'alcool, l'acide ou l'ester (Adlercreutz, 2013 ; Jung *et al.*, 2013).

En raison de cette large spécificité de substrat, les lipases peuvent effectuer plusieurs réactions telles que la transestérification, l'estérification, l'interestérification et l'acidolyse au-delà de leur hydrolyse naturelle de l'acylglycérol (Mehta *et al.*, 2017).

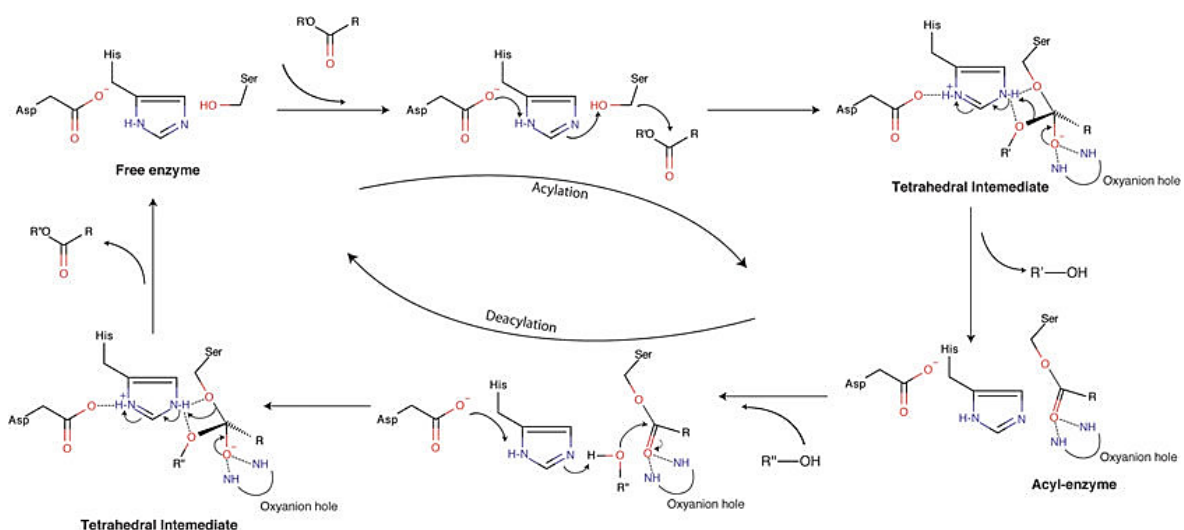


Figure 6 : Etapes du mécanisme catalytique de la lipase (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

3. Lipase comme biocatalyseur :

Les lipases peuvent catalyser une grande variété de réactions (**Figure 7**), tout en acceptant divers substrats, différents même de leur substrat naturel en conservant leur régiosélectivité et leur stéréosélectivité (Gandhi *et al.*, 2000).

La capacité des lipases à catalyser l'hydrolyse ainsi que l'estérification a été reconnue il y a près de 90 ans (Van Der Walle, 1927). En raison de leur grande stabilité aux températures extrêmes, au pH et aux solvants organiques, les lipases sont très efficaces dans les réactions de catalyse dans les milieux aqueux et non aqueux (Tan *et al.*, 2018). En effet, en présence d'un excès d'eau, ces enzymes soient conçues par nature pour l'hydrolyse des liaisons ester dans les triacylglycérols, alors qu'en milieu organique, un environnement à faible teneur en eau, elles peuvent catalyser la synthèse d'esters (Fickers *et al.*, 2008 ; Singh et Mukhopadhyay, 2012).

3.1. La réaction de l'hydrolyse :

Dans des conditions aqueuses, les lipases catalysent naturellement l'hydrolyse des liaisons esters carboxyliques dans les triacylglycérols à longue chaîne pour produire des acides gras et du glycérol, la réaction se produit à l'interface entre les phases aqueuse et huileuse (Reis *et al.*, 2009 ; Bian *et al.*, 2010). Néanmoins, comme le montre la figure 7, ces enzymes sont également actifs sur une large gamme de substrats.

L'hydrolyse est l'une des applications importantes de la lipase (Shuai *et al.*, 2017), elle permet la production d'acides gras dans divers industries comme la fabrication de produits cosmétiques et alimentaires (Su *et al.*, 2018), tels que la cardiologie dont un bon équilibre des acides gras oméga-6 et oméga-3 (soit un rapport de 4/1) est recommandé pour une diminution significative de la mortalité totale chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (Patterson *et al.*, 2012), la neurologie dont une formule à base des acides gras essentiels et de tocophérols peut réduire la maladie de sclérose en plaques (Pantzaris *et al.*, 2013).

3.2. La réaction de synthèse d'esters :

Les lipases, dans des conditions thermodynamiques favorables (c'est-à-dire une faible activité de l'eau), catalysent également une grande variété de réactions de synthèse qui peuvent être classées en deux principaux types, à savoir l'estérification et la transestérification (Kapoor et Gupta, 2012).

Comme le montre la figure 7, l'estérification est la réaction où un acide gras est lié à un alcool par une liaison covalente, produisant un ester et libérant une molécule d'eau. La thioestérification et l'amidation sont des réactions similaires mais avec un thiol ou une amine comme substrats. La transestérification regroupe les réactions d'alcoolyse, d'acidolyse, d'aminolyse et d'interestérification (Casas-Godoy *et al.*, 2018). Les lipases sont également capables d'exprimer d'autres activités telles que les activités phospholipase, isophospholipase, cholestérol estérase, cutinase ou amidase (Bora *et al.*, 2013).

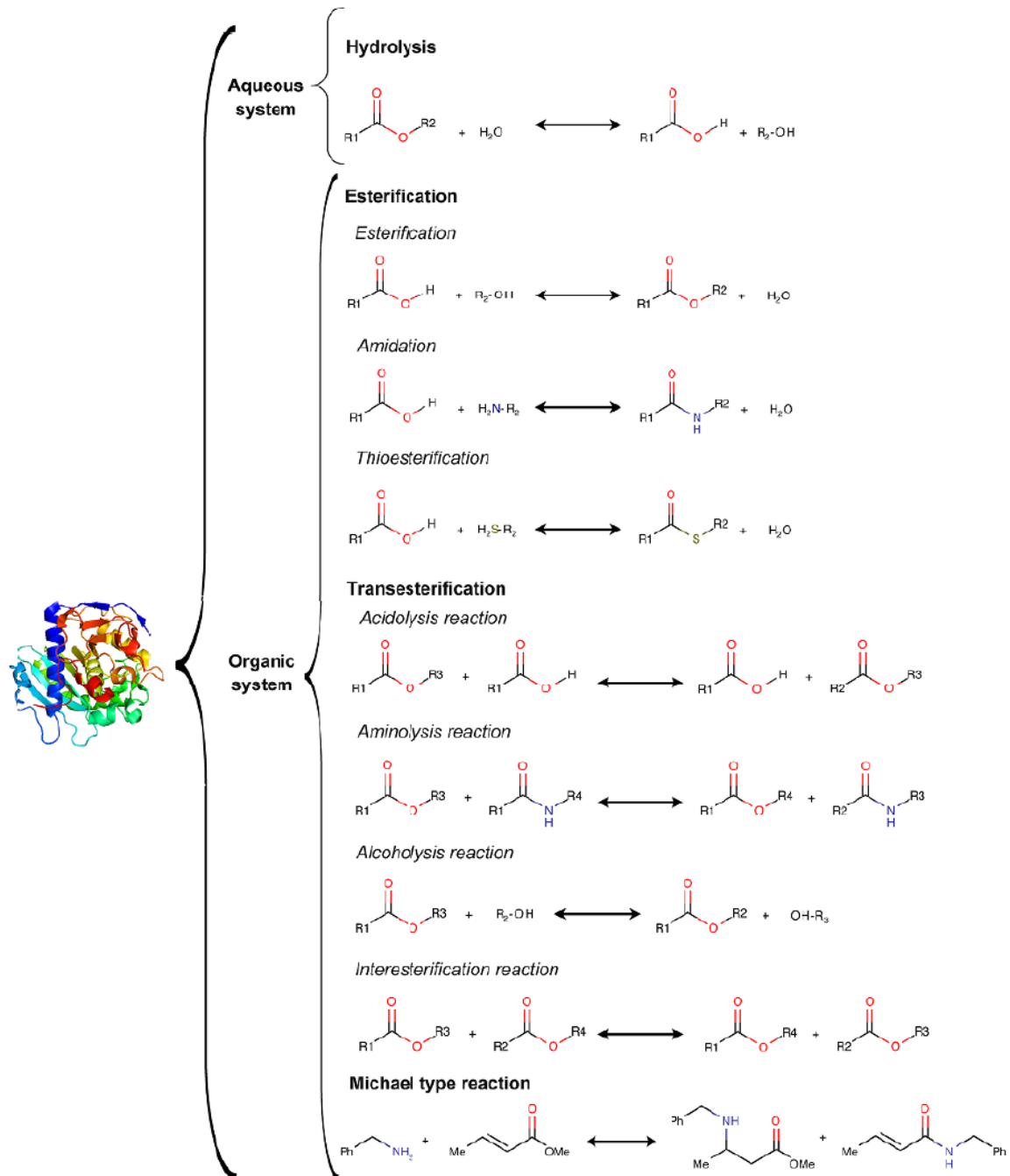


Figure 7 : Réactions catalysées par la lipase dans les systèmes aqueux et organiques (Castillo *et al.*, 2016).

4. Propriétés de sélectivité des lipases :

En tant que biocatalyseurs, les lipases ont plusieurs propriétés intéressantes. Elles possèdent différents types de sélectivité envers leurs substrats. C'est la principale raison de leur utilisation en industrie, quel soit en hydrolyse ou en synthèse organique.

4.1. La chimiosélectivité :

La chimiosélectivité des lipases est sa capacité de à catalyser spécifiquement la transformation d'un groupement fonctionnel donné, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes capables d'interagir avec la lipase (OH, NH, SH...). Elle trouve un domaine d'application dans de nombreuses études. En 2010, Hedfors *et al.* ont évalué la chimiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica* envers l'hexanol et l'hexanethiol dans des réactions de transacylation. Cette lipase a montré un rapport de chimiosélectivité très élevé

4.2. La régiosélectivité :

La régiosélectivité, ou spécificité de position, qualifie la lipase à interagir préférentiellement avec l'un des groupes fonctionnels identiques situés, chimiquement, dans différentes positions de la même molécule de substrat.

D'après plusieurs scientifiques, les lipases sont divisées en trois groupes en fonction de leur régiosélectivité envers les triacylglycérols : lipases 1,3-spécifiques, lipases spécifiques des acides gras et lipases non spécifiques (Ribeiro *et al.*, 2011 ; Kapoor et Gupta, 2012 ; Chioke *et al.*, 2018 ; Vishnoi *et al.*, 2020). Cependant certains chercheurs remplacent le deuxième groupe par lipases 2-spécifiques (Castillo *et al.*, 2016). Les tableaux 2 et 3 montrent quelques exemples issus de la littérature concernant la régiosélectivité de quelques lipases.

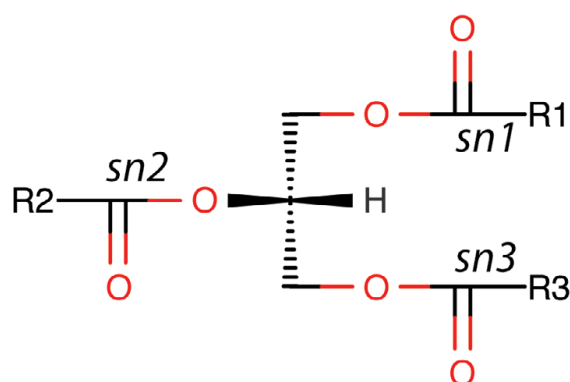


Figure 8 : Régiosélectivité des lipases. Liaisons ester potentiellement hydrolysées par les lipases dans un triglycéride (Castillo *et al.*, 2016).

4.2.1. Lipases 1,3-spécifiques :

Les lipases 1,3-spécifiques touchent rarement la liaison ester moyenne, elles hydrolysent préférentiellement les esters primaires de la molécule de triglycéride (positions sn-1 et sn-3) produisant des acides gras, des 2-monoacylglycérols et des 1,2 ou 2,3 diacylglycérols (Chioke *et al.*, 2018 ; Sarmah *et al.*, 2018). En raison de l'instabilité de ces derniers composés, la migration d'acyle se produit conduisant à la formation de 1 ou 3-monoacylglycérols et de 1,3-diacylglycérol, respectivement (Barros *et al.*, 2010). Il convient de noter que certaines lipases peuvent catalyser l'hydrolyse de groupements esters en position sn-2.

4.2.2. Lipases non spécifiques :

Cette classe de lipases est très robuste et capable d'agir sur plusieurs substrats, les lipases non spécifiques hydrolysent indifféremment tout type de liaisons esters des triglycérides (sn-1, sn-2 et sn-3), en générant des acides gras libres et du glycérol (Akil *et al.*, 2016) avec des mono et diacylglycérols comme intermédiaires (Sarmah *et al.*, 2018). Les lipases non spécifiques ne sont pas utiles en industrie car elles attaquent au hasard les liaisons ester sur une molécule de triglycéride (Chioke *et al.*, 2018) (**Figure 9**).

4.2.3. Lipases spécifiques des acides gras :

Le troisième groupe de lipases montre une sélectivité en acides gras et catalyse l'hydrolyse des esters formés par des acides gras à longue chaîne avec des doubles liaisons en position cis entre C-9 et C-10 (Ribeiro *et al.*, 2011) (**Figure 9**).

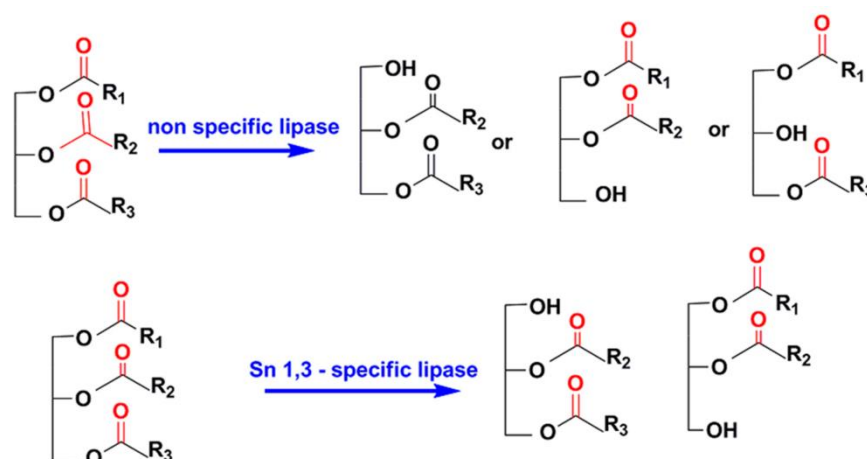


Figure 9 : Régiosélectivité des lipases. Produits de différentes réactions (Paques et Macedo, 2006).

4.3. Enantiosélectivité :

Les lipases sont largement utilisées dans la synthèse organique des isomères optiquement purs tels que les produits pharmaceutiques, les produits agrochimiques et les produits naturels (Avelar do Nascimento *et al.*, 2019). L'énantiosélectivité de lipase est donc sa capacité à discriminer entre deux énantiomères dans un mélange racémique (ex : 1-2 DAG versus 2-3 DAG), et à interagir avec l'un d'entre eux, par exemple des triacylglycérols comportant trois acides gras différents (Barros *et al.*, 2010).

5. Sources de lipases :

Les lipases sont des enzymes ubiquitaires et très répandues dans la nature (Nemati *et al.*, 2019). Elles peuvent être produites par différentes sources telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes (Rai *et al.*, 2020).

5.1. Source végétale :

La majorité des lipases végétales sont disponibles à partir de sources de semences telles que le ricin, le haricot africain, l'orme, le tournesol, le lupin, le lin, l'amande de noix de coco, le cumin noir, le blé, le riz, le maïs, l'avoine, l'orge, le sésame, le sorgho, etc. (Sarmah *et al.*, 2018).

Les lipases sont disponibles à partir de diverses parties d'une plante, y compris les graines, les fruits, le latex, les feuilles, le son, etc. (Sarmah *et al.*, 2018). Cependant, elles sont principalement localisées dans les graines, où elles servent de source d'énergie en hydrolysant des triglycérides de réserve nécessaires à la germination et à la croissance postgerminative (Patil *et al.*, 2011 ; Chapman *et al.*, 2012 ; Sarmah *et al.*, 2018). De plus, elles jouent un rôle défensif lors de blessures, lorsque des acides gras polyinsaturés et des acides gras estérifiés dans les lipides membranaires sont libérés des membranes cellulaires et chloroplastiques par les lipases (Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013 ; Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2017).

5.2. Source Animale :

Les lipases synthétisées par les cellules animales ont plusieurs fonctions physiologiques (Patil *et al.*, 2011 ; Casas-Godoy *et al.*, 2018). Ce sont des composants clés du métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Zechner *et al.*, 2012). Ainsi, ils sont produits dans le système digestif pour hydrolyser les triglycérides absorbés. Leur production serait activée par un système de régulation hormono-sensible lorsque la

demande énergétique augmente, déclenchant ainsi la dégradation des triglycérides de réserve (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Chez les insectes, les lipases sont utilisées pour la digestion des graisses alimentaires, l'hydrolyse et la mobilisation des lipides (Qiu *et al.*, 2013) et le développement du stade larvaire de l'insecte (Sakate et Salunkhe, 2013).

5.3. Source microbienne :

De nombreux micro-organismes sont connus comme producteurs potentiels de lipases, notamment des bactéries, des champignons et des levures (Bharathi et Rajalakshmi, 2019).

Les microorganismes utilisent la production de lipases extracellulaires afin d'hydrolyser les triglycérides dans les milieux et de faciliter l'ingestion de lipides. L'expression de la lipase dans les micro-organismes est ainsi principalement régulée par des facteurs environnementaux, en tant que réponse extracellulaire à un milieu privé de nutriments (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

5.3.1. Lipase bactérienne :

De nombreuses souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives différentes produisent l'enzyme lipase (Bharathi et Rajalakshmi, 2019). Les lipases bactériennes peuvent être extracellulaires, intracellulaires ou liées à la membrane et pour la plupart sont des glycoprotéines, mais certaines d'entre elles sont des lipoprotéines (Sarmah *et al.*, 2018). Les lipases bactériennes seraient plus souvent non spécifiques au substrat et thermostables en plus d'être abondantes (Dhake *et al.*, 2013 ; Vaquero *et al.*, 2016).

Parmi les bactéries productrices de lipase les plus importantes sur le plan commercial appartiennent aux genres *Bacillus*, qui comprennent *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*. Il y a également d'autres souches bactériennes productrices de lipase telles que *pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* et *Staphylococcus sp.* (Sangeetha *et al.*, 2010 ; Daoud *et al.*, 2013 ; Dror *et al.*, 2015 ; Gowthami *et al.*, 2015 ; Mabizela-Mokoena *et al.*, 2017 ; Suci *et al.*, 2018).

5.3.2. Lipase fongique :

Parmi les sources microbiennes, les champignons filamenteux sont de bons producteurs de lipase et les étapes d'extraction, de purification et de traitement sont relativement simples (Bharathi et Rajalakshmi, 2019). La production de lipases extracellulaires et intracellulaires (Sharma *et al.*, 2011) par le champignon varie selon la souche et la composition du milieu de croissance comme la source de carbone ou d'azote ainsi que de la température (Pandey *et al.*, 2016).

Les lipases de levure constituent une source très importante de lipases compte tenu de leurs attributs uniques en plus de leur facilité de culture qui les rendent recherchées par de nombreuses industries (Sarmah *et al.*, 2018). Une étude bibliographique récente montre que *Candida antarctica*, *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Rhodotorula* sp., *Yarrowia* sp. et *Pichia* sp. sont les meilleurs et principaux producteurs de lipases (Resina *et al.*, 2009 ; Moftah *et al.*, 2012 ; Fang *et al.*, 2014 ; Divya et Padma, 2015 ; Lan *et al.*, 2016 ; Su *et al.*, 2016 ; Sarmah *et al.*, 2018).

Il convient de noter que ces lipases fongiques peuvent catalyser un large éventail de réactions, notamment l'hydrolyse, l'estérification, la transestérification, la désacétylation, l'alcoolyse, l'acidolyse, la saponification, l'éthanololyse, la résolution cinétique hydrolytique, etc. (Sarmah *et al.*, 2018).

Tableau 2 : Source et régiospécificité de certaines lipases animales et végétales non commercialisées.

Lipase	Régiospécificité	Références
Graine colza (<i>Brassica napus</i>)	Sn-1,3	(Hills <i>et al.</i> , 1990)
Graine de coco (<i>Cocos nucifera</i> linn)	Sn-1,3	(Barros <i>et al.</i> , 2010)
Graine de lupin (<i>Lupinus luteus</i> L.)	Sn-1,2	(Barros <i>et al.</i> , 2010)
Graine de riz (<i>Oryza sativa</i>)	Sn-2	(Barros <i>et al.</i> , 2010)
Graine du maïs (<i>Zea mays</i>)	-	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
Graine de ricin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Sn-1,2	(Barros <i>et al.</i> , 2010)
Latex de papaya (<i>carica papaye</i>)	Sn-1,3	(Tecelão <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 3 : Source et régiospécificité des lipases commerciales communes.

Lipase	Forme	Régio-spécificité	Compagnie	Références
Lipase pancréatique de porc (Créon)	Granule enrobé	Sn-1,3	Solvay pharmaceutica	(Gewert <i>et al.</i> , 2004)
Lipase pancréatique porcine	Poudre	Sn-1,3	Sigma	(Yang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Triticum aestivum</i> (Germe de blé)	Poudre	-	Sigma-Aldrich	(Salaberría <i>et al.</i>)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax)	Poudre	Non spécifique	Genencor	(Jaeger et Reetz, 1998)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Poudre	Non spécifique	Amano	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Poudre	Sn-1,3	Asahi Chemical Industry	(Shah <i>et al.</i> , 2004)
<i>Candida rugosa</i>	Poudre	Non-spécifique	Sigma	(Knezevic <i>et al.</i> , 2004)
<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Immobilisée	Non spécifique	Novo Nordisk	(Ducret <i>et al.</i> , 1995)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Immobilisée	Sn-1,3	Novo Nordisk	(Ferrer <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)	Immobilisée	Sn-1,3	Novo Nordisk	(Reena et Lokesh, 2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> (Lipolase)	Poudre	Sn-1,3	Novo Nordisk	(Rathod et Pandit, 2009)

6. Application industrielle des lipases :

Les lipases trouvent une énorme application dans les industries de la transformation des graisses et des huiles, l'industrie oléochimique, l'industrie agroalimentaire, les détergents, l'industrie des papiers et pâtes à papier, les biocapteurs et les cosmétiques et la parfumerie, etc.

6.1. Agroalimentaire :

Les lipases ont de nombreuses applications et avantages dans les industries agroalimentaires (tableau 4) (Guerrand, 2017). Elles sont généralement utilisées dans la production de produits laitiers, tels que le fromage aux saveurs typiques, dans lesquelles

les lipases décomposent les graisses du lait et donnent des saveurs caractéristiques aux fromages (Choudhury et Bhunia, 2017).

Dans les applications de boulangerie, ces enzymes sont employées pour dégrader les lipides polaires de blé produisant des lipides émulsifiants in situ complémentaires aux émulsifiants traditionnels (Custry *et al.*, 2000 ; Kirk *et al.*, 2002 ; Sarmah *et al.*, 2018). Comme dans d'autres processus alimentaires, elles sont également utilisées pour améliorer la teneur en arôme des produits de boulangerie par réaction d'estérification (Negi, 2019). En synergie avec d'autres enzymes de cuisson, les lipases contribuent à augmenter le volume du pain et à améliorer la fermeté de la mie (Robert, 2015).

Tableau 4 : Exemples de lipase appliquée en agroalimentaire.

Source	Application	Références
<i>Cryptococcus flavescens</i>	Production d'arôme du fromage mozzarella	(Mase <i>et al.</i> , 2013)
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amélioration du fromage bleu par production des AGL et méthylcétone	(Cao <i>et al.</i> , 2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Production de l'analogue HMF contenant des acides gras oméga-3	(Ilyasoglu, 2013)
<i>Fusarium oxysporum</i> (Lipopan F)	Amélioration du volume du pain, effet émulsifiant (DATEM)	(Guy et Sahi, 2006)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Production d'acétate de furfuryle, arôme utilisée en boulangerie	(Mathpati <i>et al.</i> , 2016)
<i>Staphylococcus simulans</i>	Production d'arôme de la pomme verte et de la poire	(Karra-Châabouni <i>et al.</i> , 2006)
<i>Carica papaya</i>	Production des équivalents du beurre de cacao	(Pinyaphong et Phutrakul, 2009)
<i>Zea mays</i>	Production d'esters de bas poids moléculaire	(Liaquat et Apenten, 2000)

6.2. Médical et pharmaceutique :

Les lipases sont largement mises en œuvre dans les applications pharmaceutiques pour la synthèse d'intermédiaires énantiomériquement purs des médicaments (Carvalho *et al.*, 2015) ou dans le diagnostic de certaines maladies (Javed *et al.*, 2018). D'autres produits pharmaceutiques comme les liposomes sont produits à partir des acides gras polyinsaturés libres et leurs mono et diacylglycérides. Ces derniers sont obtenus à partir de lipides animaux et végétaux à l'aide des lipases (Sharma *et al.*, 2001).

Au cours de la production de Polixatel, médicament anticancéreux, en particulier le cancer de l'ovaire, les lipases jouent un rôle dans la synthèse d'un composé intermédiaire chiral (Fukaya *et al.*, 2016). La lipase de *Candida rugosa* est utilisée pour synthétiser la lovastatine, un médicament hypocholestérolémiant (Momsia et Momsia, 2013). Les Profens (acides 2-arylpropioniques) sont un groupe important d'anti-inflammatoires non stéroïdiens qui ne sont actifs que dans une conformation spécifique. Cette particularité est assurée par estérification énantiosélective catalysée par la lipase provenant de *Candida antarctica* et *Candidat rugosa* (Sikora *et al.*, 2014) (**Figure 10**).

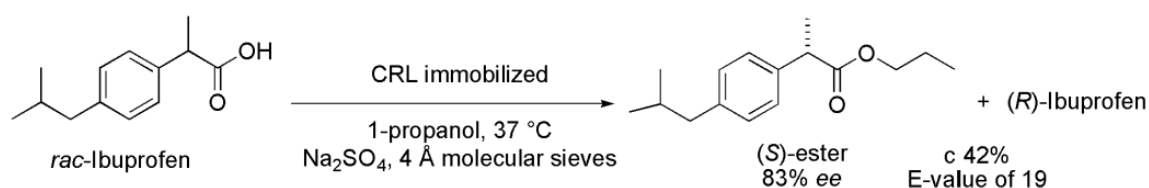


Figure 10 : Estérification enzymatique du *rac*-ibuprofène par la lipase de *C. rugosa* (Marszałł et Siódmiak, 2012).

En déterminant son activité et son niveau dans le sérum sanguin, les lipases peuvent agir également comme un indicateur de diagnostic pour la détection de certaines anomalies telles que la pancréatite aiguë, les lésions pancréatiques et des maladies cardiaques, ou de certaines infections comme la tuberculose dont la lipase sécrétée par l'agent infectieux *Mycobacterium tuberculosis* peut être détectée (Hofmeyr *et al.*, 2014 ; Javed *et al.*, 2018).

Tableau 5 : Utilisation des lipases dans les préparations pharmaceutiques selon (Carvalho *et al.*, 2015).

Principe pharmaceutiquement actif	Lipase commerciale commune et / ou espèces productrices
<i>Ketorolac</i>	Novozyme 435
<i>Chloramphenicol</i>	<i>C. antarctica</i> lipase B (CAL-B, Novozyme 435)
<i>Ketoprofen</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Prosimpal</i>	<i>Arthrobacter</i> (ABL)
<i>Pregabalin and analogs</i>	Novozyme 435, Lipolase®, Lipozyme TL IM®
<i>Dihydropyridine Derivatives</i>	<i>Candida antarctica</i> A (CAL-A, NZL-101), Porcine Pancreatic Lipase
<i>Crizotinib</i>	<i>Candida antarctica</i> lipase B (CAL-B), <i>Rhizopus delemar</i>

6.3. Détergent :

L'application des lipases dans l'industrie des détergents se développe rapidement. Elles sont utilisées à la place des ingrédients chimiques par les entreprises produisant des détergents à base d'enzymes (Javed *et al.*, 2018). Les lipases qui sont capables d'hydrolyser les graisses avec diverses compositions, stables dans les conditions de lavage (température élevée et pH alcalin), solubles dans l'eau, tolérantes aux autres formulations de détergent et peu spécifiques du substrat interviennent dans la production des poudres de lavage ainsi que les détergents liquides (Quax, 2006 ; Chauhan *et al.*, 2013).

Après l'ajout de l'eau, les lipases absorbées sur la surface du tissu catalysent l'hydrolyse des liaisons chimiques (Hasan *et al.*, 2006). Sur des tissus de coton, les lipases de *Staphylococcus arlettae* et de *Bacillus sonorensis* peuvent éliminer, lorsqu'elles sont mélangées à un détergent, 62 % des taches d'huile d'olive et du maïs, respectivement (Chauhan *et al.*, 2013 ; Nerurkar *et al.*, 2013). La lipase produite par *Pseudomonas aeruginosa* a une activité spécifique élevée qui montre des performances de lavage améliorées (Unni *et al.*, 2016). Les lipases de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* sont aussi utilisées pour cette application (Wang *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009).

6.4. Biodiesel :

En raison de ses avantages environnementaux et économiques, la production de biodiesel a fortement augmentée au cours de la dernière décennie. Chimiquement, le biodiesel est un ensemble d'ester alkyle des acides gras. C'est un biocarburant durable et renouvelable, reconnu comme un carburant alternatif pertinent au carburant fossile. Il est obtenu par des réactions de transestérification entre des triacylglycérols, présents dans les huiles et les graisses, et un alcool, dont les lipases jouent le rôle principal de la catalyse enzymatique de cette réaction (Eryilmaz *et al.*, 2016 ; Moussavou M *et al.*, 2016 ; Gonçalves Filho *et al.*, 2019).

Une lipase thermophile isolée de *Geobacillus thermodenitrificans* est utilisée pour produire du biodiesel à partir d'huile de cuisson usagée avec un rendement de conversion de 76 % (Christopher *et al.*, 2015). Une lipase immobilisée thermotolérante de *Bacillus aerius* est utilisée pour la transestérification de l'huile de ricin pour la production de biodiesel. Dans des conditions optimisées, le rendement le plus élevé était de 78,13 % (Narwal *et al.*, 2015).

Plusieurs lipases végétales sont évaluées pour catalyser la synthèse d'esters alkyles. Par exemple, la lipase d'*Adansonia grandidieri* a montré une forte activité pour la transestérification de l'huile de tournesol avec divers alcools avec un rendement allant jusqu'à 95 % (Kouteu *et al.*, 2017). Un autre exemple, la lipase du babaco (*Vasconcellea heilbornii*) pourrait catalyser la conversion de 70 % des TAG de l'huile de tournesol en esters méthyliques à 30 °C (Cambon *et al.*, 2009).

6.5. Oléochimique :

L'industrie oléochimique requiert l'utilisation des lipases pour initier diverses réactions en utilisant divers substrats (Salihu et Alam, 2012). Ces biocatalyseurs sont très utiles pour modifier les propriétés lipidiques des graisses et huiles alimentaires, par déplacement de l'acide gras au sein des glycérides ou par changement d'un ou plusieurs acides gras par de nouveaux (Kirana *et al.*, 2016), ou bien dans la synthèse des structures lipidiques par des réactions d'estérification et d'interestérification (Kim et Akoh, 2015). En 2014, Chojnacka *et al.* ont étudié l'incorporation d'acide linoléique, présent sous forme de triglycéride dans divers huiles végétales, dans la phosphatidylcholine (PC) de jaune d'œuf par Novozyme 435. L'incorporation maximale d'acide α et γ -linoléique dans la PC était de 34 % et 50,7 %, respectivement.

Sur la base des résultats obtenus par Souza *et al.* (2015), la lipase de *Moniliella spathulata* a un potentiel d'application dans l'industrie oléochimique pour le traitement des effluents chargés de pétrole. Cette lipase a montré un potentiel de dégradation de différentes huiles résiduelles avec une activité catalytique maximale de 2,47 U/ml.

6.6. Cosmétique :

Les lipases ont un large éventail dans l'industrie des cosmétiques. Elles interviennent dans production de divers produits tels que les crèmes solaires, les huiles de bain et les parfums (Vishnoi *et al.*, 2020). Les lipases sont également utilisées comme ingrédients de crèmes antiobèses topiques pour éliminer les graisses (Sonne *et al.*, 2015).

Des lipases dérivées de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas cepacia* sont employées pour la synthèse des esters de menthol qui fournissent une saveur de menthe poivrée pour certains produits cosmétiques (Chaplin *et al.*, 2006). La lipase de *Candida antarctica* est jugée la plus appropriée pour la synthèse enzymatique de plusieurs ingrédients aromatisant comme la propionate de benzyle et l'acétate de géranyle (Bhavsar et Yadav, 2019 ; de Meneses *et al.*, 2019).

Partie 2 : Analyse des protéines
in silico

1. Généralités :

Le terme bioinformatique n'est apparu dans la littérature scientifique qu'au début des années 1990. La bioinformatique a évolué en fonction des nouveaux problèmes posés par la biologie moléculaire (Ouzounis et Valencia, 2003). Elle consiste en une analyse *in silico* de l'information biologique contenue dans les séquences nucléiques et protéiques à l'aide des outils et techniques informatiques. Une variété de définitions existe, celle proposée par Pal *et al.* (2006) est adoptée :

« La bioinformatique est un domaine interdisciplinaire impliquant la biologie, l'informatique, les mathématiques et les statistiques pour analyser les données de séquence biologique, le contenu et l'arrangement du génome, et prédire la fonction et la structure des macromolécules »

Selon Mount (2004), le but ultime de la bioinformatique peut être résumé en trois grandes lignes :

- ❖ Acquisition et organisation des données biologiques.
- ❖ Conception de logiciels pour l'analyse, la comparaison et la modélisation des données.
- ❖ Analyse des résultats produits par les logiciels.

2. Les bases de données :

Le stockage, l'organisation et la diffusion de la bioinformation est l'un des aspects importants dans la bioinformatique. Une base de données biologique est une collection de données organisées par un traitement informatique pour permettre un stockage de grandes quantités d'informations facilement accessibles, gérées et mises à jour (Beroud, 2010). L'activité de préparation d'une base de données peut être divisée en :

- ❖ Collection de données sous une forme facilement accessible.
- ❖ Mise à la disposition d'un système toujours disponible pour l'utilisateur.

2.1. Les banques de données généralistes :

Une base de données généraliste est un ensemble de ressources hétérogènes qui collectent, gèrent, et mettent à la disposition de la communauté scientifique des données primaires, c'est-à-dire obtenues expérimentalement (Tagu et Risler, 2010). Elle comporte :

- ❖ Des banques nucléiques où les données issues de séquençage d'ADN et d'ARN sont stockées.
- ❖ Des banques protéiques où les données issues de traduction de séquences d'ADN ou par le séquençage de protéines sont stockées.

2.2. Les banques de données spécialisées :

Autre que les bases généralistes, nombreuses bases de données spécialisées sont développées pour des besoins spécifiques (bien précis et pas de redondance). Les banques spécialisées sont dédiées à une espèce ou un sous-ensemble d'espèces, c'est le cas par exemple de GenoList pour certaines bactéries. Elles comportent :

- ❖ Des banques nucléiques spécialisées dans l'ADNc, l'ARN, la structure secondaire d'ARN, signaux et éléments de régulation, ...
- ❖ Des banques protéiques spécialisées dans les motifs, l'alignement, la classification structurale, les familles de protéines, modifications post-traductionnelles, ...
- ❖ Des banques structurelles spécialisées dans les structures 2D et 3D des protéines. Plusieurs banques sont connues dans ce contexte, telles que PDB et SCOP.

Tableau 6 : Contenus et adresses de certaines banques de données.

Contenu	Source	Url
Banque de données généraliste		
Séquence nucléotidique	DDBJ (Ogasawara <i>et al.</i> , 2020)	https://www.ddbj.nig.ac.jp/
Séquence nucléotidique	GenBank (Clark <i>et al.</i> , 2016)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Séquence protéique	UniProt (Consortium, 2019)	https://www.uniprot.org/
Séquence nucléotidique et protéique	EMBL (Kanz <i>et al.</i> , 2005)	https://www.ebi.ac.uk/
Séquence nucléotidique et protéique	NCBI (Sherry <i>et al.</i> , 2001)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Banque de données spécialisée		
Ressources eucaryotiques	EPD (Dreos <i>et al.</i> , 2017)	https://epd.epfl.ch/
Genome humaine	GDB (Letovsky <i>et al.</i> , 1998)	https://stackoverflow.com/
Structure protéique	PDB (Berman <i>et al.</i> , 2002)	https://www.rcsb.org/
Classification des protéines	SCOP (Lo Conte <i>et al.</i> , 2000)	http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/

3. Alignement de séquences multiples :

La recherche de similitude entre des séquences nucléotidiques ou protéiques constitue souvent la première étape des analyses de séquences. C'est ce qu'on appelle l'alignement de séquences multiples, qui est une technique standard en bioinformatique. Il conduit à un ensemble de tâches notamment l'analyse phylogénétique, la fonction et/ou la prédiction de la structure des macromolécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN et les protéines (Chowdhury et Garai, 2017).

L'alignement des séquences de protéines est la tâche de visualiser et d'identifier les positions et les relations entre les résidus dans une collection de protéines liées de manière évolutive ou structurelle (Do et Katoh, 2009). Une similitude entre séquences est souvent un argument en faveur d'une homologie. Une ressemblance entre séquences peut indiquer par exemple :

- ❖ Une fonction biologique proche ;
- ❖ Une structure tridimensionnelle semblable ;
- ❖ Une origine commune.

Un alignement optimal pour une lecture de séquence nécessite un algorithme d'alignement qui tolère les correspondances imparfaites, où des variations génomiques peuvent se produire. De plus, l'algorithme doit être capable d'aligner des millions de lectures à une vitesse raisonnable (Bao *et al.*, 2014). Le tableau 7 représente certains algorithmes de l'alignement de séquences multiples.

Tableau 7 : Certains algorithmes utilisés pour l'alignement de séquences multiples.

Algorithme	Alignement	References
Needleman-Wunsch	par paire, global	(Needleman et Wunsch, 1970)
Smith-Waterman	par paire, local	(Smith <i>et al.</i> , 1981)
FASTA	recherches de base de données, par paires, locale	(Pearson et Lipman, 1988)
Blast	recherches de base de données, par paire, local	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
Clustal	multiple, global	(Higgins et Sharp, 1988)

Chapitre 2

Matériel et méthodes

La partie expérimentale de cette étude est réalisée au laboratoire pédagogique de biochimie n°4 du département de biologie, université Abou Bekr Belkaïd.

1. Caractéristiques des échantillons :

Les échantillons utilisés pour cette étude proviennent de la maïserie de la Tafna, Maghnia. Ce sont des graines du maïs (*Zea mays*) qui servent de matière première à l'usine et des déchets résultants de ses activités. Le premier déchet (D1) est un mélange de pelures issues de la mouture des graines du maïs dégermée, tandis que le deuxième (D2) résulte du tamisage de l'amidon traité afin d'obtenir la dextrine. Tous les tests sont effectués sur les trois échantillons mentionnés précédemment.

1.1. Teneur en eau :

La teneur en eau des échantillons est obtenue selon la méthode standard (NF V 03-909, 1988). Une masse de 10 g de chaque échantillon broyé est introduite dans un cristalliseur préalablement taré puis séchée dans une étuve à 103 °C jusqu'à obtenir un poids stable. Le pourcentage en humidité est exprimé par l'équation (1).

Equation 1 :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{M_1}{M_0} \times 100$$

M_1 : Poids d'eau extraite

M_0 : Poids d'échantillon utilisé

1.2. Teneur en matière grasse :

La teneur en matière grasse des échantillons est obtenue selon la méthode (NF ISO 8262-3, 2006) à l'aide de l'extracteur Soxhlet. Une masse de 10 g de chaque échantillon broyé et séché est introduite dans une cartouche cellulosique ; celle-ci est placée dans le Soxhlet. Après une extraction totale à l'hexane (point d'ébullition : 60 °C) pendant environ 2 h pour le premier déchet et 3 h pour le deuxième, l'extrait de l'huile est recueilli dans un ballon préalablement taré. Le solvant est éliminé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif chauffé à 50 °C. La quantité de matière grasse dans les échantillons est exprimée en pourcentage du poids sec selon l'équation (2).

Equation 2 :

$$\text{Teneur en matière grasse (\%)} = \frac{M_1}{M_0} \times 100$$

M_1 : Poids d'huile extraite

M_0 : Poids d'échantillon utilisé

2. Préparation de l'extrait brut de lipase (la poudre d'acétone) :

D'après Mounquengui *et al.* (2013), la préparation des extraits végétaux de lipase passe par trois étapes : broyage, séchage et délipidation par solvant.

Les procédures utilisées pour la préparation de la poudre d'acétone sont similaires à celles décrites par Pierozan *et al.* (2009). Des graines du maïs et une quantité du premier déchet sont triturées séparément dans un broyeur de type mortier pendant 10 min, tandis que le deuxième déchet n'a pas besoin d'un broyage primaire pour le dégraissage. Chacun des trois échantillons (30 g) est lavé à l'acétone froide 4 °C (avec un ratio 1/4 g/ml) sous agitation magnétique pendant 10 min. Ensuite, les suspensions sont filtrées sous vide et lavées avec l'acétone froide en excès. Le dégraissage est obtenu lorsque l'acétone de lavage devient claire.

Les extraits délipidés des graines et des deux déchets sont broyés à nouveau puis tamisés pour obtenir des poudres sèches de diamètre $\varnothing < 1$ mm (Avelar *et al.*, 2013). Après 15 h d'évaporation du solvant à l'air, le produit est défini comme extrait de lipase brut utilisé ultérieurement pour la détermination de l'activité d'hydrolyse. Les poudres sont ensuite conservées dans des flacons en verre scellés au réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

3. Détermination de l'activité de la lipase :

En 2013, Santos *et al.* ont étudié les propriétés catalytiques des lipases de différentes graines de plantes. La lipase des graines du maïs a montré une activité lipolytique maximale à pH 7 et à une température 50-55 °C. Ces conditions expérimentales sont adoptées pour optimiser l'activité hydrolytique des extraits.

3.1. Choix des substrats :

Le substrat standard utilisé dans le test de l'activité hydrolytique de la lipase et recommandé par la pharmacopée européenne est l'huile d'olive émulsionnée avec la

gomme arabique (Lengsfeld *et al.*, 2004). Cependant, plusieurs huiles peuvent être utilisées, grâce à la grande tolérance des lipases vis-à-vis de leurs substrats. La meilleure huile qui peut servir de substrat à la lipase est celle dont l'acidité est la plus faible comme celle de l'huile d'olive ($A \% \leq 0.8$). Cet indice est en considération essentiellement pour confirmer surtout les tests qualitatifs.

Pour cela, l'acidité de trois huiles d'olive est testée selon le protocole ISO 660 (1996). Ceux sont une huile d'olive achetée de l'herboristerie, une huile d'olive de l'huilerie de Beni Snous et celle de l'huilerie de Maghnia. 10 g d'huile sont dissous dans 75 ml de l'alcool éthylique en présence de phénolphaléine 1 % (indicateur coloré du pH), puis le mélange est chauffé à 30 °C sous agitation pendant quelques secondes afin d'améliorer la réaction. Ensuite, les acides gras libres sont titrés à l'aide d'une solution de NaOH (20 mM) jusqu'à obtenir une coloration rose persistante pendant 20 secondes. Une étape de neutralisation de l'alcool est obligatoire avant la dissolution de l'huile. L'acidité est exprimée en pourcentage selon l'équation (3).

Equation 3 :

$$\text{Acidité de l'huile}(\%) = \frac{N \times V \times M}{10 \times m}$$

N : Normalité de NaOH (20 mM)

V : Volume de NaOH versé (ml)

M : Masse molaire de l'acide oléique (282 g/mol)

m : Masse de la prise d'essai d'huile (g)

3.2. Test de l'activité lipolytique par chromatographie sur couche mince (CCM) :

L'activité lipolytique des extraits de lipase bruts peut être dans un premier temps détectée de manière qualitative à l'aide d'une technique de chromatographie sur couche mince (CCM). La technique est réalisée selon la méthodologie décrite par Moussavou M *et al.* (2016) en utilisant une émulsion d'huile d'olive comme substrat et un système d'élution décrit par Fontaine *et al.* (2001) qui est un mélange de solvants hexane-éther diéthylique-acide acétique (78:20:4, v/v/v) comme système d'élution.

50 g d'huile d'olive sont émulsifiés avec 150 g de la gomme arabique (3% p/p) dans 200 ml du tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7), pendant environ 2 min à 3000 tour / min à l'aide d'un mélangeur Warring. Les milieux réactionnels contenant 0,6 g de chaque extrait brut de lipase et 60 ml de cette émulsion sont incubés pendant 10 min à

50-55 °C sous agitation magnétique (150 tour / min). Un autre milieu réactionnel contenant une lipase commercialisée sous forme de médicament (Créon) est incubé à 37 °C est utilisé comme contrôle. Après 10 min d'incubation, 20 ml sont prélevés de chaque milieu réactionnel et lavés à l'hexane puis centrifugés à 2000 rpm pendant 30 minutes. Les phases hexaniques sont récupérées puis évaporées sous pression réduite (40 °C, 400 mbar) à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après évaporation du solvant, 100 mg de l'huile récupérée de chaque échantillon sont solubilisés dans 2,5 ml d'hexane et 10 µl de cette solution sont déposés sur une plaque du gel de silice activée préalablement à 110 °C pendant une heure. Un dépôt de l'émulsion de l'huile d'olive est obligatoire comme contrôle.

Les dépôts sont séchés puis la plaque est placée dans une enceinte fermée hermétiquement contenant l'éluant. Après une migration contrôlée d'environ une heure, la révélation de la plaque séchée est effectuée à chaud (80 °C pendant 20 min) par pulvérisation avec une solution de sulfate de cuivre-acide phosphorique-méthanol-eau (10:8:5:78, v/v/v/v).

3.3. Mesure de l'activité lipolytique des extraits :

L'activité lipolytique des extraits de lipase bruts est mesurée par titration des acides gras libérés par lipolyse d'huile d'olive émulsionnée selon le procédé démontré par Avelar *et al.* (2013).

Les réactions sont déclenchées par l'addition de 0.2 g de chaque extrait à 20 ml de l'émulsion d'huile d'olive. Après incubation des milieux réactionnels pendant 10 min à 50-55 °C sous agitation magnétique (150 tour / min), 20 ml de l'alcool éthylique sont ajoutés pour dissoudre l'huile et dénaturer l'enzyme, congelant ainsi efficacement la réaction. Un milieu réactionnel contenant une lipase commercialisée sous forme de médicament (Créon) incubé à 37 °C est utilisé comme contrôle.

Les acides gras libérés sont ensuite titrés par une solution de NaOH (20 mM) en présence de phénolphthaléine 1 % comme indicateur (section 3.1). Les essais à blanc sont effectués en ajoutant les extraits de lipase après l'alcool éthylique. L'activité lipolytique est calculée à partir du taux maximal de consommation de soude pour neutraliser tous les acides gras libérés (équation 4). Dans ces conditions, une unité internationale de l'activité lipasique (UI) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 µmol d'acide gras libre par minute.

Equation 4 :

$$\text{Activité Enzymatique (UI/g)} = \frac{n_{AGL} (\mu\text{mol})}{X(\text{g}) \times \text{Temps (min)}}$$

A l'équilibre,

$$n_{AGL} (\text{mol}) = C_{NaOH} (\text{mol/L}) \times V_{NaOH} (\text{L})$$

$$n_{AGL} (\text{mol}) = C_{NaOH} (\text{mol/L}) \times [V_{\text{moy. NaOH}} (\text{L}) - V_{\text{blanc NaOH}} (\text{L})]$$

$$n_{AGL} (\mu\text{mol}) = C_{NaOH} (\text{mol/L}) \times [V_{\text{moy. NaOH}} (\text{L}) - V_{\text{blanc NaOH}} (\text{L})] \times 10^6$$

n_{AGL} = Nombre de mole d'acide gras libre (mol)

C_{NaOH} = Concentration titre NaOH à 0.02 (mol/L)

$V_{\text{moy. NaOH}}$ = Volume de titration après la réaction (L)

$V_{\text{Blanc NaOH}}$ = Volume de titration d'essai à blanc (L)

$X(\text{g})$ = Masse d'extrait de lipase brut (g)

Temps = Temps de la réaction (min)

4. Alignement de séquences multiples :

Deux lipases du maïs de lignées différentes B73 et Mo17 sont présentes dans la base de données UniProtKB (**figure 11**) (<https://www.uniprot.org/>). C'est une base de connaissances qui contient des séquences protéiques annotées manuellement et obtenues à partir d'un large spectre d'organismes (Boutet *et al.*, 2016). Les séquences génomiques des deux lignées B73 et Mo17 sont démontrées respectivement en 2009 par Schnable *et al.* et en 2018 par Sun *et al.*

The screenshot shows the UniProtKB interface for the entry A0A3L6D5Z0 (A0A3L6D5Z0_MAIZE). The protein is identified as Lipase, with the gene name LIP2_4 and the organism Zea mays (Maize). The status is Unreviewed, with an annotation score of 4 out of 5 (represented by 4 filled circles and 1 empty circle), and a note that the protein was inferred from homology.

Figure 11 : Requête pour la base de données UniProtKB.

La séquence protéique de la lipase du maïs Mo17, la lignée la plus récente, est extraite sous un format particulier appelé « FASTA », c'est un format de fichier texte qui permet de représenter les séquences protéiques sous forme d'une succession de lettres codant chacun pour un acide aminé. Ce format est supporté par la plupart des moteurs de recherche et des outils de traitement en aval (Binz *et al.*, 2019).

Les homologues de la lipase étudiée sont collectés à partir d'un ensemble de base de données à l'aide du serveur BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> en utilisant l'algorithme blastP (Johnson *et al.*, 2008). Le même serveur est utilisé pour la recherche des homologues à partir de PDB, une base pour les données structurales tridimensionnelles des protéines déterminées expérimentalement (Burley *et al.*, 2017).

Le serveur BLAST permet de rechercher dans des bases de données les séquences répertoriées ayant des régions de similitude avec la séquence introduite par l'utilisateur. Cette méthode est utilisée pour trouver des relations fonctionnelles entre les séquences et peut aider à identifier les membres d'une même famille (Gibson, 2004). Le principe de fonctionnement de BLAST, peut être résumé en trois étapes (Dardel et Képès, 2002) :

- ❖ La séquence analysée est d'abord découpée en segments quadruplets d'acides aminés chevauchants. BLAST constitue un dictionnaire contenant les segments répétitifs.
- ❖ Le balayage de la banque avec ce dictionnaire. BLAST tente d'étendre l'homologie en amont et en aval des quadruplets similaires trouvés.
- ❖ Après extension de l'homologie, il évalue à partir du score obtenu la probabilité de similitude.

La **figure 12** montre les étapes du fonctionnement du serveur BLAST. La séquence à analyser est introduite sous le format Fasta dans la case (1) « Entrer la séquence de requête ». Une fois le choix des banques de données où se fait la recherche des homologues est réalisé (2), le programme est lancé en cliquant sur « BLAST » (4). L'algorithme blastP (3) est choisie automatiquement par BLAST une fois le type de la séquence est indiqué.

Standard Protein BLAST

BLASTP programs search protein databases using a protein query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), q(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

1

From

To

Or, upload file Aucun fichier choisi

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database **2**

Organism exclude

Optional

Exclude Models (XM/XP) Non-redundant RefSeq proteins (WP) Uncultured/environmental sample sequences

Program Selection

Algorithm

Quick BLASTP (Accelerated protein-protein BLAST)

blastp (protein-protein BLAST) **3**

PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)

PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)

DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

4 Search database nr using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window

BLAST has New Default Parameters and Search Limits.
Click [here](#) for more info.

Figure 12 : Fonctionnement du serveur BLAST.

L'alignement de séquences multiples (ASM) est effectué à l'aide du programme CLUSTAL W présent dans la base de données Genome Net (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Seuls les homologues issus de la base de données PDB sont utilisés.

Cet outil est utilisé pour aligner de manière efficace plusieurs séquences nucléotidiques ou protéiques avec une précision élevée (Larkin *et al.*, 2007). Il utilise des méthodes d'alignement progressif, qui alignent d'abord les séquences avec le meilleur score d'alignement et descendent jusqu'aux séquences les moins similaires jusqu'à ce qu'un alignement global soit créé. Ce programme nécessite trois séquences ou plus, afin de calculer un alignement global.

Clustal W a un algorithme basé sur une matrice assez efficace. La première étape de l'algorithme consiste à calculer une matrice de distance approximative entre chaque paire de séquences, également appelée alignement de séquences par paires. L'étape suivante est une méthode de jonction de voisins qui utilise l'enracinement du point médian pour créer un arbre guide global. L'arbre guide est ensuite utilisé comme modèle approximatif pour générer un alignement global (Higgins *et al.*, 1994).

La figure 13 représente les étapes du fonctionnement du serveur Clustal W. Un alignement lent et précis est choisi (1). Une fois les séquences protéiques à aligner sont introduite sous le format Fasta (2 et 3), l'alignement est lancé en cliquant sur « execute

multiple alignment » (4). Le fichier d'alignement final est téléchargé en cliquant sur [clustalw.aln] (Figure 14).

Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW

ETE3 MAFFT CLUSTALW PRRN

General Setting Parameters: [Help](#)

Output Format:

Pairwise Alignment: FAST/APPROXIMATE SLOW/ACCURATE 1

Enter your sequences (with labels) below (copy & paste): PROTEIN DNA 2

Support Formats: FASTA (Pearson), NBRF/PIR, EMBL/Swiss Prot, GDE, CLUSTAL, and GCG/MSF

MTPGRRRRNSSAVASLLVLLSLGAAATAVRPAPQAARAAANNGTCLSRLEPFPGYKCEEH
 TVTADGYILLSLRIPGGRGRGSGQSAAGSKIPVLLQHGLLMDGVTWLMSSPDES LGYIL
 ADGGYDVWIANTRGTVYSRGHTTLLSSDPAYWDWSWDELASNDLSAVVQVYVAQSGQQRM
 HYYGHS LGTLIAFAALSQRQQLGMLRSAGLLSPIAYLDKVTSPALAGADVFLAEAMYWL
 GLDEFDPTGEPVHKLLTDICSPGIDCYLSMSVFTGDNCCLDNSSVQVFLAHEPQASATK

Or give the file name containing your query
 Aucun fichier choisi

4

More Detail Parameters...

Pairwise Alignment Parameters:

For FAST/APPROXIMATE:
 K-tuple(word) size: , Window size: , Gap Penalty:
 Number of Top Diagonals: , Scoring Method:

For SLOW/ACCURATE:
 Gap Open Penalty: , Gap Extension Penalty:
 Select Weight Matrix:

(Note that only parameters for the algorithm specified by the above "Pairwise Alignment" are valid.)

Figure 13 : Fonctionnement de Clustal W.

CLUSTALW Result

[clustalw.aln][clustalw.dnd][readme]

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to Protein
 Sequence format is Pearson
 Sequence 1: tr|A0A3L6D5Z0|A0A3L6D5Z0_MAIZE 415 aa
 Sequence 2: 1K8Q_1|Chains 377 aa
 Sequence 3: 6V7N_1|Chains 384 aa
 Sequence 4: 1HL6_1|Chains 371 aa
 Start of Pairwise alignments
 Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 28.1167
 Sequences (1:3) Aligned. Score: 28.3854
 Sequences (1:4) Aligned. Score: 29.3801
 Sequences (2:3) Aligned. Score: 58.8859
 Sequences (2:4) Aligned. Score: 85.4447
 Sequences (3:4) Aligned. Score: 58.7601
 Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 3 groups
 Start of Multiple Alignment

Aligning...
 Group 1: Sequences: 2 Score:5735
 Group 2: Sequences: 3 Score:3375
 Group 3: Delayed
 Alignment Score 6902

CLUSTAL-Alignment file created

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Figure 14 : Téléchargement du fichier d'ASM.

Le logiciel ESPrict 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/>) est utilisé pour analyser l'ASM (figure 15). Le programme ESPrict (Easy Sequencing inPostScript), permet la visualisation rapide des séquences alignées avec des programmes tels que CLUSTAL-W ou GCG PILEUP en conservant l'alignement du fichier de l'entrée. Il peut lire les fichiers de structure secondaire pour produire une synthèse des informations de séquence et de structure (Gouet *et al.*, 1999). Les paramètres sont introduits via l'entrée standard, qui est divisée en sept étapes :

- ❖ Le fichier d'alignement généré par Clustal W est pris en charge ;
- ❖ Le nom d'un ou deux fichiers contenant des informations sur la structure secondaire peuvent être ajoutés ;
- ❖ Un système de notation pour les similitudes est donné ;
- ❖ L'ordre d'apparition des séquences affichées peut être défini ;
- ❖ La disposition de la sortie des alignements est définie tels que la couleur et la taille du papier ;
- ❖ Le type du fichier de la sortie des alignements est donné ;
- ❖ Dernièrement, l'analyse est lancée en cliquant sur « Submit ».

The screenshot shows the ESPrict 3.0 web interface. At the top, there is a navigation bar with buttons for SUBMIT, DISPLAY, MODE, LAYERS, SESSION, TIME, and EXIT. Below the navigation bar, there is a warning message: "ENDscript / ESPrict uses popup windows to display results - please be sure to disable popup blockers before submitting a job. When publishing data resulting from usage of this server, please cite this reference article." The main content area is divided into several sections: "Aligned Sequences" with an "ALN file" input field and a "Number sequences" checkbox; "Secondary structure depiction" with "Top secondary structures" and "Parameters" sub-sections, including an "Input file" field, "Chain ID" checkbox, "Relative accessibility" checkbox, and radio buttons for "Sec. structure labels"; and "Sequence similarities depiction parameters". A sidebar on the right contains a list of steps: Aligned sequences, Secondary structure, Sequence similarities, Defining groups, Output layout, and Output files.

Figure 15 : Interface du serveur web Esprict 3.0.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Caractérisation des échantillons :

Avant toute expérience, les échantillons ayant servi à l'étude sont caractérisés selon leurs teneurs en eau et en matières grasses. Les résultats sont représentés dans le **tableau 8**. Les déchets D1 et D2 utilisés contiennent environ 3,7 % et 1,4 % d'humidité, respectivement, sur la base du poids sec. Ce paramètre est très important puisqu'en 1988, Zaks et Klivanov ont démontré que l'activité catalytique de l'enzyme est liée à la quantité d'eau présente dans son environnement.

En effet, la teneur en eau étant l'objectif de plusieurs études, Moussavou M *et al.* (2016) ont confirmé qu'à plus de 5 %, cette teneur augmente la formation de réaction de l'hydrolyse. Une observation dissimilaire est rapportée par Chew *et al.* (2008) et Phuah *et al.* (2012) dans laquelle toute augmentation de la quantité d'eau, au-delà de 3,6 % et 5 %, respectivement, faisait chuter la vitesse de réaction. Ceci est à cause d'une augmentation d'épaisseur de la couche d'eau formée autour de l'enzyme, en diminuant ainsi la diffusion du substrat à faible solubilité en milieu aqueux et conduisant finalement à l'inactivation de l'enzyme (Yadav et Devi, 2004).

La teneur en matières grasses de D1 est supérieure à celle de D2 dont les valeurs obtenues étant de 9 et de 1,5, respectivement.

Tableau 8 : Caractéristiques des échantillons.

Echantillons	D1	D2
Teneur en eau %	3,7	1,4
Teneur en matières grasses %	9	1,5

2. Indice d'acide des substrats choisis pour tester l'activité :

Les indices d'acide des trois huiles d'olives testées selon le protocole ISO 660 (1996) pour servir de substrats sont présentés dans la **figure 16**. Les résultats rapportés dans la figure montrent que l'huile d'olive de l'huilerie de Beni-Snous est une huile d'olive extra vierge ayant une acidité de 0.51 %. C'est la plus optimale pour déterminer l'activité lipolytique des extraits, contrairement aux celles achetée de l'herboristerie et de l'huilerie de Maghnia ayant une acidité de 2.15 % et 1.57 %, respectivement.

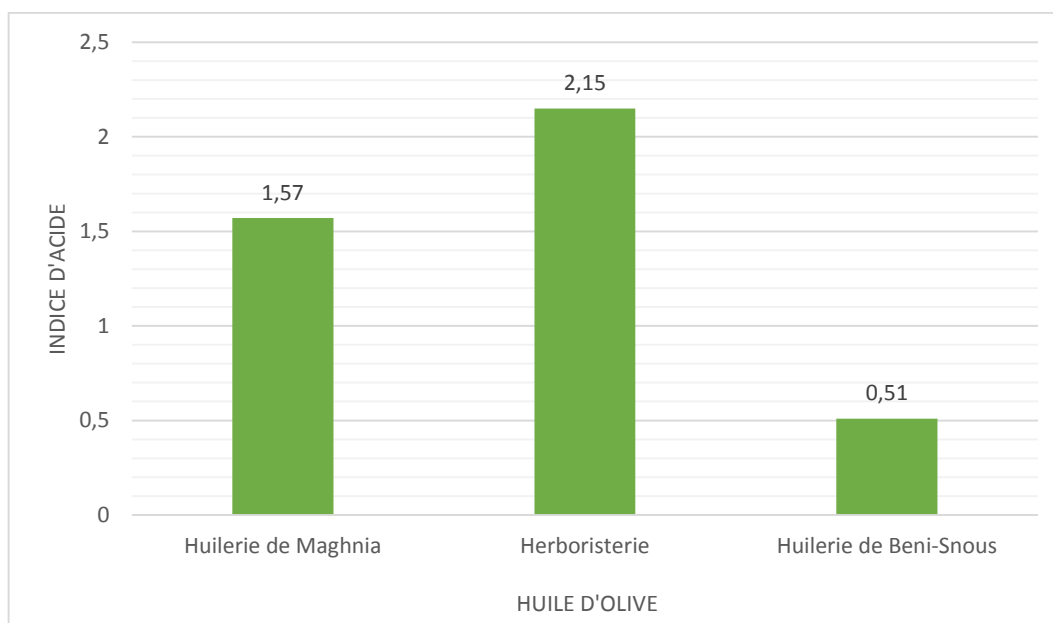


Figure 16 : Indice d'acide des trois huiles d'olives choisis pour servir de substrats.

3. Détection de l'activité lipolytique des extraits par CCM :

Les activités lipolytiques des extraits sont mises en évidence et la libération d'acide gras est suivie par chromatographie sur couche mince avec un système de solvant hexane / éther diéthylique / acide acétique glacial (80: 20: 4, v / v) (**Figure 17**). La distribution des divers composants et les changements dans les compositions du milieu réactionnel au cours de la réaction sont clairement observés. Deux taches apparaissent sur toutes les colonnes (C, M, D2, D1), représentant les quatre expériences réalisées, avec différents niveaux d'intensité. En comparant les rapports frontaux de ces taches dans ce système de solvant avec la littérature, il s'avère qu'elles représentent des acides gras libres et 1,3-diacylglycérol (Fontaine *et al.*, 2001).

D'après ces résultats, il ressort que, dans ces conditions expérimentales, les deux extraits des déchets sont actifs en hydrolyse. Il apparaît que ceux-ci contiennent donc des lipases qui peuvent être utilisées comme catalyseurs de l'hydrolyse des triglycérides. Un test quantitatif est nécessaire pour déterminer l'activité enzymatique.

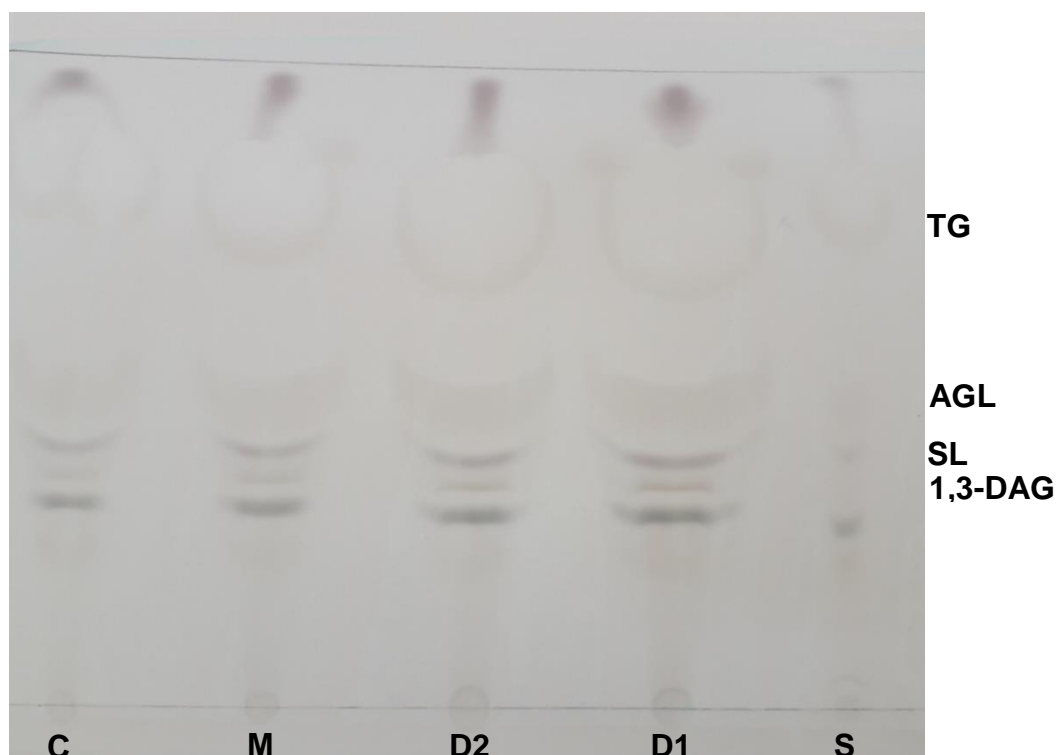


Figure 17 : Chromatogramme des milieux réactionnels. C : contrôle (médicament contenant des lipases), M : matière première de l'usine, D : déchet, S : substrat sans extrait.

4. Détermination de l'activité hydrolytique des extraits :

L'activité lipasique des extraits est détectée après augmentation des concentrations des acides gras libres présents dans le milieu réactionnel. Rappelons que les acides gras sont libérés suite à l'hydrolyse du substrat réalisée par les enzymes lipolytiques. Les résultats du dosage des activités enzymatiques sont illustrés dans la **figure 18**.

A première vue, les activités hydrolytiques des extraits des déchets sont plus élevées que celle d'extrait de la matière première qui ne dépasse pas 7 UI/g. Ceci est possible en raison du trempage des graines du maïs dans l'eau soufrée par l'usine, permettant leur germination. Par conséquent, l'activité lipolytique est augmentée. Ces résultats sont en accord avec les travaux qui ont montré que seules les graines germées présentent une activité lipasique (Mukherjee, 1996 ; Barros *et al.*, 2010 ; Su *et al.*, 2010 ; Gu *et al.*, 2011). L'activité lipolytique dans les graines du maïs n'est observée que deux jours après la germination des graines et a commencé à diminuer parallèlement à la diminution du total des lipides stockés (Wang et Huang, 1987 ; Avelar *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les extraits de déchets ne représentent pas la même activité catalytique, l'extrait de D1 est plus actif en hydrolyse avec une activité de 43,18 UI/g. Tandis que, l'extrait de D2 a marqué une activité moyennement faible de 14,6 UI/g.

Les résultats obtenus sont acceptables par rapport à plusieurs travaux antérieurs sur les lipases du maïs. En utilisant une émulsion d'huile d'olive comme substrat, Santos *et al.* (2013) ont obtenu une activité catalytique de 38,5 UI/g après 72h de germination des graines. Cependant, Eze *et al.* (2007) n'ont obtenu que 2,1 UI/g après 24h de germination. En se basant sur une méthode colorimétrique qui consiste à quantifier les acides gras libérés convertis en savons de cuivre en utilisant du 1,5-diphénylcarbazine comme réactif coloré, Lin *et al.* (1983) et Wang et Huang (1987) ont abouti à une activité hydrolytique de 42 UI/g et de 47 UI/g, respectivement.

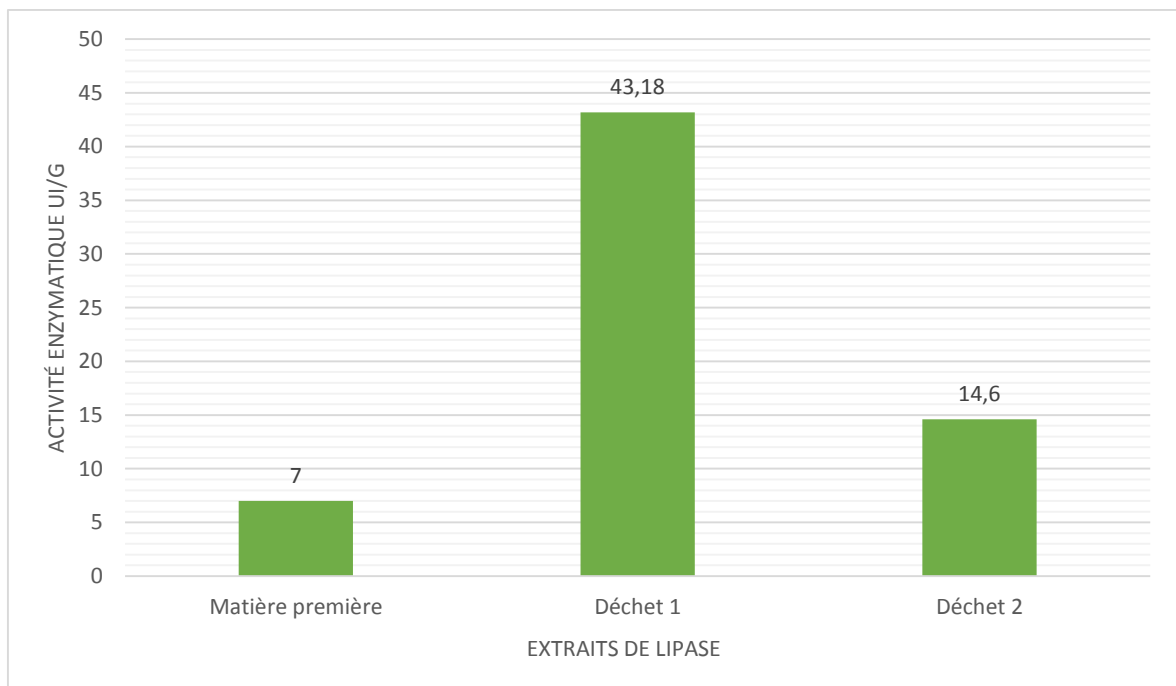


Figure 18 : Activité lipolytique des extraits de lipase brute.

5. Alignement de séquences multiples :

La séquence de la lipase du maïs Mo17 sous le format FASTA est représentée dans la **figure 19**.

```
>tr|A0A3L6D5Z0|A0A3L6D5Z0_MAIZE Lipase OS=Zea mays OX=4577 GN=LIP2_4 PE=3 SV=1
MTPGRRRRNSSAVASLLVLLSLGAAATAVRPAPQAARAAANNGTCLSRLEPFYKCEEH
TVTTADGYILSLQRIPGGRGRGSGQSAAGSKIPVLLQHGLLMDGVTWLMSSPDESLGYIL
ADGGYDVMIANTRGTVYSRGHTTLLSSDPAYWDWSNDELASNDLSAVVQYVYAQSGQORM
HYVGHSLGTLIAFAALSQRQQLGMLRSAGLLSPIAYLDKVTSPALAGADVFLAEAMYWL
GLDEFDPTGEPVHKLLTDICSQPGIDCYSLMSVFTGDNCCLDNSSVQVFLAHEPQASATK
NMVHLAQMIRRGTLAKYDYGNAADNTKHYGQATPPAYDL SAIPDDFPLFLGYGGRDTLSD
PQDVSHLLQVLKSHHGDKLTVQYVDDYAHADFVMAANARERVYAPLMAFFKLQDK
```

Figure 19 : Séquence de la lipase du maïs Mo17 au format FASTA.

Une recherche utilisant le serveur BLAST permet d'identifier plusieurs protéines présentant une homologie structurale significative avec la lipase du maïs Mo17. Les résultats sont représentés dans les **tableaux 9 et 10**. Les lipases les plus homologues à celles du maïs sont évidemment d'origine végétale comme le montre le **tableau 9**.

Concernant les enzymes dont les structures sont déterminées expérimentalement, la structure de la lipase gastrique humaine (entré PDB 1HLG, 371 résidus, (Roussel *et al.*, 1999)) est la plus similaire à celle de la lipase du maïs Mo17, avec une identité de 34,25 %. De plus, la lipase acide lysosomale/ester de cholestérol hydrolase humaine (entré PDB 6V7N, 384 résidus, (Rajamohan *et al.*, 2020)) et une triacylglycérol lipase gastrique du chien (entré PDB 1K8Q, 377 résidus, (Roussel *et al.*, 2002)) montrent une similitude structurelle avec la lipase étudiée.

Tableau 9 : Homologues structuraux de la lipase du maïs Mo17.

Description		Identité (%)	Accession
Triacylglycérol lipase 2	<i>Zea mays</i> (B73) (maïs)	98,8	ONM18610.1
Triacylglycérol lipase 2	<i>Sorghum bicolor</i> (sorgho)	88,7	XP_002446228.1
Triacylglycérol lipase 2-like	<i>Panicum hallii</i> (panic grass de Hall)	87,67	XP_025825993.1
Triacylglycérol lipase 2-like	<i>Panicum miliaceum</i> (millet)	87,13	RLM66601.1
Triacylglycérol lipase 2-like	<i>Panicum miliaceum</i> (millet)	86,68	RLM74328.1
Triacylglycérol lipase 2	<i>Setaria italica</i> (sétaire d'Italie)	85,1	XP_004977780.1
Triacylglycérol lipase 2-like	<i>Setaria viridis</i> (sétaire verte)	84,86	XP_034604574.1
Triacylglycérol lipase 2	<i>Dichanthelium oligosanthos</i> (herbe à rosette)	82,54	OEL20306.1
Triacylglycérol lipase 2	<i>Brachypodium distachyon</i> (brome raide)	75,67	XP_010239741.1

Tableau 10 : Homologues structuraux de la lipase du maïs Mo17 à partir de PDB.

Description		Identité (%)	Accession au PDB
Chaîne A, lipase gastrique	<i>Homo sapiens</i> (être humain)	34,25	1HLG_A
Chaîne A, lipase acide lysosomale / ester de cholestérol hydrolase	<i>Homo sapiens</i> (être humain)	34	6V7N_A
Chaîne A, triacylglycérol lipase gastrique	<i>Canis lupus familiaris</i> (chien)	33,88	1K8Q_A

L'alignement de séquences multiples est réalisé pour illustrer les sites conservés et variables au sein de la lipase du maïs Mo17 par rapport à ses homologues structuraux issus de PDB. Les séquences protéiques sont alignées à l'aide du serveur CLUSTAL W et analysées par ESript 3, et les résultats sont illustrés dans la **figure 20**. La structure secondaire additionnée à la figure est celle de 1HLG extraite de PDB.

Les trois homologues ont une séquence primaire identique de 33 à 35 % par rapport à la lipase du maïs Mo17, 100 résidus sont complètement conservés parmi les quatre enzymes et très peu de lacunes de 2 à 4 résidus sont remarquées. L'analyse des domaines conservés révèle que la lipase étudiée contient une triade catalytique Ser-His-Asp (Ser186, His389 et Asp356) typique, qui appartient à la superfamille des α/β hydrolases. Une chaîne de 30 résidus présente dans le côté N terminale de la lipase du maïs est absente dans les trois homologues structuraux. Certains résidus de noyau du pli α/β hydrolase sont hautement conservés dans ces protéines (le brin β 4, le brin β 5, l'hélice α 5).

Des régions assez longues hautement conservées dans toutes les lipases alignées sont retrouvées, il s'agit de TXDGYIL / RIPXG / LQHGLL / ILADXGXDVW / SXDEXA / YVGH**S**XGT, alors que d'autres assez courtes, NXRG / H**Y**XQ / PPXY / GG**X**D / **H**XDF (la lettre en rouge correspond aux résidus de la triade catalytique).

Sur la base du type du domaine conservé trouvé dans la région catalytique active des protéines, les lipases peuvent être classées en deux sous-familles : Gly-X-Ser-X-Gly (GX**S**XG) lipases et Gly-Asp-Ser-Leu (GD**S**L) lipases (Lee *et al.*, 2009 ; Updegraff *et al.*, 2009). Le premier motif est conservé dans tous les séquences, ainsi la lipase du maïs Mo17 fait partie de la sous- famille (GX**S**XG) lipases.

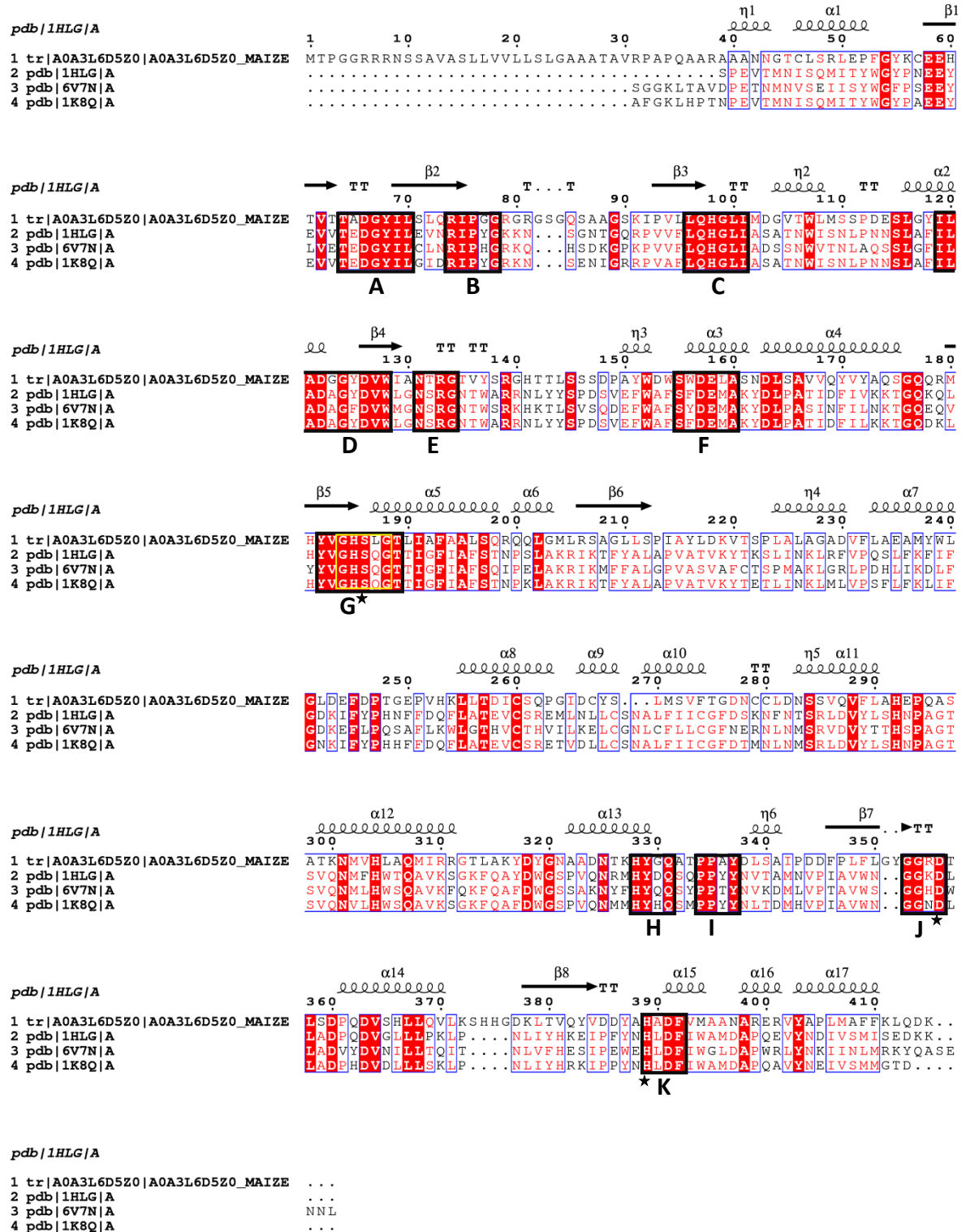


Figure 20 : Alignement de séquences multiples de la lipase du maïs Mo17 avec ses homologues structuraux issus de PDB. Les résidus identiques sont marqués avec un fond rouge et les résidus hautement conservés sont représentés par une police rouge. La triade catalytique Ser-His-Asp est indiquée par des astérisques. Les motifs hautement conservés sont indiqués par les cases noires avec des étiquettes (A, B, ...). Le motif représentant la sous-famille GX SXG est indiqué par une case jaune.

Conclusion

Les lipases sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrat. Elles font partie des enzymes hydrolases spécifiques des triglycérides et sont produites par divers systèmes vivants. Les lipases, par leur capacité à hydrolyser et à estérifier, trouvent des applications dans différents secteurs industriels.

Au cours de ce travail, des déchets issus de la maïserie de Tafna – Maghnia sont évalués pour servir à une source de la lipase végétale. Tous d'abord, les teneurs en eau et en matières grasses des déchets sont déterminés. Ensuite, une analyse par chromatographie sur couche mince et une titration des acides gras libres sont effectuées pour détecter et mesurer respectivement l'activité lipolytique. Pour plus d'information sur le plan moléculaire, la lipase du maïs est caractérisée au moyen des outils informatiques.

Nos résultats ont montré d'importants teneurs en eau et en matières grasses surtout dans le premier déchet, qui présente également une activité lipolytique intéressante de 43,18 UI. Il peut être ainsi sélectionné comme une source de la lipase végétale. De plus, l'analyse de séquences multiples de la lipase du maïs avec d'autres homologues a abouti à d'importants résultats, le plus intéressant est probablement sa similitude à la lipase gastrique humaine. Les deux font partie de la superfamille GXSXG lipase et malgré leurs origines différentes, le centre catalytique est conservé.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, nous souhaitons compléter cette étude en ciblant l'évaluation de la capacité de l'extrait de ce déchet à catalyser également la synthèse d'esters. Aussi, les homologues structuraux obtenus peuvent être utilisés pour prédire la structure de la lipase étudiée.

Références bibliographiques

A

- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6406-6436.
- Akil, E., Carvalho, T., Bárea, B., Finotelli, P., Lecomte, J., Torres, A. G., . . . Villeneuve, P. (2016). Accessing regio-and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 101-111.
- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N., Mohamad Ali, M. S., Thean, A. L., Shariff, M., . . . Raja Abd Rahman, R. N. (2020). Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts*, 10(7), 747.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Agueiras, E. C., Andrade, G. C., Moura, M. V., . . . Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014.
- Avelar do Nascimento, M., Ester Gotardo, L., Miguez Bastos, E., CL Almeida, F., AC Leão, R., OMA de Souza, R., . . . Itabaiana, I. (2019). Regioselective Acylation of Levoglucosan Catalyzed by *Candida Antarctica* (CaLB) Lipase Immobilized on Epoxy Resin. *Sustainability*, 11(21), 6044.
- Avelar, M. H., Cassimiro, D. M., Santos, K. C., Domingues, R. C., de Castro, H. F., & Mendes, A. A. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial crops and products*, 44, 452-458.

B

- Bansode, S. R., & Rathod, V. K. (2017). An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 503-529.
- Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W. A., Jiang, H., & Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*, 13, CIN-S13779.
- Barriuso, J., Vaquero, M. E., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2016). Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology advances*, 34(5), 874-885.
- Barros, M., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), 15-29.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry*/Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer; with Gregory J. Gatto, Jr.

- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., . . . Fagan, P. (2002). The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(6), 899-907.
- Beroud, C. (2010). Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique. *Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Univ. Médicale Virtuelle Francophone*, 3-6.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- Bhavsar, K. V., & Yadav, G. D. (2019). Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(4), 288-293.
- Bian, C., Yuan, C., Chen, L., Meehan, E. J., Jiang, L., Huang, Z., . . . Huang, M. (2010). Crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Penicillium expansum* at 1.3 Å determined by sulfur SAD. *Proteins*, 78(6), 1601-1605.
- Binz, P. A., Shofstahl, J., Vizcaíno, J. A., Barsnes, H., Chalkley, R. J., Menschaert, G., . . . Seymour, S. L. (2019). Proteomics standards initiative extended FASTA format. *Journal of proteome research*, 18(6), 2686-2692.
- Bora, L., Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(11), 1959-1970.
- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A. J., ... & Xenarios, I. (2016). *UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view*. In *Plant Bioinformatics* (pp. 23-54). Humana Press, New York, NY.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., . . . Thim, L. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343(6260), 767-770.
- Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., & Velankar, S. (2017). *Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive*. In *Protein Crystallography* (pp. 627-641). Humana Press, New York, NY.

C

- Cambon, E., Bourlieu, C., Salum, T. F., Piombo, G., Dubreucq, E., & Villeneuve, P. (2009). Ability of *Vasconcellea x heilbornii* lipase to catalyse the synthesis of alkyl esters from vegetable oils. *Process Biochemistry*, 44(11), 1265-1269.
- Cao, M., Fonseca, L. M., Schoenfuss, T. C., & Rankin, S. A. (2014). Homogenization and lipase treatment of milk and resulting methyl ketone generation in blue cheese. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(25), 5726-5733.

- Carvalho, A. C., Fonseca, T. D., Mattos, M. C., Oliveira, M. D., Lemos, T. L., Molinari, F., . . . Serra, I. (2015). Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *International journal of molecular sciences*, *16*(12), 29682-29716.
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018). Lipases: an overview. In *Lipases and Phospholipases* (pp. 3-38). Humana Press, New York, NY.
- Castillo, E., Casas-Godoy, L., & Sandoval, G. (2016). Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis*, *1*(open-issue), 178-188.
- Cen, Y., Singh, W., Arkin, M., Moody, T. S., Huang, M., Zhou, J. W., & Reetz, M. T. (2019). Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nature communications*, *10*(1), 1-10.
- Chaplin, J. A., Gardiner, N. S., Mitra, R. K., Parkinson, C. J., Portwig, M., Mboniswa, B. A., ... & Reddy, S. (2006). *U.S. Brevet n° 7,026,144*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *Journal of lipid research*, *53*(2), 215-226.
- Chauhan, J. S., Rao, A., & Raghava, G. P. (2013). In silico platform for prediction of N-, O-and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PloS one*, *8*(6), e67008.
- Chauhan, M., Chauhan, R. S., & Garlapati, V. K. (2013). Evaluation of a new lipase from *Staphylococcus* sp. for detergent additive capability. *BioMed research international*, 2013.
- Cheng, C., Jiang, T., Wu, Y., Cui, L., Qin, S., & He, B. (2018). Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment. *International journal of biological macromolecules*, *119*, 1211-1217.
- Chew, Y. H., Chua, L. S., Cheng, K. K., Sarmidi, M. R., Aziz, R. A., & Lee, C. T. (2008). Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, *39*(3), 516-520.
- Chioke, O. J., Ogbonna, C. N., Onwusi, C., & Ogbonna, J. C. (2018). Lipase in biodiesel production. *African Journal of Biochemistry Research*, *12*(8), 73-85.
- Chojnacka, A., Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Gliszczyńska, A., Niezgoda, N., & Wawrzęczyk, C. (2014). Lipase-catalyzed interesterification of egg-yolk phosphatidylcholine and plant oils. *Grasas y Aceites*, *65*(4), 053.
- Choudhury, P., & Bhunia, B. (2017). Industrial application of lipase: a review. *Biopharm journal*, *1*(2), 41-47.
- Chowdhury, B., & Garai, G. (2017). A review on multiple sequence alignment from the perspective of genetic algorithm. *Genomics*, *109*(5-6), 419-431.

- Christopher, L. P., Zambare, V. P., Zambare, A., Kumar, H., & Malek, L. (2015). A thermo-alkaline lipase from a new thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* AV-5 with potential application in biodiesel production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *90(11)*, 2007-2016.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, *44(D1)*, D67-D72.
- Consortium, U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, *47(D1)*, D506-D515.
- Custry, F., Fernander, N., & Shahani, K. M. (2000). Effect of enzyme association on bread dough performance: a response surface study. *Food Sci Technol Int*, *6*, 117-266.

D

- Damm, K. L., & Carlson, H. A. (2006). Gaussian-weighted RMSD superposition of proteins: a structural comparison for flexible proteins and predicted protein structures. *Biophysical journal*, *90(12)*, 4558-4573.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., . . . Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International journal of biological macromolecules*, *57*, 232-237.
- Dardel, F., & Képès, F. (2002). *Bioinformatique: Génomique et post-génomique*. Editions Ecole Polytechnique.
- de Meneses, A. C., Lerin, L. A., Araújo, P. H., Sayer, C., & de Oliveira, D. (2019). Benzyl propionate synthesis by fed-batch esterification using commercial immobilized and lyophilized Cal B lipase. *Bioprocess and biosystems engineering*, *42(10)*, 1625-1634.
- de Miranda, A. S., Miranda, L. S., & de Souza, R. O. (2015). Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnology advances*, *33(5)*, 372-393.
- de Oliveira, I. P., Jara, G. E., & Martínez, L. (2017). Molecular mechanism of activation of *Burkholderia cepacia* lipase at aqueous-organic interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19(46)*, 31499-31507.
- Dhake, K. P., Thakare, D. D., & Bhanage, B. M. (2013). Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, *28(2)*, 71-83.
- Ding, L. N., Li, M., Wang, W. J., Cao, J., Wang, Z., Zhu, K. M., . . . Tan, X. L. (2019). Advances in plant GDSL lipases: from sequences to functional mechanisms. *Acta Physiologiae Plantarum*, *41(9)*, 151.
- Divya, K., & Padma, P. N. (2015). Psychrophilic yeast isolates for cold-active lipase production. *Int. J. Sci. Prog. Res.*, *10*, 93-97.
- Do, C. B., & Katoh, K. (2009). Protein multiple sequence alignment. In *Functional Proteomics* (pp. 379-413). Humana Press.

- Dreos, R., Ambrosini, G., Groux, R., Cavin Périer, R., & Bucher, P. (2017). The eukaryotic promoter database in its 30th year: focus on non-vertebrate organisms. *Nucleic acids research*, *45(D1)*, D51-D55.
- Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., & Fishman, A. (2015). Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, *99(22)*, 9449-9461.
- Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., & Lortie, R. (1995). Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, *48(3)*, 214-221.

E

- Eryilmaz, T., Yesilyurt, M. K., Cesur, C., & Gokdogan, O. (2016). Biodiesel production potential from oil seeds in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *58*, 842-851.
- Eze, S. O., Chilaka, F. C., & Akunwata, C. U. (2007). Properties of lipase (EC 3.1. 1.3) from different varieties of maize. *Animal Research International*, *4(2)*, 650-652.

F

- Fang, Z., Xu, L., Pan, D., Jiao, L., Liu, Z., & Yan, Y. (2014). Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *41(10)*, 1541-1551.
- Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F. J., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., . . . Ballesteros, A. (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme and Microbial Technology*, *36(4)*, 391-398.
- Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, *12(2)*, 119-130.
- Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., & Sancholle, M. (2001). Métabolisme lipidique du champignon endomycorhizien: *Glomus intraradices*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, *324(9)*, 847-853.
- Fukaya, K., Yamaguchi, Y., Watanabe, A., Yamamoto, H., Sugai, T., Sugai, T., . . . Chida, N. (2016). Practical synthesis of the C-ring precursor of paclitaxel from 3-methoxytoluene. *The Journal of Antibiotics*, *69(4)*, 273-279.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular sciences*, *14(5)*, 10242-10297.

G

- Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., & Mukesh, D. (2000). Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis Reviews*, *42(4)*, 439-480.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). Humana press.
- Gewert, K., Holowachuk, S. A., Rippe, C., Gregory, P. C., Erlanson-Albertsson, C., Olivecrona, G., . . . Pierzynowski, S. G. (2004). The enzyme levels in blood are not affected by oral administration of a pancreatic enzyme preparation (Creon 10,000) in pancreas-insufficient pigs. *Pancreas*, *28*(1), 80-88.
- Gibson, G., & Muse, S. V. (2004). *Précis de génomique*. De Boeck Supérieur.
- Gonçalves Filho, D., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*(18), 7399-7423.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., & Mouton, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *15*(4), 305-308.
- Gowthami, P., Muthukumar, K., & Velan, M. (2015). Utilization of coconut oil cake for the production of lipase using *Bacillus coagulans* VK11. *Biocontrol Science*, *20*(2), 125-133.
- Gu, H., Jiang, Y., Zhou, L., & Gao, J. (2011). Reactive extraction and in situ self-catalyzed methanolysis of germinated oilseed for biodiesel production. *Energy & Environmental Science*, *4*(4), 1337-1344.
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustrie.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., & Singh, Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in lipid research*, *57*, 40-54.
- Gutiérrez-Ortega, A., Rivera, I., Cruz-Franco, S., Gutiérrez-Mora, A., Alpuche-Solís, Á. G., Sánchez-Hernández, C., . . . Sandoval, G. (2017). Identification, cloning and expression of a new GDGL lipase from *Carica papaya*. *Process Biochemistry*, *55*, 70-76.
- Guy, R. C., & Sahi, S. S. (2006). Application of a lipase in cake manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(11), 1679-1687.

H

- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, *39*(2), 235-251.
- Hedfors, C., Hult, K., & Martinelle, M. (2010). Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*(1-2), 120-123.
- Hewitt, S. H., & Butler, S. J. (2018). Application of lanthanide luminescence in probing enzyme activity. *Chemical Communications*, *54*(50), 6635-6647.

- Higgins, D. G., & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, *73*(1), 237-244.
- Higgins, D., Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, *22*, 4673-4680.
- Hills, M. J., Kiewitt, I., & Mukherjee, K. D. (1990). Lipase from *Brassica napus* L. discriminates against cis-4 and cis-6 unsaturated fatty acids and secondary and tertiary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *1042*(2), 237-240.
- Hofmeyr, S., Meyer, C., & Warren, B. L. (2014). Serum lipase should be the laboratory test of choice for suspected acute pancreatitis. *South African Journal of Surgery*, *52*(3), 72-75.
- Hou, X. D., Guan, X. Q., Cao, Y. F., Weng, Z. M., Hu, Q., Liu, H. B., ... & Ge, G. B. (2020). Inhibition of pancreatic lipase by the constituents in St. John's Wort: In vitro and in silico investigations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *145*, 620-633.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., . . . Finn, R. D. (2019). InterPro: the integrative protein signature database . *Nucleic acids research*, *37*(suppl_1), D211-D215.

I

- Ibrahim, N. A. (2013). Characteristics of Malaysian palm kernel and its products. *Journal of Oil Palm Research*, *25*(2), 245-252.
- Ilyasoglu, H. (2013). Production of human fat milk analogue containing α -linolenic acid by solvent-free enzymatic interesterification. *LWT-Food Science and Technology*, *54*(1), 179-185.

J

- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, *16*(9), 396-403.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, *53*(1), 315-351.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., . . . Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, *132*, 23-34.
- Jayaraman, J., Alagu, K., Appavu, P., Joy, N., Jayaram, P., & Mariadoss, A. (2019). Enzymatic production of biodiesel using lipase catalyst and testing of an unmodified compression ignition engine using its blends with diesel. *Renewable Energy*, *145*, 399-407.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, *36(suppl_2)*, W5-W9.

Jung, S., Kim, J., & Park, S. (2013). Rational design for enhancing promiscuous activity of *Candida antarctica* lipase B: a clue for the molecular basis of dissimilar activities between lipase and serine-protease. *RSC advances*, *3(8)*, 2590-2594.

K

Kanz, C., Aldebert, P., Althorpe, N., Baker, W., Baldwin, A., Bates, K., . . . Duggan, K. (2005). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic acids research*, *33(suppl_1)*, D29-D33.

Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, *47(4)*, 555-569.

Karra-Châabouni, M., Ghamgui, H., Bezzine, S., Rekik, A., & Gargouri, Y. (2006). Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, *41(7)*, 1692-1698.

Kavitha, M. (2016). Cold active lipases—an update. *Frontiers in life Science*, *9(3)*, 226-238.

Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *5*, 16.

Kim, B. H., & Akoh, C. C. (2015). Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Food Science*, *80(8)*, C1713-C1724.

Kirana, S., Arshada, Z., Nosheenb, S., Kamala, S., Gulzara, T., Majeeda, M. S., . . . Rafiquec, M. A. (2016). Microbial lipases: production and applications: a review. *Journal of biochemistry biotechnology and biomaterials*, *1(2)*, 7-20.

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, *13(4)*, 345-351.

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 Biochemistry*, *39(11)*, 1377-1385.

Köse, K., Erol, K., Ali Köse, D., Evcı, E., & Uzun, L. (2017). Affinity purification lipase from wheat germ: comparison of hydrophobic and metal chelation effect. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *45(3)*, 574-583.

Kouteu, P. A., Blin, J., Baréa, B., Barouh, N., & Villeneuve, P. (2017). Solvent-free biodiesel production catalyzed by crude lipase powder from seeds: Effects of alcohol polarity, glycerol, and thermodynamic water activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65(39)*, 8683-8690.

Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S., & Arora, P. K. (2016). Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological Procedures Online*, *18(1)*, 2.

Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A Broad Temperature Active Lipase Purified From a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya With Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 642.

L

Lan, D., Qu, M., Yang, B., & Wang, Y. (2016). Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 62-67.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

Le, Q. A., Joo, J. C., Yoo, Y. J., & Kim, Y. H. (2012). Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), 867-876.

Lee, D. S., Kim, B. K., Kwon, S. J., Jin, H. C., & Park, O. K. (2009). Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(4), 1038-1042.

Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., & Chatonnet, A. (2012). ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic acids research*, 41(D1), D423-D429.

Lengsfeld, H., Beaumier-Gallon, G., Chahinian, H., De Caro, A., Verger, R., Laugier, R., & Carrière, F. (2004). Physiology of gastrointestinal lipolysis and therapeutical use of lipases and digestive lipase inhibitors. In *Lipases and phospholipases in drug development* (pp. 195-229). Wiley-VCH Weinheim.

Letovsky, S. I., Cottingham, R. W., Porter, C. J., & Li, P. W. (1998). GDB: the human genome database. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 94-99.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.

Liaquat, M., & Apenten, R. O. (2000). Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of food science*, 65(2), 295-299.

Lin, Y. H., Wimer, L. T., & Huang, A. H. (1983). Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Plant physiology*, 73(2), 460-463.

Liu, T., Liu, Y., Wang, X., Li, Q., Wang, J., & Yan, Y. (2011). Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1-2), 45-50.

Lo Conte, L., Ailey, B., Hubbard, T. J., Brenner, S. E., Murzin, A. G., & Chothia, C. (2000). SCOP: a structural classification of proteins database. *Nucleic acids research*, 28(1), 257-259.

M

Mabizela-Mokoena, N. B., Limani, S. W., Ncube, I., Piater, L. A., Litthauer, D., & Nthangeni, M. B. (2017). Genetic determinant of *Bacillus pumilus* lipase lethality and its application as positive selection cloning vector in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 137, 43-51.

Madhu, A., & Chakraborty, J. N. (2017). Developments in application of enzymes for textile processing. *Journal of cleaner production*, 145, 114-133.

Mancheño, J. M., Pernas, M. A., Martínez, M. J., Ochoa, B., Rúa, M. L., & Hermoso, J. A. (2003). Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 332(5), 1059-1069.

Marszałł, M. P., & Siódmiak, T. (2012). Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (R, S)-ibuprofen. *Catalysis Communications*, 24, 80-84.

Mase, T., Asano, K., Ikeda, Y., Kato, Y., Esaki, H., & Isshiki, S. (2013). Characterization and application of lipase 39-A from *Cryptococcus flavescens* for Cheese flavoring. *19(1)*, 89-95.

Mathpati, A. C., Badgujar, K. C., & Bhanage, B. M. (2016). Kinetic modeling and docking study of immobilized lipase catalyzed synthesis of furfuryl acetate. *Enzyme and microbial technology*, 84, 1-10.

Mazou, M., Djossou, A. J., Tchobo, F. P., Villeneuve, P., & Soumanou, M. M. (2016). Plant latex lipase as biocatalysts for biodiesel production. *African Journal of Biotechnology*, 15(28), 1487-1502.

Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8.

Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: From production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158.

Mishra, U. N., & Kandali, R. (2019). Plant Lipases: A Potential Candidate for Commercial Exploitation. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 32(2), 123-131.

Moftah, O. A., Grbavčić, S., Žuža, M., Luković, N., Bezbradica, D., & Knežević-Jugović, Z. (2012). Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 348-364.

Momsia, T., & Momsia, P. (2013). A review on “microbial lipase-versatile tool for industrial applications.”. *Int. J. life Sci. Biotechnol. pharma Res*, 2.

- Motenko, H., Neuhauser, S. B., O'keefe, M., & Richardson, J. E. (2015). MouseMine: a new data warehouse for MGI. *Mammalian Genome*, 26(7-8), 325-330.
- Mounguengui, R. W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., & Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in energy and combustion science*, 39(5), 441-456.
- Mount, D. W. (2004). Sequence and genome analysis. *Bioinformatics: Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour*, 2.
- Moussavou M, R. W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., & Blin, J. (2016). Assessing the enzyme activity of different plant extracts of biomasses from Sub-Saharan Africa for ethyl biodiesel production. *Energy & Fuels*, 30(3), 2356-2364.
- Mukherjee, K. D. (1996). Plant lipases in lipid biotransformations. *NATO ASI Series E Applied Sciences-Advanced Study Institute*, 317, 391-402.

N

- Narwal, S. K., Saun, N. K., Dogra, P., Chauhan, G., & Gupta, R. (2015). Production and characterization of biodiesel using nonedible castor oil by immobilized lipase from *Bacillus aerius*. *BioMed research international*, 2015.
- Nataningtyas, D. R., Raharjo, T. J., & Astuti, E. (2019). Three Dimensional Structural Modelling of Lipase Encoding Gene from Soil Bacterium *Alcaligenes* sp. JG3 Using Automated Protein Homology Analysis. *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(3), 565-574.
- Needleman, S. B., & Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of molecular biology*, 48(3), 443-453.
- Negi, S. (2019). Lipases: A promising tool for food industry. *Green Bio-processes*, 181-198.
- Nemati, S. S., Emadi, S., Mohammadkhani, L. G., Kompany-Zareh, M., & Hasanzadeh, Z. (2019). Multivariate spectrofluorimetric detection of lipase isolated from *Serratia marcescens* in chromatographic fractions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 222, 117-137.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S., & Adivarekar, R. (2013). Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *Journal of surfactants and detergents*, 16(3), 435-443.

O

- Ogasawara, O., Kodama, Y., Mashima, J., Kosuge, T., & Fujisawa, T. (2020). DDBJ Database updates and computational infrastructure enhancement. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D45-D50.
- Ouzounis, C. A., & Valencia, A. (2003). Early bioinformatics: the birth of a discipline—a personal view. *Bioinformatics*, 19(17), 2176-2190.

P

- Pal, S. K., Bandyopadhyay, S., & Ray, S. S. (2006). Evolutionary computation in bioinformatics: A review. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part C (Applications and Reviews)*, 36(5), 601-615.
- Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., & Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533-1545.
- Pantzaris, M. C., Loukaides, G. N., Ntzani, E. E., & Patrikios, I. S. (2013). A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. *BMJ open*, 3(4).
- Paques, F. W., & Macedo, G. A. (2006). Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*.
- Pascoal, A., Estevinho, L. M., Martins, I. M., & Choupina, A. B. (2018). Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 104, 119-126.
- Patel, N., Rai, D., Shahane, S., & Mishra, U. (2019). Lipases: sources, production, purification, and applications. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 45-56.
- Patil, K. J., Chopda, M. Z., & Mahajan, R. T. (2011). Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 971-982.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2012). Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012.
- Payá-Tormo, L., Rodríguez-Salarichs, J., Prieto, A., Martínez, M. J., & Barriuso, J. (2019). Improvement of the Activity of a Fungal Versatile-Lipase Toward Triglycerides: An in silico Mechanistic Description. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 71.
- Pearson, W. R., & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2444-2448.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785-786.
- Phuah, E. T., Lai, O. M., Choong, T. S., Tan, C. P., & Lo, S. K. (2012). Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 91-97.
- Pierozan, M. K., da Costa, R. J., Antunes, O. A., Oestreicher, E. G., Oliveira, J. V., Cansian, R. L., . . . de Oliveira, D. (2009). Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9716-9721.

Pinyaphong, P., & Phutrakul, S. (2009). Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by *Carica papaya* lipase-catalyzed interesterification. *Chiang Mai J. Sci*, 36(3), 359-368.

Q

Qiu, X., Sun, W., McDonnell, C. M., Li-Byarlay, H., Steele, L. D., Wu, J., . . . Pittendrigh, B. R. (2013). Genome-wide analysis of genes associated with moderate and high DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pest management science*, 69(8), 930-937.

Quax, W. J. (2006). Bacterial enzymes. *The Prokaryotes*, 1, 777-796.

R

Rai, S., Vasava, H., & Upadhaya, D. (2020). Bacterial Lipase: A Review. *Studies in Indian Place Names*, 40(71), 200-208.

Rajamohan, F., Reyes, A. R., Tu, M., Nedoma, N. L., Hoth, L. R., Schwaid, A. G., . . . Han, S. (2020). Crystal Structure of human Lysosomal Acid Lipase and its Implications in Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD). *Journal of Lipid Research*, jlr-RA120000748.

Rathod, V. K., & Pandit, A. B. (2009). Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 93-99.

Raza, K. (2012). Application of data mining in bioinformatics. *arXiv preprint arXiv:1205.1125*.

Reena, M. B., & Lokesh, B. R. (2011). Effect of feeding blended and interesterified vegetable oils on antioxidant enzymes in rats. *Food and chemical toxicology*, 49(1), 136-143.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147, 237-250.

Resina, D., Maurer, M., Cos, O., Arnau, C., Carnicer, M., Marx, H., . . . Ferrer, P. (2009). Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *New biotechnology*, 25(6), 396-403.

Ribeiro, B. D., Castro, A. M., Coelho, M. A., & Freire, D. M. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme research*, 2011.

Robert, H. (2015). Lipases in baking. *Lipinov. Romainville, FR: Adebitech*.

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.

Rodrigues, R. C., Virgen-Ortíz, J. J., dos Santos, J. C., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A. R., Barbosa, O., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipases

on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology advances*.

Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M. P., Rivière, M., Dupuis, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16995-17002.

Roussel, A., Miled, N., Berti-Dupuis, L., Rivière, M., Spinelli, S., Berna, P., . . . Cambillau, C. (2002). Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2266-227.

S

Sakate, P. J., & Salunkhe, P. S. (2013). Study of lipase activity during development of *Chilo partellus* (Swinhoe). *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, 33(1), 61-68.

Salaberría, F., Palla, C., & Carrín, M. E. (s.d.). ENZYMATIC ACTIVITY OF A COMMERCIAL LIPASE FROM WHEAT GERM UNDER DIFFERENT REACTION CONDITIONS.

Salihu, A., & Alam, M. Z. (2012). Production and applications of microbial lipases: a review. *Scientific Research and Essays*, 7(30), 2667-2677.

Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpani, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian journal of Microbiology*, 41(1), 179-185.

Santos, K. C., Cassimiro, D. M., Avelar, M. H., Hirata, D. B., de Castro, H. F., Fernández-Lafuente, R., & Mendes, A. A. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial crops and products*, 49, 462-470.

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 13(4), 1518-1524.

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34(1), 5-28.

Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., . . . Minx, P. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326(5956), 1112-1115.

Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., . . . Scheer, M. (2012). BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic acids research*, 41(D1), D764-D772.

- Seth, S., Chakravorty, D., Dubey, V. K., & Patra, S. (2014). An insight into plant lipase research—challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, *95*, 13-21.
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2004). Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. *Energy & Fuels*, *18*(1), 154-159.
- Sharma, A., Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2018). Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. *International journal of biological macromolecules*, *107*, 2131-2140.
- Sharma, D., Sharma, B., & Shukla, A. K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, *10*(1), 23-40.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, *19*(8), 627-662.
- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, *29*(1), 308-311.
- Shuai, W., Das, R. K., Naghdi, M., Brar, S. K., & Verma, M. (2017). A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnology and applied biochemistry*, *64*(4), 496-508.
- Sikora, A., Siódmiak, T., & Marszał, M. P. (2014). Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases. *Chirality*, *26*(10), 663-669.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, *166*(2), 486-520.
- Smith, T. F., Waterman, M. S., & Fitch, W. M. (1981). Comparative biosequence metrics. *Journal of Molecular Evolution*, *18*(1), 38-46.
- Sonne, D. P., Vilsbøll, T., & Knop, F. K. (2015). Pancreatic amylase and lipase plasma concentrations are unaffected by increments in endogenous GLP-1 levels following liquid meal tests. *Diabetes Care*, *38*(5), e71-e72.
- Souza, L. T., Oliveira, J. S., Rodrigues, M. Q., dos Santos, V. L., Pessela, B. C., & Resende, R. R. (2015). Macaúba (*Acrocomia aculeata*) cake from biodiesel processing: a low-cost substrate to produce lipases from *Moniliella spathulata* R25L270 with potential application in the oleochemical industry. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 87.
- Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., . . . Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, *31*(8), 1846-1859.
- Su, C. H., Nguyen, H. C., Nguyen, M. L., Tran, P. T., Wang, F. M., & Guan, Y. L. (2018). Liquid lipase-catalyzed hydrolysis of gac oil for fatty acid production: Optimization using response surface methodology. *Biotechnology Progress*, *34*(5), 1129-1136.

Su, E. Z., Zhou, Y., You, P. Y., & Wei, D. Z. (2010). Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: activity comparison, purification and characterization. *Journal of Shanghai University (English Edition)*, 14(2), 137-144.

Su, F., Peng, C., Li, G. L., Xu, L., & Yan, Y. J. (2016). Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. *Renewable Energy*, 90, 329-335.

Suci, M., Arbianti, R., & Hermansyah, H. (2018, January). Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 105, No. 1, p. 012126). IOP Publishing Ltd..

Sun, S., Zhou, Y., Chen, J., Shi, J., Zhao, H., Zhao, H., . . . Liu, H. (2018). Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes. *Nature genetics*, 50(9), 1289-1295.

T

Tagu, D., & Risler, J. L. (2010). Bio-informatique: Principes d'utilisation des outils. *Editions Quae*.

Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Ariff, A. B., Ng, H. S., Bakar, M. H., & Chow, Y. H. (2018). Extractive purification of recombinant thermostable lipase from fermentation broth of *Escherichia coli* using an aqueous polyethylene glycol impregnated resin system. *3 Biotech*, 8(6), 288.

Tavares, F., Petry, J., Sackser, P. R., Borba, C. E., & Silva, E. A. (2018). Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. *Industrial Crops and Products*, 124, 254-264.

Tecelão, C., Rivera, I., Sandoval, G., & Ferreira-Dias, S. (2012). Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. *European journal of lipid science and technology*, 114(3), 266-276.

U

Unni, K. N., Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., & Benjamin, S. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* strain BUP2, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase. *Biologia*, 71(4), 378-387.

Updegraff, E. P., Zhao, F., & Preuss, D. (2009). The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sexual plant reproduction*, 22(3), 197-204.

V

Van Der Walle, N. (1927). Über synthetische Wirkung bakterieller Lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr*, 70, 369-373.

Vaquero, M. E., Barriuso, J., Martínez, M. J., & Prieto, A. (2016). Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(5), 2047-2061.

Vishnoi, N., Dixit, S., & Mishra, J. (2020). Microbial Lipases and Their Versatile Applications. In *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (pp. 207-230). Springer, Singapore.

W

Wang, D., Liu, D., Yuchi, J., He, F., Jiang, Y., Cai, S., . . . Xu, D. (2020). MusiteDeep: a deep-learning based webserver for protein post-translational modification site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*.

Wang, S. M., & Huang, A. H. (1987). Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel. *Journal of Biological Chemistry*, 262(5), 2270-2274.

Wang, X., Yu, X., & Xu, Y. (2009). Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and microbial technology*, 45(2), 94-102.

Wei, W., Sun, C., Wang, X., Jin, Q., Xu, X., Akoh, C. C., & Wang, X. (2020). Lipase-Catalyzed Synthesis of Sn-2 Palmitate: A Review. *Engineering*.

Winkler, F. K., d'Arcy, A., & Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343(6260), 771-774.

Y

Yadav, G. D., & Devi, K. M. (2004). Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Biochemical engineering journal*, 17(1), 57-63.

Yang, J., Hu, Y., Jiang, L., Zou, B., Jia, R., & Huang, H. (2013). Enhancing the catalytic properties of porcine pancreatic lipase by immobilization on SBA-15 modified by functionalized ionic liquid. *Biochemical engineering journal*, 70, 46-54.

Z

Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 8017-8021.

Zan, X., Cui, F., Sun, J., Zhou, S., & Song, Y. (2019). Novel Dual-Functional Enzyme Lip10 Catalyzes Lipase and Acyltransferase Activities in the Oleaginous Fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(47), 13176-13184.

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism*, 15(3), 279-291.

Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., & Cao, S. (2009). Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2-3), 78-84.