



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *enneiborciM eigolocE*

Intitulé :

L'Optimisation de la production de lipases par *Aspergillus sp*

Présenté et soutenu par : *Aggoune wissem*

Le : 19/06/2017

Marouf sabrine

Jury d'évaluation :

Président du jury : *BENHIZIA Yacine* (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : *BOUCHERIT Zeyneb* (Maitre Assistant A- UFM Constantine).

Examinatrice : *GACI Meriem* (Maitre-Assistant A- UFM Constantine).

Année universitaire
2016 - 2017

Remerciement

Nul doute que personne n'est né avec le savoir, il doit ainsi toujours quelque chose à quelqu'un, et c'est pour cette raison que nous tenons à remercier

Dieu de nous avoir aider pour la réalisation de notre Mémoire

*Notre encadreur **Madame BOUCHERIT Zeyneb** pour son support, ses conseils sa confiance, et orientation dans la conception de ce travail, merci pour le savoir précieux qu'elle a aimablement voulu partagé avec nous.*

*On présente nos sincères remerciements à **Monsieur BENHIZIA Yacine** d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous adressons nos remerciements à **Madame GACI Meriem** d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Nous ne manquerons pas à exprimer notre profonde gratitude à l'équipe du laboratoire **Biologie et Environnement** qui nous ont accueillis et tout le*

personnel du département des sciences de la nature et de la vie pour leur disponibilité.

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre sincère gratitude ainsi que toute personne qui a contribué à l'achèvement de ce projet, directement ou indirectement.

Enfin nous exprimons encore nos remerciements les plus dévoués aux membres de jury qui nous ont honoré en acceptant d'évaluer ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage

A celle qui endeuillée pour me rendre heureuse

A celle qui attend chaleureusement ce jour : « ma chère Mère souheir »

A celui qui a fait des grands efforts pour mon bonheur

A celui qui a rêvé de voir cette journée

*A celui qui m'a orienté et m'a appris les secrets de la vie : « mon cher
Père Mouhamed- larbi »*

A celui qui m'a aidée par sa prière : « Ma grand-mère bariza/bibia »

A mon cher frère : « Youcef »

A mon cher fiancée : « Amir »

A tous les oncles et tantes et cousins et cousines

A tous ceux m'ont aidé de prêt ou de loin.

WISSEM

Dédicace

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont poussées et qui m'ont
accompagnées tout au long de ces 5 ans.*

À

*Ma maman, qui par son amour et ses prières a toujours cru en ma
réussite que Dieu*

la préserve et lui accorde santé et longue vie.

*Mon papa, qui par ces efforts fournis jours et nuits pour mon bien être, ce
travail est le*

fruit de ses sacrifices consentis pour ma formation.

*Ma sœur, qui par son bonheur apporté au quotidien ma permis
d'atteindre*

cette étape de ma vie

*Toutes les personnes que je porte dans mon cœur et qui ont sans le savoir
participer d'une*

manière considérable à ma réussite.

Tous mes amis(es) et notre groupe (Ecologie Microbienne)

Tous mes enseignants.

Sabrina

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photographies	
Introduction.....	1

Partie 1 : Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les moisissures

1. Généralités.....	2
2. Classification.....	3
2.1. <i>Les Zygomycètes (Zygomycota)</i>	4
2.2. <i>Les Ascomycètes (Ascomycota)</i>	5
2.3. <i>Les Basidiomycètes (Basidiomycota)</i>	6
2.4. <i>Les Deutéromycètes(Deutéromycota)</i>	6
3. Mode de vie.....	8
3.1. Le saprophytisme.....	8
3.2. Le parasitisme.....	8
3.3. La symbiose.....	8
4. Impact des moisissures.....	8
4.1. Domaine alimentaire.....	9

4.2. Domaine pharmaceutique.....	9
4.3. Domaine environnemental.....	9

Chapitre II : Les lipases

1. Les enzymes.....	11
1.1. Nomenclature et classifications des enzymes.....	11
1.1.1. Oxydoréductases : EC1.....	11
1.1.2. Transférases : EC2.....	11
1.1.3. Hydrolases : EC3.....	11
1.1.4. Lyases : EC4.....	11
1.1.5. Isomérasés : EC5.....	12
1.1.6. Ligases ou synthétases : EC6.....	12
2. Rôles des enzymes en industries.....	12
3. Les enzymes lipolytiques.....	12
3.1. Définition.....	12
3.2. Mode d'action des lipases.....	13
3.3. Types des lipases.....	14
3.3.1. Réaction d'hydrolyse.....	14
3.3.2. Réaction de synthèse.....	14
3.3.2.1. La transestérification.....	14
3.3.2.2. Interstérification.....	14
3.3.2.3. Alcoolyse.....	14
3.3.2.4. Acidolyse.....	15
4. Origine des lipases.....	15
4.1. Origine Animale.....	15

4.1.1. Les lipases gastriques.....	15
4.1.2. Les lipases pancréatiques.....	15
4.1.3. Les lipases hépatiques.....	15
4.2. Origine Végétale.....	16
4.3. Origine Microbienne.....	16
4.3.1. Origine Bactérienne.....	16
4.3.2. Origine fongique.....	16
5. Intérêt industriel des lipases.....	17
5.1. Application dans les détergents.....	17
5.2. Application dans l'industrie alimentaire.....	17
5.3. Applications en l'oléo-chimie.....	18
5.4. Application dans l'industrie du papier.....	18
5.5. Application dans l'environnement.....	18

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Moisissures.....	19
2. Méthode de fermentation.....	19
2.1. Fermentation sur milieu synthétique.....	19
2.1.1. Croissance sur MEA (Malt Extrat Agar).....	19
2.1.2. Croissance sur MEB (Malt Extrat Broth).....	19
3. Croissance sur déchet d'olive.....	19
3.1. Croissance sur milieu solide.....	20
3.2 Croissance sur milieu liquide.....	20
4. Optimisation du milieu de production.....	20

4.1. Effet de l'inoculum.....	20
4.2. Effet de la lumière et de l'agitation.....	20
4.3. Effet des ions	20
4.4. Effet des dilutions sur milieu liquide.....	20
4.5. Effet du NaCl	20
4.6. Effet du pH.....	21
4.7. Effet de la source d'azote	21
4.8. Effet de la source de carbone.....	21
4.9. Effet des Alcools.....	21
5. Méthodes analytiques.....	21
5.1. La biomasse.....	21
5.2. Détermination de l'activité lipolytique des souches.....	22

Partie 3 : Résultats et discussions.

1. Etude cinétique des souches.....	23
2. Capacité de dégradations du déchet d'olive.....	27
3. Optimisation de la production de lipase.....	28
3.1. Etude de l'effet de la quantité d'inoculum.....	35
3.2. Etude de l'effet de l'obscurité et de l'agitation.....	36
3.3. Etude de l'effet des ions.....	37
3.4 Etude de l'effet dilutions.....	38
3.5. Etude de l'effet du Na Cl.....	38
3.6. Etude de l'effet du pH.....	39
3.7. Etude de l'effet de la source d'azote (N).....	40

3.8. Etude de l'effet de la source de carbone (sucre).....	41
3.9 Etude de l'effet des alcools.....	42

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des Abréviations

% : Pourcentage.

A : *Aspergillus*.

Ar : *Aureobasidium*.

°C : degré Celsius.

E.C : Enzyme Commission.

g: Gramme.

h: Heure.

IUB: International union of Biochemistry.

jrs : jours.

L : Litre.

M : Molarité.

MEA: Malt Extrat Agar.

MEB: Malt Extrat Broth.

ml : Millilitre.

m mol : millimole.

N : Normalité.

P : *Penicillium*.

pH : potentiel d'Hydrogène.

rpm: round per minute.

UI : Unité International.

Liste des figures

Figure 01 : Structure d'un mycélium.....	2
Figure02 : Classification générale des champignons.....	3
Figure03 : Structure de l'hyphe coenocytique des <i>Zygomycètes</i>	4
Figure04 : Cycle de reproduction sexuée et asexuée des <i>zygomycètes</i>	4
Figure05 : Figure 05 : Structure du mycélium cloisonné des <i>Ascomycètes</i>	5
Figure06 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des <i>Ascomycètes</i>	5
Figure07 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des <i>Basidiomycetes</i>	6
Figure08 : Structure dimensionnelle d'hélice site active d'une lipase.....	13
Figure 09 : Cinétique de production de lipase de la souche A1s1.....	23
Figure10 : Cinétique de production de lipase de la souche avs1.....	23
Figure11: Cinétique de production de lipase de la souche Ps6.....	25
Figure12 : Cinétique de production de lipase de la souche Ars7.....	25
Figure13: Cinétique de production de lipase de la souche Ps15.....	25
Figure14 : Cinétique de production de lipase de la souche Ps8.....	26
Figure15 : Cinétique de production de lipase de la souche As16.....	26
Figure16 : Cinétique de production de lipase de la souche Ps11.....	26
Figure 17 : L'effet de la quantité d'inoculum sur l'activité lipolytique.....	35
Figure 18 : L'effet de l'obscurité et l'agitation.....	36
Figure 19 : L'effet des ions sur l'activité lipolytique.....	37
Figure 20 : L'effet des dilutions sur l'activité lipolytique.....	38

Figure 21 : L'Effet des Concentration d'nacl sur l'activité lipolytique.....	38
Figure 22 : L'effet du ph sur l'activité lipolytique.....	39
Figure 23 : L'effet des sources d'azote sur l'activité lipolytique.....	40
Figure 24 : L'effet des sources de carbone (sucre) sur l'activité lipolytique.....	41
Figure 25: L'Effet des alcools sur l'activité lipolytique.....	42

Liste des tableaux

Tableau01 : Principales caractéristiques des embranchements de champignons.....8

Tableau 02 : Diamètres de croissance et de dégradation du déchet sur boîte de Pétri...27

Liste des photographies

Photographie 1 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 15%.....	28
Photographie 2 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 50%.....	28
Photographie 3 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 100%.....	29
Photographie 4 : La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 15%.....	29
Photographie 5 : La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 50%.....	30
Photographie 6: La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 100%.....	30
Photographie 7 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 15%.....	31
Photographie 8 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 50%.....	31
Photographie 9 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 100%.....	32
Photographie10 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 15%.....	32
Photographie11 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 50%.....	33
Photographie12 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 100%.....	33

L'ensemble de la population consomme des biens et des services issus de la biotechnologie qu'il s'agit d'un aliment comme le lait fermenté (**Alifax, 1972**), d'un médicament tel que les hormones de croissances (**Alloue et al ; 2008b**) ou d'un détergent comme anti graisse (**Najjar, 2010**). Cette production a vraisemblablement nécessité l'action des enzymes potentiellement intéressantes, parmi ces dernières on trouve les lipases fongiques (**Boukaa, 2015**).

Les lipases sont des enzymes ubiquistes, actuellement elles sont largement utilisées dans plusieurs domaines et un très grand nombre de recherche tel que le domaine agroalimentaire, textile, dégradations et dépollutions des déchets industrielles (**Rihani, 2012**).

L'industrie oléicole est une industrie agroalimentaire qui génère des déchets lipophiles souvent non recyclés de nature solide (grignons d'olive feuilles et bois) et liquide (margines).

La mise en décharge de ce type de déchets n'est pas autorisée par la législation algérienne ; ces déchets sont soit brûlés soient rejetés dans l'environnement sans traitement préalable réel, or ils sont toxique ce qui nécessite leur valorisation par les microorganismes. La biodégradation complète de ces matières polluantes comporte l'étape de lipolyse par l'intervention des enzymes lipolytiques (**Bataiche, 2014**).

Pour cela, le présent travail a pour principal objectif d'optimiser la production d'une lipase par des moisissures sur milieux liquide à base de déchet d'olive ; en suivant d'une part la cinétique de biomasse et de production de lipase et d'autre part l'étude de l'effet de plusieurs paramètres sur la production de l'enzyme.

1. Généralités

Les moisissures, en anglais « mildew », c'est une forme de champignons microscopiques hétérotrophes, immobiles et pluricellulaires du règne des mycètes (Nicklin *et al.*, 2000) . Elles sont dépourvues de chlorophylle et dotées d'un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux dont les filaments s'appellent des hyphes (Bernard Boullard., 1997).

Les champignons microscopiques sont important pour l'environnement en se développant sur n'importe quel milieu en particulier sur la matière organique en décomposition (Figarella *et al.*, 2004) ; Elles peuvent aussi dégrader les matières organiques complexes en substances simples tel que : les alcools, les acides organiques, les antibiotiques, les vitamines, les enzymes...etc

Un pourcentage des mycètes est considérés comme pathogènes ; Ils entretiennent des relations maléfiques avec les plantes, les animaux et même l'être humain car elles peuvent causer des maladies graves ; d'autre sont symbiotiques et entretiennent des relations bénéfiques avec d'autres organismes comme les associations mycorhiziennes (Lansing *et al.*, 2003).

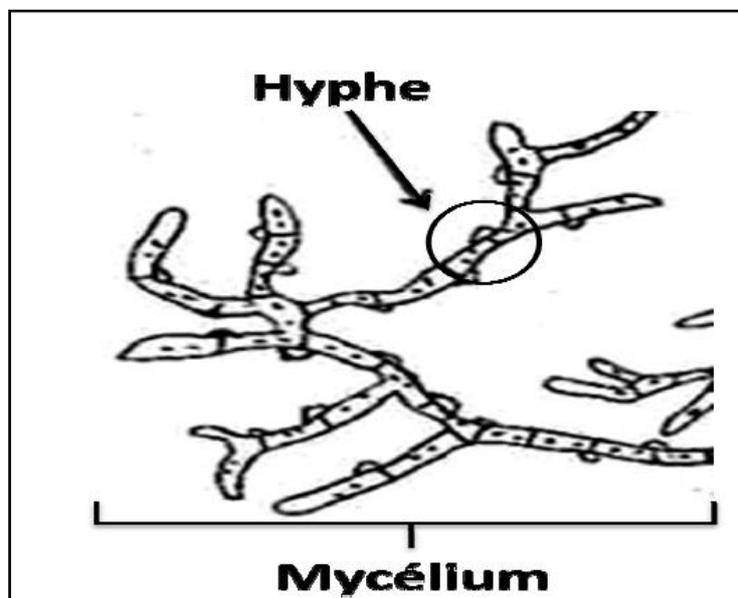


Figure01 : Structure d'un mycélium (Ross, 2010).

2. Classification

La classification des champignons a souvent été basé sur leurs comestibilités ou bien leurs toxicités mais l'évolution de la science permet, de nos jours, de classer ces champignons d'une manière plus complète en s'appuyant sur :

- Des caractères morphologiques comme la structure du mycélium (cloisonnés ou non cloisonnés), la couleur de l'hyphe et la vitesse de croissance (**Davet, 1996**).
- Les organes de reproduction asexuée ou sexuée lorsqu'elles existent (**Meyer et al., 2004**).

Cependant les Eumycètes sont les vrais champignons qui forment un groupe très vaste englobant quatre grands embranchements (**Bourgeois, 1989**): les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

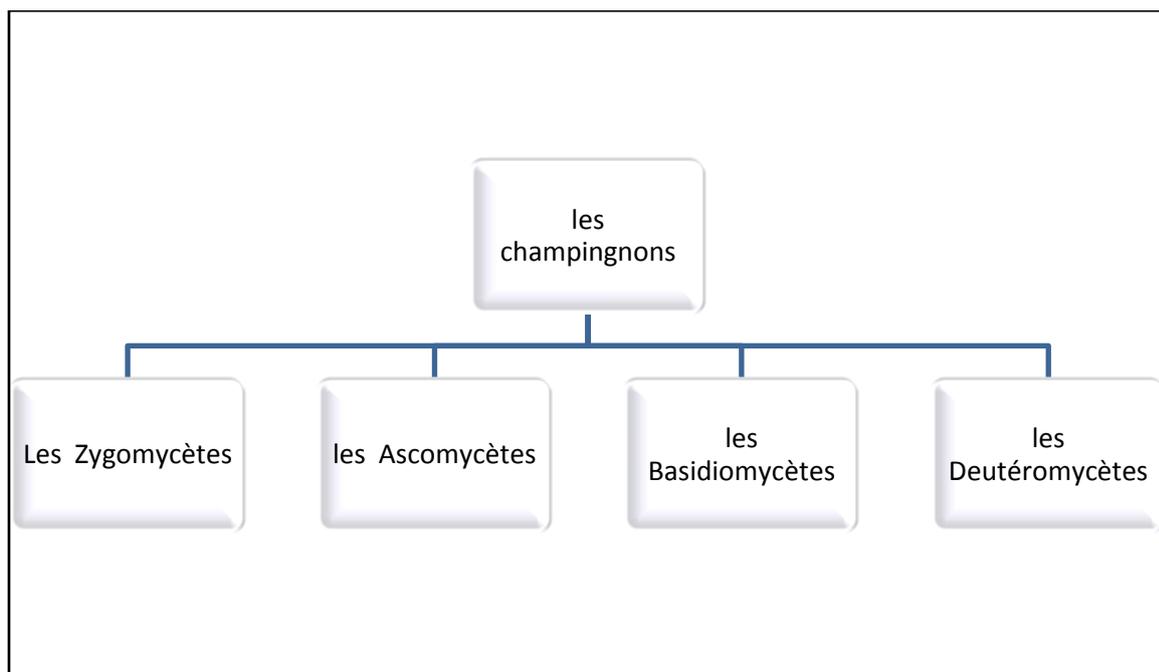


Figure 02 : Classification générale des champignons

2.1 Les Zygomycètes (Zygomycota) : Ils possèdent des hyphes coenocytiques et des organes de reproduction sexuée qui produisent des zygotes, appelés zygospores, dormants quand l'environnement est défavorable pour leur croissances, tandis que la reproduction asexuées est assurée par des sporocystospores qui se développent dans des sporanges à l'extrémité des hyphes aériens (**Georges B. Johnson et al.,2011**).

Les moisissures de cette classe vivent sur des matières végétales et animales en décomposition dans le sol mais on peut les trouver autant que parasites des plantes, des insectes, des animaux et des Hommes (**Guiraud, 1998**).



Figure 03 : Structure de l'hyphe coenocytique des Zygomycètes (**Rolland & Vian,1985**).

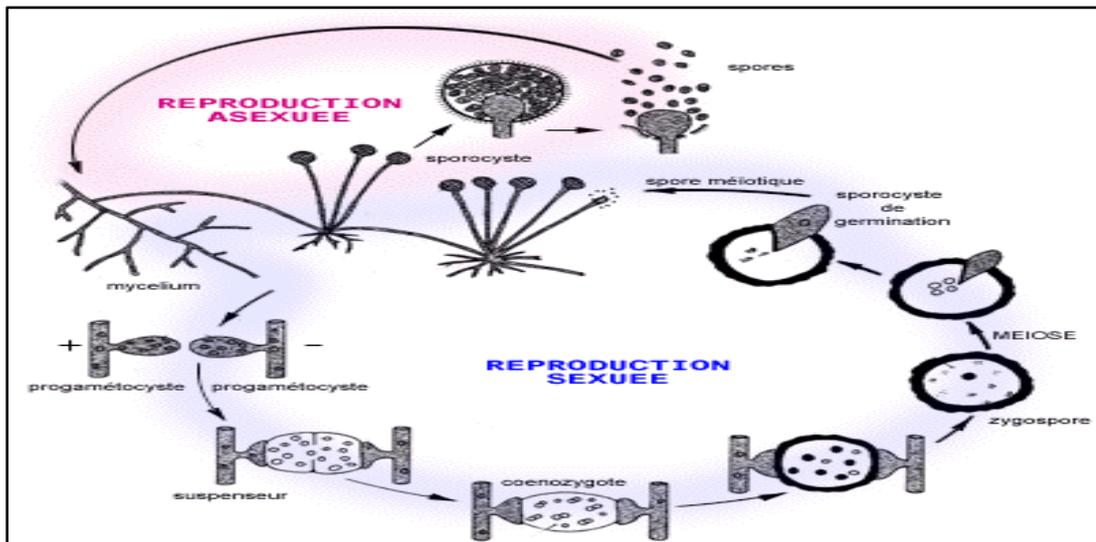


Figure 04 : Cycle de reproduction sexuée et asexuée des zygomycètes (**Rolland & Vian, 1985**).

2.2 Les Ascomycètes (Ascomycota) : Ce groupe, comprenant plusieurs champignons à thalle mycélien cloisonné, produisent des ascospores endogènes et peuvent être unicellulaire ou thallophytes ; Ils possèdent deux types de reproduction :

- Reproduction asexuée, commune chez les ascomycètes, se fait par moyen des spores exogènes (conidiospores).
- Reproduction sexuée entraîne la formation d'asque contenant des ascospores (spores endogènes).

Un certain nombre d'Ascomycètes est considéré comme de redoutables parasites des végétaux, des animaux et des Hommes ; Tandis que près de la moitié des espèces vivent en symbiose avec les algues vertes et forment des lichens. Ils sont considérés aussi comme des saprophytes, décomposeurs importants qui dégradent une grande variété de matières organiques, avec une importance considérable dans la fabrication des antibiotiques (Reece & al., 2015).

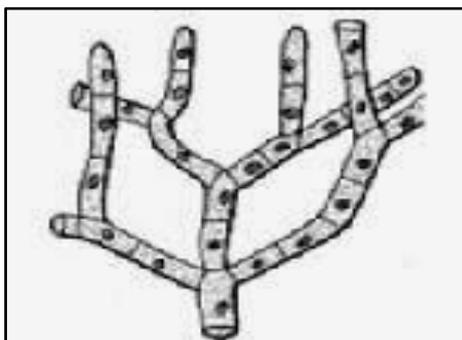


Figure 05 : Structure du mycélium cloisonné des *Ascomycètes* (Rolland & Vian, 1985).

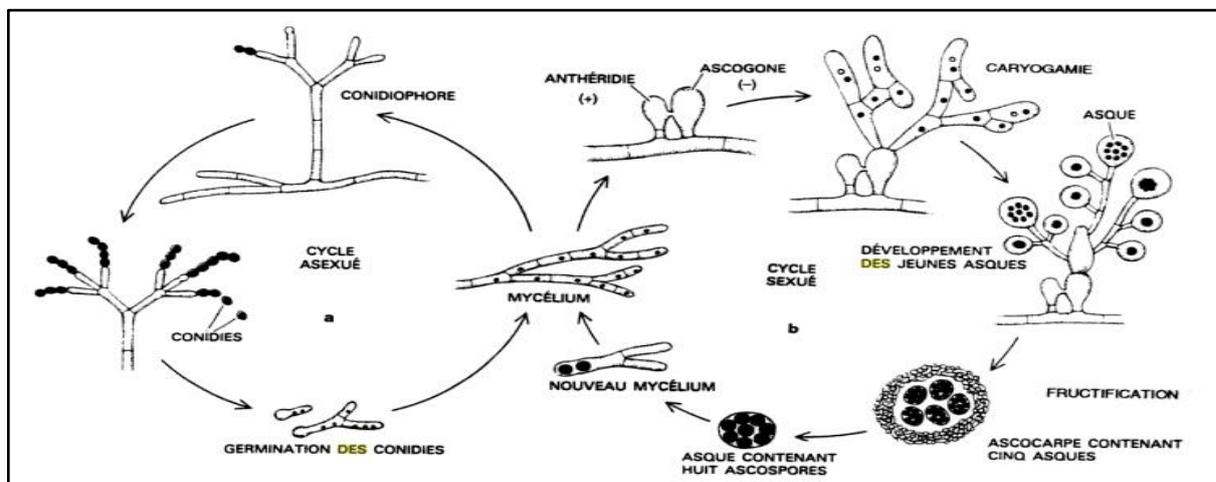


Figure 06 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des *Ascomycètes* (Meyer, 2004).

2.3 Les Basidiomycètes (Basidiomycota)

Connus sous le nom de « champignons à chapeau », ils possèdent un thalle à mycélium septé ; la reproduction sexuée se fait par la formation de spores exogènes (basidiospores).

La plupart des Basidiomycètes sont soit symbiotiques, soit responsables de la décomposition des débris végétaux (cellulose, lignine) ; Il existe aussi des Basidiomycètes parasites qu'on trouve essentiellement dans les endroits humides (**univ-brest.fr**).

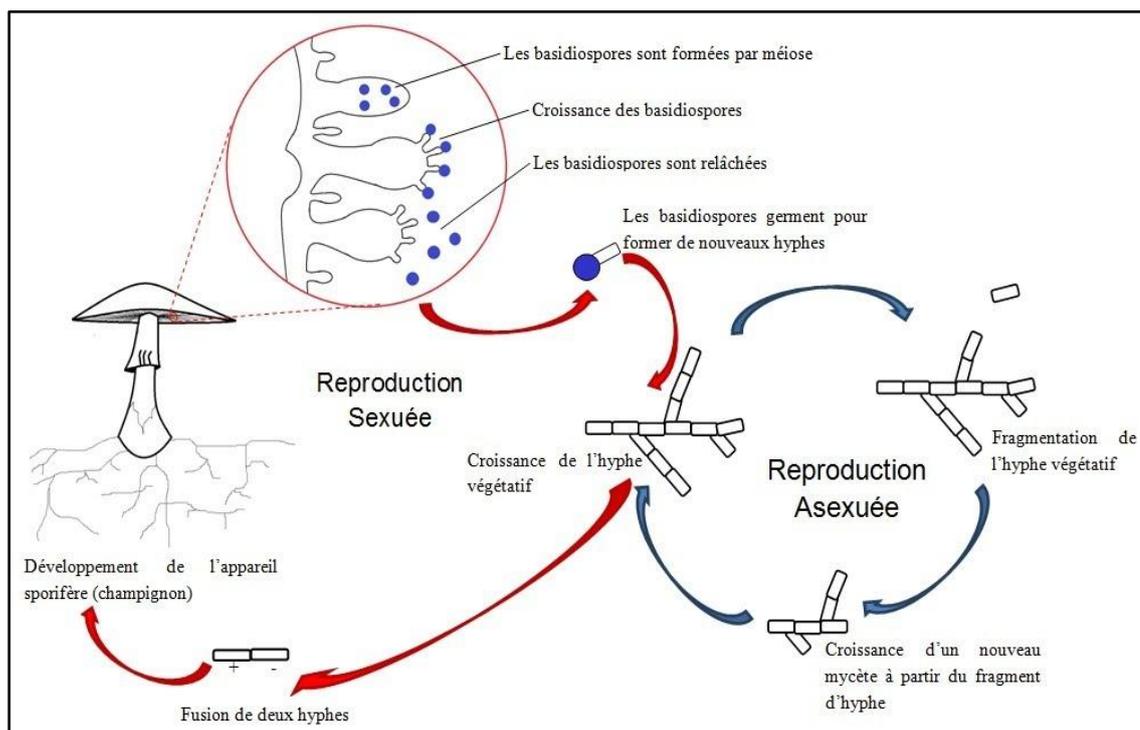


Figure 07 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des *Basidiomycetes* (**microbiologieaz**).

2.4 Les Deutéromycètes (*Deutéromycota*)

Ensemble artificiel regroupant environ 20 000 espèces de champignons filamenteux septés, ne présentant jamais ou très exceptionnellement des formes de reproduction sexuée champignons imparfaits ; Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (**univ – brest.fr**). Ce groupe artificiel est de moins en moins utilisé car avec les techniques de la biologie moléculaire on peut maintenant rattacher beaucoup de ces espèces à une forme sexuée connue.

La plupart de ces mycètes imparfaits affectent de façon directe le bien être de l'Homme vue leurs pathogénicité (maladies du pied d'athlète et maladie de la teigne tondante) mais se

produisent aussi, la plupart du temps, comme saprophytes sur une large gamme de substrats (Kiffer & Morellet. 1997).

Tableau01 : Principales caractéristiques des embranchements de champignons.

Classe	Nature de l'Hyphe (thalle mycélien)	Reproduction sexuée	Reproduction asexuée	Exemple
<i>Zygomycètes</i>	Septé	Zygosporés	Spores immobiles	<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>
<i>Ascomycètes</i>	Cloisonné	Ascospores	Spores immobiles Bourgeoisements, Conidies, Fragmentation du thalle	<i>Neurospora crassa</i> <i>Aspergillus vus</i>
<i>Basidiomycètes</i>	Cloisonné	Basidiospores	Spores immobiles Bourgeoisements, Conidies, Fragmentation du thalle	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Agaricus bisporus</i>
<i>Deutéromycètes</i>	Cloisonné	Absente ou inconnue	Voie végétatives (Spores asexuée), Fragmentation du thalle	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>

3. Mode de vie des moisissures

Les champignons ou plus précisément les mycètes se distinguent du règne végétal par l'absence du chloroplaste (chlorophylle) qui aide les plantes à fabriquer les matières organiques pour se nourrir ; de ce fait elles ont développées trois modes de nutritons pour puiser les matières organiques (éléments indispensables pour leur vie) présentes directement dans l'environnement (**Oei & van Nieuwenhijzen, 2005**).

3.1 Le saprophytisme

Les champignons saprophytes sont considérés comme de grand nettoyeurs de la nature ; Ils dégradent la matière morte et s'en nourrissent quelle soit d'origine végétale (feuilles, brindilles, souches...) ou bien animales (cadavres, organes, os, poils, peaux) en jouant un rôle primordial dans la dégradation de la matière organique en matière minérale qui se trouve dans diverses applications comme dans le domaine médicale (*Penicillium* a donné la Pénicilline), et agroalimentaire (les levures permettant à la pate à pain de lever) (**Lamaison & Polese,2005**).

3.2 Le parasitisme

Le parasitisme est une relation biologique entre deux êtres vivants dont l'un tire profit (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) d'un ou de plusieurs autres organismes que sa soit animale, causant des mycoses, ou végétale, causant la rouille, l'oïdium, l'anthracnose, (**Cassier et al., 1998 ; Combes ,2001**).

3.3 La symbiose

C'est une association durable entre deux organismes appartenant à des espèces différentes dans la quelle les bénéfices sont réciproques comme les mycorhizes (association entre champignons et les racines d'une plante généralement un Basidiomycète) (**Chestem, Botineau, 2007**).

4. Importance des moisissures

Les moisissures jouent un rôle important dans plusieurs domaines comme pour l'environnement, l'alimentaire et le pharmaceutique.

4.1 Domaine alimentaire

Certains champignons sont utilisés pour parfumer de façons caractéristiques les fromages tels que *Penicillium camemberti* pour le camembert et *Penicillium roqueforti* pour le roquefort.

Différentes espèces d'*Aspergillus* sont utilisées pour la fermentation de la sauce de soja et la fabrication des acides citriques, gluconiques et galliques ; d'autres sont utilisés dans les préparations commerciales de certaines substances attendrissantes de viandes et colorants jaune ajouté à la margarine et aux substituts du beurre (**Lansing et al., 2003**).

Les moisissures sont aussi utilisées dans la pâtisserie et également dans la production de boissons alcooliques par fermentation (**Piskur et al., 2006**).

4.2 Domaine pharmaceutique

Certaines moisissures contribuent à la fabrication d'antibiotiques tels que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la griséofulvine, Augmentin, Clamoxyl produite par *Penicillium chrysogenum* ; Elles sont aussi utilisées autant qu'adjuvant dans le traitement du cancer comme *Trametes versicolor* (**Fisher et Yang, 2002**).

4.3 Domaine environnemental

Les moisissures, d'une part assurent le maintien de l'équilibre écologique à travers la biodégradation des feuilles tombées ou bien mortes, ces dernières se transforment en composants qui seront utiles pour la végétation en libérant du carbone et des sels minéraux (cycles biogéochimiques) (**Joffin, 2003**), et d'autre part elles peuvent jouer un rôle important dans le recyclage des déchets produits par l'être Humain comme :

- les déchets agricoles valorisés par *Alternaria sp*, *Cladosporium sp* et *Epicoccum sp*.
- les déchets municipaux tels que les journaux qui ont été le substrat d'*Alternaria sp*, *Chaetomium sp*, *Cladosporium sp*, *Epicoccum sp* et *Stachybotrys sp*.
- Les déchets de tomates permet d'obtenir la Xylanase par : *Pleurotus ostreatus* et *Coriolus versicolor*.

La fermentation de mélasses est exploitée pour la production d'acides organiques (acide -

citrique par *Aspergillus niger* ; acide fumarique par *Rhizopus sp.* et *Mucor sp*) employés dans l'industrie alimentaire.

- Les déchets de pomme de terre douce donnent une protéase acide grâce à : *Aspergillus niger* (**Pandey et al., 1999**).

- Les déchets du café et les sons de blé sont utilisés comme un substrat pour produire une protéase alcaline grâce à : *Aspergillus oryzae* CFR305 (**Murthy et Naidu, 2010**), *Aspergillus flavus* (**Pandey et al., 1999**).

- Les déchets d'oranges et les sons de riz sont utilisés pour donner une protéase neutre grâce à : *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* MTCC281 (**Paranthaman et al., 2009**).

1. Les enzymes

Les enzymes, catalyseurs biologiques ou biocatalyseurs, sont des molécules permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire ; elles agissent à de faibles concentrations et se retrouvent intactes en fin de réaction (**Jarrar, 2011**).

Ces biocatalyseurs jouent un rôle important ; du fait qu'ils sont responsables des transformations biochimiques des molécules du vivant ; par conséquent cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles, tels que les détergents, le traitement de l'amidon et la production d'aliments pour animaux, aussi que le blanchiment biologique du papier et l'extraction du pétrole et du gaz naturel (**Charnock et McCleary, 2005**).

1.1 Nomenclature et classifications des enzymes

Le nom de la plupart des enzymes se compose du nom de la substance initiale (substrat) et de la réaction chimique accélérée suivi du suffixe ase (**Bloner, 2005**). Par exemple l'hexokinase (**Hennen, 2006**).

Les classes en nombre de six, sont réparties en fonction des réactions qu'elles catalysent par la commission chargée de la classification des enzymes du l'IUB (*International union of biochemistry*) publiées dans un catalogue contenant environ 4000 enzymes (**Quentin et al., 2011 ; Hennen & Binet 2006 ; McAuliffe 2012 ; Henry weil 2006**).

1.1.1 Oxydoréductases (EC.1) : Ces enzymes catalysent le transfert des électrons (équivalents d'un substrat) exemple L-lactate déshydrogénase.

1.1.2 Transférases (EC.2) : Ce groupe assure le transfert d'un groupement fonctionnel d'un substrat à un autre (groupe acyle, méthyle, Amino ...etc. Comme de L-aspartate carbamyl transférase.

1.1.3 Hydrolases (EC.3) : Ces enzymes sont responsables de la rupture des liaisons chimiques par addition d'eau pour former deux produits ; Exemple Glycérol ester hydrolase.

1.1.4 Lyases (EC.4) : Catalysant l'enlèvement d'un groupement autrement que par hydrolyse (avec souvent création d'une double liaison) ou, au contraire addition d'un groupement par exemple Fructose biphosphate aldolase.

1.1.5 Isomérases (EC.5) : Responsable du réaménagement de la structure de substrat moléculaire; en agissant sur les aminoacides, sur les oses...etc. Comme Triose phosphate isomérase.

1.1.6 Ligases ou synthétases (EC.6) : Ces Enzymes permettant l'union de deux molécules ; couplée avec la rupture d'une liaison à haute potentiel énergétique tels que Acétyl -COA synthétase.

2. Rôles des enzymes en industries

Les biocatalyseurs, considérés comme de mini usines ou de chaînes de production, travaillent avec grande rapidité, contrairement aux catalyseurs chimiques c'est pourquoi l'utilisation de la biocatalyse remplace à grande échelle de nombreux procédés chimique **(Bacchi, 2006)**.

Le marché des enzymes industrielles, quant à lui est en plein croissance grâce, notamment à l'apparition de nouveaux domaines d'application ; l'industrie des détergents où on utilise les protéases et les lipases, l'agroalimentaire on utilise par exemple l'alpha acétolactate oxydase **(Ben ameur villain, 2012)**. Et le domaine pharmaceutique où on utilise plusieurs enzymes comme l'alpha-amylase pancréatique **(Bustos, 2013)**.

3. Les enzymes lipolytiques

3.1 Définition

Les lipases (EC.3.1.1.3) appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques ; leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides monoglycérides, et acides gras et glycérol **(Chaib, 2013 ; Mtibaa et al., 2002)**. La structure des lipases a été déterminée par cristallogénèse et diffraction des rayons x **(Najjar, 2010)**. Toutes les lipases connues à ce jour présentent une organisation tridimensionnelle commune composée d'un feuillet bêta central formé de huit brins parallèles connectés entre eux par des hélices alpha **(Najjar, 2010)**.

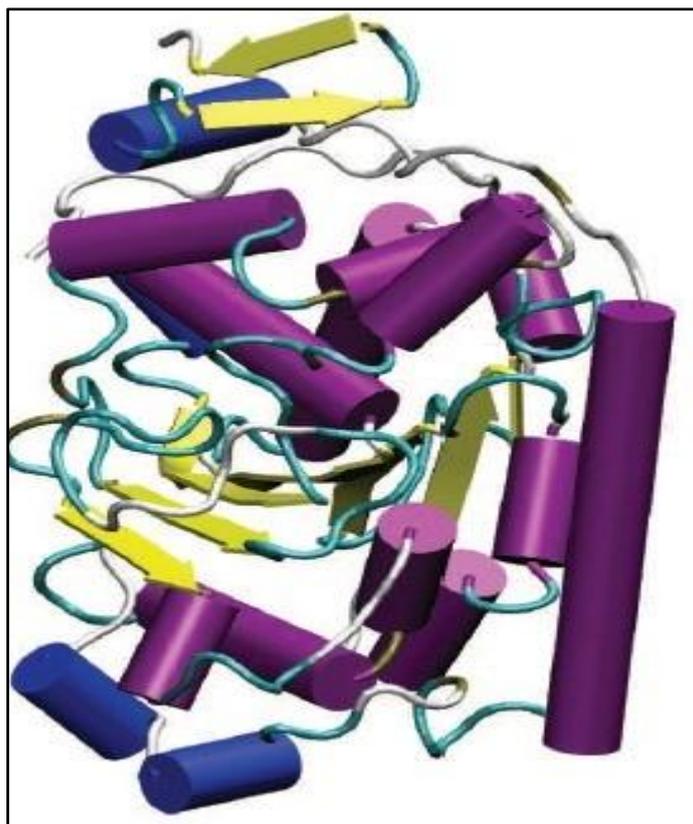


Figure 08: Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase) .le feuillet beta en jaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha 3_{10} en bleu, et les motifs 'turn' en cyan (chapot, 2012).

3.2 Mode d'action des lipases

Le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice à amphiphile et d'une quinzaine d'acide aminés qui agit comme un volet ; lorsque l'hélice alpha recouvre le site actif l'enzyme, il est donc dans sa forme fermée ou inactive (Fickers et *al.*, 2008).

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme, suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y'a un déplacement de l'hélice constituant le volet, la face hydrophobe de l'hélice orientée au pare avant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant créé une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau/corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible aux substrats (Reis et *al.*, 2008). Les analyses cristallographiques ont mis en évidence l'absence de hélice amphiphile recouvrant le site actif ; ces lipases sont classées comme étant des estérases bien qu'étant capables d'hydrolyser des triglycérides à longues chaînes d'acides gras insolubles en phase aqueuse (Scharg et Cygler, 1993).

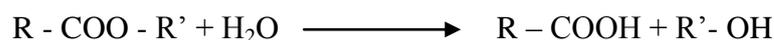
Certaines autres lipases mettent en œuvre des activités très complexes avec l'intervention d'une Co lipase pour assurer la fixation de l'enzyme sur le substrat, le mécanisme d'activation inter-faciale est dans ce cas sujet à controverse ; Ce système est activé dans l'eau avant de rejoindre l'interface (**Fickers et al., 2008**).

3.3 Types des lipases

Les lipases possèdent plusieurs types catalysant un grand nombre de réaction allant de l'hydrolyse à l'estérification sans oublier les réactions d'alcoololyse et d'acidolyse (**Rihani, 2012 ; Alloue et al., 2008a**).

3.3.1 Réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras permet la conversion de ces derniers en alcool gras (**Jaeger et al., 1999**). Par exemple la lipase de *Penicillium requeforti* est spécifique des acides gras à courte chaîne (**Rihani, 2012**).



3.3.2 Réaction de synthèse

Les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters dont la quantité d'eau du milieu détermine le type de la réaction favorisée, par exemple la lipase de *Geotrichum candidum* est spécifique des acides cis-9 insaturés et ceci quel que soit leur position (**Rihani, 2012**).

3.3.2.1 La transestérification : Elle implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoololyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) ; ou par l'interestérification (**Reis, 2008 ; Alloue et al., 2008a**).

3.3.2.2 Interstérification : Lors de la réaction, un groupe acyle est transféré à un acide gras ou à un ester d'acide gras (**Jaeger et al., 1999**). Comme le cas de la lipase de *Rhizomucor miehei* (**Alloue et al., 2008a**).



3.3.2.3 Alcoololyse : C'est une réaction d'un ester avec un alcool monovalent (l'éthanol et butanol) ou un alcool polyvalent (la glycérine) pour produire un ester avec des différentes

groupes d'alkyl (**Alloue, 2008 ; Gunstone, 1999**). L'action de la lipase de *Rhizopus arrhizus* vis-à-vis des esters d'alcools primaires en position sn1 et sn3 des triglycérides (**Rihani, 2012**).



3.3.2.4 Acidolyse : C'est une réaction d'un ester avec un acide qui mène un changement de groupe acyle transféré à un acide gras ; par exemple la lipase de *Candida antarctica* agit sur le groupement acyle (**Gunstone, 1999**).



4. Origine des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses ; on les retrouve chez de nombreux organismes vivants (**Gilhan et Lehner, 2005**).

4.1 Origine Animale

Les lipases animales représentent une source énergétique essentielle et avantageuse qui intervient dans le contrôle, de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses ; elles se divisent en trois grands groupes.

4.1.1 Les lipases gastriques

Secrétées par la muqueuse gastrique et hydrolysent les lipides alimentaires dans l'estomac (**Chahinian and sarda, 2009 ; Fickers et al., 2008**).

4.1.2 Les lipases pancréatiques

Secrétées dans le duodénum ; responsable de la digestion des lipides alimentaires (**Gargouri et al., 1984**).

4.1.3 Les lipases hépatiques

Jouent un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines où elles sont capables d'hydrolyser les glycérides ; les phospholipides et les esters de cholestérol (**Fickers et al ; 2008a**).

4.2 Origine Végétale

Les lipases se trouvent au sein de la plante, principalement dans les graines où les trilycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (**Fickers et al., 2007 ; Casas goday et al., 2012**). Ces derniers contiennent des lipases capables d'être utilisées dans la biotransformation des lipides dans les domaines suivants la papeteries, l'oléochimie, la farine de blé et les huiles essentielle (**Wilfried et al., 2011**).

4.3 Origine Microbienne

Les lipases sont largement répondues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux ; L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années principalement en raison du grand nombre d'application qu'elles offrent dans les domaines très variée (**Rihani, 2012**). Ces lipases possèdent des procédés de fabrication simples avec une grande stabilité vis-à-vis la température, les détergents et les enzymes protéolytiques (**Jaeger et al., 1994**).

4.3.1 Origine bactérienne

Les bactéries répondues dans la production de lipases sont plusieurs, et vu que la classification des microorganismes peut changer à l'issue de nouvelles découvertes taxonomique ; le nom des lipases microbiennes souvent été modifié à titre d'exemple la lipase de *Pseudomonas fluorescens* est devenue lipase de *Pseudomonas cepaci* ; la lipase de *Candida cylindracea* est devenue lipase de *Candida rugosa* (**Najjar, 2010**). La lipase de *Serratia marcescens* est utilisée pour la production de Méthyl-glycidate, employée dans la synthèse d'un antagoniste du calcium (**Rihani, 2012**).

Dans le domaine laitier, on utilise *Pseudomonas fluorescens* pour la variation du gouts et de l'odeurs qu'elle donne au lait (**Alifax, 1972**).

4.3.2 Origine fongique

Le corps gras ; s'ils se trouvent en contact avec des moisissures, quand il s'agit d'espèces lipolytiques peuvent être l'objet d'altération de diverses natures ; ces moisissures possèdent dans leur équipement enzymatique une lipoxygénase des liaisons éthyléniques des acides gras insaturée. (**Alifaxe, 1975**).

Les cutinases sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et estérases produit par *Fusarium solani* qui responsable de la formation de Mycétome chez l'homme (**Hasen et al., 2006; Fickers et al., 2008**).

La lipase de *Yarrowia lipolytica* est en cours de développement au centre wallon de biologie industrielle et son application qui intéresse le secteur clinique (**Alloue et al., 2008 b**).

La lipase de *Mucor javanicus*, utilisée dans l'extraction et le fractionnement des huiles marines extraites à partir des poissons et des algues, conduit à une diversité de molécule d'acylglycéroles et trouvent de nombreuses applications dans le domaine agroalimentaire et de la santé (**Linder et al., 2004**).

5. Intérêt industriel des lipases

Les lipases sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel ,cet intérêt provient principalement du fait que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique d'une part, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre par les produits relativement simple ; leur domaines d'application sont donc très vastes et variés.(**Rihani, 2012**).

5.1 Application dans les détergents

L'utilisation des lipases dans les détergents est le champ d'application le plus important de ces enzymes. La lipase produite par *Pseudomonas mendocina* appelée 'lumafast' possède un large spectre de substrat et elle est capable de tolérer les conditions de lavage, telle que les valeurs de pH 10 et11, température de 30 à 60°C ; une fois que les lipides sont partiellement ou totalement hydrolysée par l'enzyme, ils deviennent plus facile à extraire du tissu lavé (**Najjar, 2010**).

5.2 Application dans l'industrie alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytique additionnelle ont été décrites pour les lipases microbiennes y compris le développement de stem pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acide gras, ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur, dans l'industrie agro-alimentaire. Les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en

biscuiterie, en chocolaterie (**Boukaa, 2015**). Elles ont aussi une application dans le domaine de développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré gastrique ou microbienne), comme les lipases de *Candida antarctica* et de *Rhizomucor miehei* synthétise des arômes par réaction de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7 octadien-1-ol qui présente un arôme de Rose (**Fickers et al., 2008**). Les lipases sont aussi utilisées dans le secteur des farines de blé pour renforcer les pâtes et dans le beurre de cacao (**Jaeger et al., 1994 ; Jeager et Reetz, 1998 ; Sherma et al., 2001**).

5.3 Application en l'oléo-chimie

La transformation des corps gras est encore majoritairement réalisée par des procédés chimiques consommant beaucoup d'énergie (**Vulfson, 1994**). Ce qui a conduit à de nombreux procédés utilisant des lipases qui ont été développés pour pouvoir travailler dans des conditions moins drastiques et plus spécifique en utilisant par exemple la lipase produite par *Candida rugosa* (**Najjar, 2010**).

5.4 Application dans l'industrie du papier

A l'heure actuelle le premier ennemi dans l'industrie est la poix, mélange mou et collant à base de résine et de goudron végétale, qui nuit à la qualité du papier ; le développement d'un procédé d'hydrolyse de ces esters par additions de lipases, comme le cas de la lipase de *Bacillus subtilis*, limite le problème posé ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier (**Najjar, 2010**).

5.5 Application dans l'environnement

Les lipases sont également utilisées en environnement dans le domaine de la bioremédiation qui est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués à l'exemple de lipases végétales utilisées contre les effluents des industries agroalimentaire riche en lipides et en graisses ; ces dernières entraînent le colmatage des canalisations. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures (**Boukaa, 2015**).

1. Moisissures

Les moisissures utilisées, en nombre de huit, appartiennent à la collection du laboratoire de Biologie et Environnement (LBE). Université des Frères Mentouri. Constantine.

Les souches mycéliennes appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* et elles ont les codes suivants :

- *Penicillium* : Gs11, Gs8, Gs15, Gs6.
- *Aspergillus* : Vs1, 1s1, Gs10.
- *Aureobasidium* : Gs7.

2. Croissance sur milieu synthétique

2.1 Croissance sur MEA (Malt Extrat Agar) : Les pré-cultures sont réalisées par l'ensemencement, sur milieu MEA (Annexe 1), sur boîte de Pétri, à l'aide d'une anse de platine stérile par touche centrale. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 25°C pendant 6 jours.

2.2 Croissance sur MEB (Malt Extrat Broth) : Les moisissures sont cultivées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de bouillon malté (Annexe 2). Les milieux sont inoculés par 3 disques de chaque pré-culture, préparé sur MEA, et incubés dans un incubateur à agitation orbitale de 150 rpm à 25°C. Plusieurs cultures de 50ml sont réalisées en parallèle mais arrêtées à différents temps (chaque 24 heures) afin de suivre le développement de la biomasse cellulaire et l'activité lipolytique de chaque souche.

3. Croissance sur déchet d'olive

Pour la production de lipase, le choix d'un milieu de fermentation approprié est essentiel pour la souche choisie, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes pour cela on a choisi un milieu de production à base de déchet d'olive ; Ce substrat végétal est constitué essentiellement des triglycérides et des acides gras et un grand nombre d'autres composants qui permettent à la moisissure de produire l'enzyme lipolytique en dégradant le déchet.

3.1 Croissance sur milieu solide

Pour mettre en évidence la capacité des moisissures à dégrader le déchet d'olive on a effectué un ensemencement par touche centrale à partir de chaque isolat, en utilisant différentes dilutions du déchet allant de 15% à 100% ; Enfin on incube les milieux de culture solide dans une étuve à 25° C durant 15 jours.

3.2 Croissance sur milieu liquide (MB)

Le milieu exclusivement composé de déchets d'olive à 50%, réparti à raison de 50 ml dans des Erlen de 250 ml et incubé à 25° C / 12 jrs dans un incubateur-agitateur à 150 rpm ; Ce milieu de base (MB) est utilisé pour l'optimisation de la production de lipase.

4. Optimisation de la production de lipase

4.1 Effet de l'inoculum : Pour contrôler l'effet de l'inoculum, on a ensemencé les milieux de culture (MB) par différents nombre de disque (1, 2, 4, 5,6 et 7 disques) à partir de milieu solide à base de déchet d'olive.

4.2 Effet de la lumière et de l'agitation : Pour suivre l'influence de la lumière, on va réaliser :

- Une culture de MB en Erlen couvert de papier aluminium avec agitation
- Une culture de MB en Erlen couvert de papier aluminium sans agitation (incubé dans une étuve à 25°C).
- Une culture de MB en Erlen sans couverture du papier aluminium et sans agitation.

4.3 Effet des ions : Les milieux de culture (MB) sont additionnés des ions CuSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CaSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , KSO_4 et NaSO_4 à une concentration de 1mM.

4.4 Effet des dilutions sur milieu liquide : Des différentes concentrations de milieu de cultures à base de déchets d'olive (15, 30, 50, 75, 100%) ont été préparées et inoculées, afin d'étudier leur effet sur l'activité lipolytique.

4.5 Effet du NaCl : C'est un paramètre qui permet de déterminer l'origine de l'effet dépressif osmotique, dans ce cadre, chaque milieu de culture liquide (MB) est préparé avec différentes concentrations de Na Cl (3, 6, 10, 15 et 20%).

4.6 Effet du pH : L'activité est déterminée à des valeurs de pH allant de 4 à 9 en utilisant différents tampons à une concentration de 0.2M sur le MB :

- tampon Acétate (pH 4)
- tampon phosphate (pH6), (pH 7), (pH 8)
- tampon borate (pH 9).

4.7 Effet de la source d'azote : Les milieux de culture (MB) sont additionnés de 2g/l des substances à base d'azote organique (extrait de levure, tryptone, peptone, hydrolysate de caséine, urée) ou minéral $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$.

4.8 Effet de la source de carbone : On ajoute dans chaque culture sur MB des sucres (glucose, lactose, saccharose, fructose, amidon, dextrine) à une concentration de 1 g/l

4.9 Effet des Alcools : Les milieux de culture (MB) sont enrichis avec des Alcools (Ethanol, Pyrogallol, Gaïacol) à une concentration de 1 m mol.

5. Méthodes analytiques

5.1 La biomasse

Après l'incubation, la biomasse est séparée par filtration sur papier Whatman n°1, le poids sec est déterminé après séchage dans une étuve à 70°C, jusqu'à poids constant pour chaque souche.

5.2 Détermination de l'activité lipolytique des souches

L'activité enzymatique est due à l'acidité d'huile d'olive en présence des acides gras libres qui cèdent leurs protons H^+ dans le milieu.

Le mélange réactionnel contient 1,25ml d'huile d'olive avec 1,75 ml de tampon de phosphate (0,1M) et 1 ml d'extrait enzymatique, le mélange est incubé dans un bain Marie à une température de 37°C pendant 20 min, puis on ajoute 5 ml d'éthanol pour stopper la réaction, Enfin on titre le mélange avec une solution de KOH (0,05N), en présence de phénol phtaléine comme indicateur coloré de pH; l'apparition de la coloration rose marque la fin de la réaction.

Les résultats des volumes obtenus de l'acidité sont conventionnellement exprimés en activité lipolytique.

1. Etude cinétique des souches

Pour la production de biomasse et de lipase, on a utilisé un milieu de culture liquide, le MEB à pH 5, 25°C et 150rpm .

Après avoir, chaque jour, récupérer la biomasse et le filtrat qui représente l'extrait enzymatique, on a effectué le dosage enzymatique par titration acide /base de ce dernier ; Les résultats obtenus sont représentés, sous forme de graphe, dans les figures 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.

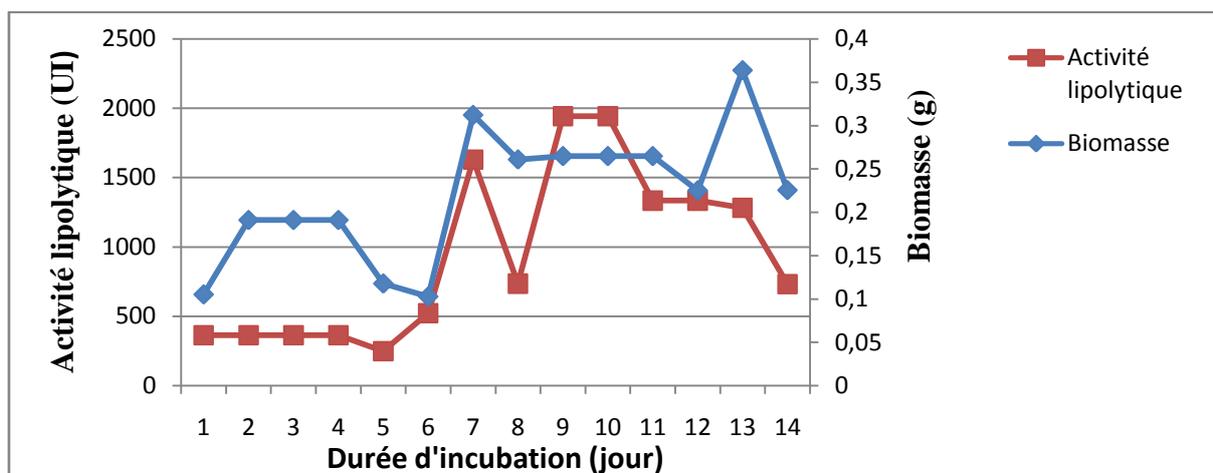


Figure 09 : Cinétique de production de lipase de la souche A1s1.

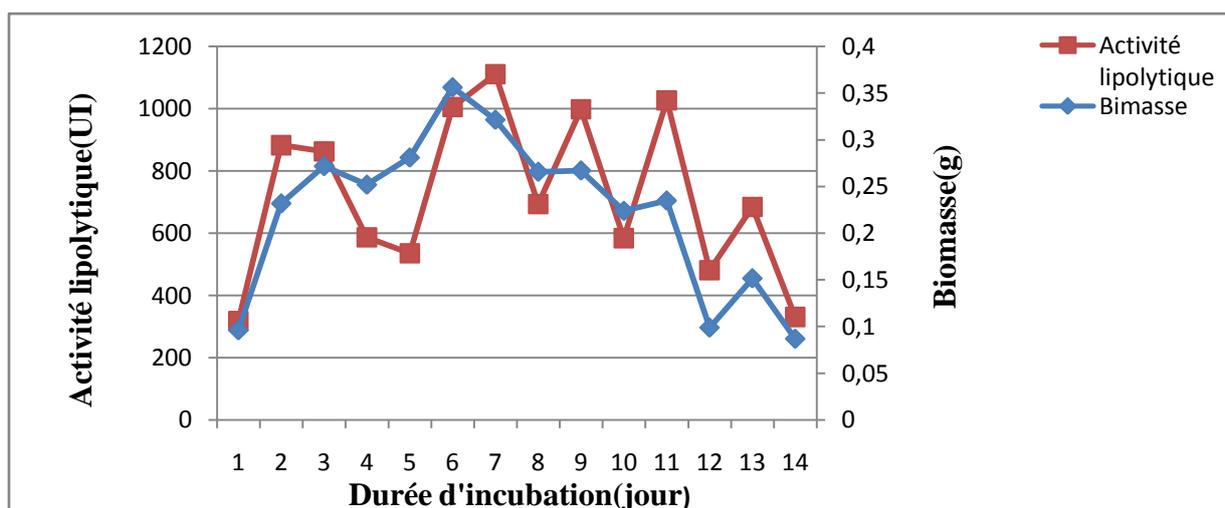


Figure10 : Cinétique de production de lipase de la souche AVs1.

La biomasse de la souche A1S1 augmente par rapport à la durée d'incubation jusqu'à atteindre le sommet au 13^{ème} jour, ce qui veut dire qu'elle a utilisé les nutriments du milieu pour croître ; cependant l'activité lipolytique est faible avec un pic au 10^{ème} jour. (Figure 09).

La souche AVs1 possède une croissance rapide prouvée par une biomasse qui atteint 0,3214g en 6^{ème} jours d'incubation (figure10) ; l'activité lipolytique était relativement faible au début mais elle a abouti un degré maximale (1110,27UI) au 7^{ème} jour d'incubation ; Cette souche possède un métabolite dépendant car la biomasse et l'activité lipolytique ont une relation proportionnelle ce qui signifie que l'un des paramètres dépend de l'autre.

La souche Ps6 s'adapte progressivement avec le milieu ; sa croissance s'observe avec des rebondissements jusqu'à obtention d'une valeur maximale au 10^{ème} jour de 0,3436g de même pour son activité lipolytique qui a abouti son pic au 7^{ème} jour de 1508,81UI. (figure11).

La figure 12 montre que la souche Ars7 possède une adaptation moyenne prouvée par l'augmentation de sa biomasse par rapport au jour d'incubation puisqu'elle à atteint 0,4373g le 9^{ème} jour, tandis que l'activité lipolytique atteint son maximum à la fin de l'incubation 13^{ème} jours d'une valeur de 1175,22 UI.

La biomasse des deux souches Ps15, Ps8 (figure13 et 14) s'accroît par rapport à la durée d'incubation jusqu'à atteindre le sommet au 5^{ème} et 6^{ème} jour 0,4279g 0,3801g, tandis que l'activité lipolytique a atteint le pic au 11^{ème} et 13^{ème} jour d'incubation d'une valeur de 1261.47 UI et 1475,88UI.

Selon les figures 15 et 16 on constate que les deux souches As16 et Ps11 ont une adaptation très lente tout au long de la première semaine avec une biomasse et une activité lipolytique faible jusqu'au 6^{ème} et 7^{ème} jour où elles atteints les pics 0,4258g et 870,54UI, 0,3343g et 2215,4UI pour les souches As16 et Ps11 respectivement.

A la fin des fermentations, la production de biomasse et de l'activité lipolytique des huit souches diminuent brutalement. Ceci est probablement dû à l'influence de différents facteurs physicochimiques qui deviennent défavorables à leur croissance et par conséquent à la production de lipase et de son activité ; tels que l'épuisement du substrat, la diminution du pH, la production des inhibiteurs (**Ghosh *et al.*, 1996**).

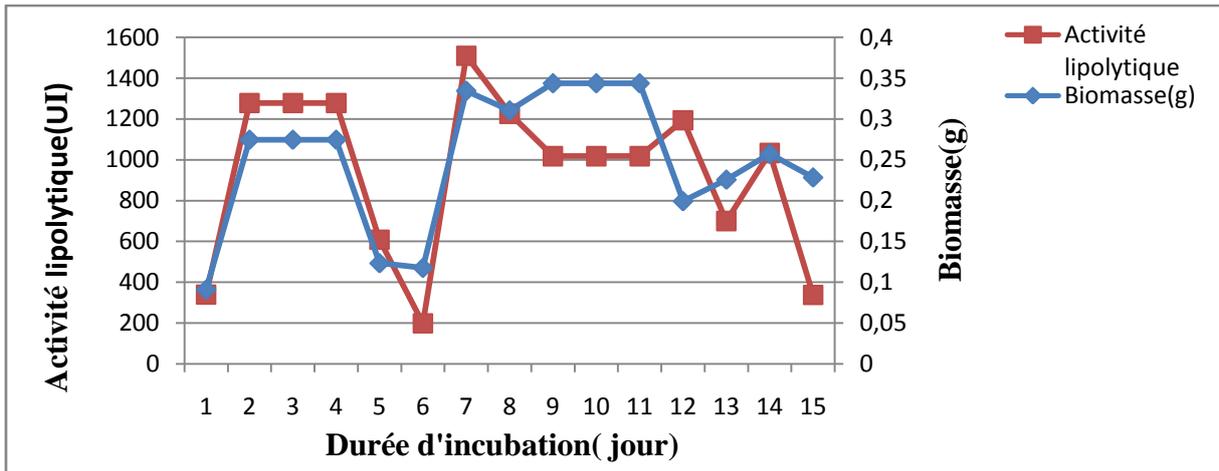


Figure11: Cinétique de production de lipase de la souche Ps6.

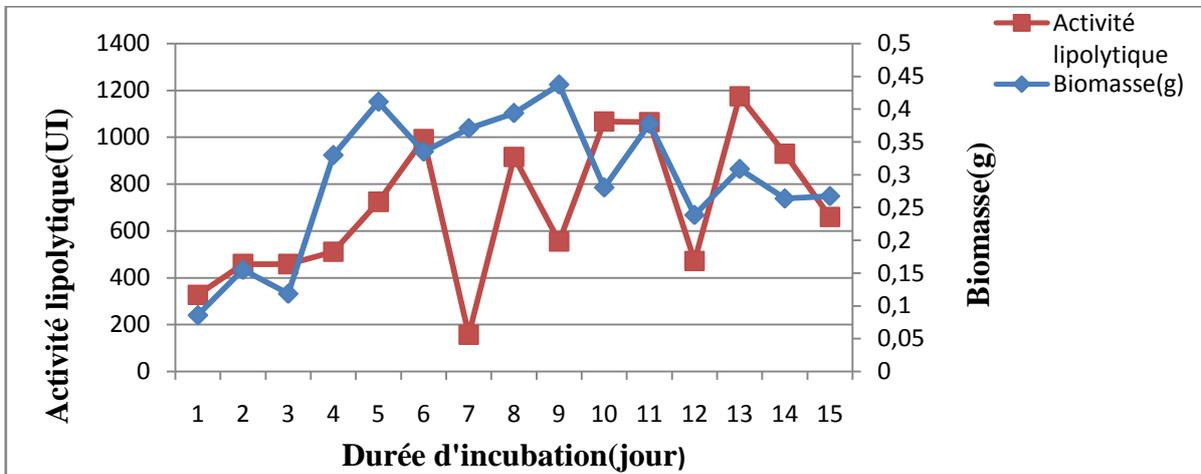


Figure12 : Cinétique de production de lipase de la souche Ars7.

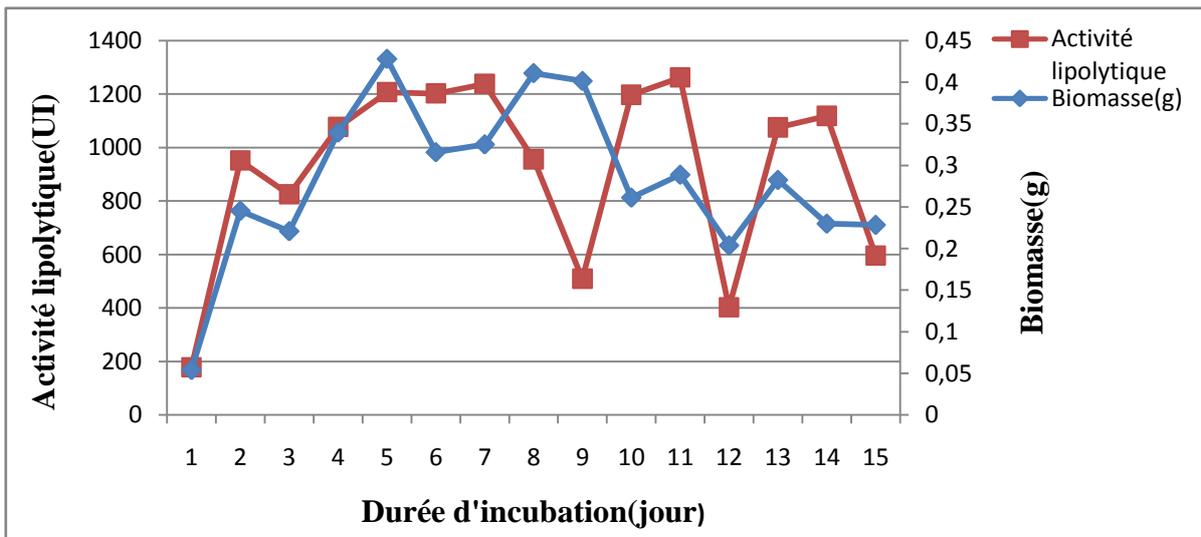


Figure13: Cinétique de production de lipase de la souche Ps15.

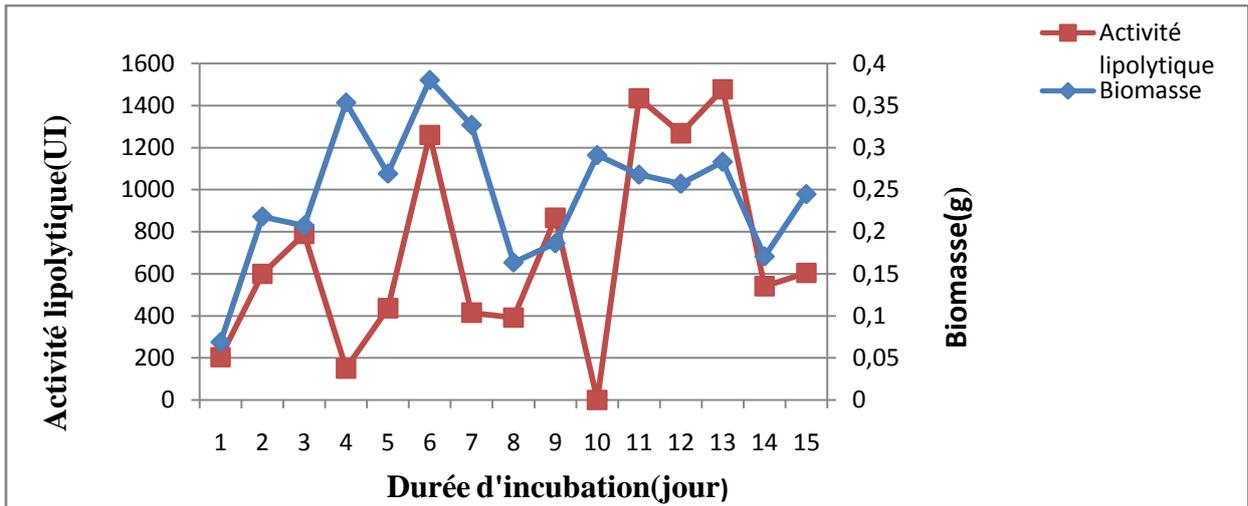


Figure14 : Cinétique de production de lipase de la souche Ps8.

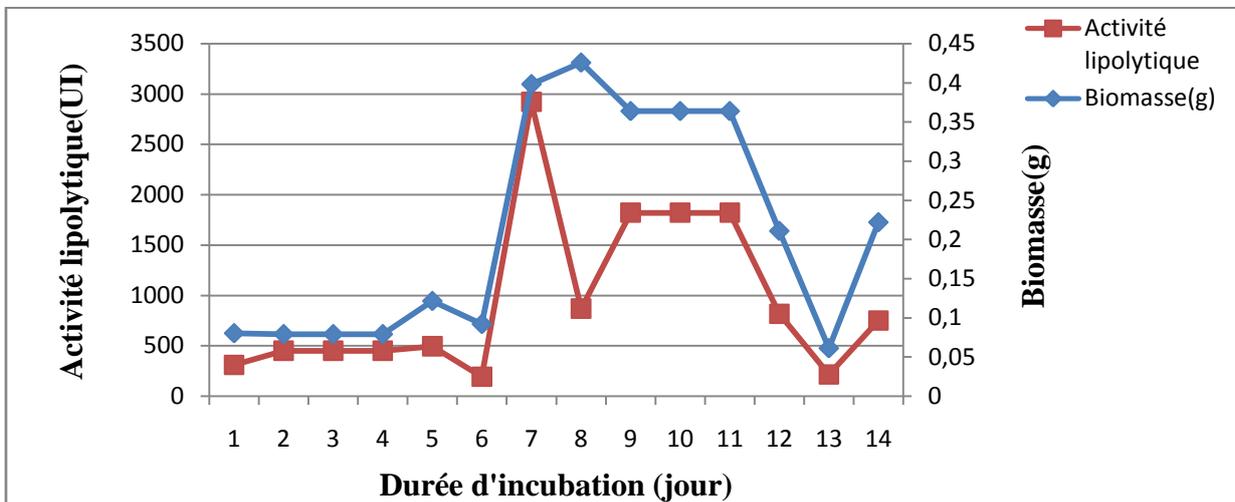


Figure15 : Cinétique de production de lipase de la souche As16.

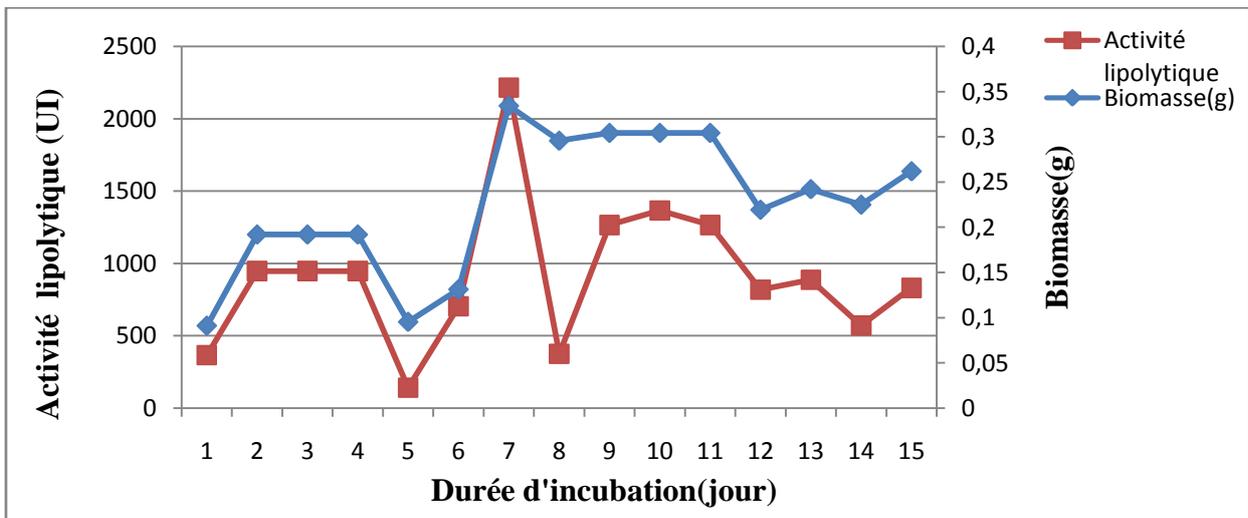


Figure16 : Cinétique de production de lipase de la souche Ps11.

Cette étude a montré que pour plusieurs souches (AVs1, A1s1, As16, Ps11, Ps6, Ps8), l'activité lipolytique est en relation avec la biomasse (métabolite associé) tandis que pour d'autre, elle est semi associé (Ars7, Ps15) ; ceci peut s'expliquer par l'influence de différents lipides sur la vitesse de croissance de ces champignons et leur production enzymatique. La souche AVs1 possède une vitesse de croissance rapide, avec 0,3562g en 6 jours, associé à une production de lipase mais d'après **Lopez et Antonio (1998)**, il a été montré que la souche *Aspergillus* présente une vitesse plus faible, ce qui ne concorde pas avec les résultats obtenus sur la AVs1.

2. Capacité de dégradations du déchet d'olives

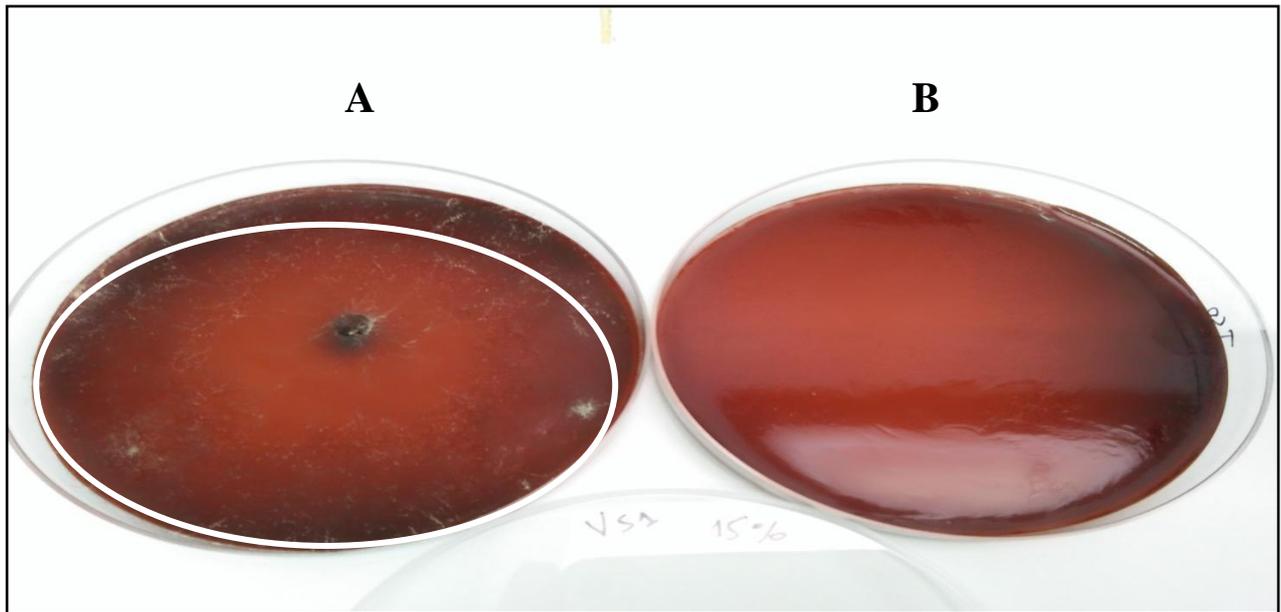
Tableau 02 : Diamètres de croissance et de dégradation du déchet sur boîte de Petri.

Les souches		Concentration	15%	30%	50%	75%	100%
		Vs1	Croissance	+++	++	+++	+++
	Diamètres (cm)	80	55	80	70	60	
S15	Croissance	++	+	++	+	+	
	Diamètres (cm)	< 1	0	0	< 1	0	
S8	Croissance	+++	++	+++	++	++	
	Diamètres (cm)	55	0	60	0	0	
S7	Croissance	++	+	+	++	++	
	Diamètres (cm)	< 1	0	0	< 1	< 1	

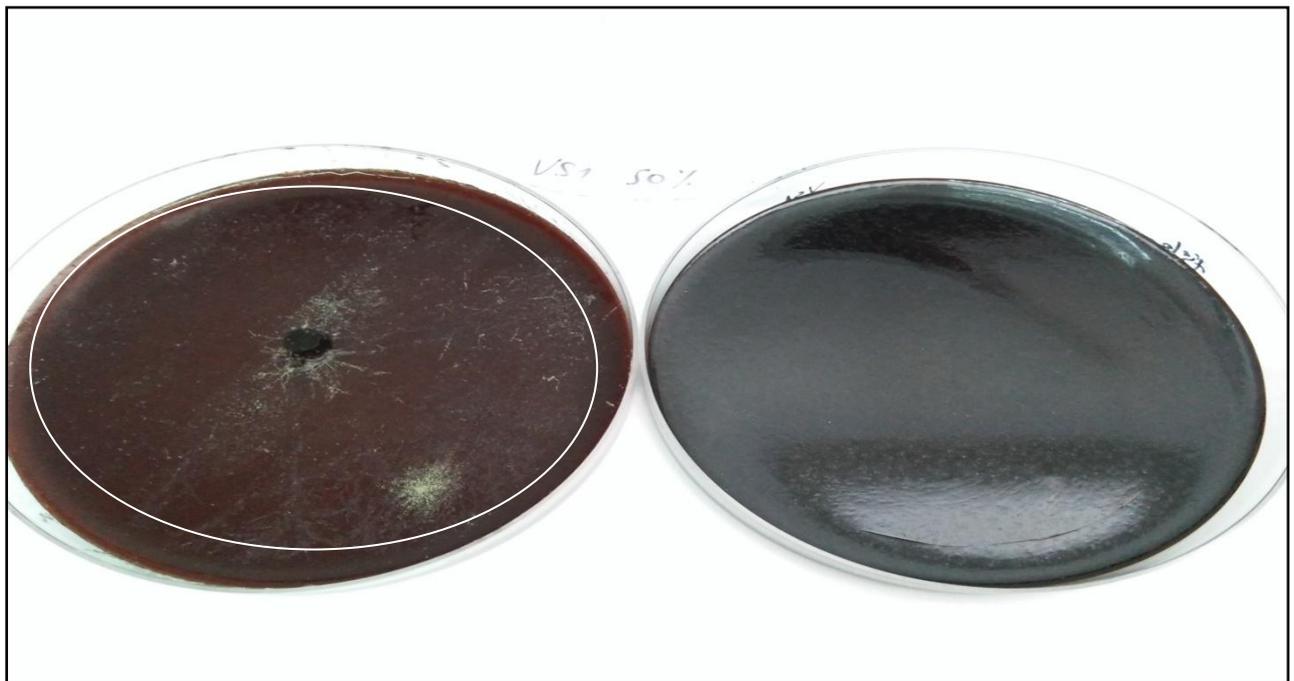
+++ : Une croissance forte.

++ : Une croissance moyenne.

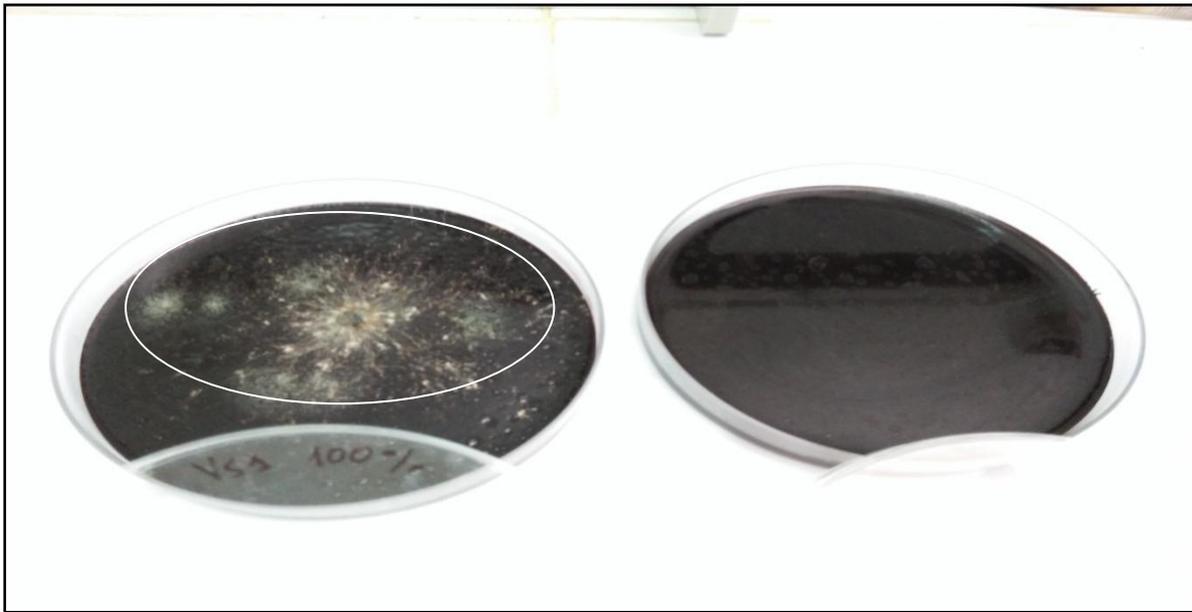
+ : Une croissance faible.



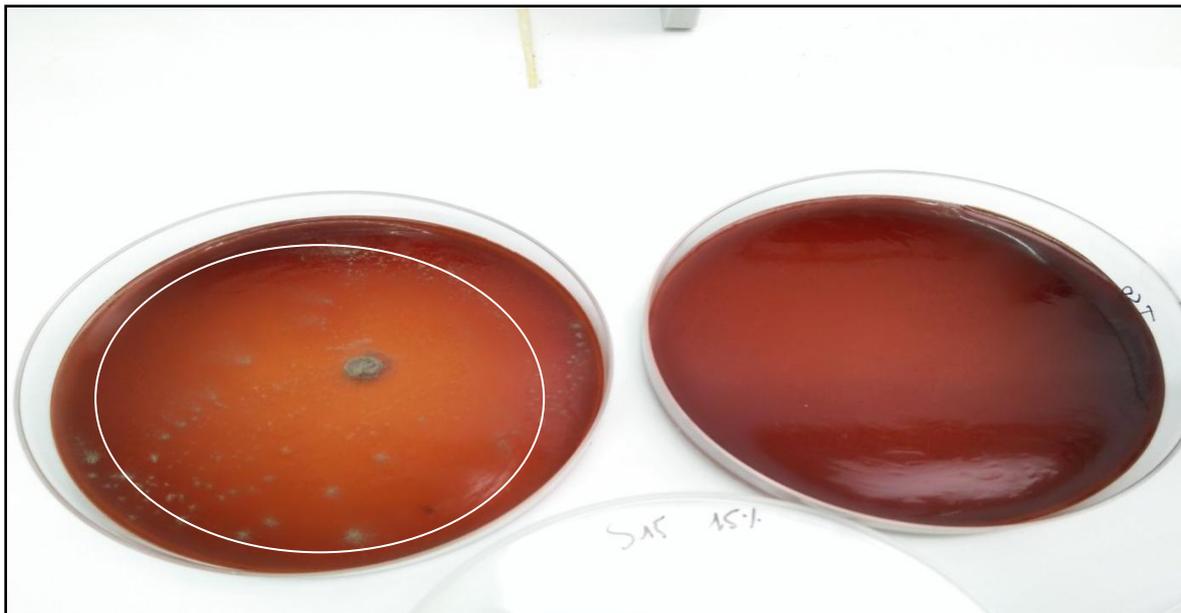
Photographie 1 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 15% (A : Boîte ensemencée ; B : Témoin)



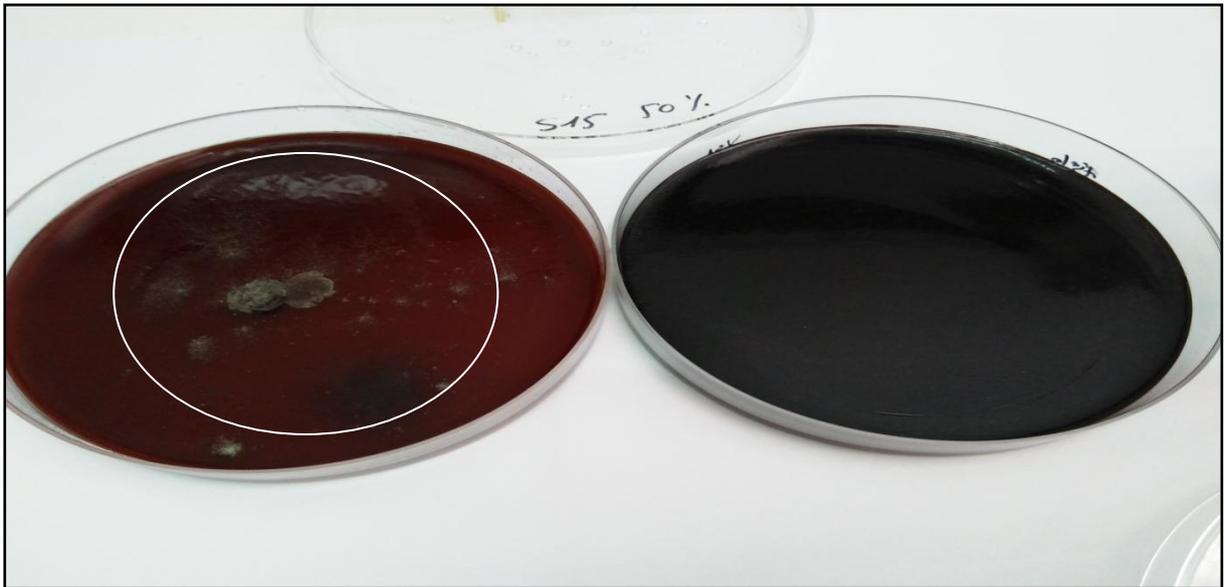
Photographie 2 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 50% (A : Boîte ensemencée ; B : Témoin).



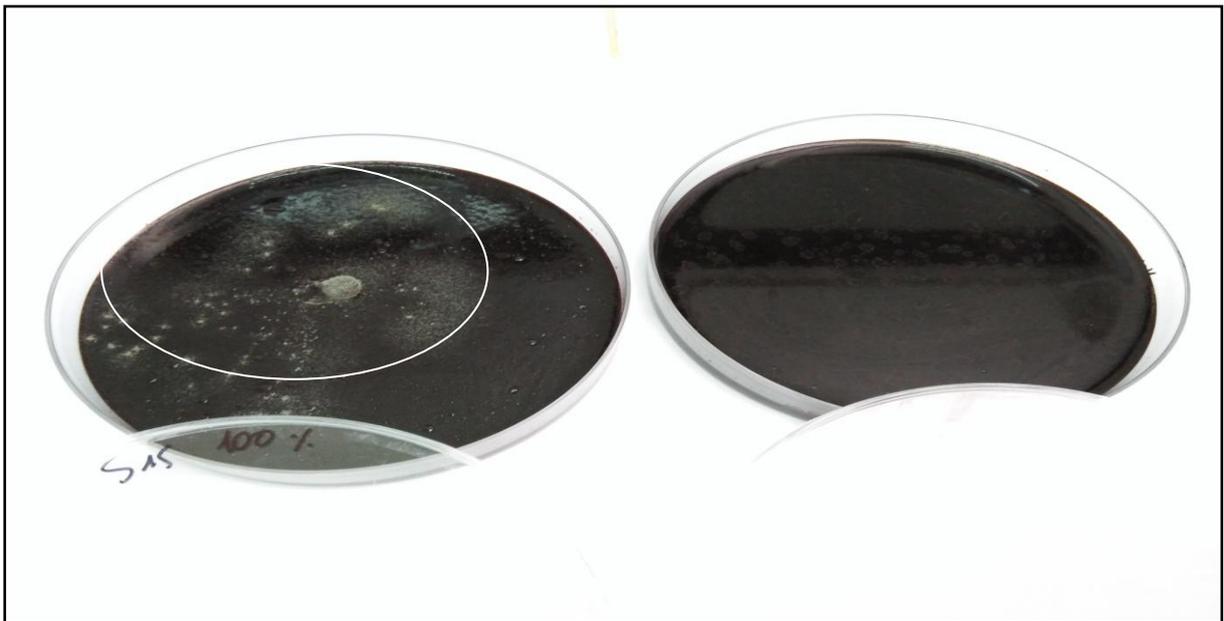
Photographie 3 : La souche AVs1 sur milieu à base de déchet à 100% (**A** : Boîteensemencée ; **B** : Témoin).



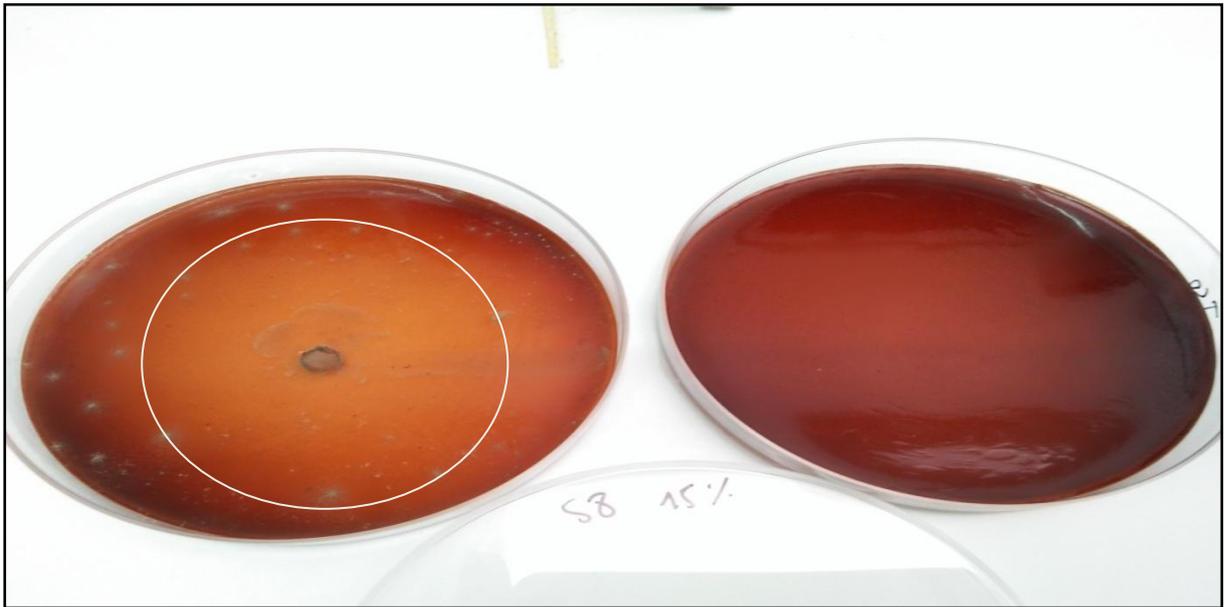
Photographie 4 : La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 15% (**A** : Boîteensemencée ; **B** : Témoin).



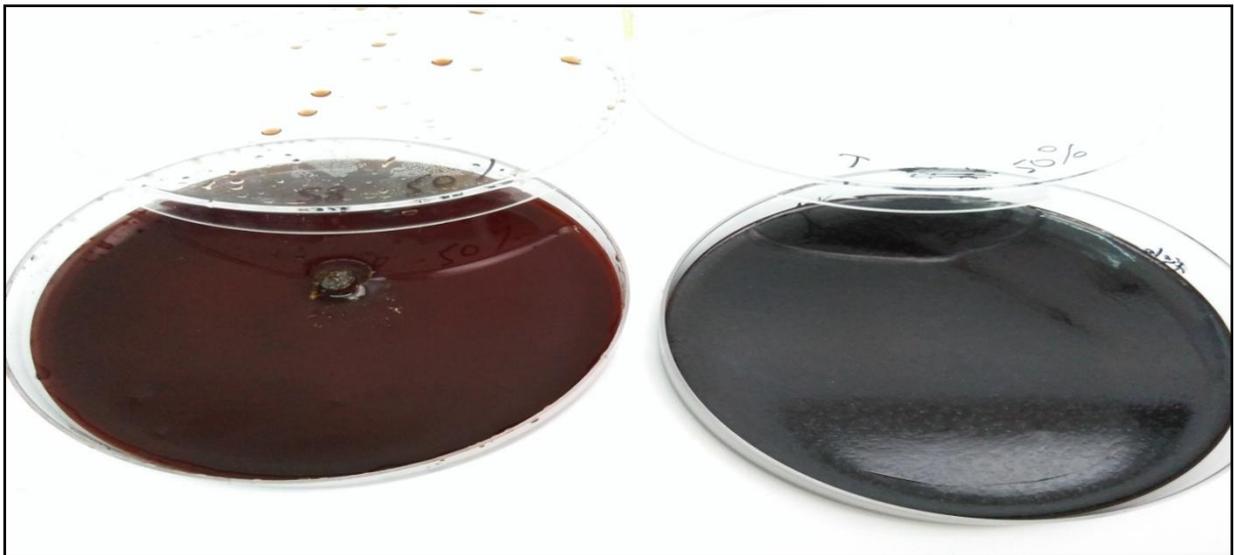
Photographie 5 : La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 50% (**A** : Boîte ensemencée ; **B** : Témoin).



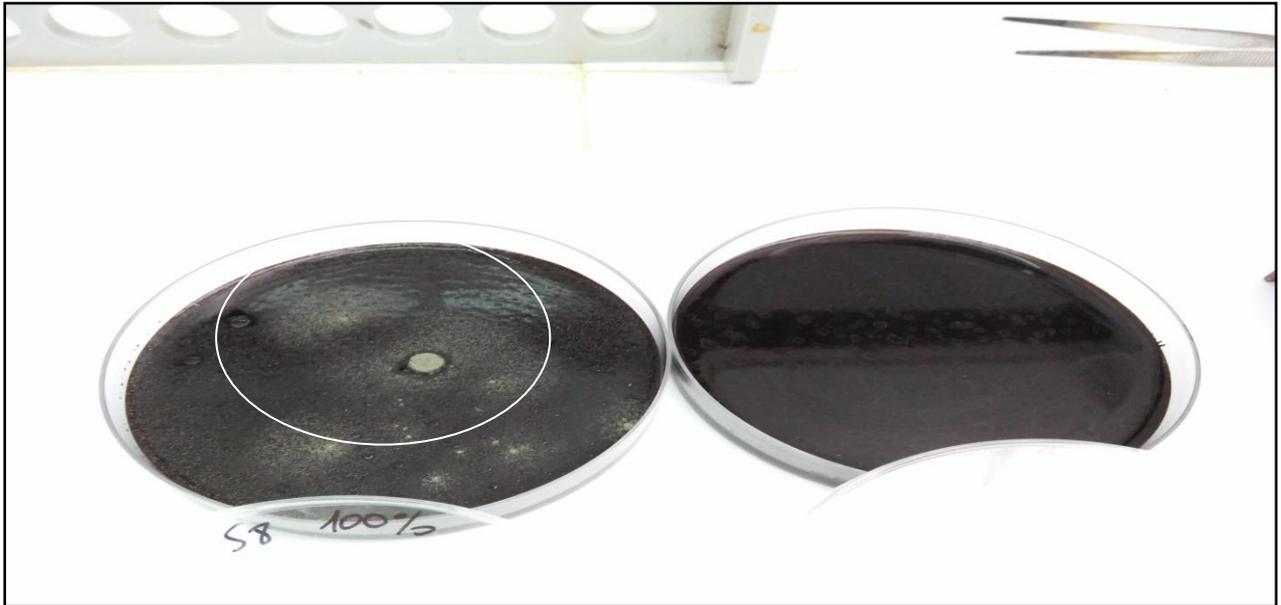
Photographie 6 : La souche Ps15 sur milieu à base de déchet à 100% (**A** : Boîte ensemencée ; **B** : Témoin).



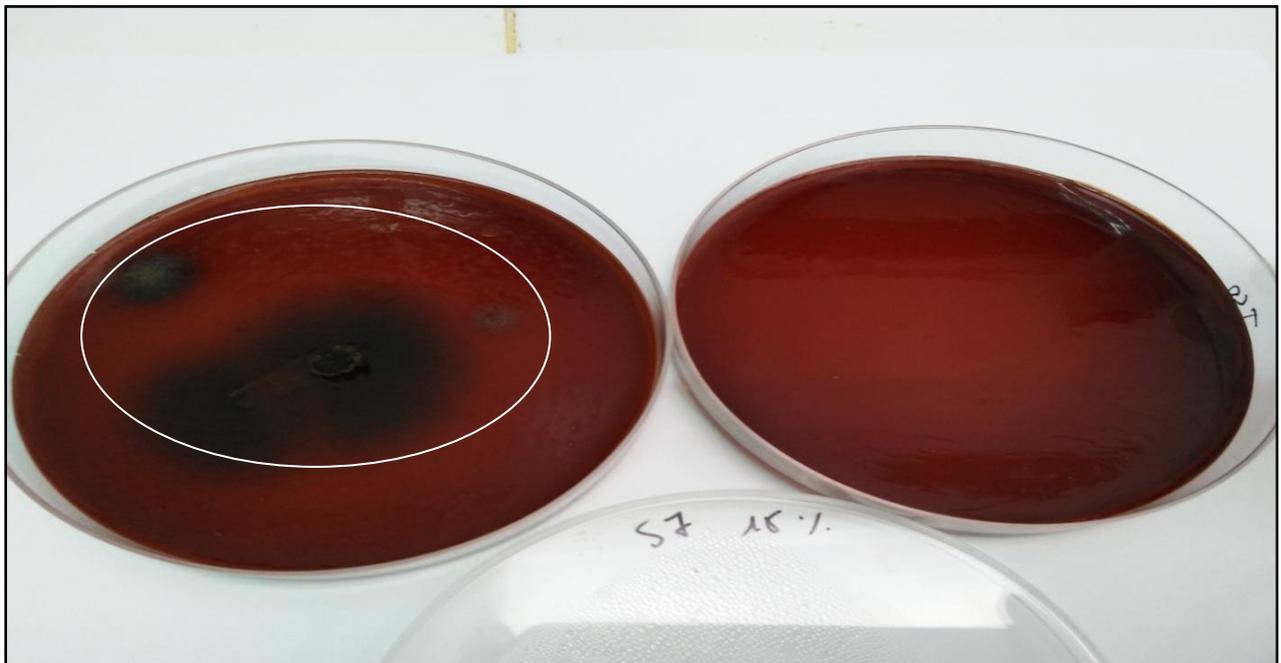
Photographie 7 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 15% (A : Boite ensemencée ; B : Témoin).



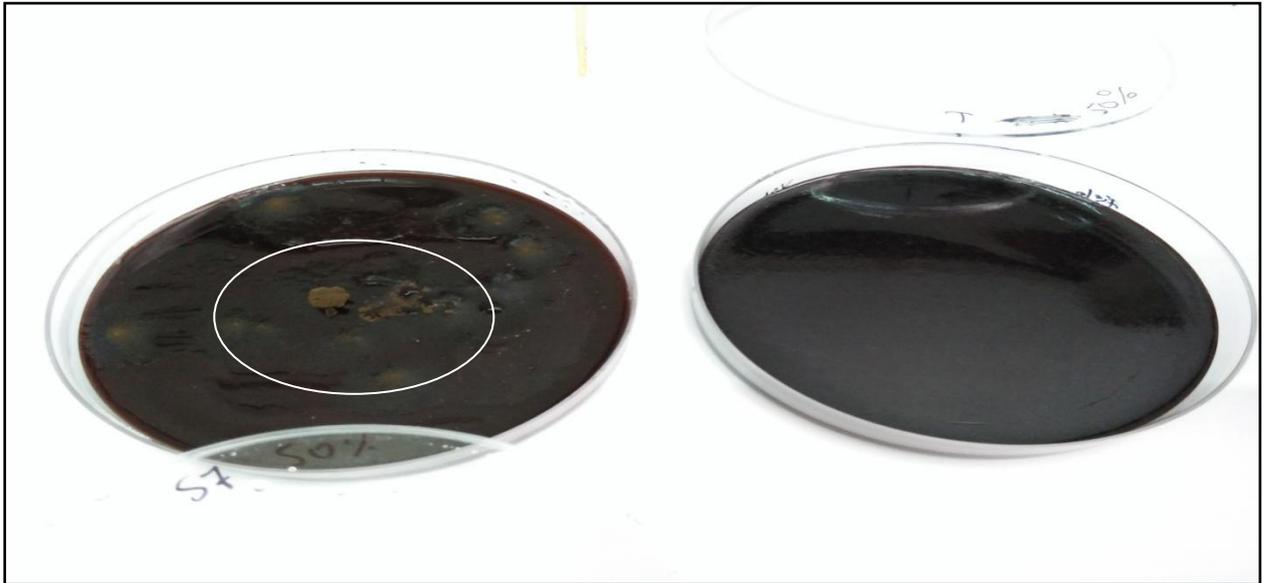
Photographie 8 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 50% (A : Boite ensemencée ; B : Témoin).



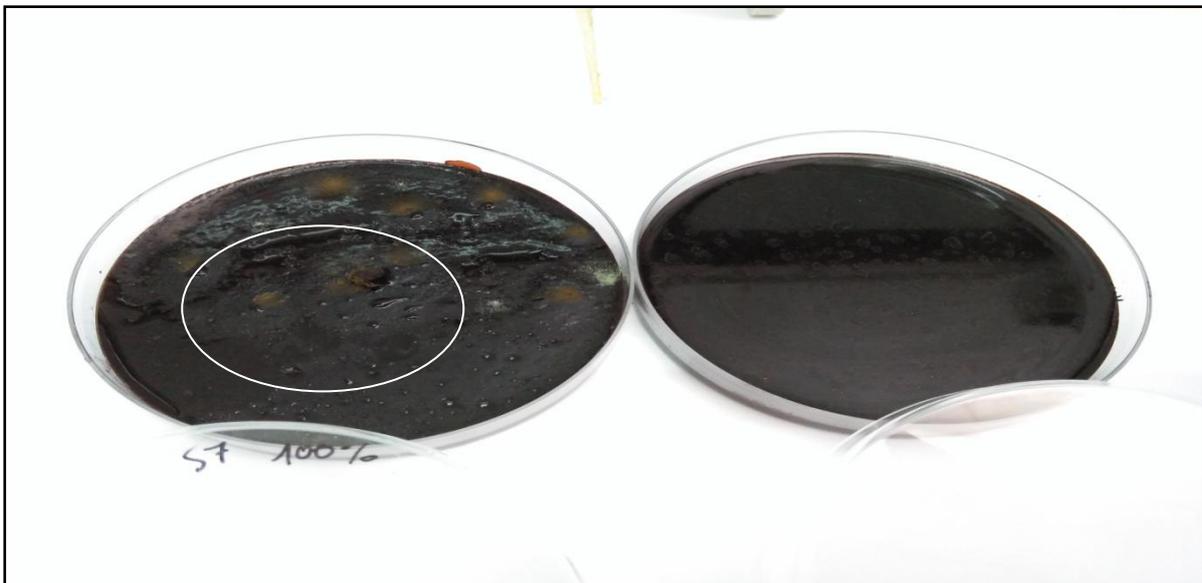
Photographie 9 : La souche Ps8 sur milieu à base de déchet à 100% (A : Boîteensemencée ; B : Témoin).



Photographie 10 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 15% (A : Boîteensemencée ; B : Témoin).



Photographie11 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 50% (A : Boiteensemencée ; B : Témoin).



Photographie12 : La souche Ars7 sur milieu à base de déchet à 100% (A : Boiteensemencée ; B : Témoin).

Parmi les huit souches isolées on a sélectionné les quatre souches les plus performantes (s7) (s8) (s15) (Avs1). Ces souches sont testées sur un milieu à base de déchet d'olive à différentes concentrations pour évaluer leur capacité à le dégrader.

Après l'incubation (à 25°C pendant 15 jours), on a observé des zones de dégradations (halo clair), de différentes dimensions, dû au bagage enzymatique nécessaire des souches et l'effet stimulant des corps gras qui composent le grignon d'olive (**Obrados et al ; 1993**) ; les résultats sont reportés dans le tableau 02 et les photographies 1,2,3 ,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12.

Les deux photographies (1 et 2) et le tableau 02 montrent Une croissance rapide et remarquable de la souche AVs1 dans toutes les concentrations par contre la dégradation du déchet (halo clair) est observé au niveau des concentrations 15 et 50% ; cette dernière a donné le plus grand diamètre.

Une croissance moyenne de la souche Ps15 dans les boîtes de toutes les concentrations mais la dégradation n'a été observé que dans la concentration 15 et 75 % avec un petit (tableau 02 et photographie 4).

Le tableau 02 et les photographies 7, 9, 10 et 12 montrent que les souches Ps8 et Ars7 sont d'une croissance très lente sauf que la souche s8 est envahissante dans toutes les boîtes tandis que la croissance de la souche s7 est limité qu'aux alentours de l'ensemencement ; Aussi la dégradation du déchet n'a été remarquée que dans les concentrations 15 et 100% sur la Ps8 et 15,75 et 100 % à un petit diamètre sur les contours de la colonie sur la Ars7.

D'après les résultats obtenus de la cinétique de production et de croissance des souches d'une part et la capacité de dégradations du déchet d'olives d'autre part, la souche Avs1 montre une meilleure production de lipase ainsi qu'une bonne dégradation du déchet ce qui à permis de la sélectionner pour la suite du travail.

3. Optimisation de la production de lipase

La production des lipases est influencée par la composition du milieu de fermentation (spécialement la source de carbone, d'azote et les sels minéraux), les facteurs physicochimiques (température, pH, densité d'inoculum) et le temps d'incubation.

La méthode adoptée dans cette étude d'optimisation est la technique d'un facteur à la fois (one factor at a time) basée sur la variation d'un seul facteur pendant que les autres facteurs sont gardés à des niveaux constants. Ce protocole permet d'évaluer l'effet individuel d'un

paramètre et d'incorporer par la suite sa valeur optimale avant de passer à l'optimisation du paramètre suivant (Kumar *et al.*, 2003; Wang et Wan, 2009).

La production et l'activité enzymatique sont sensiblement influencées par la composition du milieu (Merabat, 2006) ; aussi d'après Obrados *et al* (1993), les corps gras naturels ont un effet stimulant sur la production de lipase, dans ce contexte on a choisis le grignon d'olive pour l'optimisation sur milieu liquide puisque il contient une bonne proportion de matière grasse (37,5% de matière sèche) (Moussaoui et Youyou, 2005).

3.1 Etude de de l'effet de la quantité d'inoculum

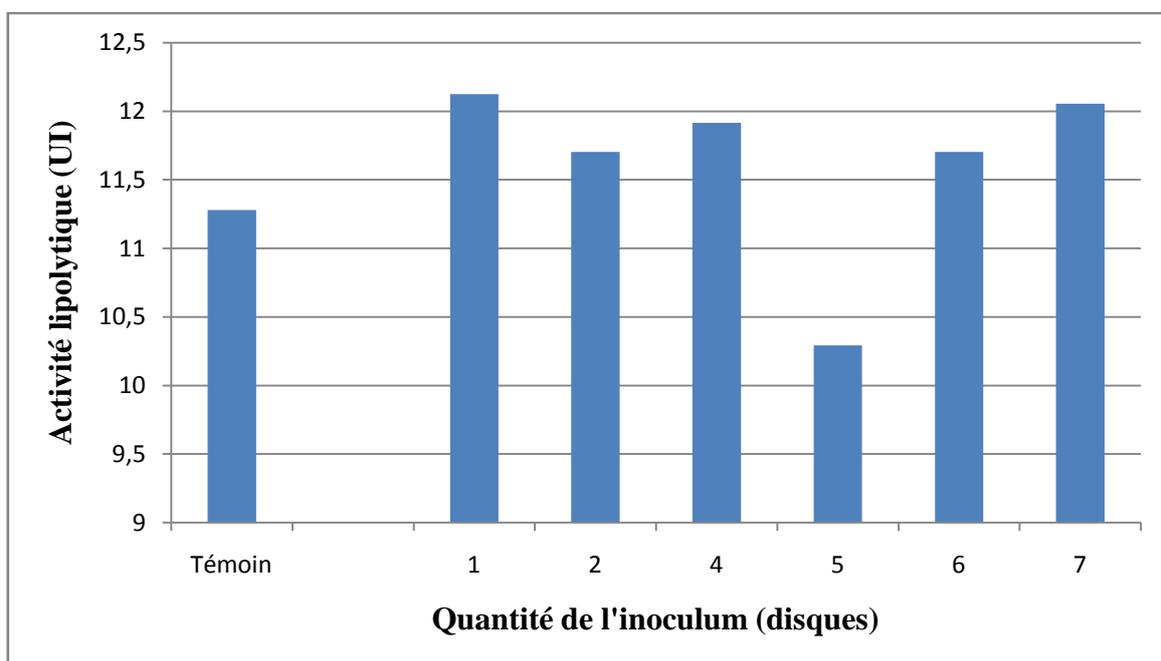


Figure 17 : l'effet de la quantité d'inoculum sur l'activité lipolytique.

D'après les résultats représentés dans la figure 17, la meilleure stimulation de l'activité lipolytique est celle qui a atteint les valeurs 12,126, 12,0555, 11,9145 et 11,703UI relatives aux quantités d'inoculum de un, sept, quatre, six et deux disques alors que la production de l'enzyme a diminué en présence de cinq disques à une valeur de 10,293 UI.

3.2 Etude de de l'effet de l'obscurité et de l'agitation

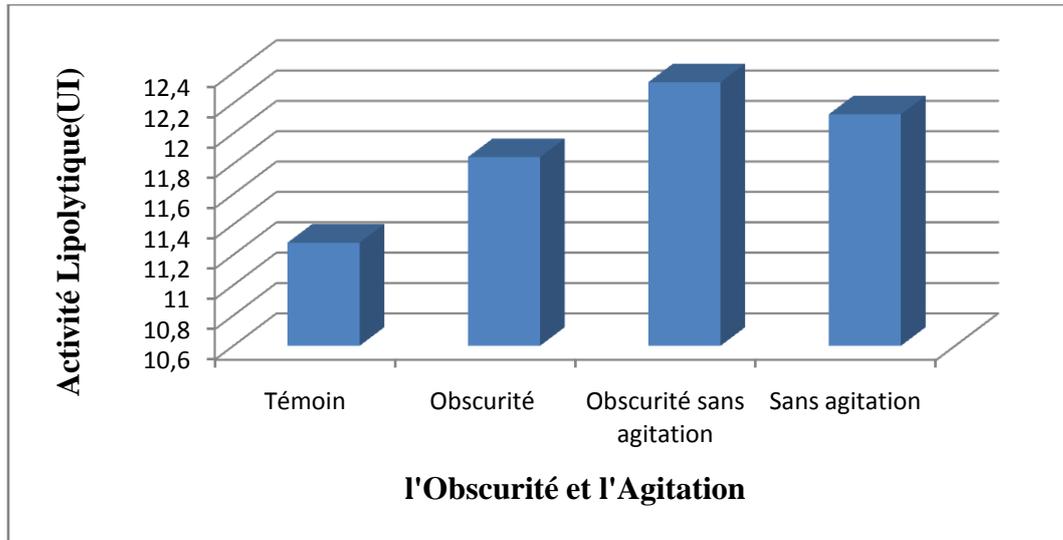


Figure 18 : L'effet de l'obscurité et l'agitation.

Les résultats présentés dans la figure 18 ont montré que l'activité lipolytique est stimulée en condition d'obscurité avec des valeurs respectives de 11,844 et 12,3375 UI alors que la présence de lumière est sans influence sur la production enzymatique.

En soumettant notre milieu à une agitation de 150 rpm l'activité lipolytique a donné une valeur de 11,4 UI par contre en supprimant l'agitation l'activité lipolytique est stimulée à une valeur 12,126 UI.

En combinant les deux conditions obscurité et absence d'agitation on a remarqué que ces dernières ont un effet stimulant puisque on a obtenu la meilleure production de l'enzyme avec une valeur de 12,3375 UI.

Selon **Estrade (1991)**, on a conclu que la lumière n'était pas indispensable dans la production de lipase, une nouvelle expérience destinée à déterminer avec une plus grande précision l'influence de la lumière blanche mais aussi la lumière ultraviolette ; cette citation correspond aux résultats obtenus puisque la lumière n'avait aucune influence sur la production de lipase.

D'après **Hamdi (1991) et Colla et al. (2016)**, la vitesse d'agitation affecte d'avantage la formation de métabolite avec les margines brute par *A.niger*, dans ce cas l'agitation améliore la production de métabolite ce qui ne concorde pas avec nos résultats, par contre dans le cas de margines pré fermenté, la vitesse d'agitation diminue la cinétique de production du

métabolite ; ceci correspond a nos résultats puisque l'absence de l'agitation a donné une bonne stimulation de l'activité lipolytique.

3.3 Etude de l'effet des ions

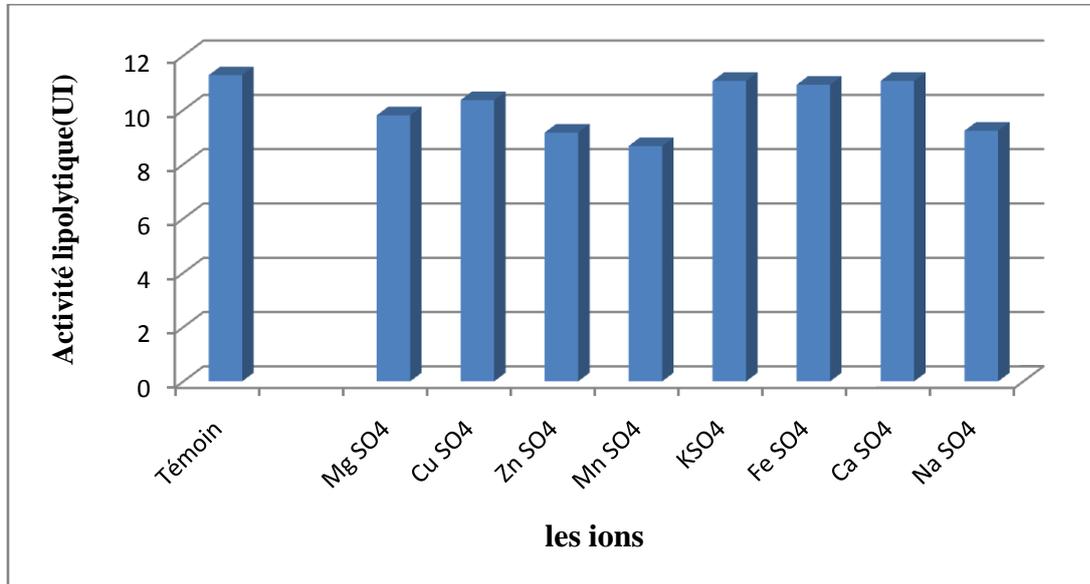


Figure 19 : l'effet des ions sur l'activité lipolytique.

D'après les résultats présentés dans la figure 19, on a remarqué que les ions (CaSO_4 , CuSO_4 , KSO_4 et FeSO_4) n'ont pas d'effet significatif sur la production tandis que le NaSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 et MgSO_4 ont diminuée l'activité lipolytique avec des valeurs allant de 8,6715 à 9,7995UI.

Les ions métalliques sont liés à des sites de liaisons spécifiques à la surface des molécules et joue un rôle structural qui contribue à la production ou non de certains enzymes (**Mendes et al., 2012**). Généralement l'activité lipolytique est inhibée par les métaux lourds comme le Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} et Sn^{2+} et légèrement inhibés par Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Na^{2+} (**Gupta,2004**) ; cette généralité rejoint nos résultats puisque la plus part des ions utilisées avais un effet inhibant sur l'activité .

3.4 Etude de l'effet des dilutions

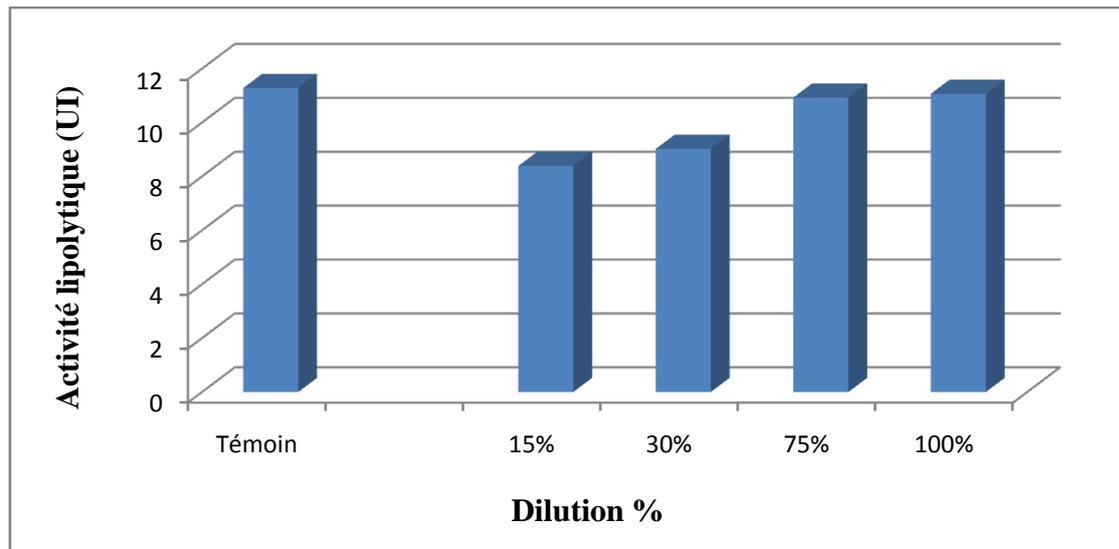


Figure 19 : l'effet des dilutions sur l'activité lipolytique.

D'après la figure 20, on remarque que les dilutions 15 et 30 % ont un effet inhibant sur l'activité lipolytique qui a diminué par rapport au témoin alors que les deux dilutions 75 et 100% n'ont aucun effet sur l'activité lipolytique.

3.5 Effet de l'effet du NaCl

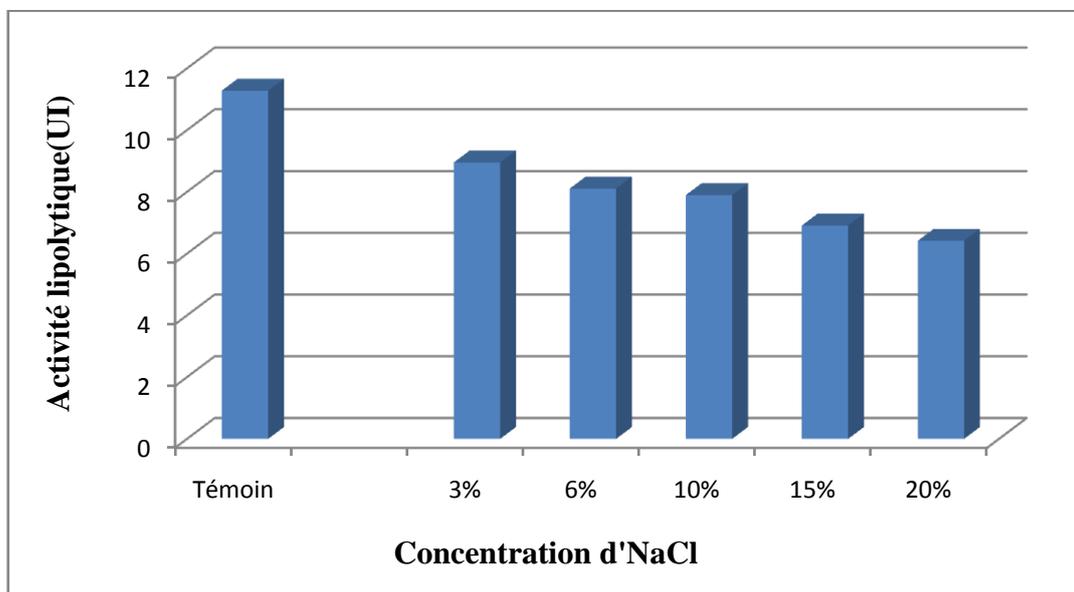


Figure 21 : L'Effet des Concentration d'NaCl sur l'activité lipolytique.

L'effet des différentes concentrations du NaCl sur l'activité lipolytique est montré dans la figure 21. Les profils du NaCl montrent que la production de lipase a été diminuée par la présence du sel, dans toutes les concentrations de 3% à 10%, avec des valeurs relatives allant

de 8,9535 à 7,896 UI. Pour les concentrations 15 et 20 % il ya présence d'activité enzymatique malgré sa faiblesse ce qui suggère que cette enzyme possède une stabilité relative par rapport au sel.

L'effet du NaCl sur l'activité dépend non seulement de la concentration en sels mais également de la nature physique du substrat triacylglycérol, plusieurs hypothèse ont été formulées quant au mode d'action du sodium sur l'activité lipolytique purifié, les ions Na^+ pourraient intervenir au niveau du complexe enzyme –activateur mais également au niveau du complexe enzyme substrat ; Nos résultats nous permettent de rejoindre cette dernière hypothèse selon laquelle le NaCl , à faible concentration augmente la liaison de l'enzyme avec le substrat et à forte concentration diminue l'interaction enzyme lipase substrat sans bloquer totalement son activité (**Hannan et al ; 1990**).

3.6 Etude de l'effet du pH

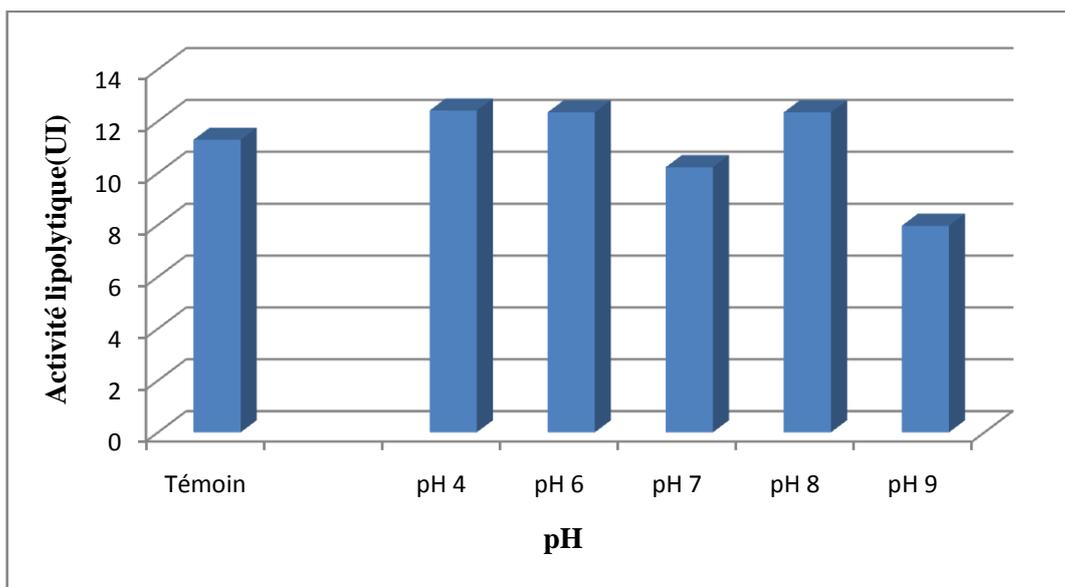


Figure 22 : L'effet du pH sur l'activité lipolytique.

L'effet des différentes valeurs du pH sur l'activité lipolytique à une température constante de 25°C est montré dans la figure 22. Les profils du pH montrent que les lipases ont été actives sur une large gamme de pH allant de 4 à 8 avec une activité atteint son maximum à pH 4, pH 6 et pH 8 avec les valeurs respectives de 12,408, 12,3375 et 12,3375 UI ; Alors qu'à un pH 9, l'activité lipolytique diminue à 7,9665UI par rapport au témoin.

L'étude de la stabilité de pH de la lipase produit par *Aspergillus flavus* montre que la protéine est stable dans une zone de pH allant de 5 à 12 après l'incubation (**Laachari et al ;**

2015), et d'après cette étude nos résultats est également semblable sur l'intervalle de pH4, pH6, pH8, et ne correspond pas aux résultats de **Laachari** à pH9 (effet inhibant).

Le pH du milieu de réaction est un autres facteur important sur l'activité enzymatique, en effet il agit sur l'ionisation des groupes donneurs ou accepteur de protons des acides aminée ionisables qui constituent l'enzyme, cette ionisation provoque une modification de la structure tertiaire de la protéine et éventuellement sa dénaturation, en affectant indirectement la disposition du site actif ou bien, le pH peut agir directement sur le site actif, composé fréquemment des acides aminées contenant des groupe ionisables qui doivent être dans une forme ionique appropriée pour maintenir la conformation du site actif, la liaison au substrat ou la catalyse la réaction (Segel, 1976 ; Zubay *et al* ; 1995).

3.7 Etude de l'effet de la source d'azote (N)

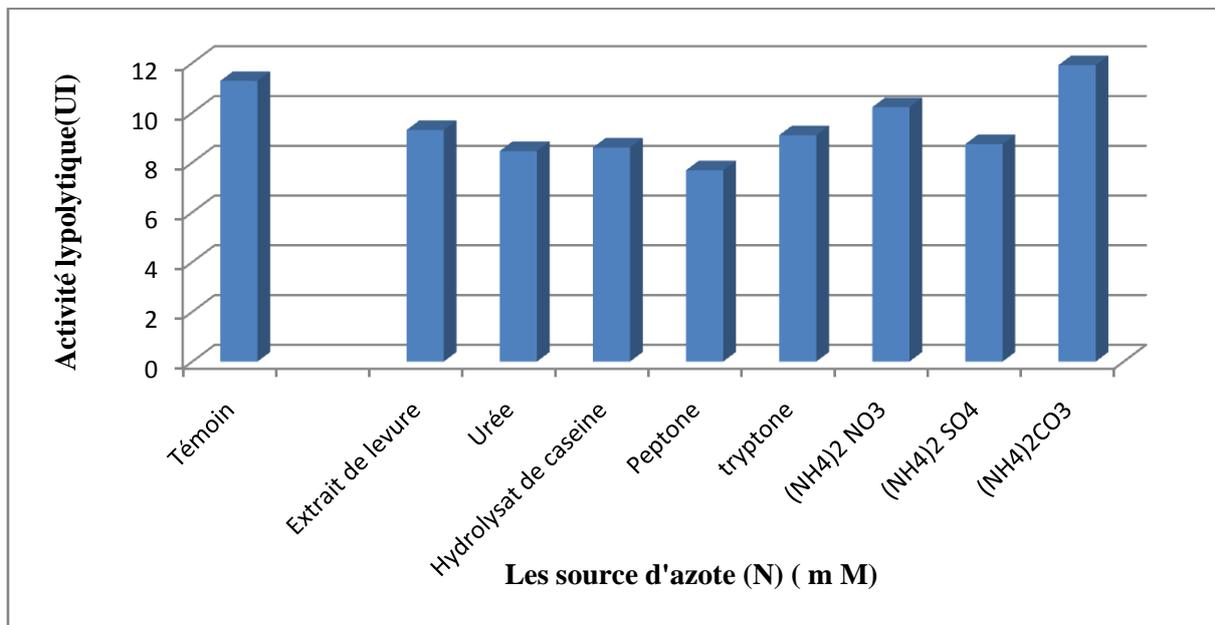


Figure 23 : L'effet des sources d'azote sur l'activité lipolytique.

La figure 23 montre que les source d'azote (N) additioné au milieu ont un effet inhibant sur l'activité lipolytique où le taux de production de l'enzyme a diminué d'une valeur relative de (7,6845UI) à (9,306UI) ; exceptionnellement pour le (NH4)2CO3, source minerale, qui a présenté un effet stimulant en augmentant l'activité lipolytique a une valeur de 11,9145UI.

Les sources d'azote ont un rôle dominant dans la biosynthèse des métabolites secondaires. Parmi les sources d'azote minérales, l'ammonium est connu pour être un répresseur sur le métabolisme secondaire (Omura *et al.*, 1980; Demain, 1991; Giordano *et al.*, 1999; Litzka *et al.*, 1999). La répression catabolite par les ions ammonium peut réguler les métabolites secondaires en inhibant et/ou en réprimant des enzymes qui permettent la biosynthèse des précurseurs (Giordano *et al.*, 1999). Ce qui correspond avec les résultats obtenus où toutes les sources d'azote utilisées ont présenté un effet inhibant sur la production de l'activité lipolytique ; seulement la présence du $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ dans le milieu de culture a influencé positivement la production lipolytique.

3.8 Etude de l'effet de la source du carbone (sucre)

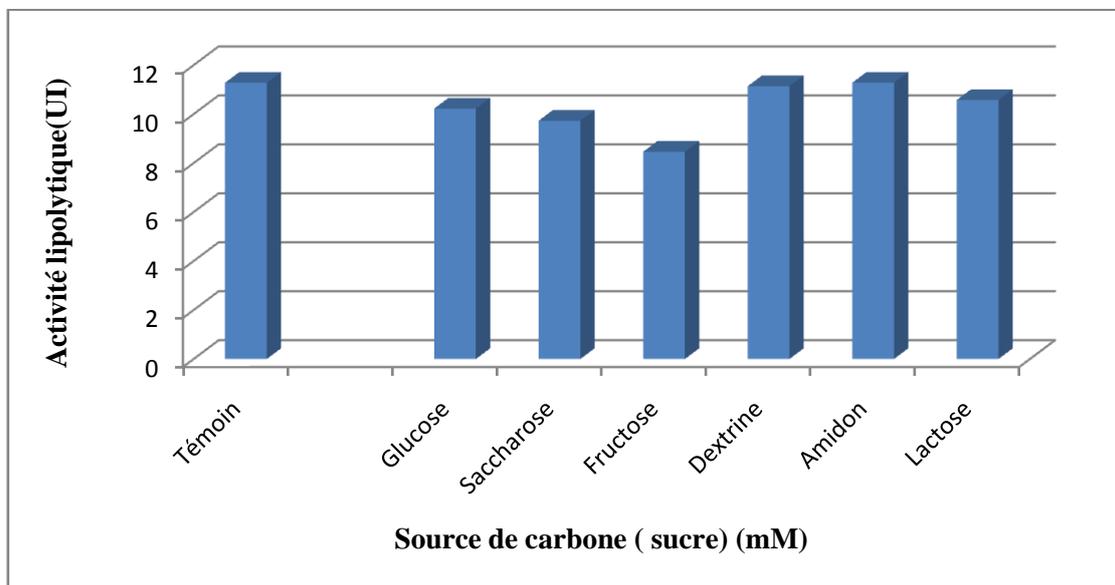


Figure 24 : L'effet des sources de carbone (sucre) sur l'activité lipolytique.

La figure 24 montre que les sucres additionnées dans le milieu ont inhibé l'activité lipolytique vu le taux de production de lipases qui a atteint 8,46 UI à part l'amidon, le dextrin et le lactose qui n'ont aucun effet sur l'enzyme.

D'après Awad (2005), la meilleure production est obtenue en présence des polysaccharides (dextrine, amidon) suivie par le saccharose, le glucose et fructose chez *A. ochraceus* et *A. ocheraceus* NRRL 3174 ce qui ne concorde pas avec les résultats puisque aucun des sucres n'a augmenté la production de l'activité lipolytique.

3.9 Etude de l'effet des alcools

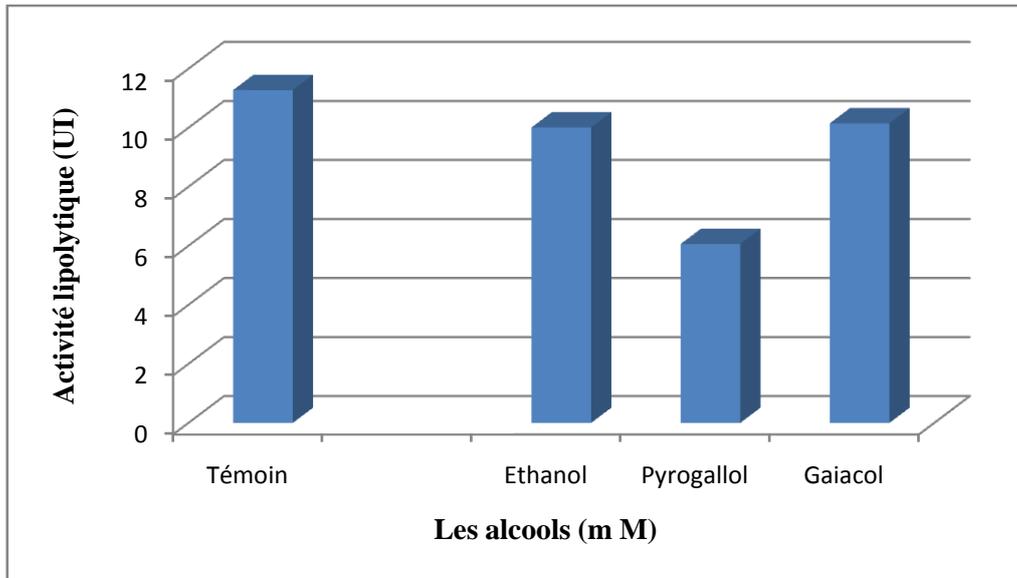


Figure 25: L'Effet des alcools sur l'activité lipolytique.

D'après les résultats présentés dans la figure 25, l'Ethanol et le Gaïacol n'ont aucun effet sur l'activité lipolytique relative avec des valeurs respectives (10,011UI) (10,152UI) ; alors que le pyrogallol a un effet inhibant sur cette dernière en diminuant la production de l'enzyme jusqu'à (0,063UI).

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est d'optimiser la production de lipase par la souche *Aspergillus* Vs1 sur le déchet d'olive en milieu liquide.

Durant l'étude de cinétique enzymatique, toutes les souches produisent l'enzyme mais les meilleurs sont ArS7, PS8, PS15 et AVs1 ; Ces derniers ont été sélectionnés pour la dégradation du déchet sur milieu solide.

D'après les résultats obtenus sur boîte de Petri, on a sélectionné la AVS1 comme la meilleure souche pour compléter l'optimisation dû sa capacité de dégradation du déchet d'olive et sa performante production d'enzyme.

Les résultats de l'optimisation montrent que la quantité de l'inoculum d'un, deux quatre, six et sept disques, l'absence de la lumière et de l'agitation, les pH4, 6 et 8, le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ présentent une meilleure stimulation de l'activité lipolytique par AVs1.

De nombreuses perspectives découlent de cette recherche en l'occurrence :

- Compléter l'étude en mesurant l'effet d'autres facteurs comme : la température, les acides, la vitesse d'agitation sur la production de lipase.
- Produire l'enzyme dans les conditions optimisées.
- Purification de l'enzyme et étude de ses propriétés cinétiques.
- Identifier génétiquement la souche.
- Séquençage du gène qui code pour la production de lipase.

Références bibliographiques

- Alifax, R. (1972). Activité lipolytique de quelques micro-organismes (1 bactéries). Le lait inra Edition, 52 (515-516), P 283-296.
- Alifax, R. (1975). Activité lipolytique de quelques microorganismes II moisissures. Le lait INRA Editions 1975, 55 (541-542), p 41-50.
- Alloue, W; Destain, J; Ongena, M; Blecker, C; and Thonart, P. (2008b). Effects of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stabilization. Prep Biochem. Biotechnol 38 : 217-228.
- Alloue, W.A.M. (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica* : Thèse de Doctorat. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique, 165p.
- Allowe, W; Aguedo, M; Destain, J; Ghalfi; Blecker, C; Wathelet, J.P; et Thomart, P. (2008a). Les lipases immobilisées et leurs applications. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 12(1), 57-68.
- Assamoi, A.A ; Destain, J ; Thonart, P.H. (2008). Aspect microbiologique de la production par fermentation solide des endo-beta 1-4-xylanses de moisissures le cas de *Penicillium canescens*. 13(2).
- Awad, G. (2005). Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* producteur de l'ocheratoxine A. Thèse de Doctorat ; Génie des procédés. Talmouse. Ecole doctorale sciences de procédés, 138p.
- Ghestem, A; Botineau, M ; Limousin. (2007). Terre de champignons. Edition Presses Univ. Limoges, 195p.
- Bacchi, M. (2006). Hydrogénases artificielles : Nouveaux catalyseurs biosynthétiques pour la production d'hydrogène : Thèse de Doctorat : Université de Grenoble, 245p.
- Bataiche, I. (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica* isolé différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse Doctorat : Microbiologie Constantine. Université Constantine 1.131p.

Ben Ameer Villain, S. (2012). Conception et Etude d'un réacteur enzymatique à membrane fonctionnant en milieu supercritique : Application à la synthèse enzymatique d'esters. Thèse de doctorat. Génie des procédés : Ecole Nationale Supérieure de chimie de Montpellier, p131.

Boullard, B. (1997). Edition Estem, N° d'impression L54450 dépôt légale Septembre 1997 en France. Plantes & champignons : Dictionnaire (875pages), p19.

Bloner, TH. (2005). Des solutions hypoallergiques pour une meilleure qualité de vie. France.

Boukaa, M. (2015). Isolement des microorganismes producteurs de lipases à intérêt biotechnologique. Mémoire Master : Biotechnologie Microbienne. Fès, Maroc : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 37p.

Bourgeois, C.M ; Mescle, J.F ; Zucca, J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris, P216-244.

Bustos, I.J. (2013). Formes pharmaceutiques à base d'enzymes sans excipients. Memoire Exigence partielle de maitrise en biochimie : Biochimie. Québec : Université du Québec à Montréal .95P.

Cassas-Goday, L; Duquesne, S; Bordes, F; Sandoval, G; et Marty, A. (2012). Lipases and phospholipases: Méthodes and protocols. Méth. Mol. Bio.861.

Chahinian, H; Sarda, L. (2009). Distinction between esterases and lipases: Comparative biochemical properties of sequence –related carboxylesterases protein pept. lett.16: 1149-1161.

Chaib, R ; Slimane, H.N. (2013). Etude des paramètres influant la production de lipases par deux souches leuvurienne. Mémoire Master en Microbiologie. Université Constantine 1.

Chilliard, Y ; et Lamberet, G. (1984). La lipolyse dans le lait : Les différents types mécanismes, facteurs de variation signification pratique 64 : 544-578.

Combes, C. (2001). Les associations du vivant : L'art d'être une parasite nouvelle bibliothèque scientifique, Edition Flammarion, 348p.

Coté, A. (2010). Identification et caractérisation de nouvelles enzymes lipolytiques thermostables provenant d'une banque métagénomique. Mémoire pour garde Mètre : Microbiologie Appliquée. INRS-institut Armand-Frappier. Université du Québec.125P.

- Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P52-57.
- Estrade, P. (1991). Approches enzymatiques de la synthèse de molécules hydroxylées par des champignons filamenteux. Thèse de Doctorat. Sciences de la vie et de santé. Lille Flandres Artois. Université des sciences et techniques, 166p.
- Kiffer, E ; Morellet, M. (1997). Les deutéromycètes classification et clés d'identification générique. Du labo au terrain. Edition Quae. Institut National de la recherche Agronomique 147 ; rue de l'université-75338, P43-306.
- Fickers, P ; Destain, J ; et THonart, P. (2007). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et Application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 12(2) : 119-130.
- Fickers, P; Destain, J; Thonart, Ph. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principale caractéristique et application. *biotechnol. agron. Soc. Environ* 12(2) 119-130.
- Gargouri, Y ; Julien, R ; Pieroni, G ; Verger, R ; Sarda, L. (1984). Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of lipid research*.25: 1214-1221p.
- Georges, B; Johnson Peter, H; Jonathan, R; Losos, B; Bouharmont, J; Susan, R; Singer. (2011). Traduit par Jules Bouharmont, Pierre L Masson, Charles Van Hove. *Biologie – Version luxe, Biologie générale. Éd. De Boeck Supérieur, 1406 p, (621).*
- Gertis, L.R; Pareyt, B; Decamps, K; Delcour, J.A. (2014). Lipases and their functionality in the production of wheat –based food systems comprehensive reviews in food science and food safety. *vol13(5)* 978-989.
- Ghosh, P.K; Saxena, R.K; Gupta, R; Yadav, R.P; Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci. Progr.* 79 (2): p119-157.
- Gilhan, D; Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methodes*.36: 139-147.
- Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod. Paris. P. 7-330.
- Gunstone, F.D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipides. *Journal of the science of food and agriculture* .79: 1535-1549.

Gupta, M.R. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties 763-781.

Hamdi, M. (1991). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse Doctorat : Biologie Cellulaire et Microbiologie. Aix-Marseille 1. Université de Provence, 166p.

Hanan, Y ; Le Goff, D ; Friloux, L ; Nouvelot, A. (1990). Effet des sels minéraux sur l'activité de la lipoprotéine lipase du lait de vache in vitro. Lait, 70 : 45-53.

Hasan, F; Alishah, A; Hameed, A. (2006). Industrial application of microbial lipases. Enzyme and microbial technology 39.235-251.

Hennen, G. (2006). Biochimie Approche bioénergétique et médicale ; France : Dunod 167P.

Henry weil, J. (2006). Biochimie générale. France : Dunod.75-79P.

Drolet,S. (2012). Classification et embranchements des *Basidiomycètes* [en ligne]. (Page consultée le 20/03/2017). <https://sites.google.com/site/microbiologieaz/home>.

Jarrar, H. (2001). Bioélectrodes enzymatiques pour application en biocapteurs et en biopiles. Thèse de Doctorat. Chimie. Montpellier : Ecole Nationale Supérieure de chimie ,163P.

Jeager, K.E ; Dijkstra, B.W ; etreetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: Moléculaire biology three dimensional structure and biotechnological applications of lipases annu.Ret. Microbiol 53: 315-351.

Jeager, K.E; Ransac, S; Dijkstra, B.W. et al. (1994). Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 15(1): 29-63.

Jeager, K.E; Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends biotechnol 16(9) : 396-403.

claude Roland, J ; Vian, B. (1985); Atlas de Biologie Végétales .Ed. Masson.

Figarella, J ; Leyral, G ; Terret, M. (2004). Microbiologie générale et appliquée. Ed. Lanore, N°3328, Paris 14-15 (285).

Louis, J ; Jean, L ; Polese, M. (2005). Encyclopédie visuelle des champignons, Edition Artemis. 383p.

Joffin, C ; et Joffin, J-N. (2003). Microbiologie alimentaire. Biologie et Technique, 5^è édition, CRDP Aquitaine. 212p.

Kumar, D; Jain, V.K; Shanker, G; and Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. Process Biochemistry. 38: p1731-1738.

Laachari, F; El Bergadi, F and Ibsouda, S.K. (2015). Purification and characterization of a Novel thermostable lipase from *Aspergillus flavus* international journal of research, 2(2): 342-352.

Lansing, M; Prescott, J; Harley Donald, P; Klein, A. (2003). 2eme édition française traduction de la 5 eme édition américaine par claire Michèle Bacq calberget jean Dusart. (Université de Liège) Microbiologie. Ed. De Boeck Supérieur (1137) (553-557).

L'ESIAB. Agroalimentaire de Bretagne atlantique [en ligne]. (Page consultée le 15/03/2017). www.univ-brest.fr/esiabscientifique.

Linder, M ; Fanni, J ; Parmentier, M. (2004). Extraction, fractionnement et concentration des huiles marines. oliseeds and fats crops and lipides. Vol 11 (2) 123-130.

Lopez, C ; Antonio, J. (1998). Isolement identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de Doctorat : Biochimie et Biologie moléculaire. Montpellier : Université Montpellier 2. 244p.

Colla, M.L; Primaz, A.L; Benedetti, S; Loss, R.A; Marieli de lima; Reinthr, C.O; Bertolin, T.E; Alberto, J; Costa, V. (2016). Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. Brazilian Journal of Microbiology.

McAuliffe. (2012). Industrial enzymes and biocatalysis handbook of industrial chemistry and biotechnology.

Mendes, A. A; Oliverira, P.C and H.F.DE. (2012). Journal of molécular catalysis B: Enzymatic properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. « Journal of moleculer cataysis. B. Enzymatic. 78: 119-134.

- Merabti, R. (2006). Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol Saharien Algérien. Diplôme de Magistère ; Université Mentouri. Constantine, 139p.
- Meyer, A ; Deiana, J ; & Bernard, A. (2004). Cour de microbiologie générale. J.Appl.Microbiol. 66 (4), p :1523-1526.
- Moussaoui, R ; Youyou, A. (2005). Extraction de l'huile à partir du grignon d'olive avec le mélange : acétone-trichloroéthyle. Sci. Tech. 23: 47-51.
- Mtibaa, H ; Fendri, A ; Sayari, A ; Ben salouh, A ; Majdoub, H ; Gergouri, Y. (2002). La lipase de *Candida rugosa* : Caractérisation biochimique. Oléagineux ; lorpras ; lipases, vol 9 (1)49-53.
- Murthy, P.S ; Naidu, M.M. (2010). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. World Appl. Sci. J., 8(2) ; 199-205.
- Najjar, A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase. de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat : Microbiologie et biotechnologies : Université de la méditerranée (Aix Marseille II) 132P.
- Nicklin, J; Graeme-Cook, K; Paget, T; & Killington, R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.
- Pandey, A; Selvakumar, P; Soccol, C.R; Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr. Sci., 77 ; 149-62.
- Paranthaman, R; Alagusundaram, K; Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. World J. Agric. Sci., 5(3) ; 308-312.
- Obrados, N ; Montesinos, J.L ; Vlero, F. (1993). Effect of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. Biotech. Letters 15 : 357-360.
- Oei, P ; avec la contribution de Nieuwenhijzen, B.N. (2005). La culture des champignons à petite échelle, Edition Janna de feijter, P-8,9 ;82p.

Cassier, P ; Brugerolles, G ; Combes, C. (1998). Le parasitisme: un équilibre dynamique Enseignement des sciences de la vie. Edition Masson, 366p.

Piškur, J; Rozpędowska, E; and Polakova, S. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer. *Trends Genet.* 22, 183–186. doi: 10.1016/j.tig.2006.02.002.

Quentin, F ; Gallet, P.F ; Guillonton, M ; Quintard, B. (2011). Maxi fiches biochimie ; France : Dunod ,124-125P.

Reis, P; Holmberg, K; Liser, M.E; Miller, R. (2008). Lipases at interfaces: A review advances in colloid and interface science.

Rihani, A. (2012). Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. Magister : Microbiologie. Annaba : Université Badji mokhtar, 55P.

Ross, R. (2010). How does *Ganderma applana* reproduce.

Scharg, J.D; and Cygler, M. (1993). 1.8 A refined structure of the lipase from *geotrichum candidum* *J.Mol. biol* 230: 575-591.

Segel, I.H. (1976). *Biochemical energetics in biochemical calculations*, jon wiley and sons. New York. 145-207.

Sharma, R; Chisti, Y; Benerjee, UC. (2001). Production purification characterization and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19(8): 627-662.

Simon, J; Charnock Barry, V; Mccleary. (2005). *Les enzymes : applications industrielles et analytiques* (2005). [en ligne] (page consultée le 17/03/17) [http:// www.megaenzyme.com](http://www.megaenzyme.com) .

Vulfson, E.N. (1994). *Industrial application of lipases in P wooley SBP (eds) lipase: Their structure biochemistry and application.* Cambridge universitypress 271-286.

Wang. J; Wan, W. (2009). Experimental design methods for fermentation hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: p235-244.

Wilfried, R; Moussavou, M; Brunschwig, Ch; Villeneuve, P; Blin, J. (2011). 6eme urnée scientifique du 2iE. Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV). 4-8 Campus 2iE Ouagadougou, 6P.

Xiang – Yang Wang; Fisher, P.B. (2015). Immunotherapy of cancer. Edition Academic Press, 392p.

Zubay, G.L; Parson, W.W and Vance, D.E. (1995). Enzyme kinetics. En principales of biochemistry WCB publishers. Oxford : 135-153.

Annexes

Annexe : Malt Extrat Agar (MEA)

- 50 g de milieu déshydraté.
- 1000 ml eau distillée.

Annexe : Malt Extrat Broth (MEB)

- 20g d'extrait de malte.
- 1000 ml eau distillée.

Annexe : milieu à base de déchets solide

- 50 % du déchet d'olive.
- 50 % d'eau distillée.
- 20g/l d'agar.

Annexe : milieu à base de déchets liquide

- 50 % du déchet d'olive.
- 50 % d'eau distillée.

Résumé

Le but de ce travail est d'optimiser la production de lipase par la souche *Aspergillus* Vs1 par fermentation sur milieu liquide.

Les résultats de la cinétique de biomasse et de production enzymatique de lipase par les huit souches ont montré que l'activité lipolytique est associée à la croissance pour les souches AVs1, A1s1, AS16, PS11, PS6 et PS8 alors que pour les autres (ArS7, PS15), elle est semi-associée la croissance ; Parmi ces huit souches on a sélectionnée quatre souches (ArS7, PS8, PS15, AVs1) les plus performantes pour le test de dégradation de déchet d'olive sur boîte de Pétri ; Ce dernier montre que la souche AVS1 donne une meilleure consommation du déchet dans les concentrations 15% et 50% ; cette consommation se traduit par un éclaircissement de milieu de culture et un halo claire autour des colonies par rapport aux autres souches.

Après la combinaison des résultats, on a conclu que la Avs1 présente une meilleure activité lipolytique et une bonne dégradation du déchet d'olive et c'est pour cela qu'elle a été sélectionnée pour l'étape de l'optimisation de production de lipase.

Les valeurs obtenues après l'optimisation de la production de lipase par la AVS1 ont montré que l'activité enzymatique est stimulé par une quantité d'inoculum équivalente à un, deux, quatre, six et sept disques, l'obscurité, l'absence de l'agitation, les pH4, pH6, pH8, le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ comme source d'azote ; en d'autre partie les ions NaSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , MgSO_4 , le pH9, les dilutions 15% et 30% en déchet, le NaCl , le peptone, l'hydrolysate de caséine, l'urée, l'extrait de levure, le tryptone, le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, le $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, le glucose, le saccharose, le fructose, le pyrogallol diminuent la production enzymatique ; alors que la lumière, les ions CaSO_4 , CuSO_4 , KSO_4 et FeSO_4 , le lactose, le dextrine, l'amidon, l'éthanol et le gaiacol sont sans effet remarquable sur la production de cette enzyme.

Mots clés : Moisissures ; Lipase ; Optimisation ; Fermentation ; Déchets d'olive.

ملخص

الهدف من هذا العمل تحسين إنتاج الليباز من طرف *Aspergillus AVs1* بالتخمير في وسط سائل.

نتائج حركية إنتاج الكتلة الحية وإنزيم الليباز بالسلاطات الثمانية أظهرت أن نشاط الدهون يرتبط بالنمو السلاطات (الكتلة الحية) بالنسبة ل AVs1، A1s1، AS16، PS6، PS11، PS8 و PS8 و بالنسبة ل (ArS7، PS15)، فهي شبه مرتبطة بنمو الكتلة الحية؛ ومن بين هذه السلاطات الثمانية اخترنا الأربعة الأفضل أداء (ArS7، PS8، PS15، PS15) في تحلل نفايات الزيتون في وسط صلب (من أطباق بيترى)؛ حيث يظهر هذا التحليل الأخير أن سلالة AVs1 تعطي استهلاك أفضل للنفايات في التركيزات من 15% و 50% أفضل النتائج)؛ و يترجم هذا الاستهلاك فاتحة واضحة حول المستعمرات عكس السلاطات الأخرى.

بعد الجمع بين النتائج السابقة، تبين أن سلالة AVs1 تبرز نشاط إنزيمي لليبازي أفضل وهي جيدة في تفكيك و تحلل نفايات الزيتون و السبب في أنها اختيرت لخطوة للاستفادة المثلى لإنتاج lipase الليباز.

حيث أظهرت النتائج المحصل عليها من الاستفادة المثلى أن إنتاج الليباز (lipase) من قبل السلالة AVs1 يتم تحفيزه بكمية من الزرع ما يعادل الأقراص واحد، اثنين، أربعة، ستة وسبعة، والظلام، وغياب الانفعالات، pH4، pH6، pH8، $(NH_4)_2CO_3$ كمصدر للزوت؛ و تبرز النتائج أيضا أن ايونات $NaSO_4$ ، le ، $MgSO_4$ ، $ZnSO_4$ ، $MnSO_4$ ، و خفيفات الوسط بالنسبة ل 15% و 30%، و كلوريد الصوديوم، خلاصة الخميرة، البيبتون، التريبتون، اليوريا، pH9، $(NH_4)_2SO_4$ ، $(NH_4)_2NO_3$ ، l'hydrolysat de caséine، مصدر الغلوكوز، السكاروز، الفروكتوز، اما بالنسبة ل بيروجالول فهو يخفض إنتاج الإنزيم؛ بينما الضوء، والايونات $CaSO_4$ ، $CuSO_4$ ، $FeSO_4$ ، KSO_4 و اللاكتوز، الدكسترين (مادة صمغية)، النشا، الإيثانول وجاياكول ليس لهم أي تأثير ملحوظ على إنتاج نشاط الإنزيمي.

الكلمات الرئيسية: الفطريات؛ Lipase؛ التحسين؛ التخمر؛ نفايات زيتون.

Summary

The purpose of this work is to optimize the production of lipase by the strain *Aspergillus AVs1* by fermentation on liquid medium.

Results of the kinetics of biomass and enzyme production of lipase by the eight strains showed lipolytic activity is associated with growth for strains AVs1, A1s1, AS16, PS11, PS6 and PS8 so for others (ArS7, PS15), she is semi-linked growth; Among these eight strains it has selected four best-performing (ArS7, PS8, PS15, AVs1) strains for degradation of waste with olive test on box of Petri dishes; The latter shows that AVS1 strain gives a better consumption of the waste in the concentrations of 15% and 50%; This consumption translates into a clearing-up of culture medium and a clear halo around the colonies against the other strains.

After combining the results, concluded that the Avs1 presents a better lipolytic activity and good the olive waste degradation and that is why she was selected for the step of the optimization of lipase production.

The values obtained after the optimization of the production of lipase by the AVS1 showed that enzyme activity is stimulated by a quantity of inoculum equivalent to one, two, four, six and seven discs, the darkness, the absence of agitation, pH4, pH6, pH8 (NH₄)₂CO₃ as nitrogen source; in other part ZnSO₄, MnSO₄, NaSO₄ ions, MgSO₄, the pH9, 15% and 30% in waste dilutions, NaCl, the peptone, the hydrolysate of casein, urea, yeast extract tryptone, (NH₄)₂SO₄, the (NH₄)₂NO₃, glucose, sucrose, fructose, the pyrogallol decrease enzyme production; While the light, ions CaSO₄, CuSO₄, KSO₄, FeSO₄, lactose, the dextrin, starch, ethanol, and the gaiacol are no remarkable effect on the production of this enzyme.

Keywords: fungi; Lipase; Optimization; Fermentation; Waste of olive.

Intitulé : l'optimisation de la production de lipases par *Aspergillus sp*Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en **Ecologie Microbienne**

Résumé : Le but de ce travail est d'optimiser la production de lipase par la souche *Aspergillus Vs1* par fermentation sur milieu liquide.

Les résultats de la cinétique de biomasse et de production enzymatique de lipase par les huit souches ont montré que l'activité lipolytique est associée à la croissance pour les souches AVs1, A1s1, AS16, PS11, PS6 et PS8 alors que pour les autres (ArS7, PS15), elle est semi-associé la croissance ; Parmi ces huit souches on a sélectionnée quatre souches (ArS7, PS8, PS15, AVs1) les plus performantes pour le test de dégradation de déchet d'olive sur boîte de Pétri ; Ce dernier montre que la souche AVS1 donne une meilleure consommation du déchet dans les concentrations 15% et 50% ; cette consommation se traduit par un éclaircissement de milieu de culture et un halo claire autour des colonies par rapport aux autres souches.

Après la combinaison des résultats, on a conclu que la Avs1 présente une meilleure activité lipolytique et une bonne dégradation du déchet d'olive et c'est pour cela qu'elle a été sélectionnée pour l'étape de l'optimisation de production de lipase.

Les valeurs obtenues après l'optimisation de la production de lipase par la AVS1 ont montré que l'activité enzymatique est stimulé par une quantité d'inoculum équivalente à un, deux, quatre, six et sept disques, l'obscurité, l'absence de l'agitation, les pH4, pH6, pH8, le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ comme source d'azote ; en d'autre partie les ions NaSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , MgSO_4 , le pH9, les dilutions 15% et 30% en déchet, le NaCl , le peptone, l'hydrolysate de caséine, l'urée, l'extrait de levure, le tryptone, le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, le $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, le glucose, le saccharose, le fructose, le pyrogallol diminuent la production enzymatique ; alors que la lumière, les ions CaSO_4 , CuSO_4 , KSO_4 et FeSO_4 , le lactose, le dextrine, l'amidon, l'éthanol et le gaïacol sont sans effet remarquable sur la production de cette enzyme.

Mots clés : Moisissures ; Lipase ; Optimisation ; Fermentation ; Déchets d'olive.

Laboratoire de recherche : L'laboratoire de Biologie et Environnement (LBE). Université des Frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *BENHIZIA Yacine* (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : *BOUCHERIT Zeyneb* (Maitre Assistant A - UFM Constantine),
Examinatrice : *GACI Meriem* (Maitre-Assistant A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 19/06/2017