

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université des frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Science de la Nature et de la Vie  
Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Alimentaires  
Spécialité : Biochimie de la Nutrition**



**Intitulé**

**Etude de la production de la lipase  
levurienne**



**Présenté par : ZENATI Saoussene  
MERABET Maroua**

**Le : 04/10/2020 à Constantine**

**Jury d'évaluation :**

Président	: Mme Bennamoun L.	MCB, UFM, Constantine.
Encadreur	: Mme Dakhmouche S.	MCA, ENS Assia Djebar, Constantine.
Examineur	: Mme Boukhalfa H.	MCB, UFM, Constantine.
Examineur	: Mme Labbani F. Z. K.	MCB, ENS Assia Djebar, Constantine.

**Année universitaire  
2019/2020**

## REMERCIEMENT

Nous tenons tout d'abord et avant tout à remercier "ALLAH" de tout puissant qui nous a données durant toutes ces années le courage, la volonté, la patience et la foi en nous pour arriver à ce jour.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre directrice de mémoire madame **DAKHMOUCHE-DJEKRIF Scheherazed**. Nous la remercions de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées. Sa présence indéfectible à nos écoutes et sa chaleur humaine.

Aussi nous ne manquons pas de présenter nos vifs remerciements à madame BOUKHALFA et madame LABBANI d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Egalement nous n'omettons pas, à remercier madame BENAMOUNE Leila d'avoir présidé ce jury.

Nous adressons nos sincères, remerciements à tous les enseignants qui ont assuré notre formation durant les cinq ans et tous les personnes par leur conseils et critiques tout au long nos études.

Nous remercions infiniment nos très chers parents lesquels grâce à dieu et à eux nous sommes ici ; ils ont toujours été là pour nous, merci pour tout ce que vous avez fait et entrain de faire pour nous.

Nous remercions nos chers frères et sœurs pour leur encouragement.

En fins nos remercions nos collègues et nos chers amis pour leur soutien inconditionnel.

## *Dédicace Saoussene*

Au nom d'ALLAH le Clément et le Miséricordieux, je dédie ce modeste travail :

A La source de tendresse, le symbole de sacrifice, la flamme de mon cœur, ceux qui sans leurs soutiens indéfectibles et sans limite, ce mémoire n'aura jamais pu voir le jour ; mes très chers parents, qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Mon cher papa : El-hacene, ma chère maman : Saliha, Que dieu vous protège, préserve et vous bénisse. Je prie dieu que la réussite sera toujours à ma portée pour que je puisse vous combler que du bonheur

A mes très chers frères : Younes, Sami, Ayoub

A ma chère sœur : Chaima

A la personne qui m'a toujours aidée, orientée et encouragée, qui était toujours à mes côtés qui m'a accompagnée durant mon chemin d'études ; mon fiancé : Mohamed

A ma belle-mère : Nora

A ma belle-sœur : Hawa

A mes belles cousines : Chahinez, Meriem, Yasmine, Naima, Manel

A mes belles copines : Meriem, Rayéne, Ikram

A ma binôme : Maroua

A tous mes amis, mes collègues et tous ceux qui m'estiment.

## *Dédicace Maroua*

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 Naouel»

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 Djamel»

A mes sœurs chahed et hanin Sans oublier ma petite fleur manissa

A mes cousines kaouter et sara et allea

A tous les oncles et tantes

A mes belles copines Maroua, Khadija, Meriem

A ma binôme Saoussene

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

# **Etude de la production de la lipase levurienne**

## **Résumé :**

Les lipases sont des biocatalyseurs importants sur le plan industriel, en particulier les lipases microbiennes et par conséquent, le criblage, la production, la purification et la caractérisation de l'enzyme lipase à partir de souches microbiennes émergent continuellement pour répondre aux besoins des industries pharmaceutiques et alimentaires. Plus récemment, diverses approches rentables et efficaces sont tentées pour augmenter la production de lipases chez les souches microbiennes. Pour cela, ce travail, à deux chapitres, tente d'étudier la production de lipases levurienne. Le premier chapitre est sur les levures. Après avoir traité les caractéristiques des levures, leur reproduction et leur classification, nous avons abordé leur habitat, l'isolement et le screening des souches productrices de lipase d'une part, et d'autre part, nous avons évoqué les facteurs influençant leur croissance et leur application industrielle notamment, la production d'enzymes. Dans le deuxième chapitre sur les lipases, nous avons décrit l'origine de la lipase, sa structure et son mécanisme. Ensuite, la production de cette enzyme sous différents systèmes de fermentation a été discutée. Aussi, l'impact de divers facteurs tels que les sources de carbone, les sources d'azote, le pH et la température a été évalué. Et nous avons présenté l'utilisation des plans statistiques, dans la perspective d'augmenter la production enzymatique à partir de souches microbiennes. Différentes méthodes de dosage de la lipase ont été révélées. Enfin, les techniques de purification, les caractéristiques de cette enzyme et ses applications industrielles ont été résumées.

**Mots clés :** Levure, criblage, lipase, méthode de dosage, utilisation industrielle.

## دراسة إنتاج الليباز من الخميرة

### ملخص:

الليباز هي إنزيمات مهمة جدا في المجال الصناعي خاصة الليباز الميكروبي. ففي الآونة الأخيرة اهتمت الكثير من الدراسات بفحص إنزيم الليباز، إنتاجه، تنقيته وتوصيفه من السلالات الميكروبي وأصبحت هذه الأبحاث في تطور مستمر لتلبية احتياجات الصناعات الدوائية والغذائية .

ولقد ظهرت عدة دراسات ومحاولات لتخفيض التكلفة وتحسين الفعالية لزيادة إنتاج الليباز من السلالات الميكروبية لهذا، يحاول هذا البحث حول دراسة إنتاج ليباز الخميرة في فصله الأول معالجة خصائص الخمائر، تكاثرها وتصنيفها، كذلك التعرف على مواطن إنتشارها، طرق عزل وفحص السلالات المنتجة للليباز. كما تمت مناقشة العوامل المؤثرة على نمو الخميرة وأهم التطبيقات الصناعية خصوصا في إنتاج الإنزيمات. كرس الفصل الثاني لإنزيم الليباز، عرفنا أصل الليباز، تركيبها وآلية عملها. ثم تطرقنا إلى دراسة إنتاج هذا الإنزيم تحت أنظمة تخمير مختلفة . تم تقييم تأثير العوامل المختلفة على هذا الإنتاج مثل مصدر الكربون، مصدر الازوت، درجة الحموضة ودرجة الحرارة . وبهدف زيادة إنتاج هذا الإنزيم من السلالات الميكروبية تعرضنا إلى أهم الطرق الإحصائية المستخدمة. شمل هذا البحث كذلك أهم طرق الكشف و تقدير إنزيم الليباز . وأخيراً تم تلخيص تقنيات التنقية وخصائص هذا الإنزيم وتطبيقاته الصناعية.

**الكلمات المفتاحية:** الخميرة، العزل، الليباز، طريقة التقدير، الاستخدام الصناعي.

## Study of production of yeast lipase

### **Abstract:**

Lipases are industrially important biocatalysts, in particular microbial lipases, and as a result, the screening, production, purification and characterization of the lipase enzyme from microbial strains is continually emerging to meet the needs of the pharmaceutical and food industries. More recently, various cost-effective and efficient approaches have been attempted to increase lipase production in microbial strains. To this end, this two-part work attempts to study yeast lipase production. The first chapter is on yeast. After having treated the characteristics of yeasts, their reproduction and classification, we discussed their habitat, the isolation and screening of lipase-producing strains on the one hand, and on the other hand, we discussed the factors influencing their growth and their industrial application, notably enzyme production. In the second chapter on lipases, we described the origin of lipase, its structure and mechanism. Then, the production of this enzyme under different fermentation systems was discussed. In addition, the impact of various factors such as carbon sources, nitrogen sources, pH and temperature was evaluated. And we presented the use of statistical designs, with a view to increasing enzyme production from microbial strains. Different methods of lipase assay were revealed. Finally, the purification techniques, the characteristics of this enzyme and its industrial applications were summarized

**Key words:** Yeast, screening, lipase, assay method, industrial use.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction** ..... 1

## Chapitre 1 : les levures

<b>1. Généralité</b> .....	3
<b>2. Caractéristiques</b> .....	3
2.1. Caractéristiques microscopiques.....	3
2.2. Caractéristiques morphologiques .....	5
2.3. Caractères biochimiques.....	5
<b>3. Reproduction</b> .....	6
3.1. Reproduction asexuée .....	6
3.2. Reproduction sexuée .....	7
<b>4. Classification des levures</b> .....	8
<b>5. Habitat</b> .....	11
<b>6. Isolement et screening des levures lipolytiques</b> .....	13
<b>7. Métabolisme</b> .....	15
7.1. Métabolisme oxydatif.....	16
7.2. Métabolisme fermentaire.....	16
7.3. Métabolisme oxydo-réductif.....	17
7.3.1. Effet Crabtree.....	18
7.3.2. Effet Pasteur.....	19
7.3.3. Effet Custer.....	19
7.4. Métabolisme secondaire des levures.....	19
<b>8. Facteurs influençant la croissance des levures</b> .....	19
8.1. Facteurs nutritionnels.....	20
8.1.1. Source de carbone.....	20
8.1.2. Source d'azote.....	21

8.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance.....	22
8.2.Facteurs physico –chimiques.....	23
8.2.1. Effet de la température.....	23
8.2.2. Effet du pH.....	25
8.2.3. Effet de l’oxygène.....	25
8.2.4. Influence de la pression osmotique (PO) et de l’activité de l’eau (aw).....	25
<b>9. Biotechnologie des levures .....</b>	<b>26</b>
9.1. Utilisation alimentaire .....	28
9.2. Utilisation biomédicale .....	28
9.3. Autres utilisations.....	29
<b>10. Production d’enzymes chez les levures .....</b>	<b>29</b>

## **Chapitre 2 : la lipase**

<b>1. Définition.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Origine des lipases.....</b>	<b>31</b>
2.1. Lipases végétales.....	32
2.2. Lipases animales.....	32
2.3.Lipases microbiennes.....	32
<b>3. Substrat de la lipase.....</b>	<b>33</b>
3.1. Nature des substrats hydrolysés .....	33
3.2.Spécificité des lipases.....	34
3.2.1. Typosélectivité.....	34
3.2.2. Régiosélectivité .....	34
3.2.3. Enantiosélectivité .....	34
<b>4. Structure et mécanisme.....</b>	<b>35</b>
4.1. $\alpha/\beta$ hydrolases.....	36
4.2. Conformation et mécanisme d’action des lipases.....	37
4.3. Différentes réactions catalysées par les lipases.....	39
<b>5. Production de la lipase.....</b>	<b>40</b>

5.1 Production de lipase chez les levures.....	40
5.2 Milieux de culture.....	41
5.3. Inoculum.....	41
5.4. Processus de production de lipase .....	42
5.4.1. Fermentations à l'état solide (SSF).....	42
5.4.2. Fermentation à l'état liquide (SMF) .....	42
5.4.3. Culture dans les fioles d'Erlenmeyer .....	43
5.4.4. Culture dans les fermenteurs .....	43
5.5. Facteurs influençant la production de lipase.....	44
5.5.1. Source de carbone .....	44
5.5.2. Source d'azote.....	44
5.5.3. Valorisation des déchets .....	45
5.5.4. Effet de la température et pH sur la production de lipase .....	46
5.5.5. Effet de la vitesse d'agitation .....	47
5.5.6. Effet de la période d'incubation.....	47
5.5.7. Teneur en humidité.....	47
<b>6. Amélioration de la production de la lipase.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Méthode de dosage de la lipase.....</b>	<b>48</b>
7.1. Méthodes qualitatives.....	49
7.2. Méthodes quantitatives.....	49
7.2.1. Méthodes titrimétriques .....	49
7.2.2. Méthodes colorimétriques par spectrométrie .....	50
7.2.3. Dosages enzymatiques par fluorimétrie .....	51
7.2.4. Dosages enzymatiques par radiométrie.....	51
7.3. Autres méthodes.....	51
<b>8. Purification des lipases.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Caractéristiques des lipase .....</b>	<b>54</b>
9.1. Effet de la température .....	54

9.2.Thermostabilité .....	54
9.3.Effet du pH .....	55
9.4.Effet de la source de carbone.....	55
9.5.Effet de la source azotée.....	56
9.6.Inhibiteurs et activateurs de la lipase.....	56
<b>10. Application industriel des lipases.....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>61</b>
Références Bibliographiques	
Résumés	

## Liste des abréviations

<b>ADN :</b>	Acide deoxyribonucléique.
<b>Asp :</b>	Aspartate.
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate.
<b>AG :</b>	Acide gras.
<b>CoA :</b>	Coenzyme A.
<b>DAGs :</b>	Diacylglycérols.
<b>DEAE-sépharose</b>	Diethylaminoethanol-sépharose
<b>DTT :</b>	Dithiothréitol.
<b>E.C :</b>	Enzyme Commission.
<b>ESA :</b>	Gélose au sulfate d'éthanol.
<b>EMP</b>	Emden Meyerhof Parnas.
<b>Glu :</b>	Glutamate.
<b>HPL :</b>	Lipase pancréatique humaine.
<b>H:</b>	Histidine.
<b>KDa:</b>	Kilodalton.
<b>MAGs:</b>	Monoacylglycérols.
<b>nm :</b>	Nanomètre.
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>PDA :</b>	Gélose pomme de terre-dextrose.
<b>PPL :</b>	Lipase pancréatique porcine.
<b>pH :</b>	Potentiel d'Hydrogène.
<b>PMSF :</b>	Phénylméthylsulphonyle fluorure.
<b>PO</b>	Pression osmotique.
<b>PseA :</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
<b>RAL :</b>	Lipase de <i>Rhizopus arrhizu.s</i> .
<b>RMN :</b>	Résonance magnétique nucléaire.
<b>SERRS :</b>	Surface enhanced resonance Raman scattering.
<b>S-S :</b>	Ponts disulfures.
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodécylsulfate-électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

<b>S :</b>	Sérine.
<b>TAGs :</b>	Triacylglycérols.
<b>Tr / min :</b>	Tour par minute.
<b>TG :</b>	Triglycéride.
<b>YEPG :</b>	Glucose-Polypeptone -Extrait de levure -Eau distillée.
<b>YM :</b>	Malt de levure Gélose.
<b>YMA:</b>	Yeast Malt Agar.
<b>YPD:</b>	Yeast extract-Peptone-Dextrose.
<b>YPO:</b>	Yeast extract-Peptone-Huile d'olive.
<b>YPDO:</b>	Yeast extract-Peptone-Dextrose-Huile d'olive.

## Liste des figures

<b><u>Figure 1</u></b> : Vue microscopique de levure <i>saccharomyce cerevisiae</i> .	3
<b><u>Figure 2</u></b> : Représentation schématique d'une cellule de levure.	4
<b><u>Figure 3</u></b> : Filamentation des levures.	4
<b><u>Figure 4</u></b> : Bourgeonnement d'une cellule de levure.	7
<b><u>Figure 5</u></b> : Reproduction sexuée des levures.	8
<b><u>Figure 6</u></b> : Métabolisme respiratoire et fermentaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
<b><u>Figure 7</u></b> : Réactions de voie anaérobie.	16
<b><u>Figure 8</u></b> : Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> est considérée comme « couteau suisse » de l'industrie.	27
<b><u>Figure 9</u></b> : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases.	31
<b><u>Figure 10</u></b> : Hydrolyse du triglycéride par lipase.	34
<b><u>Figure 11</u></b> : Structure tridimensionnelle de lipase B de <i>Candida antarctica</i> .	36
<b><u>Figure 12</u></b> : Pli canonique des hydrolases $\alpha / \beta$ .	37
<b><u>Figure 13</u></b> : Modifications conformationnelles des lipases en présence et en absence de substrat.	38
<b><u>Figure 14</u></b> : Mécanisme catalytique d'hydrolyse d'un ester carboxylique par triade catalytique de lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> .	39
<b><u>Figure 15</u></b> : Réactions catalysées par lipases.	39
<b><u>Figure 16</u></b> : Fermenteur.	43
<b><u>Figure 17</u></b> : Grignon d'olive brut.	46
<b><u>Figure 18</u></b> : Criblage sur plaque d'agar pour lipases.	49
<b><u>Figure 19</u></b> : Représentation schématique du principe de dosage des esters de p-nitrophényliques pour lipase.	50
<b><u>Figure 20</u></b> : Purification de lipase à l'aide d'un système d'affinité.	53

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 1</u></b> : Classification des levures Ascomycètes et Basidiomycètes.	9
<b><u>Tableau 2</u></b> : Hiérarchie taxonomique de levure.	11
<b><u>Tableau 3</u></b> : Habitats naturels des levures.	13
<b><u>Tableau 4</u></b> : Isolement et screening de certaines souches des levures lipolytiques.	14
<b><u>Tableau 5</u></b> : Comparaison des deux types métaboliques chez les levures.	17
<b><u>Tableau 6</u></b> : Classification des levures basée sur la propriété fermentative / la réponse de croissance à la disponibilité de l'oxygène.	18
<b><u>Tableau 7</u></b> : Diversité des sources de carbone pour la croissance de levures.	21
<b><u>Tableau 8</u></b> : Eléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et à leurs fonctions.	22
<b><u>Tableau 9</u></b> : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures.	22
<b><u>Tableau 10</u></b> : Exigences de température des levures.	24
<b><u>Tableau 11</u></b> : Activité de l'eau ( $A_w$ ) minimale pour la croissance de quelques micro-organismes.	26
<b><u>Tableau 12</u></b> : Utilité biotechnologique des levures ascomycètes et Basidiomycète.	27
<b><u>Tableau 13</u></b> : Produits industriels synthétisé par les levures.	28
<b><u>Tableau 14</u></b> : Enzymes industrielles produites par les levures.	29
<b><u>Tableau 15</u></b> : Quelque exemple sur l'origine microbienne de lipase.	33
<b><u>Tableau 16</u></b> : Quelque exemple de la spécificité de lipase.	35
<b><u>Tableau 17</u></b> : Comparaison des deux types de fermentations liquide et solide.	42
<b><u>Tableau 18</u></b> : Stratégies de purification récemment utilisées pour diverses études sur les lipases microbiennes.	54
<b><u>Tableau 19</u></b> : Application des lipases levurienne.	59

# **Introduction**

## Introduction

Ces dernières années, le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique a souligné la nécessité de relier l'université, et en particulier les laboratoires de recherche, avec le domaine industriel. Cette initiative vise à valoriser la recherche scientifique en vue d'accroître la prospérité du pays dans plusieurs domaines : l'industrie, l'agriculture, l'environnement, la nutrition ...etc., et ainsi ces recherches contribuent au développement de l'économie du pays.

Notre travail entre dans le cadre d'un projet de recherche visant la production à faible coût d'enzymes à intérêt industriel. Cette recherche permet certainement l'amélioration de l'économie du fait qu'elle participe à la réduction de l'importation des biocatalyseurs.

La demande accrue d'enzymes industrielles d'origine microbienne, en particulier les lipases, qui ont reçu le moins de priorité jusqu'à une décennie et demie et ont pris beaucoup d'importance ces derniers temps en raison de leurs applications dans une grande variété de domaines tels que l'alimentation, les produits laitiers, la pharmacie, les détergents, le textile, le papier, les industries oléochimiques, de la parfumerie, de la cosmétique, etc (**Dehbi et al., 2016; Avhad et Marchetti, 2019**).

Les lipases sont obtenues à partir des plantes, des animaux et des micro-organismes. Elles catalysent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et en acide gras. Comme les amylases et les protéases, les lipases d'origine microbienne ont une plus grande importance industrielle car elles sont plus stables (par rapport aux lipases végétales et animales) et peuvent être obtenues à faible coût. En effet, les lipases sont largement produites par les micro-organismes, et spécifiquement par les levures et par conséquent, le criblage, la production et la purification de cette enzyme à partir de souches levuriennes émergent continuellement pour répondre aux besoins des industriels. Plus récemment, diverses approches rentables et efficaces sont tentées pour améliorer la production de lipases (**Bharathi and Rajalakshmi, 2019 et Fickers et al., 2005**).

En Algérie, les lipases sont très intéressantes pour les applications biotechnologiques, elles sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des industries locales pour la production de ces enzymes. Le principal obstacle qui freine l'application des lipases repose sur le coût élevé de la de production. Pour cette raison, il est impératif de chercher des

nouvelles voies par l'utilisation des déchets industriels et agroalimentaires afin de diminuer le coût de production (**Bataiche, 2014**).

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. 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**).

La présente étude est portée sur l'étude de de la lipase levurienne à intérêt biotechnologique. Notre intérêt pour les levures se traduit par le fait que ces microorganismes sont intervenants dans divers domaines et l'intérêt qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité. Un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où elles ont été développent. L'ingénierie de ces levures a donc trouvé dans l'industrie de la fermentation des champs d'application privilégié pour produire divers métabolites, des acides gras, des pigments, et des antibiotiques, des biomolécules telles que les enzymes (**Razki, 2014**). Ceci a conduit à l'identification de nouvelles enzymes à partir de nouvelles sources, en se basant, sur diverses méthodes de criblage actuellement disponibles pour l'identification des producteurs de lipases.

Ce manuscrit comprend une première partie sur les levures. Les informations fondamentales que nous y avons apportées renferment : l'origine, la reproduction, la classification ...etc. et nous nous sommes intéressés à l'habitat, l'isolement et le screening des souches lipolytiques, les conditions de leur croissance et leur utilisation en industrie. Dans la deuxième partie, nous avons abordé les connaissances les plus importantes sur la lipase levurienne : l'origine, la structure et le mécanisme d'action, le processus de la production de la lipase, l'amélioration de la production, les différentes méthodes de dosage, la purification, la caractérisation et les applications industrielles.

# **Chapitre 1**

## **Les levures**

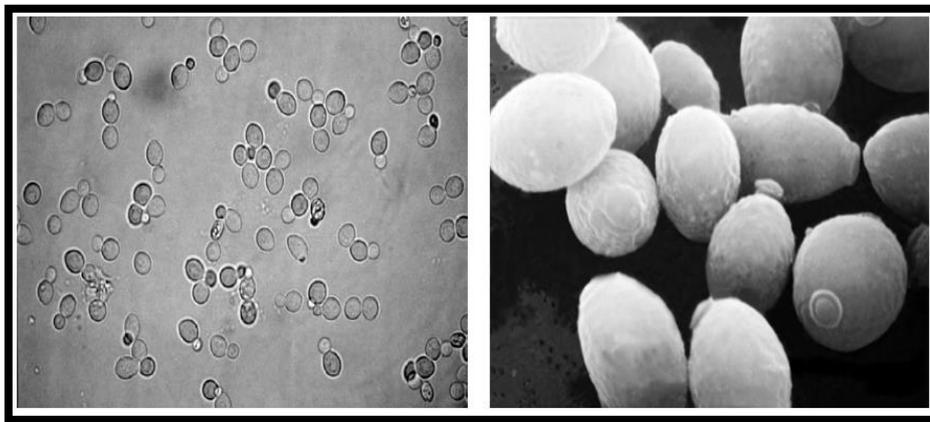
## 1. Généralité

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires de forme sphérique ou ovoïde se multipliant par bourgeonnement. Le terme de levure (du latin *levare* = rendre léger) rappelle ses capacités à « faire lever » les pâtes panifiables.

L'homme a utilisé les propriétés des levures de façon purement empirique. En effet, c'est en Egypte que le premier pain aurait levé par fermentation naturelle d'un mélange de farine et d'eau abandonné pendant plusieurs jours (**Castan, 2016**).

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes qui incluent un groupe hétérogène de microbes représentant les phylums ascomycètes et basidiomycètes. La levure joue plusieurs rôles importants fermentation alimentaire, y compris la production d'alcool, la production et l'utilisation d'acides organiques, amélioration de la saveur, de l'arôme et de la texture, amélioration des propriétés nutritionnelles et réduction des facteurs anti-nutritionnels et des toxines (**Amit et al., 2018**).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure1) est l'organisme eucaryote le plus connu car elle est utilisée depuis longtemps comme modèle en tant qu'outil de recherche fondamentale et appliquée. Elle appartient à la famille des ascomycètes et elle n'est pas pathogène pour l'homme (**Sanchez, 2008**).



**Figure1 :** Vue microscopique de levure *Saccharomyces cerevisiae* (**Cheriet, 2015**).

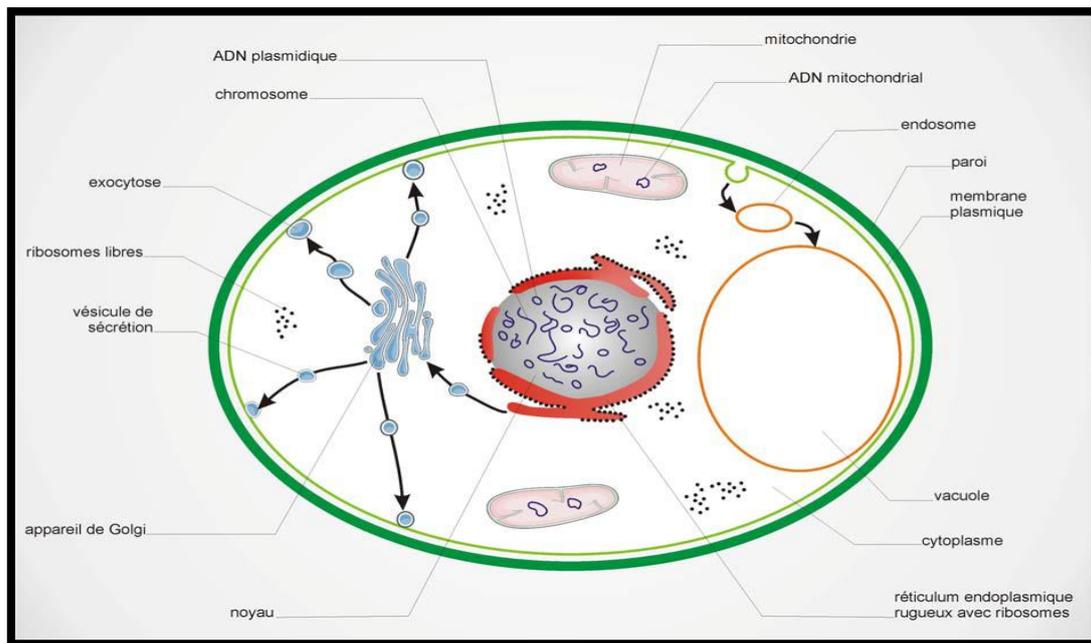
## 2. Caractéristiques

### 2.1. Caractéristiques microscopiques

La levure apparaît comme un organisme modèle dans les études sur les eucaryotes car elle a des caractéristiques ultra structurales similaires à celles des cellules eucaryotes supérieures.

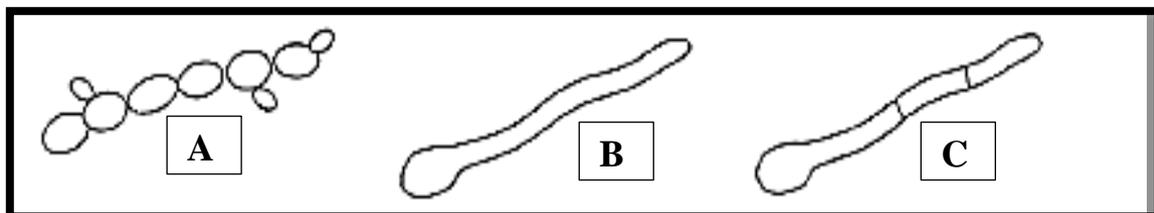
La taille des cellules peut varier considérablement, en fonction des espèces et des conditions de croissance. Certaines levures peuvent être seulement de 2 à 3 µm de longueur, tandis que d'autres peuvent atteindre des longueurs de 20 à 50 µm. La largeur de la cellule semble moins variable, entre 1 et 10 µm. *S. cerevisiae* est généralement de forme ellipsoïde avec un grand diamètre de 5–10 µm et un petit diamètre de 1–7 µm (Walker, 2009).

La cellule de levure possède un vrai noyau et est pourvu d'inclusions cytoplasmiques : mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, ribosomes, vacuoles, et granules de réserves (Figure2) (Guiraud, 1998).



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une cellule de levure (Guiffant, 2008).

Les cellules peuvent rester accolées et donner naissance à un pseudomycélium ou même un vrai mycélium (Figure3) (Guiraud, 1998).



**Figure 3 :** Filamentation des levures. A : pseudomycélium ; B : vrai mycélium ; C : vrai mycélium cloisonné (Guiraud, 1998).

## 2.2. Caractéristiques morphologiques

La caractérisation morphologique des colonies des levures est basée sur la texture, la couleur, la surface, l'élévation et la marge (**Kurtzman *et al.*, 2011**).

- **Texture :** Elle est mucoïde, fluide ou visqueuse, butyreuse, friable ou membraneuse. La croissance mucoïde est fréquemment associée à l'encapsulation de cellules provenant de la production de polysaccharides extracellulaires ; la croissance membraneuse résulte généralement d'une formation abondante d'hyphes ou de pseudohyphes.
- **Couleur :** La présence de pigments caroténoïdes non diffusibles rouges, orange ou jaunes est caractéristique de certains genres, par exemple, *Phaffia*, *Rhodospiridium* et *Sporidiobolus*. Autres levures, telles que *Metschnikowia pulcherrima*, certaines espèces de *Kluyveromyces* et certains mutants de *Saccharomyces* nécessitant l'adénine, produisent des pigments rouge foncé diffusibles et non caroténoïdes. La majorité des levures, cependant, produisent une croissance dont la couleur varie du blanc à la crème au bronzage.
- **Surface :** Elle peut être brillante ou terne, lisse, rugueuse, sectorisée, pliée, striée. Les souches lisses lorsqu'elles sont isolées pour la première fois deviennent parfois rugueuses lorsqu'elles sont maintenues sur gélose. Ce changement s'accompagne, dans certains cas, d'un changement de texture de butyreux à membraneux. Une nouvelle rupture entraîne généralement, une fois de plus, la formation de colonies lisses et rugueuses.
- **Élévation :** La croissance est plate, déprimée au centre, surélevée et en forme de dôme, ou conique.
- **Marge :** le bord de la colonie apparaît entier, ondulé, lobé, érigé ou frangé d'hyphes ou de pseudohyphes.

## 2.3. Caractères biochimiques

Les levures étant dépourvues de chlorophylle sont incapables de produire les composés organiques nécessaires à leur croissance. Elles sont donc saprophytes et quelques fois parasites. Pour leur croissance, elles ont besoin d'oxygène, de sources organiques de carbone, d'azote minéral ou organique, de divers minéraux, d'une température et d'un pH adéquats. Certaines d'entre elles ont également besoin d'un ou plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B1), la biotine (vitamine B8), l'inositol (vitamine B7), l'acide pantothénique (vitamine B5) et d'autres facteurs de croissance.

Toutes sont capables d'utiliser le D-glucose, le D-fructose et le D-mannose. Certaines levures produisent des lipides telles que *Lipomyces starkeyi* alors que d'autres ont plutôt une activité lipolytique comme *Candida rugosa*. Il a été révélé que les levures du genre *Cryptococcus* et *Rhodotorula* utilisent de nombreux substrats carbonés par voie oxydative (**Belmaziz et Djalal, 2017**).

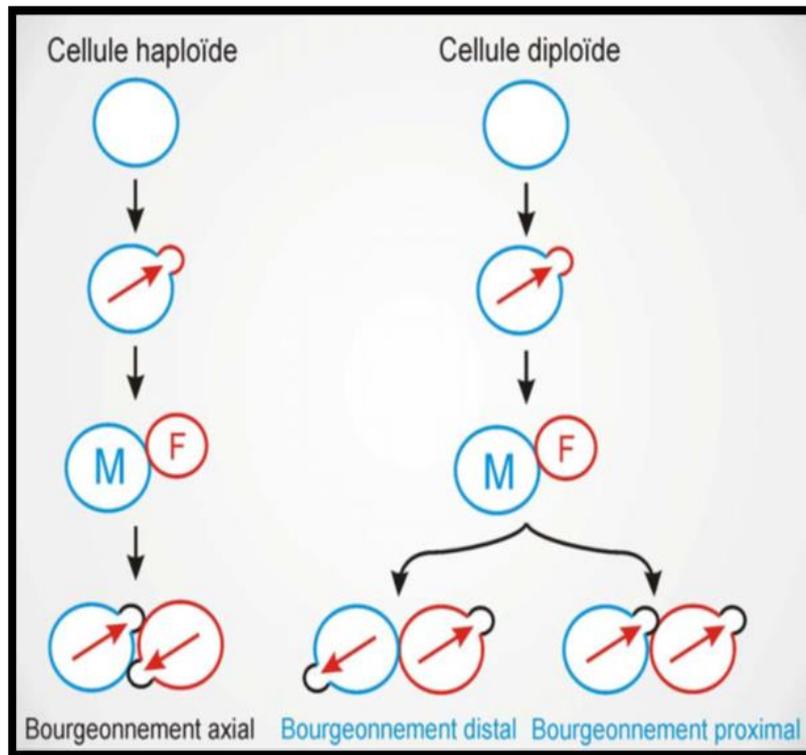
### 3. Reproduction

La levure existe sous deux formes diploïde ou haploïde qui peuvent suivre deux types de divisions cellulaires : la reproduction végétative (asexuée) et la reproduction sexuée. La ploïdie est la répétition de chromosome. Les cellules sont haploïdes lorsqu'elles contiennent un seul exemplaire de chromosomes ( $n$  chromosomes). Au contraire, les cellules avec des chromosomes en double exemplaire ( $2n$  chromosomes) sont diploïdes. La reproduction cellulaire est différente en fonction du génotype de la construction cellulaire (**Nguyen, 2016**).

#### 3.1. Reproduction asexuée

La croissance végétative de *S. cerevisiae* concerne aussi bien les cellules haploïdes que les cellules diploïdes et c'est sur ce principe que les levures utilisées en laboratoire sont «cultivées». La reproduction végétative nous mène à la notion de cycle cellulaire. En effet, une cellule mère est capable de donner naissance à une cellule fille identique en termes de contenu chromosomique.

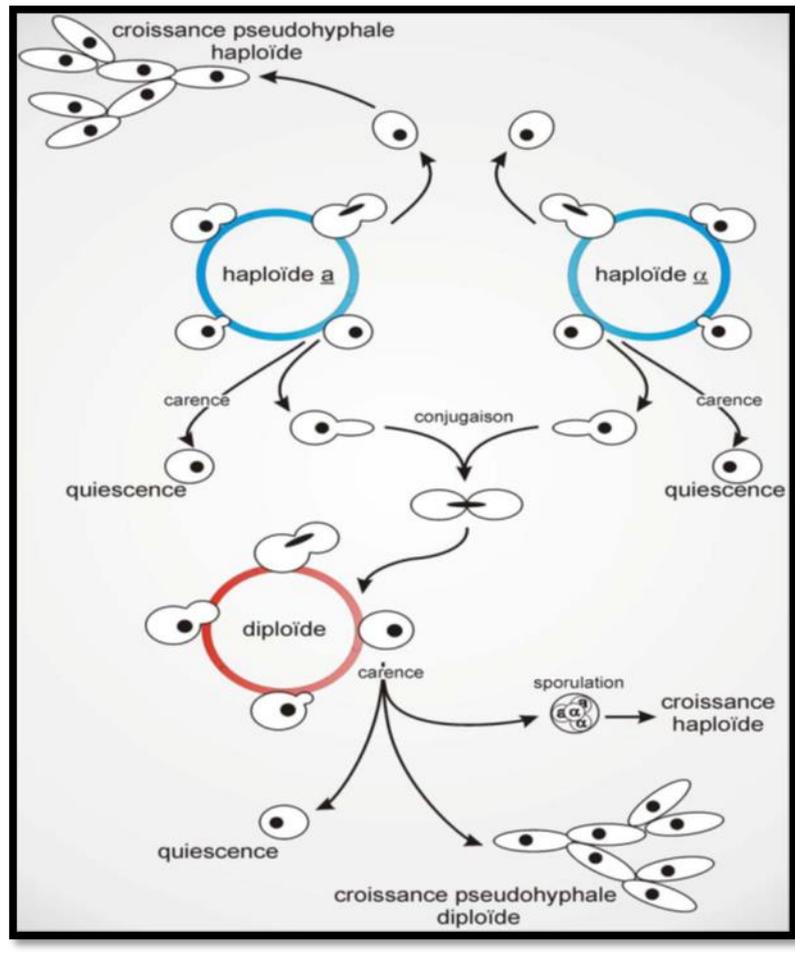
*Saccharomyces cerevisiae* se divise par bourgeonnement, d'où le terme de « levure bourgeonnante » retrouvé dans nombre d'ouvrages et de publications. Ce bourgeonnement est axial dans le cas des cellules haploïdes : un nouveau bourgeon se forme préférentiellement à proximité du site précédent de bourgeonnement (marqué par une cicatrice). En ce qui concerne les cellules diploïdes, ce bourgeonnement est bipolaire : le nouveau bourgeon peut apparaître soit à côté du précédent site de bourgeonnement (on parle de bourgeonnement proximal), soit à son opposé (il s'agit de bourgeonnement distal) (Figure 4). Il est à noter que les cellules filles favorisent le bourgeonnement au pôle distal (**Guiffant, 2008**).



**Figure 4 :** Bourgeoisement d'une cellule de levure (Guiffant, 2008).

### 3.2.Reproduction sexuée

En plus de la croissance végétative, *S. cerevisiae* est capable d'avoir une reproduction sexuée. Des cellules haploïdes sont capables de se comporter comme des gamètes et de former un zygote diploïde : ce phénomène est appelé conjugaison. Pour cela, chaque partenaire sexuel haploïde émet des phéromones sexuelles dans le milieu. Ce sont des petits peptides appelés facteur a ou facteur  $\alpha$ , ce sont eux qui déterminent le type sexuel (ou haplotype) d'une souche haploïde. Ils se lient à des récepteurs exposés à la membrane des cellules de type sexuel opposé. Le zygote, formé par conjugaison, pourra alors croître de manière végétative par le biais de mitoses successives. A l'état naturel, c'est le mode de croissance privilégié par la levure *S. cerevisiae*. En effet, la sporulation n'a lieu que pour passer à l'état de spores qui sont une forme de résistance aux carences et aux stress ; la conjugaison n'est utilisée que pour revenir à l'état diploïde lorsque les conditions de croissance sont redevenues convenables (Figure 5) (Guiffant, 2008).



**Figure 5 :** Reproduction sexuée des levures (Guiffant, 2008).

#### 4. Classification des levures

Grâce au développement des techniques d'analyse, Lodder (1971) a pu établir une classification des levures basée sur les critères morphologiques, culturels, sexuels et physiologiques. Cependant, l'isolement de nouvelles souches, ainsi que l'avènement des biotechnologies ont permis par la suite à Kreger-Van Rij en (1984) de réactualiser cette classification qui, outre les critères cités plus haut, repose sur l'étude de certains organites (exemple : le noyau, l'ADN). Cette classification est devenue actuellement une référence et comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (Kreger-Van, 1984).

Les levures se divisent en 3 grandes classes : Les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes ou levures imparfaites (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Classification des levures Ascomycètes et Basidiomycètes (Labrani, 2015).

<b>Ascomycètes</b>			
<i>Schizosaccharomycetes</i>	<i>Dipodascopsis</i>	<u><i>Saccharomycodaceae</i></u>	<i>Komagataella</i>
<i>Schizosaccharomycetales</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Kuraishia</i>
<u><i>Schizosaccharomycetaceae</i></u>	<i>Myxozyma</i>	<i>Kloeckera</i>	<i>Lodderomyces</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Zygozoma</i>	<i>Saccharomycodes</i>	<i>Lindnera</i>
	<u><i>Metschnikowiaceae</i></u>	<u><i>Saccharomycopsidaceae</i></u>	<i>Macrorhabdus</i>
<i>Saccharomycetes</i>	<i>Clavispora</i>	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Meyerozoma</i>
<i>Saccharomycetales</i>	<i>Metschnikowia</i>	<u><i>Trichomonascaceae</i></u>	<i>Millerozoma</i>
<u><i>Ascoideaceae</i></u>	<u><i>Pichiaceae</i></u>	<i>Spencermartinsiella</i>	<i>Nakazawaea</i>
<i>Ascoidea</i>	<i>Brettanomyces</i>	<i>Trichomonascus</i>	<i>Ogataea</i>
<i>Cephaloascaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Wickerhamiella</i>	<i>Pachysolen</i>
<i>Cephaloascus</i>	<i>Peterozyma</i>	<i>Saccharomycetales incertae sedis</i>	<i>Phaffomyces</i>
<u><i>Dipodascaceae</i></u>	<i>Pichia</i>	<i>Aciculoconidium</i>	<i>Priceomyces</i>
<i>Dipodascus</i>	<i>Saturnispora</i>	<i>Ambrosiozoma</i>	<i>Scheffersomyces</i>
<i>Galactomyces</i>	<u><i>Saccharomycetaceae</i></u>	<i>Arxula</i>	<i>Schizoblastosporion</i>
<i>Geotrichum</i>	<i>Kazachstania</i>	<i>Ascobotryozyma</i>	<i>Schwanniomyces</i>
<u><i>Endomycetaceae</i></u>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Babjeviella</i>	<i>Sporopachydermia</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Lachancea</i>	<i>Barnettozoma</i>	<i>Starmerella</i>
<i>Helicogonium</i>	<i>Nakaseomyces</i>	<i>Blastobotrys</i>	<i>Starmera</i>
<i>Myriogonium</i>	<i>Naumovia</i>	<i>Botryozyma</i>	<i>Sympodiomyces</i>
<i>Phialoascus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Trigonopsis</i>
<u><i>Eremotheciaceae</i></u>	<i>Tetrapisispora</i>	<i>Citeromyces</i>	<i>Wickerhamia</i>
<i>Coccidiascus</i>	<i>Torulaspora</i>	<i>Cyniclomyces</i>	<i>Wickerhamomyces</i>
<i>Eremothecium</i>	<i>Vanderwaltozyma</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Yamadazyma</i>
<u><i>Lipomycetaceae</i></u>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Hyphopichia</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Babjevia</i>	<i>Zygorulaspora</i>	<i>Kodamaea</i>	<i>Zygoascus</i>

<b>Basidiomycètes</b>			
<i>Hymenomycetes</i>	<i>Bulleribasidium</i>	<i>Sterigmatomyces</i>	<i>Ustilaginomycetes</i>
<i>Cystofilobasidiales</i>	<i>Bulleromyces</i>	<i>Microbotryales</i>	<i>Malassezia</i>
<u><i>Cystofilobasidiaceae</i></u>	<i>Cryptococcus</i>	<u><i>Microbotryaceae</i></u>	<i>Pseudozyma</i>
<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Cuniculitrema</i>	<i>Bensingtonia</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Dioszegia</i>	<i>Curvibasidium</i>	<i>Sympodiomyces</i>
<i>Guehomyces</i>	<i>Fellomyces</i>	<i>Leucosporidiella</i>	<i>Tilletiopsis</i>
<i>Itersonia</i>	<i>Filobasidiella</i>	<i>Leucosporidium</i>	
<i>Mrakia</i>	<i>Holtermannia</i>	<i>Mastigobasidium</i>	
<i>Phaffia</i>	<i>Kockovaella</i>	<i>Reniforma</i>	
<i>Tausonia</i>	<i>Sirobasidium</i>	<i>Rhodosporidium</i>	
<i>Udeniomyces</i>	<i>Sterigmatosporidium</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Xanthophyllomyces</i>	<i>Tremella</i>	<i>Sporobolomyces</i>	
<i>Filobasidiales</i>	<i>Trimorphomyces</i>	<i>Naohideale</i>	
<u><i>Filobasidiaceae</i></u>	<i>Tsuchiyaea</i>	<i>Bannoa</i>	
<i>Cryptococcus</i>		<i>Erythrobasidium</i>	

<i>Filobasidium</i>	<i>Uredinomyces</i>	<i>Naohidea</i>	
<i>Trichosporonales</i>	<i>Agaricostilbales</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Trichosporonaceae</i>	<i>Agaricostilbaceae</i>	<i>Sakaguchia</i>	
<i>Cryptococcus</i>	<i>Agaricostilbum</i>	<i>Sporobolomyces</i>	
<i>Cryptotrichosporon</i>	<i>Bensingtonia</i>	<i>Sporidiobolales</i>	
<i>Trichosporon</i>	<i>Chionosphaera</i>	<i>Sporidiobolaceae</i>	
<i>Tremellales</i>	<i>Kondoa</i>	<i>Rhodospordium</i>	
<i>Tremellaceae</i>	<i>Kurtzmanomyces</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Auriculibuller</i>	<i>Sampaio</i>	<i>Sporidiobolus</i>	
<i>Bullera</i>	<i>Sporobolomyces</i>		

Toutefois, la classification de référence actuelle est celle de Kurtzman, Fell et Boekhout (2011), elle classe les levures en six grands phylums (division ou embranchement) (**Kurtzman et al., 2011**) :

**1-Ascomycota** : Genre Ascosporeux et sexué, résultant de la transformation d'une cellule après la méiose.

**2-Basidiomycota** : Réalise une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

**3- Deuteromycota** : Connus sous le nom de *Fungi imperfecti* (levures imparfaites), ces levures sont caractérisées par la reproduction végétative.

**4- Zygomycota** : Possède des zygospores (fusion de deux gamétanges), un mycélium siphonné, sans cloison.

**5- Glomeromycota** : N'ayant ni reproduction sexuée, ni mycélium siphonné, et non cloisonné.

**6- Chytridiomycota** : Ayant des zoospores (spores flagellées) à une flagelle et sans mycélium.

#### 4.1.Taxonomies

Les règles de taxonomie des levures et d'autres champignons relèvent de l'autorité du Code international de nomenclature botanique. La version la plus récente du Code a été adoptée au dix-septième Congrès botanique international (**Kurtzman et al., 2011**).

L'espèce de levure la plus exploitée commercialement est *S. cerevisiae* (Levure de boulanger). Elle appartient à la subdivision du royaume fongique Ascomycotina. Le tableau 2 résume la hiérarchie taxonomique de *S. cerevisiae* (comme exemple de levure) (**Walker, 2009**).

**Tableau 2 :** Hiérarchie taxonomique de la levure (Walker, 2009).

Catégorie taxonomique	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Royaume	Fungi
Division	<i>Ascomycota</i>
Subdivision	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Hemiascomycete</i>
Ordre	<i>Endomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Sous-famille	<i>Saccharomyetoideae</i>
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Cerevisiae</i>

Les autres genres de levure sont classés sous Basidiomycotina (par exemple, *Cryptococcus* spp et *Rhodotorula* spp et *Deuteromycotina* (par exemple, *Candida* spp. et *Brettanomyces* spp) (Walker, 2009).

### 5. Habitat des levures

Les levures sont largement distribuées dans tous les biomes du monde. Elles ont été trouvées dans les niveaux supérieurs de l'atmosphère (au-dessus des nuages de stratosphère), les parties les plus profondes des océans, les aquifères sous-marins, les anciennes glaces glaciaires et elles sont abondantes dans toute la phyllosphère. Les levures sont associées aux virus, bactéries, autres champignons, algues, plantes vasculaires et animaux (Starmer et Lachance, 2011) Les levures ont été isolées de différentes niches (Tableau 3) :

#### ➤ Sols

Le sol est un réservoir pour la survie à long terme de nombreuses levures, plutôt qu'un habitat pour la croissance. Cependant, les levures sont omniprésentes dans les sols cultivés (environ 10000 cellules de levure par gramme de sol) peuvent se trouvent dans la partie supérieure, couches de sol aérobies (10–15 cm) (Walker, 2009) et aussi elles peuvent isoler de la profondeur du sol jusqu'à 35 cm (Labani, 2015).

### ➤ **Eaux**

Les levures prédominent dans les couches superficielles des eaux douces et salées, mais ne sont pas présentes en grand nombre (environ 1000 cellules par litre). De nombreux isolats de levures aquatiques appartiennent à des genres à pigments rouges (**Walker, 2009**).

### ➤ **Atmosphère**

On peut s'attendre à quelques cellules de levure viables par mètre cube d'air. La dispersion des levures à partir du sol est assurée par le vecteur car celles-ci n'étant pas mobiles (**Dassy, 2018 et Walker, 2009**).

### ➤ **Plantes**

L'interface entre les nutriments solubles des plantes (sucres) et le monde septique sont des niches favorisées par les levures. La propagation des levures sur la phyllosphère est facilitée par des insectes (par exemple, *Drosophila spp*). Cependant, quelques levures sont des agents pathogènes des plantes. La présence de nombreux composés organiques en surface et dans les zones en décomposition (exsudats, fleurs, fruits, phyllosphère, rhizosphère et zones nécrotiques) crée des conditions favorables à la croissance de levures, (**Walker, 2009**).

Par exemple le cas de banane il existe peu d'informations sur la microflore des levures à la surface des bananes des Philippines. Par conséquent, les bananes des Philippines représentent une source inexploitée de souches de levure. Les souches de levures de cet environnement peuvent donner des produits précieux tels que des enzymes et d'autres molécules bioactives (**Gana et al., 2014**).

### ➤ **Animaux**

Quelques espèces de levures sont commensales des intestins et de la peau des animaux. Plusieurs espèces sont pathogènes pour l'homme. De nombreuses levures sont commensales des insectes qui sont de bons vecteurs pour leur distribution (**Dassy, 2018**).

### ➤ **Bâtiments**

Les levures sont assez omniprésentes dans les bâtiments. Leur présence, aussi, a été révélée sur le papier peint domestique (**Walker, 2009**).

**Tableau 3 :** Habitats naturels des levures.

Habitat	Exemples	Références
Atmosphère	<i>Cryptococcus spp.</i> , <i>Debaryomyces spp.</i> , <i>Rhodotorula spp.</i> et <i>Sporobolomyces spp.</i>	Walker, 2009
Tractus intestinal et peau des animaux à sang chaud	<i>Candida albicans</i>	Walker, 2009
Surface des bananes	<i>Pichia anomala</i> <i>Pseudozyma pruni</i>	Gana <i>et al.</i> , 2014
Produits laitiers	<i>Debaryomyces spp.</i> , <i>Yarrowia spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Zygosaccharomyces spp.</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Capece <i>et al.</i> , 2020 et Capece and Romano, 2009
Eaux	<i>Rhodotorula spp.</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Walker, 2009
Sol	<i>Lipomyces spp.</i> et <i>Schwanniomyces spp.</i>	Walker, 2009
Bâtiments	<i>Aureobasidium spp.</i> (levure noire)	Walker, 2009

## 6. Isolement et screening des levures lipolytiques

Les levures susceptibles de produire des lipases sont récupérées à partir d'une large gamme d'habitats spécifiques y compris les déchets des huiles végétales et de produits laitiers, sols contaminés par les huiles, les graines et détériorés alimentaire .Cela indique que la nature offre un énorme potentiel pour identifier de nouvelles sources de lipases avec de nouvelles propriétés. La recherche de micro-organismes aux propriétés lipolytiques souhaitées est toujours en continue à partir de sources naturelles (**Kurtzman *et al.*, 2011 ; Salihau, 2012**).

Les techniques d'isolement sont souvent réalisées pour la récupération des levures, en utilisant des milieux qui permettent aux levures de se développer, tout en supprimant les moisissures et les bactéries. Ces milieux exploitent le fait que les levures sont généralement capables de se développer à des niveaux de pH et des activités de l'eau qui réduisent ou inhibent la croissance de bactéries (**Kurtzman *et al.*, 2011**).

Parmi les levures, *Candida sp* est le producteur de lipase le plus potentiel rapporté dans la littérature. Alors que, la lipase produite par *Candida rugosa* est devenue rapidement l'une des enzymes industrielles les plus utilisées en raison de sa haute activité, aussi bien en hydrolyse qu'en synthèse. D'autres levures ont été, aussi, signalées à être de puissants producteurs de lipases à savoir : *Trichosporon asahii*, *Candida cylindracea*, *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* (**Salihau, 2012**).

Cette popularité dans l'industrie a provoqué une demande de nouvelles sources de lipases avec des caractéristiques catalytiques alternatives, ce qui stimule l'isolement et la sélection de nouvelles souches levuriennes lipolytiques (Tableau 4) (Salgado *et al.*, 2019).

**Tableau 4 :** Isolement et screening de certaines souches de levures lipolytiques.

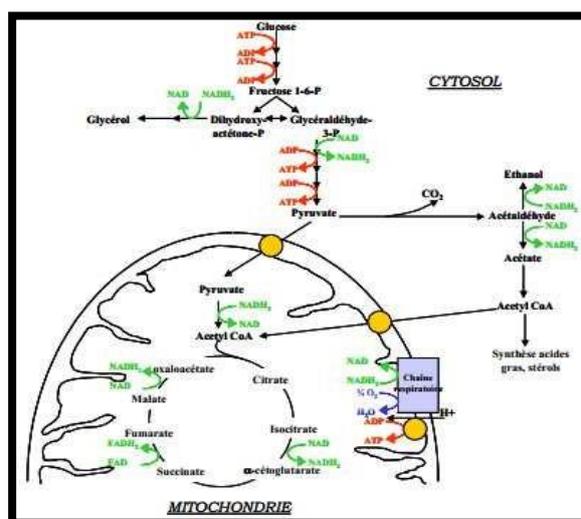
Echantillons	Milieu d'isolement	Criblage	Souches productrices de lipase	Référence
- Boues actives - Sol et eaux usées provenant des raffineries - Sol contaminés par le pétrole	Extrait de levure - extrait de malt - Gélose (YMA).	Sur milieu gélosé additionné de la tributyrine  Les isolats présentant une zone claire sont sélectionnés pour l'identification et la production de lipase par fermentation submergée SmF.	<i>Rhodotorula slooffiae</i> , <i>Candida davisiana</i> , <i>Cryptococcus diffluens</i> et <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> .  <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Rhodotorula muciloginosa</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .	Yalçın <i>et al.</i> , 2013.
Eaux usées des moulins de production d'huile d'olive situé dans la région sud du Portugal.	Extrait de levure - extrait de malt - Gélose (YMA).	Trois différentes méthodes sont utilisées  <b>1/ Tween 20 agar :</b> L'activité lipasique a été détectée par l'hydrolyse du Tween-20 (zone claire).  <b>2/- Test de la tributyrine :</b> Positif si formation de précipités et absence de turbidité.  <b>3/ Test de Rouge de Phénol :</b> Positif si changement de couleur autour du disque.	<i>Magnusiomyces capitatus</i> .	Salgado <i>et al.</i> , 2019.
Pelures de banane	Gélose au sulfate d'éthanol (ESA).	Méthode décrite par Hrraring (1998) : Utilisation du milieu de Sierra avec du tween 80 : Positif si formation de Précipités autour des colonies de levures	<i>Pseudozyma pruni</i> - <i>P. prolifica</i> - <i>P. hubeiensis</i> - <i>Brandoniozyma spp.</i> - <i>Pichia anomala</i> - <i>P. prolifica</i> .	Gana <i>et al.</i> , 2014.
Effluent de réfrigérateur d'abattoir et effluents d'huilerie.	Gélose Sabouraud.	-Test selon Hankin et Anagnostakis (1975) Tween-20 ou Tween-80 : Positif si formation des halos mesurés par l'indice enzymatique (IE).	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> .	Knob <i>et al.</i> , 2020.

Phylloplan d' <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (Brésil)	Gélose YEPG.	Test réalisé dans des tubes contenant de la levure et 0,5% de Tween 20 : Positif si croissance indiquée la présence d'une activité enzymatique. Les souches sélectionnées sont alors testées avec des matières premières bon marché (huile de soja ou graisse bovine).	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> - <i>Debaryomyces occidentalis</i> - <i>cryptococcus spp.</i> – <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> .	<b>Bussamara et al., 2010.</b>
--	--------------	--	--	--------------------------------

## 7. Métabolisme

Le métabolisme chez les levures comprend deux types de catabolisme énergétique, la voie respiratoire et la voie fermentaire. Ces deux voies peuvent se déclencher selon plusieurs facteurs génétiques, environnementaux et nutritifs. Mais c'est la concentration du substrat (glucose) et l'aération (l'oxygène) qui déterminent principalement l'orientation du métabolisme et jouent un rôle important dans les mécanismes de régulation et d'activation. (Cheriet, 2015).

La première étape de transformation du glucose suit la voie d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) aussi appelée la glycolyse. Cette étape qui se déroule dans le cytosol est commune pour la respiration et la fermentation (Figure 6). Elle comprend une série de dix réactions, chacune catalysée par une enzyme spécifique. La glycolyse conduit à la formation de deux molécules de pyruvate à partir duquel les voies de respiration ou de fermentation seront activées (Castro Martinez, 2007).



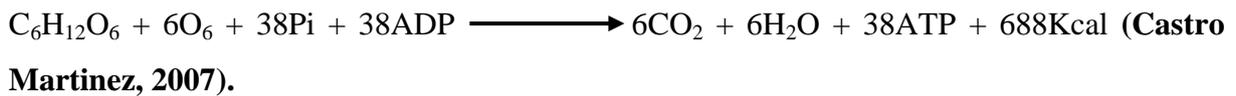
**Figure 6 :** Métabolisme respiratoire et fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Gervasio, 2008).

### 7.1. Métabolisme oxydatif

Pour la voie aérobie, la levure se sert de la respiration pour métaboliser les glucides en dioxyde de carbone et en eau (**Dickinson and Schweizer, 2004**). Cette voie a trois fonctions principales :

- la production d'ATP
- la régénération du cofacteur  $\text{NAD}^+$
- la formation de radicaux carbonés intermédiaires pour les biosynthèses cellulaires.

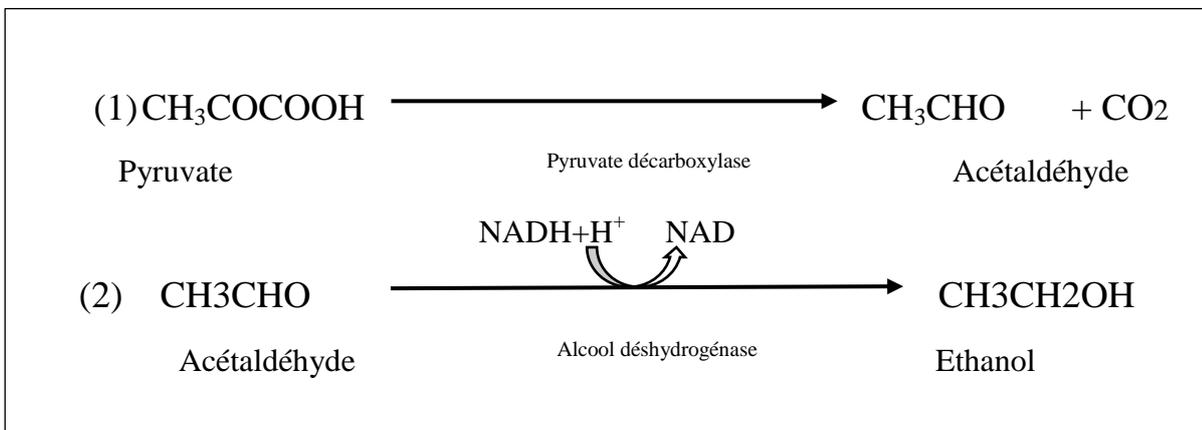
La respiration est obtenue en trois étapes : le pyruvate est transformé en acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase, puis l'acétyl-CoA formée rentre dans le cycle de Krebs (qui se déroule dans la mitochondrie), et finalement la chaîne respiratoire est active. Le bilan aérobie théorique est :



### 7.2. Métabolisme fermentaire

Pour la voie anaérobie, le microorganisme fermente les glucides et produit de l'éthanol et du  $\text{CO}_2$ . (Métabolisme en l'absence de dioxygène) (**Dickinson and Schweizer, 2004**).

L'acide pyruvique produit à la fin de la glycolyse est décarboxylé en acétaldéhyde lui-même réduit en éthanol grâce au  $\text{NADH}^+$  formé au cours de l'oxydation du glycéraldéhyde-3 phosphate. Ces deux réactions sont couplées et constituent un mécanisme d'oxydoréduction (Figure7) (**Castro Martinez, 2007**).



**Figure 7 :** Réactions de voie anaérobie (**Castro Martinez, 2007**).

Le bilan anaérobie théorique est :



Cette voie en comparaison avec la voie respiratoire montre un très faible gain énergétique (2 ATP/par glucose) puisque le gain est seulement lié à la seule phosphorylation au niveau du substrat (glycolyse) et la chaîne respiratoire qui donne 36 ATP n'est pas active.

Le rendement théorique en éthanol est de 0.51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (acide acétique, substance de réserve) limitent ce rendement à 80-90% de sa valeur théorique. Dans ces conditions, le rendement en biomasse est de l'ordre de 0.10 g/g de glucose (**Castro Martinez, 2007**).

Cependant une comparaison des deux types métaboliques est récapitulée dans le tableau suivant :

**Tableau 5 :** Comparaison des deux types métaboliques chez les levures (**Hencke, 2000**).

	Type respiratoire	Type fermentaire
	Métabolisme respiratoire en aérobiose	Métabolisme fermentaire même en aérobiose
<b>Utilisation du glucose en aérobiose</b>	< 30 %	> 90 %
<b>Transformation totale du glucose en</b>	CO <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O	Ethanol + CO <sub>2</sub>
<b>Rendement énergétique</b>	Elevé	Faible
<b>Utilisation du glucose dans la synthèse de biomasse</b>	Peu	Importante
<b>Exemples</b>	Majorité des levures	<i>Saccharomyces</i> , <i>Schiosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , et <i>Kloeckera</i>

### 7.3.Métabolisme oxydo-réductif

En présence d'oxygène certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ont la particularité de présenter un métabolisme mixte : fermentation (production fermentaire d'éthanol) et respiration (production oxydative de biomasse) (Tableau 6) (**Benamoune, 2017**).

### 7.3.1. Effet Crabtrère

Découvert en 1929, l'effet Crabtrère (répression catabolique) a été décrit comme un processus fermentaire avec inhibition de la respiration en présence d'oxygène quand la concentration en glucose atteint un certain seuil. Ainsi la levure passe d'un métabolisme purement oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif (**Cheriet, 2015**).

Une levure sera considérée comme « Crabtrère positive » si on observe pour des fortes concentrations de glucose une répression de son métabolisme oxydatif et donc une formation d'éthanol. En revanche, les levures qui sont susceptibles de fonctionner en métabolisme oxydatif (respiration) même à de très fortes teneurs en sucre sont dites « Crabtrère négatives ». Les levures du genre *Saccharomyces* et *Brettanomyces* sont considérées comme Crabtrère positives (**Castro Martinez, 2007**).

**Tableau 6 :** Classification des levures basée sur la propriété fermentative / la réponse de croissance à la disponibilité de l'oxygène (**walker, 2018**).

Mode d'énergie Métabolisme	Exemples	commentaires
Fermentaire obligatoire	Levures : <i>Candida pintolopesii</i> ( <i>Saccharomyces telluris</i> )	➤ Levures d'origine respiratoire déficientes. Fermenter seulement, même dans la présence d'oxygène.
Facultativement fermentatif <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crabtrère-positif</li> <li>• Crabtrère-négatif</li> <li>• Non fermentaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>• <i>Candida utilis</i></li> <li>• <i>Rhodotorula rubra</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ces levures fermentent principalement des milieux riches en sucre en présence d'oxygène (respiro-fermentation).</li> <li>➤ Ces levures ne forment pas d'éthanol dans des conditions aérobies et ne peuvent pas grandir en anaérobie.</li> <li>➤ Ces levures ne produisent pas d'éthanol, que ce soit en présence ou en l'absence d'oxygène.</li> </ul>
Respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida</i>,</li> <li>• <i>Kluyveromyces</i>,</li> <li>• la plupart des <i>Pichia</i> et <i>Hansenula</i></li> <li>• Quelques espèces de <i>Torulopsis</i></li> </ul>	➤ En présence d'oxygène, la levure se sert de la respiration pour métaboliser les glucides en CO <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O.

### 7.3.2 Effet Pasteur

La croissance de levures en aérobiose et anaérobiose a été comparée pour la première fois par Pasteur. Il a constaté une inhibition de la fermentation par la respiration. C'est à-dire, pour de faibles concentrations en sucre, l'aération induit une augmentation de la quantité de biomasse formée, une diminution de la production d'alcool et de la consommation de sucre : c'est l'effet Pasteur (**Castro Martinez, 2007**).

### 7.3.2. Effet Custer

Ce phénomène se rencontre chez certaines levures, en particulier du genre *Brettanomyces*. Elles fermentent le glucose plus rapidement en présence d'oxygène qu'en anaérobiose. L'effet Custer est le résultat de la formation excessive de NADH, due à la formation de l'acide acétique qui provoque un déséquilibre redox (NAD<sup>+</sup>/NADH) et de l'incapacité à produire du glycérol. Ce phénomène a été justifié de la façon suivante : en présence d'oxygène la cellule pourrait plus facilement réoxyder ses coenzymes réduits dans la chaîne respiratoire, lui permettant d'augmenter le flux glycolytique. En revanche, *Saccharomyces* n'est pas sensible à l'effet Custer et montre une activation de la fermentation en absence d'oxygène (Effet Pasteur) (**Castro Martinez, 2007**).

## 7.4. Métabolisme secondaire des levures

Les levures synthétisent de nombreuses molécules aromatiques ou organoleptiques, que l'on peut répartir en huit familles principales : alcools supérieurs, acides organiques, esters, phénols volatils, aldéhydes et cétones, composés soufrés, terpènes et lactones. Un composé est dit organoleptique s'il agit sur les sens, en l'occurrence ici le goût et l'odorat. Mais la situation est complexe, car un arôme donné peut dépendre d'un mélange de substances organoleptiques plutôt que d'une molécule particulière. De plus, il y a des effets de synergie ou de masquage provoqués par d'autres composés non organoleptiques (**Dassy, 2018**).

## 8. Facteurs influençant la croissance des levures

La croissance est une période d'interaction entre la cellule et son environnement qui lui fournit les éléments nécessaires (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les levures sont des organismes vivants dont l'activité requiert des apports nutritionnels nécessaires à la synthèse des éléments de base qu'elles dégradent à l'aide d'enzymes exocellulaires appropriées pour diverses activités métaboliques, y compris la reproduction des cellules. Ces nutriments doivent être présents dans le milieu de culture en concentration

optimale pour éviter toute carence susceptible de limiter l'activité cellulaire. En outre, plusieurs facteurs environnementaux tels que : la température, le pH et l'aération influencent le développement des levures (**Bennamoun, 2017**).

### **8.1.Facteurs nutritionnels**

Les cellules de levures ont besoin de macronutriments (sources de carbone, d'azote, d'oxygène, de soufre, de phosphore, de potassium et de magnésium) (Tableau 8) au niveau millimolaire dans les milieux de croissance et ils nécessitent des oligo-éléments (par exemple,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , et  $\text{Zn}^{2+}$ ) au niveau micromolaire (**Walker, 2009**).

Certaines d'entre elles ont besoin d'une ou plusieurs vitamines, dont la biotine, la thiamine, l'acide pantothénique (ou la  $\beta$  alanine) et plus rarement l'inositol. Par contre, il est fréquent que les vitamines soient de bons activateurs de la croissance sans être rigoureusement indispensables (**Delcourt, 2011**).

La capacité de la levure de croître rapidement et sa possibilité d'assimiler comme substrats les matières premières bon marché ont été montrées. Différents sous-produits et déchets tels que le lactosérum, corn steep liquor, les grignons d'olives,...ont été utilisés comme source de carbone et source d'azote. Tous ces substrats constituent de bons milieux de culture pour le développement des levures et la production des enzymes (**Kot et al., 2020 et Bataïche, 2014**).

#### **8.1.1. Source de carbones**

Le carbone constitue le composé majoritaire de la cellule levurienne et représente environ 50% du poids sec (**Toumi, 2018**). Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène. Les levures ont besoin de glucides mais elles peuvent également en produire (tréhalose, glycogène), aussi il a été révélé que la capacité à utiliser les sucres varie selon levures (**Henckè, 2000**).

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Les glucides sont les plus fréquemment utilisés, en particulier les monosaccharides comme les hexoses, les disaccharides et les trisaccharides. D'autres glucides abondants et peu coûteux comme les pentoses et les polysaccharides ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. Cependant, d'autres composés carbonés peuvent être utilisés tel que les alcools, les acides ou les composés moins oxygénés comme les hydrocarbures (Tableau 7) (**Rezki, 2014**).

**Tableau 7 :** Diversité des sources de carbone pour la croissance de levures (**Walker and White, 2018**).

Source de carbone	Exemples typiques
Sucres hexoses	D - glucose, D - galactose, D-fructose, D-mannose
Disaccharides	Maltose, saccharose, lactose, tréhalose, mélibiose cellobiose, mélézitose,
Trisaccharides	Raffinose, maltotriose
Sucres pentoses	L - arabinose, D - xylose, D - xylulose, L - rhamnose
Oligosaccharides	Maltotétraose, maltodextrines
Polysaccharides	Amidon, inuline, cellulose, hémicellulose, chitine, substances pectiques
Alcools de sucre	Glycérol, glucitol
Acides organiques	Acétate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate
Acides gras	Oléate, palmitate
Hydrocarbures	alcanes

La richesse du lactosérum en lactose (comme source de carbone) a permis une bonne croissance de certaines souches levuriennes telles que *Yarrowia lipolytica* (**Ould hamouda et Habachou, 2015**).

### 8.1.2. Source d'azote

L'azote est le deuxième constituant important, il joue un rôle capital puisqu'il entre dans la composition de plusieurs molécules, essentielles au fonctionnement (**Rezki, 2014**).

Les levures contiennent 10% environ (de la masse sèche de la cellule) d'azote ; il doit donc être présent dans le milieu de culture pour être assimilé (**Sanchez, 2008**). La plupart des levures sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples sous forme d'ion ammonium qui sont apportés dans le milieu par le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), le phosphate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) et surtout le sulfate d'ammonium, meilleur composé car il apporte en même temps du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés. L'azote peut être apporté également par des composés organiques divers tels que les acides aminés, les peptides ou des polypeptides dont la taille nécessite pour leur utilisation une hydrolyse par des peptidases intracellulaires (**Rezki, 2014**).

- **Le soufre** : Il est assimilé généralement sous forme inorganique  $\text{SO}_4^{2-}$
- **Le phosphore** : il est assimilé préférentiellement sous forme d'ion monovalent en utilisant l'orthophosphate. Il participe au maintien de l'intégrité de la membrane ainsi qu'à la synthèse des lipides et des hydrates de carbone (**Sanchez, 2008**).

**Tableau 8 :** Eléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et à leurs fonctions (Belmaziz et Djalal, 2017).

Eléments	Fonctions
<b>Hydrogène (H)</b>	Constituant de l'eau et des composants de la cellule donneur d'électrons
<b>Carbone (C)</b>	Constituant des composants cellulaires, donneur d'électrons (respiration), accepteur d'électrons (fermentation)
<b>Azote (N)</b>	Constituant des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Donneur d'électrons (bactéries nitrifiantes) accepteur d'électrons (bactéries dénitrifiantes)
<b>Soufre (S)</b>	Constituant des protéines et du coenzyme A Donneur et accepteur d'électrons chez les sulfito-bactéries.
<b>Phosphore (P)</b>	Constituant des acides nucléiques, des phospholipides et de certains coenzymes et l'ATP.

### 8.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance

Les oligoéléments sont des éléments constitutifs de coenzymes, présents en faible concentrations. Ils sont indispensables, variés et interviennent lors des réactions enzymatiques. Ils jouent un rôle important dans l'activation et la stabilisation des protéines et stimulent la croissance des levures (Tableau 9). Parmi les métaux alcalins indispensables, souvent les plus rencontrés sont les cations monovalents  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$  et les cations bivalents  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (Toumi, 2018).

**Tableau 9 :** Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (Walker, 2000 ; Lourens and Reid, 2002).

Oligoéléments et facteurs de croissance	Rôle
<b>Magnésium</b>	- Stabilité et perméabilité des membranes. - Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
<b>Manganèse</b>	- Favorise la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse.
<b>Zinc</b>	- Coenzymes pour certains enzymes. - Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines.
<b>Biotine</b>	- Essentielle dans la réaction de carboxylation et de décarboxylation. - Production des alcools et des esthers.
<b>Thiamine</b>	- Synthèse de l'isoleucine et de la valine.

<b>Acide pantothénique</b>	- Synthèse de l'Acétyl –CoA. - Production des acides gras et des acides aminés.
----------------------------	--

## 8.2. Facteurs physico -chimiques

Comme chez tout organisme vivant, un certain nombre de facteurs physiques et chimiques influent considérablement sur la croissance des levures dont les principaux sont :

### 8.2.1. Effet de la température

Les levures sont en général mésophiles à des températures voisines de 25-28°C.

La température optimale de croissance se situe entre 20-25°C mais elle peut osciller de 5 à 30°C, et différer de la température courante de culture. Parfois, la multiplication végétative a encore lieu vers 0°C, et même légèrement en dessous mais le taux de croissance sera faible.

(**Henckè, 2000**). Les levures peuvent donc être classer selon la température de leur croissance (Tableau 10).

#### ➤ Levures Psychrophiles

Il existe peu de levures de ce type, elles sont facilement isolées à partir des eaux et des sols de l'Arctique ou l'Antarctique : Comme 90 % des océans ont une température inférieure ou égale à 5°C, ils constituent un habitat important. Ces micro-organismes s'adaptent à leur environnement : leurs enzymes, leurs systèmes de transports et leurs mécanismes de synthèse protéique fonctionnent bien à basse température. Leurs membranes cellulaires restent semi-fluides dans le froid grâce à leur teneur élevée en acides gras insaturés.

Beaucoup d'entre eux commencent à perdre leurs constituants cellulaires à 25-30°C par altérations de leur membrane cellulaire (**Henckè, 2000**).

#### ➤ Levures psychrophiles facultatives, ou psychrotrophes

Elles sont nombreuses et responsables de la détérioration de la nourriture réfrigérée.

Plus la température de croissance est basse et plus le taux d'acides gras insaturés de la membrane plasmique est important, plus la membrane est fluide à basse température (**Hanckè, 2000**).

#### ➤ Levures mésophiles

La plupart des levures font partie de cette catégorie sont très peuplée, vu que leur environnement se situe à une température assez constante de 37°C.

#### ➤ Levures thermophiles

La levure est susceptible de supporter. Elle diffère s'il s'agit d'une chaleur sèche ou humide.

La plus grande thermorésistante se retrouve chez *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri*, puis *S.baillii* et *S.uvarum* (**Hanckè, 2000**).

Seuls certains mycètes appartiennent à cette classe qui comporte essentiellement des bactéries. Ces organismes prospèrent dans le compost, les meules de foin, les conduites d'eau chaude et les sources chaudes. Elles diffèrent des mésophiles car leurs enzymes sont beaucoup plus stables à la chaleur et les systèmes de synthèse protéique, capables de fonctionner à des températures élevées. En outre, leurs lipides membranaires sont plus saturés et ont des points de fusion plus élevés ; ainsi les membranes des thermophiles restent intactes à des températures élevées, exemple : *Cyniclomyces guttulatus*, *Saccharomyces telluris*, *Torulopsis bovina*, et *T pintolopensii*.

La destruction des levures non «thermorésistantes» commence à 52°C ; les cellules en phase de croissance exponentielle sont plus sensibles qu'en phase stationnaire, et la mortalité est maximale en début de bourgeonnement.

Une élévation de la température au-dessus de la température maximale de croissance entraîne l'arrêt de la synthèse de certaines protéines tandis que d'autres, spécifiques, sont produites.

**Tableau 10 :** Exigences de température des levures (Hencké, 2000).

	Température de croissance minimale	Température de croissance optimale	Température de croissance maximale
Levures psychrophiles	5 °C voire 0- 1 °C	< 15°C voire +1°C	< 20°C
Facultatif : psychrotrophes	jusqu'à 0°C	20-30°C	35°C
Levures mésophiles	15-20°C voire 0°C	20-45°C	< 45°C
Levures thermophiles	45°C	55-65°C voire 45°C	> 100°C

L'étude réalisée par **Torija et al., 2002** sur l'effet de la température sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation alcoolique a montré un allongement de la phase de latence à basse température (15°C). Cependant, la population est restée viable tout au long de la fermentation. Par contre, à une température élevée de 35°C, la fermentation a été plus rapide mais avec une diminution de la viabilité cellulaire dès le début de la fermentation. Par rapport au métabolisme et à la température élevée, ces auteurs ont observé une augmentation des produits secondaires de la fermentation, tandis qu'aux températures plus faibles la production d'éthanol a été favorisée.

### 8.2.2. Effet du pH

Le pH est un autre facteur important pour la croissance des levures, car il détermine l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire (**Castro Martinez, 2007**).

La croissance est bonne à pH 7-8, l'optimum se situant souvent entre 4,5 et 6,5 mais beaucoup tolèrent de grandes variations. La plupart des levures peuvent se développer à pH= 3,0 et certaines tolèrent mieux des pH très acides (comme tous les champignons), voisins de 1,5 : *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculatu*, *Picliia fermentans* . *Rhodotorula rubra*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces ballii*, *S. cerevisiae*, *S. exigutts*, *S. rosei*, *Trichosporon fermentans*, *Zygosaccharomyces rouxii*. Les *Torulopsis* préfèrent des pH voisins de 2,8-3 (**Hanckè, 2000**). Les levures du genre *Candida* se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 mais certaines espèces peuvent survivre à pH 9 comme la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée des grains de blé provenant de zones arides (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

Alors qu'elles supportent la plupart des acides organiques rencontrés dans les aliments, les levures sont fortement inhibées par les acides acétique et lactique.

### 8.2.3. Effet de l'oxygène

La plupart des levures sont des aérobies, les levures sont généralement incapables de bien pousser dans des conditions complètement anaérobies car, en plus de fournir l'électron terminal accepteur dans la respiration, l'oxygène est nécessaire comme facteur de croissance des acides gras membranaires (l'acide oléique) et la biosynthèse de stérol (ergostérol) (**Walker, 2009**). Selon **Walker (2009)** *S. cerevisiae* est auxotrophe pour l'acide oléique et l'ergostérol.

### 8.2.4. Influence de la pression osmotique (PO) et de l'activité de l'eau (aw)

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer qu'à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 (Tableau 11) mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (glycérol et bétaine) (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

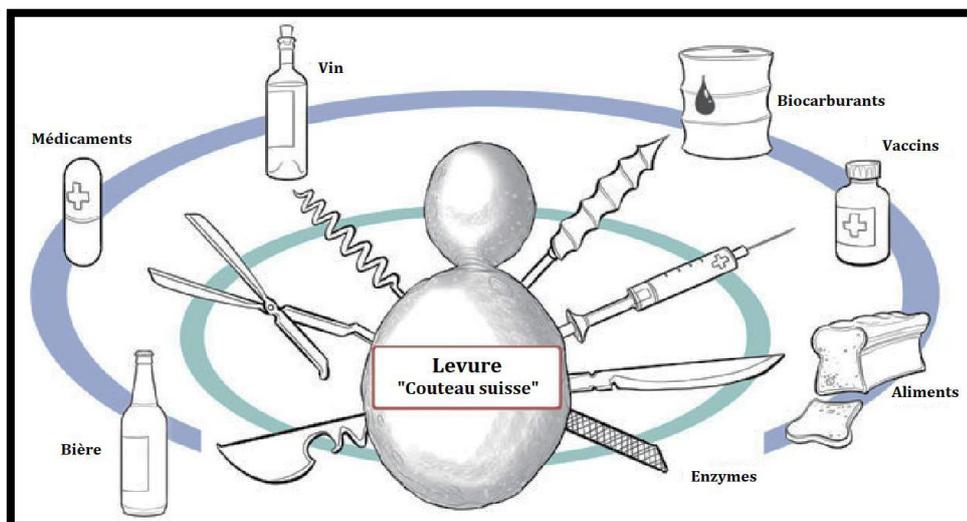
**Tableau 11 :** Activité de l'eau ( $A_w$ ) minimale pour la croissance de quelques micro-organismes (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

Microorganismes	$A_w$
<b>Levures</b>	
<i>S.cerevisiae</i>	0,90-0,94
<i>Rhodotorula sp.</i>	0,90
Levures osmophiles	0,62
<b>Moisissures</b>	
<i>Botrytis cinerea</i>	0,93
<i>Fusarium</i>	0,90
<i>Mucor</i>	0,80-0,90
<i>P. expansum</i>	0,85
<i>A. flavus</i>	0,70

## 9. Biotechnologie des levures

Les levures sont le principal producteur mondial de produits biotechnologiques, dépassant la production en capacité et les revenus économiques d'autres groupes de micro-organismes industriels. Les levures ont une grande importance fondamentale et industrielle dans les disciplines scientifiques, alimentaires, médicales et agricoles (Johnson, 2013).

- ❖ La levure *Saccharomyces cerevisiae* est sans doute, l'espèce la plus étudiée et utilisée dans le monde. Couramment connue comme la « levure boulangère » cette espèce est un agent majeur dans la formulation de divers produits alimentaires, tels que le pain, la bière et le vin. Elle est également utilisée pour la production d'enzymes, d'arômes et de biocarburants. Elle est pour cela considérée comme le « couteau suisse » de l'industrie de la fermentation (Figure 8) (Câmara Júnior, 2018).



**Figure 8 :** Levure *Saccharomyces cerevisiae* est considérée comme « couteau suisse » de l'industrie. (Câmara Júnior, 2018).

- ❖ Les levures non Saccharomyces (levures non conventionnelles), y compris les membres des ascomycètes et des basidiomycètes, ont également une utilité actuelle importante et une applicabilité potentielle en biotechnologie (Tableau 12) (**Johnson, 2013**).

**Tableau 12 :** Utilités biotechnologiques des levures ascomycètes et basidiomycètes (**Johnson, 2013**).

Ascomycète	Basidiomycète
<p>Les levures ascomycètes sont particulièrement importantes dans la formation de :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aliments</li> <li>➤ Ethanol</li> <li>➤ Protéines unicellulaires,</li> <li>➤ Aliments pour animaux et fourrage,</li> <li>➤ Protéines et d'enzymes,</li> </ul> <p>Et en tant qu'organismes modèles et fondamentaux pour la délimitation des gènes et leur fonction dans le métabolisme et les maladies des mammifères et des humains.</p>	<p>Les levures basidiomycètes sont connues principalement pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Production d'enzymes utilisées dans la synthèse pharmaceutique et chimique.</li> <li>➤ Production de certaines classes de métabolites primaires et secondaires tels que les terpènes et les caroténoïdes,</li> <li>➤ Catabolisme aérobie de sources de carbone complexes</li> <li>➤ Biorestauration des polluants environnementaux.</li> </ul> <p>Néanmoins, les levures basidiomycètes semblent avoir un potentiel considérable en biotechnologie en raison de leurs utilités cataboliques, de la formation d'enzymes agissant sur des substrats récalcitrants et de la production de métabolites primaires et secondaires uniques.</p>

### 9.1. Utilisation alimentaire

Les levures sont responsables de la production d'une large gamme de produits fermentés tels que les boissons alcoolisées préparées avec différents types de substrats, les produits laitiers fermentés, y compris le fromage, les produits levés à base de céréales, et les condiments. Leur rôle en fermentation a été reconnu par Pasteur, et les premières cultures pures de la levure de bière et la levure de vin ont été obtenues respectivement par Hansen et Müller-Thurgau, à la fin du 19e siècle. Depuis lors, l'application des levures est devenue une pratique standard dans la fermentation industrielle (Tableau 13) (**Amit et al., 2019**).

La levure a également montré une nouvelle fonction d'aliment naturel additif chez les animaux ruminants et non ruminants pour la manipulation du tractus gastro intestinal et de l'environnement du rumen. (**Monroy Salazar et al., 2016**).

Plusieurs espèces de levures isolées à partir d'aliments fermentés ont été caractérisées et appliquées comme démarreur / co-démarreur dans les industries alimentaires fonctionnelles.

**Tableau 13 :** Produits industriels synthétisés par les levures (**Walker, 2009**).

Produits	Exemples
Brevages	Boissons alcoolisées potables : bière, vin, cidre, saké et spiritueux distillés (whisky, rhum, gin, vodka et cognac)
Alimentation humaine et animale	Levure de boulanger, extraits de levure, levure fourragère, facteur de croissance du bétail et pigments alimentaires
Produits chimiques	Carburant éthanol (bioéthanol), dioxyde de carbone, glycérol et vitamines d'acide citrique ; les levures sont également utilisées comme catalyseurs bioréductifs en chimie organique
Enzymes	Invertase, insulínase, pectinase, lactase et lipase
Protéines recombinantes	Hormones (par exemple, insuline), vaccins viraux (par exemple, vaccin contre l'hépatite B), anticorps (par exemple, récepteur IgE), facteurs de croissance (par exemple, facteur de nécrose tumorale), interférons (par exemple, interféron leucocytaire), des protéines sanguines (par exemple, albumine sérique humaine) et des enzymes (par exemple, lipase gastrique et chymosine)

### 9.2. Utilisation biomédicale

La biotechnologie et la recherche biomédical exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêts médicaux comme la production de protéines hétérologues (vaccin de l'hépatite B). La facilité d'approvisionnement, de conservation et de mise en culture de ces microorganismes (**Berber, 2017**). Les aspects médicaux bénéfiques des levures sont évidents dans la fourniture de nouveaux agents thérapeutiques humains grâce à la technologie de l'ADN recombinant de levure (**Walker, 2009**).

### 9.3. Autres utilisation

La levure est aussi un excellent modèle expérimentale occupant une place de choix au sein de la communauté scientifique pour la recherche fondamentale et appliquée en biologie moléculaire et génie génétique, en biochimie et en toxicologie (**Cherit, 2015**). Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en

biotechnologie environnementale. Un avantage majeur pour la dégradation de solvants organiques volatils est leur tolérance à l'acidité. En effet, il a été souvent observé que durant la dégradation, par exemple, du xylène, il y a production d'acides intermédiaires acidifiant ainsi le milieu (Labrecque, 2003).

### 10. Production d'enzymes chez les levures

Les micro-organismes présentent une bonne source de biomolécules telles que des enzymes, des acides gras, des pigments, des métabolites et des antibiotiques, qui sont d'une grande importance commerciale et industrielle et ce fait a conduit à l'isolement de micro-organismes d'une grande importance biotechnologique tels que les levures qui se sont avérées être de bonnes sources d'enzymes (Tableau 14) (Gana, 2014).

**Tableau 14 :** Enzymes industrielles produites par les levures (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
<b>Chymosine</b>	<i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Préparation des aliments
<b>Galactosidase</b>	<i>Saccharomyces sp.</i>	Applications alimentaires
<b>Glutaminase</b>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Thérapeutique analyse
<b>Inulinases</b>	<i>Candida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus</i>	Applications alimentaires
<b>Invertase</b>	<i>Saccharomyces cerevisia</i>	Applications alimentaires
<b>Lactase</b>	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromyces sp.</i>	Préparation des aliments
<b>Lipase</b>	<i>Candida rigosa</i> <i>Pseudozyma antarctica</i> <i>Trichosporon fermentum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Préparation des aliments Arômes, Dégraissage Biorestauration Thérapeutique Détergents
<b>Phenylalanine ammonialyase</b>	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodospiridium sp.</i>	Pharmaceutique
<b>Phenylalanine déshydrogénase</b>	<i>Candida boidinii</i>	Pharmaceutique
<b>Phytase</b>	<i>Ogataea polymorpha</i>	Fourrage nutritionnelle

Les principaux avantages de la production des enzymes par les procédés de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction végétale ou animale sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques végétal ou animale.
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché.
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique ou par l'optimisation des conditions de fermentation (**Toumi, 2018**).

Les levures sont généralement détectées dans un nombre élevé de produits alimentaires reflétant leur bonne adaptation à un substrat riche en protéines, lipides, sucres, et acides organiques. De plus, les levures ont la capacité de produire des enzymes importantes sur le plan industriel telles que les lipases (**Yalçın et al., 2013**).

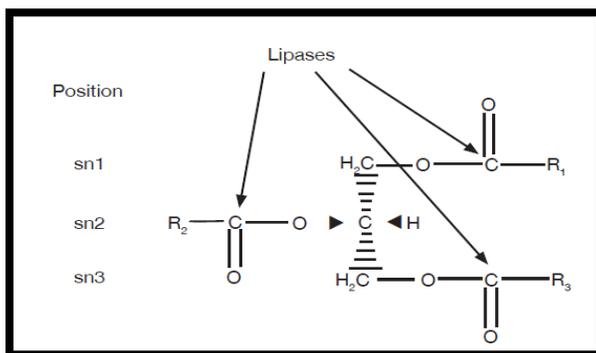
# **Chapitre 2**

## **La lipase**

### 1. Définition

Les triacylglycérol acyle hydrolases-EC 3.1.1.3 (lipases) sont des enzymes produites par divers organismes, animaux, végétaux et microbiens (**Gonçalves Filho *et al.*, 2019**). Ces enzymes jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides (**Mireille Alloue *et al.*, 2008**). Elles ont été déterminées par Claude Bernad en 1856 dans le jeu pancréatique comme enzyme qui hydrolyse les gouttelettes d'huile insolubles et les convertit en produits solubles. Sur le marché mondial des enzymes les lipases sont classées après les protéases et les amylases et représentent 5% de ce marché (**Ilesanmi, 2020**).

Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie de la sous-classe des hydrolases spécifiques des esters carboxyliques (EC 3.1.1) et sont définies comme étant des triacylglycérol lipases, donc des enzymes capable d'hydrolyser spécifiquement les liaisons ester carboxyliques des TAGs, qui lient les acides gras au squelette carboné du glycérol (Figure 9). D'un point de vue biochimique, une lipase est obligatoirement une estérase, mais l'inverse n'est pas vrai puisqu'il existe de nombreuses estérases non lipolytiques (**Zallot, 2011**).



**Figure 9** : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases (**Fickers *et al.*, 2008**).

### 2. Origine de lipase

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires (**Fickers *et al.*, 2008**).

### 2.1. Lipases végétales

Chez les plantes, les lipases se trouvent dans les céréales, les fruits, les feuilles, Cependant, la principale source de l'enzyme est les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou oil bodies), car dans les graines il y a généralement une grande concentration d'huile, qui sera une source d'énergie pour le développement ultérieur de la plante (**Gonçalves Filho *et al.*, 2019 et Fickers *et al.*, 2008**).

Elles peuvent être classées en trois grands groupes (**Fickers *et al.*, 2008**) :

- a) Triacylglycérol hydrolase.
- b) Acylhydrolases.
- c) Phospholipases C et D

### 2.2. Lipases animales

La plupart des lipases d'origine animale sont obtenues à partir du pancréas des bovins, d'ovins, de porcs et de cochons ou par d'autres animaux hôtes présents dans le tractus gastro-intestinal chez les animaux, dont la fonction est la digestion des graisses et des lipides (**Gonçalves Filho *et al.*, 2019 et Bataiche, 2014** ).

Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes :

- A. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique.
- B. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, le foie et les tissus adipeux.
- C. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel (**Fickers *et al.*, 2008**).

### 2.3. Lipases microbiennes

Elles sont obtenues à partir de champignons, de levures et de bactéries. La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaires, ces lipases présentent de grands avantages par rapport aux autres, elles sont plus abondantes (Tableau 15). Les microorganismes producteurs de ces enzymes peuvent être facilement modifiés génétiquement et présentent une grande diversité de caractéristiques et de spécificités (**Gonçalves Filho *et al.*, 2019**).

**Tableau 15 :** Quelque exemple sur l'origine microbienne de lipase.

Origine	Exemples	Références
<b>Bactéries</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> tolérante aux solvants produit une lipase extracellulaire <i>Geobacillus</i> sp TW1 thermophile capable de produire une lipase extracellulaire	<b>Ruchi et al., 2007</b>
<b>Levures</b>	<i>Candida rugosa</i> et <i>Candida cylindracea</i> sont productrice de la lipase extracellulaire. Quelques espèces du genre <i>Geotrichum</i> sont des producteurs des lipases pour la plupart extracellulaires. <i>Trichosporon</i> sp. <i>Yarrowia lipolytica</i> produit des lipases extracellulaires et liées aux cellules. <i>Candida parapsilosis</i> CBS 604 synthétise des lipases liée aux cellules. <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 produit des lipases extracellulaires	<b>Li et Zhang, 2005</b>  <b>Vakhlou et Kour, 2006</b>  <b>Kamini, 2000</b>

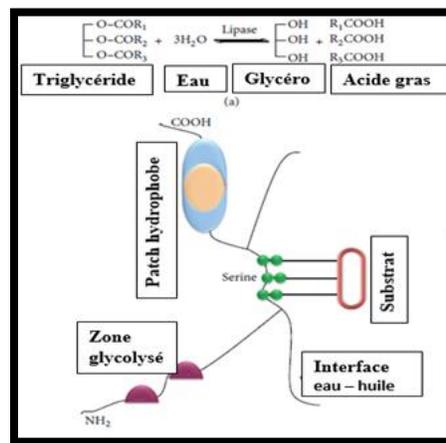
Elles sont aussi bien produites par les bactéries Gram + telles que les genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram – telles que *Pseudomonas*. Elles sont également très répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux comme *Rhizopus* ou *Thermomyces* (**Fickers et al., 2008**).

### 3. Substrat de lipase

#### 3.1. Nature des substrats hydrolysés

Les lipases sont capables d'hydrolyser les triacylglycérols TAGS et les diacylglycérols (DAGs) mais généralement pas les monoacylglycérols (MAGs).

Certaines lipases sont aussi capables d'hydrolyser des phospholipides, des galactolipides, des esters de stérol ainsi que des esters synthétiques (solubles dans l'eau) à courte chaîne (**Zallot, 2011**). Donc les lipases sont capables d'agir sur des centaines de substrats différents et ces activités pourraient avoir une signification physiologique (Figure10).



**Figure 10 :** (a) Hydrolyse du triglycéride par lipase. Après hydrolyse le triglycéride se transforme en glycérol et en acide gras. (b) Représentation d'une molécule de lipase avec caractéristiques. Le substrat peut être n'importe quel triglycéride. Les régions interactives du substrat sont affichées (Gopinath *et al.*, 2013).

### 3.2. Spécificité des lipases

Si les lipases ne paraissent pas toujours spécifiques d'un substrat, elles présentent par contre des sélectivités généralement bien définies quant aux acides gras et liaisons ester hydrolysés (Tableau 16) (Zallot, 2011).

#### 3.2.1. Typosélectivité

La typosélectivité ou spécificité par rapport à un type d'acide gras donné, les lipases peuvent être également spécifiques vis-à-vis de l'acide gras (Larbi, 2015).

En général, les lipases sont plus actives sur des triglycérides à chaînes courte ou moyenne qu'à chaîne longue (Zallot, 2011).

#### 3.2.2. Régiosélectivité

La régiosélectivité ou spécificité de position ; qui représente le pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les esters primaires (en position externe sn-1 ou sn-3) ou secondaires (En position interne sn-2) des triacylglycérols (Larbi, 2015).

#### 3.2.3. Enantiosélectivité

C'est la capacité d'une lipase à discriminer entre deux énantiomères d'un mélange racémique (1,2- contre 2,3-sn diacylglycerol) (Najjar, 2010).

La stéréosélectivité représente la capacité de discriminer un groupement stéréo hétérotopique mais homomorphe par rapport à l'autre (positions sn-1 contre sn-3) (Larbi, 2015).

**Tableau 16** : Quelque exemple de la spécificité de lipase.

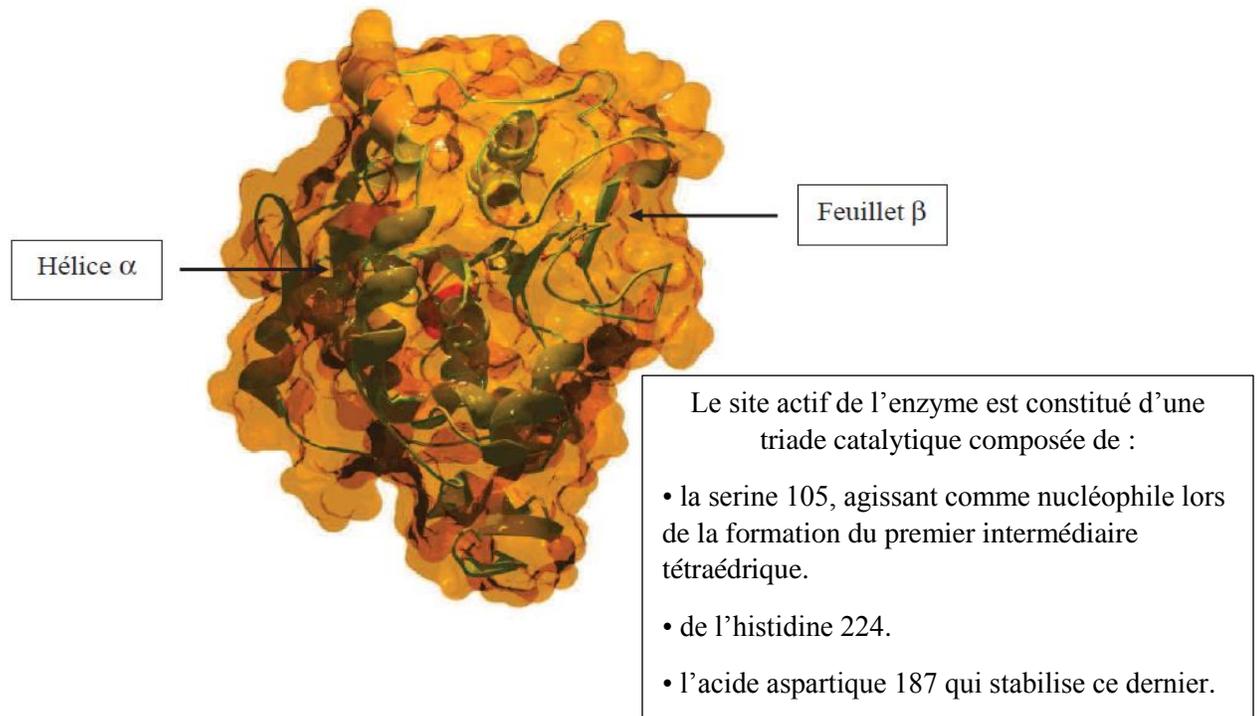
Spécificité	Exemples	Références
<b>Typosélectivité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La lipase de <i>G. candidum</i> est spécifique des acides cis-9 insaturés.</li> <li>- La lipase de ricin qui est très active sur la tri-ricinoléine.</li> <li>- L'enzyme de <i>Penicillium requeforti</i> est spécifique des acides gras à courte chaîne</li> </ul>	<p><b>Najjar, 2010</b></p> <p><b>Zallot, 2011 ; Lin et al., 1986.</b></p> <p><b>Larbi, 2015 ; Najjar, 2010 ; Fickers et al., 2008.</b></p>
<b>Régiosélectivité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La lipase pancréatique humaine (HPL), la lipase pancréatique porcine (PPL) et la lipase de <i>Rhizopus arrhizus</i> (RAL) sont <b>régiosélectives</b> vis-à-vis des esters d'alcools primaires en position <i>sn</i>-1 et <i>sn</i>-3 des triglycérides.</li> <li>- La lipase A de <i>Candida antarctica</i> a montré une préférence pour la position <i>sn</i>-2.</li> </ul>	<p><b>Najjar, 2010</b></p> <p><b>Najjar, 2010</b></p>
<b>Enantiosélectivité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La lipase gastrique est <i>sn</i>-3 stéréospécifique alors que la lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> est <i>sn</i>-1 stéréospécifique.</li> </ul>	<p><b>Najjar, 2010</b></p>

#### 4. Structure et mécanisme de la lipase

Les lipases sont des enzymes très variables par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Celles de faible poids moléculaires ont des tailles de 20-25 KDa tandis que celles de grandes tailles ont des masses moléculaires de 60-65 KDa (**Fickers et al., 2008**).

La structure des lipases a été déterminée par la cristallogénèse et diffraction des rayons x (**Najjar, 2010**) selon leur structure tridimensionnelle ces enzymes appartiennent à la super-famille structurale de  $\alpha/\beta$ -hydrolases (**Bataiche, 2014**).

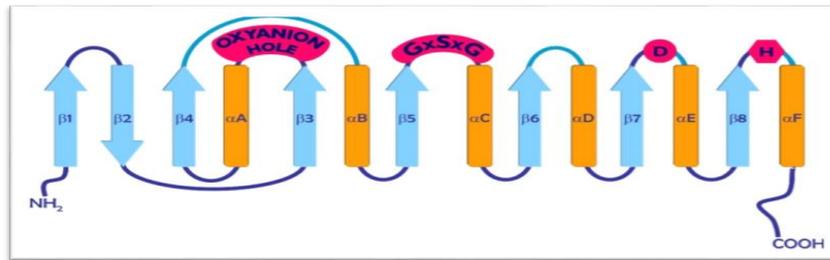
La structure tridimensionnelle des lipases ainsi que leur mécanisme réactionnel ont fait depuis longtemps l'objet de différentes études. A titre d'exemple, la lipase B de *Candida antarctica*, une protéine de 33 kDa, constituée de 317 acides aminés, se caractérise, comme chez les estérases, par la présence d'une structure  $\alpha/\beta$  (figure 11) (**Rouillard, 2012**).



**Figure 11** : Structure tridimensionnelle de lipase B de *Candida antarctica* (Rouillard, 2012).

#### 4.1. $\alpha/\beta$ hydrolases

Le repliement  $\alpha/\beta$  est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la diène lactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins  $\beta$  connectés par 6 hélices  $\alpha$  formant un repliement dit  $\alpha/\beta$  (Figure 12). Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité de substrat (Fickers *et al.*, 2008). La machinerie catalytique comprend une triade catalytique et un trou oxyanion, situés dans le site actif recouvert éventuellement par un fragment amphiphile (ou le chapeau).



**Figure 12** : Pli canonique des hydrolases  $\alpha/\beta$ . Les brins sont indiqués par des flèches et les hélices par des cylindres. Les positions de l'histidine (H) et les résidus d'aspartate (D), ainsi que le GX SXG et le trou oxyanion sont représentés (Agbo *et al.*, 2017).

- La triade catalytique est composée de trois acides aminés géométriquement conservés :
  - une sérine (S) polaire non chargée.
  - une histidine (H) polaire chargée positivement.
  - un acide glutamique ou aspartique (E/D) polaire chargé négativement.

Ces acides aminés jouant un rôle primordial dans la catalyse.

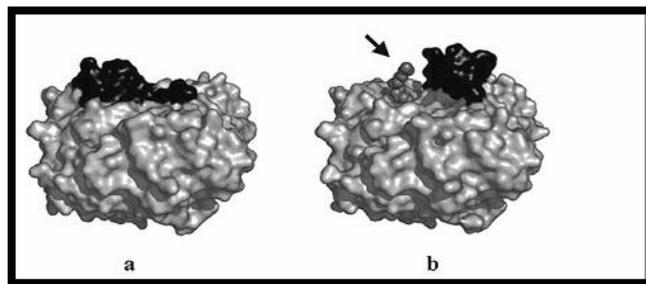
- Le chapeau se retrouve en général sous forme d'hélices sauf pour quelques lipases dont le chapeau est sous forme de boucles. On trouve également des lipases ayant deux chapeaux. Ce fragment amphiphile, plus ou moins mobile, est constitué par une ou plusieurs courtes hélices  $\alpha$  liées au corps de la lipase par des éléments de structure relativement flexibles. L'accessibilité du substrat au site actif semble dépendre de ce chapeau dont la conformation change en fonction de l'environnement qui l'entoure.
- Le trou oxyanion est constitué de deux résidus, qui stabilisent l'état de transition. Un résidu (X2) est localisé dans le coude nucléophile conservé, son amide se positionnant identiquement pour toutes les lipases. La configuration de ce trou oxyanion ou encore celle du site actif pourrait changer selon la nature de chaque enzyme. Un autre résidu du trou oxyanion, au contraire, ne se localise pas dans la région de séquence ou de structure conservée, mais sur une autre boucle de la lipase. Lors de l'activation interfaciale, la configuration de ce trou oxyanion ou encore celle du site actif pourrait changer selon la nature de chaque enzyme (Neang, 2013).

#### 4.2. Conformation et mécanisme d'action des lipases

Les lipases présentent deux conformations en fonction de l'environnement ils sont : une conformation «fermée» et l'autre «ouverte». La structure 3D de certaines lipases contient une

structure amphipathique. Le chapeau contient à la fois les faces hydrophiles et hydrophobes. La face hydrophobe du chapeau s'orienterait vers le site actif par interaction hydrophobe avec ses résidus et la face hydrophile vers l'extérieur.

En présence du solvant organique et/ou de substrat lipidique, le chapeau se déplacerait et sa face interne, devenue accessible au solvant, créerait une surface hydrophobe qui interagirait avec l'interface huile/eau. Le site actif deviendrait alors accessible au substrat (Figure 13) (Agbo *et al.*, 2017 et Neang, 2013).



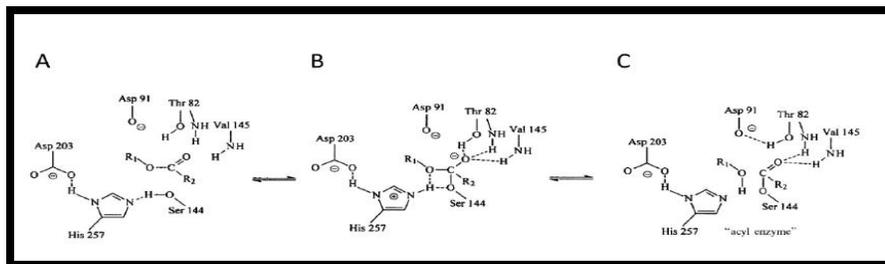
**Figure 13** : Modifications conformationnelles des lipases en présence et absence de substrat.

(a) L'enzyme présente une conformation en l'absence du substrat. (b) En présence du substrat, le couvercle sera ouvert et l'enzyme prend alors une nouvelle conformation, ce qui en fait une enzyme active (Agbo *et al.*, 2017).

Le mécanisme de ce site catalytique est bien déterminé. Lors de la présentation du substrat dans la poche catalytique (Figure 14). L'hydrolyse d'un ester carboxylique peut se dérouler en six grandes étapes (El alaoui, 2015 et Fickers *et al.*, 2008) :

- Le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (Asp ou Glu).
- La formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou oxyanion (oxygène chargé négativement).
- Par la suite, il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme.
- Une attaque nucléophile de l'acylenzyme par une molécule d'eau.

- Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou oxyanion.
- Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale (Figure 14) (El alaoui, 2015 et Fickers *et al.*, 2008).

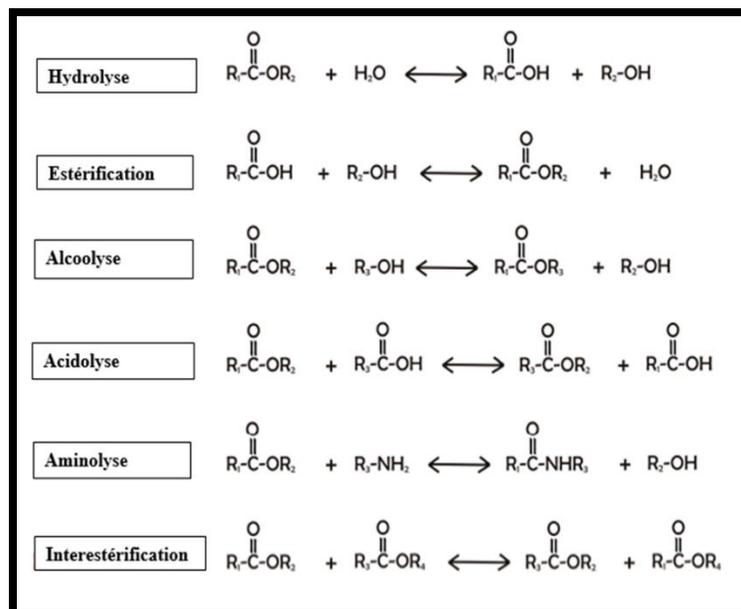


**Figure 14** : Mécanisme catalytique d'hydrolyse d'un ester carboxylique par triade catalytique de la lipase de *Rhizopus oryzae*.

- Conformation initiale de la triade catalytique et approche du substrat.
- Formation du premier intermédiaire tétraédrique et sa stabilisation par le trou oxyanion.
- Libération de l'alcool et formation du complexe acyl-enzyme (El alaoui, 2015).

#### 4.3. Différentes réactions catalysées par les lipases

Les lipases catalysent un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification et les réactions d'alcoololyse et d'acidolyse (Figure 15).



**Figure 15** : Réactions catalysées par lipases (Borrelli and Trono, 2015).

Cette particularité catalytique des lipases de diverses réactions est en fonction du microenvironnement, leurs spécificités et leurs conditions de réactions, rend cette classe d'enzyme intéressante de point de vue industriel.

### ✓ Réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles et des graisses.

### ✓ Réaction de synthèse

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

### ✓ Transestérification

La transestérification comprend trois réactions, l'interestérification, l'alcoolyse et l'acidolyse. Elle implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse).

- **Interestérification** : Lors de la réaction d'interestérification, un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras.
- **Alcoolyse** : L'alcoolyse est une réaction d'un ester avec un alcool monovalent tel que l'éthanol et butanol ou un alcool polyvalent tel que la glycérine pour produire un ester avec des différents groupes d'alkyl.
- **Acidolyse** : L'acidolyse est une réaction d'un ester avec un acide qui mène à un changement de groupe acyle (un groupe acyle est transféré à un acide gras) (**Larbi, 2015**).

## 5. Production des lipases

De nombreux micro-organismes sont connus comme des producteurs potentiels de lipases extracellulaires, y compris les bactéries, les levures et les champignons. Les espèces fongiques sont de préférence cultivées en la fermentation solide (SSF), tandis que les bactéries et les levures sont cultivées en fermentation submergée (**Treichel et al., 2010**).

### 5.1. Production des lipases chez les levures

Les levures ont été largement utilisées pour la production de la lipase, avec un accent particulier sur le genre *Candida sp.* Dans ce cas, il est nécessaire de fournir au microorganisme

des conditions appropriées qui permettent leur croissance et induisent la production du métabolite d'intérêt (**Defranceschi et al., 2014**).

Différentes espèces des levures : *Trichosporon asahii*, *Candida cylindracea* ; *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae* ; *Yarrowia lipolytica* (**Salihua, 2012**), *Meyerozyma guilliermondii* (**Gana et al., 2014**), *Pseudozyma pruni*, *P. prolifica*, *P. hubeiensis*, *Brandoniozyma sp*, *Pichia anomala*, *P. Prolifica* (**Salgado et al., 2019**), *Magnusiomyces capitatus*. (**Knob et al., 2020**) ont été particulièrement isolées pour la production de la lipase.

### 5.2. Milieux de culture

La production de lipases dépend principalement de l'inducteur et différents milieux ont des effets de stimulation différents sur la production de lipase en fonction des voies physiologiques et biochimiques de souche microbienne afin de sélectionner le meilleur milieu de production de la lipase (**Ebrahimpour et al., 2008**).

Il existe différents milieux de culture synthétiques pour la production de cette enzyme à savoir : Extrait de levure- Peptone - Dextrose (YPD), Extrait de levure- Peptone - huile d'Olive (YPO), et Extrait de levure – Peptone – Dextrose – huile d'Olive (YPDO) (**Najjar, 2010**). Ces milieux de culture sont généralement coûteux, ce qui entraîne un coût élevé de la production d'enzymes. Néanmoins, l'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat pour les procédés de fermentation, permet une réduction du coût de production de ces biocatalyseurs et peut ainsi les rendre économiquement compétitifs face aux catalyseurs chimiques (**Defranceschi et al., 2014**).

### 5.3. Inoculum

Un taux d'inoculum approprié, les niveaux de nutriments et d'oxygène sont suffisants pour une croissance adéquate de la souche microbienne et par conséquent, améliorent la production de lipase. Si le taux de l'inoculum est trop faible, un nombre insuffisant des souches microbiennes entraînera une réduction de la quantité de lipase sécrétée. Un taux d'inoculum élevé peut entraîner un manque d'oxygène et une diminution des nutriments dans les milieux de culture (**Ebrahimpour et al., 2008**).

## 5.4. Processus de production des lipases

Les principaux processus de production de lipase sont la fermentation submergée (SMF) et la fermentation à l'état solide (SSF). Ces deux types sont largement utilisés sur lesquelles des développements continus ont été réalisés qui ont enregistré un grand succès dans la production enzymatiques (Tableau 17) (Geoffry and Achur, 2018).

### 5.4.1. Fermentations à l'état solide (SSF)

La SSF est définie comme tout processus de fermentation effectué sur un matériau non soluble qui agit à la fois comme support physique et comme source de nutriments en l'absence de liquide à écoulement libre (Kumar and Kanware, 2012).

Il fait que le milieu de culture représente généralement 35 à 50% de la production totale, l'utilisation des résidus agro-industriels en tant que substrats alternatifs se sont avérés adaptatifs à la SSF ce permet aussi une réduction considérablement du coût de la production de lipase ainsi que la résolution du problème de pollution environnementale (Geoffry and Achur, 2018).

### 5.4.2. Fermentation à l'état liquide (SMF)

Le processus de fermentation submergée est un processus de culture dont le milieu est sous forme liquide. L'huile en tant que source de carbone est un facteur d'influence majeur dans la fermentation submergée et l'huile d'olive est un composant coûteux dans n'importe quel milieu de production de lipase (Geoffry and Achur, 2018). La comparaison des deux types de fermentation est récapitulée dans le tableau 17.

**Tableau 17 :** Comparaison des deux types de fermentations liquide et solide (Lagrari, 2019).

Fermentation en milieu solide	Fermentation en milieu liquide
Besoin d'équipement à l'échelle industrielle	Équipements industriels disponibles
Milieu de culture hétérogène	Milieu de culture homogène
Quantité d'eau limitant	Quantité d'eau non limitant
Quantité d'air non limitant	Quantité d'air limitant
Volume faible d'eaux résiduaires à traiter	Volume important d'eaux résiduaires à traiter
Risque de contamination limité	Risque de contamination élevé
Favorable aux organismes pluricellulaires (champignon filamenteux et champignon supérieur)	Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures)
Produit fermenté	Produit très dilué

### 5.4.3. Culture en fioles d'Erlenmeyer

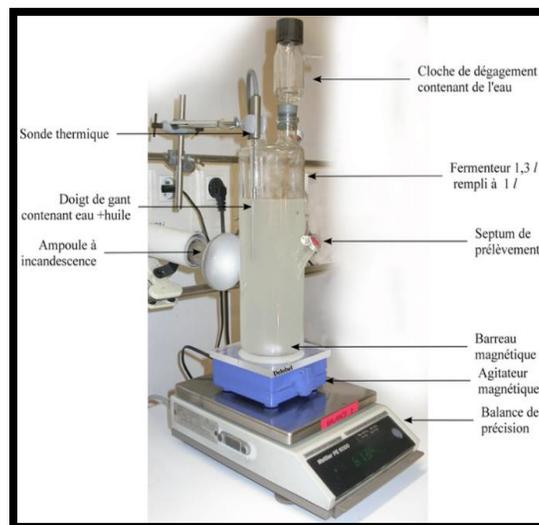
Les flacons Erlenmeyer sous agitation sont généralement utilisés pour la réalisation des cultures et précultures (une ou plusieurs successives). On peut suivre dans le milieu fermenté la croissance cellulaire et la dégradation du substrat (composés lipidiques) ainsi que la sécrétion d'enzyme (dosage d'activité lipase dans le surnageant) (Neang, 2013).

### 5.4.4. Culture en fermenteurs

Après avoir vérifié que la levure est capable de sécréter suffisamment de lipases dans les erlenmeyers, une production dans le fermenteur est généralement réalisée afin d'évaluer la capacité de production de biocatalyseur à grande échelle.

Le pH et la teneur en oxygène du milieu sont contrôlés par un régulateur. La régulation du pH est faite par ajout d'ammoniaque qui permet également d'apporter l'azote dans le milieu. La teneur en oxygène est exprimée en pourcentage. Le débit d'aération est régulé par un débitmètre massique. Le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide est assuré par l'intermédiaire de pales de contre-pales fixes pour limiter l'effet vortex. Les pales sont mises en mouvement par un moteur à vitesse variable et contrôlée.

Les fermentations réalisées avec un taux d'oxygénation précis et maintenu en ajustant à la fois le débit d'aération et la vitesse de rotation des pales (Figure 16) (Defranceschi *et al.*, 2014 ; Neang, 2013).



**Figure 16** : Fermenteur (Delobel, 2012)

### 5.5.Facteurs influençant la production de lipase

Les lipases microbiennes sont principalement extracellulaires et sont donc sécrétées dans les milieux de production. Leur production est grandement influencée par la composition du milieu en associant par les facteurs physico-chimiques tels que la température, le pH et l'oxygène dissous. (**Treichel et al., 2010**).

#### 5.5.1. Source de carbone

La source de carbone est le facteur ayant probablement le plus d'influence sur la production de lipase. Comme les lipases sont principalement des enzymes inductibles, elles sont généralement produites en présence d'une source de lipides comme de l'huile telle que l'huile d'olive, de canola, de palme ou d'autres inducteurs comme des triacylglycérols, des acides gras, des Tweens ou du glycérol. De plus, la production de lipase peut être grandement influencée par la présence des sucres (**Jean, 2008**). Certaines molécules de sucres étant utilisées comme source de carbone supplémentaire pour les lipases microbiennes (maltose, l'amidon, lactose, mannose, galactose) (**Agbo et al., 2017**).

La Production de lipase chez la levure *C. rugosa* pourrait être induite en ajoutant de l'acide oléique et le glucose comme source de carbone. (**Sharma et al., 2001**).

#### 5.5.2. Source d'azote

De nombreuses études ont montré l'importance des sources d'azote inorganiques et organiques dans la production de lipases y compris la peptone, le nitrate de sodium le sulfate d'ammonium et le chlorure d'ammonium (**Geoffrey and Achur, 2018 et Agbo et al., 2017**). Certaines molécules de vitamines, acide aminé, étant également utilisées comme source de d'azote supplémentaire (**Agbo et al., 2017**). La peptone s'est avérée être la meilleure parmi toutes les sources d'azote testées, à cause de la libération d'ions  $\text{NH}_4^+$  qui stimule la croissance du microorganisme et augmente en même temps le rendement enzymatique en raison de sa nature inhibitrice de protéase à faible concentration. (**Bora and Bora, 2012**).

Le type de source d'azote ajouté au milieu détermine le niveau de la production de la lipase. Il diffère considérablement d'une souche à l'autre, cependant l'utilisation de déchets agricoles et industriels bon marché comme sources d'azote pour la production de lipases fongiques est moins

acceptée que celles qui sont utilisées comme source de carbone. Il est donc nécessaire d'utiliser ces sources d'azote afin de réduire le coût de production et également d'augmenter l'activité lipolytique (**Geoffry and Achur, 2018 et Salihu et al., 2012**).

### 5.5.3. Valorisation des déchets

Toutes les actions de la valorisation des déchets comme le réemploi, le recyclage visent à obtenir des matériaux réutilisables. Avant de valoriser un déchet, il est nécessaire de connaître son origine, de l'analyser, de caractériser son état actuel et son comportement dans le temps et d'évaluer sa traçabilité (**Ould hamouda and Habachou, 2015**).

L'utilisation des déchets en biotechnologie apporte un avantage supplémentaire car le traitement des déchets permet de réduire le coût des méthodes de culture des microorganismes pour produire des enzymes (**Kot et al., 2020**).

Le choix d'un milieu approprié est essentiel pour la souche de levure choisie, aussi bien pour la croissance que pour la production de la lipase pour cela on choisit un milieu de production à base de déchet. Plusieurs sous-produits ont été étudiés comme substrats pour la production de lipases microbiennes, comme le babassu tourteaux, tourteaux d'arachide, son de blé, déchets de raffinage d'huile végétale, Le lactosérum et d'autres (**Knob et al., 2020**).

En Algérie, les pertes annuelles du secteur oléicole et laitier comme les sous-produits laitiers et le grignon d'olive sont importantes. Elles s'estiment pour les déchets liquides à : 650 tonnes de matière organique, 300 tonnes d'azote et près de 600 tonnes d'éléments minéraux (Potassium, Phosphore, Calcium, Magnésium, etc.) ; sans oublier la perte considérable d'eau (en moyenne 15.000 litres par jour au niveau de chaque huilerie). En outre, ces pertes dans les déchets solides atteignent environ 16.000 tonnes de matières organiques et 21.000 tonnes de matières énergétiques (**Moussouni, 2013**).

Les microorganismes cultivés soit en milieu solide (SSF) grignon brut ; broyé. Soit en milieu liquide (SMF) lactosérum et l'hydrolysate du grignon d'olives (**Bataiche, 2014**).

#### A. Lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit de la fromagerie. Pendant de très nombreuses années, était considéré comme un déchet organique de l'industrie agroalimentaire. Il pourrait être un substrat de fermentation pour de nombreuses espèces microbiennes.

Le lactosérum composé de matières grasses, de lactose, d'azote, des protéines et des minéraux ; phosphore, calcium, potassium, sodium, chlorures (**Bataiche, 2014**).

### **B. Grignon d'olives**

Les grignons d'olives sont des résidus végétaux issus après extraction de l'huile d'olive (Figure17). Il renferme une grande partie de la matière sèche d'olive. Les tissus contenus dans les grignons d'olive sont résistants à la dégradation microbienne.

Les traitements biologiques (par culture de microorganisme) permettraient non seulement une amélioration de la dégradation des constituants pariétaux du grignon d'olive, mais, également, son enrichissement en protéines.

Les grignons bruts sont riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses. L'épuisement par les solvants diminue la teneur en matières grasses et augmente relativement les autres teneurs. Le dénoyautage partiel par tamisage ou ventilation réduit les teneurs en cellulose brute (**Bataiche, 2014**).



**Figure17 :** Grignon d'olive brut (**Bataiche, 2014**).

#### **5.5.4. Effet de la température et du pH sur la production des lipases**

La température et le pH optimaux pour la production de lipases sont extrêmement variables étant liées au genre, à l'espèce et même à la souche étudiée. Selon nombreuses études la gamme de température est de 28 °C à 32 °C s'est révélée idéal pour la production de lipases.

Les lipases de *S. cerevisiae* présente une température et un pH optimaux de 30 ° C et 7,5 respectivement. Tandis que la température d'incubation optimale des lipases de *Candida*, *Yarrowia lipolytica* et *Pichia Hansenula* est d'environ 30 °C. Le pH optimal pour la production de ces enzymes se situe entre 5 et 7, 5 (**Lux Lock, 2007 et Geoffry and Achur, 2018**).

### 5.5.5. Effet de la vitesse d'agitation

L'agitation est une variable significative pour la fermentation. Elle augmente la croissance et la production de la lipase en améliorant éventuellement le taux de transfert d'oxygène et en augmentant ainsi la dispersion des micelles d'huile pour une plus grande surface de contact avec les cellules, ce qui améliore considérablement l'absorption d'huile qui induit par conséquent la sécrétion de la lipase (**Geoffry and Achur, 2018**). La vitesse d'agitation comprise entre 110 et 160 tr / min a amélioré la production de la lipase (**Agbo et al., 2017**).

### 5.5.6. Effet de la période d'incubation

Dans la production de la lipase, le temps d'incubation joue un rôle important. Une période d'incubation de 2 ou 3 ou 4 jours sous fermentation immergée a été trouvée être optimal pour la production de la lipase selon l'espèce productrice. Par exemple temps d'incubation de 4 jours être optimal pour la production de lipase par *Rhizopus sp* isolé du sol contaminé d'un hangar de production d'huile de palme et de 3 jours ont été rapportés pour la production maximale de lipases chez *Rhizopus chinensis* et *Aspergillus niger*. Maximum de production de lipase a été obtenue à 48 heures par *Pseudomonas gessardii* un résultat similaire a été obtenu par *Staphylococcus* et *Trichoderma viride* (**Agbo et al., 2017**).

### 5.5.7. Teneur en humidité

Une teneur en humidité optimale est très importante pour une production accrue de lipases. Il a été noté qu'une activité hydrolytique et une diminution de l'activité lipasique ont été observées en raison de l'augmentation de la teneur en humidité. Ce phénomène a été attribué à l'impact de l'humidité sur les propriétés physiques du substrat solide (**Geoffry and Achur, 2018**).

## 6. Amélioration de la production de la lipase

En industrie, il serait intéressant d'améliorer le rendement de la production de la lipase. Ceci peut être réalisé soit par différentes approches statistiques, soit par la manipulation de la souche par le génie génétique (la mutagénèse, l'ADN recombinant).

Plusieurs facteurs importants ont été testés pour améliorer le rendement de la production de lipase. Il est bien connu qu'une productivité enzymatique élevée a été obtenue par optimisation des milieux de culture pour augmenter la production de lipase, différents plans statistiques sont

appliqué pour étudiée et amélioré l'effet de différentes variables importantes notamment les substrats, les inducteurs, les sources d'azote et de carbone. À l'échelle industrielle, la production de la lipase réalisée à faible cout en utilisant des sources de carbone et d'azote. Ce qui permet la réduction des coûts (Soleyman *et al.*, 2017).

### 6.1 Optimisation de la production enzymatique

L'optimisation de la concentration de chaque composé du milieu de culture est généralement une procédure longue. La méthode classique consiste à changer une variable à la fois, tout en gardant les autres constantes .Cette dernière est inefficace, car elle n'explique pas les effets d'interaction entre les variables et leurs effets sur le processus de fermentation et en plus elle est trop lente.

Des approches efficaces sont largement utilisées à savoir l'application des plans de Plackett – Burman, de Box - Behnken combinées à la méthode des surfaces de réponses à effet significatif sur la production enzymatique.

Le plan Plackett-Burman est un plan de criblage utilisé pour la sélection des facteurs (variables) ayant un effet significatif sur la production enzymatique.

De plus, la conception de Box – Behnken permet l'étude des interactions entre les variables indépendantes et prédit la réponse enzymatique.

Par conséquent, ces méthodes sont efficaces pour améliorer le milieu de la production afin d'atteindre un rendement plus élevé d'une manière économique (Ebrahimipour *et al.*, 2017 ; Thakur, 2012).

### 7. Méthode de dosage de la lipase

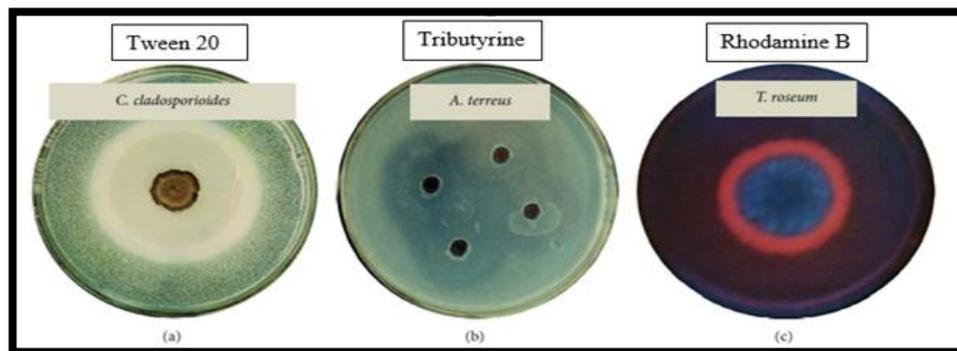
Les méthodes de dosages d'activités lipolytiques sont variées. Chacune de ces techniques peut être appliquée à des besoins précis. Il faut prendre en compte la sensibilité du test, la disponibilité du substrat, son coût et la facilité de la mise en œuvre du dosage. De nombreux kits commerciaux existent, basés sur diverses technologies, et permettent des gains de temps importants. Des progrès considérables ont été effectués ces dernières années pour le développement de tests enzymatiques à haut débit (El alaoui, 2015).

## 7.1. Méthodes qualitatives

### 7.1.1. Méthodes de criblage en milieu solide

La visualisation de l'activité lipolytique sur des milieux solides peut être déterminée en utilisant des colorants tels que le bleu Victoria B et le sulfate de bleu de Nil. La chute du pH du milieu due à la libération des acides gras peut être suivie grâce à la présence de ces indicateurs colorés. Il y a une relation proportionnelle entre le diamètre des halos créés par la diffusion des acides gras et le logarithme de la concentration de l'enzyme. Cette technique permet de cribler rapidement l'activité lipolytique des microorganismes producteurs de lipases sur l'agar, mais cette méthode est limitée car l'acidification du milieu peut être due à d'autres mécanismes métaboliques (El alaoui, 2015 et Hasan *et al.*, 2009 ).

**Gopinath *et al*** ont réalisé un criblage qualitatif en utilisant la méthode de dosage sur plaque d'agar avec divers substrats :(a) Tween-20, (b) tributyrine et(c) huile végétale en présence de Rhodamine B (Figure18).



**Figure 18 :** Criblage sur plaque d'agar pour lipases. Utilisation des substrats (a) Tween 20, (b) tributyrine et (c) huile végétale (**Gopinath *et al.*, 2013**).

## 7.2.Méthodes quantitatives

### 7.2.1. Méthodes titrimétriques

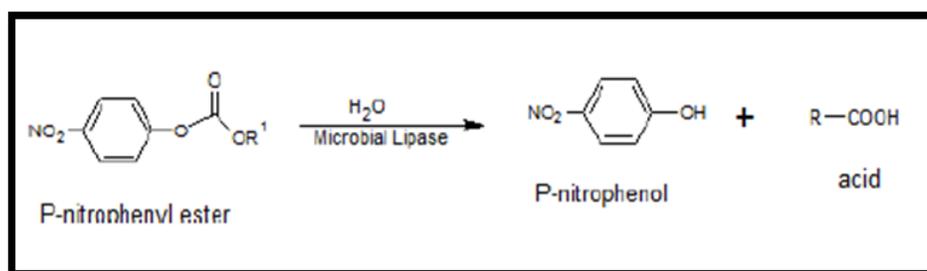
Ces techniques pratiques sont utilisées pour caractériser l'activité lipasique et la spécificité, ainsi que le phénomène d'activation interfaciale. Elles sont effectuées par la titration des acides gras libérés lors de la réaction de lipolyse basée sur le pH-stats. Cette méthode quantitative détecte une activité de l'ordre de 1  $\mu\text{mol}$  par minute.

Les substrats utilisés peuvent être des lipides naturels ou synthétiques, pour lesquels la libération d'acides gras est neutralisée par l'addition simultanée de soude pour maintenir le pH à une valeur constante, le substrat usuel est la tributyrine, qui est émulsifiée dans le réacteur par agitation. En plus de l'huile d'olive, qui est un substrat peu onéreux contenant des triglycérides à chaîne longue. Le mélange peut être soumis aux ultrasons afin d'émulsifier ce substrat de façon homogène et augmenter la sensibilité et la reproductibilité du test. Néanmoins, les procédures aux ultrasons peuvent être difficiles à reproduire et peuvent induire une dégradation du substrat. De plus, dans ces conditions, il peut être nécessaire d'ajouter des détergents pour favoriser l'émulsion tel que des sels biliaires de type déoxycholate ou de la gomme arabique (Contenant divers contaminants). Cette technique peut être couplée à des méthodes d'analyse comme spectrométrie de masse ou chromatographie en phase gazeuse (El alaoui, 2015 et Hasan *et al.*, 2009).

### 7.2.2. Méthodes colorimétriques par spectrométrie

La vitesse et la sensibilité des dosages pour les acides gras libre peuvent être augmentées par l'utilisation de méthodes colorimétriques. Les méthodes impliquent la complexation des acide gras (AG) libre dans un solvant organique avec un métal divalent (généralement du cuivre) suivi de l'analyse spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 440 nm du métal en phase organique.

Plusieurs méthodes utilisent un substrat spécifique conçu pour donner un produit final coloré après hydrolyse, ou facilement convertible à un produit coloré. Par exemple, l'hydrolyse des esters de para-nitrophénol libère le paranitrophénol qui peut être mesuré et quantifié de manière spectrophotométrique avec une coloration jaune dont l'absorbance maximale est située à 410 nm (Figure 19) (El alaoui, 2015 ; Hasan *et al.*, 2009 ).



**Figure 19 :** Représentation schématique du principe de p-Dosage des esters nitrophényles pour lipase (Agbo *et al.*, 2017).

L'hydrolyse de la tributyrine, dans une émulsion, provoque une clarification du milieu qui est lu à 450 nm, et l'hydrolyse de la tributyrine entraîne un changement de couleur du rouge de phénol utilisé comme un indicateur de pH, les données quantitatives sont obtenues avec la mesure de la diminution de l'absorbance à 557 nm (**Lagrari, 2019**).

### **7.2.3. Dosages enzymatiques par fluorimétrie**

Le test de la fluorescence quantitative de lipase basé sur l'interaction de la rhodamine B avec des acides gras libéré lors de l'hydrolyse enzymatique des triglycérides, Le dosage Rhodamine – Triglycéride – Agarose, permet une flexibilité dans le choix du substrat et un grand nombre d'échantillons peuvent être dosés simultanément, ce qui le rend pratique pour le dosage de l'activité lipase que dans les fractions de la chromatographie sur colonne au cours de la purification.

Les principaux avantages des dosages fluorimétriques sont leur sensibilité et le fait qu'ils permettent de suivre en continu la réaction cinétique et dépendent de la sensibilité de la détection des AG libre, et l'activité spécifique de la lipase (**Hasan et al., 2009**).

### **7.2.4. Dosages enzymatiques par radiométrie**

La technique de dosage utilisant des substrats radio-marqués est la méthode présentant la meilleure sensibilité. Elle est indispensable pour la mesure d'activités enzymatiques très faibles. Ces enzymes ayant une faible activité sont souvent impliquées pour la régulation fine de métabolites. En revanche les conditions de travail et de sécurité pour la manipulation de tels composés rendent son utilisation très difficile. Cette méthode de dosage est réalisée en point final et nécessite des étapes de séparation par chromatographie sur couche mince, qui induisent des temps d'expérience longs et incompatibles avec les méthodes de criblages à haut débit (**El alaoui, 2015**).

## **7.3. Autres méthodes**

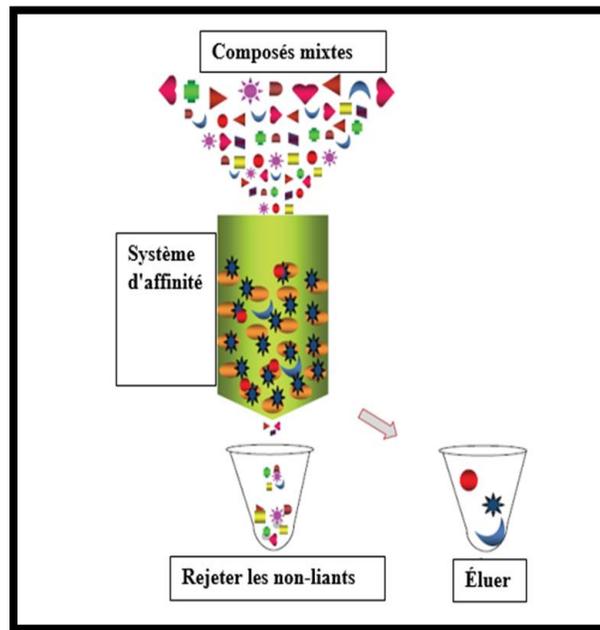
Il existe autres méthodes de dosage : Résonance magnétique nucléaire (RMN), spectrométrie de masse, méthodes chromatographiques, méthodes couplées, films monomoléculaires, spectroscopie infrarouge, microscopie à force atomique, méthode de

diffusion Raman à résonance améliorée de surface (SERRS : Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) (El alaoui, 2015).

### 8. Purification de lipases

L'objectif de la progression de la purification est d'atteindre un rendement maximal, une activité maximale et une pureté maximale de l'enzyme. Il est très important d'éliminer les molécules contaminées à partir du mélange complexe pour exclure l'enzyme pure en utilisant une méthode appropriée (Robina, 2020).

Les méthodes de purification utilisées sont généralement des techniques impliquent différentes étapes en fonction de l'intracellulaire ou la nature extracellulaire de l'enzyme, telles que la précipitation par le sulfate d'ammonium (70% de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  ont été utilisés pour la lipase fongique) (Bharathi et Rajalakshmi, 2019 et Sharma *et al.*, 2001), plus loin la protéine précipitée est soumise à des techniques de dialyse et de chromatographie. Le choix des techniques de chromatographie diffèrent en fonction de la source des microorganismes et de la taille des protéines. Enfin les fractions brutes ainsi obtenus sont analysées pour la présence d'enzyme par plusieurs protocoles d'essai, et appliqués d'autres techniques de séparation telles que l'échange d'ions, le DEAE-sépharose et la filtration sur gel chromatographie (Bharathi and Rajalakshmi, 2019). La chromatographie d'affinité a été aussi utilisée dans certains cas pour réduire le nombre des étapes de purification individuelles nécessaires (Figure20) (Robina, 2020 et Sharma *et al.*, 2001).



**Figure 20 :** Purification de lipase à l'aide d'un système d'affinité. Séparation de lipase à partir de composés mixtes est indiquée. La lipase liée peut être éluée en créant des conditions strictes (Gopinath *et al.*, 2013).

Des techniques de séparation récente utilisée pour purifier la lipase microbienne a été montrée dans le tableau 18 (Bharathi and Rajalakshmi, 2019).

Les lipases produites par *C. rugosa* ont été séparées par la chromatographie échangeuse colo d'anions, après l'extraction à l'éthanol de l'extrait brute de l'enzyme. L'élution a montré l'existence de deux lipases : lipase I et lipase II avec un rendement de 18% et 25% respectivement. Les deux protéines avaient un poids moléculaire de 58 kDa sur SDS-PAGE (Saxena *et al.*, 2003).

La taille des lipases microbiennes varie selon les micro-organismes. Le poids moléculaire de la lipase bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* est de 29 kDa, alors que celui de la lipase fongique est de 27 kDa. Bharathi et Rajalakshmi (2019) ont révélé que la lipase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un monomère avec un poids moyen de 46 kDa dans la levure.

**Tableau 18 :** Stratégies de purification récemment utilisées pour diverses études sur les lipases microbiennes (Bharathi and Rajalakshmi, 2019).

Microorganismes	Technique de purification	Poids moléculaire (kDa)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium, échange d'anions et sephadex 75 chromatographies de filtration sur gel.	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Précipitation au sulfate d'ammonium et filtration sur gel Sephadex G-100.	29
<i>Idiomarina sp.</i>	Précipitation au sulfate d'ammonium, DEAE-sépharose et séphacryl S-200.	67
<i>Bacillus sp.</i>	Précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie par échange d'ions.	24
<i>Chromohalobacter sp.</i>	Précipitation au sulfate d'ammonium, séphacryl S-100.	44
<i>Penicillium sp.</i>	Dialyse, colonne octyl sepharose FF.	65.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	Précipitation au sulfate d'ammonium, filtration sur gel DEAE-sépharose et sephadex G100.	27

## 9. Caractéristiques de lipases

### 9.1. Effet de la température

La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40°C. En général, les lipases d'origine végétale ou animale sont peu thermostables contrairement aux lipases microbiennes. En effet, *Humicola lanuginosa* produit une lipase dont l'activité optimale est de 45°C tandis que pour certaines souches de *Pseudomonas fragi*, elle est de 75°C. D'autres lipases sont adaptées aux plus basses températures. C'est le cas d'*Aspergillus niger* qui a une température optimale de 25°C ainsi que celle de *Pseudomonas fluorescens* qui possède encore 30% de son activité maximale à 1°C (Sharma *et al.*, 2001).

### 9.2. Thermostabilité

Les microorganismes thermophiles sont pour la plupart des organismes unicellulaires se développant à haute température (45-122°C) et sont une source importante d'enzymes

thermostables. Les microorganismes dits proprement thermophiles se développent optimal entre 50 et 80 °C alors que les microorganismes hyperthermophiles ont des températures optimales de croissance supérieures à 80°C (**Charbonneau, 2014**). On peut supposer que les thermophiles modérés, étroitement liés phylogénétiquement aux organismes mésophiles, peuvent s'adapter dans des environnements chauds (**Dakhmouche, 2016**).

La plupart des lipases isolées et étudiées sont de nature mésophile qui ne peuvent pas hydrolyser un substrat qui existe sous forme solide à température ambiante. Pour résoudre ce problème, la recherche d'enzyme thermostable est en cours car les lipases issus de microorganisme thermophiles présentent une thermostabilité plus élevée, une activité plus élevée à des températures élevées et présentent souvent une plus grande résistance à la dénaturation chimique. Cela en fait des outils idéaux dans les processus industriels et chimiques où des températures de réactions relativement élevées et des solvants organiques sont utilisés (**Bora and Bora, 2012**).

### 9.3. Effet du pH

Le pH optimum de l'activité lipasique est généralement autour de 7. Le pH agit non seulement sur l'activité enzymatique mais aussi sur les propriétés de l'interface dans un système multiphasique, ainsi que sur la solubilité des réactifs dans le milieu. Par ailleurs, l'hydrolyse catalysée par une lipase peut être affectée par la présence de différents cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) et activée en présence de sels biliaires (**Gargouri et al., 2008**).

Les lipases bactériennes ont généralement un pH optimum légèrement basique (8 – 8,5) alors que les lipases d'origine fongique ont un pH légèrement acide, comme la lipase de *Yarrowia lipolytica* qui présente un pH optimum de 6,0 (**Veeraragavan et al., 1990**).

### 9.4. Effet de la source de carbone

La source de carbone est le facteur majeur requis pour l'expression de l'activité lipasique. L'activité lipolytique sur un milieu salin supplémenté avec de l'huile d'olive comme meilleure source de carbone (**Geoffry and Achur, 2018**).

**Najjar, (2010)** a testé la culture de *Yarrowia lipolytica* qui permet de déterminer les conditions optimales pour les mesures de l'activité lipolytique de la lipase

- Quand l'huile d'olive est utilisée comme seule source de carbone, l'activité lipolytique augmente drastiquement en début de culture et atteint un optimum, l'activité lipolytique diminue ensuite rapidement et n'est plus détectable.
- Quand le glucose est utilisé comme seule source de carbone, l'activité lipolytique demeure à un niveau très bas.
- Quand la levure est cultivée dans un milieu, en présence d'huile d'olive et de glucose, l'activité lipolytique est faible pendant le début de la culture, puis elle augmente pour atteindre le maximum.

Les apports des carbones simulent le dynamique moléculaire et structurel de la lipase et les mouvements (translations, rotations, vibrations) (Najjar, 2010).

### 9.5. Effet de la source azotée

La source d'azote est essentielle pour l'amélioration de l'activité lipasique. De plus, les organismes fongiques expriment une activité lipase variée en présence de divers types de sources d'azote et pour une plus grande amélioration de l'activité lipase, étant donné la nature de la source d'azote ainsi que la concentration sont d'une importance primordiale (Geoffry and Achur, 2018).

### 9.6. Inhibiteurs et activateurs de la lipase

Plusieurs composés ont été testés afin de vérifier leur effet stimulateur ou inhibiteur de l'activité enzymatique. Ces composés sont soit des dérivés de ressources naturelles (plantes / animaux / microbes), soit synthétisés artificiellement (Coté, 2010 et Jawed, 2018).

Cependant, les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes :

- **Inhibiteurs non-spécifiques (réversibles) :** Sont des composés qui n'agissent pas directement sur le site actif des lipases, leur effet consiste à la modification de la conformation ou les propriétés à l'interface de l'enzyme. Les sels biliaires et les surfactants sont de bons exemples (Gupta *et al.*, 2004).
- **Inhibiteurs spécifiques (réversible ou irréversible) :** Agissent directement sur le site actif de l'enzyme, il s'agit souvent d'analogues de substrats (Gupta *et al.*, 2004).

Parmi les composés activateurs et inhibiteurs on cite : les cations, les DTT et le PMSF, les solvants organiques, les détergents (Coté, 2010) :

- **DTT** : Ils réduisent les ponts disulfures (S-S) ces derniers jouent un rôle structural, permettant l'enzyme de stabiliser sa conformation tridimensionnel et une certain rigidité à cette conformation donc la réduction de (S-S) modifier la structure d'enzyme.
- **PMSF** : Formulation d'une liaison covalente avec la sérine du site catalytique inhibant toute activité d'hydrolyse.
- **Cations** : Certains nombre de lipase possèdent de site de liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  Ces sites permettent la stabilisation de la triade catalytique et de l'activité enzymatique (Cotè, 2010). L'effet stimulateur des ions  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait s'expliquer par leur capacité de titrage des acides gras libérés par la lipolyse, ce qui préviendrait l'effet inhibiteur des acides gras libres sur l'activité des lipases. Il pourrait aussi y avoir un lien au niveau structural (Jean, 2008).
- **Solvants organiques** : Les lipases microbiennes sont reconnues pour leur grande stabilité en présence de solvants organique. Ces derniers améliorent la stabilisation de la matière grasse à hydrolyser. Ils peuvent influencer la liaison de substrat au sein du site actif en favorisant la conformation active de l'enzyme. Cependant, il existe quelques exceptions où les solvants organiques stimulent ou inhibent l'activité enzymatique (Gupta *et al.*, 2004).
- **Détergents** : Les détergents possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe avec des propriétés semblables aux TG. Ces caractéristiques sont idéales afin d'étudier l'activation interracial des lipases. L'interaction entre les molécules de détergents et les lipases est complexe car l'effet activateur ou inhibiteur dépend des propriétés de détergent, du substrat, de la structure d'enzyme et de la présence d'un volet hydrophobe permettant une activation interfaciale (Cotè, 2010).

### 10. Application de la lipase dans l'industrie

Les lipases sont un groupe important d'enzymes à valeur industrielle en raison de leur nature polyvalente. On peut les utiliser en tant qu'hydrolase ou comme catalyseur et synthèse organique. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés. Parmi lesquelles nous citons quelque industries (Fickers *et al.*, 2008 et Gupta *et al.*, 2015) :

- **Industrie alimentaire** : La lipase a été utilisée dans les produits laitiers pour le développement de la saveur dans la transformation d'autres aliments tels que les produits carnés, aliments cuits au four, transformation du beurre de cacao et autres (**Guerrand, 2017**).
- **Industrie des détergents** : Les lipases constituent d'un groupe d'enzymes détergentes très importantes pour contribuer à l'élimination des taches et des traces d'huile et de graisse. Les lipases sont utilisées à la fois dans la lessive et la vaisselle, dans les formulations de détergents commerciaux où elles ont été optimisées pour fonctionner à différents pH et à différentes températures. Lipex® et Lipolase® de Novozymes sont deux exemples de lipases vendues à l'industrie des détergents (**Guerrand, 2017**).
- **Industrie des cosmétiques et de la parfumerie** : les lipases permettent de produire des mono- et diacylglycérols qui sont employés en tant que surfactants et composés aromatiques (arômes) (**Ximena Zottig, 2016**).
- **Industrie de pâte à papier et du papier** : La présence de composants hydrophobes (principalement des triglycérides et des cires) dans le bois est préjudiciable de nombreux procédés de production de papier et de pâte à papier, et les lipases peuvent être utilisées pour éliminer ces triglycérides indésirables (**Guerrand, 2017**).
- **Industrie de biodiesel** : A partir de diverses matières premières telles que l'huile de palme ou les graisses animales, des lipases thermostables ont été développées pour optimiser l'application d'enzymes dans la production de biodiesel (**Guerrand, 2017**).
- **Industrie pharmaceutique** : Ces enzymes sont largement utilisées pour la synthèse des médicaments par exemple les anti-inflammatoires non stéroïdiens, certains antibiotiques vitamines (**Lagrari, 2019**).

### 10.1. Application industriel des lipases

Les levures constituent une source très importante de lipases compte tenu de leur attributs uniques en plus de leur facilité de culture qui rendent leurs lipases recherchés par de nombreux industries telles que l'industrie pharmaceutique, chimique, biodiesel etc. (Tableau 19) (**Sarmah et al., 2017**).

**Tableau 19 :** Application des lipases levuriennes (Sarmah *et al.*, 2017).

Type de réaction	Source de levure	Applications industrielles	Substrat
Hydrolyse	<i>Candida rugosa</i>	Peintures à l'huile, vernis, cosmétiques, Huiles à séchage rapide	Acide linoléique
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Biodiesel Santé, cosmétiques, lubrifiants, aliments industrie. Bio-tensioactifs	Huile de palme Huile d'olive Huile de soja
	<i>Candida lipolytica/ Yarrowia lipolytica</i>		Triglycérides
	<i>Williopsis californica</i>	Industrie chimique et alimentaire	Stéarate de p-nitrophényle, 4-palmitate de nitrophényle, tripalmitintrioléi, huile d'olive triglycérides
	<i>Candida antarctica</i> <i>Candida rugosa</i>	Synthèse d'acide gras précieux Industrie du parfum	Huile d'olive (S) -3- (2-méthylfuryl) thioacétate, Thioacétate de (S) -2-furfuryle
Estérification	<i>Candida antarctica</i>	Agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, Industrie chimique Industrie chimique, cosmétique, Détergents, agriculture, marchandises  Biodiesel, pharmaceutique, plastifiants, textiles, cuir traitement, cosmétiques.  Aliments, savons, cosmétiques  Technologie des champs pétrolifères, papier carbone fabrication, industrie textile, applications lubrifiantes, boulangeries	Acide lactique  Acide dihydroxy stéarique.  Acides gras, esters d'acides gras  Glycérol avec acide palmitique  Acide oléique
	<i>Pichia burtonii</i>	Industrie de la beauté  Industrie chimique	Citronellol Esters N-P à longue chaîne

Transestérification	<i>Chromobacterium viscosum</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Rhodotorulamucilaginoso</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida antarctica</i>	Biodiesel, carburéacteur, lumière huile d'hydrocarbure.  Biodiesel  Synthèse d'acide gras méthyle les esters Médical, agricole, Pharmaceutique.  Biodiesel.	Huile de jatropha  Huile de tournesol  Huile de palme et méthanol  Tributyryne  L'huile de soja
Alcoololyse	<i>Candida antarctica</i>	Produits pharmaceutiques, cosmétiques et Compléments alimentaires	Acyl ribonucléosides
Énantio sélectif hydrolyse	<i>Candida rugosa</i>	Industrie cosmétique et alimentaire	Benzoate de menthol
Acidolyse	<i>Candida antarctica</i>	Cosmétiques, détergents Industrie alimentaire, cosmétique, Médicaments.	Acyl glycérols, huile de bourrache

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'analyse de la littérature actuelle montre que les lipases microbiennes sont l'une des enzymes les plus produites. À l'échelle mondiale, de nombreuses recherches mènent leurs études sur l'isolement, le criblage et l'optimisation des paramètres de croissance critiques pour les souches microbiennes afin d'obtenir un rendement maximal en lipases. Le criblage qualitatif a été réalisé en utilisant la méthode de dosage sur plaque d'agar avec divers substrats tels que l'huile d'olive, la tributyrine et le Tween 20/80. En outre, un criblage quantitatif a été réalisé par la détermination de l'activité lipasique en utilisant diverses méthodes colorimétriques et spectrophotométriques.

Ce type de méthodes de criblage, en particulier les méthodes colorimétriques, a permis d'identifier les souches microbiennes qui produisent en continu des lipases avec un rendement plus élevé. La production de lipases microbiennes réalisée en utilisant soit le système de fermentation à l'état solide soit la fermentation immergée avec l'aide des diverses sources de carbone et d'azote. La plupart des rapports de la littérature soutiennent que les systèmes de fermentation à l'état solide sont de meilleures méthodes de production de lipase microbienne. Les facteurs nutritionnels influençant la production microbienne de lipase ont été explorés et se sont avérés être une partie intégrante de l'amélioration du rendement en lipase. Enfin, la purification des lipases en utilisant différentes techniques de précipitation et de chromatographie et l'étude de ses différentes caractéristiques ont été discutées et résumées. Les lipases microbiennes ont de nombreuses applications et avantages dans les industries alimentaire et agro-alimentaire.

Une compréhension approfondie des facteurs comme l'immobilisation peut aider au développement des lipases pour une application spécifique et, à long terme, ouvrir de nouvelles perspectives. Quel que soit le volume ou la valeur du produit de l'industrie, la plupart d'entre eux sont utilisés pour la consommation. Il n'est pas nécessaire de souligner que l'utilisation de levures dans la fabrication de produits consommables est sûre. En fait, la levure est utilisée depuis des siècles dans la fabrication de produits alimentaires comme le fromage, le yaourt, le caillé, le pain, etc. et sont considérées comme naturelles. Des dizaines de lipases, y compris des lipases de levure, sont maintenant disponibles dans le commerce, mais celles utilisées dans les procédés et produits industriels à grande échelle sont encore limitées à quelques cas. Ceci est principalement dû au prix élevé / à la faible disponibilité ou aux

caractéristiques opérationnelles non optimales des enzymes naturellement disponibles. Les perspectives d'utilisation des lipases comme catalyseurs industriels reposent fortement sur la production d'enzymes aux caractéristiques biochimiques et catalytiques améliorées par des méthodes d'ingénierie des protéines.

La crise sanitaire provoquée par la pandémie du coronavirus (COVID19) nous a malheureusement empêchés de réaliser la partie pratique de cette recherche bibliographique. De ce fait, effectuer la partie expérimentale prévue sur la production de la lipase levurienne est impérativement important notamment :

- 1/ Isolement, criblage et sélection de souches levuriennes locales performantes pour la production de la lipase.
- 2/ Production à faible coût de cette enzyme.
- 3/Amélioration de la production enzymatique par l'utilisation des plans statistiques
- 4/Purification et caractérisation de l'enzyme.
- 5/ Immobilisation de la lipase

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

**Agobo K.U**, Arazu V.A, Uzo K, Igwe CN. (2017). Microbial Lipases: A Prospect for Biotechnological Industrial Catalysis for Green Products: A Review. *Ferment Technol* 6: 144. doi:10.4172/2167-7972.1000144.

**Alloue Wazé A.M**, Marioaguedo, Destain J, Hakimghalfi, Blecker C, Wathelet J.P, Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc, Environ.* 12 (1), 57-68.

**Avhad M.R**, Marchetti J.M. (2019). Uses of enzymes for biodiesel production. Chapitre7 *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts, Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization Woodhead Publishing Series in Energy.* P : 135-152.

### B

**Bataiche I.** (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine1.

**Belmaziz M** et Djalal F. (2017). Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem). Mémoire en agronomie, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

**Bennamoun L.** (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides Sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase: Purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat en Biochimie et Microbiologie Appliquées, Université Frères Mentouri Constantine1.

**Berber N.** (2017).Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de «*Saccharomyces cerevisiae* » issues des cépages Algériens. Thèse de doctorat en Agronomie, Université Abdelhamid ibn badis – Mostaganem.

**Bharathi D**, Rajalakshmi G. (2019).Microbial lipases: An overview of screening, production, purification. *Biocatalysis, and Agricultural Biotechnology*, S1878-8181: 30842-4.

**Bussamara R**, Alexandre Meneghello F, Eder S.O, Leonardo B, Michaela S, PatríciaV, Augusto S, Marilene Henning V. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plantscale batch fermentation. *Bioresource Technology* 101: 268-275.

**Bora L**, Bora M. (2012). Optimisation de la lipase extracellulaire thermophile hautement alcaline de *Bacillus sp* thermophile isolé de hot spring d'Arunachal Pradesh, Inde. *Journal brésilien de microbiologie*. 30-42 ISSN 1517-8382.

**Borrelli G.M** and Trono D. (2015). Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 20774-20840.

## C

**Câmara Júnior A.** (2018). Conservation et préservation fonctionnelle de levures d'intérêt en agro-alimentaire. Thèse de doctorat, l'Université de Bourgogne Franche-Comté.

**Capece A**, Romano, P. (2009). "Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*, and Short communication. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2- 3), 180-184.

**Capece A**, Gabriella S, Harun A, Sema Sandik c, yilmaz A, Patrizia R, Karagul Y. (2020). Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. *Food Sci. Technol*, Campinas ISSN 1678-45.

**Castan C.** (2016). Levure De Bière : Un Champignon Aux Multiples Bienfaits Pour La Santé Et La Beauté. Thèse de doctorat, Université de Montpellier UFR Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques.

**Castro Martinez C.** (2007). *Brettanomyces bruxellensis* : Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux. Thèse de doctorat en Génie de Procédés et de l'Environnement, L'Institut National Polytechnique de Toulouse.

**Charbonneau D.** (2014). Eléments structuraux essentiels à la thermostabilité de nouvelles enzymes lipolytiques. Thèse de doctorat en physique et biologie cellulaire, Université du Québec.

**Cheriet A.** (2015). Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. Thèse de doctorat en toxicologie, Université Badji Moukhtar Annaba.

**Coté A. (2010).** Identification et caractérisation de nouvelles enzymes lipolytiques thermostables provenant d'une banque métagénomique. Mémoire en microbiologie appliquée, Université du Québec.

## D

**Dakhmouche-Djekrif S. (2016).** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitanae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse doctorat Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie et Université de Technologie Compiègne, France.

**Dassy B. (2018).** Levures et métabolisme fermentaire. Muséum national d'Histoire naturelle.

**Dahbi M., Nakano, T., Yabuuchi, N., Fujimura, S., Chihara, K., Kubota, K. Komaba, S. (2016).** Effect of Hexafluorophosphate and Fluoroethylene Carbonate on Electrochemical Performance and the Surface Layer of Hard Carbon for Sodium-Ion Batteries. *Chem Electro Chem*, 3(11), 1856–1867.

**Defranceschi Oliveira A.C., Fernandes M.L., Mariano A.B. (2014).** Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 4, 1503-1511.

**Delcourt A.L. (2011).** La levure de bière, c'est malin : Santé, beauté, bien-être. Un ingrédient magique aux innombrables vertus, Éditions Leducs, Paris, 160 p.

**Delobel P. (2012).** Les limitations nutritionnelles de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique : lipides et azote impactent la viabilité suivie par cytométrie en flux. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes.

**Dickinson R.J., Michael S. (2004).** The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press Second edition.

## E

**Ebrahimpour A., Raja N.Z., Diana Hooi Ean Ch'ng, Mahiran B and Abu Bakar S. (2008).** A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. Strain ARM. *BMC Biotechnology*, 8 : 96, 1-15.

**Ebrahimipour G**, Sadeghi H and Zarinviarsagh M. (2017). Statistical Methodologies for the Optimization of Lipase and Biosurfactant by *Ochrobactrum intermedium* Strain MZV101 in an Identical Medium for Detergent Applications. *Molecules*, 22:1460.

**El alaoui M.** (2015). Développement de tests enzymatiques applicables au criblage des activités et/ou inhibiteurs de (phospho) lipases. Thèse de doctorat en Biochimie, L'université Claude Bernard Lyon 1.

## F

**Fickers P**, Destain J, Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 119-130.

**Fickers P**, Fudalej F, Nicaud J.-M, Destain J and Thonart P. (2005). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 115(4), 379-386.

## G

**Gana Tan N.H**, Bernadette C. Mendoza et Rosario G. M. (2014). Isolement, criblage et caractérisation de levures à activités amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques à la surface des bananes des Philippines (Musaspp). *Philippine Journal of Science* 143 (1) : 81-87.

**Gargouri M**, Ben Akacha N, Kotti F, Ben Rejeb I. (2008). Voie de la lipoxigénase : valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12(2), 185-202.

**Geoffry.K, Rajeshwara N.A.** (2018). Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, S1878-8181(17)30567-4: 1-44.

**Gervásio Othon L**, Nicholas P. Whitehead, E.W, William D. Phillips<sup>1</sup> and David G. Allen. (2008). TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase – role in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cell Science* 121 (13).

**Gonçalves Filho D**, Gonçalves S, ZanellaGuidini C. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:7399–7423.

**Gopinath Subash C. B**, Periasamy A, Thangavel A, and Azariah H. (2013). Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. *BioMed Research International*, 154549: 1-10.

**Guerrand D.** (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL*, 24(4), D403:1-7.

**Guiffant D. (2008).** using yeast as a model and as a tool: from understanding cytokinesis to evaluating therapeutic compound selectivity. Thèse de doctorat en biologie, Université de Rennes 1.

**Guiraud J P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed, Dunod, Paris, p : 7-9.

**Gupta R, Gupta N, Rathi P. (2004)** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64. 763–781.

**Gupta R, Arti K, Poonam S, Yogesh S. (2015).** Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*.

## H

**Hasan F, Aamer A, Abdul H. (2009).** Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27: 782–798.

**Hencké S. (2000).** Utilisation alimentaire des levures. Mémoire en Pharmacie, université Henri Poincare, Nancy i.

## I

**Ilesanmi O.I, E.A. Adekunle, J.A. Omolaiye, E.M. Olorode, L.A. Ogunkanmi. (2020).** Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Journal Pre-proof*, p: 1-27. SCIAF 279.

## J

**Jawed. A, Singh G, Kohli S, Sumera A, Haque S, Prasad R, Paul D. (2018).** Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural resources for remedies against metabolic disorders and lifestyle diseases. *South African Journal of Botany*.

**Jean Hupé F. (2008).** Enrichissement recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles. Mémoire en microbiologie appliqué, Université du Québec.

**Johnson E. (2013).** Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 97, p 7563-7577.

**Joseph R and Bachhawat AK. (2014).** Yeasts. Production and Commercial Uses. Indian Institute of Science Education and Research, Punjab, India.p:823-830.

## K

**Kamini N.R,** T. Fujii, T. Kurosu, H. I. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. National Research Institute of Brewing, 36: 317–324.

**Knob A,** Izidoro S.C, Lacerda L.C, Rodrigues A, Aparecido V. (2020). A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, S1878-8181(20)30071-2. BCAB 101565.

**Kot Anna M,** Stanisław B, Marek K, Iwona Gientka, K.P, Brzezińska R. (2020). Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low - cost wastes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 26: 101634.

**Kreger-van R.G. (1984).** The yeasts a taxonomic study third revised and enlarged edition. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Chapter 1: General classification of the yeasts: 2-43.

**Kurtzman,** Jack W. Boekhout F.T. (2011). Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. The Yeasts, a Taxonomic Study. Chapitre1: 3-5.

**Kurtzman,** Jack W. Fell, Teun Boekhout and Vincent Robert. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. The Yeasts 5th Edition. Chapitre 7:87-110.

**Kumar A.R,** Pandey A, Sahoo D. (2018). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. Trends in Food Science & Technology, S0924-2244(18)30416-3. TIFS 2361.

**Kumar A,** Shamsheer S.K. (2012). Production de lipases en fermentation à l'état solide (SSF) : développements récents et applications biotechnologiques. Livres scientifiques mondiaux.6, 13-27.

## L

**Labrani F.Z.K. (2015).**Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables. Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri, Constantine.

**Labrecque M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire en l'agriculture et l'alimentation. Université Laval.

**Lagrari C. (2019).** Production améliorée des lipases à partir du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de fermentation liquide. Mémoire en sciences de l'eau, Université du Québec.

**Larbi Daouadji K. (2015).** Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase. Thèse doctorat Microbiologie Moléculaire et Protéomique, Université Djillali Liabes Faculté Des Sciences Sidi Bel Abbès.

**Leveau J.Y, Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel ; Lavoisier TEC & DOC, Paris. 08: 2-92.

**Li H and Zhang X. (2005).** Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. Protein Expr Purif.

**Lin Y.H, Charles Yu, Anthony H.C. (1986).** Huang. Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. Archives of biochemistry and biophysics, 244(1): 346–356.

**Lourens K., Reid G. (2002).** Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grape grower & Winemaker. Annual Technical Issue. 50 - 54.

**Lux Lock L, Valeriano A, Corbellini Patrícia V. (2007).** Lipases produites par des levures : des biocatalyseurs puissants à des fins industrielles. tecnológica, Santa Cruz do Sul, v.11 n1 e 2, p. 18-25.

## M

**Monroy Salazar Humberto G, Salem, A.Z.M, Ahmed E. K. (2016).** Mode of action of yeast in animal nutrition. Yeast additive and animal production, p : 14-20.

**Moussouni, A. (2013).** La réalisation d'une étude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb, sous-secteur : huile d'olives. *REME*. Algérie. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/17488549/etude-de-faisabilite-de-nouvelles-techniques-pour-la-reme>.

## N

**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 en Microbiologie et Biotechnologies, Université de la méditerranée (Aix Marseille2).

**Neang Mao P. (2013).** Identification et caractérisation fonctionnelle de nouvelles lipases/acyltransférases de levures. Thèse de Doctorat, centre international d'études supérieures en sciences agronomiques de Montpellier.

**Nguyen T.D. (2016).** Protection de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne Agrosup Dijon.

## O

**Ould Hamouda M.D et HABACHOU M. (2015).** Recherche de souches d'intérêt biotechnologiques : Evaluation de leurs pouvoirs de dégradation et/ou de biotransformation sur quelques sous-produits industriels. Mémoire en Microbiologie Appliquée. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

## R

**Rezki-Bekki M. A. (2014).** Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de doctorat en Biotechnologie, Université d'Oran.

**Revy R. (2005).** Levures biologiques alimentaires et poudres levantes. Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire F3 (F4600).

**Robina R. (2020).** Characterization of commercial lipase from indigenous fungal strains and biomass. Thèse de doctorat, university of gujrat.

**Rouillard H. (2012).** Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde. Thèse de doctorat en Chimie organique, université de la rochelle.

**Ruchi G, Anshu Gupta, Khare SK. (2007).** Lipase de la souche *Pseudomonas aeruginosa* tolérante aux solvants : optimisation de la production par la méthodologie et l'application de la surface de réponse. Bioresour Technol, 99: 4796–4802.

## S

**Salgado V, César F, Teresa L, José Carlos R, Ana E. (2019).** Isolation and Identification of *Magnusiomyces capitatus* as a Lipase-Producing Yeast from Olive Mill Wastewater. Waste and Biomass Valorization.

**Salihua. Aliyu**, Md. Zahangir Alama, M. Ismaili A. K, Hamzah M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resources, Conservation and Recycling, 58: 36– 44.

**Sanchez Gonzalez Y.** (2008). Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé : intensification de la production d'éthanol. Thèse de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique, l'université de Toulouse.

**Sarmah Nipon D.** Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab and C. Sumana1. (2017).Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. Biotechnology Progress, 1-67.

**Saxena R.K,** Anita Sheoran, Bhoopander Giri, W. Sheba D. (2003). Purification strategies for microbial lipases. Journal of Microbiological Methods, 52: 1-18.

**Sharma R,** Chistib Y, Banerjeea U.C (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances. 627–662.

**Soleyman. S,** H. Alizadeh, H. Mohammadian, E. Rabbani, F. Moazen, H. (2017). Sadeghi Milieux efficaces pour une production élevée de lipases : approche une variable à la fois. Avicenna J. Med. Biotechnol, 9 (2): 82 – 86.

**Starmer William T** and Lachance M.A. (2011). Yeast Ecology. The Yeasts, a Taxonomic Study. Chapitre 6: 65-83.

## T

**Thakur S.** (2012). Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. International Journal of Scientific & Engineering Research Volume 3, Issue 7:1-29.

**Toriya M.J,** Rozès N, Poblet M, Guillamón J.M, Mas A (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International of Food Microbiology, 80 : 47-53.

**Toumi S.** (2018). Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de doctorat en Microbiologie Moléculaire et Protéomics, Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes.

**Treichel H,** Débora O , Marcio A. M , Marco Di L , J. Vladimir O. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. Food Bioprocess Technol, 3:182–196.

## V

**Veeraragavan K**, Tracey C, Bernard F.G. (1990). Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, Volume 1044, Issue 1: 26-33.

**Vakhlou J et Kour A.** (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile: 69-85.

## W

**Walker and Nia A.W.** (2018). Introduction to Fungal Physiology. *Fungi: Biology and Applications*, Third Edition, 1- 35.

**Walker G.** (2000). The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. In: *Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria. Allemande Technical Meeting*. P: 27-30.

**Walker, G. M.** (2009). Yeasts. In M. Schaechter (Ed.), *Desk encyclopedia of microbiology* (2nd ed., pp. 1174-1187). Academic Press/Elsevier.

## X

**Ximena Z.** (2016). Caractérisation in silico, biophysique et enzymatique d'une nouvelle lipase alcalinophile provenant d'une souche d'*aneurini bacillus thermoaerophilus*. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université du Québec.

## Y

**Yalçın Tansel H**, Cengiz Çorbacı, Füsün B. (2013). Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. *Journal of Basic Microbiology*, 54(S1), S85–S92.

## Z

**Zallot R.** (2011). Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat en Biologie Végétale, L'université bordeaux 2. n° 1840.

**Présenté par :** ZENATI Saoussene  
MERABET Maroua

**Date de Soutenance :** 04/10/2020

**Intitulé :** Etude de la production de la lipase levurienne.

**Résumé :**

Les lipases sont des biocatalyseurs importants sur le plan industriel, en particulier les lipases microbiennes et par conséquent, le criblage, la production, la purification et la caractérisation de l'enzyme lipase à partir de souches microbiennes émergent continuellement pour répondre aux besoins des industries pharmaceutiques et alimentaires. Plus récemment, diverses approches rentables et efficaces sont tentées pour augmenter la production de lipases chez les souches microbiennes. Pour cela, ce travail, à deux chapitres, tente d'étudier la production de lipases levurienne. Le premier chapitre est sur les levures. Après avoir traité les caractéristiques des levures, leur reproduction et leur classification, nous avons abordé leur habitat, l'isolement et le screening des souches productrices de lipase d'une part, et d'autre part, nous avons évoqué leur mécanisme, les facteurs influençant leur croissance et leur application industrielle notamment, la production d'enzymes. Dans le deuxième chapitre sur les lipases, nous avons décrit l'origine de la lipase, sa structure et son mécanisme. Ensuite, la production de cette enzyme sous différents systèmes de fermentation a été discutée. Aussi, l'impact de divers facteurs tels que les sources de carbone, les sources d'azote, le pH et la température a été évalué. Et nous avons présenté l'utilisation des plans statistiques, dans la perspective d'augmenter la production enzymatique à partir de souches microbiennes. Différentes méthodes de dosage de la lipase ont été révélées. Enfin, les techniques de purification, les caractéristiques de cette enzyme et ses applications industrielles ont été résumées.

**Mots clés :** Levure, criblage, lipase, méthode de dosage, utilisation industrielle.

**Jury :**

**Président :** Mme Bennamoun L.                    MCB, UFM, Constantine.  
**Encadreur :** Mme Dakhmouche S.            MCA, ENS Assia Djébar, Constantine.  
**Examineur :** Mme Boukhalifa H.            MCB, UFM, Constantine.  
**Examineur :** Mme Labbani F. Z. K.        MCB, ENS Assia Djébar, Constantine.

**Année universitaire :** 2019/2020