



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Production de quelques enzymes hydrolytiques fongiques par fermentation solide

Présenté par : BELKEBIR Amira

Le : 13/06/2024

MEHAREK Aya

Jury d'évaluation

Président : BENHAMDI Asma (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s): LEGHLIMI Hind (MCA- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 – 2024

Remerciements

Avant tout, on remercie notre créateur Allah le tout puissant qui nous a donné la sagesse, la santé et la volonté pour réaliser ce travail et arriver à ce stade scientifique.

*On adresse nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance à Mme **BOUCHERIT Zeyneb** maître assistante A, qui nous fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail pour sa patience, sa gentillesse, qui nous a fait profiter de ses connaissances, On le remercie de nous avoir guidés pendant tout le long de la réalisation de notre mémoire.*

On tient à remercier aussi tous les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer travail.

A :

*Mme la présidente **BENHAMDI Asma** maître de conférences A,
Université des Frères Mentouri .Constantine*

*Mme l'examinatrice **LEGHIMI Hind** maître de conférences A,
Université des Frères Mentouri .Constantine*

En fin, on exprime toute nos sympathies et on remercie très chaleureusement l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

Dédicace

Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage et à celle qui attend chaleureusement ce jour À :

Les deux personnes, les plus chères à mon cœur :

Au meilleur papa du monde « Hichem » mon héros, l'homme qui s'est sacrifiée pour me voir réussir dans ma vie, mon support dans la vie, qui m'a appris et m'a toujours dirigé vers la gloire, que Dieu le garde

A mon paradis sur terre, ma vie et la source de bonheur ma mère « Lilia » qui m'a guidé vers le bon chemin, qui a fait le possible pour me voir réalisé mes rêves, que Dieu leur prête bonheur et longue vie

Ma belle jumelle, ma compagnie de vie, ma sœur « Inès » que dieu le protéger et leur offre la chance et le bonheur

À mon adorable petite frère « Ahmed » je te souhaite du succès de ton baccalauréat, une vie est remplie de succès et de bonheur, que dieu protège de tout mal

Sans oublier mon binôme « Amira » pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet

Aya

Dédicace

Tout d'abord, je remercie le dieu, notre créateur de m'avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Je dédie cette fruit de fin d'étude à mes parents, sa présence est un précieux cadeau qui inonde ma vie de joie et de tendresse, à mon père « IBRAHIM » que je le remercie énormément pour ces efforts, ces conseils et sa surveillance.

A ma merveilleuse mère « RATIBA », la source de tendresse et la lumière qui guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de réussite, pour tous ses sacrifices consentis et ces précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A mon cher oncle décédé « Halim Boutouatou », s'il était encore en ma vie, il serait très heureux de ce succès que vous avez obtenu

A mes chères sœurs et mon cher frère

A mon partenaire en mémoire « Aya »

A mes meilleurs amis chaque personne par son nom, le bonheur de ma vie.

A ma famille et à tous ceux que je l'aime

Enfin, j'offre mes bénédictions à tous ceux qui m'ont soutenu dans l'accomplissement de ce travail.

Amira

Table des matières

Résumé	
Abstract	
المخلص	
Table des abréviations	
Liste des figures	
Liste des photographies	
Liste de tableau	
Introduction.....	1
Partie 1 : Revue bibliographique	
1. Les moisissures.....	3
2. Penicillium.....	4
2.1 Caractères culturaux.....	4
2.2 Caractères microscopique.....	5
2.3 Taxonomie	6
2.4 Ecologie.....	6
2.5 Les metabolites produits par Penicillium	7
3. Les enzymes fongiques.....	8
3.1 Généralités sur les enzymes	8
3.2 Importance et applications des enzymes fongiques	9
3.3 Production des enzymes fongique	9
3.3.1 Fermentation a l'état solide (FMS).....	9

3.3.2 Fermentation a l'état liquide (FML).....	10
4. Les lipases.....	10
4.1 Définition.....	10
4.2 Nomenclature.....	10
4.3 Substrat.....	11
4.4 Mode d'action.....	12
4.5 Les microorganismes producteurs.....	13
4.6 Milieux et conditions de production.....	13
4.7 Utilisations industrielle	13
4.7.1 Industrie alimentaire.....	13
4.7.2 Industrie oleochimique	14
4.7.3 Détergent	14
4.7.4 Application pharmaceutique	14
5. Les tannases.....	15
5.1 Définition.....	15
5.2 Nomenclature.....	15
5.3 Substrat.....	15
5.4 Mode d'action.....	16
5.5 Les microorganismes producteurs.....	17
5.6 Milieux et condition de production.....	17
5.7 Utilisations industrielles.....	17
Partie 2 : Matériel et méthodes	
1. Optimisation de la production enzymatique.....	19
1.1 Effet de la quantité de l'inoculum.....	19

1.2 Effet de la source de carbone	19
1.3 Effet des sels minéraux.....	19
1.4 Effet de l'éthanol et de la concentration en tween 80.....	19
1.5 Effet de l'humidité.....	19
1.6 Effet des sources d'azote.....	19
1.7 Effet de temps d'incubation	19
2. Production enzymatique optimale	20
2.1 Préparation du milieu de culture.....	20
2.2 Préparation de l'inoculum.....	20
2.3 Condition de fermentation.....	20
2.4 Extraction des enzymes.....	21
3. Dosage des lipases.....	21
4. Dosage des tannases	22
Partie 3 : Résultats et discussions	
1. Production des lipases.....	23
1.1 Optimisation de la production des lipases.....	23
1.1.1 Etude de l'effet de la quantité de l'inoculum.....	23
1.1.2 Etude de l'effet de la source de carbone	23
1.1.3 Etude de l'effet des sels minéraux.....	24
1.1.4 Etude de l'effet de l'éthanol et de la concentration en tween 80.....	25
1.1.5 Etude de l'effet l'humidité	25
1.1.6 Etude de l'effet des sources d'azote.....	26

1.1.7 Etude de l'effet de temps d'incubation.....	27
1.2 Production optimale des lipases	27
2. Production des tannases.....	27
2.1 Optimisation de la production des tannases.....	27
2.1.1 Etude de l'effet de la quantité de l'inoculum	28
2.1.2 Etude de l'effet de la source de carbone.....	28
2.1.3 Etude de l'effet des sels minéraux.....	29
2.1.4 Etude de l'effet de l'éthanol et de la concentration en tween 80.....	30
2.1.5 Etude de l'effet de l'humidité	30
2.1.6 Etude de l'effet des sources d'azote.....	31
2.1.7 Etude de l'effet de temps d'incubation	32
2.2 Production optimale des tannases	32
Conclusion générale.....	34
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumés

Résumé

L'objectif de notre travail est l'optimisation de la production, par *Penicillium sp*, des lipases et des tannases par fermentation solide sur les grignons d'olives. La première partie de ce travail de recherche vise la détermination des valeurs optimale des différent facteurs sélectionnés un par un pour la production de lipases et de tannases en FMS à savoir : la quantité de l'inoculum, la source de carbone, des sels minéraux, la concentration en tween 80, l'humidité, source d'azotes et le temps d'incubation. L'analyse des résultats a permis de déterminée les valeurs de ces facteurs ; Pour les lipases, la production optimale est obtenue avec 10 disque de l'inoculum, extrait de malt, l'ion $MnSO_4$, 1% tween 80, l'humidité 70%, $NHO SO_4$ comme source d'azote et 6 jrs pour l'incubation. Pour confirmer les effets de ces facteurs sur la production lipasique, on a réalisé une expérience où on a procédé à une culture sous les conditions optimales regroupées. Les résultats est négative et on a obtenu aucune activité. Tandis que pour les tannases, la production optimale est obtenue en présence de 14 disques de l'inoculum, extrait de malt, l'ion $Zn SO_4$, 2.5% tween 80, l'éthanol, l'humidité 60%, $NA NO_3$ comme source d'azote et 12 jrs pour l'incubation. L'expérience de confirmation menée sous les conditions optimales a permis d'augmenter la production tannasique de 3 fois par rapport aux conditions non optimisées.

Mots clés : Optimisation, Production, Lipases, Tannases, *Penicillium sp*, Fermentation solide (FMS), Grignons d'olive.

Abstract

The objective of our work is the optimization of the production, by *Penicillium* sp, of lipases and tannases by solid fermentation on olive pomace. The first part of this research work aims to determine the optimal values of the different factors selected one by one for the production of lipases and tannases in FMS, namely: the quantity of the inoculum, the carbon source, mineral salts, the concentration of tween 80, humidity, nitrogen source and incubation time. The analysis of the results made it possible to determine the values of these factors; For lipases, optimal production is obtained with 10 disk of inoculum, malt extract, $MnSO_4$ ion, 1% tween 80, humidity 70%, $NHO SO_4$ as nitrogen source and 6 days for incubation. To confirm the effects of these factors on lipase production, we carried out an experiment where we carried out a culture under the optimal conditions grouped together. The results were negative and no activity was obtained. While for tannases, optimal production is obtained in the presence of 14 disks of inoculum, malt extract, $Zn SO_4$ ion, 2.5% tween 80, ethanol, humidity 60%, $NA NO_3$ as source of nitrogen and 12 days for incubation. The confirmation experiment carried out under optimal conditions made it possible to increase tannasic production by 3 times compared to non-optimized conditions.

Keywords: Optimization, Production, Lipases, Tannases, *Penicillium* sp, Solid fermentation (FMS), Olive pomace.

الملخص

الهدف من هذا العمل تحسين انتاج الليباز و التاناز من طرف *Penicillium sp* عن طريق التخخير في وسط صلب على نفايات الزيتون ، يهدف الجزء الأول من هذا العمل البحثي إلى تحديد القيم المثلى للعوامل المختلفة المختارة واحدا تلو الآخر لإنتاج الليباز والتاناز وهي: كمية اللقاح، مصدر الكربون، الأملاح المعدنية، التركيز. توين 80، الرطوبة، مصدر الازوت و وقت الحضانة. وقد مكن تحليل النتائج من تحديد قيم هذه العوامل؛ بالنسبة لليباز، يتم الحصول على الإنتاج الأمثل باستخدام 10 أقراص من اللقاح ، مستخلص الشعير كمصدر للكربون ، و الايون $MnSO_4$ ، 1% توين 80 رطوبة 70 % $NHO SO_4$ كمصدر للأزوت ، ايثانول و ستة ايام للزراعة من اجل تأكيد تأثير هذه عوامل قمنا بالتجربة او عملية الزراعة تحت شروط مثالية . نتائج سالبة و لم نحصل على اي نشاط .

بينما بالنسبة للإنتاج التاناز المثالي تم الحصول عليه في وجود 14 قرص من لقاح و مستخلص الشعير ، و الايون Zn SO_4 2.5% من توين 80 و رطوبة 60% ، NO_3 كمصدر للأزوت و 12 يوم للزراعة . و تجربة التأكيد تمت في شروط مثالية ، سمحت بزيادة إنتاج التاناز بمقدار 3 مرات مقارنة بالظروف غير المحسنة.

الكلمات المفتاحية: التحسين، الإنتاج، الليباز، التاناز، *Penicillium sp* ، التخخير الصلب ، نفايات زيتون .

Liste des abréviations

A: Aspergillus

Aw: Water Activity

BSA: Bovine Serum Albumin

CYA : CZA pek Yesat

FML : Fermentation en Milieu Liquide

FMS : Fermentation en Milieu Solide

Jrs : jours

MEA: Malt Extract Agar

M: Molaire

N : Normalité

nm : nanomètre

P : Penicillium

pH : potentiel hydrogène

S : Sabouraud

Sp : sans pagination

µl : micro litre

Liste des figures

- Figure 1 :** les colonies de *Penicillium malodoratum* sur diffèrent milieu.....4
- Figure 2 :** les types de ramification des conidiophores chez penicillium.....6
- Figure 3 :** Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride.....12
- Figure 4 :** Voie d'hydrolyse de l'acide tannique par la tannase.....16
- Figure 5 :** Effet de la taille d'inoculum sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....23
- Figure 6 :** Effet de la source de carbone sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....24
- Figure 7 :** Effet des sels minéraux sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....24
- Figure 8 :** Effet de tween 80 et d'alcool sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....25
- Figure 9 :** Effet l'humidité sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....26
- Figure 10 :** Effet des sources d'azote sur la production des lipases par *Penicillium sp*.....26
- Figure 11 :** Effet de temps d'incubation sur la production des lipases par *Penicillium sp*....27
- Figure 12 :** Effet de la taille de l'inoculum sur la production des tannases par *Penicillium sp*28
- Figure 13 :** Effet de la source de carbone sur la production des tannases par *Penicillium sp*..29
- Figure 14 :** Effet des sels minéraux sur la production des tannases par *Penicillium sp*.....29
- Figure 15 :** Effet de tween 80 et d'alcool sur la production des tannases par *Penicillium sp*30
- Figure 16 :** Effet de l'humidité sur la production des tannases par *Penicillium sp*.....31
- Figure 17 :** Effet des sources d'azotes sur la production des tannases par *Penicillium sp*.....31
- Figure 18 :** Effet de temps d'incubation sur la production des tannases par *Penicillium sp*.....32

Figure 19: Expérience de confirmation de la production optimale des tannases par *Penicillium*

sp......**33**

Liste des photographies

Photographie 1 : Production enzymatique optimale.....	20
Photographie 2 : Extraction des enzymes.....	21
Photographie 3 : Le dosage de l'activité enzymatique (lipasique et tannasique).....	22

Liste des tableaux

Tableau 1 : aspect macroscopique de quelque espèce de penicillium.....	5
Tableau 2 : Taxonomie penicillium.....	6
Tableau 3 : Classification des enzymes.	8
Tableau 4 : quelque microorganisme producteur de lipase.....	12
Tableau 5 : les exemples du microorganisme producteur de tannase	16
Tableau 6 : D'autre application des tannases	18

Introduction

Introduction

Depuis de nombreuses civilisations les enzymes ont toujours fait partie de la vie quotidienne (Nobel *et al.*, 2004). Elles sont définies comme des molécules organiques d'origine protéique, conçues pour catalyser des réactions biochimiques (Motta *et al.*, 2023). Le marché mondial des enzymes industrielles devrait connaître une croissance exponentielle, avec un taux de croissance annuel de 6,8 % de 2019 à 2024 (Allied Research Market, 2021).

Parmi ces enzymes, les lipases devraient atteindre une augmentation de 6.8% d'ici 2024. Ils sont généralement utilisés dans l'industrie alimentaire (Herrington, 1954), détergent (FALCH, 1991), l'industrie oleochimique (Hasan *et al.*, 2006), l'industrie pharmaceutique (Kumar *et al.*, 2023). Les tannases devait croître de 5,3% d'ici 2032 (Future Market insights) ; Elles sont utilisées dans la fabrication des détergents à lessives et des produits cosmétiques (Dykstra *et al.*, 2011), indicateur du cancer du côlon (Noguchi *et al.*, 2007) et l'industrie de cuir (Dykstra *et al.*, 2011).

Leur production et leur activité peuvent être influencées par divers facteurs, tels que les conditions de culture, la composition des milieux et la composition génétique de la souche productrice. Par conséquent, l'optimisation de la production et de l'activité de lipase et tannase est devenue un objectif clé pour les chercheurs. Le processus d'optimisation vise à atteindre une activité lipasique et tannique maximale tout en minimisant les coûts et le temps L'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat alternatives peut également réduire considérablement les coûts et résoudre les problèmes de pollution de l'environnement (K. Geoffry et RN. Achur, 2018).

Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton *et al.*, 1999), les enzymes fongiques sont des biocatalyseurs stables et efficaces ; leur production est rapide et élevée en consommant moins d'énergie (Mojsov, 2016). Parmi les meilleurs producteurs des enzymes industrielle c'est les moisissures de genre *Penicillium* notamment l'ascomycète filamenteux *Penicillium chrysogenum* (mukesh *et al.*, 2018).

Pour cela, le présent travail a pour principal objectif d'optimiser la production de lipases et de tannases par une souche de *Penicillium* sur fermentation solide à base de grignons d'olive. Nous avons abordé dans une première partie une synthèse bibliographique comportant d'une part

l'étude de moisissure *Penicillium* et d'autre part l'étude des enzymes fongiques (lipases et tannases). Quant à la deuxième partie, elle concerne la méthodologie adoptée lors de la présente étude. On a commencé par l'évaluation les effets des différents paramètres (temps d'incubation, source de carbone, les sels minéraux, la quantité d'inoculum, l'éthanol, la concentration en tween 80, source d'azote, et l'humidité) sur la production des enzymes (lipase et tannase) afin d'obtenir des valeurs optimales pour la production d'enzymes, Ensuite on a procédé à la fermentation sur milieu solide (FMS) à base de grignons d'olive avec la souche *Penicillium* sous les conditions optimales trouvées. La troisième partie expose les résultats obtenus et leurs discussions. Finalement, on termine par une conclusion générale et des perspectives.

**Partie 1 : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Les moisissures

« Les moisissures » est un terme utilisé pour les champignons filamenteux microscopiques, ils sont eucaryotes, hétérotrophes et ubiquistes. En général, les aliments sont des substrats très favorables à leur développement. La structure des moisissures repose sur leur appareil végétatif qui est un thalle en forme de filaments ; L'association des thalles constitue un mycélium (M.Nguyen Minh Tri, 2007).

Ils se nourrissent en absorbant des composés organiques solubles et des éléments minéraux (Kachour Leila, 2005), par exemple : le carbone, l'azote, le calcium, le potassium, le soufre, les ions métalliques tels que fer, cuivre, magnésium, zinc (Marie-Dominique Parchas, 2008) avec quatre différents mode de vie : le saprophytisme, le parasitisme et la symbiose (Kachour Leila, 2005).

Les facteurs physiques et chimiques ont un impact significatif sur la croissance et le développement des moisissures. Ces derniers ont généralement des besoins en eau inférieurs à ceux des autres microorganismes (A_w voisines de 0,7) (Davet, 1996). L'humidité n'affecte pas seulement la croissance mycélienne mais aussi la germination des spores (Bourgeois, 1989). La majorité des moisissures sont mésophiles avec des températures optimales de croissance de 25 C° à 35 C° (Botton *et al.*, 1999 ; Julien, 2002). Elles se développent dans un pH entre 4.5 – 8.0 (Botton *et al.*, 1999) et préfèrent croître dans un milieu faiblement acide (Urbanek *et al.*, 1984 ; Delgado-Jarana *et al.*, 2002). La quantité d'oxygène disponible est un facteur important pour le développement des moisissures, la plupart sont aérobies mais il y a aussi certaines espèces avec est une anaérobiose très stricte (Bourgeois, 1989 ; Botton *et al.*, 1999) alors que le rayonnement du spectre visible (380 nm – 720 nm) n'a généralement aucun effet sur la croissance. Le corps végétatif des champignons, mais peut agir en sporulation (Botton *et al.*, 1999).

Les moisissures reproduisent en manière sexuée (champignons téléomorphe) ou asexuée (champignons anamorphe) il existe aussi champignon holomorphes chez qui les deux forme coexistent (M.Nguyen Minh Tri, 2007).

2. Penicillium

En 1809 à introduire le penicillium pour la première fois par Link, le nom Penicillium est un mot latin qui signifie « brosse » cela est dû à la forme des conidiophores, ce genre contient 354 espèces taxonomiquement reconnues, qui sont isolées dans différent environnement telles que le sol, l'air et les aliments. Le penicillium est un champignon supérieur (ascomycètes) et saprophyte, ils se reproduisent par voie asexuée par les conidies (les spores asexuées) ou par voie sexuée quand les hyphes de deux individus haploïdes portant des types accouplement opposés (Jeanne Ropars *et al.*, 2020).

2.1 Caractères culturels

Le penicillium se développe rapidement sur les milieux standards tels que Sabouraud (S) Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yesat Agar (CYA). Il croît à des températures optimales entre 20 °C à 25 °C pendant 7 jours, on observe les mycéliums plats et la texture duveteuse avec des gouttelettes d'exsudat non coloré (Visagie *et al.*, 2014). La teinte, le plus souvent dans les moisissures sont vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi pour certaines espèces, jaune, orange ou rouge (tableau 1). (Chermette et Bussieras, 1993). Les couleurs des espèces peuvent changer selon milieu de cultures, la lumière, la température et l'humidité comme le montre dans (figure 1) (Visagie *et al.*, 2014).



Figure 1 : les colonies de *Penicillium malodoratum* sur différents milieux (rangée supérieure de gauche à droite sur milieu CYA, YES, DG18 et MEA ; rangée du bas de gauche à droite le reverse CYA, Yes, DG18 et CRÉA. donnant ainsi différent aspect (Visagie *et al.*, 2014).

Tableau 1 : aspect macroscopique de quelque espèce de penicillium (Chermette et Bussieras, 1993).

Espèces du Pénicillium	La couleur (aspect macroscopique)
<i>P. citrinum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. italicum</i>	Vert – gris
<i>P. chrysogenum</i>	Vert-jaune
<i>P. roquefortii</i> , <i>P. fellutatum</i>	Vert-sombre
<i>P. nalgiovense</i>	Jaune pâle
<i>P. purpurogenum</i>	Jaune vif à rouge
<i>P. islandicum</i>	Mélange d'orange et verdâtre
<i>P. camembertii</i>	Blanche

2.2 Caractères microscopique

Penicillium doit son nom à sa forme des conidiophore, ils ont une grande importance dans la taxonomie de penicillium. La figure 3 montre les modèles de ramification utilisée dans la classification. Les conidiophores varient depuis des phialides simples et solitaire (figure 2A) aux modèles très complexes à plusieurs ramifications résultant en des motifs généralement symétriques et asymétriques. Monoverticille (figure 2B) les conidiophores comportent un verticille terminal de phialides. Chez certaines espèces la cellule terminale portant des conidiophores est enflée ou vésiculaire, ils peuvent être confondus avec diminutifs conidiophore d'aspergillus, mais ils ont des conidiophore par des septums contrairement aux des conidiophore d'aspergillus. Conidiophores divariqués (irrégulier) ont un modèle de ramification simple à complexe, il possède de nombreuses branches subterminales, mais où le conidiophore les parties sont divergente (figure 2C). Les conidiophores biverticillés (Figure 2D, E) ont un groupe de trois métules ou plus entre l'extrémité du conidiophore et les phialides ; les métules peuvent être de longueur inégale ou égale, varier dans leur degré de divergence, sont généralement plus ou moins cylindriques mais peut aussi être claviforme ou légèrement vésiculaire. Terverticillé les conidiophores (Figure 2F) ont un autre niveau de ramification entre les conidiophore et les métules, ce n'est peut-être qu'une continuation d'un axe de l'hyphe et une branche latérale, parfois un véritable verticille de trois ou plus branches. Des conidiophores quaterverticillés (Figure 2G) sont produits par seulement quelques espèces, et ont un niveau supplémentaire de ramification (Visagie *et al.*, 2014).

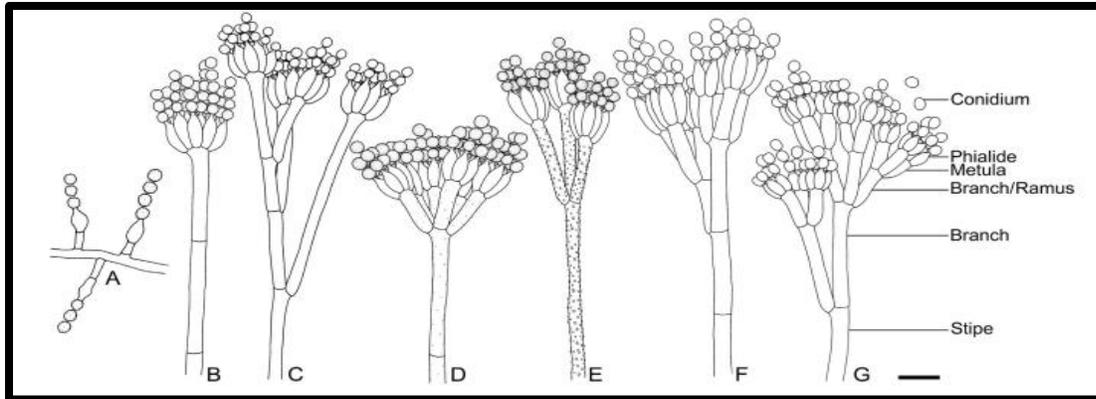


Figure 2 : les types de ramification des conidiophores chez penicillium A. conidiophores a simple phialides, B. Monoverticille, C. conidiophore divarique, D.E. biverticillés, F. Terverticillé, G. quaternverticillés (Visagie *et al.*, 2014).

2.3 Taxonomie

Le penicillium est un champignon filamenteux appartenant au phylum ascomycètes, il comprend 354 espèces définies. Ils sont classés comme suit :

Tableau 2 : Taxonomie de Penicillium (Samson et Pitt, 1985)

Règne	Fungi
Division	Amastigomycota
Sous-division	Ascomycotina
Classe	Ascomycète
Sous-classe	Plectomycetidae
Ordre	Eurotiales
Famille	Eurotiaceae(Trichocomaceae)
Genre	Penicillium

2.4 Ecologie

Les Penicillium sont ubiquistes, la majorité des espèces présentent croissance optimale dans des conditions défavorables (à des températures modérées à basses et sont capables de croître lors d'activités d'eau (aw) inférieur à 0,9). Chaque penicillium et leurs habitats. De nombreuses espèces habitent dans le sol (JI Pitt, 2002). Présent aussi dans la matière organique en décomposition, dans le matériel nutritionnel comme les céréales et produits laitiers, sur matériel

de construction des environnements détériorer par l'eau, l'air intérieur et poussière de maison (Alban Gauthier,2016), et copeaux et bloc de bois humide (JoanaTannous,2015).

2.5 Les métabolites produits par *Penicillium*

Penicillium peut également produire une gamme variée de métabolites secondaires, dont plusieurs mycotoxines, composés antibactériens, antifongiques, immunosuppresseurs et agents hypocholestérolémiant. L'exemple le plus emblématique de médicament d'origine fongique est la pénicilline (Christelle El Hajj Asaf *et al.*, 2020).

L'ascomycète filamenteux *Penicillium chrysogenum* est utilisé industriellement pour obtenir des pénicillines économiquement (Sandra Ziemons *et al.*, 2017). En plus de son rôle de producteur de pénicilline, avancée récente en biologie synthétique plus que la production d'antibiotique β -lactamine céphalosporine et la pénicilline (Francisco Fierro *et al.*, 2022).

La moisissure *Penicillium* produise des alcaloïdes avec d'activités antimicrobiennes et anticancéreuses (antiprolifératives, antimigatoires et anti-invasives contre des cellules cancéreuses du sein). Les hormones, les polycétides plus que les acides aminés qu'ils utilisé aussi comme des anticancéreuses et antimicrobiennes dans l'industrie alimentaire, agricole pharmaceutique et thérapeutique (Bendjazia Abdelkrim *et al.*, 2022).

Les *Penicillium*s produisent aussi des enzymes tels que : Beta glucosidase, Cellulase, Hemicellulase, Pectinase, Xylanase, α -Amylase, Laccase, Protéase, Lipases, Invertase (Singh, 2018 ; Meena *et al.*, 2018).**Figure3:** Figure 4: Voies de biosynthèse des métabolites secondaires. Dans les cases grises, L'épine dorsale typique de métabolites secondaires. En gris, les principales mycotoxines produites par ces voies. En rouge, l'enzyme associées à chaque voie. En bleu, des PKS et NRPS distincts sont impliqués dans l'ochratoxine une biosynthèse (OTA) ; NRPS : peptide synthétase non ribosomale, PKS : polykétide synthase, TC : Terpène cyclase, DMATS : diméthylallyl tryptophane synthase. En gras, les mycotoxines produites par Espèce de *Penicillium* (Christelle El Hajj Assaf *et al.*, 2020).

3. Les enzymes fongiques

3.1. Généralités sur les enzymes

Tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humain, dépendent pour leur existence des molécules biologiques catalysent les réactions chimiques connu sous le nom enzymes, elles sont définies comme des protéines ou des polymères d'acide aminés forment dans longue chaine douées d'une activité biologique particulière, elles sont divisées en six classes, certains enzymes sont utilisés pour les réactions de fabrication de certains composés chimiques. Tandis que d'autres enzymes jouent un rôle dans la dégradation et la modification de tels composés (Tableau 3) (Charnock et McCleary, 2005).

Ces biomolécules ont une application étendue en biotechnologie par leur capacité à conquérir des substrats naturels grâce à un arsenal enzymatique très développée. Les enzymes principalement utilisées sont les enzymes fongiques extracellulaires qui dégradent des polymères naturels comme les amidons, les protéines, les celluloses et aussi les pectines (Werner et al., 2010).

Tableau 3 : Classification des enzymes (Haytem Jarrar, 2011)

Classe d'enzyme (EC)	Famille	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réductions
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isoméras	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées a l'hydrolyse d'ATP

3.2 Importance et application des enzymes fongique

Les enzymes fongiques sont utilisé dans nombreuses industries notamment l'alimentaire dans la production des fromages (lipase de *Penicillium roqueforti*), les boissons, la boulangerie et dans la médecine où ils sont également très utiles comme un traitement contre le cancer diabète et AIDS (enzymes digestives comme l'amylase et Protéase d'*Aspergillus*. Aussi, elles sont utilisées pour clarifier les jus de fruits et de légumes afin d'améliorer la texture et stabilité en diminuant la viscosité (cellulase de *Penicillium*) (P. Dhevagi *et al.*, 2021).

Dans la préparation de nourriture pour les animaux et l'industrie de cuir (D. Banerjee *et al.*, 2012). Les enzymes fongiques sont utilisées aussi dans l'extraction du café, dans les détergents et dans la production des polysaccharides pharmacologiques (Gahfif Ouahiba, 2021).

3.3 Production des enzymes fongiques

La fermentation submergée et la fermentation à l'état solide (FMS) sont les deux types largement utilisés dans la production enzymatique (Kumar et Kanware, 2012). L'utilisation de résidus agro-industriels comme substrat alternatives peut également réduire considérablement les coûts et résoudre les problèmes de pollution de l'environnement (K. Geoffry et RN. Achur, 2018).

3.3.2. Fermentations à l'état solide (FMS)

C'est une technique alternative économique aux fermentations (FMS) pour la production à grande échelle d'enzymes industrielles, elle est définie comme « la croissance de micro-organismes sur des matériaux solides humides en l'absence d'écoulement libre l'eau ». Cette technique utilise des substrats agricoles avec diverses les glucides, les sources d'azote, les sels ainsi que les nutriments comme l'amidon, cellulose, pectine, lignine, fibres et minéraux (Kumar et Suman, 2014).

L'utilisation de procédés de fermentation solide présente de nombreux avantages, notamment : Il s'agit de procédés simples qui utilisent une technologie simple, il ne nécessite pas d'équipement sophistiqué et coûteux pour surveiller les paramètres environnementaux, de plus, les produits solides de fermentation sont souvent plus concentrés, ce qui les rend plus faciles à purifier. En outre, la faible humidité du milieu et le grand volume utilisé dans les FMS réduisent le risque de contamination par d'autres micro-organismes, mais la majorité des bactéries ont besoin de niveaux d'humidité plus élevés pour survivre. De plus, lors d'une fermentation solide, il n'y a pas de production de mousse et le volume de déchets est faible contrairement à la fermentation

liquide ; les enzymes produites par fermentation solide sont moins sensibles à la répression catabolique ainsi qu'à l'induction (singhania *et al.*, 2009)

3.3.1 Fermentation à l'état liquide (FML)

La fermentation à l'état liquide est un bioprocédé technologique établie depuis longtemps par rapport à la fermentation à l'état solide, elle inclue l'utilisation d'un milieu de culture liquide tel que le bouillon nutritif. Dans le processus submergé, les microorganismes libèrent les enzymes recherchées en décomposant des nutriments (carbone et l'azote) (Cordova Lopez, 1998; Ravichandran, 2012).

4. Les lipases

4.1 Définition

Les lipases sont des hydrolases atypiques, sont des enzymes ubiquistes qu'on retrouve chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, champignons ou levures, spécifique de substrat contient une classe particulière d'estérases capables d'hydrolyser des esters carboxyliques. Sont des enzymes forment une classe d'enzymes parfaitement solubles dans l'eau, responsables du catabolisme des triglycérides, donc sont des Triacylglycerol acyl hydrolases. Le rôle physiologique principal dans le métabolisme des graisses et des lipides (Patrick Fickers *et al.*, 2007).

4.2 Nomenclature

La nomenclature des lipases est souvent une source des confusions, spécialement en ce qui concerne la spécificité du substrat, différent termes, définition et manières de mesurer les lipases ont été rapportées dans la littérature. En considérant l'ensemble des derniers avancements de l'étude de ces enzymes une définition générale peut être donne base sur consensus des enzymologistes.

Une lipase (EC 3.1.1.3) peut être définie comme une triacylglycérol hydrolase, l'enzyme qui hydrolyse des liaisons esters des triglycérides émulsionnées en diglycérides, mono glycérides, glycérol et acide gras (Cordova Lopez, Jesus Antonio, 1998)

4.3 Substrat

Les lipases hydrolysent les phospholipides, les esters de cholestérol, les triglycérides, les diglycérides et les monoglycérides et même parfois aux esters synthétiques à chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues. Les lipases montrent une activité particulièrement élevée sur des lipides riches en triglycérides tels que l'huile d'olive, le beurre, les graisses animales et végétales etc. (Patrick Fickers *et al.*, 2007).

4.4 Mode action

Pendant la réaction lipolytique, un intermédiaire tétraédrique est formé provenant d'un complexe acyl-enzyme par l'attaque nucléophile de l'oxygène de la chaîne latérale de la sérine sur la liaison ester du carbone carbonyle du lipide.

Ensuite, un azote de l'anneau imidazole de l'histidine se proton avec l'hydrogène du résidu de la sérine, en augmentant la nucléophilie de l'oxygène de la sérine.

En conséquence, l'anneau imidazole de l'histidine se charge positivement. Cette charge positive est stabilisée par la charge négative du résidu acide de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique. L'état de transition du substrat est stabilisé par deux ponts d'hydrogène formés avec des liaisons amides des résidus qui appartiennent au trou de l'oxygénation.

Finalement, le groupe alcool de la sérine libère le carbone carbonyle de l'intermédiaire, et par l'attaque nucléophile d'un ion hydroxyle au carbone carbonyle, l'acide gras est libéré et l'enzyme régénéré, en consommant une molécule d'eau, et la lipase libre est régénérée par une réaction hydrolytique (Cordova Lopez et Jesus Antonin, 1998)

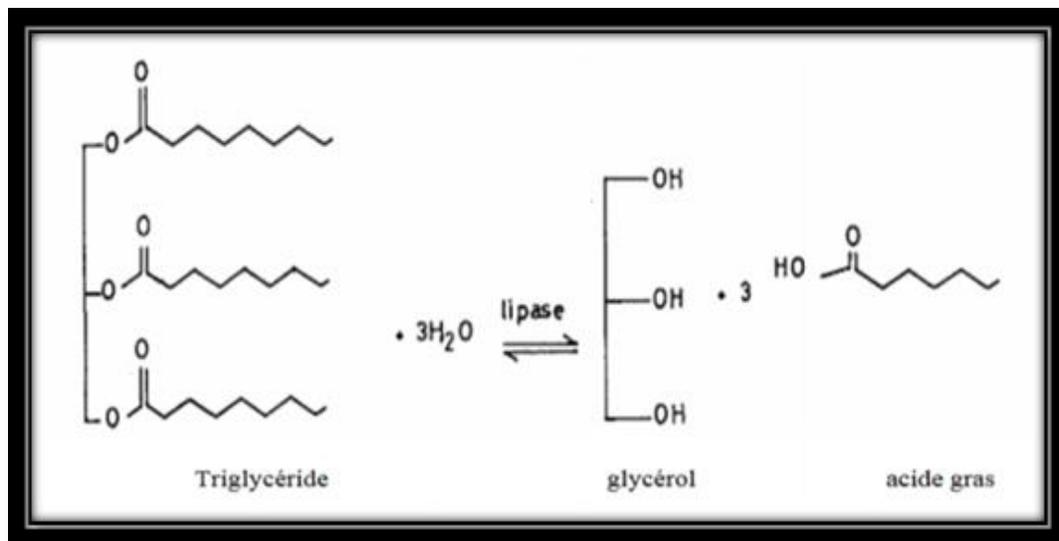


Figure 3 : Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride (Rihani, 2012)

4.5 Les microorganismes producteurs

De nombreux micro-organismes sécrètent de la lipase dans le milieu de culture (Hou et Johnson, 1992) ont étudié 1229 espèces de bactéries, levures, actinomycètes et champignons sur des plaques de gélose contenant de l'huile de soja et de la todamine B et ont découvert qu'environ 25 % de ces micro-organismes présentaient une activité lipolytique. La présence de lipases dans de nombreux micro-organismes leur permet d'utiliser des sources de carbone non conventionnelles, telles que des triglycérides ou d'autres lipides contenant des liaisons ester (P. Reis *et al.*, 2008) quelque exemple de microorganisme qui produite le lipase sont reportées sur le tableau 4

Tableau 4 : quelque microorganisme producteur de lipase (Rihani, 2012)

La source de lipase	Espèce
Bactéries (gram positive)	- <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus coagulans</i>
Bactéries (gram négative)	- <i>Pseudomonas monteilli</i> - <i>Pseudomonas cepacia</i>

Actinomycètes	- <i>Streptomyces coelicolor</i> - <i>Streptomyces fradiae</i>
Champignon	- <i>penicillium cyclopium</i> - <i>penicillium roqueforti</i> - <i>Aspergillus niger</i> - <i>Mucor mucido</i>
Levure	- <i>candida tropicalis</i> - <i>Rhizopus oligosporus</i>

4.6 Milieu et condition de production

La production de lipase à 47°C par fermentation solide en utilisant la souche *Rhizopus delemar* sur le milieu de culture à base de la bagasse de canne à sucre, le grignon d'olive et le tourteau de coprah de coco comme support (Jesus et Cordova, 1998).

Des grignons d'olive mélangés avec de la bagasse de canne à sucre ont été utilisés pour la croissance de champignons filamenteux thermophiles pour la production de lipases thermostables (80°C). La technique de Fermentation en Milieu Solide s'avère plus adaptée pour la croissance des champignons thermophiles que la culture liquide, la production de lipases est plus élevée (10 à 20 fois) et ces enzymes sont extracellulaires. La présence dans les grignons d'olive d'acide oléique, utilisé comme inducteur, augmente la production de lipases en FMS 8 fois. L'addition à la bagasse de canne à sucre, de grignons d'olive augmente la production de lipases 25 fois (Cordova *et al.*, 1998).

4.7 Utilisation industrielle

4.7.1 Industrie alimentaire : Les lipases sont utilisés dans l'affinage de charcuterie comme les saucisses, l'affinage de fromages, en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et en industrie des produits laitiers (Herrington, 1954).

Ils possèdent également application dans le domaine de la développement des arômes par des lipases exogènes (lipases pré-gastriques ou microbiennes) telles que la synthèse des arômes par la lipase de *Candida antarctica* et de *Rhizomucor miehei* (Synthèse d'arômes par réaction

d'estérification comme dans le cas du 3,7-diméthyl-4,7-octadiène-1-ol qui a une odeur de rose) (Fickers *et al.*, 2008).

4.7.2 Industrie oleochimique : Les applications des lipases dans l'industrie oleochimique pourraient être énormes car 60 millions de tonnes/an des graisses et des huiles sont produites dans le monde entier. par exemple : La lipase de *Mucor miehei* produit les huiles végétales comme: l'huile de maïs, l'huile de tournesol, l'huile d'arachide, l'huile d'olive et l'huile de soja contenant les acides gras polyinsaturés (Hasan *et al.*, 2006). Une substantielle partie de cette production (2 millions de tons/an) est utilisée dans des procédés chimiques qui consomment beaucoup d'énergie, comme l'hydrolyse, la glycérolyse, alcoololyse (VULFSON, 1994). Ces procédés chimiques d'hydrolyse des graisses et de glycérolyse des huiles requièrent de conditions sévères de température 240 C°-260 C° et de pression 6 bars.

4.7.3 Détergent : La vente des enzymes comme constituants des détergents représentent le plus grand marché des enzymes industrielles (Falch, 1991). Jusqu'à présent, les lipases ne jouaient pas un rôle significatif dans la composition des détergents, dû principalement au manque d'enzymes suffisamment actives et stables dans des conditions alcalines. La plus grande application des lipases dans l'industrie des détergents est arrivée quand l'entreprise NOVO/Nordisk, a lancé le produit **Lipolase**. Ce produit contient la lipase extracellulaire de *Humicola lanuginosa* produite dans une échelle industrielle par *Aspergillus niger*. Cette lipase est utilisée par au moins deux entreprises de détergent Procter &Gamble et Unilever. Le deuxième produit commercialement disponible est le **Lumafast** contenant la lipase bactérienne de *Piradomonas putida* (JAEGER et coll., 1994).

4.7.4 Application pharmaceutique : L'application des lipases comme outils de diagnostic connaît une croissance rapide car leurs niveaux accrus montrent l'indication de plusieurs maladies et agissent également comme cibles médicamenteuses importantes ou comme enzymes marqueurs dans le domaine médical. *Candida rugosa* produit une lipase qui est immobilisée sur des supports nylon en présence de solvants organiques, la lipase immobilisée est utilisée dans la synthèse de la lovastatine, un médicament largement utilisé dans le traitement de la réduction du cholestérol sérique (Kumar *et al.*, 2023)

5. Les tannases

5.1 Définition

La tannase est une enzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons présentes dans les molécules de tannins et d'esters de l'acide gallique. La tannase est un des biocatalyseurs les plus polyvalents et joue un rôle important dans un large éventail de bioconversions, réactions dans des conditions de précipitation des protéines (Mónica Chávez-González *et al.*, 2011).

Les tannases sont généralement produite sur le carbone tannique tel que acide tannique, le son de blé, extrait de cosse, de thé, et de café (Jian Yao *et al.*, 2014).

L'enzyme obtenue chez les procaryotes jusqu'aux eucaryotes, qui sont des bactéries, des champignons, des plantes, certaines types d'insectes et du bétail (Kannan Natarajan *et al.*, 2008).

5.2 Nomenclature

La tannase s'appelle tannin acyl hydrolase ou autrement connue sous le code EC3.1.1.20 (Swaroop *et al.*, 2019). Le nom complet de tannase est acylhydrolase tannique, découvert en 1867 par Van Tieghem, par ce que c'est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons ester présentes dans différents substrats: les gallotanins, les tanins complexes et les esters d'acide gallique et glucose (D. Banerjee *et al.*, 2012).

5.3 Substrat

On utilise les tannins comme substrat, sont des constituants polyphénoliques de différents poids (Kannan Natarajan *et al.*, 2008). Ils sont naturellement solubles dans l'eau et se trouvent dans les plantes comme des métabolites secondaires. De nombreux groupes hydroxyle phénoliques présent dans les tanins permet de former des complexes avec des protéines et d'autres macromolécules tel que la pectine et la cellulose. Tannins ont également des effets toxiques sur certaines organismes (Aida M. farag *et al.*, 2018), sont les quatrièmes composées végétaux les plus abondant après la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ils jouent un rôle très important dans l'immunité des plantes, et protège les parties faibles des plantes contre l'attaque microbiennes en: inactivant les virus et les enzymes microbiennes invasives extracellulaires (K. Pradeep *et al.*, 2006).

5.4 Mode d'action

Les tannases hydrolysent l'acide tannique. Chez les plantes, elles détruisent la paroi cellulaire végétale, en brisant les liaisons croisées entre les polymères, et donnent l'acide gallique, le glucose, le 2, 3, 4, 6-tétragalloylglucose et deux type de mono galloyle. (Kannan Natarajan *et al.*, 2008)

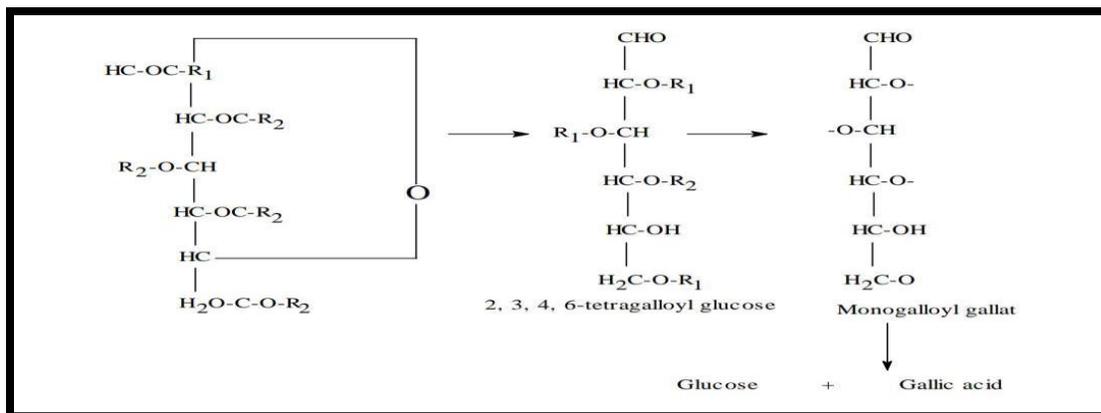


Figure 4 : Voie d'hydrolyse de l'acide tannique par la tannase R1-acide gallique, R2-acide di gallique. (Kannan Natarajan *et al.*, 2008)

5.5 Microorganismes producteur

D'après (Jian Yao *et al.*, 2014), les tannases sont produites par différents microorganismes : mycètes, bactéries et levures et les plante (tableau 5)

Tableau 5 : les exemples des microorganisme producteur de tannase (Kannan Natarajan *et al.*, 2008)

Type de microorganisme	Microorganisme
Mycètes	<i>Aspergillus alliaceus</i> (<i>A.alliaceus</i>) <i>A.fumigatus</i> <i>A.niger</i> <i>A.flavus</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Trichoderma sp.</i>

	<i>Rhizopus oryzae</i>
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Levure	<i>Candida sp.</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>
Plantes	<i>Quercus rubra</i> <i>Quercus robur</i> <i>Terminaliachebula</i> <i>Rhustyphina</i>

5.6 Milieu et condition de production

La production de tannase par fermentation à l'état solide sur les déchets des fruits et de pomme de terre en utilisant une souche *Aspergillus* (Nurul Adlin Azaman *et al.*, 2023).

La culture d'*Aspergillus awamori* permet une production plus élevée de tannase extracellulaire dans le milieu contenant l'acide tannique. *Aspergillus niger* donne un rendement enzymatique maximal lorsque la FMS est réalisée à 30% - 53,5% d'humidité initiale de substrat 33-109 spores/5g d'inoculum et 5% acide tannique comme source de carbone après 96 h de fermentation (Meghamehta *et al.*, 2013).

5.7 Utilisation industrielle

Les tannases sont extrêmement utile dans divers domaines, elle joue un rôle important

- Dans l'industrie pharmaceutique : la production d'acide gallique à partir des produits végétaux riche en tanins, qu'il utilise pour la synthèse de gallate de propylée, qui est utiliser comme antioxydant dans les graisses et les huiles (Kannan Natarajan *et al.*, 2008), et pour la fabrication d'un antibiotique appelée trimethoprim qui est un dérivé d'acide gallique comme le tannase d'*Aspergillus niger* (Halah Aissam,2003).
- Industrie alimentaire: la fabrication de thé froid, l'application des tannases d'*Aspergillus niger* (Halah Aissam, 2003) à la fabrication de thé élimine les sédiments insolubles formés dans les

boissons froides. C'est un agent clarifiant dans l'industrie de la bière et du vin pour éliminer la formation de brume (Kannan Natarajan *et al.*, 2008)

- La fabrication d'encre et de colorants d'écriture ordinaires (K. Natarajan *et al.*, 2008)

Production d'aliments des animaux tel que le tannase d'*Aspergillus* sp (D. Banerjee *et al.*, 2012)

Tableau 6 : D'autres applications des tannases (P. Aguilar-Zarate *et al.*, 2013)

Applications	Références
-Identification des <i>Staphylococcus</i> chez l'homme.	(Noguchi <i>et al.</i> , 2007)
-Indicateur du cancer du côlon.	(Noguchi <i>et al.</i> , 2007)
-Fabrication des détergents à lessive et des produits cosmétiques.	(Dykstra <i>et al.</i> , 2011)
-Industrie de cuir.	(Dykstra <i>et al.</i> , 2011)
-Traitement des produits agro-industriels.	(Tejirin et Xu, 2011)

Partie 2 : Matériel et méthodes

Matériel et méthode

La partie expérimentale est réalisée au sein du laboratoire biologie et environnement au bio pôle, Université Constantine 1. Son objectif est le dosage de deux enzymes : les lipases et les tannases dans des extraits obtenus de la croissance de la souche isolée *Penicillium sp* sur milieu de fermentation solide (déchet d'olive) avec différentes sources de carbone, métaux, quantités d'inoculum, éthanol, sources d'azote, taux d'humidité, durée de temps et concentration de tween 80.

1. Optimisation de la production enzymatique

1.1 Effet de la taille de l'inoculum : On va chercher avec ces différents nombres de disques (6, 8, 10, 12, et 14 disques) comme inoculum leurs effets sur l'activité enzymatique.

1.2 Effet de la source de carbone : On ajoute dans chaque essai un sucre, parmi eux fructose, glucose, galactose, amidon, extrait de malt, puis on mesure l'activité de chaque enzyme.

1.3 Effet des ions : pour voir leurs effet sur les deux enzymes, on additionné le Cu, Mg, Mn, Fe, K et Zn au milieu, et on a dosé l'activité.

1.4 Effet d'alcool : Les milieux de culture sont enrichis par l'éthanol pour contrôler son effet sur les activités enzymatiques.

1.5 Effet de tween : on a cherché avec des différentes concentrations de tween 80 : 1, 1.5, 2,2.5 et 3%son effet sur l'activité des enzymes.

1.6 Effet de l'humidité : Pour voir l'effet d'humidité sur les deux enzymes, on a essayé différents pourcentage: 30, 40, 50, 60 et 70%.

1.7 Effet de la source d'azote : on a ajouté différents source d'azote (peptone, extrait de levure, urée, NaNO_3 et NH_4SO_4) pour étudier leur effet sur l'activité des tannases et lipases.

1.8 Effet de temps d'incubation: Pour suivre la cinétique de l'activité enzymatique on va suivre sur plusieurs jours (2, 4, 6, 9, 10, 12, 14, 16 et 18 jrs).

2. Production enzymatique optimale

2.1 Préparation de milieu de culture

Après avoir déterminé les optima des paramètres pour la production enzymatique, on a réalisé les cultures dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chaque un 10 g de grignons additionné des éléments donnant la production optimale des tannases et des lipases séparément. Chaque erlenmeyers doit être bien mélangé à l'aide d'une tige puis sont bouché avec du coton cardé recouverts de papier aluminium et stérilisé a l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

2.2 Préparation de la souche

L'inoculum a été préparé par repiquage de la souche *Penicillium sp* sur milieu de culture Malt Extract Agar (MEA) et incubation pendant 7 jours.



A : Milieu de culture de FMS



B : La souche *penicillium sp*

Photographie 1 : production enzymatique optimale

2.3. Condition de la fermentation

Après la stérilisation et le refroidissement des erlenmeyers, on a les inoculé avec 10 disques de *Penicillium sp* pour les lipases et 14 disque pour les tannases puis à l'aide d'une tige stérile on a mélangé le contenu. Les erlenmeyers sont incubé à 25 C° dans une étuve pendant 6 jrs pour les lipases et 12 jrs pour les tannases.

2.4 Extraction des enzymes

Après une fermentation, une quantité connue de 5 g de substrat fermenté est mélangée avec 50 ml de l'eau distillé. Le mélange est broyé pendant 1 minute à l'aide d'un ultraturrax. Le mélange est par la suite filtré sur papier Whatman n°1, pour éliminer les particules du substrat ; le filtrat obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour le dosages enzymatiques adéquats.



A : Broyage



B : Filtration

Photographie 2 : Extraction des enzymes

3. Dosage de lipases

L'activité lipolytique a été dosée par la méthode de titration. Le mélange réactionnel contient 625 μ l d'huile d'olive avec 875 μ l tampon de phosphate 0.1M (annexe 1) et 500 μ l de l'extrait enzymatique. Ce mélange est incubé dans un bain marie à 40°C pendant 20min, ensuite on a additionnée 2,5 ml l'éthanol pour stopper la réaction enzymatique. Enfin, on ajoute 1 goutte de phénol phtaléine (annexe 2) dans le mélange et on fait la titration de ce mélange avec une solution de KOH (0,05N) (annexe 3). La couleur rose indique que la titration est terminée puis le volume utilisé de la solution KOH est pris.

4. Dosage des tannases

Le mélange réactionnelle se compose de 500 μ l d'extrait enzymatique additionnée de 1500 μ l d'acide tannique (annexe 4), ce mélange est incubé en bain marie à 40°C pendant 20 min .En ajoute 2ml de BSA (annexe 5), pour stopper la réaction enzymatique. On laisse s'incuber à la température ambiante 20min après on fait la filtration. Finalement on mesure l'absorbance on spectrophotomètre avec une longueur d'onde 260 nm en utilisant une cuve de quartz. On compare les résultats avec une courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 6).



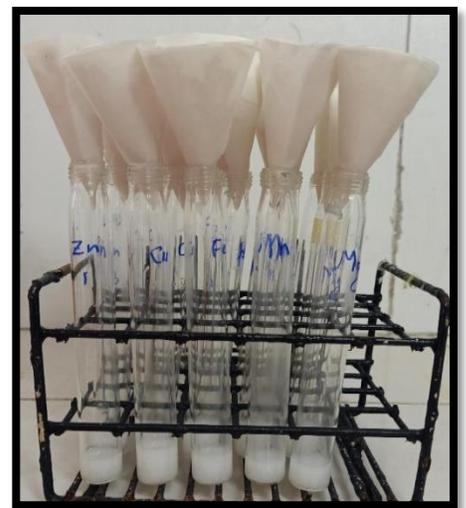
C : La titration
après filtration

(Lipase)



D : Les extraits après l'ajoute de BSA

(Tannase)



E : Les extraits

(Tannase)

Photographie 3 : Le dosage de l'activité enzymatique (lipasique et tannasique)

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Production des lipases

1.1 Optimisation de la production des lipases

1.1.1 Effet de la taille d'inoculum

L'effet des différents disques d'inoculum sur l'activité des lipases est montré dans la figure 5. L'inoculation avec 10 disques de *Penicillium sp* à un effet optimal sur l'activité lipolytique. Yang cai et Guangha yang, (2023) ont fait l'étude sur la souche de *Penicillium sp* sur la farine de soja par fermentation solide et ont obtenu un taux de 15% d'inoculum pour une activité optimale lipolytique. Tandis que F Boratynski *et al.*, (2018) ont trouvé que une quantité d'inoculum de 1.2×10^6 spores de *Penicillium camembertii* donnant une activité maximale sur tourteaux de colza en fermentation solide.

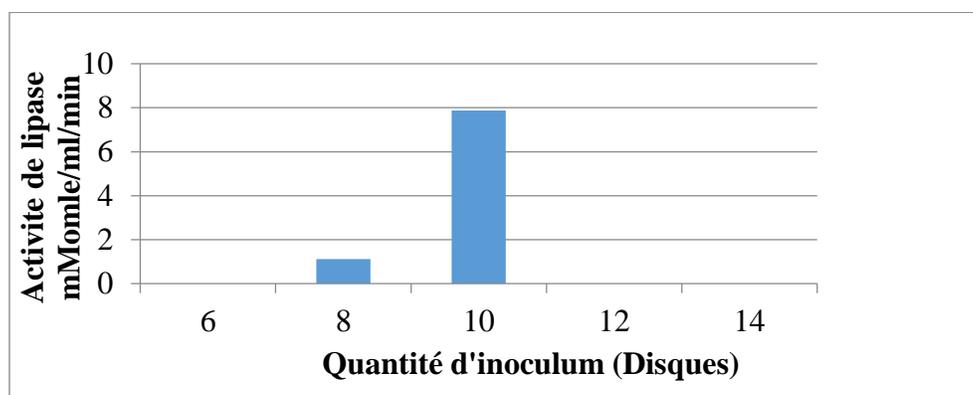


Figure 5: Effet de quantité d'inoculum sur la production des lipases par *Penicillium sp*.

1.1.2 Effet des sources de carbone

Selon les résultats représentés dans la figure 6, on a remarqué que le glucose, fructose et l'amidon ont un effet inhibiteur sur la production tandis que l'extrait de malt augmente l'activité des lipases à une valeur maximale 27 mMol/ml/min. H.S.El-Shall *et al.*, (2022) ont rapporté que le maltose est la source de carbone donnant une activité enzymatique optimale produite par *Penicillium citrinum* sur le maïs en fermentation submergée. Par contre Yang cai et Guangha yang, (2023) ont montré que le glucose donne bonne activité lipolytique sur la farine de soja par une souche de *Penicillium*. Une autre souche *Penicillium aurantiogrisuma* produit une lipase inhibée par complètement par le glucose et l'huile d'olive tandis qu'elle

donne de meilleure activité avec l'huile de palme en fermentation submergée sur un milieu synthétique (Valeria M.G.Lima *et al.*,2003)

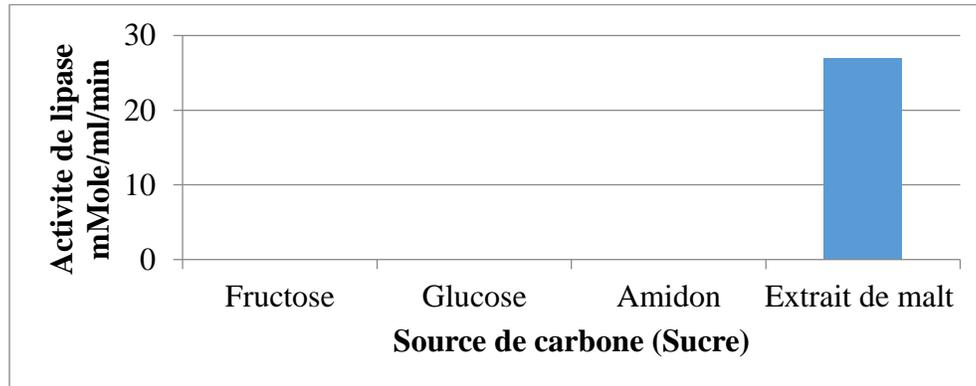


Figure 6: Effet de source de carbone sur la production des lipases par *Penicillium sp.*

1.1.3 Effet des sels minéraux

On remarque dans la figure 7 que l'ion $MnSO_4$ donne la meilleure activité par contre $MgSO_4$, $FeSO_4$, KSO_4 ont inhibé l'activité des lipases. Les lipases de la souche *Penicillium citrinum*, produites sur le maïs, ont donné une activité maximale en présence du $NaCl$, H.S.El-Shall *et al.*, (2022) tandis que les lipases de *Penicillium sp* donne sa production optimale en présence de Fe^{+3} sur la farine de soja par la fermentation solide (Yang cai et Guangha yang,2023). De plus, Preetha Sasi *et al.*, (2007) ont montré que le Ca^{++} a donné la meilleure production des lipases de *Rhizopus orrhizus* sur un milieu synthétique à base de l'huile d'olive.

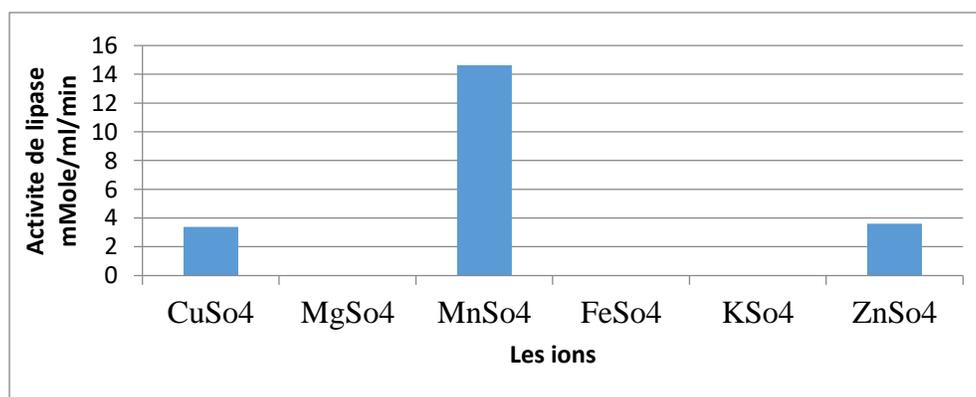


Figure 7: Effet des sels minéraux sur la production des lipases par *Penicillium sp.*

1.1.4 Effet des concentrations en Tween 80 et l'éthanol

La figure 8 montre que le tween 80 à 1% est l'efficace pour l'activité lipolytique mais les autres concentrations inhibent l'activité. Ces résultats concordent avec ceux de R.Abdullah *et al.*, (2018) qui ont trouvé que 0.1 % de tween 80 donne une production optimale de lipases par la souche *Penicillium sp* sur le tourteau de graines de canola par FMS. De plus, les lipases de *Pseudomonas sp* aussi ont donné une valeur optimale d'activité en présence de tween 80 à 0.9 % sur les tourteaux de graines de jatropha sur fermentation submergée (Heri Hermansyah *et al.*, 2018).

La figure 8 représente l'effet positif de l'éthanol sur la production des lipases par *Penicillium sp*. Ces résultats se rapprochent de ceux de (Gilberto victorcoradi *et al.*, 2012) sur les lipases produites par la souche est *Pseudomonas aeruginosa* en fermentation solide sur un des huiles végétales (maïs, soja et olive)

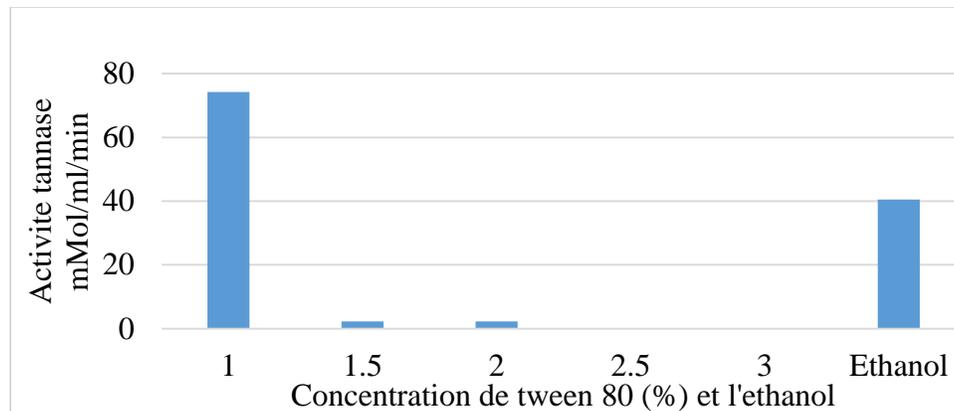


Figure 8: Effet de tween et d'alcool sur la production des lipases par *Penicillium sp*.

1.1.5 Effet de l'humidité

La figure 9 affiche que les taux d'humidité de 30, 40 et 50% ont inhibé totalement la production lipolytique alors que 70% a présenté une production optimale à une valeur de 6.3 mMol/ml/min. Ces résultats ne correspondent pas avec Yang cai et Guangha Yang, (2023) qui ont trouvé que 50% d'humidité donne une production optimale de lipase sur la farine de soja par *Penicillium sp*. Alors que Omar A.S. Moftah *et al.*, (2013) ont montré que 55% est le taux nécessaire pour une production optimale par *Yarrowia lipolytica* sur les grignons d'olive par fermentation solide.

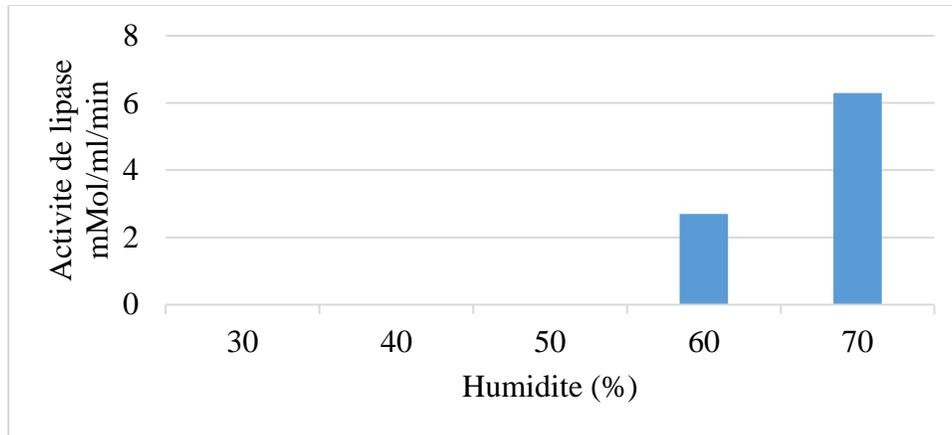


Figure 9 : Effet d'humidité sur la production des lipases par *Penicillium sp.*

1.1.6 Effet des sources d'azote

D'après les résultats observés dans la figure 10, on trouve que le NH_4SO_4 donne la meilleure valeur de production lipolytique. Ces résultats correspondent à ceux de (H.S.El-Shall *et al.*,2022) et (Valeria M.G .Lima *et al.*,2003) qui ont montré que le Sulfate d'ammonium est la bonne source d'azote pour la production des lipases par *Penicillium citrinum* sur le maïs comme substrat de fermentation solide et *Penicillium aurantiogrisum* sur un milieu synthétique à base de l'huile d'olive en fermentation submergée respectivement. La figure 10 montre aussi que le NaNO_3 et le peptone ont inhibé complètement l'activité lipolytique ceux qui ne correspondent pas avec Filip Boratynski *et al.*, (2018) et (Yang cai et Guangha Yang,2023) qui ont remarqué que l'optimale est obtenu par la peptone avec les souches *Penicillium camembertii* et *Penicillium sp* sur les substrats respectifs tourteaux de colza et la farine de soja.

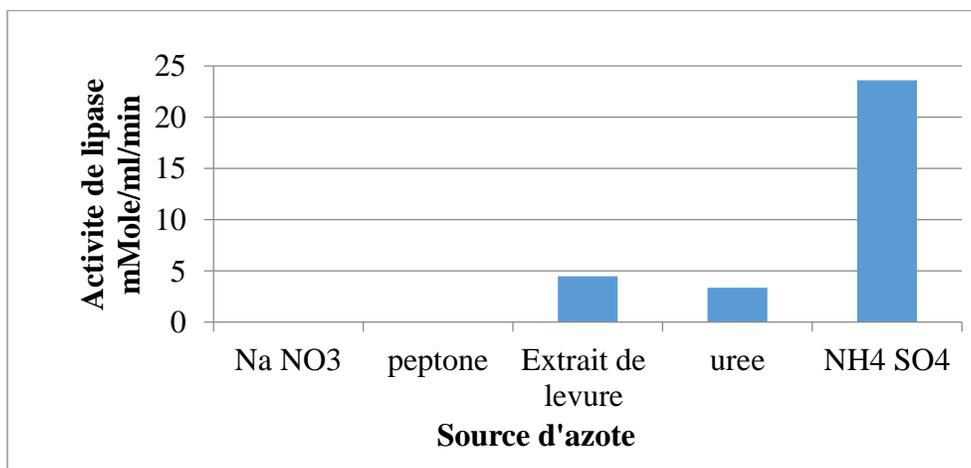


Figure 10 : Effet de source d'azote sur la production des lipases par *Penicillium sp.*

1.1.7 Effet du temps d'incubation

La figure 11 montre que la meilleure activité lipolytique atteint la valeur maximale de 0,8 m Mol/ml/min au sixième jour d'incubation de la souche *Penicillium sp* sur les grignons d'olives en fermentation solide. D'après H.S.El-Shall *et al.*, (2022) le 3^{ème} jour donne l'optimale de l'activité des lipases produites par *Penicillium citrinum* sur le maïs par fermentation submergée. Aussi, Yang cai et Guangha Yang, (2023) ont trouvé que la durée d'incubation qui donne la meilleur activité sur les lipases en 3 jours avec la souche est *Penicillium sp* sur la farine de soja comme substrat de fermentation solide.

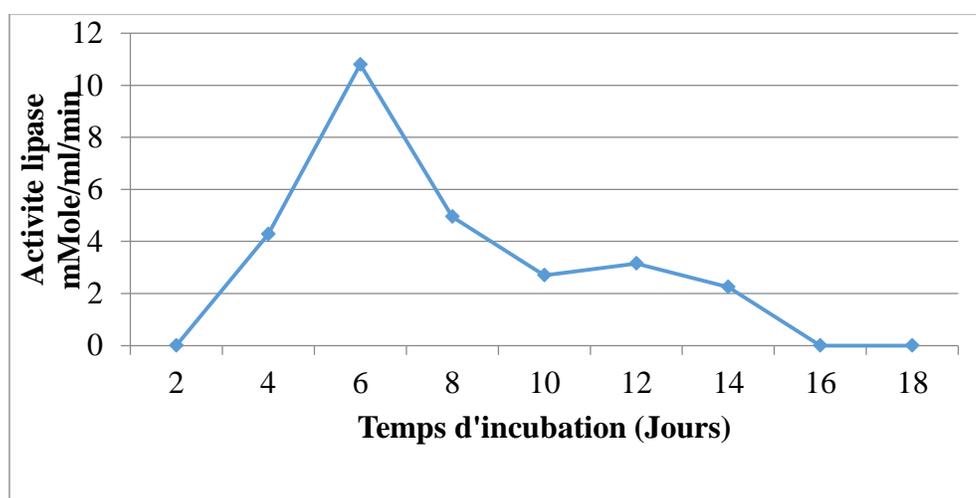


Figure 11 : Effet du temps de l'incubation sur la production des lipases par *Penicillium sp*.

1.2. Production optimale des lipases

Les résultats de l'expérience de confirmation ont montré une absence de production des lipases dans les conditions optimisés. Ceci est dû probablement aux interactions, entre les différents facteurs, qui ont influencée négativement la production lipasique par *Penicillium sp* sur les grignons d'olives. Ces résultats sont loin de ceux présenté par (Yang cai *et al.*, 2023) qui ont obtenu une production lipasique plus grande de 6,76 fois (115 U/g) dans le milieu optimisé par rapport au milieu non optimisées (17 U/g).

2. Production des tannases

2.1 Optimisation de la production des tannases

2.1.1 Effet de la taille d'inoculum

La figure 12 indique l'effet de la quantité d'inoculum de *Penicillium sp* sur la production des tannases. On observe que 14 disques est la quantité qui donne une activité enzymatique optimale. (Fang wang *et al.*, 2012), (M.Narsi Reddy *et al.*, 2015) et (Vikas Beniwal *et al.*, 2012) ont montré que la quantité $2 \cdot 10^8$ et 10^{10} et 1% respectivement ont permis d'obtenir une meilleure activité tannasique avec des souches d'*Aspergillus*.

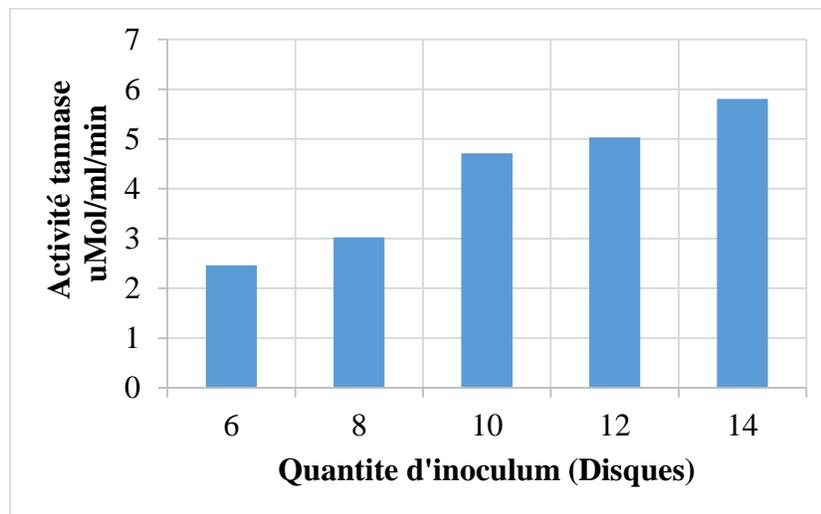


Figure 12: Effet de quantité d'inoculum sur la production des tannases par *Penicillium sp*.

2.1.2 Effet de la source de carbone

La figure 13 présente les sucres additionnés comme sources de carbones aux grignons d'olives. Ces sucres ont inhibé la production sauf dans le cas de l'extrait de malt qui a activé la production des tannases. Selon (fang wang *et al.*, 2012) toutes les sources de carbone ont diminué la production de l'enzyme sauf le lactose, maltose et l'amidon ainsi la production maximale avec *A.niger* sur les tiges de thé a été gagnée lorsque le milieu est complété par lactose. M.Narsi Reddy *et al.*, (2015) montrent que le saccharose est la meilleure source de carbone avec *Aspergillus terreus* en fermentation submergée sur milieu synthétique.

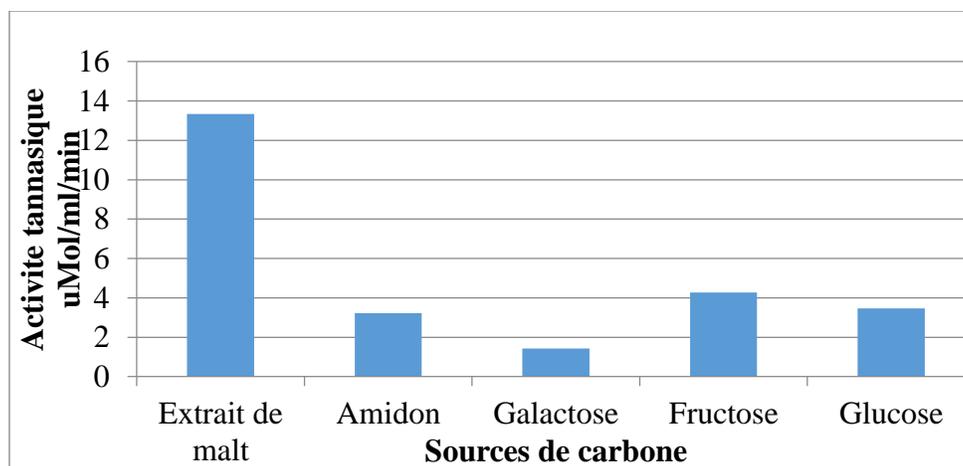


Figure 13 : Effet de la source de carbone sur la production des tannases par *Penicillium sp.*

2.1.3 Effet des sels minéraux

Nos résultats montrent que le $ZnSO_4$ est l'ion qui a présenté un effet stimulant en augmentant l'activité tannasique à une valeur de 180,515 m Mol/ml/min (figure14). D'après Vikas Beniwal *et al.*, (2012), le $ZnSO_4$ est le meilleur ion pour l'activité tannasique produites par *Aspergillus heteromorphus* sur la sciure de bois alors qu'il a inhibé la production des tannases de *Paecilomyces variotii* produites par fermentation solide sur les tourteaux de colza ; l'activité optimale dans ce cas est obtenue en ajoutant $S_2O_3^{2-}$ (Vania Battestin *et al.*, 2007).

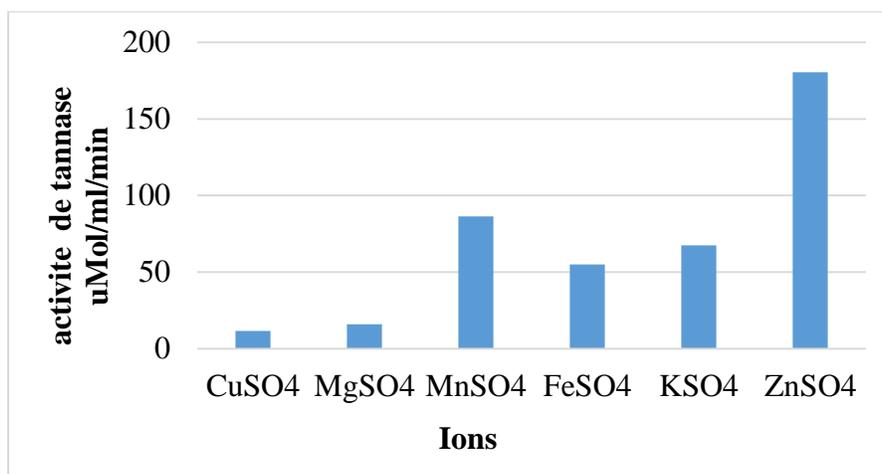


Figure 14 : Effet des sels minéraux sur la production des tannases par *Penicillium sp.*

2.1.4 Effet de la concentration en tween80 et l'éthanol

La figure 15 montre que la concentration de 2.5% en Tween 80 a stimulé la production enzymatique des tannases. Nos résultats ne correspondent pas à ceux de Gargi Mukherjee *et al.*, (2005) qui ont trouvé que le tween40, tween60 et tween80 sont des inhibiteurs des tannases de la souche *Aspergillus foetidus* produites sur le fruit de terminalia chebula (myrobalan) comme substrat en fermentation solide. Aussi, Vania Battestin *et al.*, (2007) montrent que le tween 80 et Tween20 avec différents concentrations (0.25% 0.5% 1%) ont inhibé la production tannasique de la souche *A.niger* produite sur son de blé et coque de café.

La figure 15 affiche une faible production enzymatique des tannases en présence d'éthanol ce qui correspond aux résultats obtenus par Vinod Chhokar *et al.*, (2009) qui ont montré que l'éthanol est parmi les alcools qui inhibent la production tannasique.

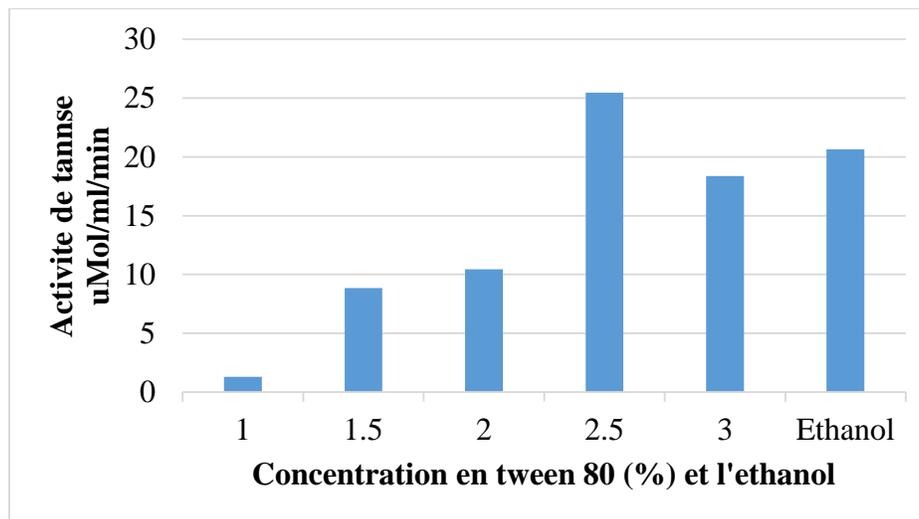


Figure 15 : Effet de tween et d'alcool sur la production des tannases par *Penicillium sp.*

2.1.5 Effet de l'humidité

La figure 16 montre que l'humidité optimale est 60%, par contre on trouve que le meilleur taux pour une bonne activité tannasique est 70% avec *Aspergillus heteromorphus* sur la sciure de bois (Vikas Beniwal *et al.*, 2012). Des taux d'humidités de 1.8:1(v/w) et 1:2(W/V) ont été obtenus respectivement par fang wang *et al.*, (2012) qui a travaillé avec la souche *A.niger* sur les Tige de thé et (Rakesh kumar *et al.*, 2006) qui a produit les tannases par *A.niger* sur les feuilles de Jamuna et feuilles de ber et alma.

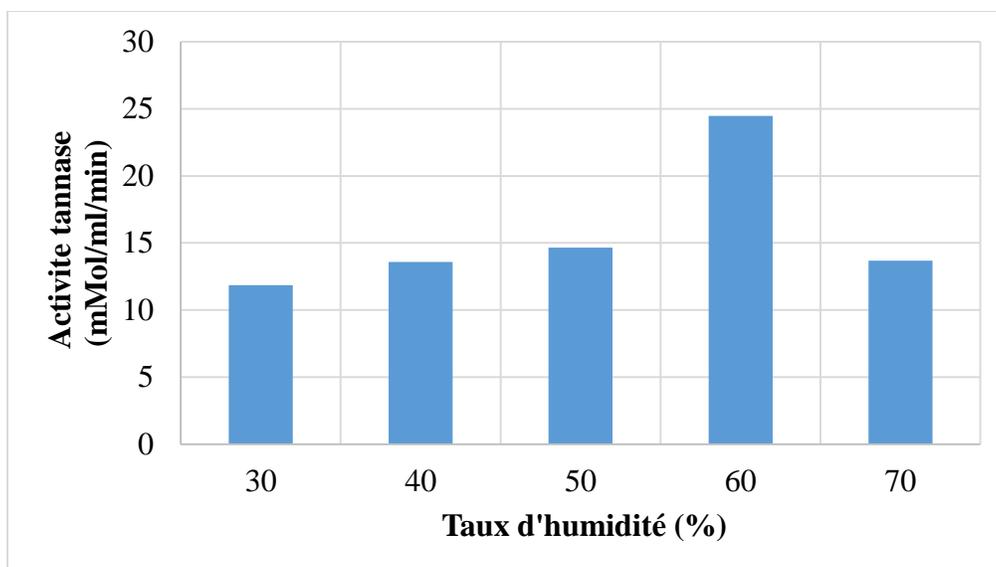


Figure 16: Effet de l'humidité sur la production des tannases par *Penicillium sp.*

2.1.6 Effet des sources d'azote

La figure 17 montre que le nitrate de sodium comme source azote ajoutée aux grignons d'olives a activé la production tannasique de *Penicillium sp.* Ces chiffres concordent avec Vikas Beniwal *et al.*, (2012) qui ont montré la même chose avec la souche *Aspergillus heteromorphus* sur la sciure de bois. Tandis que fang Wang *et al.*, (2012), ont montré que l'addition du nitrate de sodium, peptone, sulfate d'ammonium et l'urée a inhibé l'activité d'enzyme par contre le chlorure d'ammonium a permis une augmentation optimale de l'activité tannasique d'*A.niger* sur les Tiges de thé.

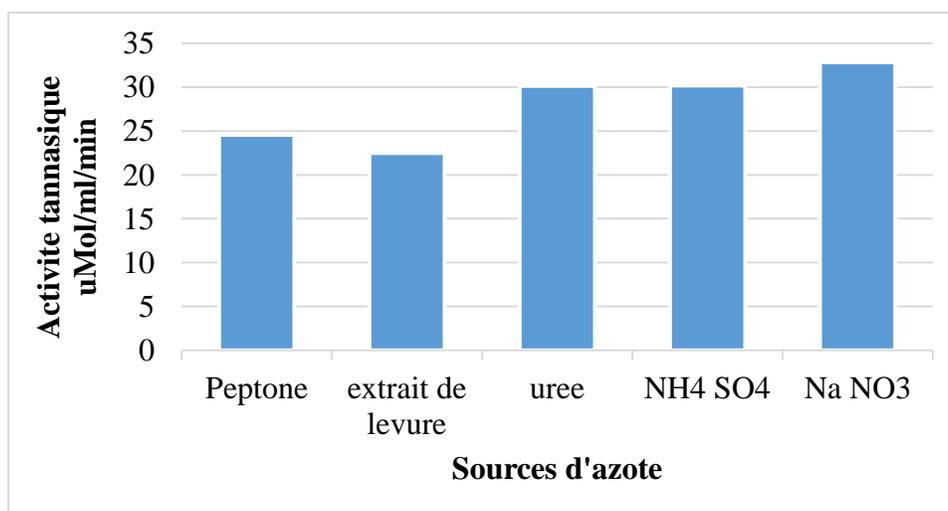


Figure 17: Effet de source d'azote sur la production des tannases par *Penicillium sp.*

2.1.7 Effet du temps d'incubation

La figure 18 montre que l'activité enzymatique des tannases est optimale dans le 12^{ème} jour de l'incubation avec la souche *Penicillium sp* en FMS sur les grignons d'olive. Cette durée est plus longue que la durée obtenue par Vikas Beniwal *et al.*, (2012) qui ont produit les tannases dans un temps d'incubation de 4 jours avec la souche *Aspergillus heteromorphus* en SSF sur la sciure de bois et fang Wang *et al.*, (2012) qui ont trouvé aussi 4 jours avec la souche *A.niger* sur les tiges de thé comme substrat de fermentation solide.

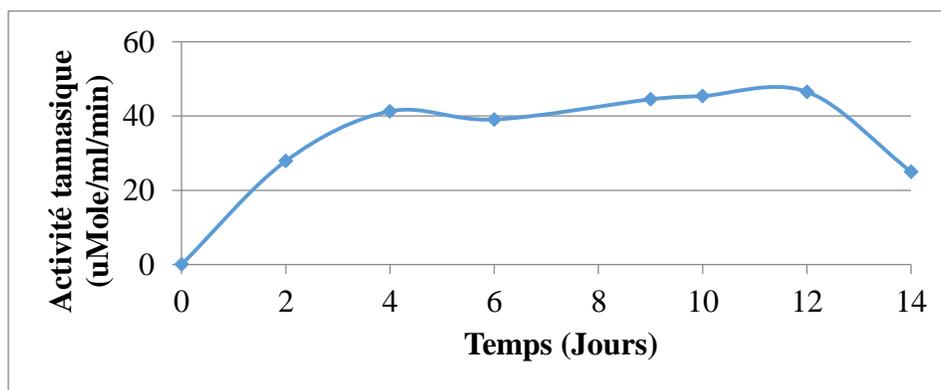


Figure 18: Effet du temps de l'incubation de *Penicillium sp* sur la production des tannases.

2.2 Production optimale des tannases

Les résultats de l'expérience de confirmation ont montré que les conditions optimisées ont permis d'augmenter la production des tannases par *Penicillium sp* de 1.5 fois (168.557 umole/ml/min) par rapport au témoin (112.431 umole/ml/min). Ces chiffres concordent avec (Changzheng Wu *et al.*, 2018) qui ont obtenu une augmentation de la production des tannases de 3,12 fois sur le milieu optimisé de *A.tubingensis* (5 U/ml) par rapport au témoin (1.6 U/gml).

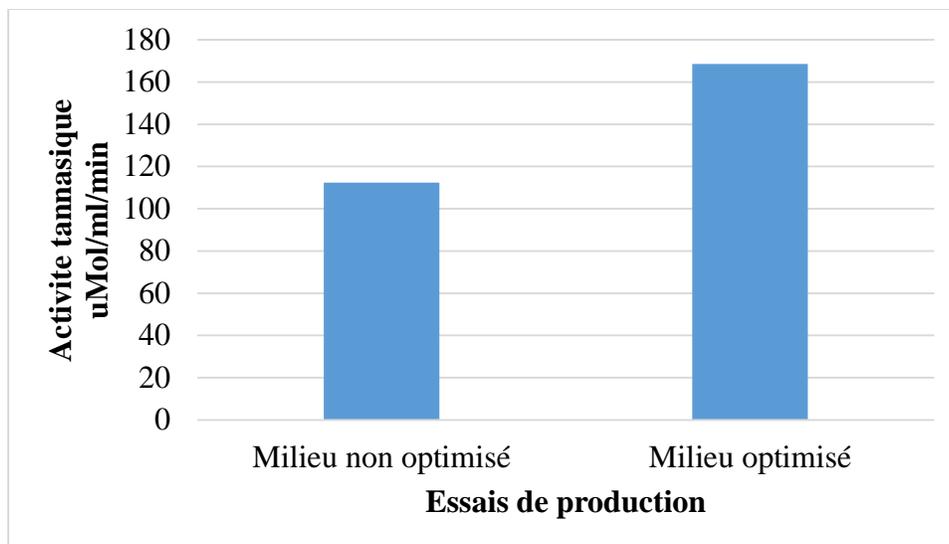


Figure 19 : Expérience de confirmation de la production optimale des tannases par *Penicillium sp.*

Conclusion générale

CONCLUSION

L'objectif de cette étude est l'optimisation de la production des lipases et des tannases par la moisissure *Penicillium sp* cultivée par fermentation solide sur les grignons d'olive. On a optimisé la production des deux enzymes après l'étude de 7 facteurs qui sont : quantité d'inoculum, source de carbone, sels minéraux, des concentrations en Tween 80 et l'éthanol, l'humidité, source d'azote et temps d'incubation.

Les résultats d'optimisation des lipases sont : 6jrs de temps d'incubation, 10 disques d'inoculum, extrait de malt comme source de carbone, le NH_4SO_4 pour la source d'azote, le MnSO_4 comme sel minéral en présence de l'éthanol, de 1% de Tween 80 et de 70% d'humidité. Le teste de confirmation de la production optimale des lipases, qui consiste au regroupement de toutes les conditions optimales précédentes, n'a montré aucune production lipasique.

De leur côté, les tannases ont donné des optima dans 12 jours d'incubation, 14 disques comme inoculum, l'extrait de malt, le NaNO_3 , le ZnSO_4 et le tween 80 (2,5%) et 60% d'humidité. Les résultats de l'expérience de confirmation ont montré que les conditions optimisés ont permis d'augmenter la production des tannases par *Penicillium sp* de 3 fois par rapport aux conditions non optimisées.

Ce mémoire présente la mise au point d'un procédé en SSF pour la production des enzymes d'intérêt industriel. Ces résultats mettent en relief, aussi, l'intérêt de recycler les déchets industriel tels que les grignons d'olive pour la production des lipases et des tannases par la moisissure *Penicillium sp*.

Enfin, ces résultats sollicitent d'autres études et ouvrent des nouvelles perspectives comme suite :

- la purification l'extrait enzymatique tannasique obtenu.
- la recherche d'autres sous-produits pour trouver le plus adéquat à la production des lipases.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- Banerjee D. and Mahapatra S.** (2012). Fungal Tannase : A Journey from strain Isolation to Enzyme Applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6(2), p : 49-60.
- Beldjazia A., Kamah A.** (2022). Effet de la température et du pH sur la production des substances antimicrobiennes par *Penicillium chrysogenum*. Mémoire master recherche : Microbiologie Appliquée. Mohamed Elsadik ben yahia jijel, 29p.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Guy P.H., Larpent J.P., Veau, P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2ème Édition : MASSON, (Paris). P : 442.
- Chabasse D., Bouchara JP., and Gentile L.** (2002). Cahier de formation biologie médicale : les moisissures d'intérêt industriel .Bioforma[en ligne],2(1),(consultée le 7 avril 2022) <http://www.fspublishers.org>
- Chávez-González M ., Rodríguez-Durán L.V., Balagurusamy N., Arely P., Rodríguez R., Juan C.C. and Aguilar N.C.** (2011). Biotechnological Advances and Challenges of Tannase : An Overview. *Food Bioprocess Technol*, 2012(5), p445–459.
- Chermette R., and Bussieras J.** (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort
- Davet P. and Rouxel F.** (1997). Détection et isolement des champignons du sol, techniques et pratiques. Edition : INRA, PP 27, 32, 33
- Dhevagi P., Ramya A., Priyatharshini S., Thanuja K.J., Ambreetha S., and Nivetha A.** (2021). Industrially important Fungal Enzymes : productions and applications. Dans *Mycological Research, Fungal Biology*. India : A. N. Yadav , 263-309 p.
- El Hajj Assaf C., Zetina-Serrano C., Tahtah N., El Khoury A., Atoui A., P. Oswald I., Puel O., Lorber S** (2020). Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus. *International Journal of Molecular sciences* [En ligne] , 24(21) (page consultée le 12/12/2020). <https://hal.inrae.fr/hal-03064407>.

- Fickers P., Destain J and Thonart Ph.** (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principale caractéristique et application. *biotechnol. agron. Soc. Environ* 12(2) 119-130.
- Fickers P., Destain J., and THonart P.** (2007). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et Application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 12(2) : 119-130.
- Gahfif** (2021). Isolement et identification des champignons producteurs d'enzymes. Thèse doctorat recherche : Biochimie. Mohamed El Bachir El Ibrahimy Bordj Bou Arréridj, 99 p.
- Gauthier A.** (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse doctorat recherche : Sciences pharmaceutiques. Bordeaux, 120 p.
- Geoffry K and Rajeshwara N.A.** (2018). Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, S1878-8181(17)30567-4: 1-44
- Gopinath Subash C., 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 <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Jarrar H.** (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. Thèse doctorat recherche : Sciences Chimiques. École nationale supérieure de chimie de montpellier ,163 p
- Jian Yaoa., Geng Shan Guo ., Guang Hui Ren., Yu Huan Liu** (2014). Production, characterization and applications of tannase. *Journal of molecular catalysis B : enzymatic* , 101 (2014) ,p137–147.
- Joanna T.** (2015). Patuline mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogene post recolte des pommes : nouvelles donnees sur sa biosynthese et deveoppement d'approche préventive. Thèse doctorat recherche : pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Toulouse, 232p.
- Kachour L.** (2005). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité. Thèse doctorat recherche : biochimie. Badji Mokhtar Annaba, 259 p.

Kim W . K., Sang H. K., Woo S. K., Park M. S., Paul, N. C., and Yu, S. H. 2007. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycrobiologie*, p: 180- 185 .

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

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

Mehta M., Dr. Muddapur U. M. and Shanmuga Priya V. G. (2013).Fungal Production of Tannase :A Review. *International Journal of Scientific Engineering and Technology*, 2(8), p : 752-755

Mukesh M. Andleeb Z. Manish K. (2018). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering : *Penicillium* Enzymes for the Food industries [en ligne] ,167–186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00009-0>

Najjar A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase. de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d’huile d’olive. Thèse de doctorat : Microbiologie et biotechnologies : Université de la méditerranée (Aix Marseille II) 132P.

Natarajan K., Rajendran A and Thangavelu V. (2008). Tannase enzyme : The most promising biocatalyst for food processing industries. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 5(1), p :221-228.

Nguyen Minh Tri M. (2007). Identification des espèces des moisissures potentiellement productrice de mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq province de la région centrale de Vietnam -études des conditions pouvant reduire la production des mycotoxines. Thèse doctorat recherche : Génie des procédés et de l’environnement. Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés,135p

Nicklin J., Graeme- Cook K., Paget T and Killington R. (2000). L’essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris, 209- 213, 215- 217, 231- 235 p. NGYEN, M-T. 2007. Identification des

espèces de moisissure potentiellement productrices de mycotoxines dans riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines .thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, p 23-28,32-35.

Nobel .E-M. 2004. Nobel Prize. Eduard Buchner.

Oliveira M. J., Fernandes ., Benevides. R. G., Assis .S.A. (2020). Production, characterization, and immobilization of protease from the yeast *Rhodotorula oryzoicola*. *Biotechnology and Applied Biochemistry International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 0, Number 0, Pages 1–11.

P.Aguilar-Zarate., M.A. Cruz-Hernandez., J.C. Montanez., R.E. Belmares-Cerda and C. N. Aguilar (2014). Bacterial tannase : production, properties and applications tanasas bacterianas : production, propiedades y aplicaciones . *Revista Mexicana de Ingenier'ia Qu'ımica* ,13(1), p : 63-74.

Parchas M.D. (2008). Comment faire face aux risques biologiques ? France : 01. Sd.p 6. 30p. – (Direction des Archives de France).

Pitt J. (2002). Biology and ecology of of toxigenic *Penicillium* species : Mycotoxins and Food Safet. Australia : Trucksess et al.30 p. – (Kluwer Academ)

Pradeep K., Mohapatra D., keshab C.,Mondal and Bikas R., Pati (2006). Production of Tannase through Submerged Fermentation of Tannin-containing Plant Extracts by *Bacillus licheniformis* KBR6. *Polish Journal of Microbiology* , 55(4), p : 297-301.

Report C. (2003). Mycotoxine: risks in plant, animal and human systems.In :J.L.Richard and Payne, G, A. (Eds.), Council for Agricultural Science and technology Task Force Report No. 139, Ames,Iowa,USA.ISBN1-887383-22-0.

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

Ropars J., Caron T., Lo Y.C., Bennetot B and Giraud T. (2020).La domestication des champignons *penicillium* du fromage Volume 343, issue 2 (2020), p. 155-176 [En ligne] 9 October 2020 <https://doi.org/10.5802/crbiol.15>

Simon P. and Meunier R. (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris VIe. p : 31-47, 385-411.

Singh S and Khajuria R. (2018). New and Future Developments in Microbial biotechnology and Bioengineering : Penicillium Enzymes for the Textile Industry.p: 201–215.

Singh S.(2016). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and bioengineering: Aspergillus Enzymes for Textile Industry.191-198. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00014-2

Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T. and Samson R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* 78: 343-371 [En ligne], (page consulté le 22 September 2014)

Visagie C.M., Samson R.A., Hirooka Y., Hobraken., Mwange K., Tanney J.B., Meijer M., Amend A.S., Seifert K.A. (2014). Speices diversity in *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*.

Annexes

Annexes

1. Phénol phtaléine (2%)

- 2 g phénol phtaléine
- 50 ml éthanol
- 50 ml eau distille

2. préparation de solution KOH (0.05 N)

- 0.14 g KOH
- 500 ml eau distille

3. préparation de la solution d'acide tannique (0.33 %)

- 0.33 g d'acide tannique
- 100 ml tampon de phosphate (0.1 M)

4. préparation de la solution Bovine Albumine (BSA) (2 %)

- 2 g BSA
- 100 ml eau distille

5. Préparation de la solution de tween 80

- 3 ml tween
- 100 ml eau distille

6. La courbe étalonnage de l'acide gallique

6.1 Préparation de la solution acide gallique 0.25 mg/ml

- 0.03 g acide gallique
- 120 ml eau distille

La solution d'acide gallique μ l	0	400	800	1200	1600	2000
Eau distille	2000	1600	1200	800	400	0
2 ml eau distille						

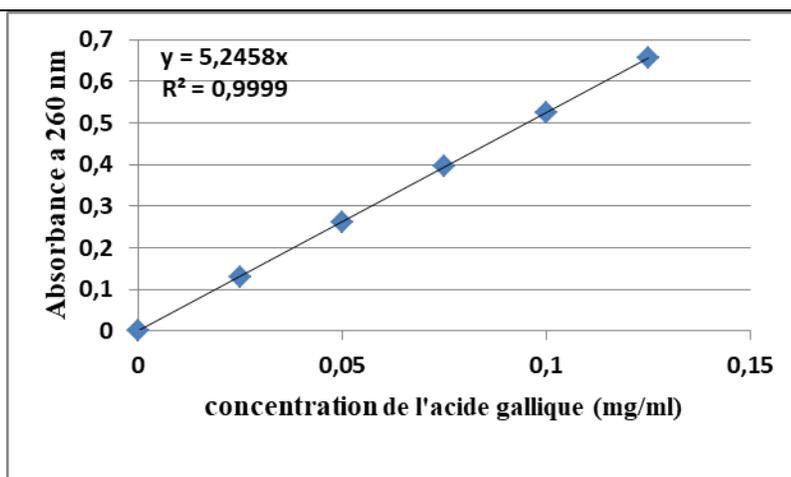


Figure 1 : La courbe de l'acide gallique

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : BELKEBIR Amira
MEHAREK Aya

Production de quelques enzymes hydrolytiques fongiques par fermentation solide

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé

L'objectif de notre travail est l'optimisation de la production, par *Penicillium sp*, des lipases et des tannases par fermentation solide sur les grignons d'olives. La première partie de ce travail de recherche vise la détermination des valeurs optimale des différent facteurs sélectionnés un par un pour la production de lipases et de tannases en FMS à savoir : la quantité de l'inoculum, la source de carbone, des sels minéraux, la concentration en tween 80, l'humidité, source d'azotes et le temps d'incubation. L'analyse des résultats a permis de déterminée les valeurs de ces facteurs ; Pour les lipases, la production optimale est obtenue avec 10 disque de l'inoculum, extrait de malt, l'ion $MnSO_4$, 1% tween 80, l'humidité 70%, $NHO SO_4$ comme source d'azote et 6 jrs pour l'incubation. Pour confirmer les effets de ces facteurs sur la production lipasique, on a réalisé une expérience où on a procédé à une culture sous les conditions optimales regroupées. Les résultats est négative et on a obtenu aucune activité. Tandis que pour les tannases, la production optimale est obtenue en présence de 14 disques de l'inoculum, extrait de malt, l'ion $Zn SO_4$, 2.5% tween 80, l'éthanol, l'humidité 60%, $NA NO_3$ comme source d'azote et 12 jrs pour l'incubation. L'expérience de confirmation menée sous les conditions optimales a permis d'augmenter la production tannasique de 3 fois par rapport aux conditions non optimisées.

Mots-clefs : Optimisation, Production, Lipases, Tannases, *Penicillium sp*, Fermentation solide

(FMS), Grignons d'olive.

Laboratoires de recherche : laboratoire de biologie et environnement au bio pôle, (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : BENHAMDI Asma (MCA - UFM Constantine 1).

Encadrant : BOUCHERIT Zeyneb (MAA - UFM Constantine 1).

Examineur: LEGHLIMI Hind (MCA - UFM Constantine 1).