



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 الاخوة منتوري**  
**كلية علوم الطبيعة والحياة**

**Département :** Biologie Appliquée

**قسم :** البيولوجيا التطبيقية

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologies

**Spécialité :** Biotechnologie et Contrôle de qualité

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

Intitulé :

---

## **Prospection et screening de microorganismes lipolytiques isolées à partir de résidus oléicoles régionaux**

---

**Présenté par :** ZERARA Ouissam  
ZERMANI Djahida

Le : 29/06/2025

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Dr. CHENTLI Amira (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Dr. DJELID Hadjer (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examinateur :** Dr. MILET Asma (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire  
2024 – 2025**

## *Remerciement*

### *Remerciement*

*À l'issue de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Allah Tout-Puissant qui nous a accordé la patience, la force et la détermination nécessaires pour mener à bien cette recherche. C'est par Sa grâce et Son soutien que nous avons pu atteindre nos objectifs. À Lui reviennent toutes les louanges, maintenant et toujours.*

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères et notre reconnaissance à notre honorable superviseure, « Dr.Djelid Hadjer », pour les efforts considérables, le savoir et la patience dont elle a fait preuve tout au long de ce parcours de recherche. Ses précieuses observations, ses conseils avisés et son évaluation objective ont été des facteurs déterminants dans la réussite de ce travail. Nous saluons particulièrement les sacrifices qu'elle a consentis pour nous guider et corriger notre trajectoire, contribuant ainsi significativement à l'amélioration de la qualité de la recherche et au perfectionnement de nos compétences académiques.*

*Nous soulignons également sa constante disponibilité à nos côtés, son empressement à répondre à nos interrogations, ainsi que ses explications claires qui ont fait d'elle un excellent mentor.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à toutes les personnes qui nous ont soutenus dans la réalisation de ce travail, en particulier les ingénieurs du laboratoire de bio végétal pour leur aide précieuse.*

*Enfin, nous présentons nos vifs remerciements à nos respectés professeurs ainsi qu'à nos collègues de département pour leur coopération et leur bienveillance tout au long de cette période d'étude.*

*Qu'Allah les récompense tous pour leur aide et guide chacun vers le bien et un savoir utile.*

*Dédicace*

**Dédicace**

*Bismillah, Je dédie ce travail*

*À ma chère maman, « Zakia », qui m'a toujours donné de l'espoir en la vie et n'a jamais cessé de prier pour moi.*

*Elle a toujours été ma première source de soutien et d'encouragement, et elle mérite toute ma gratitude et mes éloges pour tous ses efforts.*

*À mon cher père « Djahid », je tiens à exprimer ma reconnaissance pour son soutien, ses encouragements et les sacrifices qu'il a faits pour assurer le bon déroulement de mes études.*

*À mes sœurs « Roumaïssa » et « Lilia », vous avez été à mes côtés jusqu'à la fin de mon parcours, et à la princesse de notre maison « Milina », je souhaite le succès et l'excellence dans ses études et dans la vie.*

*À mes amis d'enfance « chourouk » et « choubaila » à l'école, qui m'ont soutenue et m'ont apporté amour, réconfort et soutien, et m'ont encouragé dans les moments les plus difficiles, je n'oublierai jamais votre gentillesse.*

*Je vous souhaite le meilleur. Que Dieu vous protège et vous aide.*

*Je vous aime tous et vous remercie pour tout.*

*Ouissam*

## Dédicace

*Bismillah, Je dédie ce travail*

*À ceux qui ont semé en moi les graines de l'espoir, et les ont arrosées de patience et de prières, à ceux dont mon bonheur était le but et mon avancement, un rêve...*

*À ma mère bien-aimée à mon paradis sur terre « Hadda », et à mon père, mon pilier « Badr Eddine », je dédie ce mémoire en reconnaissance et en gratitude.*

*Merci du fond du cœur, chère tante « Hanifa » celle qui m'a soutenue par ses mots et a apaisé mes angoisses par sa tendresse, ta présence dans ma vie, est un trésor inestimable.*

*Ce succès t'est dédié comme gage d'amour et de fidélité.*

*À mes chers frères et sœurs : « Lina », « Abdelkayoum » et « Tawha », et mes cousines « Amira » « Zina » « soumai » « souhaïla » et « Wissal » qui ont toujours été mon soutien après Dieu, les sourires qui allégeaient mes journées lourdes, et ceux qui ont partagé les moindres détails, et m'ont encouragée à avancer malgré tout...*

*Je vous offre ce mémoire avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*Et enfin...*

*À moi-même, qui ai tenu bon, veillé tard, et persévéré malgré toutes les épreuves, ce mémoire est une marque d'amour et de fierté pour ce que j'ai accompli.*

*Djahida*

## **Table des matières**

Résumé  
Abstract  
ملخص  
Liste des figures  
Liste des tableaux  
Liste des abréviations

**Introduction .....** ..... 1

### **Chapitre I : Revue bibliographique**

1. Généralités sur les lipides .....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Classification et structure des lipides .....	4
1.3. Lipides contaminants l'environnement .....	4
2. Généralités sur les lipases .....	7
2.1. Définition .....	7
2.2. Les enzymes lipolytiques .....	7
2.3. Différence entre lipase et estérase .....	8
2.4. Spécificité des lipases .....	8
2.5. Origines de lipase .....	9
2.5.1. Lipases végétales .....	9
2.5.2. Lipases animales .....	10
2.5.3. Lipases microbiennes .....	11
3. Microorganismes producteurs de lipases .....	12
3.1. Bactéries lipolytiques .....	12
3.2. Propriétés structurales des lipases microbiennes .....	13
3.3. Mécanisme d'action des lipases microbiennes .....	13
3.4. Caractéristiques des bactéries lipolytiques .....	14
4. Applications biotechnologiques des lipases .....	14
4.1. Production de détergents .....	15

*Tables des matières*

4.2. Production de biodiesel .....	16
4.3. Production d'aliment .....	17

**Chapitre II : Matériel et Méthodes**

1. Isolement, purification et criblage des microorganismes lipolytiques à partir des coproduits oléicoles .....	18
1.1. Biotopes .....	18
1.2. Prélèvement et présentation des échantillons .....	19
1.3. Préparation des dilutions .....	19
1.4. Isolement de microorganismes lipolytiques .....	20
1.5. Purification des isolats .....	20
1.6. Test de confirmation et sélection des souches les plus performantes .....	20
2. Production de lipases sur milieu liquide .....	21
2.1. Préparation de pré-culture .....	21
2.2. Inoculation des fioles .....	21
2.3. Dosage de biomasse .....	21
2.4. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford .....	22
2.4.1. Principe de la méthode .....	22
2.4.2. Préparation du réactif de Bradford .....	23
2.4.3. Courbe d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA) .....	23
2.4.4. Dosage des protéines synthétisées par les isolats sélectionnés .....	24
2.5. Dosage l'activité lipolytique par spectrophotometrie .....	24
2.5.1. Principe de 4-Nitrophanyl palmitate (pNPP) .....	25
2.5.2. Courbe d'étalonnage du 2-Chloro-4-nitrophenol (2C4NP) .....	25
2.5.3. Préparation du tampon phosphate .....	25
2.5.4. Préparation de la solution 4-Nitrophanyl palmitate .....	26
2.5.5. Dosage de lipase .....	26
3. Identification des isolats sélectionnés S1 et S2 .....	27

## *Tables des matières*

3.1. Examen macroscopique .....	27
3.2. Examen microscopique .....	27
3.3. Coloration de gram .....	28
3.4. Test de catalase.....	28
3.5. Test de mobilité.....	29
3.6. Caractérisation biochimique de l'isolat S1 par la galerie API 50CH .....	29
3.6.1. Inoculation de la galerie .....	30
3.6.2. Préparation de milieu d'inoculation de la galerie .....	30
3.6.3. Préparation de la galerie .....	30
3.6.4. Lecture de la galerie .....	30
3.7. Conservation de la souche sélectionne .....	30
4. Production de lipase par fermentation submergée .....	31
4.1. Substrat de fermentation .....	31
4.2. Préparation de l'inoculum .....	31
4.3. Inoculation des fioles .....	31
4.4. Etude de différents paramètres et suivi de fermentation (biomasse, protéines et lipase).....	31
5. Purification partielle de lipase .....	31
5.1. Précipitation de protéines .....	32
5.2. Dialyse .....	33
5.3. Dosage enzymatique .....	34
6. Test d'application .....	

## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

1. Résultat de l'isolement de microorganismes lipolytiques .....	40
1.1. Activité lipolytique des isolats et sélection de l'isolat le plus performant .....	42
1.2. Caractérisation macro et microscopique des isolats S1et S2 .....	35
2. Suivi de production de lipase par les isolats S1 et S2 sur différents substrats lipidiques ..	44
2.1. Production de biomasse par S1 et S2 .....	44

*Tables des matières*

2.2. Production de protéines totales par S1 et S2 .....	46
2.3. Production d'enzymes lipolytique par l'isolat S1 et S2 .....	49
3. Identification de l'isolat S1 par la galerie API50 CH .....	50
4. Production de lipase par <i>Bacillus cereus</i> 2 sur huile de friture .....	51
4.1. Production de biomasse .....	51
4.2. Production de protéines totales .....	52
4.3. Production de lipase par <i>Bacillus cereus</i> 2 .....	53
5. Purification partielle de lipase .....	54
6. Résultat de test d'application .....	54
<b>Conclusion .....</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>58</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>59</b>

## Résumé

### Résumé

Compte tenu du coût élevé de la production d'enzymes tels que la lipase à partir de substrats commerciaux, plusieurs études visent à optimiser leur production par des microorganismes capables de les sécréter en grande quantité, en utilisant des déchets naturels alternatifs comme substrat. Ces enzymes de type triacylglycérolacyl-hydrolases ont le potentiel de dégrader les triglycérides en Glycérol et acides gras, ce qui leur confère un grand potentiel biotechnologique dans plusieurs domaines. L'isolement des microorganismes lipolytiques a été initialement réalisé sur deux milieux gélosés où l'huile d'olive et le Tween 80 ont été utilisés comme seules sources de carbone. 14 isolats ont été révélés après 48 h d'incubation. Le potentiel lipolytique de ces isolats a été évalué sur un milieu gélosé sélectif contenant l'huile d'olive comme seule source de carbone et le rouge de phénol comme indicateur. L'apparition d'un halo clair jaune autour de 7 colonies après 48 heures d'incubation à 30°C, a confirmé la présence d'une activité lipolytique. La culture liquide des isolats S1 et S2 sur ces mêmes substrats a montré une production maximale de biomasse pour l'isolat S1 avec une densité optique (DO) de 1.6 sur huile d'olive et de 1 pour l'isolat S2 sur Tween 80. Elle a aussi montré que la production maximale de protéines (0.5 mg/mL) a été obtenue par l'isolat S1 sur l'huile d'olive comme substrat. Le dosage de l'activité lipolytique par la méthode spectrophotométrique a aussi révélé que les activités lipolytiques maximales des deux isolats sont très proches avec des valeurs de 6.16 U/min/mL pour l'isolat S1 et 6.8 U/min/mL pour l'isolat S2 sur huile d'olive. L'identification de l'isolat S1 par examen macro et microscopiques et par des tests biochimiques tel que la catalase et la galerie API 50 CH a indiqué que l'isolat appartient au genre *Bacillus cereus*. L'hydrolyse des triglycérides par la lipase de la souche de *Bacillus cereus* a été étudiée dans une fermentation submergée en présence de l'huile de tournesol usagée comme substrat lipidique alternatif. Le suivi de la croissance bactérienne a montré une production maximale de biomasse après 72 heures d'incubation avec une DO de 1.2. La production maximale de protéines totales a été évaluée après 72 heures d'incubation, atteignant 0.4 mg/mL. L'extrait enzymatique a révélé une activité lipasique maximale de 7 U/min/mL. La purification partielle de la lipase produite a été réalisée par précipitation des protéines en utilisant le sulfate d'ammonium et la technique de *Salting out*. Après dialyse de l'échantillon, le dosage enzymatique a montré que la meilleure activité lipolytique a été obtenue à un pourcentage de saturation compris entre 70 et 90% à 5.48 U/min/mL. Le test d'application a démontré une disparition complète de la tache de la matière grasse par l'extrait enzymatique. Ces résultats confirment le grand potentiel de la souche de *Bacillus cereus* 2 à produire des lipases dégradant plusieurs lipides. Ils démontrent également le potentiel détergent de l'extrait enzymatique obtenu dans cette étude.

Mots clés : Lipase, Microorganisme lipolytiques, *Bacillus cereus*, Fermentation, Acide gras.

## *Abstract*

### **Abstract**

Given the high cost of producing enzymes such as lipase from commercial substrates, several studies aim to optimize their production by microorganisms capable of secreting them in large quantities, using alternative natural wastes as substrates. These triacylglycerolacyl hydrolase enzymes have the potential to degrade triglycerides into glycerol and fatty acids, giving them great biotechnological potential in a number of fields. Isolation of lipolytic microorganisms was initially performed on two agar media using olive oil and Tween 80 as the sole carbon sources. 14 isolates were revealed after 48 h incubation. The lipolytic potential of these isolates was assessed on a selective agar medium containing olive oil as the sole carbon source and phenol red as an indicator. The appearance of a clear yellow halo around 7 colonies after 48 h incubation at 30°C confirmed the presence of lipolytic activity. Liquid culture of isolates S1 and S2 on these same substrates showed maximum biomass production for isolate S1 with an optical density (OD) of 1.6 on olive oil and 1 for isolate S2 on Tween 80. It also showed that maximum protein production (0.5 mg/mL) was obtained by isolate S1 on olive oil as substrate. Spectrophotometric determination of lipolytic activity also revealed that the maximum lipolytic activities of the two isolates were very close, with values of 6.16 U/min/mL for isolate S1 and 6.8 U/min/mL for isolate S2 on olive oil. Identification of isolate S1 by macro and microscopic examination and biochemical tests such as catalase and API 50 CH gallery indicated that the isolate belongs to the *Bacillus cereus* genus. Triglyceride hydrolysis by lipase from the *Bacillus cereus* strain was studied in a submerged fermentation in the presence of used sunflower oil as an alternative lipid substrate. Bacterial growth monitoring showed maximum biomass production after 72 hours incubation at an OD of 1.2. Maximum total protein production was assessed after 72 hours incubation, reaching 0.4 mg/mL. The enzymatic extract revealed a maximum lipase activity of 7 U/min/mL. Partial purification of the lipase produced was achieved by protein precipitation using ammonium sulfate and the Salting out technique. After dialysis of the sample, enzymatic assay showed that the best lipolytic activity was obtained at a saturation percentage between 70 and 90% at 5.48 U/min/mL. The application test demonstrated complete disappearance of the fat stain by the enzymatic extract. These results confirm the great potential of the *Bacillus cereus* 2 strain to produce lipases that degrade several lipids. They also demonstrate the detergent potential of the enzyme extract obtained in this study.

Key words : Lipase, Lipolytic microorganism, *Bacillus cereus*, Fermentation, Fatty acid.

## ملخص

ونظراً لارتفاع تكالفة إنتاج إنزيمات مثل اللياز من الركائز التجارية، تهدف العديد من الدراسات إلى تحسين إنتاجها بواسطة كائنات مجهرية قادرة على إفرازها بكميات كبيرة، باستخدام نفاثات طبيعية بديلة لركائز، وتنتمي إنزيمات ثلاثي الجلسرين الغليسيرولاسيلاز هذه بالقدرة على تكسير الدهون الثلاثية إلى جلسرين وأحماض دهنية، مما يمنحها إمكانات تكنولوجية حيوية كبيرة في عدد من المجالات. تم عزل الكائنات الحية الدقيقة المحللة للدهون في البداية على وسطين من أجار باستخدام زيت الزيتون وتوبين 80 كمصدرين وحيدين للكربون. تم الكشف عن 14 عزلة بعد 48 ساعة من الحضانة. تم تقييم قدرة هذه العزلات على تحلل الدهون على وسط أجار انتقائي يحتوي على زيت الزيتون كمصدر وحيد للكربون والفينول الأحمر كمؤشر. وقد أكد ظهور حالة صفراء واضحة حول 7 مستعمرات بعد 48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 30 درجة مئوية وجود نشاط تحلل الدهون. أظهرت المزرعة السائلة للعزلتين S1 و S2 على نفس الركائز أقصى إنتاج لكتلة الحيوية للعزلة S1 بكثافة بصيرية (OD) تبلغ 1.6 على زيت الزيتون و 1 للعزلة S2 على توبين 80. وأظهر أيضاً أنه تم الحصول على أقصى إنتاج للبروتين (0.5 مجم/مل) بواسطة المعزول S1 على زيت الزيتون كركيزة. كما كشف تحديد النشاط المحلل للدهون بطريقة القياس الطيفي الضوئي أن الحد الأقصى لأنشطة التحلل الدهني للعزلتين كان متقارباً جداً، حيث بلغت القيمة 6.16 وحدة/دقيقة/ملل للعزلة S1 و 6.8 وحدة/دقيقة/ملل للعزلة S2 على زيت الزيتون. أشار تحديد هوية المعزولة S1 عن طريق الفحص الكلي والمجهري والاختبارات الكيميائية الحيوية مثل الكاتلаз ومعرض CH API 50 إلى أن المعزولة تتبع إلى جنس العصيات المخية. تمت دراسة التحلل المائي للدهون الثلاثية بواسطة لياز سلالة العصية العصوية المخية في عملية تخمير مغمورة في وجود زيت عباد الشمس المستخدم كركيزة بديلة للدهون. أظهرت مراقبة النمو البكتيري أقصى إنتاج لكتلة الحيوية بعد 72 ساعة من الحضانة مع 1.2 (OD). تم تقييم الحد الأقصى لإنتاج البروتين الكلي بعد 72 ساعة من الحضانة، حيث وصل إلى 0.4 ملغم/ملل. وأظهر المستخلص الإنزيمي أقصى نشاط للياز بلغ 7 وحدة/دقيقة/مليتر. تم تحقيق تنقية جزئية للياز المنتج عن طريق الترسيب البروتيني باستخدام كبريتات الأمونيوم وتقنية التملح. بعد غسيل العينة، أظهر الفحص الإنزيمي أنه تم الحصول على أفضل نشاط محلل للدهون عند نسبة تنقية تتراوح بين 70 و 90% عند 5.48 وحدة/دقيقة/مليتر. أظهر اختبار التطبيق اختفاء كامل للبقعة الدهنية بواسطة المستخلص الإنزيمي. تؤكد هذه النتائج الإمكانيات الكبيرة لسلالة *Bacillus cereus* 2 لإنتاج الليازات التي تحلل العديد من الدهون. كما أنها توضح أيضاً القدرة التنظيفية لمستخلص الإنزيم الذي تم الحصول عليه في هذه الدراسة.

**الكلمات الرئيسية:** اللياز، الكائنات الحية الدقيقة المحللة للدهون، العصية العصوية المخمرة، التخمير، الأحماض الدهنية.

*Liste des figures*

**Liste des figures**

**Figure 1.** Pollution de la mer par des déchets liquides et du pétrole déversé.

**Figure 2.** Toutes les positions spécifiques au sein de la molécule de lipase.

**Figure 3.** L'hydrolyse du triglycéride le transforme en glycérol et en acide gras. b Représentation d'une molécule de lipase avec ses caractéristiques.

**Figure 4.** Analyse du marché de la lipase microbienne.

**Figure 5.** Structure tridimensionnelle de lipase B de *Candida antarctica*.

**Figure 6.** Schéma du repliement  $\alpha/\beta$ . Les flèches représentent les feuillets  $\beta$  et les rectangles les hélices  $\alpha$ . Le rectangle noir représente le volet amphiphile.

**Figure 7.** Application des lipases microbiennes dans différents secteurs industriels.

**Figure 8.** Localisation des régions de prélèvement et les échantillons.

**Figure 9.** Différents échantillons collectés.

**Figure 10.** Schéma de la réaction de la méthode de Bradford. Crédit à une complexe protéine colorant de Coomassie de couleur bleue absorbant à 595 nm.

**Figure 11.** Courbe d'étalonnage de BSA utilisé pour déterminer la concentration des protéines selon la méthode BRADFORD.

**Figure 12.** Courbe d'étalonnage de (2C4NP) utilisée pour déterminer la concentration de lipase.

**Figure 13.** Echantillons après une heure d'incubation.

**Figure 14.** La précipitation des protéines par la méthode de *Salting out*.

**Figure 15.** La dialyse des culots resuspendus a été réalisée contre un tampon Tris-HCl.

**Figure 16.** Le test d'application de quatre expériences.

**Figure 17.** Photographies de l'observation microscopique à l'état frais (objectif  $\times 100$ (a) et  $\times 40$  (b)) après coloration de Gram.

**Figure 18.** Test de catalase de l'isolat S1 et S2.

**Figure 19.** Test de mobilité après l'incubation.

**Figure 20.** La galerie API 50CH après l'incubation.

**Figure 21.** Les 14 microorganismes lipolytiques obtenus.

**Figure 22.** Activité lipolytique pour les souches (1) et (2), (7) sur gélose à base de rouge de phénol.

*Liste des figures*

**Figure 23.** La biomasse produite dans chaque milieu de fermentation à différentes temps d'incubation.

**Figure 24.** Fermentation submergée des isolats S1 et S2.

**Figure 25.** Concentration de protéines totaux produites dans chaque milieu de fermentation à différentes temps d'incubation (Souche 1 (huile d'olive), Souche 1 (tween 20), Souche 1 (tween80)).

**Figure 26.** Lipase extracellulaire produite dans chaque milieu de fermentation à différents temps d'incubation.

**Figure 27.** La biomasse produite dans un milieu de fermentation à différentes temps d'incubation.

**Figure 28.** Milieu de fermentation qui contient l'huile de friture comme un substrat.

**Figure 29.** Concentration de protéines totales produites dans un milieu de fermentation à différentes temps d'incubation (Souche 1 (huile de friture)).

**Figure 30.** Lipase extracellulaire produite dans un milieu de fermentation à base de l'huile de friture à différents temps d'incubation.

**Figure 31.** Résultats du test d'application.

*Liste des tableaux*

**Liste des tableaux**

**Tableau 1 :** Lecture des résultats positive de la galerie API 50 CH.

**Tableau 2 :** Aspect morphologique des colonies obtenues sur GN.

**Tableau 3 :** Résultats du test d'activité lipolytique (14 souches).

*Liste des abréviations*

**Liste des abréviations**

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Le sulfate d'ammonium**

**2C4NP : 2-Chloro-4-nitrophenol**

**AGL : Acide gras libre**

**BSA : Albumine sérique bovine**

**CAT : La catalase**

**DO : Densité optique**

**GN : Gélose nutritive**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Eau oxygénée**

**HO : Huile d'olive**

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : Phosphate dipotassique**

**kDa : Kilo-dalton**

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Phosphate monopotassique**

**mM : Millimolaire**

**NaCl : Chlorure de sodium**

**nm : Nanomètre**

**pH : Potentiel hydrogène**

**pNPP : 4-Nitrophanyl palmitate**

**PSP : Phénolsulfonephthaléine**

**rpm : Rotation par minute**

**T20 : Tween 20**

**T80 : Tween 80**

**TAG : Triglycéride**

**YPG : Yeastextract peptone glucos**

**µL : Microlitre**

# Introduction

## **Introduction**

Au cours des dernières années, la conversion de la matière lipidique (triglycérides) par les lipases bactériennes a suscité un grand intérêt dans les recherches à travers le monde. Les lipases sont des biocatalyseurs essentiels à l'industrie, notamment les lipases microbiennes. Ainsi, le criblage, la production et la purification d'enzymes lipases à partir de souches microbiennes sont des procédés en constante évolution pour répondre aux besoins croissants des industries (Bharathi et Rajalakshmi 2019). Ces recherches ont connu des avancées significatives, impactant l'ensemble des secteurs et domaines industriels, ce qui en fait une solution prometteuse pour l'avenir.

Chaque année, l'industrie alimentaire, les abattoirs, l'industrie de transformation des huiles alimentaires et l'industrie des produits laitiers produisent des quantités considérables de déchets riches en lipides. Dans les pays méditerranéens, l'importance des moulins à huile d'olive est un fait bien établi ; Dans l'ensemble des déchets riches en lipides provenant de ces sources, les lipides ne sont pas présents seuls, mais constituent généralement l'un des composants principaux et l'un des éléments les plus problématiques (Cirne et al; 2007). Malheureusement, ces quantités illimitées de déchets lipidiques produites chaque année ont un impact négatif sur la vie des êtres humains et des animaux, et causent de nombreuses maladies en raison de la pollution environnementale qu'elles engendrent. Cependant, les lipides ont une grande valeur lorsqu'ils sont exploités de manière appropriée. Ces résidus offrent un potentiel de valorisation à travers diverses applications finales, telles que la production de Savons ou d'énergie par digestion anaérobie, craquage thermique et plus récemment, la production de biodiesel, un carburant pouvant être utilisé comme substitut du diesel minéral pour les moteurs (Felizardo et al; 2006).

Dans le contexte actuel, la valorisation de la biomasse triglycéérique pour la production d'enzyme lipase suscite un intérêt croissant de la part des chercheurs et des industriels. Cette démarche vise à convertir les résidus lipidiques et les déchets gras en produits bio à haute valeur ajoutée, tout en générant des bénéfices économiques et environnementaux.

La conversion de la biomasse triglycéérique s'appuyait principalement sur des procédés chimiques, mais ceux-ci sont devenus peu rentables en raison du coût élevé des réactifs chimiques utilisés et des résidus chimiques générés par ces procédés. Ainsi, les méthodes enzymatiques se sont imposées comme une alternative compétitive aux méthodes chimiques, offrant une solution biologique à faible coût, à rendement élevé et opérant dans des conditions

## *Introduction*

moins sévères. Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases EC 3.1.1.3) sont une classe d'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et en acides gras libres sur une interface huile-eau (Treichel et al; 2010). Ces lipides représentent un atout majeur dans le secteur de la biotechnologie, offrant des applications diversifiées. Ils sont utilisés dans la production de biodiesel, de détergents, ainsi que dans l'industrie alimentaire, notamment les produits laitiers. Ils sont également utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Dans ce contexte, le présent projet a pour objectif de maximiser la production de l'enzyme lipase par la sélection d'une souche bactérienne spécifique et l'évaluation de sa capacité de production. En outre, il vise à stimuler sa synthèse à l'aide d'une biomasse non traitée, afin d'atteindre un rendement rentable à l'échelle industrielle.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres. Dans le cadre du premier chapitre, une analyse exhaustive de la littérature scientifique a été conduite, structurée en trois sections. La première partie offre un panorama complet de la biomasse lipidique, tandis que la deuxième se focalise sur l'enzyme lipase. La troisième partie aborde les applications biotechnologiques majeures de la lipase bactérienne.

Le deuxième chapitre détaille les méthodes expérimentales employées pour la sélection de la souche *Bacillus cereus* 2, en mettant en œuvre diverses techniques d'identification. Dans un second temps, il présente la production de l'enzyme lipase par fermentation en milieu submergé. Cette production est réalisée à partir de différentes biomasses. L'objectif est d'évaluer la capacité de production de l'enzyme.

Le troisième chapitre présente les résultats numériques et expérimentaux obtenus au cours de cette étude, suivi d'une conclusion qui résume les principales étapes ayant marqué ce travail.

# **Chapitre I :**

# **Revue bibliographique**

## **1. Généralités sur les lipides**

### **1.1. Définitions**

Dans le secteur de l'énergie, les lipides sont des composés chimiques essentiels qui remplissent de multiples fonctions vitales dans divers processus (Muro et al; 2014) ; Ils sont présents dans de nombreux produits et jouent un rôle crucial dans la structure des membranes cellulaires ; Ils jouent un rôle crucial dans le stockage de l'énergie et la régulation des voies de signalisation (Fahy et al; 2011).

Les lipides sont des composés chimiques qui se caractérisent par leur structure à base de carbone et d'hydrogène. En outre, ils peuvent également contenir des éléments tels que l'oxygène, l'azote, le soufre et le phosphore, ce qui leur confère des propriétés supplémentaires (2.3 2021) ; Il s'agit de composés organiques caractérisés par des propriétés chimiques spécifiques, présents dans une large gamme de molécules telles que les acides gras, les phospholipides, les stérols, les sphingolipides, les terpènes, etc. Il est important de noter que les lipides sont un groupe de molécules très hétérogènes, tant sur le plan structurel que fonctionnel (Fahy et al; 2011).

Ils peuvent être classés, selon leur squelette fonctionnel chimique, en polykétides, acylglycérols, sphingolipides, prénois ou Saccharolipides (Otieno et Mwongela 2008) ; Les lipides sont des esters formés par l'union d'un alcool avec un ou plusieurs acides gras. Il s'agit de molécules organiques insolubles dans l'eau, telles que le benzène, le chloroforme ou l'éther (Zennouhi s. d.). Ces molécules sont classées en deux catégories principales en fonction de leur solubilité : les hydrophobes, qui ne se dissolvent pas dans l'eau, et les hydrophiles, qui se dissolvent facilement dans des solvants organiques apolaires tels que le chloroforme, les éthers ou les alcools. Cependant, la définition de la solubilité peut s'avérer trompeuse, car de nombreux lipides présentent une solubilité presque équivalente dans l'eau et dans les solvants organiques (Li-Beisson et al; 2016).

En conséquence, les lipides sont globalement insolubles dans l'eau, ce qui est essentiel pour comprendre les phénomènes particuliers associés à leur digestion, leur absorption et leur transport au niveau cellulaire dans le cadre de leur métabolisme (Rogalska 1995).

## **1.2. Classification et structure des lipides**

Selon les études ; les lipides sont classés en deux catégories ; les lipides simples et les lipides complexes. Les lipides simples, aussi connus sous le nom de homolipides, sont constitués exclusivement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Lors de l'hydrolyse, ces lipides génèrent au plus deux types de produits, à l'image des acides gras, des stérols et des acylglycérols (les glycérides simples) (Christie 1984) et les lipides complexes (ou hétérolipides) qui donnent trois produits ou plus lors de l'hydrolyse sont composés, comme les sphingolipides (les glycérophospholipides et les glycosphingolipides) (Fahy *et al*; 2005).

## **1.3. Lipides contaminant l'environnement**

Bien que naturelles et indispensables à la vie, les matières grasses (graisses et huiles, utilisées ou non) deviennent des polluants environnementaux préoccupants lorsqu'elles sont rejetées en masse dans les écosystèmes. Leur pollution, souvent sous-estimée, à un impact important sur les milieux aquatiques et terrestres (Sharmin *et al*; 2015), Principalement issues de déchets industriels (transformation alimentaire et cosmétiques), les huiles végétales sont largement utilisées dans la production alimentaire à différents niveaux : Domestique, commerciale et industrielle... Seuls 2.5 % des huiles de cuisson usagées peuvent être recyclées. Le reste est déversé de manière inappropriée dans les égouts, ce qui peut polluer les ressources en eau et causer de nombreux problèmes dans le fonctionnement des stations d'épuration, entraînant une perte d'efficacité et une augmentation des coûts d'exploitation (Filho *et al*; 2017); Ou ils sont rejetés directement dans l'environnement. Dans les rivières, les lacs et les océans, les lipides forment une couche imperméable à la surface, empêchant l'échange de gaz entre l'atmosphère et l'eau. Cette barrière physico-chimique provoque une forte diminution de l'oxygène dissous, entraînant l'asphyxie des animaux aquatiques tels que les poissons et les crustacés, et la toxicité pour les animaux aquatiques (microorganismes) et perturbent la photosynthèse des plantes (Salam *et al*; 2016). De plus, en se décomposant, ces graisses favorisent la prolifération de bactéries anaérobies qui génèrent des toxines et des odeurs désagréables (Yap *et al*; 2010). La contamination de l'approvisionnement en eau est plus grave que la contamination du sol (Rafiq *et al*; 2015).

Dans le sol, l'accumulation de graisse obstrue les pores du sol, réduisant sa perméabilité, inhibant l'activité microbienne bénéfique et l'oxydation chimique, entravant la décomposition d'autres matières organiques et appauvrissant ainsi de manière permanente la fertilité du sol. Cependant, l'effet des déversements d'hydrocarbures s'est avéré être relativement de courte

durée et augmente quelque peu la capacité de certains organismes à survivre (Tamothran et *al*; 2022). Par exemple, les produits pétroliers. L'essence et le gazole ont un effet toxique sur la croissance des plantes et la teneur en azote, et la gravité de l'effet dépend du type, de la dose et du type de substance utilisée pour minimiser l'effet des dérivés du pétrole (Mirosław Wyszkowski et Ziolkowska 2009); Une marée noire est un déversement accidentel de pétrole brut dans l'environnement qui entraîne la contamination de l'environnement par des hydrocarbures liquides. Ces déversements mettent en péril la santé publique, l'eau potable et les ressources naturelles et perturbent l'économie. Des contaminants particulièrement dangereux se trouvent dans les sols municipaux, autour des installations industrielles et dans les zones d'extraction du pétrole et du gaz naturel (M Wyszkowski et Ziò 2008). Enfin, les graisses sont à l'origine de dysfonctionnements majeurs dans les stations d'épuration : Elles bouchent les filtres, obstruent les canalisations et forment d'énormes « bouchons de graisse » dans les égouts, augmentant les coûts d'entretien et les risques sanitaires. Pour réduire cette pollution insidieuse, le traitement responsable des huiles usagées (en les collectant et en les recyclant sous forme de biocarburant ou de savon), l'installation de séparateurs de graisses dans l'industrie et la sensibilisation du public aux bonnes pratiques (comme ne pas jeter l'huile de friture dans l'évier) sont des solutions nécessaires qui doivent être généralisées (Anand et Chhibber 2006).



**Figure 1.** Pollution de la mer par des déchets liquides du pétrole déversé.

## **2. Généralités sur les lipases**

### **2.1. Définition**

Les triacylglycérolacyl-hydrolases, également appelées lipases, sont des enzymes particulières en raison de leur mode d'action et de leur spécificité envers les substrats. Selon le micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent fonctionner comme des hydrolases dans un milieu aqueux ou comme des catalyseurs pour des réactions de synthèse organique. Ils sont une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides à longues chaînes (Fickers et *al*; 2008). Les lipases peuvent être obtenues à partir de diverses sources, animales, végétales et microbiologiques. (Hasan et *al*; 2006). Elles sont (triacylglycérolacyl hydrolase) catalysent les réactions d'hydrolyse, d'estérification et d'alcoolylse (Chandra et *al*; 2020). Sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse des esters glycériques en milieu aqueux et la synthèse des esters en milieu non aqueux. Elles peuvent ainsi catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel (Tavares et *al*; 2018).

### **2.2 Les enzymes lipolytiques**

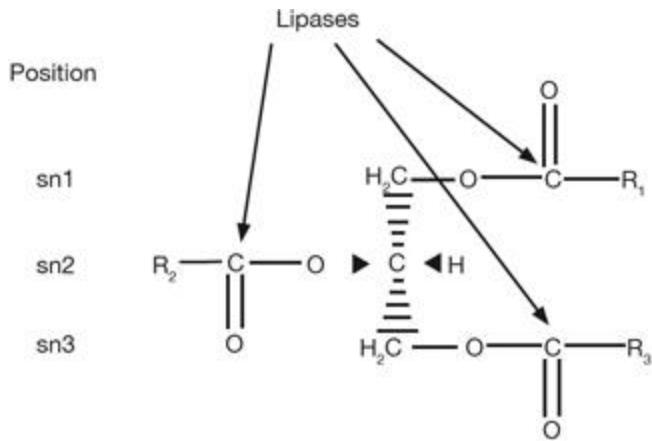
Il existe actuellement 15 familles de lipases, classées en fonction de leur séquence d'acides aminés et de leur fonction. Les enzymes lipolytiques constituent un groupe diversifié d'enzymes hydrolases importantes. Les enzymes lipolytiques sont largement répandues, omniprésentes dans la nature et présentes dans les trois règnes d'organismes, et remplissent un large éventail de rôles physiologiques, par exemple dans de nombreux tissus, cellules fluides, graines, organes, etc. Ces enzymes sont métaboliquement importantes pour la production d'acides gras libres et de glycérides partiels nécessaires au transport des acides gras à travers les membranes et à la libération des acides pour l'oxydation et la recombinaison en triglycérides et phospholipides. Les enzymes lipolytiques se composent de deux groupes principaux : les lipases, qui sont des acylhydrolases de triacylglycérols, et les phospholipases A1 et A2, qui sont des acylhydrolases de phosphoglycérols. Bien que les phospholipases C et D ne soient pas des acylhydrolases, elles sont généralement incluses parmi les enzymes lipolytiques.

### **2.3. Différence entre lipase et estérase**

Les estérases et les lipases hydrolysent toutes deux les liaisons esters, mais les lipases présentent une activité plus élevée vis-à-vis de l'état agrégé de leur substrat, tandis que les estérases montrent généralement une activité plus marquée envers l'état soluble de leur substrat. (D. B. Lopes et *al*; 2011). Comme les estérases montrent une activité maximale envers les solutions d'esters de vinyle à chaîne courte (tels que l'acétate de vinyle, le propionate de vinyle, le butyrate de vinyle) et de TAG (tels que la triacétine, la tripropionine, la tributyryne), les lipases sont également actives sur les solutions d'esters de vinyle à chaîne courte et de TAG. Cependant, contrairement aux estérases, les lipases présentent une activité maximale contre les substrats émulsifiés, et l'activité à mi-maximale est atteinte lorsque les concentrations de substrat approchent la limite de solubilité des esters. (Chahiniana et sarda 2009).

### **2.4. Spécificité des lipases**

Certaines lipases peuvent hydrolyser tous types de liaisons ester des triglycérides, sans faire de différence entre leurs positions dans la molécule. D'autres lipases sont spécifiques de la position de ce lien au sein de la molécule (Figure 2) (Jensen et *al*; 1983). Ce lien peut être sur le carbone 1 (sn1) du glycérol, sur le carbone sn2 ou sur le carbone sn3. Les lipases peuvent aussi être spécifiques à un acide gras. Certaines lipases ont des propriétés stéréospécifiques (Fickers et *al*; 2008). Les lipases peuvent en effet distinguer des énantiomères, c'est-à-dire des molécules qui ont la même formule chimique mais des propriétés différentes. Cela a été démontré dans la synthèse d'esters aromatiques. Les lipases sont des enzymes qui dégradent les lipides. Elles sont sélectives pour les classes de lipides, les alcools (positionnels ou régio-), les acides gras, les énantiomères (chiralité du résidu acide ou alcool) et les combinaisons de ceux-ci. Elles peuvent préférer une certaine longueur de la chaîne de l'acide gras, un certain type d'insaturation, une certaine chiralité des groupes et une certaine position des groupes sur le glycérol (Barros et *al*; 2010).



**Figure 2.** Toutes les positions spécifiques au sein de la molécule de lipase (Fickers et al; 2008).

## 2.5. Origines de lipase

Les lipases sont largement répandues dans la nature et jouent un rôle physiologique important dans le métabolisme des lipides (Fickers et al; 2008). Elles sont présentes dans les plantes, les invertébrés et les vertébrés, et produites par de nombreux microorganismes, principalement sous la forme de protéines extracellulaires (Dab 2023).

Parmi les différentes sources de lipases, les microbes (flore microbienne), qui comprennent les bactéries, les champignons et les levures, (Pandey et al; 1999) sont les sources les plus intéressantes en raison de leur énorme potentiel industriel, de la facilité de manipulation de leurs cultures, de leur disponibilité et de leur évolutivité. (Sarmah et al; 2018).

### 2.5.1. Lipases végétales

Les lipases sont disponibles dans différentes parties de la plante, telles que les graines ou les grains, les fruits, les feuilles, etc (Moussavou Mounguengui et al; 2013). Toutefois; la principale source d'enzymes est constituée par les graines, notamment le ricin, le haricot africain, l'orme, le tournesol, la noix de physique, le lupin, la graine de lin, la noix de coco, l'amande, la nigelle, le grain de blé, le riz, le maïs, l'avoine, l'orge, le sésame, le sorgho, etc. Les graines ont une activité lipasique plus élevée que les autres sources car elles contiennent généralement une forte concentration d'huile (triacylglycérol) et servent donc de source d'énergie pour la croissance de la plante (D. G. Filho et al; 2019). L'activité de la lipase augmente au cours de la germination car le triacylglycérol est converti en sucres solubles par la lipase (Sarmah et al; 2018), ainsi que sa capacité à catalyser l'hydrolyse des

esters via les réactions d'estérification et de transestérification. Les méthodes de préparation et de traitement de ces biocatalyseurs peuvent varier en fonction de la nature de la source végétale. Les lipases végétales sont généralement utilisées dans la biosynthèse sous forme d'extraits végétaux bruts ou partiellement purifiés, ou sous forme de lipases purifiées obtenues par des méthodes d'extraction ou de séparation spécifiques (Moussavou Mounguengui et al; 2013).

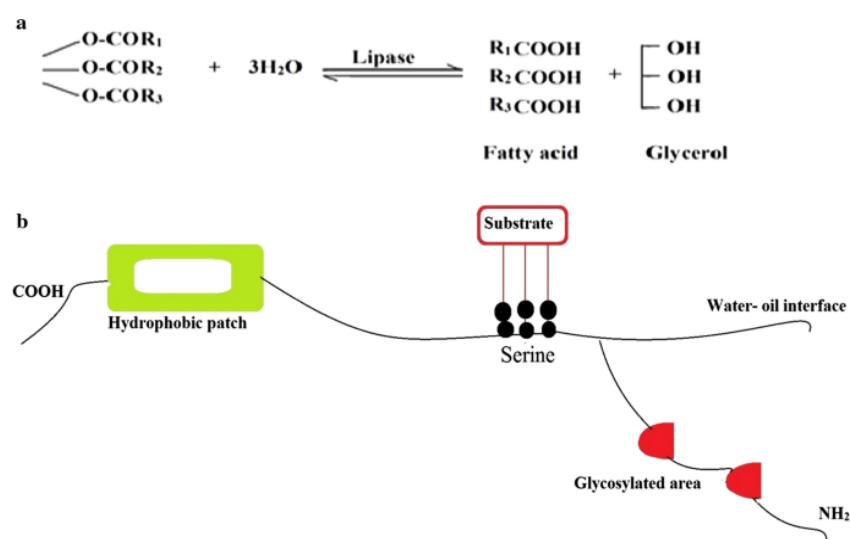
### **2.5.2. Lipases animales**

Les cellules animales synthétisent des lipases qui permettent la digestion des graisses et des lipides (Sarmah et al; 2018). Ces enzymes sont produites par différents organes tels que le pancréas, l'iléon et la langue. Cependant, les lipases animales sont plus souvent utilisées dans les diagnostics cliniques que dans la production commerciale en raison de facteurs complexes tels que la manipulation des cultures et la séparation des produits (D. G. Filho et al; 2019). Comparées aux lipases végétales et microbiennes, ces lipases sont beaucoup moins étudiées (Sarmah et al; 2018). Parmi les différentes lipases animales, la lipase pancréatique a été largement utilisée et est essentielle dans la digestion du glycate. Elle est utilisée comme outil de recherche dans les domaines de la chimie des lipides et de la biochimie, car elle catalyse efficacement l'hydrolyse hautement spécifique des esters d'alcool primaire pour libérer les acides gras libres (AGL) des positions sn-1 et -3 (Rogalska et al; 1993), Les lipases dérivées du pancréas de porc ou de l'étoile de mer peuvent être obtenues comme alternative aux lipases pancréatiques de porc, qui trouvent leur principale application dans les industries de transformation alimentaire (D. G. Filho et al; 2019). Les lipases peuvent également être dérivées de tissus d'insectes, et de plus en plus d'études portent sur l'exploitation de l'activité lipasique intestinale pour les agents de biocontrôle (Sarmah et al; 2018); Lipase pancréatique humaine (HPL) l'une des lipases mammaliennes les plus étudiées, qui contribue à l'hydrolyse de 75 à 80% des triglycérides alimentaires. Elle est produite par les cellules acidophiles du pancréas exocrine (Dab 2023).

Chez les mammifères en général, il existe différents types de lipases qui se rassemblent à divers stades du tractus gastro-intestinal, y compris dans des tissus spécialisés tels que le pancréas et le tissu adipeux (Dab 2023). Les lipides sont absorbés dans la lumière gastro-intestinale et diffusent dans l'intestin où la lipase gastrique catalyse l'hydrolyse afin d'obtenir de l'énergie à partir de différents tissus corporels.

### 2.5.3. Lipase microbienne

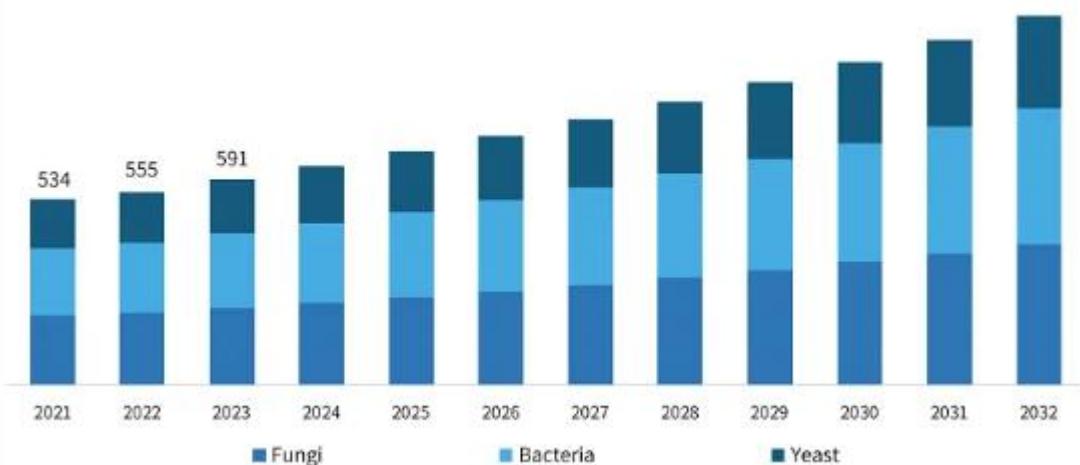
Les lipases sont omniprésentes dans la nature. Elles sont produites par plusieurs plantes, animaux et microorganismes. Les lipases d'origine microbienne représentent la classe d'enzymes la plus largement utilisée dans les applications biotechnologiques et en chimie organique (Treichel et al; 2010). Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases ; EC 3.1.1.3) sont une classe d'enzymes hydrolytiques qui catalysent l'hydrolyse du triacylglycérol insoluble en glycérol, acylglycérols et acides gras libres (Bharathi et Rajalakshmi 2019). Ils ne nécessitent aucun cofacteur et relèvent de la catégorie des serine hydrolases. La dégradation des liaisons ester à l'interface est catalysée par les lipases entre une phase de substrat insoluble et une phase aqueuse, où les enzymes maintiennent leur activité de liquéfaction dans des conditions naturelles (Figure 3). Issues de sources microbiennes variées, ces enzymes se distinguent par leur efficacité et leur polyvalence, ce qui leur confère un large éventail d'applications industrielles, notamment dans la fabrication de molécules modifiées (Chandra et al; 2020).



**Figure 3.** L'hydrolyse du triglycéride le transforme en glycérol et en acide gras. b Représentation d'une molécule de lipase avec ses caractéristiques (Chandra et al; 2020).

### 3. Microorganismes producteurs de lipases

Les lipases sont produites par les animaux, les plantes et les microorganismes. Elles se sont vues attribuer une attention particulière de la part de l'industrie en raison de leur stabilité, de leur sélectivité et de leur large spécificité de substrat de nombreux microorganismes sont connus pour produire naturellement des lipases, y compris les bactéries, les levures et les champignons (Treichel et al; 2010). Elles sont supérieures aux lipases d'origine végétale ou animale en termes d'activité, de stabilité, de facilité de purification, de modifications moléculaires, et de production continue indépendante des saisons (Zhao et al; 2021). Les lipases microbiennes, en tant qu'enzymes biologiques polyvalentes, présentent un intérêt considérable pour diverses applications dans les processus biologiques et industriels, notamment dans les secteurs de l'alimentation et des boissons, du cuir, des détergents, des cosmétiques, des textiles, des produits agrochimiques, de l'industrie pharmaceutique et du traitement des déchets (Pham et al; 2021).



**Figure 4.** Analyse du marché de la lipase microbienne.

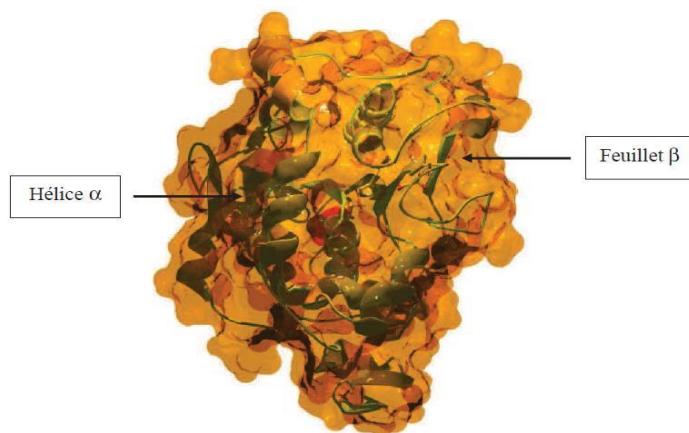
#### 3.1. Bactéries lipolytiques

Les lipases sont des enzymes lipolytiques vitales produites par de nombreux micro-organismes, des procaryotes aux eucaryotes (Riseh et al; 2024). Les lipases microbiennes (bactériennes) sont de plus en plus précieuses et préférables en raison de la diversité des

substrats utilisés, d'un rendement élevé, d'une plus grande stabilité, d'un temps de génération plus court, de manipulations génétiques simples et de coûts de production moindres. Par exemple, les enzymes lipolytiques sécrétées par les membres du genre *Bacillus* présentent un intérêt pour la biotechnologie (Pham et al; 2021). Sont présents dans différents habitats, notamment dans les sols et les graines contaminés par le pétrole. Les déchets industriels, les usines d'huile végétale, etc (Fashogbon et al; 2021).

### 3.2. Propriétés structurales des lipases microbiennes

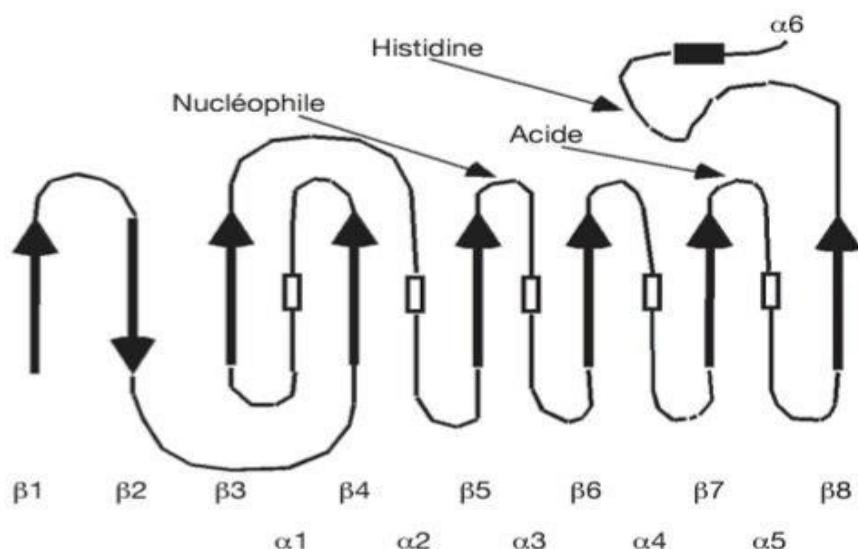
Les lipases microbiennes décrites jusqu'à présent partagent l'architecture structurale de la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases, en dépit de leurs différences de taille (20-60 kDa). Cette topologie commune se compose au moins de 5 feuillets  $\beta$  parallèles connectés et emballés par des hélices  $\alpha$  (Holmquist 2000). Le site actif possède une séquence de résidus Ser-His-Asp. Ces lipases ont une spécificité pour l'hydrolyse des acides gras avec des doubles liaisons cis-insaturées (Mala et Takeuchi 2008). Elle comprend une triade catalytique formée de ; la sérine 105, qui agit comme nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique, l'histidine 224, l'acide aspartique 187, qui stabilise cet intermédiaire ; À titre d'exemple, la lipase B de *Candida antarctica*, une protéine de 33 kDa composée de 317 acides aminés, se distingue, comme c'est le cas pour les estérases, par la présence d'une structure  $\alpha/\beta$  (Figure 5) (Rouillard 2012). Elle possèdent de nombreuses caractéristiques catalytiques, telles que l'alcoolyse, la transestérification, la décarboxylation et l'aminolyse. Leur mécanisme d'action catalyse l'hydrolyse de différents substrats lipidiques (Riseh et al; 2024).



**Figure 5.** Structure tridimensionnelle de lipase B de *Candida antarctica* (Rouillard 2012).

### 3.3. Mécanisme enzymatique d'hydrolyse

Les lipases, comme les estérases, sont des catalyseurs essentiels pour l'hydrolyse et la transestérification des groupes esters. Cependant, alors que les estérases agissent sur des substrats solubles, les lipases catalysent des réactions sur des substrats insolubles dans l'eau. La présence d'une interface eau/lipide est une condition préalable habituelle pour une catalyse efficace (Cygler et Schrag 1999). Cette réaction se fait essentiellement grâce au site actif de l'enzyme, car le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice  $\alpha$  amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet (Figure 6). Lorsque cette hélice  $\alpha$  recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette configuration, la face hydrophobe de l'hélice amphiphile interagit avec des résidus hydrophobes entourant le site actif, tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Par conséquent, le substrat ne peut pas interagir avec la triade catalytique. Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme, suite au mécanisme d'activation interraciale, il y a un déplacement de l'hélice alpha constituant le volet. La face hydrophobe de l'hélice, auparavant orientée vers l'intérieur du site actif, se retrouve exposée au solvant, créant ainsi une surface hydrophobe qui interagit avec l'interface eau/corps gras (Fickers et al; 2008).



**Figure 6.** Schéma du repliement  $\alpha/\beta$ . Les flèches représentent les feuillets  $\beta$  et les rectangles les hélices  $\alpha$ . Le rectangle noir représente le volet amphiphile (Fickers, et al; 2008).

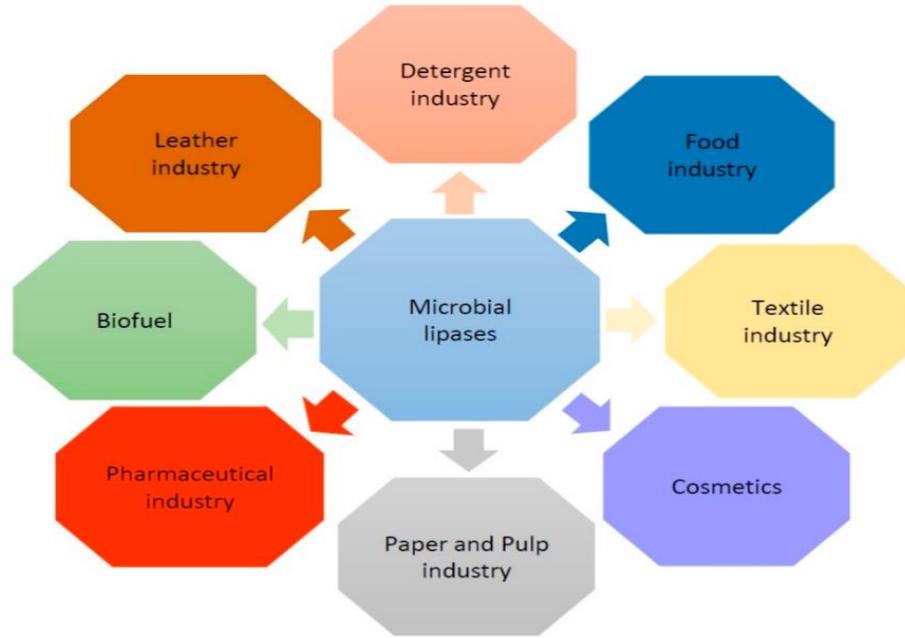
### **3.4. Caractéristiques des bactéries lipolytiques**

Les bactéries productrices de lipase se caractérisent par leur fermentation en milieu submergé est directement liée à des facteurs nutritionnels et physico-chimiques tels que les sources de carbone et d'azote, la température, le pH, ainsi que la présence d'inducteurs enzymatiques comme les huiles végétales (Furini et *al*; 2018). Le choix des bactéries comme source de production de lipase est considéré comme le plus pertinent en raison de leur caractéristique comme la rapidité du processus, sa facilité de manipulation, ses coûts de production relativement faibles, et la capacité du contrôle de la fermentation, ce qui permet de produire des enzymes en grandes quantités et avec une activité élevée. Les bactéries lipolytiques ayant la capacité de décomposer les lipides peuvent potentiellement être utilisées comme sources pour la production des lipases. On les trouve généralement dans divers habitats, tels que les déchets domestiques, contiennent des lipides. Les sols contaminés par des hydrocarbures (Purkan et *al*; 2020).

## **4. Applications biotechnologiques des lipases**

Les lipases d'origine bactérienne sont largement reconnues comme l'une des classes d'enzymes les plus importantes et les plus prometteuses pour l'industrie. Cet engouement s'explique notamment par leurs propriétés catalytiques particulières et par la relative simplicité des procédés nécessaires à leur production. La majorité de ces enzymes présentent une bonne stabilité dans divers solvants organiques et n'ont pas besoin de cofacteurs pour être actives. Elles peuvent être employées aussi bien comme hydrolases que comme catalyseurs en synthèse organique. Les lipases microbiennes se distinguent par une large spécificité vis-à-vis des substrats ainsi qu'une énantiomérotropie remarquable. Leurs champs d'application sont donc nombreux et variés (Fickers et *al*; 2008). L'intérêt récent pour la production de lipases est associé à leurs applications en tant qu'additifs dans l'alimentation (modification des arômes), dans les produits chimiques fins (synthèse d'esters), dans les détergents (hydrolyse des graisses), dans le traitement des eaux usées (décomposition et élimination des substances huileuses), dans les cosmétiques (élimination des lipides), dans les produits pharmaceutiques (digestion des huiles et des graisses alimentaires), dans le traitement du cuir (élimination des lipides des peaux animales) et dans les analyses biomédicales (triglycérides sanguins). De plus, les lipases ont une application importante dans le domaine

de la bioénergie, en particulier dans la production de biodiesel, qui est un secteur en expansion en raison de la demande mondiale croissante pour l'utilisation des énergies renouvelables (Salihu et al; 2012).



**Figure 7.** Application des lipases microbiennes dans différents secteurs industriels (Szymczak et al; 2021).

#### 4.1. Production des détergents

Les produits de nettoyage sur le marché international sont composés d'un mélange de plusieurs substances actives, dont la nature varie selon l'usage du produit. Les détergents contiennent principalement des agents tensioactifs, des agents de construction, des inhibiteurs de corrosion, des agents azurants optiques, des régulateurs de mousse, des agents de blanchiment et des enzymes, ainsi que d'autres additifs mineurs (Gürkök 2019). Les enzymes compatibles avec les détergents sont la nouvelle tendance suivie par la plupart des acteurs de l'industrie des détergents. Les cellulases, les lipases, les protéases et les amylases font partie des enzymes fréquemment utilisées dans les détergents (Inan Bektas et al; 2023). Les lipases sont des ingrédients clés des détergents, tels que les lessives et les lave-vaisselle, où elles jouent un rôle essentiel dans l'élimination des résidus graisseux et le débouchage des canalisations. Les détergents contenant des lipases offrent un pouvoir nettoyant considérablement accru (Hasan et al; 2010).

#### **4.2. Production de biodiesel**

Bien que les combustibles fossiles soient une source d'énergie majeure pour l'humanité depuis plusieurs siècles, leur exploration et leur utilisation entraînent plusieurs problèmes environnementaux. Par ailleurs, il est important de noter que les combustibles fossiles ne sont ni renouvelables ni durables. Il est donc essentiel de rechercher des alternatives renouvelables qui soient durables et respectueuses de l'environnement. Le biodiesel, est un biocarburant renouvelable et durable utilisé pour faire fonctionner les moteurs diesel. Sa production se fait (Chioke et *al*; 2018). Le biodiesel, un mélange d'esters monoalkyles d'acides gras, a suscité l'intérêt du monde entier en tant que source de carburant renouvelable (Haq et *al*; 2020). L'un des facteurs qui influencent l'efficacité de la production de biodiesel est le choix du type de catalyseur utilisé pour la transestérification. La lipase est l'un des catalyseurs pouvant être utilisés pour la production de biodiesel .La lipase production de biodiesel a pour fonction de convertir les triglycérides en esters méthyliques (éthyliques) par le biais d'un processus de réaction de transestérification (alcoolysse).L'exploration des bactéries lipolytiques présente des difficultés pour fournir la lipase comme catalyseur dans la production de biodiesel (Purkan et *al*; 2020).

#### **4.3. Production d'aliment**

Les lipases, ou triacylglycérol hydrolases, sont un groupe important d'enzymes ayant une grande importance biotechnologique. Elles trouvent de nombreuses applications dans les industries alimentaires, laitière (Gupta et *al*; 2004). La lipase catalyse l'hydrolyse des graisses présentes dans le lait et intervient dans la fabrication d'aliments cuits, de vins, d'émulsifiants et de compléments alimentaires. Elle joue également un rôle important dans l'amélioration des arômes des fromages, des crèmes et d'autres produits laitiers ; L'utilisation d'une enzyme encapsulée contenant de la lipase associée à une protéase permet de produire un fromage riche en Saveur, Sans arrière-goût amer (Szymczak et *al* ; 2021).

# **Chapitre II :**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Isolement, purification et criblage des microorganismes lipolytiques à partir des coproduits oléicoles

### 1.1 Biotopes

Des échantillons ont été soigneusement sélectionnés pour l'isolement des microorganismes lipolytiques. Ces échantillons ont été prélevés sur des sites où la présence de substances lipidiques est une caractéristique notable et persistante. Notre analyse s'est concentrée sur des échantillons représentatifs, tels que des déchets solides issus de l'extraction de l'huile d'olive, la margine (un sous-produit liquide généré lors de l'extraction de l'huile d'olive), ainsi que le sol des champs d'oliviers (Figure 8). L'échantillon de grignons d'olives et la margine ont été prélevés dans l'huilerie Essafa et El Marwa, située dans la région d'El M'sif, wilaya de Jijel. L'échantillon de sol a été collecté dans une exploitation agricole située au centre de la commune de Hamma Bouziane (Figure 8).



**Figure 8.** Localisation des sites d'échantillonnage. a : l'huilerie Essafa et El Marwa. b : Prélèvement de la margine. c : Grignons d'olive (déchet solide) d : Champ d'olivier

## 1.2. Prélèvement et présentation des échantillons

Les échantillons ont été soigneusement et aseptiquement collectés dans des tubes stériles à l'aide d'une spatule stérile. Des trous d'environ 10 centimètres de profondeur ont été percés pour obtenir les deux échantillons. L'eau a ensuite été prélevée directement dans la machine, et enfin chaque boîte a été soigneusement étiquetée pour assurer une traçabilité précise. Le transport et le stockage sont ensuite effectués à domicile dans un réfrigérateur à une température de 4 °C jusqu'à l'utilisation en laboratoire. Les différentes photos des échantillons sont représentées au niveau de la Figure 9.



**Figure 9.** Différents échantillons collectés.

## 1.3. Préparation des dilutions

Des dilutions décimales sont réalisées par la préparation d'une solution d'eau physiologique en pesant 0.9 g de NaCl et en le dissolvant dans 100 mL d'eau distillée. Les dilutions décimales sont préparées par l'ajout successif de 1 mL de la solution initiale à 9 mL d'eau physiologique stérile. La préparation des solutions mères est réalisée par le dépôt de 1 g de chaque échantillon dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. Une vortexation d'une minute est ensuite réalisée afin de détacher et libérer les microorganismes du sol et avoir une suspension homogène.

#### **1.4. Isolement de microorganismes lipolytiques**

L'ensemencement a été réalisé sur deux milieux préparés en fonction des besoins nutritifs des microorganismes lipolytiques. Le premier milieu était YPD où le dextrose a été remplacé par 10 mL d'huile d'olive comme seule source de carbone (Annexe 2). Dans le second milieu, le dextrose a été remplacé par 10 mL de Tween 80 (Annexe 3). Une fois les milieux préparés, ils ont été versés sur des boîtes de Pétri. À l'aide d'une micropipette, 0.1 mL de chaque dilution a été ajouté sur la surface des milieux d'isolement. La solution a été distribuée à l'aide d'un râteau sur chaque boîte. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 30°C pendant 48 heures.

#### **1.5. Purification des isolats**

Dans le cadre du processus de purification des colonies bactériennes et fongiques isolées, et après l'apparition de ces dernières, nous avons procédé à leur purification par réisolement sur les mêmes milieux utilisés dans l'isolement ; la méthode est effectuée sous conditions d'asepsie par la réalisation des stries sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture. Ce processus de purification des isolats est réalisé par plusieurs repiquages successifs, jusqu'à l'obtention d'une culture homogène où toutes les colonies sont identiques.

#### **1.6. Test de confirmation et sélection des souches les plus performantes**

Le criblage des microorganismes isolés est évalué pour leur potentiel lipolytique suivant la méthode (Dab 2023). La production de lipase est examinée en utilisant un milieu sélectif contenant l'huile d'olive comme seule source de carbone et le rouge de phénol comme indicateur pour détecter les souches lipasiques (Annexe 4), ce colorant représente un composé chimique connu sous le nom de rouge de phénol R et également désigné sous le nom de phénol-sulfo-néphthaléine (PSP). La forme acide de ce dernier se présente sous un aspect jaune, tandis que sa forme basique est caractérisée par une couleur rouge. La zone de virage de la PSP se situe dans une fourchette de valeurs de pH allant de 6.6 à 8.4 (Barret 2021). Le rouge de phénol est utilisé principalement comme indicateur de pH dans diverses applications scientifiques et médicales en raison de sa capacité à changer de couleur en fonction de l'acidité ou de la basicité d'une solution (Branger 2007). Après l'isolement et la purification des souches, et dans des conditions d'asepsie, une colonie bien précise est soigneusement

## *Matériel et méthode*

sélectionnée à l'aide d'une anse de platine stérile, puis ensemencée par piqûre centrale sur le milieu de culture contenant 0.01% de rouge de phénol. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures. Et après incubation, une zone jaune est attendue autour de la colonie isolée, ce qui prouve la validité et l'efficacité du test.

## **2. Production de lipases sur milieu liquide synthétique**

La production de lipases extracellulaires par les deux isolats sélectionnés, S1 et S2 est réalisée selon la méthode de Tansey (1971). Trois différents substrats ont été utilisés : deux substrats synthétiques (Tween 20 et Tween 80) (Annexe 7 et 8) et un substrat naturel à base d'huile d'olive (Annexe 2).

### **2.1. Préparation de pré-culture**

Les isolats S1 et S2 sont repiqués sur gélose YPG (Annexe 5) et incubés à 30°C pendant 24 h. Ensuite, des colonies sont prélevées afin d'inoculer 100 mL de milieu YPG liquide, l'incubation est faite à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24 h.

### **2.2. Inoculation des fioles**

L'inoculation est réalisée dans des fioles de 250 mL, chacune contenant 100 mL de milieu de fermentation composé de 1% d'extrait de levure et 2 mL d'huile d'olive, de Tween 80 ou de Tween 20. Le pH des milieux est ajusté à 7.0. Après bouchage au coton cardé, l'ensemble des fioles est stérilisé à l'autoclave durant 20 min à 120°C. Après refroidissement, les fioles sont inoculées à 1% avec l'inoculum préparé. Les fioles sont ensuite incubées à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 48 h. Des prélèvements sont réalisés dans des tubes Falcon stériles chaque 24 h afin d'évaluer la production de biomasse, de protéines totales et l'activité lipolytique des isolats.

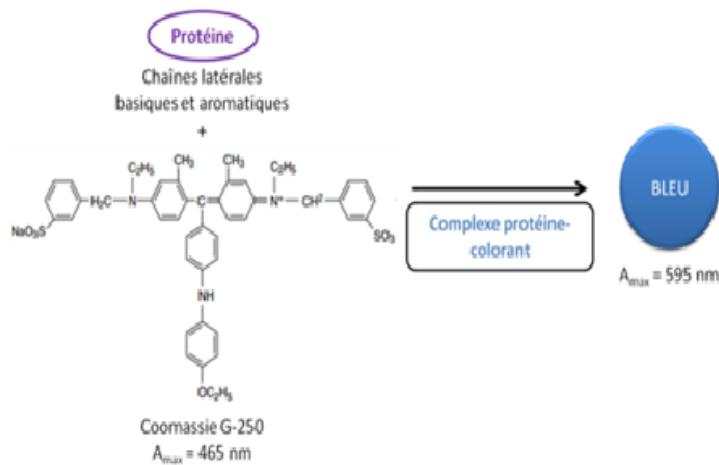
### **2.3. Dosage de biomasse**

La mesure de la biomasse est effectuée sur les échantillons de chaque fiole en utilisant un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 680 nm et des cuves en plastique pour déterminer l'absorbance de chaque échantillon, ce qui permet d'évaluer la concentration de biomasse produite par les deux isolats sélectionnées dans les différents milieux utilisés.

#### **2.4. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford**

#### **2.4.1 Principe de la méthode**

La méthode de Bradford est une technique largement reconnue pour la quantification des protéines, basée sur l'utilisation du colorant Coomassie (Brilliant Blue G-250), qui interagit avec les protéines. (Kruger 2002) .Cette approche est particulièrement prisée dans les laboratoires en raison de sa simplicité, sa rapidité, et sa sensibilité supérieure comparée à d'autres méthodes de dosage. De plus, elle est moins sujette aux interférences des réactifs courants et des composants non protéiques présents dans les échantillons biologiques (Liu et al; 2015). Le principe du doS1ge repose sur l'interaction entre le colorant bleu de Coomassie et les protéines. À l'état anionique, le Coomassie brillant bleu G-250 présente une couleur rouge et absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465 nm. Lors de son interaction avec les protéines, le colorant se lie aux chaînes latérales basiques et aromatiques des acides aminés, ce qui conduit à la formation d'un complexe (Figure 10) stable (Ernst et Zor 2010). Ce complexe prend la forme cationique bleue, dont l'absorption atteint son maximum à 595 nm. La coloration bleue ainsi obtenue est directement proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon, permettant une quantification précise (Kruger 2002). L'intensité de la coloration bleue est mesurée par spectrophotométrie à 595 nm, ce qui permet d'établir une courbe de calibration basée sur la loi de Beer-Lambert. Cette méthode est rapide (quelques minutes) et la coloration reste stable pendant environ une heure, facilitant son application. En résumé, cette technique fiable et précise permet de déterminer la concentration totale en protéines d'un échantillon, conformément aux travaux fondateurs de Bradford (1976) et de Krohn (2011) (Fumex 2019).



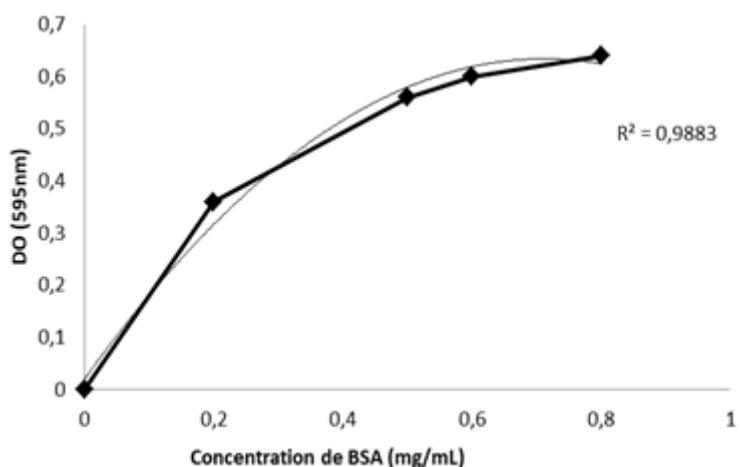
**Figure 10.** Schéma de la réaction de la méthode de Bradford. Création d'un complexe protéine-colorant de Coomassie de couleur bleue absorbant à 595 nm (Krohn 2011).

#### **2.4.2. Préparation du réactif de Bradford**

Avant toute utilisation, il est impératif de procéder à la dilution du réactif de Bradford. Ce dernier, disponible dans le commerce sous forme de concentré liquide de la marque Bio-Rad, doit être dilué cinq fois avec de l'eau distillée. Pour réaliser cette dilution, 4 mL d'eau distillée sont ajoutés à 1 mL de réactif Bradford. Ensuite, la solution est agitée au vortex pendant quelques secondes.

#### **2.4.3 Courbe d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA)**

La concentration des protéines est déterminée par une méthode de référence, représentée par une courbe de calibration (Figure 11). Cette courbe a été établie à l'aide de l'albumine, une protéine présente dans le sérum bovin (BSA), comme substance de référence, avec une plage de concentration allant de 0 à 1 mg/mL. Pour cela, 10 mg de BSA sont méticuleusement pesés, puis dissous dans 10 mL d'eau distillée stérile afin d'obtenir une solution de concentration finale de 1 mg/mL (solution mère). Après, on fait des dilutions adaptées à partir de la solution principale pour avoir des solutions de BSA avec des concentrations différentes (0.2 jusqu'à 0.8 mg/mL).



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage de BSA utilisé pour déterminer la concentration des protéines selon la méthode BRADFORD.

#### **2.4.4 Dosage des protéines synthétisées par les isolats sélectionnés**

Les échantillons ont été prélevés de différents âges (de 0 h à 48 h) des milieux synthétiques (tween 20, tween 80), ainsi que les autres échantillons provenant de substrat naturel (huile

## Matériel et méthode

d'olive). Ces échantillons ont ensuite été centrifugés. Dans un second temps, 800 µL de chaque échantillon sont mélangés avec 200 µL de réactif de Bradford dilué cinq fois. Puis, les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 20 à 30 minutes. Enfin, la lecture des DO est réalisée à 595 nm.

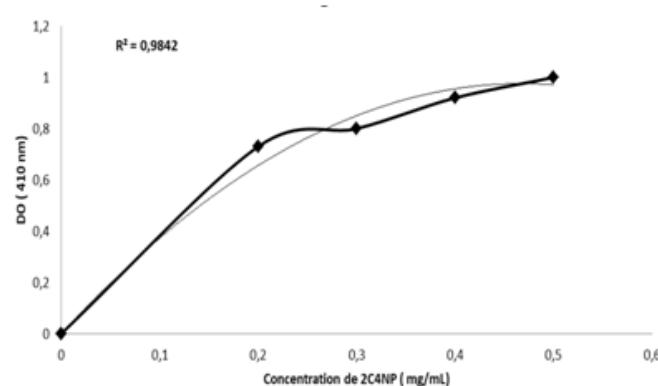
### 2.5 Dosage de l'activité lipolytique par spectrophotométrie

#### 2.5.1 Principe de 4-Nitrophanyl palmitate (pNPP)

L'activité de l'enzyme lipase est mesurée par la méthode spectrophotométrique. Les esters de p-nitrophénol sont couramment utilisés pour l'analyse cinétique. Dans la méthode d'analyse spectrophotométrique, le produit coloré est mesuré à la suite de l'hydrolyse des substrats d'esters de p-nitrophénol par l'enzyme lipase (Yel 2021). Le principe de ce test repose sur l'hydrolyse du pNPP, substrat chromogène d'ester d'acides gras, par la lipase en milieu aqueux, produisant du p-nitrophénol et des acides. Le p-nitrophénol se présente sous sa forme anionique, le p-nitrophénolate, ce qui lui confère une coloration jaunâtre et une absorption lumineuse à 410 nm dans un tampon alcalin tel que Tris-HCl pH 7.5 (Pohanka 2019). Dans notre étude, nous avons utilisé le tampon de phosphate.

#### 2.5.2. Courbe d'étalonnage du 2-Chloro-4-nitrophenol (2C4NP)

La courbe d'étalonnage dans la Figure 12 est réalisée à base du colorant 2-Chloro-4-nitrophenol (2C4NP) ; une solution de concentration 0.5 mM est préparée par le dissout de 10 mg de 2C4NP dans 10 mL eau distillée filtrée, une série de dilutions est ensuite préparée selon différentes concentrations allant de 0 à 1 mg/mL.



**Figure 12.** Courbe d'étalonnage de 2C4NP utilisée pour déterminer la concentration de lipase.

### **2.5.3. Préparation du tampon phosphate**

Une solution de tampon phosphate 1M a été préparée en dissolvant 1.36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 10 mL d'eau distillée et 1.74 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dans 10 mL d'eau distillée. Ensuite, une dilution a été réalisée pour obtenir une solution à 100 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Pour cela, 1 mL de la solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a été prélevé et dilué dans 9 mL d'eau distillée, puis la même opération a été effectuée avec 1 mL de la solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dans 9 mL d'eau distillée afin d'obtenir une concentration de 100 mM. Au préalable, 8.1 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dilué ont été mélangés avec 1.9 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  afin d'obtenir 10 mL de tampon phosphate à une concentration de 100 mM, par le PH mètre le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  est ajouté avec précaution jusqu'à atteindre un pH de 7.6.

### **2.5.4. Préparation de la solution 4-Nitrophanyl palmitate**

Pour obtenir une solution 4-Nitrophanyl palmitate de concentration finale de 20 mM 37 mg de pNPP sont dissous dans 5 mL de solvant organique isopropanol, ensuite, le mélange est vortexé jusqu'à homogénéisation.

### **2.5.5. Dosage de lipase**

Pour mesurer l'activité de la lipase et quantifier le nombre d'unités présentes dans chaque échantillon en fonction des différents milieux utilisés, 1 mL de tampon phosphate pH 7.6, 75  $\mu\text{L}$  de solution de 4-Nitrophényl palmitate à 20 mM et 5  $\mu\text{L}$  de surnageant de chaque échantillon ont déposés dans des tubes secs et bien homogénéisés (Figure 13). L'incubation du mélange réactionnel est ensuite réalisée à 30°C pendant 30 minutes. Enfin, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 410 nm. L'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme libérant un micromole de lipase équivalent au en une minute dans des conditions d'essai standard. Le calcul est réalisé par référence à la courbe standard de 2C4NP.



**Figure 13.** Echantillons après une heure d'incubation.

Les résultats de l'étude de ces trois paramètres (dosage de biomasse, de protéines totales et de l'activité lipolytique) ont permis de sélectionner un seul isolat performant pour la suite du travail.

### **3. Identification des isolats sélectionnés S1 et S2**

Après le test de confirmation et la sélection des souches les plus performantes pour la suite de l'étude, deux souches pures ont été retenues : la première a été désignée par l'abréviation S1, et la seconde par S2.

#### **3.1. Examen macroscopique**

Dans le but d'identifier les isolats utilisés dans notre étude, nous avons eu recours à des méthodes d'observation macroscopique et microscopique. L'isolat S1 et S2 ont été repiqués en stries sur un milieu GN, puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, une observation détaillée à l'œil nu des colonies a été effectuée afin de déterminer l'aspect extérieur de la souche.

#### **3.2. Examen microscopique**

Dans le but d'observer la morphologie, le mode de groupement et la mobilité des cellules, une observation microscopique à l'état frais a été effectuée. Pour ce faire, une goutte d'eau physiologique (Annexe 1) ainsi qu'une colonie de chaque d'un isolat jeune ont été déposées entre lame et lamelle. L'observation a ensuite été réalisée à l'aide d'un microscope optique à l'objectif X40 et à l'immersion (objectif X100). Afin de déterminer le type de Gram auquel appartient la S1 et S2, et ainsi identifier précisément S1 nature, un test de coloration de Gram a été réalisé.

### 3.3. Coloration de Gram

La coloration de Gram est l'une des techniques de coloration les plus importantes en microbiologie. Elle a été introduite pour la première fois en 1882, dans le but principal d'identifier les microorganismes responsables de la pneumonie.

Cette coloration constitue souvent le premier test réalisé en laboratoire. On utilise généralement le violet de cristal ou le bleu de méthylène comme colorant primaire. Les microorganismes qui retiennent le colorant primaire et apparaissent de couleur violet-brun au microscope sont appelés "bactéries à Gram positif". En revanche, ceux qui ne conservent pas la coloration primaire et apparaissent rouges sont appelés "bactéries à Gram négatif". La procédure de coloration de Gram commence par l'application du violet de cristal pour colorer la lame. Ensuite, La première étape de la coloration de Gram consiste à utiliser le colorant violet de cristal pour colorer initialement la lame. L'étape suivante, appelée aussi fixation du colorant, implique l'utilisation d'iode pour former un complexe violet de cristal–iode afin d'empêcher l'élimination facile du colorant. Ensuite, un décolorant, souvent un mélange d'éthanol et d'acétone, est utilisé pour enlever le colorant. Le principe de base de la coloration de Gram repose sur la capacité de la paroi cellulaire bactérienne à retenir le colorant violet de cristal lors du traitement au solvant. Les microorganismes à Gram positif ont une teneur plus élevée en peptidoglycane, tandis que les organismes à Gram négatif ont une teneur plus élevée en lipides. Initialement, toutes les bactéries absorbent le violet de cristal ; cependant, avec l'utilisation du solvant, la couche lipidique des bactéries à Gram négatif est dissoute. Avec cette dissolution, elles perdent la coloration primaire. En revanche, le solvant déhydrate les parois cellulaires des bactéries à Gram positif en fermant les pores, ce qui empêche la diffusion du complexe violet-iodé ; ainsi, ces bactéries restent colorées. La durée de la décoloration est une étape critique de la coloration de Gram, car une exposition prolongée au décolorant peut éliminer toutes les colorations chez les deux types de bactéries. L'étape finale de la coloration de Gram consiste à utiliser un colorant de contre-coloration, comme la fuchsine basique, pour donner une couleur rose aux bactéries à Gram négatif décolorées, facilitant ainsi leur identification. Certaines laboratoires utilisent la safranine comme contre-colorant ; cependant, la fuchsine basique colore les bactéries à Gram négatif plus intensément que la safranine (Tripathi et al; 2025).

### 3.4. Test de catalase

- a) **Principe :** La catalase (CAT) est une enzyme importante qui protège les biomolécules contre les dommages oxydatifs en décomposant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau

## *Matériel et méthode*

et en oxygène. La CAT est présent chez tous les microorganismes aérobies (Hadwan et al; 2024), Certaines bactéries produisent l'enzyme catalase, qui facilite la détoxicification cellulaire. La catalase neutralise les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène, et sa concentration chez les bactéries a été corrélée à leur pouvoir pathogène (Cifelli et al; 2016) Ce test permet donc d'identifier la présence de l'enzyme catalase dans une souche bactérienne.

- b)** **Méthode :** Une goutte de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) a été déposée sur une lame propre. Ensuite, à l'aide d'une anse en platine et dans des conditions d'asepsie, une colonie de la S1 et S2 ont été prélevées et ajoutées à cette goutte.
- c)** **Lecture :** La formation de bulles indique que la réaction est positive, ce qui signifie que la bactérie est catalase positif ; L'absence de formation de bulles au contact des bactéries avec l'eau oxygénée indique que les bactéries sont à catalase négative.

### **3.5. Test de mobilité**

Pour tester la mobilité de l'isolat S1, des colonies de cet isolat ont été déposées, dans des conditions aseptiques, dans un tube à vis contenant un milieu liquide (Annexe 5), puis incubées pendant 24h à température ambiante.

### **3.6. Caractérisation biochimique de l'isolat S1 par la galerie API 50CH**

L'identification biochimique des bactéries s'est effectuée à l'aide d'une galerie de tests biochimiques, appelées galeries API 50 CH. Cette galerie se présente sous forme de séries de petits tubes miniaturisé, appelés tubules, chacun correspondant à un test biochimique spécifique (Joffin et Joffin 2025). Chaque tubule est muni, à son extrémité supérieure, d'une cupule pouvant être remplie ou non de liquide, selon les conditions requises pour le test. Ces tubes contiennent des substrats précis avec lesquels les microorganismes interagissent de manière variable, selon leurs caractéristiques métaboliques (Cattoir et al; 2016).

Dans cette étude, nous avons utilisé la galerie API 50 CH (Girard-Pipau et al; 1995), afin de caractériser l'isolat bactérien étudié. Le système API 50 CH est une méthode standardisée permettant d'évaluer les propriétés physiologiques des microorganismes (Nigatu et al; 2000), notamment leur capacité à métaboliser divers substrats comme les glucides, les hétérosides, les polyalcools et les acides uroniques. Il repose sur 50 microtubes, dont 49 contiennent des substrats spécifiques et un sert de témoin négatif (Carpana et al; 1995). Chaque tube contient un réactif déshydraté et un indicateur de pH (rouge de phénol). Ce système est particulièrement utile

## *Matériel et méthode*

pour l'identification des *Lactobacillus* et espèces apparentées (Kühn et al; 1990), ainsi que d'autres groupes tels que les *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*, en fonction du milieu utilisé.

### **3.6.1. Inoculation de la galerie**

#### **a) Préparation de milieu d'inoculation de la galerie**

Une suspension bactérienne préparée dans un milieu approprié nommé API 50 CHE (Annexe 11). Ce milieu de fermentation est enrichi avec l'extrait de levure et équipé d'un tampon pour réguler le pH. De plus, du rouge de phénol, un indicateur coloré, est ajouté pour permettre un suivi visuel du processus de fermentation (Annexe 4).

#### **b) Préparation de la galerie**

Le milieu de fermentation a été réparti à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans les 50 tubes de la galerie en respectant les conditions de stérilité.

#### **c) Lecture de la galerie**

Les réactions sont observées visuellement à différentes périodes d'incubation (24 et 48 heures à 37°C) ce qui a permis de définir le profil glucidolytique de la souche testée.

## **3.7. Conservation de la souche sélectionnée**

Après avoir sélectionné la souche de *Bacillus cereus* 2, il est nécessaire d'utiliser un milieu de conservation approprié permettant de préserver sa viabilité et ses caractéristiques génétiques. Ce milieu permet un stockage à long terme tout en empêchant la dégradation cellulaire et en assurant la stabilité de la souche pour des études futures.

Pour préparer ce milieu, on dissout dans 20 mL d'eau distillée stérile une quantité de 0.1 g de glucose et 0.1 g d'extrait de malt, puis on homogénéise soigneusement. Ensuite, 20 mL de glycérol ont été ajouté. Le milieu préparé est réparti dans des tubes stériles, ensuite une stérilisation a été réalisée dans un autoclave à 121°C pendant 30 minutes. Ensuite, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie, on prélève une colonie de la souche bactérienne sélectionnée et on l'introduit dans le milieu de conservation. Après agitation douce pour assurer une bonne dispersion des cellules, les tubes sont scellés et stockés dans des conditions appropriées (généralement à -80°C) pour une conservation à long terme.

## 4. Production de lipase par fermentation submergée

### 4.1. Substrat de fermentation

Le substrat utilisé pour la production de lipase dans cette étude est l'huile de friture usagée, elle a été choisie pour sa richesse en lipides en particulier (triglycérides) pouvant induire la production enzymatique. Cette huile a été récupérée à partir de déchets ménagers, puis filtrée soigneusement afin d'optimiser les conditions de culture en éliminant les impuretés solides et en évitant les inhibiteurs de croissance, car cela réduit les composés oxydés et polymérisés et améliore la biodisponibilité des lipides, ce qui augmente la production de lipase, nous effectuons cette étape avant de l'utiliser dans la fermentation submergée.

### 4.2. Préparation de l'inoculum

La souche S1 est repiquée sur gélose YPG à une température de 30°C pendant une durée de 24 heures. Ensuite, des colonies sont prélevées avec soin afin d'inoculer 100 mL de milieu YPG liquide. L'incubation est ensuite réalisée à 37°C sous agitation de 150 rpm pendant 24 h.

### 4.3. Inoculation des fioles

L'inoculation est effectué dans des fioles de 250 mL, contenant chacune 50 mL de milieu de fermentation composé de 0.5% d'extrait de levure et d'extrait de malt, ainsi que 3 mL d'huile de friture. Le pH des milieux est ajusté à 7.0. Après bouchage au coton cardé, les deux fioles sont stérilisées à l'autoclave durant 20 min à 120°C. Une fois le refroidissement effectué, les fioles sont inoculées à 2% avec l'inoculum préparé. Ensuite, les fioles sont incubées à 37°C sous agitation de 150 rpm pendant 72 heures. Des prélèvements sont effectués à intervalles de 24 heures afin d'évaluer la production de biomasse, de protéines totales et de lipase produites.

### 4.4. Etude de différents paramètres et suivi de fermentation (biomasse, protéines et lipase)

## 5. Purification partielle de lipase

Afin de précipiter les protéines produites par la souche de *Bacillus cereus* 2 durant la fermentation sur l'huile de friture, la méthode de précipitation avec le sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) a été réalisée. Cette méthode a été décrite par Duong-Ly et Gabelli 2014,

## Matériel et méthode

décrivant le principe du *Salting out* qui est une technique de séparation ou de purification qui consiste à diminuer la solubilité d'un composé (généralement une protéine) dans une solution aqueuse par l'ajout d'un sel très soluble, comme le sulfate d'ammonium, le chlorure de sodium (NaCl) ou le sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 5.1. Précipitation de protéines

Pour préparer l'échantillon, le surnageant de culture est centrifugé à 8000 rpm à 4°C pendant 20 minutes suivi d'une filtration avec un filtre de diamètre de 0.22 µM. Cette étape a permis d'éliminer les débris cellulaires en obtenant un surnageant stérile contenant toutes les protéines extracellulaires produites par la souche y compris la lipase. 30 mL de ce surnageant est déposé dans un Becher de 50 mL, ce dernier a été placé dans un autre Becher contenant de la glace afin de créer un environnement d'environ 4°C ce qui évite toute dénaturation de protéines. Ensuite, le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement sous agitation douce pour éviter la formation de zones locales trop concentrées. Une série de concentration à divisée de (20%-40%-70%-90%) en utilisant un tableau de (Annexe 12) ; après l'ajout, le surnageant est laissé sous agitation pendant 30 min pour assurer une précipitation complète (Figure 14). Puis, les protéines précipitées sont centrifugées à nouveau à 8000 rpm, 4°C pendant 20 minutes, le surnageant est récupéré pour la suite du processus de précipitation et les culots (contenant les protéines précipitées) de chaque étape de précipitation sont récupérés séparément et resuspendus dans 10 mL de tampon tris-HCl 50 mM pH 7.5.



**Figure 14.** La précipitation des protéines par la méthode de *Salting out*.

### 5.1. Dialyse

Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium et les protéines de taille moléculaire entre 6000 à 8000 kDa, la dialyse des culots resuspendus a été réalisée contre un tampon Tris-HCl à 50 mM à un pH de 7.5, en utilisant une membrane de dialyse ou dialyseur avec cut-off de 6000 à 8000 kDa. Le mélange (culot et Tris-HCl) est placé à l'intérieur de la membrane de dialyse, puis déposé dans un bêcher contenant 300 mL de Tris-HCl, sous agitation (Figure 15). Le tampon est renouvelé tous les 30 minutes.



**Figure 15.** La dialyse des culots resuspendus a été réalisée contre un tampon Tris-HCl.

### 5.3. Dosage enzymatique

Après dialyse, un dosage de l'activité lipolytique est ensuite réalisé avec la même méthode décrite au-dessus.

## 6. Test d'application

Pour confirmer notre étude, un test d'application a été réalisé au cours duquel quatre expériences différentes ont été appliquées sur quatre tissus tachés de beurre (Figure 16)

Dans la première expérience, uniquement 30 mL de l'eau du robinet (témoin) a été mise dans le Becher.

Quant à la deuxième expérience, 30 mL eau de robinet et 8 mL d'extrait d'enzyme obtenu après purification partielle ont été mis dans le Becher. Dans la troisième expérience, 30 mL eau de robinet et 3 mL de détergent commercial produit à base de lipase (SpeedFire) ont été mis dans le Becher. Et dans la quatrième et dernière expérience, 8 mL d'extrait d'enzyme ont

### *Matériel et méthode*

été mis dans le Becher, suivi de l'ajout de détergent commercial préchauffé à ébullition pendant 15 min. Les tissus ont été immersés pendant 10 min, lavés à l'eau, puis séchés.



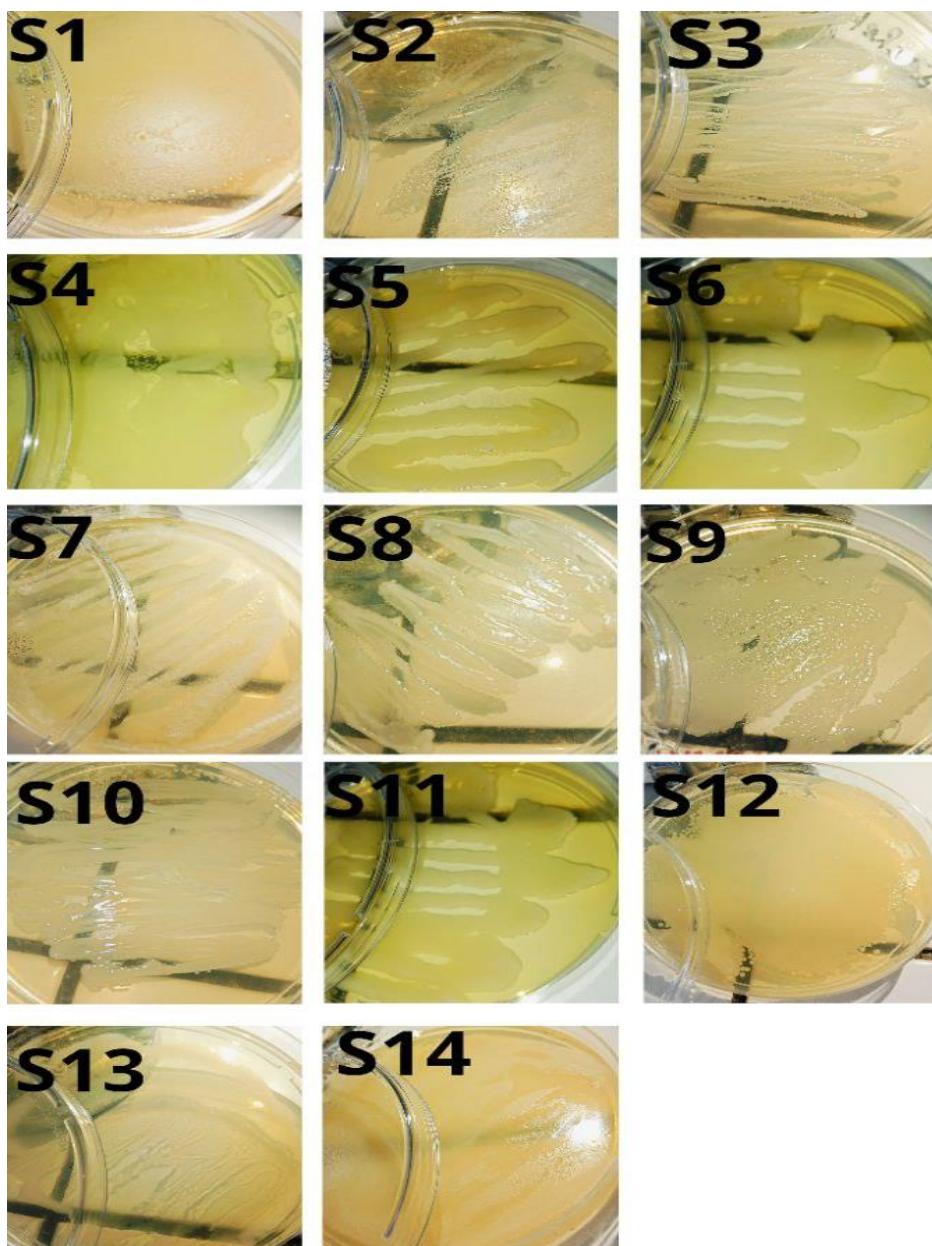
**Figure 16.** Le test d'application de quatre expériences.

# **Chapitre III :**

# **Résultats et Discussion**

## 1. Résultat de l'isolation de microorganismes lipolytiques

L'utilisation de milieu contenant un substrat lipidique comme source de carbone pour isoler les microorganismes lipolytiques obtenue de sélectionnée seulement les bactéries qui capacité à dégradée les lipides et a permis de gagner du temps ; de plus, au lieu d'obtenir un grand nombre d'isolats bactériens, l'utilisation du milieu enrichi en glucose considéré comme une source principale de carbone a été écartée. Nous avons utilisée directement un milieu riche en lipides le screening et ce test a terminé d'obtenue 14 isolats (Figure 17).



**Figure 17.** Les 14 microorganismes lipolytiques obtenus.

## Résultats et discussion

Les 14 isolats proviennent d'un mélange de bactéries, de levures, et de champignons.

### 1.1. Activité lipolytique des isolats et sélection de l'isolat le plus performant

La méthode au rouge de phénol a été utilisée pour confirmer l'activité lipolytique des isolats obtenus lors de l'étape d'isolement sur différents substrats lipidiques. Cet indicateur de pH passe du rouge (pH 7.3 - 7.4) au jaune lorsque le pH diminue à (7.0 - 7.1), signalant ainsi la libération d'acides gras libres par la lipolyse bactérienne. Ainsi, en utilisant de l'huile d'olive comme substrat lipidique dans l'agar au rouge de phénol, la présence d'une activité lipolytique pourrait être indiquée par la coloration jaune. Ce test repose sur le principe selon lequel des acides gras libres sont libérés lors de la réaction de lipolyse bactérienne (Lee et al; 2015). Après incubation de 48h, les résultats de ce test sont représentés dans la Figure 21. Seul les isolats S1, S2 et S7 ont montré la présence d'un halo clair jaune autour de la zone ensemencée, indiquant la présence d'une activité lipolytique significative, le reste des isolats ont montré une zone claire qui vire vert le rose suggérant une légère diminution du pH. Cela pourrait indiquer un niveau modéré d'activité lipolytique ou une hydrolyse partielle des lipides (Kumari et al; 2023). A partir de ces résultats les isolats S1 et S2 ont été sélectionnés pour le reste du travail.



**Figure 18.** Activité lipolytique pour les souches (1) et (2), (7) sur gélose à base de rouge de phénol.

*Résultats et discussion*

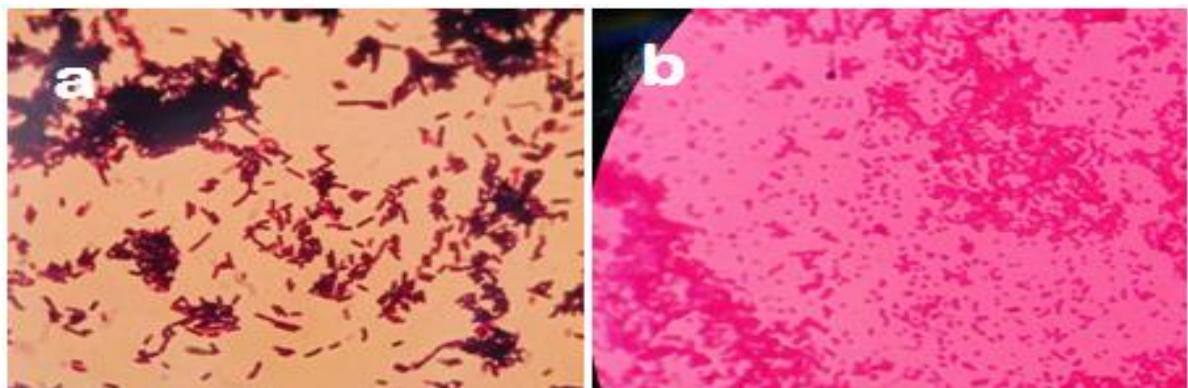
**Tableau 3 :** Résultats du test d'activité lipolytique (14 souche)

N°	Figure	Origine	Dilution	Milieu de culture	Activité enzymatique
S1		Sol	10 <sup>-3</sup>	YPDO	Positive
S2		Eau	10 <sup>-3</sup>	YPDO	Positive
S3		Déchet	10 <sup>-2</sup>	YPDO	Négative
S4		Déchet	10 <sup>-2</sup>	YPDT	Négative
S5		Eau	10 <sup>-3</sup>	YPDT	Négative
S6		Eau	10 <sup>-2</sup>	YPDT	Négative
S7		Déchet	10 <sup>-3</sup>	YPDO	Positive
S8		Eau	10 <sup>-2</sup>	YPDT	Négative
S9		Déchet	10 <sup>-3</sup>	YPDO	Négative
S10		Sol	10 <sup>-2</sup>	YPDO	Négative

S11		Eau	$10^{-2}$	YPDO	Négative
S12		Eau	$10^{-2}$	YPDT	Négative
S13		Sol	$10^{-3}$	YPDT	Négative
S14		Sol	$10^{-2}$	YPDT	Négative

## 1.2. Caractérisation macro et microscopique des isolats S1 et S2

Après une incubation des isolats (1) et (2) sur milieu gélosé GN à 37°C pendant 24 heures, une observation macroscopique a permis de mettre en évidence l'apparition de colonies distinctes, visibles à l'œil nu (Figure 19).



**Figure 19.** Photographies de l'observation microscopique à l'état frais des isolats S1 (a) et S2 (b) (objectif  $\times 100$ (a) et  $\times 40$  (b)) après coloration de Gram.

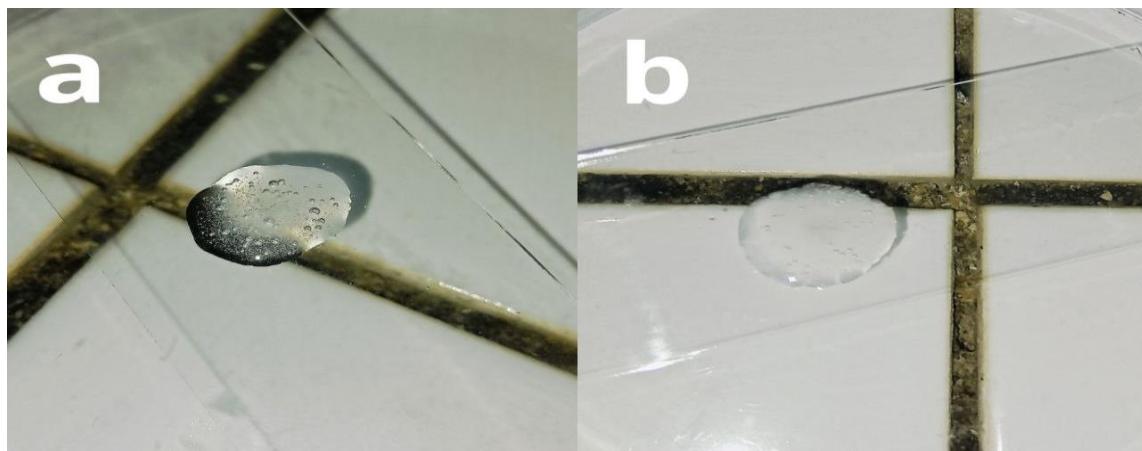
**Tableau 2 :** Aspect morphologique des colonies obtenues sur GN.

Isolat	Taille	Forme	Contour	Aspect	Consistance	Surface	Couleur	Opacité
S1	Moyenne	Ronde	Régulier	Lisse	Crèmeuse	Plate	Beige	Opaque
S2	Petite	Ronde	Régulier	Lisse	Crèmeuse	Plate	Jaunâtre	Opaque

## Résultats et discussion

L'observation microscopique a été réalisée à l'état frais ainsi qu'après la coloration de Gram. Les bactéries qui conservent la couleur primaire et apparaissent violet-brun au microscope sont appelées « bactéries à Gram positif ». Celles qui ne retiennent pas cette coloration et deviennent rouges sous le microscope sont désignées comme « bactéries à Gram négatif ». (Tripathi et al; 2025) ; Cette observation a révélé que l'isolat S1 est un bacille à Gram positif, tandis que l'isolat S2 est une cocciforme à Gram négatif (Figure 20).

Le résultat du test à la catalase pour l'isolat S1 était positif, c'est-à-dire qu'aucune bulle n'est apparue au contact de la souche avec le peroxyde d'hydrogène. Cela confirme et renforce le résultat de la coloration de Gram indiquant que de l'isolat (1) est à Gram positif. En revanche, des bulles sont apparues au contact de l'isolat (2) avec le peroxyde d'hydrogène, ce qui confirme que la souche est à Gram négatif (Figure 20).



**Figure 20.** Test de catalase de l'isolat S1 et S2.

Le résultat du test de mobilité est positif. Cela se manifeste par une turbidité visible et sa diffusion dans tout le tube, ainsi qu'un changement de couleur du milieu (Figure 21). Cela indique que la bactérie est mobile et s'est propagée dans tout le milieu.



**Figure 21.** Test de mobilité après l'incubation.

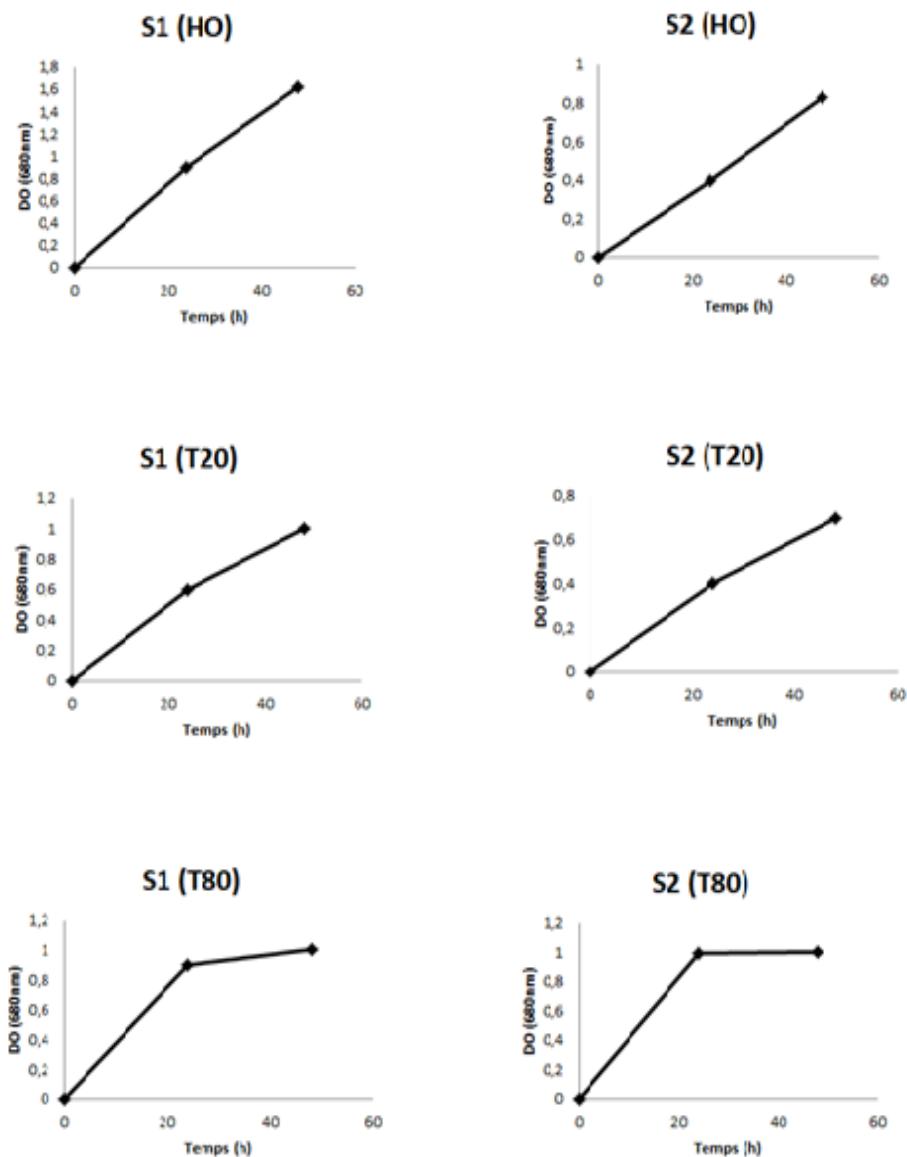
## 2. Suivi de production de lipase par les isolats S1 et S2 sur différents substrats lipidiques

### 2.1. Production de biomasse par S1 et S2

Dans la production de biomasse bactérienne, l'utilisation de substrats lipidiques tels que l'huile d'olive et les tensioactifs comme le Tween 80 et le Tween 20 peut favoriser la prolifération de ces souches. L'huile d'olive constitue une source de carbone essentielle, tandis que les agents tensioactifs facilitent l'émulsification des lipides, augmentant ainsi leur biodisponibilité pour les bactéries, l'objectif de cette étude est d'évaluer la croissance des bactéries lipolytiques dans un milieu contenant ces substrats et d'analyser leur capacité à produire de la biomasse. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques pour l'isolat S1 et S2 (Figure 22). Les données obtenues montrent que, pour S1, la valeur de DO (680 nm) était à 1.6 après 48 heures d'incubation, cette valeur était nettement plus élevée dans le substrat naturel (huile d'olive) par rapport aux substrats synthétiques (Tween 80 et Tween 20). En ce qui concerne le Tween 80, il est supposé que les bactéries ont atteint la phase stationnaire en un temps relativement court (après 20 heures). Dans le cadre de notre étude, nous avons constaté que la valeur de DO était élevée pour S2, avec des valeurs proches de S1 pour le substrat naturel et le Tween 80. En revanche, pour le Tween 20, la valeur était relativement plus faible, s'approchant de

## Résultats et discussion

0.7. Ces résultats indiquent que la production de biomasse était meilleure avec l'isolat S1 par rapport à S2 et démontrent que la quantité de biomasse était supérieure lorsque l'huile d'olive était utilisée comme précurseur pour la production de lipase par rapport à d'autre substrats en présence de bactéries telles que *Pseudomonas*, *Bacillus* (Treichel, de Oliveira, et al; 2010), *Rhodococcus* et *Staphylococcus* (Haba et al; 2000a).



**Figure 22.** La biomasse produite dans chaque milieu de fermentation à différentes temps d'incubation.

## Résultats et discussion

Les résultats obtenus avec l'huile d'olive comme source de carbone dans le cadre de cette étude semblent cohérents avec ceux obtenus par Abouseoud et al; 2010, qui a

De plus, l'efficacité de l'utilisation de l'huile d'olive s'est avérée particulièrement notable en présence de levures telles que *Yarrowia lipolytica* (M. Lopes et al; 2019).

### 2.2. Production de protéines totales par S1 et S2

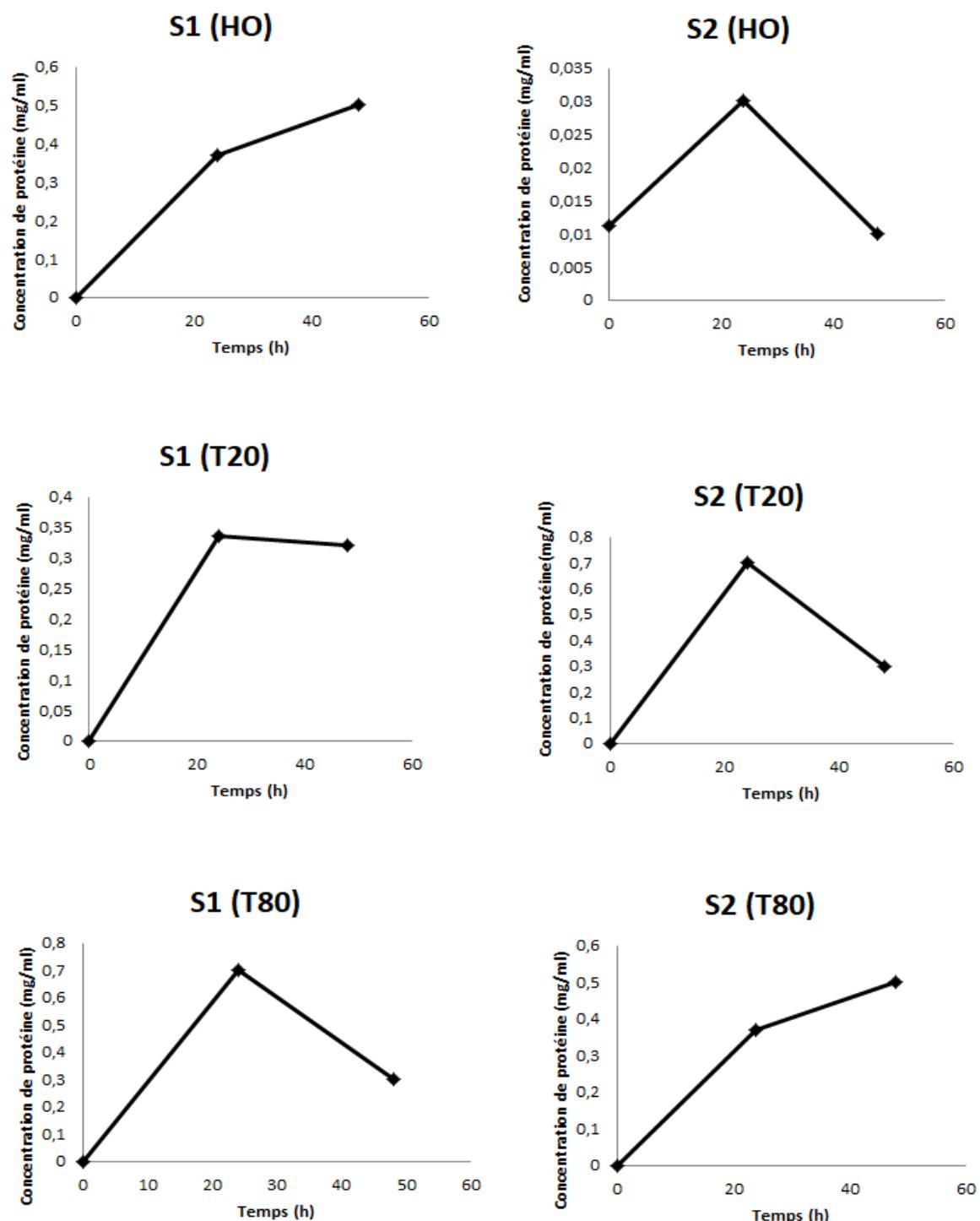
Le suivi de la production des protéines par les deux isolats S1 et S2 est réalisé durant 48 de fermentations sur 3 substrats différents (Figure 23).



**Figure 23.** Fermentation submergée des isolats S1 et S2 sur différents substrats lipidiques.

Le dosage des protéines extracellulaires bactériennes est un moyen efficace utilisé pour confirmer la croissance bactérienne par la quantification des protéines synthétisées par la souche y compris la lipase. Les résultats présentés dans les graphiques de la Figure 24 montrent une augmentation progressive et significative de la concentration des protéines produites pour tous les substrats étudiés. Cette observation met en évidence la relation directe entre l'activité métabolique des bactéries et la production de protéines extracellulaires.

*Résultats et discussion*



**Figure 24.** Concentration de protéines totales produites dans chaque milieu de fermentation à différentes temps d'incubation.

## Résultats et discussion

Ces résultats confirment également que l'isolat S1 possède la capacité de dégrader un substrat lipidique naturel, en l'occurrence l'huile d'olive, en complément des substrats synthétiques utilisés (T20 et T80). Les variations de concentration observées indiquent que la production de protéines extracellulaires est étroitement influencée par la nature du substrat. Les graphiques de la Figure 24 révèlent une concentration élevée des protéines produites sur l'huile d'olive, dépassant les attentes initiales, malgré la présence de composés pouvant être toxiques pour les bactéries, tels que les polyphénols. Les valeurs enregistrées varient entre 0.4 et 0.5 mg/mL. En comparaison, les cultures réalisées sur les substrats synthétiques (T20 et T80) affichent des concentrations de protéines inférieures, avec un maximum de 0.3 mg/mL pour le T20 et 0.4 mg/mL pour le T80. Ces résultats suggèrent une meilleure adaptation métabolique de la souche bactérienne en présence de l'huile d'olive, malgré la présence de composés inhibiteurs. Les résultats obtenus sur des substrats naturels sont bien supérieurs à ceux rapportés par Boskou 2012 et Zullo et *al*; 2018 qui ont remis en question la possibilité d'utiliser une substance naturelle (l'huile d'olive) pour améliorer le taux de fermentation.

Leurs résultats ont montré que l'effet antibactérien des composés phénoliques est étroitement lié à la teneur totale en polyphénols présente dans chaque type d'huile d'olive.

La concentration de protéines produites par l'isolat S2 cultivé sur T80 est également très proche à ceux du S1 cultivé sur HO (0.5 mg/mL). Les résultats de l'isolat S2 cultivé sur HO et T20 ont été exclus de l'analyse en raison de leur manque de fiabilité, attribuable à une anomalie du spectrophotomètre ou un mauvais stockage.

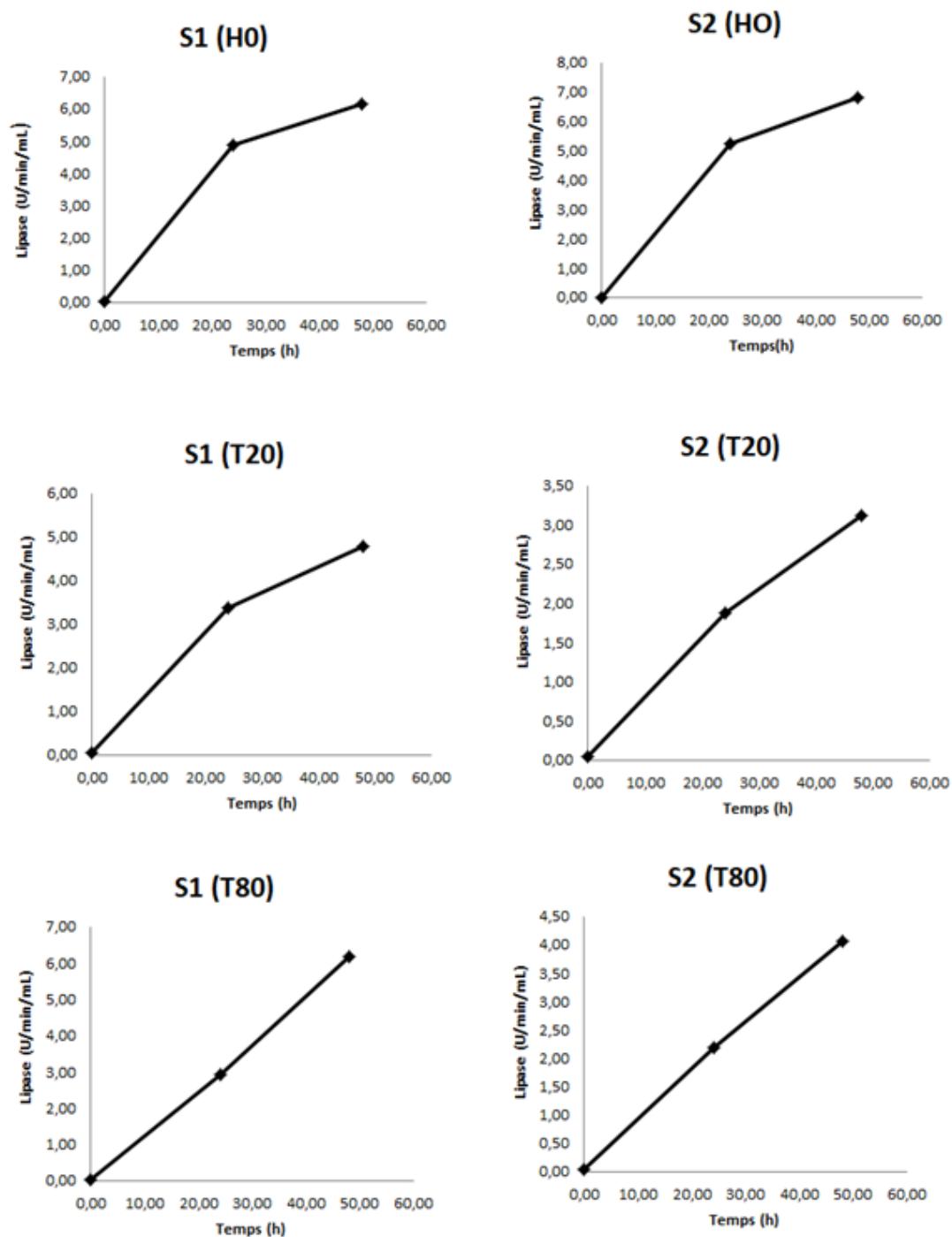
### 2.3. Production d'enzymes lipolytique par l'isolat S1 et S2

Les résultats du suivi de l'activité lipolytique représentés dans la figure, démontrent une grande capacité de dégradation des trois substrats étudiés par les deux souches sélectionnées. Nous avons observé que l'isolat S1 sécrète un bon rendement de lipase, atteignant 6.16 U/min/mL dans le milieu de culture à base d'huile d'olive, bien que celle-ci contienne plusieurs autres composés, tels que les polyphénols, qui peuvent ralentir la croissance bactérienne et ainsi diminuer le taux de lipase produite. Le rendement en lipase obtenu dans le milieu à base de T80 est également de 6.16 U/min/mL, ce qui confirme que ce milieu synthétique est exempt d'impuretés pouvant affecter la souche. En revanche, dans le milieu à base de T20, le rendement est de 4.78 U/min/mL, Pour le deuxième isolat, les courbes montrent que le S2 produit un rendement de lipase dans le milieu à base d'huile d'olive légèrement plus élevé par rapport à S1, atteignant 6.8 U/min/mL (Figure 25). En revanche, les rendements dans les milieux à base de

## *Résultats et discussion*

T20 et T80 étaient plus faible atteignant était 3.12 U/min/mL et 4.06 U/min/mL respectivement. Donc l'ajout d'huile d'olive a considérablement amélioré la synthèse et la sécrétion de lipase par les deux isolats étudiés. Dans une étude similaire sur un type de levure, des résultats positifs ont été trouvés dans un milieu de culture contenant de l'huile d'olive comme précurseur de la production de lipase ; lorsque l'activité enzymatique de la souche *Y. lipolytica* 854/4 était de 1.3 U/mL après 24 heures, a augmenté à 2.5 U/mL après 48 heures, puis a diminué à environ 2.0 U/mL à la fin du processus de fermentation (Sipiczki et al; 2024). Ce résultat indique que S1 et S2 ont la capacité de sécréter l'enzyme lipase avec le même rendement en présence d'un précurseur naturel ou synthétique, À partir de ces résultats et ceux du suivi de la biomasse et la production des protéines, il a été décidé de sélectionner l'isolat S1 pour poursuivre cette étude, en raison du taux élevé de lipase, de biomasse et de protéines qu'elle a produit. Contenant de l'huile d'olive.

## Résultats et discussion



**Figure 25.** Lipase extracellulaire produite dans chaque milieu de fermentation à différents temps d'incubation.

### 3. Identification de l'isolat S1 par la galerie API 50 CH

L'isolat S1 a été testé pour leurs propriétés biochimiques en utilisant la galerie API 50CH (Tableau 2).

## Résultats et discussion

Après 18 - 24 heures de fermentation, on observe un changement de couleur de certaines cupules qui deviennent jaunes, tandis qu'une seule devient noire (Tableau 2). Ces résultats indiquent que l'isolat bactérien (S1) a été capable de dégrader une large gamme de sources de carbones et présente plusieurs activités enzymatiques (Figure 26).



**Figure 26.** La galerie API 50CH après l'incubation.

**Tableau 3 :** Lecture des résultats positive de la galerie API 50 CH.

N°	Test	Substrat	Caractère recherché	Lecture	Résultat(+)
5	RIB	Ribose	Ribokinase,Ribose-5-phosphat isomérase	Directe	Jaune 
11	GLU	D-Glucose	Hexokinase,Glucose-6-phosphate déshydrogénase	Directe	Jaune
12	FRU	D-Fructose	Fructokinase,Fructose-1-phosphate aldolase	Directe	Jaune
15	RHA	Rhamnose	Rhamnoseisomérase, Rhamnulokinase	Directe	Jaune
22	NAG	N-Acétyl-glucosamine	N-acétylglucosamine kinase	Directe	Jaune

## Résultats et discussion

24	ARB	Arbutine	$\beta$ -glucosidase (libérée d'hydroquinone)	Directe	Jaune
25	ESC	Esculine	$\beta$ -glucosidase	Directe	Noire 
28	MAL	Maltose	$\alpha$ -glucosidase (maltase)	Directe	Jaune
31	S1C	Succharose	$\beta$ -fructofuranosidase (invertase)	Directe	Jaune
32	TRE	Tréhalose	Tréhalase	Directe	Jaune
36	AMD	Amidon	Amylase ( $\alpha$ -amylase glucoamylase)	Directe	Jaune
37	GLYC	Glycogène	Glycogène phosphorylase	Directe	Jaune

Nous avons identifié 12 résultats positifs, qui se manifestent par :

**Le ribose** : (D-ribose) est un sucre à 5 carbones (pentose). La réaction positive indique que la bactérie possède les capacités de fermentation ou d'oxydation du ribose en tant que source de carbone, grâce à des enzymes telles que la ribokinase (qui phosphoryle le ribose en ribose-5-phosphate).

**D-Glucose** : Le résultat du test de D-glucose dans la galerie API 50 CH indique une présence de glucose, avec une implication de l'hexokinase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Cette observation est étroitement liée au mécanisme métabolique spécifique de la bactérie testée. Il est à noter que la grande majorité des bactéries sont positives au test de glucose, car le glucose est une source de carbone universelle.

**D-Fructose** : Le résultat du test de D-fructose dans la galerie API 50 CH est positif. Cela indique que la bactérie testée est capable de métaboliser ce sucre, généralement via deux enzymes clés : Fructokinase (phosphoryle le fructose en fructose-1-phosphate,

## Résultats et discussion

F1P) Notre produit phare, la Fructose-1-Phosphate Aldolase, permet de cliver le F1P en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et glycéraldéhyde.

**Rhamnose :** Un test rhamnose positif dans l'API 50 CH indique que la bactérie possède la voie enzymatique complète (rhamnose isomérase + rhamnulokinase) pour utiliser ce sucre.

**N-Acétyl-glucosamine :** Un test positif à la N-Acétylglucosamine (NAG) dans la galerie API 50 CH indique que la bactérie testée est capable de métaboliser ce sucre aminé, généralement grâce à l'enzyme N-acétylglucosamine kinase (NAGK). Cette enzyme joue un rôle clé dans la transformation de la NAG en N-acétylglucosamine-6-phosphate, une molécule essentielle à diverses voies métaboliques, notamment la synthèse de la paroi cellulaire (peptidoglycane) ou la dégradation énergétique.

**Arbutine :** Une analyse de l'arbutine révèle une indication positive, suggérant que la bactérie produit une  $\beta$ -glucosidase active. L'arbutine, un hétéroside naturel, est hydrolysée par la  $\beta$ -glucosidase, ce qui conduit à la libération de deux composés : Le glucose, qui est ensuite métabolisé par la bactérie, entraînant une acidification du milieu. L'hydroquinone, un composé phénolique détectable.

**Esculine :** le résultat obtenu dans ce test montré que la bactérie possède la capacité d'hydrolyser l'Esculine en présence de fer par la sécrétion de l'enzyme de  $\beta$ -glucosidase.

**Maltose :** Est un disccharide composé de deux molécules de glucose donc Le test au maltose s'est révélé positif, indiquant que notre bactérie possède l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase (maltase) nécessaire pour hydrolyser le maltose et libéré les deux glucose lié donc l'obtention des acide dans le milieu.

**Saccharose :** C'est un disccharide de glucose + fructose, le test de saccharose est positif ce qui signifie que bactérie est capable de fermenté le saccharose en produisant des acides par la sécrétion de l'enzyme de  $\beta$ -fructofuranosidase (invertase).

**Tréhalose :** C'est un disaccharide (un sucre formé de deux molécules de glucose) donc le test de tréhalose s'est révélé positif, indiquant que notre bactérie possède l'aptitude à dégrader le tréhalose en glucose grâce à la production de l'enzyme Tréhalase.

## Résultats et discussion

**Amidon** : L'amidon c'est un polysaccharide, le test est positif, ce qui signifie que notre bactérie est capable de dégrader l'amidon en sucre simple grâce à la sécrétion de l'enzyme de Amylase ( $\alpha$ -amylase, glucoamylase).

**Glycogène** : Le test de détection du glycogène est positif, ce qui indique que notre bactérie est capable de libérer du glucose à partir de le polysaccharide le glycogène grâce à la sécrétion de l'enzyme glycogène phosphorylase.

Après avoir réalisé le test Galerie API 50 CH et selon les résultats obtenus, nous avons comparé ces résultats avec le tableau fourni par la société bioMérieux, afin de faciliter l'identification du type de bactérie étudiée. Il s'est avéré que la bactérie étudiée est appelée *Bacillus cereus* 2.

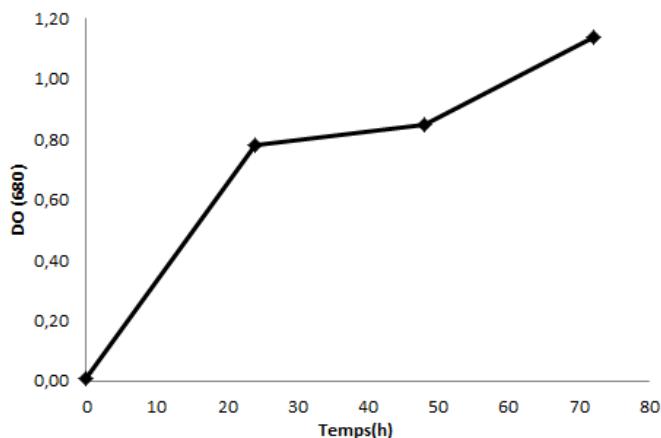
## 4. Production de lipase par *Bacillus cereus* 2 sur huile de friture

### 4.1. Production de biomasse

La production de lipase par la souche de *Bacillus cereus* 2 a été examinée par fermentation submergée en utilisant l'huile de friture usagée comme substrat lipidique alternatif. Après 72 heures d'incubation, un changement notable de la couleur du milieu a été observé, indiquant que ce substrat a favorisé l'augmentation de la densité et de la prolifération cellulaire, Les graphiques obtenus dans la Figure 27, montrent que la valeur de la DO (à 680 nm) augmente progressivement et significativement avec le temps (24, 48 et 72 heures) jusqu'à atteindre un pic à 1.2.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Wadekar et al; 2012), qui ont montré que la quantité de biomasse était relativement bonne avec une valeur estimée de  $(0.74 \pm 0.02)$  en utilisant huile de friture usagée comme substrat de fermentations de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) ; nos résultats présentent aussi une grande similitude avec ceux obtenus par Valenzuela-Ávila et al. 2020 d'une valeur estimée à  $1.0 \pm 1.5$  et ce lors de l'utilisation de l'huile de friture usagée comme matière première pour la production de lipase en présence de bactéries telles que *Bacillus subtilis* A6, B5 et DSM 3256.

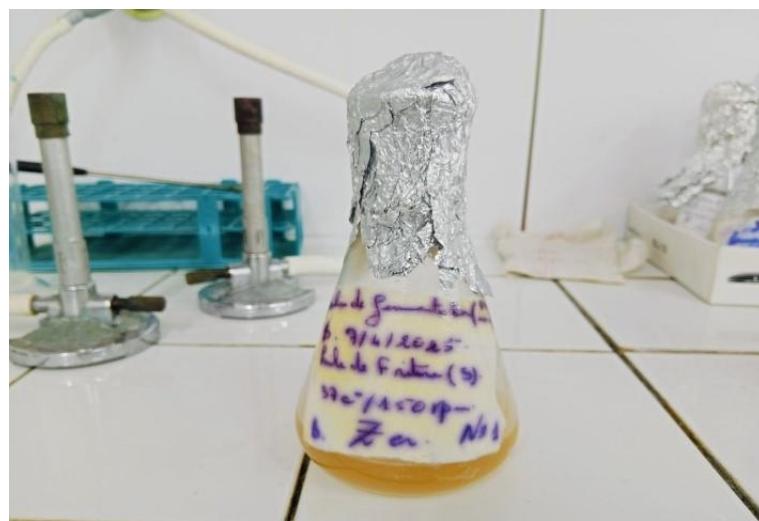
## Résultats et discussion



**Figure 27.** La biomasse produite dans un milieu de fermentation à différentes temps d'incubation.

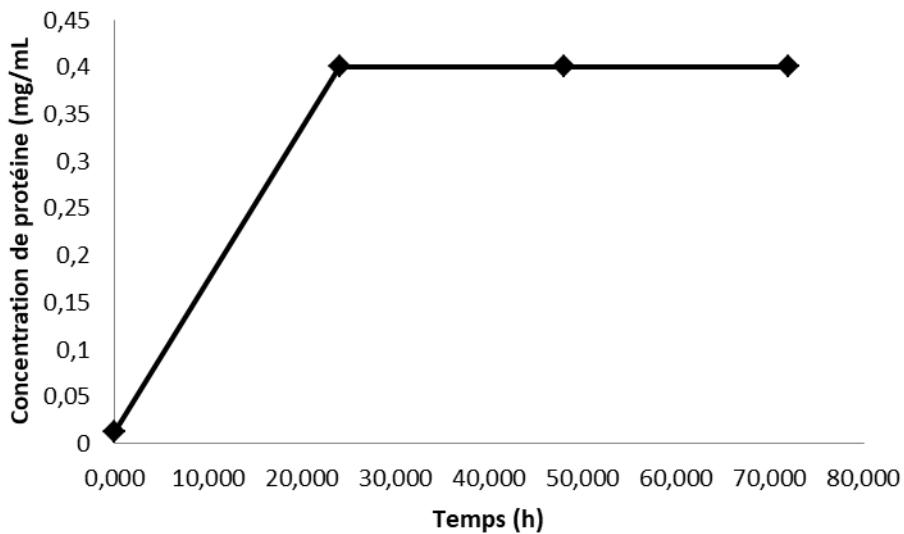
### 4.2. Production de protéines totales

Un suivi de la production de protéines a été effectué sur la souche pendant une période de 72 heures de fermentation sur le substrat sélectionné (huile de friture) (Figure 28).



**Figure 28.** Milieu de fermentation qui contient l'huile de friture comme un substrat.

Le dosage du rapport protéique est un moyen performant pour valider la croissance bactérienne. Il permet de quantifier les protéines synthétisées par la souche *Bacillus cereus* 2 y compris la lipase. Les résultats illustrés dans le graphique (Figure 29) révèlent une hausse graduelle de la concentration de protéines produites lors de l'utilisation d'un substrat alternatif. Cette observation met en évidence la relation directe entre l'activité métabolique des bactéries et la production de protéines extracellulaires.



**Figure 29.** Concentration de protéines totales produites dans un milieu de fermentation à différentes temps d'incubation Souche 1 (huile de friture).

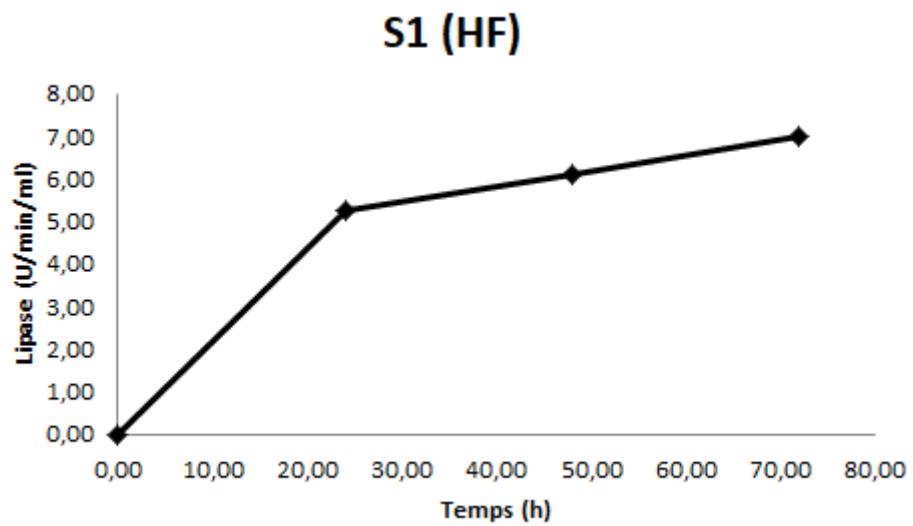
Ces résultats confirment également que la souche bactérienne a la capacité de dégrader l'huile de friture, qui est considérée comme un substrat végétal alternatif. Tous les résultats ont été rassemblés dans un graphique (Figure 29), qui indique une augmentation significative de la concentration des protéines produites au début, puis une légère diminution jusqu'à 0.4 mg/mL. Ces résultats obtenus lors de l'utilisation de l'huile de friture sont très cohérents avec ceux obtenus lors de la production du biodiesel en utilisant Biodiesel. Comme substrat en présence de *Pseudomonas aeruginosa* (Raoufi et Mousavi Gargari 2018). Cependant, lorsque ces résultats sont comparés à ceux obtenus par (Altinok et al; 2023), ils sont significativement plus bas avec des bactéries du type *Anoxybacillus gonensis* UF7 puisque sa valeur était 1 mg/mL.

#### 4. Production de lipase par *Bacillus cereus* 2

Les résultats obtenus pour le dosage de biomasse et les protéines expliquent et justifient les résultats obtenus pour la lipase, car une augmentation de la biomasse est accompagnée d'une augmentation de la concentration de protéines, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de lipase sécrétée par *Bacillus cereus* 2 (Figure 30). Cette valeur retrouvée à 7 U/min/mL, est peu mieux que les résultats obtenus dans plusieurs études, tel que l'étude de Baltaci et al. 2019, visant à produire de la lipase à partir de plusieurs souches bactériennes en

## Résultats et discussion

utilisant l'huile de friture usagée comme substrat ; parmi les quatre souches bactériennes testées, *Bacillus licheniformis* A7 s'est révélée être la meilleure productrice de lipase dans les conditions optimales de culture, avec une activité lipasique de seulement 1.607 U/mL, et l'étude de Haba et al. 2000b portant sur plusieurs bactéries, dont il a été trouvé que ; Parmi les 47 souches examinées, les genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* et *Staphylococcus* ont montré une capacité de croissance sur plusieurs huiles usagées y compris l'huile de friture et une activité lipolytique de 2.748 U/mL pour *Pseudomonas* sp. 3AT et 1.7038 U/mL pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 111. Ces études ainsi que plusieurs d'autres montrent l'efficacité de l'utilisation de l'huile de friture comme inducteur de production de biomasse et de lipase ; Étant donné qu'elles sont largement disponibles dans le monde, l'augmentation de la demande en aliments frits a entraîné la production de grandes quantités d'huiles de friture usagées. Kock et al. Ont rapporté que ces huiles contenaient plus de 30% de composés polaires issus de la dégradation oxydative des triglycérides. Ces huiles peuvent être considérées comme une source alimentaire à haute valeur énergétique, jusqu'à présent utilisée pour l'alimentation animale, mais elles pourraient également être envisagées comme une source de carbone pour la croissance microbienne et la transformation en produits à haute valeur ajoutée (Haba et al. 2000b).



**Figure 30.** Lipase extracellulaire produite dans un milieu de fermentation à base de l'huile de friture à différents temps d'incubation.

## **5. Purification partielle de lipase**

Après la précipitation de protéines au sulfate d'ammonium (de 20 à 90%), des dosages de l'activité lipolytique ont été réalisés sur les culots protéiques récupérés. La meilleure activité enzymatique a été obtenue avec un pourcentage saturation se situant entre 70 et 90% avec 5.48 U/min/mL. Ce résultat est relativement proche du résultat obtenu dans l'étude de Iftikhar et al. s. d., lorsqu'ils ont trouvé que la meilleure activité lipolytique a été obtenue avec un pourcentage de saturation de sulfate d'ammonium de 80% (13.14 U/mL), donc ce résultat confirme et justifie notre résultat.

## **6. Résultat de test d'application**

Après une incubation de 10 minutes, nous avons constaté que la tache de beurre sur le morceau de tissu immergé dans le bécher n°1, qui contenait de l'eau du robinet, était restée visible et ne s'était pas effacée. En revanche, dans le bécher n°2, qui contenait l'extrait enzymatique avec de l'eau, la tache avait complètement disparu. Dans le bécher n°3, contenant le détergent avec de l'eau, la tache avait également disparu. Enfin, dans le bécher n°4, qui contenait le détergent chauffé avec l'extrait enzymatique et de l'eau, la tache avait aussi disparu du tissu (Figure 31).

Ces résultats ont démontré l'efficacité de l'extrait enzymatique que nous avions obtenu dans cette étude, car il avait montré la même efficacité que le détergent enzymatique utilisé, lequel contenait pourtant d'autres substances auxiliaires. Contrairement à ce dernier, l'extrait enzymatique que nous avions obtenu était partiellement purifié et ne contenait aucun additif auxiliaire.

*Résultats et discussion*



**Figure 31.** Résultats du test d'application.

# Conclusion

## Conclusion

L'intégration des microorganismes dans les industries technologiques modernes constitue un enjeu stratégique qui suscite l'intérêt de multiples secteurs industriels. Cette démarche innovante permet la conversion enzymatique de résidus naturels pour la production d'une gamme diversifiée de produits biosynthétiques à haute valeur ajoutée, au bénéfice des industries. Ces études se concentrent principalement sur la dégradation des résidus naturels à l'aide d'enzymes d'origine microbienne, sans l'utilisation de traitements chimiques, dans le but de produire des produits biologiques à la fois plus rentables et ayant un impact environnemental réduit.

Cette étude avait pour objectif la sélection d'une souche bactérienne productrice de lipase à partir de trois échantillons prélevés dans une huilerie. Par la suite, la capacité de cette souche à produire de la lipase a été étudiée par fermentation bactérienne en milieu liquide. Les trois échantillons sont d'abord soumis à un criblage sur milieu solide contenant de l'huile d'olive et du Tween 80, puis la capacité des 14 isolats obtenus à produire de la lipase est confirmée ultérieurement par un test d'activité enzymatique utilisant le rouge de phénol. Les résultats ont révélé la présence de trois isolats producteurs de lipase (S1, S2, S7). Deux isolats (S1, S2) ont été sélectionnés et soumis à un processus de fermentation bactérienne submergé en utilisant trois substrats (Tween 20, Tween 80, l'huile d'olive) afin de tester leur capacité à dégrader ces substrats. Trois paramètres (biomasse, protéine totaux, lipase) ont ensuite été étudiés pour chaque isolat selon chaque substrat utilisé. Les résultats, après 48 heures d'incubation à 37 °C et 150 rpm, ont montré que la production de biomasse de l'isolat S1 était respectivement la suivante (1, 0.7, 1.62), la valeur des protéines produites est estimée à (0.3 mg/mL, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/mL), et la valeur de lipase produit est estimé à (4.78 U/min/mL, 6.16 U/min/mL et 6.16 U/min/mL). Et de isolat S2 la valeur de biomasse (0.7, 1 et 0.83), la protéine (0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml et 0.01 mg/ml) et la lipase (3.12 U/min/mL, 4.06 U/min/mL et 6.8 U/min/mL). La poursuite de l'étude a été réalisée avec le premier isolat S1 en raison des bons résultats obtenus précédemment. Elle a été soumise à plusieurs tests afin d'identifier le genre de l'isolat, qui est *Bacillus cereus* 2. Par la suite, la production de lipase a été réalisée à l'aide de cette souche *Bacillus cereus* 2 en utilisant de l'huile de friture, par un processus de fermentation bactérienne submergé à une température de 37°C et à 150 rpm pendant 72 heures.

## Conclusion

Les trois paramètres ont été étudiés (biomasse, protéine et lipase), et les résultats ont été observés respectivement (1.2, 0.45 mg/mL et 7 U/min/mL). Une purification partielle de la lipase a été réalisée ultérieurement en utilisant la méthode de *salting out* à l'aide du sulfate d'ammonium. Les résultats des dosages effectués à différentes concentrations de sel ont montré que la meilleure précipitation de protéines, ainsi que la plus forte présence de la lipase, ont été obtenues à 90% de saturation en sulfate d'ammonium, correspondant à l'ajout de 4.01 g. La lipase obtenue et sécrétée par la bactérie a été testée et comparée à un produit commercial contenant de la lipase. Les résultats obtenus dans ce travail sont d'une grande importance, car la souche isolée *Bacillus cereus* 2 à travers de nombreuses expériences représente un candidat prometteur pour la production de lipase bactérienne en utilisant des substrats disponibles et à faible coût. De plus, elle contribue à la protection de l'environnement en éliminant les déchets gras nuisibles.

Certaines observations et résultats enregistrés peuvent représenter un point de départ pour des recherches plus approfondies et précises dans ce domaine, notamment :

- ❖ L'optimisation des facteurs de production de l'enzyme et la détermination des conditions optimales.
- ❖ Étude de la deuxième souche obtenue, compte tenu des résultats prometteurs obtenus dans ce travail.
- ❖ Recherche d'un autre substrat pour la production de la lipase, qui soit disponible, moins coûteux et bénéfique pour l'environnement.

# Références bibliographique

## Références bibliographiques

- « 2.3: Lipids ». 2021. *Biology LibreTexts*.  
[https://bio.libretexts.org/Courses/Sacramento\\_City\\_College/BIOL\\_440%3A\\_General\\_Microbiology\\_\(Hughes\)/02%3A\\_Week\\_2/02%3A\\_Microbial\\_Biochemistry/2.03%3A\\_Lipids](https://bio.libretexts.org/Courses/Sacramento_City_College/BIOL_440%3A_General_Microbiology_(Hughes)/02%3A_Week_2/02%3A_Microbial_Biochemistry/2.03%3A_Lipids) (13 février 2025).
- Abouseoud, Mahmoud, Aziza Yataghene, Abdeltif Amrane, et Rachida Maachi. 2010. « Production of a biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* - Solubilizing and wetting capacity ». *Chemical Engineering Transactions* 20: 291-96.
- Altinok, Fatma, Seyda Albayrak, Nazli Pinar Arslan, Mesut Taskin, Esra Aygun, Melda Sisecioglu, et Ahmet Adiguzel. 2023. « Application of *Anoxybacillus gonensis* UF7 lipase as a catalyst for biodiesel production from waste frying oils ». *Fuel* 334: 126672.  
doi:10.1016/j.fuel.2022.126672.
- Anand, O. N., et V. K. Chhibber. 2006. « Vegetable Oil Derivatives: Environment-Friendly Lubricants and Fuels ». *Journal of Synthetic Lubrication* 23(2): 91-107. doi:10.1002/jsl.14.
- Baltaci, Mustafa Özkan, Elanur Tuysuz, Hakan Ozkan, Mesut Taskin, et Ahmet Adiguzel. 2019. « Lipase Production from Thermophilic Bacteria Using Waste Frying Oil as Substrate ». *Teknik Bilimler Dergisi*. doi:10.35354/tbed.510140.
- Barret, Roland. 2021. *Chimie des médicaments des pathologies cardiovasculaires*. ISTE Group.
- Barros, M., L. F. Fleuri, et G. A. Macedo. 2010. « Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - a Review ». *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 27: 15-29.  
doi:<https://doi.org/10.1590/S0104-66322010000100002>.
- Bharathi, Devaraj, et G. Rajalakshmi. 2019. « Microbial lipases: An overview of screening, production and purification ». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22: 101368.  
doi:10.1016/j.bcab.2019.101368.
- Boskou, Dimitrios. 2012. *Olive Oil: Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. BoD – Books on Demand.
- Branger, Alain. 2007. *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions.
- Carpana, E., L. Marocchi, et L. Gelmini. 1995. « Evaluation of the API 50CHB System for the Identification and Biochemical Characterization of *Bacillus Larvae* ». *Apidologie* 26(1): 11-16. doi:10.1051/apido:19950102.
- Cattoir, Vincent, François Denis, Christian Martin, et Marie-Cécile Ploy. 2016. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences.
- Chahiniana, H., et L. Sarda. 2009. « Distinction Between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases ». *Protein & Peptide Letters* 16(10): 1149-61. doi:10.2174/092986609789071333.
- Chandra, Prem, Enespa, Ranjan Singh, et Pankaj Kumar Arora. 2020a. « Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review ». *Microbial Cell Factories* 19(1): 169.  
doi:10.1186/s12934-020-01428-8.
- Chandra, Prem, Enespa, Ranjan Singh, et Pankaj Kumar Arora. 2020b. « Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review ». *Microbial Cell Factories* 19(1): 169.  
doi:10.1186/s12934-020-01428-8.

## Référence bibliographique

- Chioke, Onyinyechukwu J., Christiana N. Ogbonna, Chukwudi Onwusi, et James C. Ogbonna. 2018. « Lipase in Biodiesel Production ». *African Journal of Biochemistry Research* 12(8): 73-85. doi:10.5897/AJBR2018.0999.
- Christie, W. W. 1984. « The Chemistry and Biochemistry of Simple and Complex Lipids ». *Natural Product Reports* 1(5): 499-511. doi:10.1039/NP9840100499.
- Cifelli, Jessica L., Tim S. Chung, Haiyan Liu, Panchika Prangkio, Michael Mayer, et Jerry Yang. 2016. « Benzothiazole Amphiphiles Ameliorate Amyloid  $\beta$ -Related Cell Toxicity and Oxidative Stress ». *ACS Chemical Neuroscience* 7(6): 682-88. doi:10.1021/acschemneuro.6b00085.
- Cirne, D.G., X. Paloumet, L. Björnsson, M.M. Alves, et B. Mattiasson. 2007. « Anaerobic Digestion of Lipid-Rich Waste—Effects of Lipid Concentration ». *Renewable Energy* 32(6): 965-75. doi:10.1016/j.renene.2006.04.003.
- Cygler, Miroslaw, et Joseph D Schrag. 1999. « Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1441(2): 205-14. doi:10.1016/S1388-1981(99)00152-3.
- Dab, Ahlem. 2023a. « Criblage, identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel ». phdthesis. Université Claude Bernard - Lyon I ; Université de Sfax (Tunisie). <https://theses.hal.science/tel-04703661> (25 mai 2025).
- Dab, Ahlem. 2023b. « Criblage, identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel ». These de doctorat. Lyon 1. <https://theses.fr/2023LYO10180> (29 mai 2025).
- Dab, Ahlem. 2023c. « Criblage, identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel ». phdthesis. Université Claude Bernard - Lyon I ; Université de Sfax (Tunisie). <https://theses.hal.science/tel-04703661> (7 avril 2025).
- Duong-Ly, Krisna C., et Sandra B. Gabelli. 2014. « Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation ». In *Methods in Enzymology*, Elsevier, 85-94. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- Ernst, Orna, et Tsaffrir Zor. 2010. « Linearization of the Bradford Protein Assay ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (38): 1918. doi:10.3791/1918.
- Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, et Shankar Subramaniam. 2011a. « Lipid classification, structures and tools ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811(11): 637-47. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009.
- Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, et Shankar Subramaniam. 2011b. « Lipid classification, structures and tools ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811(11): 637-47. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009.
- Fahy, Eoin, Shankar Subramaniam, H. Alex Brown, Christopher K. Glass, Alfred H. Merrill, Robert C. Murphy, Christian R. H. Raetz, et al. 2005. « A Comprehensive Classification System for Lipids1 ». *Journal of Lipid Research* 46(5): 839-61. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200.

## Référence bibliographique

- Fashogbon, Racheal Oluwayemisi, Bose Adebayo, Victoria Musa, et Titilayo Femi-Ola. 2021. « Lipolytic Activities of Bacteria and Fungi Isolated from Soil Samples ». *Microbiology Research Journal International*: 27-43. doi:10.9734/mrji/2021/v31i530318.
- Felizardo, Pedro, M. Joana Neiva Correia, Idalina Raposo, João F. Mendes, Rui Berkemeier, et João Moura Bordado. 2006. « Production of biodiesel from waste frying oils ». *Waste Management* 26(5): 487-94. doi:10.1016/j.wasman.2005.02.025.
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008a. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12(2). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/40544> (10 février 2025).
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008b. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12(2). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/40544> (25 mai 2025).
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008c. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2307> (13 juin 2025).
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008d. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12(2). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/40544> (25 mai 2025).
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008e. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12(2). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/40544> (2 février 2025).
- Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008f. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12(2). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/40544> (14 juin 2025).
- Filho, Danielle Gonçalves, Amanda Gonçalves Silva, et Carla Zanella Guidini. 2019a. « Lipases: Sources, Immobilization Methods, and Industrial Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(18): 7399-7423. doi:10.1007/s00253-019-10027-6.
- Filho, Danielle Gonçalves, Amanda Gonçalves Silva, et Carla Zanella Guidini. 2019b. « Lipases: Sources, Immobilization Methods, and Industrial Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(18): 7399-7423. doi:10.1007/s00253-019-10027-6.
- Filho, Sérgio Thode, Julieta Laudelina de Paiva, Heider Alves Franco, Daniel Vidal Perez, et Monica Regina da Costa Marques. 2017. « Environmental Impacts Caused by Residual Vegetable Oil in the Soil-Plant System ». *Ciência e Natura* 39(3): 748-57.
- Fumex, Maud. 2019. « Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives ». other. Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297917> (7 avril 2025).

## Référence bibliographique

- Furini, Graciane, Jussara S. Berger, José A.M. Campos, Sueli T. Van Der Sand, et José C. Germani. 2018. « Production of Lipolytic Enzymes by Bacteria Isolated from Biological Effluent Treatment Systems ». *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(3): 2955-65. doi:10.1590/0001-3765201820170952.
- Girard-Pipau, F., C. J. Soussy, et J. Duval. 1995. « Incidence de *Clostridium difficile* dans un hôpital de court séjour : amélioration de sa technique d'identification biochimique ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 25(2): 133-39. doi:10.1016/S0399-077X(05)80757-7.
- Gupta, R., N. Gupta, et P. Rathi. 2004. « Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6): 763-81. doi:10.1007/s00253-004-1568-8.
- Gürkök, Sumeyra. 2019. « Microbial Enzymes in Detergents: A Review ». 10(9).
- Haba, E, O Bresco, C Ferrer, A Marqués, M Busquets, et A Manresa. 2000a. « Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate ». *Enzyme and Microbial Technology* 26(1): 40-44. doi:10.1016/S0141-0229(99)00125-8.
- Haba, E, O Bresco, C Ferrer, A Marqués, M Busquets, et A Manresa. 2000b. « Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate ». *Enzyme and Microbial Technology* 26(1): 40-44. doi:10.1016/S0141-0229(99)00125-8.
- Hadwan, Mahmoud Hussein, Marwah Jaber Hussein, Rawa M Mohammed, Asad M Hadwan, Hawraa Saad Al-Kawaz, Saba S M Al-Obaidy, et Zainab Abbas Al Talebi. 2024. « An improved method for measuring catalase activity in biological samples ». *Biology Methods and Protocols* 9(1): bpa015. doi:10.1093/biomet/bpa015.
- Haq, Abdul, Sana Adeel, Alam Khan, Qurrat ul ain Rana, Muhammad Adil Nawaz Khan, Muhammad Rafiq, Muhammad Ishfaq, et al. 2020. « Screening of Lipase-Producing Bacteria and Optimization of Lipase-Mediated Biodiesel Production from Jatropha Curcas Seed Oil Using Whole Cell Approach ». *BioEnergy Research* 13(4): 1280-96. doi:10.1007/s12155-020-10156-1.
- Hasan, F., A. A. Shah, S. Javed, et A. Hameed. 2010. « Enzymes Used in Detergents: Lipases ». *African Journal of Biotechnology* 9(31): 4836-44. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92032> (21 mai 2025).
- Hasan, Fariha, Aamer Ali Shah, et Abdul Hameed. 2006. « Industrial applications of microbial lipases ». *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 235-51. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- Holmquist, M. 2000. « Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms ». *Current Protein & Peptide Science* 1(2): 209-35. doi:10.2174/1389203003381405.
- Iftikhar, Tehreema, Mubashir Niaz, Rukhsana Jabeen, et Ikram Ul Haq. « PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR LIPASES ».
- Inan Bektas, Kadriye, Aleyna Nalcaoğlu, Esma Ceylan, Disat Nigar Colak, Pinar Caglar, Sevda Agirman, Nur Sena Sivri, et al. 2023. « Isolation and characterization of detergent-compatible amylase-, protease-, lipase-, and cellulase-producing bacteria ». *Brazilian Journal of Microbiology* 54(2): 725-37. doi:10.1007/s42770-023-00944-0.

## Référence bibliographique

- Jensen, Robert G., Felice A. DeJong, et Richard M. Clark. 1983. « Determination of Lipase Specificity ». *Lipids* 18(3): 239-52. doi:10.1007/BF02534556.
- Joffin, Christiane, et Jean-Noël Joffin. 2025. *Dictionnaire des techniques de Microbiologie / Nouvelle édition actualisée*. BoD - Books on Demand.
- Krohn, Randall I. 2011. « The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein ». *Current Protocols in Cell Biology* 52(1): A.3H.1-A.3H.28. doi:10.1002/0471143030.cba03hs52.
- Kruger, Nicholas J. 2002a. « The Bradford Method for Protein Quantitation ». In *The Protein Protocols Handbook*, éd. John M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press, 15-21. doi:10.1385/1-59259-169-8:15.
- Kruger, Nicholas J. 2002b. « The Bradford Method for Protein Quantitation ». In *The Protein Protocols Handbook*, éd. John M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press, 15-21. doi:10.1385/1-59259-169-8:15.
- Kühn, I., A. Brauner, et R. Möllby. 1990. « Evaluation of Numerical Typing Systems For ». *Epidemiology & Infection* 105(3): 521-31. doi:10.1017/S0950268800048147.
- Kumari, Alka, Kanti N. Mihooliya, Debendra K. Sahoo, Mani S. Bhattacharyya, Gandham S. Prasad, et Anil Kumar Pinnaka. 2023. « Description of Lipase Producing Novel Yeast Species Debaryomyces Apis f.a., Sp. Nov. and a Modified pH Indicator Dye-Based Method for the Screening of Lipase Producing Microorganisms ». *Scientific Reports* 13(1): 1-12. doi:10.1038/s41598-023-38241-3.
- Lee, Li Pin, Hudzaifah Mohamed Karbul, Marimuthu Citartan, Subash C. B. Gopinath, Thangavel Lakshmipriya, et Thean-Hock Tang. 2015. « Lipase-Secreting Bacillus Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution ». *BioMed Research International* 2015(1): 820575. doi:10.1155/2015/820575.
- Li-Beisson, Yonghua, Yuki Nakamura, et John Harwood. 2016. « Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications ». *Sub-Cellular Biochemistry* 86: 1-18. doi:10.1007/978-3-319-25979-6\_1.
- Liu, Zong, Jorge Santini Gonzalez, Hui Wang, Sundaram Gunasekaran, et Troy Runge. 2015. « Dairy Manure Protein Analysis Using UV-Vis Based on the Bradford Method ». *Analytical Methods* 7(6): 2645-52. doi:10.1039/C4AY03006K.
- Lopes, Danielle Branta, Laira Priscila Fraga, Luciana Francisco Fleuri, et Gabriela Alves Macedo. 2011. « Lipase and Esterase: To What Extent Can This Classification Be Applied Accurately? » *Food Science and Technology* 31: 603-13. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300009>.
- Lopes, Marlene, Sílvia M. Miranda, Joana M. Alves, Ana S. Pereira, et Isabel Belo. 2019. « Waste Cooking Oils as Feedstock for Lipase and Lipid-Rich Biomass Production ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 121(1): 1800188. doi:10.1002/ejlt.201800188.
- Mala, John Geraldine Sandana, et Satoru Takeuchi. 2008. « Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview ». *Analytical Chemistry Insights* 3: ACI.S551. doi:10.4137/ACI.S551.

## Référence bibliographique

- Moussavou Mounguengui, Rédéo Wilfried, Christel Brunschwig, Bruno Baréa, Pierre Villeneuve, et Joël Blin. 2013. « Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? » *Progress in Energy and Combustion Science* 39(5): 441-56. doi:10.1016/j.pecs.2013.05.003.
- Muro, Eleonora, G. Ekin Atilla-Gokcumen, et Ulrike S. Eggert. 2014. « Lipids in cell biology: how can we understand them better? » *Molecular Biology of the Cell* 25(12): 1819-23. doi:10.1091/mbc.e13-09-0516.
- Nigatu, Ayele, Siv Ahrné, et Göran Molin. 2000. « Temperature-Dependent Variation in API 50 CH Fermentation Profiles of Lactobacillus Species ». *Current Microbiology* 41(1): 21-26. doi:10.1007/s002840010085.
- Otieno, Anthony C., et Simon M. Mwongela. 2008. « Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids—A review ». *Analytica Chimica Acta* 624(2): 163-74. doi:10.1016/j.aca.2008.06.026.
- Pandey, Ashok, Sailas Benjamin, Carlos R. Soccol, Poonam Nigam, Nadia Krieger, et Vanete T. Soccol. 1999. « The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology ». *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29(2): 119-31. doi:10.1111/j.1470-8744.1999.tb00541.x.
- Pham, Van Hong Thi, Jaisoo Kim, Soonwoong Chang, et Woojin Chung. 2021. « Investigation of Lipolytic-Secreting Bacteria from an Artificially Polluted Soil Using a Modified Culture Method and Optimization of Their Lipase Production ». *Microorganisms* 9(12): 2590. doi:10.3390/microorganisms9122590.
- Pohanka, Miroslav. 2019. « Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review ». *Molecules* 24(3): 616. doi:10.3390/molecules24030616.
- Purkan, Purkan, Indah Tri Lestari, Rizky Arissirajudin, Retno Rahayu Puspita Ningsih, Wiwin Apriyani, Hamidah Nurlaila, Sri Sumarsih, et al. 2020a. « ISOLATION OF LIPOLYTIC BACTERIA FROM DOMESTIC WASTE COMPOST AND ITS APPLICATION TO BIODIESEL PRODUCTION ». *Rasayan Journal of Chemistry* 13(04): 2074-84. doi:10.31788/RJC.2020.1345697.
- Purkan, Purkan, Indah Tri Lestari, Rizky Arissirajudin, Retno Rahayu Puspita Ningsih, Wiwin Apriyani, Hamidah Nurlaila, Sri Sumarsih, et al. 2020b. « ISOLATION OF LIPOLYTIC BACTERIA FROM DOMESTIC WASTE COMPOST AND ITS APPLICATION TO BIODIESEL PRODUCTION ». *Rasayan Journal of Chemistry* 13(04): 2074-84. doi:10.31788/RJC.2020.1345697.
- Rafiq, M., Y. Z. Lv, Y. Zhou, K. B. Ma, W. Wang, C. R. Li, et Q. Wang. 2015. « Use of vegetable oils as transformer oils – a review ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52: 308-24. doi:10.1016/j.rser.2015.07.032.
- Raoufi, Zeinab, et Seyed Latif Mousavi Gargari. 2018. « Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface ». *Biochemical Engineering Journal* 140: 1-8. doi:10.1016/j.bej.2018.09.008.
- Riseh, Roohallah Saberi, Masoumeh Vatankhah, Mohadeseh Hassanisaadi, et Essaid Ait Barka. 2024. « Unveiling the Role of Hydrolytic Enzymes from Soil Biocontrol Bacteria in Sustainable Phytopathogen Management ». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 29(3): 105. doi:10.31083/j.fbl2903105.

## Référence bibliographique

- Rogalska, Ewa. 1995. « Enzymes lipolytiques et lipolyse Les lipases : cinétiques, spécificités et aspects structuraux ». *Les lipases : cinétiques, spécificités et aspects structuraux*. [https://www.academia.edu/45137273/E\\_nzymes\\_lipolytiques\\_et\\_lipolyse\\_Les\\_lipases\\_cinetiques\\_specifiques\\_et\\_aspects\\_structuraux](https://www.academia.edu/45137273/E_nzymes_lipolytiques_et_lipolyse_Les_lipases_cinetiques_specifiques_et_aspects_structuraux) (13 février 2025).
- Rogalska, Ewa, Claire Cudrey, Francine Ferrato, et Robert Verger. 1993. « Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases ». *Chirality* 5(1): 24-30. doi:10.1002/chir.530050106.
- Rouillard, Hervé. 2012. « Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde ». phdthesis. Université de La Rochelle. <https://theses.hal.science/tel-00815983> (15 mai 2025).
- Salam, Darine A., Makram T. Suidan, et Albert D. Venosa. 2016. « Biodegradation and toxicity of vegetable oils in contaminated aquatic environments: Effect of antioxidants and oil composition ». *Science of The Total Environment* 547: 95-103. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.138.
- Salihu, Aliyu, Md. Zahangir Alam, M. Ismail AbdulKarim, et Hamzah M. Salleh. 2012. « Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues ». *Resources, Conservation and Recycling* 58: 36-44. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.007.
- Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, et C. Sumana. 2018a. « Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases ». *Biotechnology Progress* 34(1): 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, et C. Sumana. 2018b. « Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases ». *Biotechnology Progress* 34(1): 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, et C. Sumana. 2018c. « Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases ». *Biotechnology Progress* 34(1): 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, et C. Sumana. 2018d. « Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases ». *Biotechnology Progress* 34(1): 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, et C. Sumana. 2018e. « Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases ». *Biotechnology Progress* 34(1): 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Sharmin, Eram, Fahmina Zafar, Deewan Akram, Manawwer Alam, et Sharif Ahmad. 2015. « Recent advances in vegetable oils based environment friendly coatings: A review ». *Industrial Crops and Products* 76: 215-29. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.022.
- Sipiczki, Gizella, Stefan Savo Micevic, Csilla Kohari-Farkas, Edina Szandra Nagy, Quang D. Nguyen, Attila Gere, et Erika Bujna. 2024. « Effects of Olive Oil and Tween 80 on Production of Lipase by Yarrowia Yeast Strains ». *Processes* 12(6): 1206. doi:10.3390/pr12061206.
- Szymczak, Tomasz, Justyna Cybulska, Marcin Podleśny, et Magdalena Frąć. 2021. « Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products ». *Agriculture* 11(6): 540. doi:10.3390/agriculture11060540.

## Référence bibliographique

- Tamothran, Arularasu Muthaliar, Kesaven Bhubalan, Sabiqah Tuan Anuar, et Jonathan M. Curtis. 2022. « The degradation and toxicity of commercially traded vegetable oils following spills in aquatic environment ». *Environmental Research* 214: 113985. doi:10.1016/j.envres.2022.113985.
- Tavares, F., J. Petry, P. R. Sackser, C. E. Borba, et E. A. Silva. 2018. « Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil ». *Industrial Crops and Products* 124: 254-64. doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.073.
- Tensey M.R., Brock T.D. (1978). Microbial life at high temperature, aero logical aspect, (edn) Kushner. Life in extreme environments. Academic press.Ltd. London.United Kingdom.
- Treichel, Helen, Débora De Oliveira, Marcio A. Mazutti, Marco Di Luccio, et J. Vladimir Oliveira. 2010a. « A Review on Microbial Lipases Production ». *Food and Bioprocess Technology* 3(2): 182-96. doi:10.1007/s11947-009-0202-2.
- Treichel, Helen, Débora De Oliveira, Marcio A. Mazutti, Marco Di Luccio, et J. Vladimir Oliveira. 2010b. « A Review on Microbial Lipases Production ». *Food and Bioprocess Technology* 3(2): 182-96. doi:10.1007/s11947-009-0202-2.
- Treichel, Helen, Débora de Oliveira, Marcio A. Mazutti, Marco Di Luccio, et J. Vladimir Oliveira. 2010. « A Review on Microbial Lipases Production ». *Food and Bioprocess Technology* 3(2): 182-96. doi:10.1007/s11947-009-0202-2.
- Tripathi, Nishant, Muhammad Zubair, et Amit Sapra. 2025a. « Gram Staining ». In *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK562156/> (29 mai 2025).
- Tripathi, Nishant, Muhammad Zubair, et Amit Sapra. 2025b. « Gram Staining ». In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/> (29 mai 2025).
- Valenzuela-Ávila, Laura, Yuliia Miliar, Ignacio Moya-Ramírez, Olena Chyhrynets, Miguel García-Román, et Deisi Altmajer-Vaz. 2020. « Effect of Emulsification and Hydrolysis Pretreatments of Waste Frying Oil on Surfactin Production ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95(1): 223-31. doi:10.1002/jctb.6225.
- Wadekar, S. D., Kale ,S. B., Lali ,A. M., Bhowmick ,D. N., et A. P. and Pratap Assistant Professor. 2012. « MICROBIAL SYNTHESIS OF RHAMNOLIPIDS BY Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145) ON WASTE FRYING OIL AS LOW COST CARBON SOURCE ». *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 42(3): 249-66. doi:10.1080/10826068.2011.603000.
- Wyszkowski, M, et A Zió. 2008. « Effect of Petrol and Diesel Oil on Content of Organic Carbon and Mineral Components in Soil ».
- Wyszkowski, Mirosław, et Agnieszka Ziolkowska. 2009. « Role of compost, bentonite and calcium oxide in restricting the effect of soil contamination with petrol and diesel oil on plants ». *Chemosphere* 74(6): 860-65. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.035.
- Yap, C. L., S. Gan, et H. K. Ng. 2010. « Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils ». *Journal of Hazardous Materials* 177(1): 28-41. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.078. Zennouhi, Abdelhadi. « Biochimie Structurale - Cours Des Lipides ».

## Référence bibliographique

- [https://www.academia.edu/38953945/Biochimie\\_Structurale\\_Cours\\_des\\_Lipides](https://www.academia.edu/38953945/Biochimie_Structurale_Cours_des_Lipides) (13 février 2025).
- Zhao, Junxin, Maomao Ma, Zheling Zeng, Ping Yu, Deming Gong, et Shuguang Deng. 2021.  
« Production, Purification and Biochemical Characterisation of a Novel Lipase from a Newly Identified Lipolytic Bacterium *Staphylococcus Caprae* NCU S6 ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 249-57. doi:10.1080/14756366.2020.1861607.
- Zullo, Biagi Angelo, Lucia Maiuro, et Gino Ciafardini. 2018. « Survival of Coliform Bacteria in Virgin Olive Oil ». *BioMed Research International* 2018: 8490614.  
doi:10.1155/2018/8490614.
- Yel, Nurcan Vardar. 2021. « Investigation of The Activity of Lipase Variants on Different 4-Nitrophenyl Esters by Spectrophotometric Assay ». *Caucasian Journal of Science* 8(2): 292-303. doi:10.48138/cjo.968723.

# **ANNEXES**

## Annexes

### Annexe 1

<b>Eau physiologie</b>	
Composition	Quantité
Na Cl	9 g
Eau distillée	1L

### Annexe 2

<b>YPDO</b>	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	10g
Agar (pour milieu solide)	20g
L'extrait de malté	10g
Tween 80	10mL
L'huile d'olive	10mL
PH 7.0	

### Annexe 3

<b>YPDT</b>	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	10g
Agar (pour milieu solide)	20g
L'extrait de malté	10g
Tween 80	10mL
PH 7.0	

### Annexe 4

<b>POA</b>	
Composition	Quantité
CaCL <sub>2</sub>	0,1g
Rouge de phénol	0,1g
L'extrait de levure	10g
L'huile d'olive	10mL
Agar (pour milieu solide)	20g
PH 7.0	

### Annexe 5

<b>Pré-culture (YPD)</b>	
Composition	Quantité
Glucose	1g
L'extrait de levure	1g
L'extrait de malt	1g
PH 7.0	

## Annexes

### Annexe 6

Pré-inoculum(YPO)	
L'extrait de levure	10g
L'extrait de malt	10g
L'huile d'olive	2mL
PH 7.0	

### Annexe 7

YPT20	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	1g
L'extrait de malt	1g
Tween20	2mL
PH 7.0	

### Annexe 8

YPT80	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	1g
L'extrait de malt	1g
Tween80	2mL
PH 7.0	

### Annexe 9

YDF	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	0,5g
L'extrait de malt	0,5g
L'huile de friture	2mL
PH 7.0	

### Annexe 10

API 50 CH	
Composition	Quantité
L'extrait de levure	0 ,009g
Rouge de phénol	0,0036g
Tampon	9mL
Eau physiologie	9mL

PH 7.0

**Annexe 11**

Tableau : Lecture des résultats de la galerie API 50 CH.

	Test	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte	Résultat (+)	Résultat (-)
0		<b>Test</b>		Directe	Jaune	Rouge
1	GLY	<b>Glycérol</b>	Glycérol kinase, Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
2	ERY	<b>Érythritol</b>	Érythritol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
3	DARA	<b>D-Arabinose</b>	Arabinose isomérase xylulose kinase	Directe	Jaune	Rouge
4	LARA	<b>L-Arabinose</b>	L-arabinose isomérase Ribulokinase	Directe	Jaune	Rouge
5	RIB	<b>Ribose</b>	Ribokinase, Ribose-phosphate isomérase	Directe	Jaune	Rouge
6	DXYL	<b>D-Xylose</b>	Xylose isomérase, Xylulokinase	Directe	Jaune	Rouge
7	LXYL	<b>L-Xylose</b>	L-xylulose réductase	Directe	Jaune	Rouge
8	ADO	<b>Adonitol</b>	Adonitol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
9	MDX	<b>β-Méthyl-D-xyloside</b>	β-xylosidase	Directe	Jaune	Rouge
10	GAL	<b>Galactose</b>	Galactokinase, Galactose-1-phosphate uridylyltransférase	Directe	Jaune	Rouge
11	GLU	<b>D-Glucose</b>	Hexokinase, Glucosé phosphate déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
12	FRU	<b>D-Fructose</b>	Fructokinase, Fructose-1-phosphate aldolase	Directe	Jaune	Rouge
13	MNE	<b>D-Mannose</b>	Mannose-6-phosphate isomérase	Directe	Jaune	Rouge
14	SBE	<b>L-Sorbose</b>	Sorbose déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
15	RHA	<b>Rhamnose</b>	Rhamnose isomérase Rhamnulokinase	Directe	Jaune	Rouge
16	DUL	<b>Dulcitol</b>	Dulcitol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge

*Annexes*

17	INO	<b>Inositol</b>	Inositol oxydase	Directe	Jaune	Rouge
18	MAN	<b>Mannitol</b>	Mannitol-1-phosphat déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
19	SOR	<b>Sorbitol</b>	Sorbitol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
20	MDM	<b><math>\alpha</math>-Méthyl-D-mannoside</b>	$\alpha$ -mannosidase	Directe	Jaune	Rouge
21	MDG	<b><math>\alpha</math>-Méthyl-D-glucoside</b>	$\alpha$ -glucosidase	Directe	Jaune	Rouge
22	NAG	<b>N-Acétyl-glucosamine</b>	N-acétylglucosamin kinase	Directe	Jaune	Rouge
23	AMY	<b>Amygdaline</b>	$\beta$ -glucosidase (libération de glucoside)	Directe	Jaune	Rouge
24	ARB	<b>Arbutine</b>	$\beta$ -glucosidase (libération d'hydroquinone)	Directe	Jaune	Rouge
25	ESC	<b>Esculine</b>	$\beta$ -glucosidase (avec hydrolyse de l'esculin)	Directe	Noir	Rouge
26	S1L	<b>Salicine</b>	$\beta$ -glucosidase	Directe	Jaune	Rouge
27	CEL	<b>Cellobiose</b>	$\beta$ -glucosidase (cellobiase)	Directe	Jaune	Rouge
28	MAL	<b>Maltose</b>	$\alpha$ -glucosidase (maltase)	Directe	Jaune	Rouge
29	LAC	<b>Lactose</b>	$\beta$ -galactosidase (lactase)	Directe	Jaune	Rouge
30	MEL	<b>Mélibiose</b>	$\alpha$ -galactosidase	Directe	Jaune	Rouge
31	SAC	<b>Saccharose</b>	$\beta$ -fructofuranosidase (invertase)	Directe	Jaune	Rouge
32	TRE	<b>Tréhalose</b>	Tréhalase	Directe	Jaune	Rouge
33	INU	<b>Inuline</b>	Inulinase (endo- et exo-inulinase)	Directe	Jaune	Rouge
34	MLZ	<b>Mélézitose</b>	$\alpha$ -glucosidase	Directe	Jaune	Rouge
35	RAF	<b>D-Raffinose</b>	$\alpha$ -galactosidase (dégradation en mélibiose + sucrose)	Directe	Jaune	Rouge
36	AMD	<b>Amidon</b>	Amylase ( $\alpha$ -amylase, glucoamylase)	Directe	Jaune	Rouge
37	GLYG	<b>Glycogène</b>	Glycogène phosphorylase	Directe	Jaune	Rouge
38	XLT	<b>Xylitol</b>	Xylitol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
39	GEN	<b>Gentiobiose</b>	$\beta$ -glucosidase	Directe	Jaune	Rouge

Annexes

40	TUR	<b>D-Turanose</b>	$\alpha$ -glucosidase	Directe	Jaune	Rouge
41	LYX	<b>D-Lyxose</b>	Lyxose isomérase	Directe	Jaune	Rouge
42	TAG	<b>D-Tagatose</b>	Tagatose-6-phospho kinase	Directe	Jaune	Rouge
43	DFUC	<b>D-Fucose</b>	Fucose kinase	Directe	Jaune	Rouge
44	LFUC	<b>L-Fucose</b>	L-fucose isomérase	Directe	Jaune	Rouge
45	DARL	<b>D-Arabinol</b>	Arabinol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
46	LARL	<b>L-Arabinol</b>	L-arabinol déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
47	GNT	<b>Gluconate (K<sub>2</sub>)</b>	Gluconate kinase, Gluconate-6-phosphate déshydrogénase	Directe	Jaune	Rouge
48	2KG	<b>2-Cétogluconat (K<sub>2</sub>)</b>	2-cétogluconate réductase	Directe	Jaune	Rouge
49	5KG	<b>5-Cétogluconat (K<sub>2</sub>)</b>	5-cétogluconate réductase	Directe	Jaune	Rouge

## Annexe 12

Tableau de saturation donne les quantités de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	565
0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	530	575
0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	496	540	585
0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	460	502	545	588
0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	424	466	508	550	592
0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	389	431	473	515	557	599
0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	355	397	439	481	523	565	607
0	31	62	95	129	164	201	239	279	317	357	399	441	483	525	567	609
0	31	63	97	132	168	205	244	282	320	360	401	443	485	527	569	611
0	32	65	99	134	171	209	247	285	323	361	403	445	487	529	571	613
0	32	66	101	137	174	212	250	288	326	364	406	448	490	532	574	616
0	33	67	103	139	176	214	252	290	328	366	408	450	492	534	576	618
0	34	68	105	142	178	216	254	292	330	368	410	452	494	536	578	620
0	34	70	107	144	181	219	257	295	333	371	413	455	497	539	581	622
0	35	72	109	146	184	222	260	298	336	374	416	458	500	542	584	624
0	36	74	111	148	186	224	262	300	338	376	418	460	502	544	586	626
0	37	76	113	150	188	226	264	302	340	378	420	462	504	546	588	628
0	38	78	115	152	190	228	266	304	342	380	422	464	506	548	590	630
0	39	80	117	154	192	230	268	306	344	382	424	466	508	550	592	632
0	40	82	119	156	194	232	270	308	346	384	426	468	510	552	594	634
0	41	84	121	158	196	234	272	310	348	386	428	470	512	554	596	636
0	42	86	123	160	198	236	274	312	350	388	430	472	514	556	598	638
0	43	88	125	162	200	238	276	314	352	390	432	474	516	558	598	638
0	44	90	127	164	202	240	278	316	354	392	434	476	518	560	598	638
0	45	92	129	166	204	242	280	318	356	394	436	478	520	562	598	638
0	46	94	131	168	206	244	282	320	360	396	438	480	522	564	598	638
0	47	96	133	170	208	246	284	322	362	398	440	482	524	566	598	638
0	48	98	135	172	210	248	286	324	364	400	442	484	526	568	598	638
0	49	100	137	174	212	250	288	326	366	402	444	486	528	570	598	638
0	50	102	139	176	214	252	290	328	368	404	446	488	530	572	598	638
0	51	104	141	178	216	254	292	330	370	406	448	490	532	574	598	638
0	52	106	143	180	218	256	294	332	372	408	450	492	534	576	598	638
0	53	108	145	182	220	258	296	334	374	410	452	494	536	578	598	638
0	54	110	147	184	222	260	298	336	376	412	454	496	538	580	598	638
0	55	112	149	186	224	262	300	340	380	414	456	498	540	582	598	638
0	56	114	151	188	226	264	302	342	382	416	458	500	542	584	598	638
0	57	116	153	190	228	266	304	344	384	418	460	502	544	586	598	638
0	58	118	155	192	230	268	306	346	386	420	462	504	546	588	598	638
0	59	120	157	194	232	270	308	350	390	422	464	506	548	590	598	638
0	60	122	159	196	234	272	310	352	392	424	466	508	550	592	598	638
0	61	124	161	198	236	274	312	354	394	426	468	510	552	594	598	638
0	62	126	163	200	238	276	314	356	396	428	470	512	554	596	598	638
0	63	128	165	202	240	278	316	358	398	430	472	514	556	598	598	638
0	64	130	167	204	242	280	318	360	400	432	474	516	558	598	598	638
0	65	132	169	206	244	282	320	362	402	434	476	518	560	598	598	638
0	66	134	171	208	246	284	322	364	404	436	478	520	562	598	598	638
0	67	136	173	210	248	286	324	366	406	438	480	522	564	598	598	638
0	68	138	175	212	250	288	326	368	408	440	482	524	566	598	598	638
0	69	140	177	214	252	290	328	370	410	442	484	526	568	598	598	638
0	70	142	179	216	254	292	330	372	412	444	486	528	570	598	598	638
0	71	144	181	218	256	294	332	374	414	446	488	530	572	598	598	638
0	72	146	183	220	258	296	334	376	416	448	490	532	574	598	598	638
0	73	148	185	222	260	298	336	378	418	450	492	534	576	598	598	638
0	74	150	187	224	262	290	338	380	420	452	494	536	578	598	598	638
0	75	152	189	226	264	292	340	382	422	454	496	538	580	598	598	638
0	76	154	191	228	266	294	342	384	424	456	498	540	582	598	598	638
0	77	156	193	230	268	296	344	386	426	458	500	542	584	598	598	638
0	78	158	195	232	270	298	346	388	428	460	502	544	586	598	598	638
0	79	160	197	234	272	300	348	390	430	462	504	546	588	598	598	638
0	80	162	199	236	274	302	350	392	432	464	506	548	590	598	598	638
0	81	164	201	238	276	304	352	394	434	466	508	550	592	598	598	638
0	82	166	203	240	278	306	354	396	436	468	510	552	594	598	598	638
0	83	168	205	242	280	308	356	398	438	470	51					

**Année universitaire : 2024-2025**

**Présenté par :** ZERARA Ouissam  
ZERMANI Djahiida

**Prospection et screening de microorganismes lipolytiques isolées à partir de résidus oléicoles régionaux**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master professionnel en Biothéchnologie et Contrôle de qualité**

Compte tenu du coût élevé de la production d'enzymes tels que la lipase à partir de substrats commerciaux, plusieurs études visent à optimiser leur production par des microorganismes capables de les sécréter en grande quantité, en utilisant des déchets naturels alternatifs comme substrat. Ces enzymes de type triacylglycérol lipases ont le potentiel de dégrader les triglycérides en Glycérol et acides gras, ce qui leur confère un grand potentiel biotechnologique dans plusieurs domaines. L'isolement des microorganismes lipolytiques a initialement été réalisé sur deux milieux gélosés où l'huile d'olive et le Tween 80 ont été utilisés comme seules sources de carbone. 14 isolats ont été révélés après 48 h d'incubation. Le potentiel lipolytique de ces isolats a été évalué sur un milieu gélosé sélectif contenant l'huile d'olive comme seule source de carbone et le rouge de phénol comme indicateur. L'apparition d'un halo clair jaune autour de 7 colonies après 48 heures d'incubation à 30°C, a confirmé la présence d'activités lipolytiques. La culture liquide des isolats S1 et S2 sur ces mêmes substrats a montré une production maximale de biomasse pour l'isolat S1 avec une densité optique (DO) de 1.2 sur huile d'olive et de 1 pour l'isolat S2 sur Tween 80. Elle a aussi montré que la production maximale de protéines (0.4 – 0.5 mg/mL) a été obtenue par l'isolat S1 sur l'huile d'olive comme substrat. Le dosage enzymatique de l'activité lipolytique par la méthode spectrophotométrique a aussi révélé que les activités lipolytiques maximales des deux isolats sont très proches avec des valeurs de 6.16 U/min/mL pour l'isolat S1 et 6.8 U/min/mL pour l'isolat S2 sur huile d'olive. L'identification de l'isolat S1 par examen macro et microscopiques et par des tests biochimiques tel que la catalase et la galerie API 50 CH a indiqué que l'isolat appartient au genre *Bacillus*. L'hydrolyse des triglycérides par la lipase de la souche de *Bacillus cereus* a été étudiée dans une fermentation sous atmosphère nulle en présence de l'huile de friture usagée comme substrat lipidique alternatif. Le suivi de la production de biomasse a montré une production maximale après 72 heures d'incubation avec une DO de 1.2. La production maximale de protéines totales a été évaluée après 72 heures d'incubation, atteignant 0.4 mg/mL. L'activité enzymatique a révélé une activité lipasique maximale de 14 U/min/mL. La purification partielle de la lipase produite a été réalisée par précipitation des protéines en utilisant le sulfate d'ammonium et la technique de Salting out. Après dialyse de l'échantillon, le dosage enzymatique a montré que la meilleure activité lipolytique a été obtenue à un pourcentage de saturation compris entre 70 et 90% à 5.48 U/min/mL. Le test d'application a démontré une disparition complète de la tache de la matière grasse par l'extrait enzymatique. Ces résultats confirment le grand potentiel de la souche de *Bacillus cereus* à produire des lipases dégradant plusieurs lipides. Ils démontrent également le potentiel détergent de l'extrait enzymatique obtenu dans cette étude.

**Mots clés :** Lipase, Microorganisme lipolytiques, *Bacillus cereus*, Fermentation, Acide gras.

**Laboratoires de recherche :**

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Dr. CHENTLI Amira (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Dr. DJELID Hadjer (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examinateur :** Dr. Milet Asma (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).