

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT  
En Sciences  
Option : Microbiologie Appliquée

### THEME

Isolement et identification de souches fongiques  
productrices de lipases extracellulaires destinées à  
la bio-décontamination

Présentée par RIHANI Alima

Directeur de thèse : SOUMATI Boudjema

Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba

Membres de Jury:

Président : BRANES Zidane

Professeur, Université Badji Mokhtar-Annaba

Examineurs : DEHIMAT Laid

Professeur, Université de Constantine 1

GRARA Nedjoud

Professeur, Université de Guelma

N° DBCH..../2018

Année universitaire : 2017/2018

## **Remerciements**

*Je remercie vivement Dieu de m'avoir donnée la force et le courage pour accomplir cette thèse.*

*Mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance vont à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse;*

*Je voudrais remercier mon directeur de thèse monsieur **Soumati Boudjema**, professeur à l'université d'Annaba, qui m'a guidée tout au long de ma thèse. Je souhaiterais ici lui témoigner ma sincère reconnaissance pour tous les conseils et les remarques objectives qu'il m'a apportés et pour la confiance qu'il m'a témoignée au cours de ces années.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du jury de cette thèse qui ont accepté de consacrer leur temps pour évaluer ce travail :*

*Monsieur **BRANES** Zidane professeur et chef de département de*

*Biochimie à l'université d'Annaba, pour avoir accepté de présider ce jury,*

*Monsieur **DEHIMAT Laid** professeur de l'Université les frères Mentouri Constantine,*

*Je remercie sincèrement Madame **Nedjoud GRARA** professeur à l'université 8 Mai 1945 Guelma de me faire l'honneur de juger ce travail.*

*J'adresse mes vifs remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire du département de Biochimie.*

*Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement ma famille pour son soutien constant tout au long de mes études. Ma reconnaissance va également à ma mère pour ses immenses sacrifices.*

*J'exprime aussi ma grande gratitude envers toutes les personnes, ayant contribué de prêt ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.*

*Que toutes les personnes que j'aurais oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe ma sincère reconnaissance et mes remerciements.*

## *Dédicace*

*A ma chère mère, pour tout son soutien à mon égard,*

*A la mémoire de mon père que dieu lui apporte ses indulgences,*

*A mes frères et sœurs,*

*A toute ma famille,*

*A vous tous,*

*chez qui l'échange scientifique est un plaisir,*

*A ceux que j'aime et qui m'aiment...*

## Sommaire

Remerciements .....	i
Dédicace .....	ii
Sommaire.....	iii
Résumé .....	vii
Abstract.....	viii
ملخص .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux .....	xiii
<i>Liste des abréviations</i> .....	xiv
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I- Synthèse bibliographique</b> .....	3
1. Les champignons .....	3
1.2. Définitions .....	3
1.3 Champignons filamenteux.....	4
1.3.1 Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux.....	4
1.3.2. Dissémination .....	6
1.3.3. Développement des champignons filamenteux .....	6
1.3.3.a. Une reproduction asexuée.....	6
1.3.3.b. La reproduction sexuée.....	6
1.4. Les levures .....	7
2. Identification des champignons .....	10
3. Problèmes liés aux champignons filamenteux et à leurs métabolites.....	10
3. 1. Secteur agroalimentaire .....	11
3. 2. Secteur pharmaceutique et médical .....	11
4. Les lipases .....	12
4.1. Généralité.....	12
4.2. Définition de lipase.....	14
4.3. Réactions réalisables par les lipases .....	14
4.3.1. Voie de dégradation des acides gras .....	15

4.4. Spécificité de lipase .....	16
4.3. Modèle cinétique interfacial .....	17
5. Microorganismes producteurs de lipases .....	19
5.1. Habitat des microorganismes producteurs de lipase.....	20
5.2. Mécanisme de production de lipase microbienne.....	20
5.3. Lipases fongiques .....	21
6. Facteurs influençant la production de lipase .....	23
6.1. Effet du pH sur les lipases .....	24
6.2. Effet de la température sur les lipases .....	24
6.3. Stabilité en solvant organique .....	25
6.4. Effet d'ions du métal.....	25
7. Applications biotechnologiques de lipase .....	25
7.1. En tant qu'hydrolase .....	25
7.1.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire.....	25
7.1.2. Applications dans les détergents.....	26
7.1.3. Applications en bioremédiation.....	26
7.1.4. Applications en tannerie .....	27
7.1.5. Applications dans l'industrie du papier .....	27
7.2. En synthèse organique .....	27
7.2.1. Les lipases en industries cosmétique:.....	28
7.2.2. Application médicale et pharmaceutique: .....	28
7.2.3. Résolution de mélanges racémiques.....	28
7.2.4. Production des polymères biodégradables : .....	29
8. Stratégies de purification pour les lipases .....	29
<b>II- Matériel et Méthode</b> .....	31
1. Isolement des souches lipolytiques.....	31
1.1. Prélèvement .....	31
1.2. Isolement des souches fongiques.....	31
1.3. Milieux d'isolement.....	31
1.4. Ensemencement des souches fongiques .....	31

1.5. Purification .....	32
1.6. Conservation.....	32
2. Identification des souches isolées.....	33
2.1. Identification microscopique .....	33
2.2. Identification macroscopique .....	33
3. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	34
3.1 Milieu solide à base de tributyrine .....	34
3.2. Milieu solide à base de Tween 80 .....	35
4. Production de lipases.....	35
4.1. Fermentation sur milieu liquide.....	35
4.2. Détermination de l'activité lipolytique .....	36
4.3. Détermination de la biomasse.....	38
4.4. Évolution du pH .....	38
5. Caractérisation partielle de la lipase de Trichoderma sp.....	38
5.1. Étude de l'influence du substrat inducteur .....	38
5.2. Effet du pH .....	39
5.3. Effet de la température .....	39
<b>III-Résultats et discussion.....</b>	<b>40</b>
1. RESULTATS ET DISCUSSION .....	40
1.1. Dépistage et isolement des champignons lipolytiques .....	40
1.2. Identification.....	40
1.2 .1. Aspects macroscopique et microscopique de quelques souches isolées .....	41
1.3. Mise en évidence de l'activité lipasique.....	48
1.3.1. Sur milieu à base de tributyrine.....	48
1.3.1. Sur milieu à base de Tween 80 .....	48
1.4 Poids secs des souches testées.....	53
1.5. Production de lipases.....	54
1.5.1 Effet de tween 80 sur la production de lipase.....	58
1.5.2. Étude de l'influence du glucose.....	63
1.4.5 Détermination du pH en fin de cultures .....	74

1.6. Caractérisation partielle de la lipase de la souche <i>Trichoderma</i> sp.....	75
1.6.1. Effet des additifs à base de carbone.....	75
1.6.2. Effets de la température sur l'activité de la lipase .....	77
1.6.3. Effets du pH sur l'activité de la lipase .....	78
Conclusion et perspectives .....	80
<i>Références bibliographique</i> .....	82
<i>ANNEXE 1</i> .....	102
<i>ANNEXE 2</i> .....	105

## *Résumé*

Les lipases, protéines ubiquitaires, sont les enzymes les plus étudiées et les plus utilisées dans l'industrie. Ils catalysent un très grand nombre de réactions, d'hydrolyse et de synthèse, conduisant à une grande diversité de molécules, d'acides, d'esters, d'amides ...etc. Dans le cadre de la recherche des enzymes lipolytiques; des champignons ont été isolés à partir du sol contaminé par des sources lipidiques et à partir des grignons d'olives situés à la région d'Oued Fragha wilaya de Guelma.

Les isolats ont été purifiés et vérifiés pour leur potentiel lipolytique en utilisant un milieu solide à base de Tributyrine et de Tween 80. L'apparition des halos clairs autour des colonies c'est une indication de la présence de l'activité lipolytiques. Pour l'identification des moisissures lipolytiques isolées, une étude macroscopique et microscopique a été effectuée. Une analyse quantitative de l'activité lipasique a été effectuée par la méthode de titrage utilisant de l'huile d'olive comme substrat. L'addition d'autres sources de carbone a été testée dans le but d'améliorer la production d'enzyme par les isolats sélectionnés.

Certaines souches ont été isolées et identifiées comme *Penicillium sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *A. versicolor*, *Cunninghamella sp.*, *Mucor sp.* et *Candida albicans* ont été sélectionnées présentant la meilleure activité lipasique.

Les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de l'huile d'olive induirait fortement la production de lipase par les souches isolées quand elle est utilisée comme seule source de carbone dans le milieu de culture.

**Mots-clés :** Champignons lipolytiques; huile d'olive; Lipase fongique; Tween 80.

## *Abstract*

Lipases, ubiquitous proteins, are the most studied and used enzymes in the industry. They catalyze a very large number of reactions, hydrolysis and synthesis, leading to a great diversity of molecules, acids, esters amides ...etc. In the context of the research of lipolytic enzymes; fungi were isolated from soil contaminated by lipid sources and from oil-mill effluent located in the Oued Fragha wilaya region of Guelma. The isolates were purified and verified for their lipolytic potential using a solid medium based on Tributyrin and Tween 80. The appearance of the light halos around colonies is an indication of the presence of lipolytic activity. For identification of isolated lipolytic molds, a macroscopic and microscopic study was performed. Quantitative analysis of the lipase activity was performed by the titration method using olive oil as substrate. The evolution of biomass and enzyme production has been tested. The addition of other carbon sources has been tested in order to improve enzyme production by the selected isolates.

Some strains have been isolated and identified as *Penicillium* sp. *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*, *A. versicolor*, *Cunninghamella* sp., *Mucor* sp. and *Candida albicans* were selected with the best lipase activity.

The results obtained revealed that the use of olive oil would strongly induce lipase production by isolated strains when it is used as the only carbon source in the culture medium.

**Keywords:** Lipolytic fungi; olive oil; Fungal lipase; Tween 80.

## ملخص

الليباز، هي بروتينات متواجدة في كل مكان، و هي أكثر الأنزيمات المدروسة والمستعملة في الصناعة. فهي تحفز عددًا كبيرًا جدًا من تفاعلات التحلل والتكيب، مما يؤدي إلى تنوع كبير في الجزيئات والأحماض والاسترات والأמיד... الخ ومن أجل البحث عن الأنزيمات المحللة للدهن التي طورتها الفطريات المعزولة، من أجل عزل هذه الفطريات تم أخذ عينتين من التربة الملوثة بمصادر الدهون ومن مصانع زيت الزيتون الواقعة في منطقة وادي فراغة قالمة في شرق الجزائر.

تم تنقية العزلات والتحقق من إمكاناتها الدهنية باستخدام وسط صلب قائم على Tributyrin و Tween 80 تم زرعها واختبارها لنشاط الخلايا الدهنية. ان ظهور الهالات الخفيفة حول المستعمرات هو مؤشر على وجود نشاط دهني.

لتحديد القوالب الليبوليتية المعزولة، أجريت دراسة مجهرية وميكروسكوبية. كما تم إجراء التحليل الكمي لنشاط الليباز بواسطة طريقة المعايرة باستخدام زيت الزيتون كركيزة، تم اختبار تطور الكتلة الحيوية وإنتاج الإنزيم. كما تم اختبار إضافة مصادر أخرى من الكربون من أجل تحسين إنتاج الإنزيمات بواسطة العزلات المختارة.

بعض السلالات تم عزلها وتحديدتها باسم *Aspergillus fumigatus* و *Penicillium sp.* و *Aspergillus terreus* و *Candida albicans* و *Cunninghamella sp.*, *Mucor sp.*, *A. versicolor* و أفضل نشاط للليباز.

وأظهرت النتائج أن استخدام زيت الزيتون تحفز بقوة إنتاج الليباز من سلالات عند استخدامها كمصدر وحيد للكربون في مستنبت.

**كلمات البحث:** الليباز الفطري؛ زيت الزيتون؛ الليباز؛ توين 80.

*Liste des figures*

Figure 1: Structure de l’hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné (Lecellier, 2013)..... 5

Figure 2: Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées (Lecellier, 2013). ..... 7

Figure 3: Quelques exemples d’aliments contaminés par des moisissures. .... 11

Figure 4: Réaction enzymatique catalysant l’hydrolyse ou la synthèse de triglycéride. (Jaeger et al., 1994 ; Singh et Mukhopadhyay, 2012). ..... 14

Figure 5: Différentes réactions possibles par utilisation de lipases..... 15

Figure 6 : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases (Muralider et *al.*, 2002)..... 17

Figure 7: Modèle cinétique interfacial d’après Verger et de Haas, 1973, A est la surface et V le volume (Najjar, 2010)..... 18

Figure 8: Évaluation des halos produits dans des milieux solides contenant du T 80 au quatrième et sixième jour de croissance des champignons. d : le diamètre de colonie (cm), D: le diamètre de l’halo (cm)..... 49

Figure 9: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Aspergillus terreus* repérées sur des puits de gélose à base de T80 après 6 jours d'incubation. (+G) en présence de glucose et (-G) en absence de glucose..... 50

Figure 10: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Trichoderma* sp. sur milieu à base de T80, après 6 jours d'incubation. La lipase est secrétée en présence de glucose. .... 50

Figure 11 : Zones d'hydrolyse produites par la souche *Mucor* sp. repérés sur des puits de gélose à base du T80 après 6 jours d'incubation..... 50

Figure 12: Zones d'hydrolyse produites par la souche *A. versicolor* repérés sur des puits de gélose à base du T 80 après 6 jours d'incubation. .... 51

Figure 13: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Penicillium* sp. repérées sur des puits de gélose à base de T 80 après 6 jours d'incubation. .... 51

Figure 14: Zones d'hydrolyse produites par la souche <i>Candida albicans</i> repérées sur des puits de gélose après 6 jours d'incubation. Lipase secrétée en présence de glucose (+G) et en absence de glucose (-G).....	52
Figure 15: Zones d'hydrolyse produites par la souche <i>A. fumigatus</i> repérées sur des puits de gélose après 6 jours d'incubation. ....	52
Figure 16: Comparaisons de poids sec de différentes souches après 96 h d'incubation à 30° C. ....	54
Figure 17 : Effet du temps d'incubation sur l'activité lipasique d' <i>A. versicolor</i> , et sur la variation de pH du milieu de culture. ....	55
Figure 18 : Effet du temps d'incubation sur l'activité lipase d' <i>Aspergillus terreus</i> et sur la variation de pH du milieu de culture. ....	55
Figure 19: Effet de la concentration de tween 80 sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de <i>A. versicolor</i> , dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur supplémenté par Tween 80 à 2% (a), Tween 80 à 1% (b).....	59
Figure 20: Évolution de l'activité enzymatique (AE), la croissance de souche <i>Mucor</i> sp. (DO) et le pH de milieu en fonction de temps dans un milieu minéral contenant l'huile d'olive et Tween 80 à 1%. ....	60
Figure 21 : Évolution de l'activité enzymatique (AE) et la croissance de souche la souche <i>A. fumigatus</i> dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et supplémenté par Tween 80 (1%). ....	61
Figure 22 : Effet de T80 (1%) sur la production de lipase extracellulaire, sur l'évolution de la biomasse et le pH de milieu de la souche fongique <i>Cunnigamella</i> sp. (A) en absence de T80 et (B) en présence de T80.....	62
Figure 23 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de <i>Penicillium</i> sp. dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive comme inducteur. (a) en l'absence de glucose et (b) en présence de glucose. ....	64
Figure 24: Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de <i>Cunnigamella</i> sp. dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur, en présence de glucose (a) en l'absence de glucose (b). ....	66
Figure 25: Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse <i>Mucor</i> sp., dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive 1% comme inducteur. 67	67

Figure 26 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse d'*A. terreus* dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive et glucose à 2% (A) et sans ajout de glucose (B). ..... 69

Figure 27: Effet de la concentration de glucose sur la production de lipase et de la biomasse de *Candida albicans* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et 1% de glucose (A), 2% glucose (B). ..... 71

Figure 28 : Évolution de taux de production de la biomasse fongique, activité de lipase et le pH moyen pendant la culture de fermentation de *Trichoderma* sp. (Milieu minéral additionné d'huile d'olive et glucose (A) et un milieu minéral additionné d'huile d'olive (B)). ..... 73

Figure 29 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse d'*A. versicolor* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive et additionné du glucose. .... 74

Figure 30 : Effet de la température sur l'activité lipasique de *Trichoderma* sp. (- □ -) Activité relative. .... 77

Figure 31: Effet du pH sur l'activité lipasique de *Trichoderma* sp. (- □ -) Activité résiduelle. .... 78

*Liste des tableaux*

Tableau 1: souches fongiques productrices de lipases. .... 22

Tableau 2: Aspects macroscopique et microscopique de quelques moisissures microscopie, objectif (x10 x 40). .... 44

Tableau 3: Effet des additifs à base de carbone sur la production de lipase et la biomasse de *Trichoderma* sp. .... 76

## *Liste des abréviations*

- AE : Activité enzymatique.
- AG : Acides gras.
- GA : La gomme arabique.
- PDA : pomme de terre dextrose agar
- rpm : rotation par minute.
- SDA : Sabauraud dextrose agar
- T80 : Tween 80
- TAG : triacylglycérols
- TG : triglycérides.
- umol : micromole.

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé, la demande mondiale ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment pour répondre aux besoins des consommateurs. Ainsi, la création des moulins pour la trituration des olives de plusieurs producteurs, forme des points de concentration des polluants non résorbables par le pouvoir épurateur des milieux.

L'Algérie fait partie des pays méditerranéens dont le climat est un des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus grands producteurs au monde, et qui sont confrontés à des effets toxiques des déchets de l'usine d'olive (grignons d'olive). Les grignons d'olive du moulin peuvent dégrader le sol et la qualité de l'eau, négativement affectant les écosystèmes aquatiques et terrestres. Les grignons d'olive sont des sous-produits de l'industrie oléicole (Olives) et présentent de nombreux problèmes de toxicité vis-à-vis de l'environnement. Les rejets annuels de déchets solides provenant des huileries traditionnelles sont une source de pollution considérable et peuvent avoir des impacts négatives sur la santé humaine et sur l'environnement. Les déchets domestiques sont également considérés comme des polluants car ils contiennent une grande quantité de substances grasses et huileuses (**Gopinath et al.,2013**).

Les lipases, protéines ubiquitaires, sont les enzymes les plus étudiées et les plus utilisées dans l'industrie. Elles catalysent un très grand nombre de réactions, d'hydrolyse et de synthèse, conduisant à une grande diversité de molécules, acides, esters, amides...

Les lipases peuvent être produites par différents organismes, y compris les animaux, les plantes et les micro-organismes, mais seules les lipases microbiennes sont commercialement significatives en raison de leur production plus élevée et de leur plus grande variété. Les champignons filamenteux et les levures sont les sources les plus préférées pour la production de lipase, car cette enzyme est principalement décrite comme extracellulaire, ce qui facilite sa récupération à partir du milieu fermenté (**Maldonado et al., 2016**).

Des nombreuses études ont été rapportées par des auteurs : la lipase de la souche *A. terreus* a été décrite par **Sethi et al., (2016)**, *A. fumigatus* a été décrite par **Shangguan et al. (2011)**. *T. harzianum* a été décrite par **Toscano et al. (2013)**, **Ülker et al. (2011)**, lipase d'*A. niger* a été décrite par **Falony et al., (2006)** et **Ire et al. (2014)**. *Cunninghamella verticillata*, la lipase de cette souche elle est étudiée par **Gopinath et al., (2002)**.

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles potentialités de souches lipolytiques. Cette approche constitue une application biologique dans l'intérêt de la préservation de l'environnement.

L'objectif de ce travail est d'isoler et d'identifier les différentes souches fongiques obtenues à partir des échantillons prélevés du sol et à partir des déchets de l'huile d'olive et de produire des lipases capables de dégrader ces effluents.

Tout au long de ce travail, nous avons suivi l'évolution de la production de la biomasse des souches fongiques et nous avons étudié l'activité lipolytique de quelques micro-organismes isolés.

***I- Synthèse  
bibliographique***

## **1. Les champignons**

### **1.2. Définitions**

Les champignons sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes, se nourrissant par absorption de substances très diverses, et se multipliant par des spores sexuées ou asexuées. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes ou cinquième règne. Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (**Ghorri, 2015**).

Les champignons constituent un groupe d'organisme d'une extrême variété, des espèces microscopiques aux organismes de plusieurs kilos. Ils ont colonisé tous les milieux, terrestres ou aquatiques, et jouent un rôle primordial dans l'écologie de la planète en recyclant la matière organique morte (**Tabuc, 2007**).

Les champignons sont des parasites, saprophytes ou symbiotes, généralement aérobies, ils se développent à des températures variables entre 0 et 50° C avec une température optimale entre 20 et 27° C. Les champignons exercent à la fois chez leurs hôtes des actions favorables (fermentation, fertilisation, synthèse) et défavorables (maladies végétales, animales ou humaines). Environ 100.000 espèces sont connues actuellement dont une centaine sont pathogènes pour l'homme. Ce groupe, dont les quelque 100 000 espèces se sont adaptées à des modes de vie très variés, est maintenant considéré comme un règne à part entière. Certains s'associent par symbiose à des algues pour survivre dans des conditions climatiques extrêmes, d'autres parasitent la peau de l'homme, quant aux saprophytes, ils provoquent la pourriture du bois. Ils sont parmi les plus anciennes formes « végétales » différenciées apparues sur le globe terrestre. Classés, initialement, parmi les végétaux à cause de la structure de leurs cellules, ils ne réalisent pourtant pas de photosynthèse. Ils sont hétérotrophes: ils ne peuvent pas, comme les plantes vertes, synthétiser la matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique et doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau, les substances nutritives et les éléments minéraux nécessaires à la synthèse de leur propre matière. Ils les absorbent à travers la paroi de leur appareil végétatif. Sans véritables tissus, à l'inverse des plantes supérieures ou des animaux, leur appareil végétatif.

D'un point de vue pratique on distingue les champignons lévuriformes dont le thalle est réduit à un état unicellulaire, et les champignons filamenteux ou dermatophytes (**Lecellier, 2013**).

### ***1.3 Champignons filamenteux***

Les champignons filamenteux sont considérés comme des organismes prometteurs pour la conversion en sucres fermentescibles de la biomasse végétale complexe. En effet, ils disposent d'une machinerie enzymatique complexe qui leur permet de dégrader les polymères les plus récalcitrants, tels que la lignine. Actuellement, les recherches sur ces organismes se focalisent essentiellement sur la caractérisation des enzymes impliqués dans la dégradation: glycosidases, peroxidases, lipases etc., soit via une approche biochimique, soit via une approche génomique qui vise à identifier le répertoire enzymatique présent chez de nombreuses espèces fongiques (**Lecellier, 2013**).

#### ***1.3.1 Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux***

Les champignons filamenteux sont composé d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Figure 1). Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes parfois visibles sous forme de petites tâches colorées à leur surface. Les hyphes puisent l'eau et les substances organiques dans les différents substrats qu'ils colonisent pour leur développement (**Chabasse et al.,2002; Lecellier, 2013**).

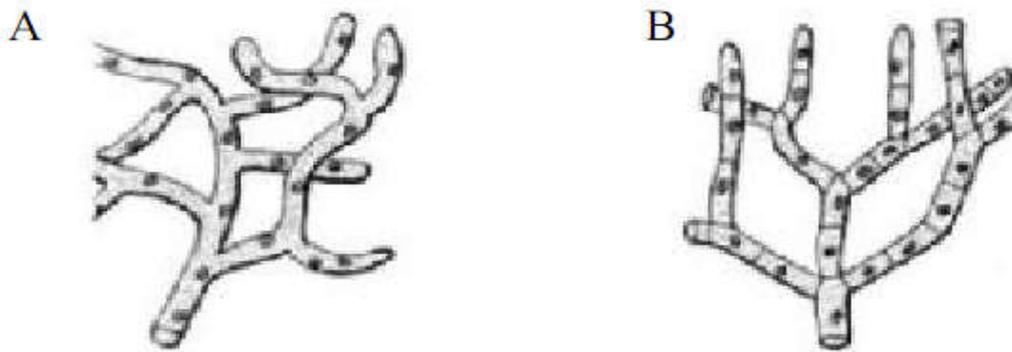


Figure 1: Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné (Lecellier, 2013).

Dans les parties jeunes du mycélium les cloisons sont percées de pores qui permettent le passage du contenu cellulaire d'un compartiment à l'autre. Dans les parties les plus âgées, les cloisons sont fermées, isolant les parties en voie de dégénérescence des parties actives. Des septums assurent le cloisonnement des différents compartiments cellulaires. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de celles-ci s'effectue par le sommet, ou apex, où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et dégradation du métabolisme dit "primaire", indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les régions apicales des hyphes sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèses de nouveaux polymères. Les produits du métabolisme "secondaire" non indispensable au fonctionnement de la cellule, sont plutôt stockés en région subapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les pigments, les antibiotiques, les mycotoxines... (Tabuc, 2007 ).

Le développement de l'hyphe se fait à partir d'une spore (sexuée ou asexuée) par émission d'un ou plusieurs tubes germinatifs et par croissance de la seule cellule terminale. La formation d'une colonie se fait de façon radiale à partir du point d'inoculation. Certaines moisissures sont les plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou Champignons imparfaits (Chabasse et al.,2002).

### **1.3.2. Dissémination**

Les champignons se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250 µm de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant ou par le contact de l'homme. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, tel que le support papier, elles germent si les conditions d'humidité et de température y sont favorables. Elles y pénètrent par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (**Boudih, 2011**).

### **1.3.3. Développement des champignons filamenteux**

La complexité des cycles de reproduction sexuée ou asexuée est l'un des éléments qui ont entraîné la création d'un règne à part pour les champignons. La classification des espèces est d'ailleurs fondée sur ces particularités. Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction:

#### **1.3.3.a. Une reproduction asexuée**

La reproduction asexuée se réalise différemment selon l'espèce: par bourgeonnement chez la levure, par individualisation d'un des segments d'un hyphes ou par formation de spores asexuées. Au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées (**Boudih, 2011**).

Elle se fait sans fusion de gamètes. Elle correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation. Au cours de la sporulation, ces spores, petites cellules déshydratées au métabolisme réduit et entourées d'une paroi protectrice les isolant du milieu environnant, sont produites en grande quantité par des structures spécialisées développées à partir du mycélium. Leur diamètre varie de 2 à 250 µm. Il existe différentes formes de reproduction asexuée et différents types de spores (Figure 2). Les spores peuvent être le résultat de la fragmentation (**Lecellier, 2013**).

#### **1.3.3.b. La reproduction sexuée**

La reproduction sexuée nécessite la fusion de deux cellules spécialisées, ou gamètes. Elle implique la rencontre de deux mycélium de signes sexuels opposés. Un mycélium à n

chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à  $2n$  chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (Figure 2).

A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis en genres et espèces. Ces deux derniers termes étant utilisés pour les désigner. La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux: les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes (Ghorri, 2015).

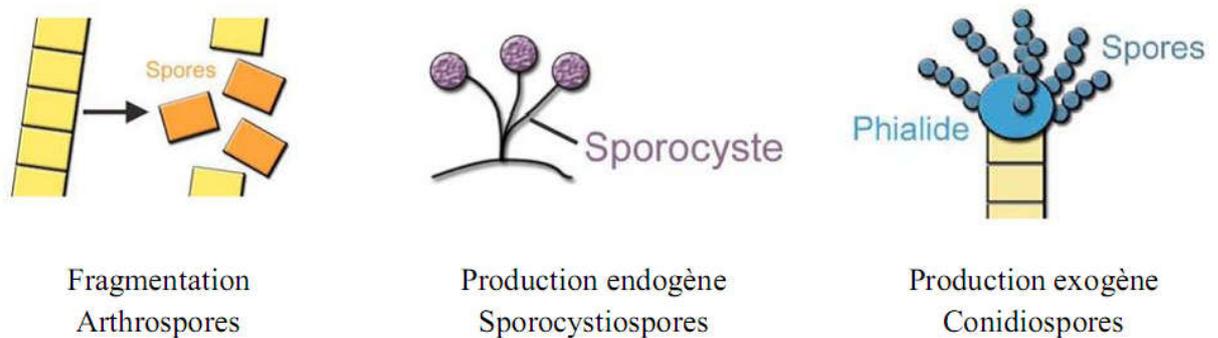


Figure 2: Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées (Lecellier, 2013).

#### 1.4. Les levures

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires (ou très faiblement pluricellulaires) qui se multiplient par bourgeonnement ou sporulation. Elles ont la capacité de fermenter des matières organiques, minérales ou végétales pour produire des substances variées. On distingue trois grands groupes (Najjar, 2010) :

- Les levures vraies, ascosporeées appartenant à l'ordre des Endomycétales, faisant partie des Ascosporeées avec comme genre important *Saccharomyces*,
- Les levures appartenant à la classe des Basidiomycètes et de l'ordre des Ustilaginales avec le genre *Filobasidiella* récemment créé (1975) par Kwong-Chung.

- Les levures non ascosporeées appartenant aux Deutéromycètes ou Fungi imperfecti où l'on reconnaît 6 genres d'intérêt médical qui sont: *Candida*, *Cryptococcus*, *Pityrosporum*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* et *Géotrichum*.

Les levures sont constituées par les espèces du genre *Saccharomyces*, agents de la fermentation alcoolique de la bière, du vin, du cidre, et des éléments actifs du levain de boulanger. C'est l'activité chimique des levures qui provoque le dégagement de bulles de gaz carbonique et fait lever la pâte à pain. Ces levures sont des cellules rondes ou ovales, qui, placées dans un milieu sucré ou glucidique, avec ou sans oxygène, se multiplient activement. *Saccharomyces pompe*: Ce groupe se caractérise par son mode de division végétatif qui est transversal alors que les autres levures bourgeonnent. Elle a une forme rectangulaire. *Saccharomyces cerevisiae*. Au microscope, elle apparaît de formes arrondies ou ovoïdes (Najjar ,2010).

Informations sur *Saccharomyces cerevisiae*

Les levures sont les premiers microorganismes à avoir été utilisés par l'homme, initialement de façon empirique. Ainsi, les Sumériens, les Babyloniens et les Égyptiens ont laissé des traces iconographiques et/ou écrites, vieilles de plusieurs milliers d'années, de la production de boissons alcoolisées par fermentation et de l'utilisation des levures dans la fabrication du pain. Elles sont également les premiers microorganismes à avoir été observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek qui les a dessinées vers 1680 et en a même réalisé des modèles tridimensionnels en cire. Au dix-neuvième siècle, c'est à la suite de ses travaux sur les levures que Pasteur contribua à la fondation de la microbiologie. (Guiraud 1998).

La levure fut aussi à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner à la même époque. Plus près de nous, elle fut - et continue d'être – un organisme modèle chez lequel de nombreux processus cellulaires et moléculaires communs à toutes les cellules ont été élucidés. Les levures sont des champignons unicellulaires et présentent donc une structure cellulaire eucaryote. Leur seule caractéristique commune est l'état unicellulaire bien que de nombreuses levures soient aussi capables de faire dans certaines conditions un pseudo-mycélium comme le genre *Brettanomyces*, voire un véritable mycélium comme *Candida albicans*. Quoique les cellules des levures ne soient pas mobiles par elles mêmes, l'état unicellulaire favorise leur dissémination dans les

liquides qui constituent leur milieu de prédilection surtout lorsqu'ils sont sucrés. Mais on trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les sols, dans les eaux et dans l'atmosphère. Les levures furent reconnues comme des champignons par A. de Bary en 1866 lorsqu'il détecta des ascospores chez la levure de bière **(Guiraud 1998)**.

L'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes. Comme l'écrivit joliment James D. Watson, ce sont les « *Escherichia Coli* des eucaryotes ». Les cellules de levure du genre *Saccharomyces*, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, sont arrondies, plus ou moins ovalaires. Elles ont la forme d'un ellipsoïde de révolution dont le grand axe atteint une longueur d'environ 5 µm chez les cellules haploïdes et 7 à 8 µm chez les cellules diploïdes. La paroi cellulaire rigide et très résistante comporte trois couches dont la composition chimique est différente de celle des végétaux supérieurs et des bactéries. La couche externe est formée de mannanes (polymères du mannose) phosphorylés et de glycoprotéines tandis que les couches moyenne et interne sont formées de glucanes **(Guiraud, 1998)**.

On trouve également dans la paroi des lipides et de la chitine. Le noyau, généralement en position centrale, a un diamètre d'environ 2 µm chez les cellules haploïdes. Le nombre haploïde de chromosomes est égal à seize chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le cytoplasme contient des vacuoles en nombre variable qui fusionnent le plus souvent chez les cellules âgées. On trouve également dans le cytoplasme des inclusions de glycogène et des microvésicules, les peroxysomes, contenant notamment de la catalase. Lorsque les levures vivent en aérobiose, on trouve dans le cytoplasme des mitochondries qui disparaissent en anaérobiose. La plupart des constituants cellulaires peuvent être distingués au microscope sur la base de leurs affinités sélectives pour tel ou tel colorant. Malgré leur petite taille, le microscope optique permet d'obtenir diverses informations sur les levures, en particulier si l'on utilise des techniques de coloration. L'observation d'organites caractéristiques permet de situer les levures dans la classification. L'observation vitale peut aussi être utile pour comparer des cellules d'espèces différentes, souvent très semblables, et montrer ainsi les limites de cette approche pour apprécier les différences spécifiques **(Stéphanie, 2000)**.

## **2. Identification des champignons**

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques, microscopiques et moléculaires après isolation et culture sur milieux de culture.

Les critères macroscopiques reposent sur l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso, leur taille, leur relief, leur aspect (filamenteux, collant), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et la pigmentation. L'identification des champignons selon fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques tels que **(Tabuc, 2007)**:

- Caractères cultureux: vitesse de la croissance apicale ; texture, marge, épaisseur et couleur de la colonie ; pigmentation de l'agar, production d'exsudat et odeur des colonies.
- Caractères morphologiques:
  - a - Du mycélium: absence ou présence de cloisons, couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores.
  - b - Des organes différenciés et de leur contenu: forme, couleur, dimensions, texture des parois et ornementations.

Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons : le type de thalle (septé ou non), la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des spores, l'origine des spores (endogène ou exogène), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire) **(Cordova,1998)**.

Outre des critères morphologiques, il existe maintenant des critères moléculaires qui permettent une identification précise des espèces. Les loci les plus souvent testés sont les ADN codant pour les différentes fractions des ARN ribosomiaux **(Tabuc, 2007)**.

## **3. Problèmes liés aux champignons filamenteux et à leurs métabolites**

Les champignons filamenteux présentent un intérêt au sein de l'environnement humain, de manière bénéfique ou néfaste, avec des conséquences économiques. Ils sont impliqués dans différents domaines tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi que dans le secteur médical **(Lecellier, 2013)**.

### 3. 1. Secteur agroalimentaire

Au sein de l'industrie agroalimentaire, certaines moisissures sont utilisées pour la production de fromage comme le roquefort (*Penicillium roqueforti*) ou le camembert (*Penicillium camemberti*). Elles peuvent également servir à la synthèse d'acides organiques comme l'acide citrique ou l'acide gluconique (*Aspergillus niger*). Ces deux types d'acides sont utilisés comme additifs alimentaires. Certaines moisissures sont utilisées pour la synthèse d'enzymes telles la maltase et la dextrinase servant à transformer le maltose et l'amidon en alcool (*Rhizopus oryzae*). Ce processus de fermentation alcoolique est rencontré dans la fabrication de l'alcool de riz en Asie. Les champignons filamenteux présentent donc un intérêt industriel. Néanmoins, ils représentent un risque dans le domaine de l'industrie agroalimentaire sous forme de contamination des denrées alimentaires. En effet, elles peuvent être à l'origine d'importantes dégradations des propriétés physicochimiques entraînant une altération de la qualité des denrées alimentaires. Le premier type d'altération de la qualité des aliments concerne la qualité dite « marchande ». La prolifération des moisissures, qu'elles soient pathogènes ou non, entraîne des modifications défavorables des caractéristiques diététiques et organoleptiques, tels l'aspect, la texture, l'odeur et la saveur des aliments, avec des conséquences économiques importantes dans l'industrie agroalimentaire (Figure 3) (Lecellier, 2013).



Figure 3: Quelques exemples d'aliments contaminés par des moisissures.

### 3. 2. Secteur pharmaceutique et medical

La consommation d'aliments contenant des mycotoxines est responsable d'une intoxication alimentaire appelée mycotoxicose. Il existe deux types de mycotoxicose

: la mycotoxicose aiguë (une seule ingestion d'une forte dose) et la mycotoxicose chronique (ingestions répétées de faibles doses). Les symptômes observés sont dépendant du type de mycotoxine, de la dose et de la durée d'exposition, ainsi que des caractéristiques de l'individu. Dans le cas par exemple des aflatoxines, principalement produites par les espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, l'intoxication aiguë se traduit par différents symptômes (dépression, anorexie, diarrhée, ictère ou anémie) et peut être fatale. Lors d'une intoxication chronique, ces mycotoxines sont hautement hépatotoxiques, tératogènes, mutagènes et cancérigènes. Chez l'homme, l'aflatoxine B1, composé d'origine naturelle, représente l'agent hépato-cancérigène le plus puissant connu actuellement.

Les infections fongiques chez l'homme dues aux champignons filamenteux sont en augmentation depuis ces dernières décennies. La contamination se fait principalement par inhalation de spores en suspension dans l'air, ou plus rarement par ingestion ou encore par inoculation cutanée post traumatique.

#### **4. Les lipases**

##### **4.1. Généralité**

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases EC : 3.1.1.3) sont des sérines hydrolases atypiques qui sont retrouvées aussi bien chez les végétaux, animaux, bactéries Gram (+) ou Gram (-), et chez les mycètes. Nativement utilisées dans la régulation du métabolisme des triglycérides et lipoprotéines, ces sérines hydrolases permettent notamment la dégradation des triglycérides pour le passage à travers la barrière intestinale chez les vertébrés (**Thakur, 2012**).

Du fait de leur utilisation métabolique dans l'hydrolyse des esters gras, beaucoup d'entre elles agissent en interface eau/ester gras, au biais d'un volet amphiphile, boucle peptidique permettant l'accès des substrats dans le site actif, ce dernier influençant la sélectivité de l'enzyme (**Rouillard, 2012**).

La lipase est une autre enzyme miracle qui a été sous-estimée pendant longtemps. Cette enzyme convertit les lipides non polaires en diglycérides et monoglycérides, c'est-à-dire en émulsifiants. Dans la farine de blé, il y a aussi des lipides polaires, notamment des phospholipides et des glycolipides, qui peuvent être hydrolysés par des lipases ou phospholipases spéciales et sont ensuite plus hydrophiles (**Alloue, 2008**).

Cette formation in situ d'émulsifiants conduit certes à un renforcement de la pâte et à un plus fort volume, mais elle n'améliore pas la durée de conservation, contrairement à ce qui se produit lorsqu'on ajoute des mono et des diglycérides dans une formulation de pain. On sait qu'en raison de leur interaction avec l'amidon, ces composés sont à même de réduire le rassissement. D'un autre côté, ils n'ont qu'un effet très limité sur le volume du pain. Il est très probable que si l'action des émulsifiants formés par voie enzymatique est aussi marquée à cet égard, c'est parce qu'ils sont déjà placés aux bons endroits de la pâte pour pouvoir en améliorer les propriétés. Par contre, il ne se forme pas suffisamment d'émulsifiant pour interférer avec la dégradation de l'amidon et avoir un effet anti-rassissement. Il est intéressant de noter qu'il existe une controverse quant à la nécessité d'ajouter de la matière grasse dans la pâte – et, dans l'affirmative, quelle matière grasse – pour que les lipases donnent un résultat satisfaisant (**Hupé, 2008**).

Les lipases appartiennent à la famille structurale super  $\alpha / \beta$ -hydrolases dont les activités reposent essentiellement sur une triade catalytique habituellement formée par les résidus sérine, histidine et asparagine. L'hydrolyse du substrat est effectuée par la formation d'un intermédiaire tétraédrique. Dans des conditions thermodynamiques favorables (l'eau par exemple est de faible activité thermodynamique), elles sont capables de catalyser des réactions de synthèse telles que l'estérification ou l'amidation. Ceci est rendu possible grâce à leur résistance aux solvants organiques. Elles sont très appréciées dans l'industrie parce qu'elles sont capables de catalyser des réactions chimio-sélectives, régio-sélectives et stéréo-sélectives. *Y. lipolytica* est la levure qui contient le plus de lipases décrites (**Lock et al., 2007**)

On dénombre 16 lipases de la famille « Génolevures » GL3R0084 (Sherman et al., 2009) : LIP2, LIP4, LIP5, LIP7, LIP8, LIP9, LIP10, LIP11, LIP12, LIP13, LIP14, LIP15, LIP16, LIP17, LIP18 et LIP19 ainsi que 4 estérases de la famille « Génolevures » GL3C3695 : LIP1, LIP3, LIP6 et LIP20. Plusieurs lipases de *Geotrichum candidum* ont été décrites dans la littérature. Une lipase de *Geotrichum sp.* a été purifiée. Celle-ci montre sous certaine condition une activité enzymatique stable après 12 heures de fermentation. De façon plus anecdotique, il a été trouvé sur un compact disc en cours de dégradation une espèce du genre *Geotrichum* non décrite par les auteurs (**Guillaum, 2012**).

#### 4.2. Définition de lipase

Les lipases sont des sérines hydrolases définies comme triacylglycérol acylhydrolases (EC 3.1.1.3). Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison ester de tri-, di- et mono-glycérides d'acides gras à longue chaîne en acides gras et glycérol. Elles diffèrent des estérases (EC 3.1.1.1) en raison de leur capacité à hydrolyser des triglycérides à l'interface lipide-eau (Figure 4) (Cordova, 1998).

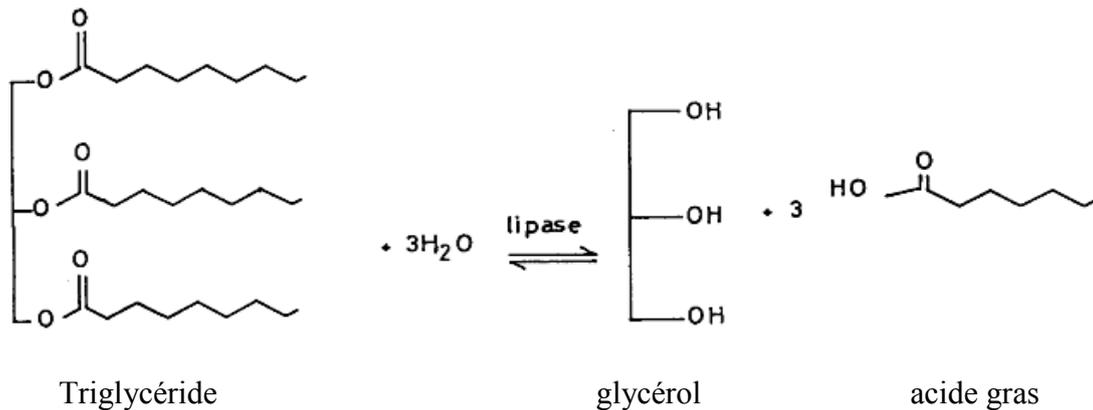


Figure 4: Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride. (Jaeger et al., 1994 ; Singh et Mukhopadhyay, 2012).

#### 4.3. Réactions réalisables par les lipases

Les lipases peuvent catalyser un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification sans oublier les réactions d'alcoololyse et d'acidolyse. Cette particularité des lipases de catalyser diverses réactions en fonction du microenvironnement de l'enzyme, ainsi que leurs spécificités et leurs conditions douces de réactions, les rendent intéressantes du point de vue industriel (Reis et al., 2008).

Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse tel que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres, nucléophiles tels que des amines ou des thiols (Figure 5) (Karam, 2007 ; Alloue, 2008)

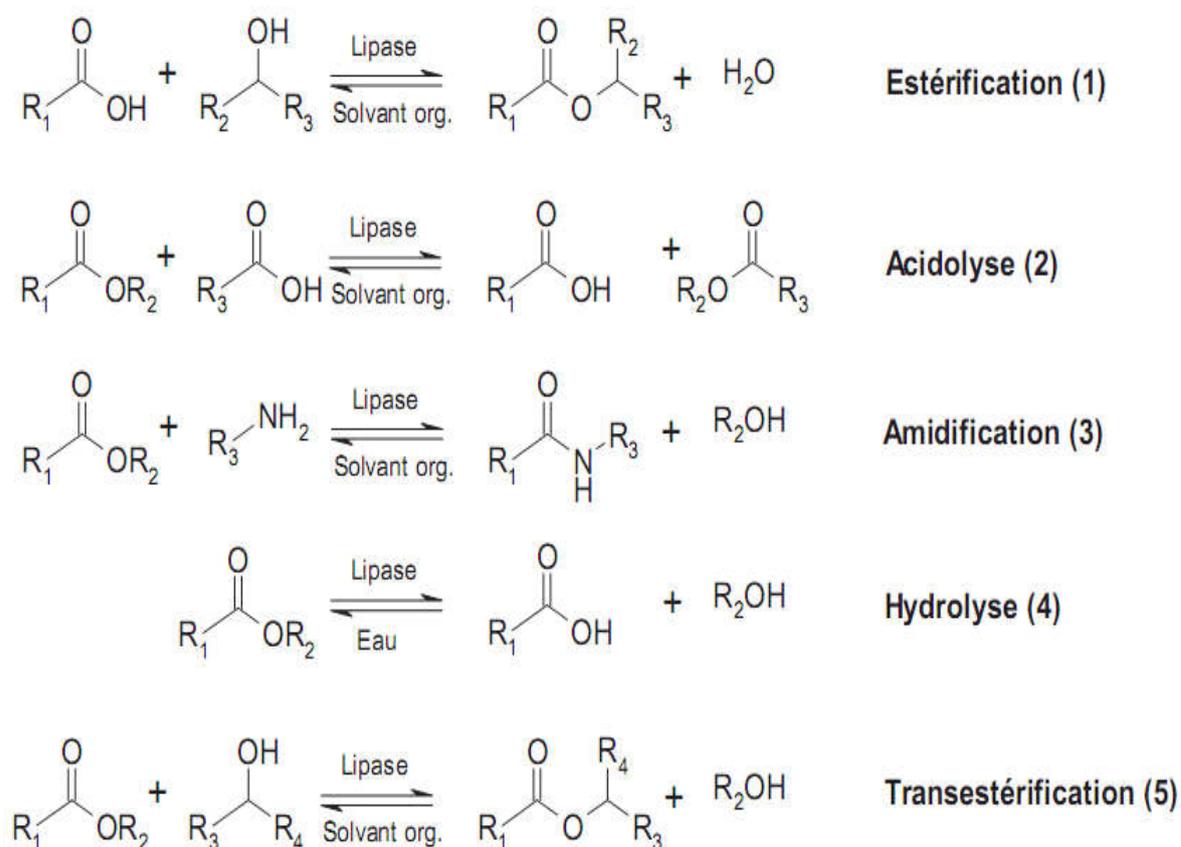


Figure 5: Différentes réactions possibles par utilisation de lipases.  
(Villeneuve et *al.*, 2000; Rouillard, 2012).

Les lipases peuvent être employées en synthèse organique en tant que catalyseurs de choix. En effet, elles présentent l'avantage de réaliser une multitude de réactions chimiques, allant de l'estérification (1), à l'acidolyse (2), en passant par l'amidification (3), l'hydrolyse (4) ou la transestérification (5) (Figure 5). En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (**Hupé, 2008**).

#### 4.3.1. Voie de dégradation des acides gras

Pour dégrader la biomasse, les champignons filamenteux différencient des structures cellulaires spécifiques qui permettent d'améliorer l'efficacité de la dégradation, mais aussi de déstructurer rapidement les matériaux. Une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation passe donc par la détermination des voies de signalisation qui permettent le développement de ces structures.

Le catabolisme des triacylglycérols (TAG) nécessite un système lipasique permettant de les dégrader en glycérol et acides gras. Les TAG sont dégradés préférentiellement sur les positions sn1 et sn3 (Figure 6). Le système catabolique de *Y. lipolytica* est très actif. Il comprend plusieurs lipases extracellulaires, intracellulaires ou membranaires et leur activité dépend de la présence d'acides gras ou de TAG dans l'environnement. Le gène LIP2 code une lipase extracellulaire qui hydrolyse préférentiellement les TAG dont les acides gras ont une longue chaîne carbonée (**Cescut, 2009**). Le gène LIP7 code une lipase membranaire spécifique du caproate (C6 :0) et le gène LIP8 code une lipase membranaire spécifique du caprate (C18 :0). Les gènes LIP1, 3 et 6 codent des carboxyl-estérases (**Fickers et al., 2006**).

Les acides gras ont un effet toxique pour la cellule. Ainsi, dès leur apparition dans la cellule, ils sont activés en thioesters de Coenzyme A, réaction catalysée par une acide-gras acyl-CoA synthétase présente dans les peroxysomes.

#### ***4.4. Spécificité de lipase***

Les lipases peuvent être classées dans trois groupes selon leur spécificité d'hydrolyse des triglycérides (**Jaeger et al., 1994**):

- a - Ces lipases ne présentent pas de spécificité d'hydrolyse, ni au niveau de la position du triglycéride, ni par rapport à la structure chimique de l'acide gras.
- b - Ces lipases hydrolysent les liaisons esters primaires (C1 et C3 du triglycéride).
- c - Ces lipases présentent une préférence prononcée par l'acide gras à hydrolyser (présence de doubles liaisons ou de la longueur de la chaîne de l'acide gras).

Certaines lipases hydrolysent indifféremment tous types de liaisons esters des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* et de *P. cepacia* (Figure 6) (**Alloue et al., 2008; Fickers et al., 2008**).

Les lipases de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus acnes* et de *Chromobacterium viscosum* hydrolysent indifféremment les positions sn-1, sn-2, sn-3 tandis que celles de *Pseudomonas geniculata* et de *P. fragi* sont spécifiques de la position sn-1 et sn-2.

Les lipases de *Pseudomonas glumae* et de *Pseudomonas fluorescens* semble quant à elles être spécifiques de la position sn-2 (Fickers et al. 2008).

L'hydrolyse de groupements esters en position sn-2 est catalysée par très peu d'enzymes et seule la lipase de *Candida antarctica* a montré une préférence nette pour cette position (Schrag et al., 1993).

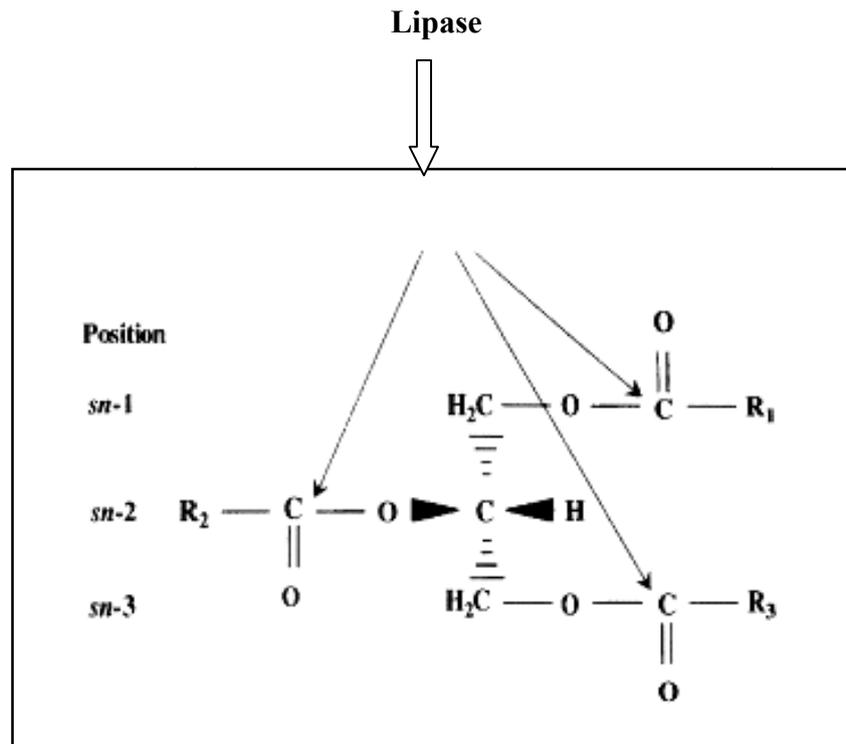


Figure 6 : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases (Muralider et al., 2002).

#### 4.3. Modèle cinétique interfacial

Le modèle de Michaelis-Menten a été conçu pour l'enzymologie en milieu homogène, c'est-à-dire lorsque la réaction enzymatique se déroule dans une phase unique dans laquelle enzyme et substrat sont solubles. Pour l'étude des enzymes lipolytiques qui agissent essentiellement à l'interface d'une phase aqueuse et d'une phase lipidique insoluble dans l'eau (enzymologie en milieu hétérogène), ce modèle ne peut être utilisé, en particulier car l'on passe d'un système tridimensionnel ou volumique, à un système bidimensionnel ou surfacique (Fickers et al., 2008).

Pour rendre compte des propriétés particulières des lipases, Verger & de Haas (Verger and De Haas, 1973) ont proposé un modèle cinétique interfacial (Figure 7). Dans ce modèle, la réaction enzymatique est décomposée en deux étapes:

-une étape d'adsorption de la lipase à l'interface lipidique (E: enzyme soluble dans l'eau, E\*: enzyme adsorbé). Une conséquence de l'étape d'adsorption est le changement dimensionnel de la concentration d'enzyme. Deux constantes de vitesse régissent cette étape:  $k_p$ : constante d'adsorption (ou de pénétration) de l'enzyme à l'interface et  $k_d$ : constante de désorption de l'enzyme. Cette étape peut ou non s'accompagner d'un changement de conformation de l'enzyme.

-une étape catalytique proprement dite, analogue à une pseudo-réaction de Michaelis-Menten, se déroulant en surface et non plus en solution. Toutes les concentrations des espèces impliquées dans la réaction (enzymes (E\* et E\*S), substrat lipidique (S), produit de la réaction (P)) sont donc exprimés en densité de surface ( $\text{mole.m}^{-2}$ ) et non plus en concentration volumique ( $\text{mole.m}^{-3}$ ). Les formes enzymatiques présentes à l'interface sont notées avec un astérisque (E\*, E\*S) afin de les différencier des formes enzymatiques solubles dans la phase aqueuse (E).

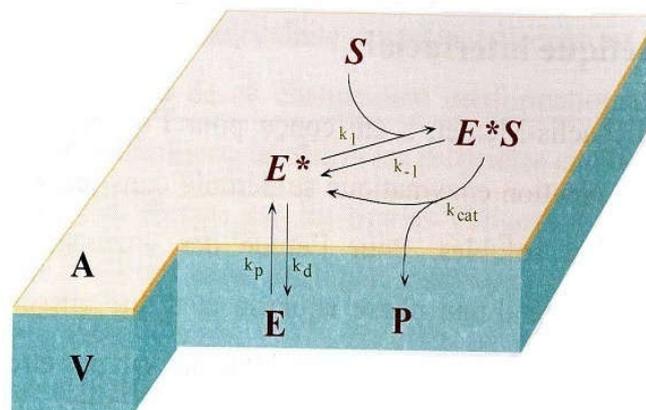


Figure 7: Modèle cinétique interfacial d'après Verger et de Haas, 1973, A est la surface et V le volume (Najjar, 2010).

### 5. *Microorganismes producteurs de lipases*

De nombreux microorganismes sécrètent des lipases dans le milieu de culture. Hou et Johnston (1992) ont criblés 1229 bactéries, levures, actinomycètes et champignons sur des plaques d'agar contenant de l'huile de Soja et de la rhodamine B et ils ont trouvé qu'environ 25 % de ces microorganismes présentent une activité lipolytique. La présence de lipases chez de nombreux micro-organismes leur permet d'utiliser des «sources non-conventionnelles» de carbone comme les triglycérides ou d'autres lipides contenant des liaisons ester (Najjar, 2010).

*Yarrowia lipolytica* est généralement considérée comme l'espèce de levure la plus lipolytique. Trois lipases ont été isolées chez cette espèce; Une est exocellulaire et deux sont liées à la paroi. La production de ces trois lipases est induite par l'acide oléique. Elles ont une activité optimale à pH 8 et à 37°C suivant les levures ces systèmes enzymatiques sont capables d'hydrolyser spécifiquement des acides gras de longueurs différentes (Alloue, 2008). La production de lipases extracellulaires peut être constitutive comme pour *Calvatia gigantea*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Rhodotorula glutinis*, mais elle peut aussi être induite par des substrats lipidiques comme chez *Candida rugosa*, *Geotrichium candidum* et *Yarrowia lipolytica* (Najjar, 2010).

Dans le passé, la sélection et l'isolement des microorganismes producteurs de lipases à partir des échantillons du sol ou d'autres matières biologiques a été portée le plus fréquemment dans un milieu solide contenant des triglycérides simples comme substrat, l'activité lipasique a été détectée par des zones claires due à l'hydrolyse de triglycérides (Pabai, 1997).

D'autres méthodes de criblages font l'usage des méthodes titrimétriques (Loperena et al., 2008). Screening de l'activité lipasique utilisant milieu solide qui contient le tween 80 en combinaison avec Nile-bleu a aussi été décrit. Récemment, le système de criblage utilisant des substrats chromogènes a été décrit (Hasan et al., 2009). Cependant, ces systèmes de screening ne détectent pas toujours des lipases à partir de consortiums.

De plus, quelques-uns de ces substrats ne sont pas convenables de détecter les vraies lipases parce qu'ils sont aussi hydrolysés par des estérases. La Rhodamine B a été employée pour le criblage des lipases bactériennes par UV (Kouker, Jaeger, 1987).

### **5.1. Habitat des microorganismes producteurs de lipase**

Les producteurs de lipases ont été isolés de divers habitats tels que les usines de traitement d'huiles végétales, effluents industriels, sols contaminés par des huiles comestibles et diesel, laiteries, aliments et graines oléagineuses en décomposition, pointes de charbon, sources thermales et tas de compost (**Veerapagu et al., 2013**). Le sol est un microhabitat complexe naturel pour tous les composants vivants et non vivants. Un grand nombre de plantes et de micro-organismes résident dans le sol, ce qui fait du sol le plus grand réservoir de diversité biologique au monde. Le sol est un habitat principal de plusieurs types de microorganismes (**Sharma et al., 2016**). La diversité de ces micro-organismes dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques liées au climat et au type de sol. pH, texture, rayonnement solaire, température, aération, composition minérale et teneur en eau. Le sol contaminé par des huiles possède également une diversité de micro-organismes produisant des enzymes. Ces micro-organismes sont exploités pour leur potentiel en tant que producteurs de lipases (**Pandey et al., 2015**). Des travaux approfondis sur les microbes produisant des lipases sont disponibles, en mettant l'accent sur le clonage et l'expression des gènes des lipases, la caractérisation structurale, les paramètres cinétiques et l'action des enzymes (**Sharma et al., 2001**). En revanche, relativement peu de travail a été fait sur le criblage des microbes lipolytiques provenant de sols contaminés par des huiles comestibles. Par conséquent, des échantillons de sol provenant de diverses huileries ont été utilisés pour l'isolement et le criblage de bactéries lipolytiques par **Veerapagu et al. (2013)**. De même, de nombreux chercheurs ont suggéré que les échantillons de sol huileux étaient la source d'isolement des champignons lipolytiques (**Sharma et al., 2016**).

### **5.2. Mécanisme de production de lipase microbienne**

Les lipases sont synthétisées en présence d'inducteurs. Les lipides et autres substances apparentées présents dans les résidus agricoles soutiennent la croissance microbienne et agissent comme inducteurs pour la production de lipase. Plusieurs rapports ont montré que les huiles naturelles, les acides gras, les esters gras, les stérols, les sels biliaires, le Tween et le Span étaient parmi les inducteurs les plus couramment utilisés pour la production de lipase microbienne.

Des études sur la production de lipases à partir de différents microorganismes ont montré des variations entre différentes espèces, bien que l'exigence d'une source de carbone lipidique demeure essentielle pour la production de lipase.

Même en l'absence d'inducteurs, l'activité de la lipase pourrait être détectée dans certains micro-organismes. C'est le niveau basal (non induit) de l'enzyme et les preuves ont montré que les enzymes basales et induites sont biochimiquement identiques, produites par transcription de gènes structuraux identiques (Salihu et al., 2012).

La plupart des microorganismes naturellement adeptes des résidus agricoles appartiennent aux champignons filamenteux, en raison de leur capacité à s'étaler et pénétrer à l'intérieur du substrat solide, et les mycéliums fongiques synthétisent et libèrent une grande quantité d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Salihu et al., 2012).

### 5.3. Lipases fongiques

Les lipases fongiques ont été étudiées depuis les années 1950. Ils sont capables de digérer les graisses et se caractérisent par leur capacité à hydrolyser les graisses sur une large gamme de pH et de températures. Ces lipases sont utilisées en raison de leur procédé d'extraction rentable, de leur spécificité vis-à-vis du substrat et de leur tolérance à différentes températures, de leur pH élevé, de leur concentration élevée en solvants organiques et de leurs ions métalliques. Les champignons filamenteux sont des sources préférées de lipases parmi le reste des microorganismes producteurs de lipase. Les lipases des souches *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Geotrichum candidum* sont des catalyseurs attractifs pour la modification des lipides. Les avantages de l'utilisation de champignons filamenteux comme producteurs industriels de lipases extracellulaires par rapport au reste des microorganismes producteurs de lipase sont les suivants (Sharma et al., 2016).

(i) capacité à utiliser une large gamme de résidus de biomasse lignocellulosique comme source de nutriments; (ii) capacité à produire des lipases de manière extracellulaire dans le bouillon de fermentation; (iii) la séparation du mycélium fongique est très simple à partir du bouillon de fermentation par filtration sous vide en comparaison avec les levures et les biomasses bactériennes et (iv) la capacité à produire des lipases dans les SSF et SmF.

*A. niger* est l'un des micro-organismes les plus impératifs exploités en biotechnologie. Il est connu pour sa capacité à sécréter de nombreuses enzymes extracellulaires qui sont considérées GRAS (généralement considérées comme sûres) (da Silva et al., 2008).

La production de lipase par les champignons varie et dépend du type de la souche, des ingrédients du milieu de production, des sources de carbone et d'azote et des conditions de

culture telles que la température, le pH, l'aération. Mucor est connu pour sa thermostabilité et sa résistance aux conditions alcalines élevées (Cihangir et Sarikaya, 2004).

Quelques exemples de microorganismes lipolytiques sont rassemblés et regroupés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: souches fongiques productrices de lipases.

Microorganismes	Genres	espèces	références
moisissures	Rhizopus	<i>R. arrhizus</i> <i>R. chinensis</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. oligosporus</i>	Rajendran and Thangavelu, 2009 Wang et al., 2008 Hiol et al. 2000 Iftikhar et al., 2010
	Aspergillus	<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. melleus</i> <i>A. carbonarius</i>	Pera et al., 2006 Zhou et al., 2012 Toscano et al., 2011 Shangguan et al., 2011 Sethi et al., 2016 Niaz et al., 2014, Mayordomo et al., 2004 Amin et al., 2014 Ire and Ike, 2014
	Penicillium	<i>Pe. citrinum</i> <i>Pe. caseicolum</i> <i>Pe. camambertii</i> <i>Pe. chrysogenum</i> <i>Pe. Wortmanii</i> <i>Pe. cyclopium</i>	D'Annibale et al., 2006 Lamberet, Lenoir, 1972 Tan et al. 2004 Bancerz et al. 2005 Costa and Peralta, 1999 Chahinian et al., 2000
	Eurotrium	<i>Eu. herbanorium</i>	Adamczak, et al. (2004)
	Ophiostoma	<i>O. piceae</i>	Vaquero et al., 2015
	Trichoderma	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	Toscano et al. 2013, Ülker et al. 2011 Osman et al. 2012
	Fusarium	<i>F. graminearum</i> <i>F. solani</i>	Feng et al. 2005 Liu et al. 2009
	Acremonium	<i>Ac. alcalophilum</i>	Pereira et al., 2013
	Geotrichum	<i>G. candidum</i>	Schrag et al. 1993

		<i>Geotrichum sp.</i>	Ota et al. 2000
	Mucor	<i>Mucor sp</i> <i>Mucor muced</i> <i>Mucor hiemalis</i>	Abbas et al., 2002 Stern et al. 1954. Hiol et al.,1999
	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i> <i>C. cylindracea</i> <i>C. albicans</i>	Benjamin et al.,1998. Lakshmi et al. 1999 Brozzoli et al., 2009 Vakhlu, Kour,2006
Levures	Yarrowia	<i>Y. lipolytica</i>	Guerzoni et al., 2001
	Saccharomyces	<i>Sac. cerevisiae</i>	Vakhlu, Kour,2006
	Cryptococcus	<i>Cryptococcus sp.</i>	Kamini et al.2000; Garcia-Martos et al.,2000
	Trichosporon	<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar et al., 2008

### 6. Facteurs influençant la production de lipase

Des études quantitatives sur la production de lipase et les facteurs modifiant la libération de l'enzyme dans le milieu de croissance, ont été décrites chez de nombreux microorganismes (**Sharma et al., 2001**).

L'influence de la composition du milieu sur la production de quelques lipases est bien connue. Dans la majorité des cas, les milieux complexes comme le bouillon nutritif, les bouillons à peptones ou à l'hydrolyse de caséine additionnés d'extrait de levure, sont révélés d'excellents supports pour la croissance et la production de lipase chez de nombreux microorganismes : *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus freudenreihii*. Parfois l'addition d'une petite quantité de glucose semble nécessaire, notamment chez *Candida lipolytica* ; par contre, ce même composé à concentration trop élevée devient inhibiteur pour la production de l'enzyme. Cet effet a été également illustré chez *Geotrichum candidum* et chez *Pseudomonas fluorescens* (**Tsuzuki et al.,1999**).

### 6.1. Effet du pH sur les lipases

Le pH optimum de l'activité lipasique est généralement autour de 7. Le pH agit non seulement sur l'activité enzymatique mais aussi sur les propriétés de l'interface dans un système multiphasique, sur la solubilité des réactifs dans le milieu, ainsi que sur le partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et l'interface. Les lipases bactériennes ont généralement un pH optimum légèrement basique (8 – 8,5), alors que les lipases d'origine fongique ont un pH légèrement acide, avec par exemple, un pH optimum de 6,0 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica*, 6,5 pour la lipase de *Geotrichium candidum*, et 5,6 pour la lipase de *Rhizopus delemar*.

Cependant, il existe des lipases possédant une activité à des pH plus extrêmes, comme la lipase gastrique qui est stable et active jusqu'à pH 2,0. Les lipases de *Pseudomonas fragi*, *Mucor javanicus* ont un pH optimum situé entre 8 et 10 tandis que la lipase de *Torulopsis sp.* conserve 80% de son activité à pH 3,0 (**Gargouri et al.,2008 ; Sharma et al.,2001**).

D'autre part, certaines lipases sont stables et actives dans une large gamme de valeurs de pH. La lipase de *Pseudomonas cepacia* conserve 100% de son activité après son incubation pendant 24 h à 30°C pour une gamme de pH variant de 3 à 11 tandis que celle de *Fusarium heterosporum* est stable dans une gamme de pH variant de 4 à 10 (**Gargouri, 2008**).

La croissance et l'accumulation de lipides chez *Yarrowia* cultivée sur stéarine dont le pH initial du milieu varie de 5,5 à 6,5 a été étudié. Un pH initial élevé favorise la croissance mais un pH initial bas favorise l'accumulation de lipides. Les meilleurs rendements en biomasse et en lipides sont obtenus au pH de 6 (**Cescut, 2009**).

### 6.2. Effet de la température sur les lipases

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

uniquement pour les espèces de *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* (Bornsheur et al., 2002).

### **6.3. Stabilité en solvant organique**

La plupart des lipases microbiennes sont stables dans de nombreux solvants organiques et ne requièrent pas de cofacteur pour être actives. On peut les utiliser en tant qu'hydrolase ou comme catalyseur en synthèse organique. La stabilité dans les solvants organiques est désirable dans la réaction de synthèse. En littérature disponible, les lipases sont généralement stables dans les solvants organiques, avec un peu d'exceptions de stimulation ou d'inhibition (Benamia et al., 2008).

### **6.4. Effet d'ions du métal**

L'hydrolyse catalysée par une lipase peut être affectée par la présence de différents cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) et activée en présence de sels biliaires (Sharma et al., 2001). Les cofacteurs ne sont pas exigés généralement pour l'activité de lipase, mais les cations bivalents tels que le calcium stimulent souvent l'activité enzymatique (Davranov et Khalameiser, 1997 ; Bornsheur et al., 2002).

## **7. Applications biotechnologiques de lipase**

Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel. Cet intérêt provient principalement du fait d'une part, que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre pour les produire sont relativement simple (Ghosh et al., 1996, Singh, Mukhopadhyay, 2012). Elles présentent une large gamme de spécificité de substrat et une grande énantiosélectivité. Leurs domaines d'applications sont donc très vastes et variés.

### **7.1. En tant qu'hydrolase**

#### **7.1.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire**

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes, y compris le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras ; ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur (Najjar, 2010). Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en

chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis) (**Hasan et al., 2006**).

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages. L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l'enzyme utilisé, à la libération d'acides gras à courte chaîne (C4-C6) ou à plus longue chaîne (C12-C14), ce qui donne des arômes plus au moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'interestérisation d'huile et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels (**Sharma et al., 2001; Fickers et al., 2008**).

### ***7.1.2. Applications dans les détergents***

Les taches d'huile et de graisse ont toujours été difficiles à enlever. Souvent, on n'y parvenait qu'en cuisant le linge. Mais bon nombre de textiles modernes doivent être lavés à températures modérées, ce qui rend la tâche plus ardue encore. Les lipases apportent une aide précieuse dans ce domaine. Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases (**Ghosh et al., 1996, Jaeger et al., 1998; Najjar, 2010**).

Elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, par exemple de rouge à lèvres, de beurre, d'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules (**Sharma et al., 2001; Fickers et al., 2008 ; Mehta et al., 2017**).

### ***7.1.3. Applications en bioremédiation***

Les milieux aquatiques d'eau douce ou d'eau salée, ainsi que les sols, sont fréquemment contaminés par les huiles minérales. Ces contaminations constituent un problème environnemental et écologique majeur (**Najjar, 2010**).

Les lipases sont utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agro-alimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut entraîner le colmatage des canalisations. L'addition de lipases ou la culture dans ces effluents, permet d'en réduire la charge en lipide. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures. La bioremédiation est devenue la

méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués (**Gandhi, 1997; Hasan et al., 2006**).

#### **7.1.4. Applications en tannerie**

Les lipases sont également couramment utilisées en tannerie. Avant le tannage, les peaux sont lavées dans des bains alcalins (pH 8-13) en présence de lipases de façon à pouvoir éliminer les graisses sous cutanées. L'utilisation de lipases permet de diminuer la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques (**Hasan et al., 2006; Fickers et al., 2008**).

#### **7.1.5. Applications dans l'industrie du papier**

Actuellement, le premier ennemi dans l'industrie du papier est la poix. Ce mélange mou et collant, à base de résine et de goudrons végétaux, produit durant la fabrication de la pâte de bois, nuit à la qualité du papier. Ce sont en majorité les TG, le sitostérol et les esters de sitostérol qui posent des problèmes dans la fabrication mécanique de la pâte à papier à partir des résineux. L'entreprise japonaise a développé un procédé d'hydrolyse de ces esters par addition de lipases, ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier. Ce procédé est utilisé à une échelle de plusieurs centaines de tonnes de bois par jour (**Jaeger et Reetz, 1998; Singh et Mukhopadhyay, 2012**).

### **7.2. En synthèse organique**

Les lipases sont devenues un des groupes les plus importants d'enzymes pour ses applications dans les synthèses organiques (**Lotti et Alberghina, 2002**).

Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras poly insaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final. Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyl laurate) est utilisé en industries cosmétiques (**Sharma et al., 2001**).

### 7.2.1. Les lipases en industries cosmétique:

Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arôme soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7-octadien-1-ol qui présentent un arôme de rose ou soit par estérification directe. En effet, de nombreux esters de faibles masses moléculaires tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle sont des constituants d'arôme. Ils sont obtenus à partir de l'alcool et de l'acide correspondant en système non aqueux en présence de lipases de *C. antarctica* ou de *R. miehei* sous forme immobilisée. Les rétinoïdes (vitamine A et dérivés) sont de grand potentiel commercial dans les produits de beauté et de médicaments tels que produits du soin de la peau. Les dérivés du rétinol solubles dans l'eau ont été préparés par réaction catalytique de lipase immobilisée (Jaeger et Eggert 2002; Hasan et al. ,2006).

### 7.2.2. Application médicale et pharmaceutique:

Les lipases sont largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse des médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif. C'est le cas de la nikkomycin-B, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de certains agents antimoraux, de certains antibiotiques ou vitamines. Par exemple, le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont l'énantiomère (S) est 28 fois plus actif que l'énantiomère R (Jaeger et Eggert, 2002).

Les Lipases de *Candida rugosa* ont été utilisées pour synthétiser lovastatin, une drogue qui diminue le taux de cholestérol du sérum. L'hydrolyse asymétrique de 3-phenylglycidic ester acide qui est une clef intermédiaire dans la synthèse d'hydrochloride du diltiazem, un vasodilatateur coronaire largement utilisé, a été emportée avec *S. marcescens* (Hasan et al. ,2006 ; Mehta et al., 2017).

### 7.2.3. Résolution de mélanges racémiques

Parmi les enzymes hydrolytiques, les lipases sont les plus couramment utilisées pour la résolution des mélanges racémiques visant à obtenir des molécules de haute pureté optique. Les lipases sont ainsi impliquées dans un nombre croissant d'étapes de synthèse et concurrencent diverses techniques plus classiques parmi lesquelles nous pouvons citer la recristallisation fractionnée avec des sels chiraux, la résolution chimique par condensation de réactifs asymétriques ou la séparation sur des colonnes de chromatographie préparative chirale (Sharma et al.,2001;Hasan et al.,2006).

#### 7.2.4. Production des polymères biodégradables :

Lipases peut être utilisé comme biocatalyseur dans la production des composés biodégradables utiles. L'oléate du butyle a été produit par estérification direct de butanol et d'acide oléique pour diminuer la viscosité de biodiesel dans l'usage hivernal. Les esters Trimethylol propane ont aussi été synthétisés de la même façon comme lubrifiants. Lipases peut catalyser des synthèses d'ester et des transestérifications. Les polyesters aromatiques peuvent être synthétisés par des biocatalyseurs de lipases (**Sharma et al.,2001 ; Jaeger et Eggert 2002; Hasan et al. ,2006**).

#### 8. Stratégies de purification pour les lipases

La connaissance des activités de la lipase purifiée à utiliser à des fins biotechnologiques est obligatoire et peut servir de base ou d'autres applications. Diverses stratégies de purification ont été examinées pour la lipase. Dans le cas des lipases extracellulaires, il est principalement important d'éliminer d'autres contaminants du mélange de composés contenant la lipase par une stratégie appropriée. Les stratégies de purification classiques donnent un faible rendement dû à une grande surface hydrophobe près du site actif. De nouvelles étapes de purification sont obligatoires pour augmenter les rendements enzymatiques globaux et cela pourrait être réalisé en optant pour un système de chromatographie approprié.

Un des choix est la chromatographie d'interaction hydrophobe et il est considéré comme une stratégie commune. En plus de cela, l'échange d'ions et la chromatographie gel-filtration sont des méthodes couramment préférées. Système micellaire inversé, processus membranaires, immunopurification, chromatographie d'interaction hydrophobe avec un bras espaceur activé par époxy (ligand), chromatographie sur colonne utilisant du polyéthylène glycol ( PEG) / gel de sépharose et des systèmes aqueux à deux phases sont également recommandés.

Pour éviter de nombreuses étapes dans cette étude et pour minimiser les impuretés autant que possible, l'expérience a été répétée avec 50% d'acétone saturées avec des incréments graduels de 5% d'acétone. Utilisant les méthodes ci-dessus, de nombreuses lipases provenant de différents microorganismes ont été rapportées. 31 et 19 kDa ont été rapportés pour la lipase d'*Aspergillus niger*, 21,4 kDa pour *Rhodotorula pilimana*, 30 kDa pour *Rhizopus japonicus*, 51 kDa pour *Pichia burtonii*, 25 kDa pour *Aspergillus oryzae*, 49 kDa pour *Mucor hiemalis*, 35,5 kDa pour *Aspergillus niger*, 49 kDa pour *Cunninghamella*

*verticillata*, et 32 kDa pour *Geotrichum candidum*. Différentes stratégies de purification des lipases avec des sources variées ont été récemment décrites en détail par **Singh et Mukhopadhyay (2012)**, et il semble que la production de lipases à partir d'espèces fongiques entraîne des tailles moléculaires différentes dues aux variations du nombre de résidus d'acides aminés (**Gopinath et al., 2005**)

## ***II- Matériel et Méthode***

## **1. Isolement des souches lipolytiques**

### **1.1. Prélèvement**

Les échantillons ont été prélevés et isolés à partir des effluents des moulins d'olive et du sol contaminé par l'huile d'olive à proximité dans le Nord Est d'Algérie.

Les déchets d'olives utilisés dans cette étude ont été obtenus en octobre 2013 à partir d'un moulin d'huile d'olive. Ce grignon est de type brut, provenant d'une huilerie algérienne située dans la région d'Oued Fragha wilaya de Guelma (Nord Est de l'Algérie).

Tous les prélèvements (du sol et de grignon d'olive) sont réalisés dans des conditions d'asepsie et récupérés dans des flacons et des sachets stériles et paraffinés puis, emmenés au laboratoire de microbiologie du département de biochimie de l'université de Badji- Mokhtar de Annaba et gardés au frais (4°C) jusqu'à utilisation.

### **1.2. Isolement des souches fongiques**

L'isolement est réalisé selon la méthode de suspension - dilution (**Davet et Rouxel, 1997**). La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère de chaque échantillon. Cette dernière est préparée, en ajoutant 1g (de sol ou de grignon d'olive brute) dans 9 ml d'eau physiologique stérile, suivi, d'une agitation pendant 10 min.

A partir de cette solution, des dilutions décimales sont préparés par l'ajout successif de 1 mL de la solution à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de  $10^{-6}$ .

### **1.3. Milieux d'isolement**

Deux milieux ont été employés pour l'isolement des champignons(**voir Annexe 1**) :

- PDA (Pomme de terre Dextrose Agar) préparé ou commercialisé ont été utilisés.
- Sabouraud dextrose agar SDA

### **1.4. Ensemencement des souches fongiques**

Les échantillons ont été inoculés dans un milieu de culture PDA. La croissance bactérienne est inhibée par l'addition de Gentamycine après leur stérilisation à une concentration de (1 mL/L), le milieu de culture PDA, refroidi à 50°C, est coulé en boîte de Pétri sous des conditions stériles. Après solidification chacune des boîtes de Pétri estensemencée avec

1 mL de chaque dilution. L'incubation a été réalisée dans une étuve à  $30 \pm 2$  °C pour les milieux solides.

Les champignons ont été cultivés aussi à 30 °C dans des tubes et des boîtes de Pétri sur SDA (Yesilada et al., 1998).

### **1.5. Purification**

Après incubation, les souches obtenues sont repiquées par touche sur PDA jusqu'à l'obtention de souches pures.

Les souches ont été repiquées régulièrement et conservées sur milieu PDA. Les cultures ont été incubées à 30°C jusqu'à la colonisation complète de la surface gélosée et ensuite conservées à 4°C pendant 4-6 mois.

### **1.6. Conservation**

Les moisissures purifiées sont conservées à 4 °C, dans un milieu de conservation à 20 % glycérol (voir Annexe 1), après être ensemencées sur gélose PDA inclinées et incubées à 30 °C pendant 7 jours (Botton et al., 1990).

Les colonies sont conservés aussi dans de l'eau distillée stérile, pH 6,5, en stock pour les futures inoculations (Schinke et Germani, 2012).

#### ➤ Préparation des observations microscopiques à l'état frais

Dans les mêmes conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée comme suit :

Prélever un échantillon du mycélium dans la colonie, à l'aide de l'anse de platine stérile puis le déposer dans une goutte de liquide de montage sur une lame porte-objet stérile. Dilacérer le fragment mycélien avec l'anse de platine pour le rendre moins dense et mieux observable, sans autant l'abîmer complètement.

Recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle et la faire passer légèrement par dessus la flamme de la veilleuse du Bec Bunsen pour éliminer les bulles d'air formées. L'observation microscopique est réalisée aux grossissements (x10 x40).

## **2. Identification des souches isolées**

Pour l'observation visuelle, les isolats cultivés en PDA ont été utilisés. L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de (**Botton et al., 1999 ; Guirud, 2003**) ainsi que celles de (**Chabasse et al., 2002**).

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique), rarement à des propriétés biochimiques (**Botton et al., 1999**).

### **2.1. Identification microscopique**

Toutes les souches isolées sont soumises à une identification morphologique réalisée par une étude microscopique. Cette dernière est effectuée par un prélèvement soigneux d'un petit fragment de la flore microbienne (quelques spores et un fragment mycélien à la marge du thalle) à l'aide d'une anse en platine stérile, l'observation microscopique est réalisée au grossissement (objectif  $\times 10\times 40$ ).

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur des filaments mycéliens, différenciation des thallospores ,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...)

### **2.2. Identification macroscopique**

La moisissure sélectionnée est soumise à une identification macroscopique par un examen de la culture sur milieux gélosés; SDA et PDA (**Nwuche and Ogbonna, 2011**).

L'examen permet de déterminer les quatre caractères cultureux suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur. Le mode de croissance mycélien, de couleur, d'odeur et les changements de couleur moyenne de chaque isolat ont été examinés quotidiennement (**Nwuche et Ogbonna, 2011**).

#### **➤ IDENTIFICATION DE LEVURES**

L'étude des caractères biochimiques est réalisée par la mise en évidence du profil fermentaire des sucres, le test d'assimilation des sources carbonées- test API 20C AUX (Biomérieux, Belgique) Voir Annexe 1.

### 3. Mise en évidence de l'activité enzymatique

La première sélection de souches productrices de lipase était à la base de la grandeur de la zone de diffusion de l'enzyme (diamètre, cm) sécrétée dans le milieu de gélose par des colonies en croissance (**Bancerz et al., 2005**).

Les plaques de culture inoculées avec des souches ont été incubées à 30 ° C pendant 72h, le diamètre des colonies (d) et le diamètre des halos hydrolytiques transparents (D) autour d'eux ont été mesurés (**Colen et al., 2006**). Les isolats ont été sélectionnés sur la base de la plus grande zone de lipolyse.

#### 3.1 Milieu solide à base de tributyrine

Le dépistage lipolytique préliminaire a été réalisé selon la méthodologie décrite par **Ayinla et al., 2017**) avec quelques modifications. Le milieu utilisé était composé de peptone mycologique (5,0 g L<sup>-1</sup>), d'extrait de levure (3,0 g L<sup>-1</sup>), d'agar (10,0 g L<sup>-1</sup>) et de tributyrine (glycérine tributyrat) (sigma-aldrich) ajoutée pour donner une Concentration finale de 0,1% (v / v).

Après l'autoclavage du milieu (121 °C, 20 min), le mélange a été émulsifié par agitation vigoureuse pendant 15 minutes (**Roberts et al., 1987**) et après refroidissement à environ 60 °C, le milieu a été transféré dans des boîtes de Pétri et refroidi rapidement (**Zanotto et al., 2009**).

Les microorganismes ont été incubés à 30°C. L'activité lipolytique a été identifiée sur les plaques comme un halo transparent autour des colonies après 7 jours d'incubation (**Costas et al., 2004**).

Culture (% m / v dans l'eau distillée) : peptone 0,5%; Extrait de levure 0,3%; Tributyrine 0,1%; Agar 2%, pH 6,0 (**Griebeler et al., 2011**).

Le développement d'une zone claire est une indication de l'activité lipolytique, et sa superficie est une mesure de l'étendue de l'activité (**Gopinath et al., 2005**).

La production de lipase est indiquée par la formation des halos clairs autour des colonies cultivées sur des plaques de gélose contenant de la tributyrine (**Hasan et al., 2009**).

L'activité lipolytique est estimée par mesure des diamètres des zones de lipolyses selon la formule suivante :  $D/d$  dont D est le diamètre du halo total hydrolysé y compris le diamètre du disque et le d c'est le diamètre du disque (**Griebeler et al., 2011**;

**Hasan et al., 2013**). Les souches exhibant les diamètres les plus élevés (D/d) sont sélectionnées en tant que potentiellement productrices de lipases.

### **3.2. Milieu solide à base de Tween 80**

Le milieu décrit par **Sierra (1957)** a été utilisé pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel le monooléate sorbitane polyoxyéthylène (Tween 80) est utilisé comme substrat lipidique.

Le principe de cette méthode repose sur la précipitation des cristaux du sel de calcium de l'acide gras sous l'influence d'une lipase (**El marrakchi et al., 1988 ; Plou et al., 1998**). Si la souche fongique possède une enzyme lipolytique, la précipitation des cristaux de savon calcique sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies. En outre, si l'activité lipasique est intense, la précipitation apparaît sous forme de cristaux visibles à l'œil nu (**Delmotte, 1958**).

Le dépistage de l'activité lipase sur une plaque de gélose contenant du Tween 80 en combinaison avec le rouge du méthyle. Culture contenant (en g/l) : NaCl, 1, Tween 80 10, Agar 20, eau distillée 1000 mL (**Abed samad et al., 1989**). Les filtrats de culture ont été repérés sur des puits de plaques d'agar contenant Tween 80. La formation d'opalescence entourant la colonie fongique a été enregistrée comme positive pour la production de lipase (**Mukunda et al., 2012**).

## **4. Production de lipases**

### **4.1. Fermentation sur milieu liquide**

Pour la détermination de l'activité lipasique, les souches fongiques ont été cultivées sur un milieu minéral basal contenant (en g/L) :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  12 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{CaCl}_2$  0,25 g, sulfate d'ammonium à 1% et huile d'olive à 2% ont été utilisés comme sources d'azote et de carbone, le pH initial a été ajusté à 6 pour la levure et les champignons (**Falony et al., 2006**).

Les souches ont été inoculées dans des fioles Erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL du milieu et cultivée à 30 ° C sous agitation à 120 rpm (tours / min) pendant 96 h dans un incubateur agitateur.

La densité optique DO ont été mesurées à 600 nm par spectrophotomètre (SECOMAM) toutes les 24 h pendant 4 jours et des échantillons de 5 mL ont été recueillis, filtrés à l'aide du papier Whatman n° 1 (**Schinke et al., 2012**).

Après fermentation, les milieux de culture sont filtrés sur papier Whatman n° 1. Le filtrat clair obtenu représente l'extrait enzymatique brut, il est utilisé comme sources enzymatiques, puis il est congelé pour les dosages ultérieurs.

L'évolution de l'activité lipolytique ainsi que la densité optique ont été suivies toutes les 24 heures pendant une période de 96 heures.

#### **4.2. Détermination de l'activité lipolytique**

De nombreuses méthodes destinées à mesurer l'activité lipasique ont été décrites dans la littérature. La plupart sont basées, soit sur la disparition des triglycérides ou bien sur la production des acides gras (AG) (**Pabai, 1997**).

Au cours de cette présente étude, l'activité lipasique a été mesurée à l'aide du test quantitatif de titration des acides gras libérés par l'enzyme au sein d'une émulsion de triglycérides.

Le titrage d'AG libérés de l'hydrolyse de l'huile d'olive a été fait avec 0,05 M de NaOH en utilisant de l'huile émulsionnée comme substrat (**Pabai, 1997 ; Vardanega et al., 2008 ; Nwuche and Ogbonna, 2011; Hasan et al. 2013**). Pour ce faire, une émulsion d'huile d'olive est préparée comme suit : en mélangeant à l'aide d'un homogénéisateur (Dahian scientific, co ltd) 40 mL d'huile d'olive dans 400 mL d'une solution à 2% de gomme arabique provenant d'acacia (*sigma-aldrich*) préparée dans de l'eau distillée (**Hiol et al., 2000**).

La réaction enzymatique se déroule dans le mélange réactionnel, contenant 5 ml d'émulsion, 4 ml 50 mM tampon citrate-phosphate avec pH 6.0 et 1 mL d'enzyme, convenablement dilué à 35 °C pour 30 min. La réaction est arrêtée avec l'ajout de 15 ml de mélange acétone : éthanol (1:1 v/v). Les acides gras supérieurs obtenus sont titrés avec une solution de Na OH 50 mM.

Le mélange de dosage a été fait selon la méthode de **Hasan et al. (2013)** et **Hiol et al., (2000)** avec quelques modifications, on a ajouté 1 mL d'enzyme diluée convenablement à 4 mL d'émulsion et 5 mL de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) 0.1 Mole à pH 7.

L'autre mélange de dosage contenant 1 ml d'huile d'olive, 4,5 ml d'acétate 50 mM pH 5,6, 0,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M et 1 ml de solution enzymatique. La solution enzymatique précédemment obtenue a été utilisée pour le dosage de l'activité lipolytique. Le mélange a été incubé pendant 15 min à 30 ° C sous agitation continue à 120 rpm. Une unité de lipase correspond à la libération de 1 umol d'acide gras par minute à 30 ° C, pH 7 (**Yu et al., 2007**).

Différents prélèvements sont opérés au cours du temps et les tests d'activité lipasique sont réalisés sur les surnageants par titrimétrie, selon le protocole suivant :

Les mélanges réactionnels (5 ml d'émulsion d'huile d'olive ; 2 ml de tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM à pH 6,8 et 1 ml d'enzyme) sont incubés 20 min à 30°C sous agitation orbitale (120 rpm) dans des tubes en plastique de 20 ml. L'activité lipolytique est mesurée toutes les 24h pour chaque souche pendant 96h d'incubation.

L'activité enzymatique présente dans les tubes est calculée comme suit :

$$\text{Activité (U/ml)} = \frac{(V-V_0) \times M \times D}{(T \times E)}$$

$V_0$  = volume de soude mis dans l'échantillon témoin pour le dosage (ml)

$V$  = volume de soude mis dans l'échantillon (ml)

$T$  = temps de la réaction (min)

$M$  = molarité de la soude utilisée pour le dosage (mM)

$D$  = dilution effectuée sur l'échantillon dosé

$E$  = volume de l'échantillon utilisé pour le dosage (ml)

Une unité de lipase correspond à la quantité d'enzyme capable de catalyser la formation d'1 umole d'AG/min/ml dans les conditions opératoires décrites ci-dessus.

### **4.3. Détermination de la biomasse**

La biomasse a été déterminée en pesant la cellule sèche (**Wang et al., 2008**); Le poids sec de la biomasse est la méthode la plus utilisée pour analyser la croissance fongique. Cette méthode représente la manière la plus directe de connaître la quantité de biomasse produite.

Après une période d'incubation, les cultures ont été arrêtées pour estimer la biomasse produite, le poids sec de la biomasse est déterminé après filtration sur papier Whatman n° 1 (préalablement séché et taré). Le mycélium a été lavé deux fois avec de l'eau distillée. Les filtres ont été séchés à 80°C jusqu'à poids constant puis pesés (**Hiol et al., 1999 ; Sanchez et al. 1999 ; Colen et al., 2006**). Les valeurs étaient la moyenne de trois séries d'expériences exécutées simultanément.

### **4.4. Évolution du pH**

La mesure du pH par une électrode spécifique est théoriquement utilisable quand la réaction enzymatique libère des protons. L'action de la lipase sur un triglycéride libère des acides gras titrables par la soude. En fait, l'acidité libérée est titrée automatiquement au fur et à mesure de son apparition dans le milieu réactionnel par une solution de soude qui maintient le pH constant. La pente de la courbe obtenue (quantité de soude ajoutée en fonction du temps) permet de mesurer l'activité de la lipase.

## **5. Caractérisation partielle de la lipase de *Trichoderma sp.***

### **5.1. Étude de l'influence du substrat inducteur**

L'étude de l'influence du substrat inducteur a été réalisée dans le but d'améliorer la production d'enzyme par cet isolat sélectionnés en l'occurrence *Trichoderma sp.*

La méthode repose sur la mise de la souche dans des conditions optimales de croissances, en présence des inducteurs de l'enzyme.

Pour la production de lipase, les milieux de base contenant de l'huile d'olive à 1% (v / v) comme source de lipides ont été ajoutés. Du glucose et du Tween 80 ont été fournis comme sources de carbone supplémentaires à 1% et 2% (poids / volume). L'effet de ces substrats sur la croissance fongique et l'activité lipolytique a été étudié.

### **5.2. Effet du pH**

L'effet du pH est mis en évidence par dosage de l'activité enzymatique comme il a été décrit précédemment (section 4.2) en modifiant le pH du milieu réactionnel. Les pH 5,0, 6,0, 7,0 et 8,0 sont obtenus à partir des solutions  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1M). Le pH 9,0 est obtenu par ajout de Na OH (0,1 N). Les pH 3,0 et 4,0 sont obtenus par ajout d'acide citrique (0,1M).

### **5.3. Effet de la température**

L'effet de la température sur l'activité lipasique est mis en évidence par dosage de l'activité enzymatique comme il a été décrit précédemment (section 4.2). Il a été étudié en effectuant la réaction enzymatique à différentes températures dans la gamme de 25-60 °C à pH 7,0 en utilisant un tampon phosphate (100 mM).

# ***III-Résultats et discussion***

## 1. RESULTATS ET DISCUSSION

### 1.1. Dépistage et isolement des champignons lipolytiques

Des souches de champignons lipolytiques ont été isolées à partir des effluents des moulins d'olive et du sol contaminé par l'huile d'olive. Les déchets d'olives utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir de la fabrication locale d'huile d'olive de la région de Guelma (Algérie).

Au terme de l'analyse mycologique, différents genres ont été isolés et identifiés à partir des échantillons du sol et des déchets d'usines traditionnelles à savoir le genre *Penicillium* et *Aspergillus* et levures. Identification des souches fongiques.

Toutes les espèces isolées à partir des grignons d'olive et à partir du sol ont pu se développer dans les milieux de culture incubés à une température de 30°C. *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Mucor* sp., et *Candida albicans* et *Cunninghamella* sp .

Les résultats de cette étude sont compatibles avec les études précédentes démontrant que la production de lipase par les micro-organismes est largement distribuée dans des sols différents et des déchets agro-industriels (Sharma et al., 2011 ; Thota et al., 2012).

### 1.2. Identification

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de **Botton (1990)**, **Guiraud (2003)** ainsi que celles de **Chabasse et al.(2002)**. Les moisissures purifiées sont identifiées par un examen macroscopique qui est effectué après une incubation de 07 jours sur milieux SDA et PDA.

L'identification morphologique est encore largement utilisée, même si les caractéristiques observées ne peuvent être utilisées pour identifier précisément les espèces au niveau de l'espèce, mais suffisamment pour donner des indications ou des indices de sections ou de complexe d'espèces. En général, l'identification de *Aspergillus* sp. est basée sur les caractéristiques morphologiques de la colonie et des examens microscopiques **Botton (1990)**.

### 1.2.1. Aspects macroscopique et microscopique de quelques souches isolées

#### 1.2.1.1. *Aspergillus*

##### ➤ Caractères culturels généraux

Le genre *Aspergillus* présente une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (PDA, SDA) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces.

##### ➤ Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates. Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses.

#### 1.2.1.2. *Aspergillus fumigatus*

##### ➤ Caractères culturels

Mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques PDA et SDA à 30°C. *A. fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore ou jaune.

##### ➤ Aspect microscopique

Tête conidienne unisériée, conidiophore lisse, court, s'élargissant légèrement au sommet; vésicule subhémisphérique verte, fertile à sa moitié supérieure; phialides courtes, dressées, densément groupées, vertes produisant des conidies globuleuses, lisses.

#### 1.2.1.2. *Aspergillus terreus*

##### ➤ Caractères culturels

Après 48 heures, la colonie est blanche-jaunâtre, plate, veloutée, lisse, à contour échancré de 0,7 cm de diamètre ; revers jaune. Après 7 jours d'incubation à 30°C sur SDA, la colonie est duveteuse, d'un aspect feutré, présentant un bouton central,

quelques plis radiaires et un contour lobé, adhérente au milieu, jaunâtre puis marron clair de diamètre ~ 3.5 cm.

Sur PDA, les colonies sont duveteuses à poudreuses, plates, de teinte cannelle Revers jaune du à un pigment diffusible dans la gélose.

➤ Aspect microscopique

- Tête aspergillaire en forme d'éventail ;
- Conidiophore, hyalin assez long, se terminant par une vésicule hémisphérique courte sur toute sa moitié supérieure (ou les 2/3) bi sériée.
- Les phialides hyalins, parallèles, produisant des spores lisses, globuleuses.

**1.2.1.3. *Aspergillus versicolor***

➤ Caractères culturels

Sur milieu de SDA les colonies vieilles présentent des gouttelettes à leur surface.

Sur milieu de PDA le mycélium blanc à chamois; les nombreuses têtes des conidies rayonnent du presque vert au vert de cactus. Le revers est jaune brun au brun orange.

Cette espèce se remarque par la large rangée de pigmentation du mycélium et du revers, particulièrement si l'incubation des cultures a lieu pendant 7 jours ou plus.

➤ Aspect microscopique

Tête aspergillaire bisériée, radiée à subcylindrique.

Conidiophore lisse, hyalin, assez long; Vésicule sub-globuleuse ou peu allongé, fertile sur les 2/3 supérieurs avec 2 séries de stérigmates hyalins à verdâtres produisant des spores globuleuses lisses.

**1.2.1.4. *Cunninghamella***

➤ Caractères culturels

Les colonies de *Cunninghamella* se développent rapidement (maturité en 4 jours), sont cotonneuses et de couleur blanche à gris tannée. Le revers est pâle. *Cunninghamella elegans* produit des colonies purement grises. Alors que *Cunninghamella bertholletiae* peut pousser à des températures pouvant atteindre 45 ° C, *Cunninghamella elegans* ne croît pas à cette température. Les columelles de forme globuleuse.

➤ **Aspects Microscopique**

Sporangiophores portant des vésicules de forme sphérique qui bourgeonnent donnant des sporangioles contenant une spore .

**1.2.1.4 *Mucor sp.***

➤ Caractères cultureux

Les colonies présentent un développement aérien souvent important et envahissent de manière quasi-totale les boîtes de cultures en 5 à 7 jours sur PDA.

Le mycélium reste blanc avec peu ou pas de sporulation. Le revers est de couleur claire au blanc (Tableau 2).

➤ Aspects Microscopique

- Les sporocystes de forme ovoïdes
- Les sporangiophores non ramifiés.

**1.2.1.5. *Trichoderma sp***

➤ Aspects macroscopique

L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur PDA. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

➤ **Morphologie macroscopique sur SDA:**

*Trichoderma* espèce est un moule en croissance rapide qui arrive à échéance en 3 à 5 jours. La croissance commence comme des touffes blanches duveteuses qui alors compact et apparaissent laineux. Les touffes vertes peuvent se développer dans la colonie en raison de la production de conidies. L'inverse est typiquement un brun clair à jaune pâle.

➤ **Aspect microscopique**

Sous microscope optique, un mycélium peut être observé, composé d'hyphes jaunes, septés et ramifiés. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Tableau 2).

### **1.2.1.6 *Candida Albicans***

#### ➤ **Aspects macroscopique**

En culture sur milieu de SDA, on obtient en 24 ou 48 heures des colonies blanches, crémeuses, bombée d'aspect brillant. ne contenant que la forme levure (voir Tableau 2)

#### ➤ **Aspect microscopique**

Levures rondes ou ovalaires de 2 à 4 microns, bourgeonnantes, souvent accompagnées de filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens.

- Pseudomycélium abondant avec peu de blastospores.

### **1.2.1.7. *Penicillium sp.***

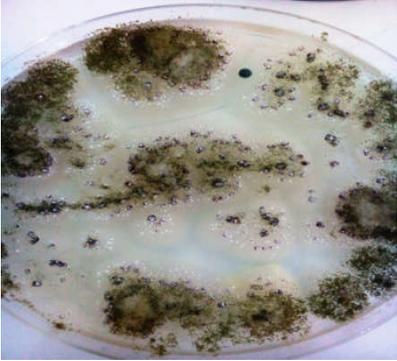
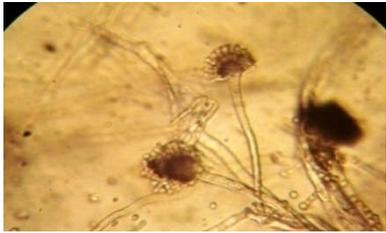
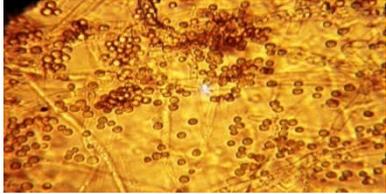
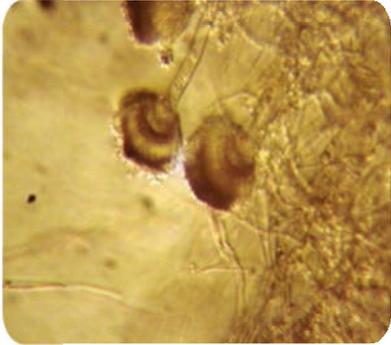
#### ➤ **Aspects macroscopique**

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (PDA, SDA). Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte jaune (Tableau 2).

#### ➤ **Morphologie microscopique**

Au point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille.

Tableau 2: Aspects macroscopique et microscopique de quelques moisissures microscopie, objectif (x10 x 40).

Aspects macroscopique		Aspect microscopique
Recto	Verso	
		 <p>têtes aspergillaires</p>  <p>Spores</p>
La souche suggérée : <i>Aspergillus fumigatus</i> (PDA)		
		
La souche suggérée : <i>Aspergillus terreus</i> (SDA)		
		

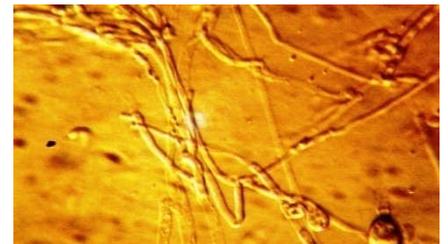
La souche suggérée : *Aspergillus terreus* sur PDA



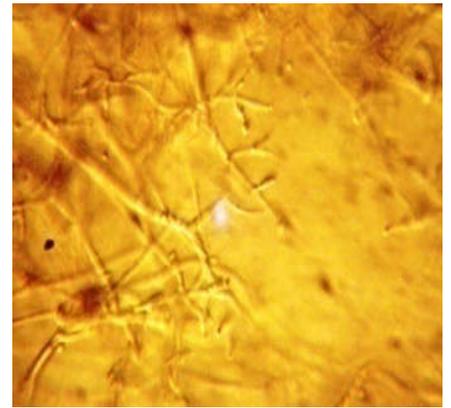
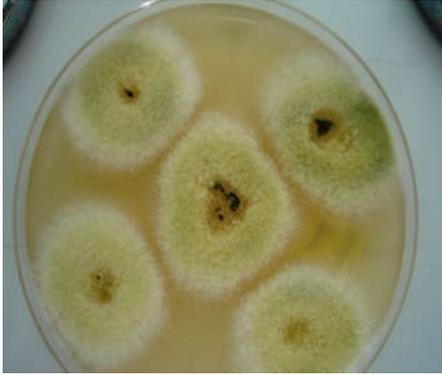
La souche suggérée : *Aspergillus versicolor*



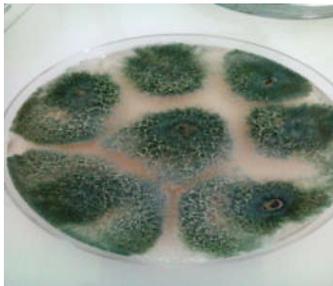
La souche suggérée : *Cunninghamella* sp.



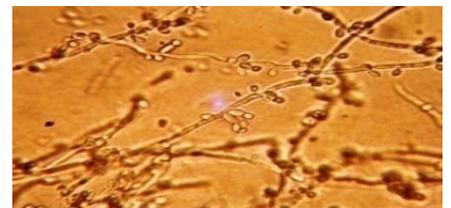
La souche suggérée : *Mucor* sp. sur PDA



La souche suggérée : *Trichoderma* sp. (SDA)

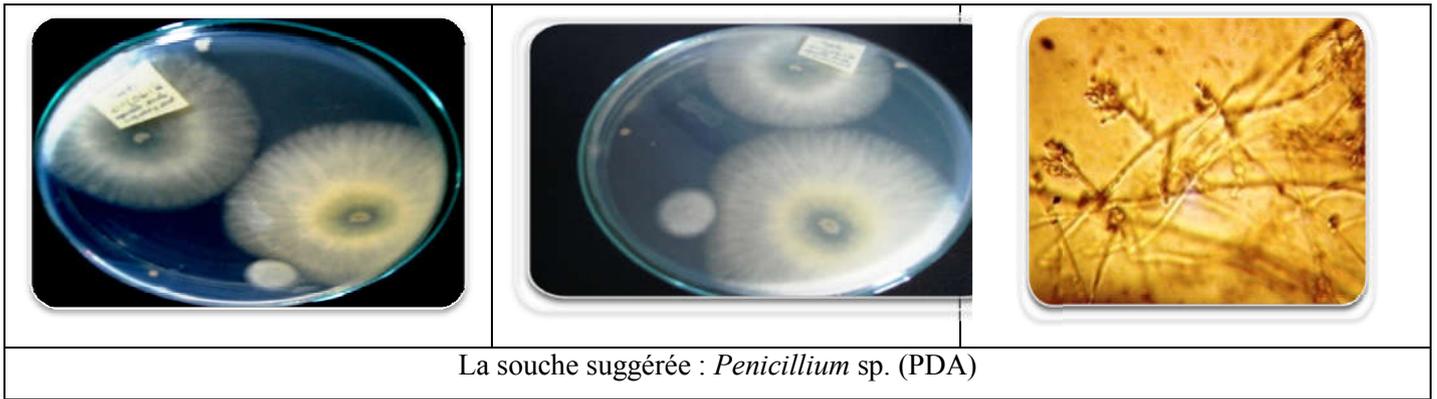


La souche suggérée: *Trichoderma* sp. (PDA)



chlamydospores

La souche suggérée: *Candida albicans* (PDA)



### 1.3. Mise en évidence de l'activité lipasique

#### 1.3.1. Sur milieu à base de tributyrine

Les micro-organismes isolés de déchets d'huilerie et du sol contaminé par l'huile d'olive ont été criblés pour leur capacité de produire de lipase sur un milieu solide.

Les isolats ont été purifiés et vérifiés pour leur potentiel lipolytique en utilisant un milieu solide à base de Tributyrine.

La production de lipase se traduit par la formation des halos clairs autour des puits gélosés. Les zones d'hydrolyse produites par la dégradation du Tributyrin sont visibles après 72 à 96 h de période d'incubation et qui sont attribuables à la présence de lipase libérée par des isolats de champignons. Parmi ceux-ci, les champignons filamenteux sont considérés comme une source idéale de lipases car ils produisent une enzyme extracellulaire en l'occurrence, *Trichoderma* sp., *Cunninghamella* sp. et *Mucor* sp. (Voir Annexe 1).

#### 1.3.1. Sur milieu à base de Tween 80

Le screening des microorganismes pour détecter l'activité lipasique est le plus souvent effectué en utilisant des milieux gélosés contenant de Tween 80.

Les diamètres des halos de clarification sont mesurés, la figure 8 permet de comparer le rapport D/d (diamètre de l'halo/ diamètre de colonie) des souches fongiques isolées. Les zones actives augmentent avec une période d'incubation et ces zones peuvent être mesurées.

Les résultats obtenus ont montré que le diamètre de l'halo est le plus important chez la souche *Penicillium* sp. Il y a une augmentation importante de l'halo de cette souche de 0.83 cm entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>èmes</sup> jour.

Cependant, Le taux d'augmentation de l'halo est restreint pour la souche *A. versicolor* (0.06 cm) quand le milieu de production a été supplémenté par 0.5 ml de T80. Par contre, le rapport D/d atteint (0.11 cm) quand le milieu de production a été additionné par 1 ml de T80. En fin, il atteint 0.5 cm sans addition de celui-ci.

Comme le montre la figure 8, le champignon *Penicillium* sp. a été identifié comme un bon producteur de lipase avec à *Aspergillus versicolor*. L'halo de cette souche était de 3,4 cm, 4,5 cm respectivement en 4 jours et 6 jours.

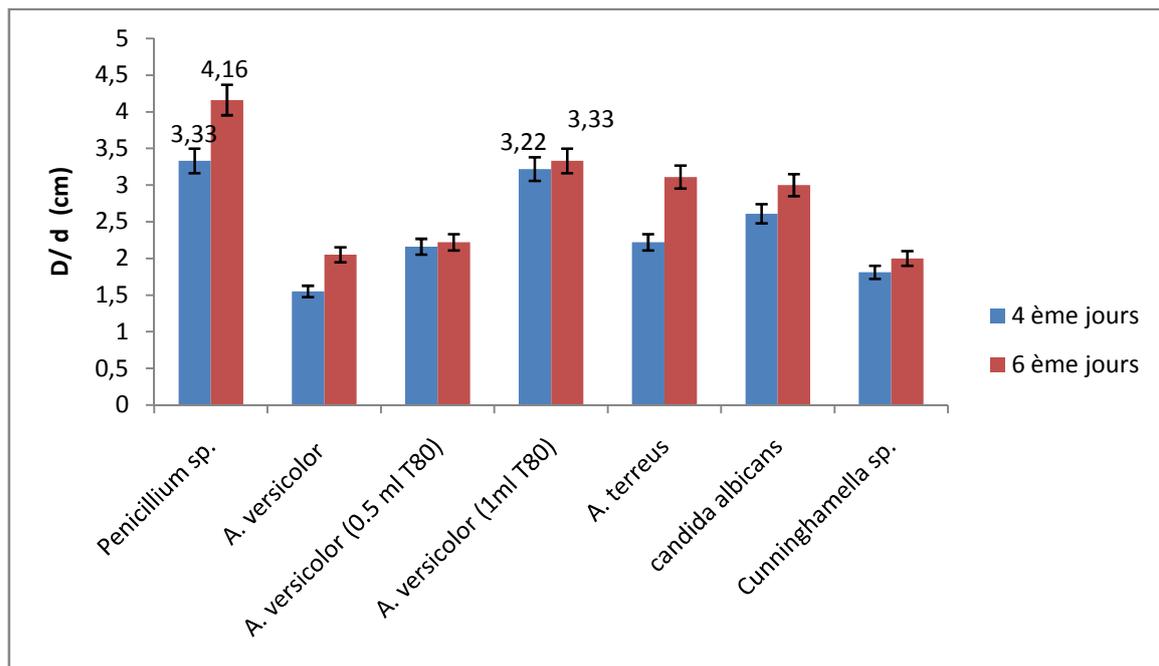


Figure 8: Évaluation des halos produits dans des milieux solides contenant du T 80 au quatrième et sixième jour de croissance des champignons. d : le diamètre de colonie (cm), D: le diamètre de l'halo (cm).

La souche *A. versicolor* est fortement lipolytique lorsqu'on utilise un surnageant de milieu minéral contenant 1 ml de T80 1% (source lipidique synthétique) (3,3 cm). Le diamètre de l'halo de ces souches là a augmenté avec le temps croissant d'incubation et il est devenu important après 6 jours d'incubation.

➤ **Sur milieu à base de Tween 80**

Les zones d'hydrolyse sont produites par les souches fongiques repérées sur des puits de gélose à base de T80 après 6 jours d'incubation contenant du surnageant qui est récolté

après 92h d'incubation, la lipase est produite en présence de glucose (+G) et en absence de glucose (-G). Les résultats sont représentés sur les figures 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15. Ces figures montrent que les halos d'hydrolyse sont formés autour des souches. Ces halos sont indicatifs d'activité lipolytique.

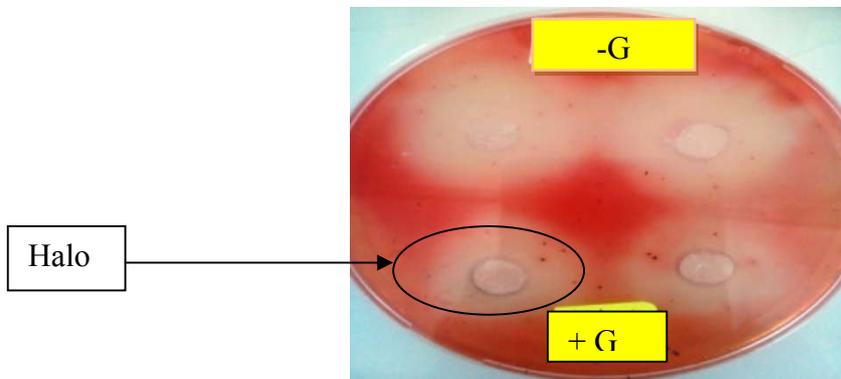


Figure 9: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Aspergillus terreus* repérées sur des puits de gélose à base de T80 après 6 jours d'incubation. (+G) en présence de glucose et (-G) en absence de glucose.

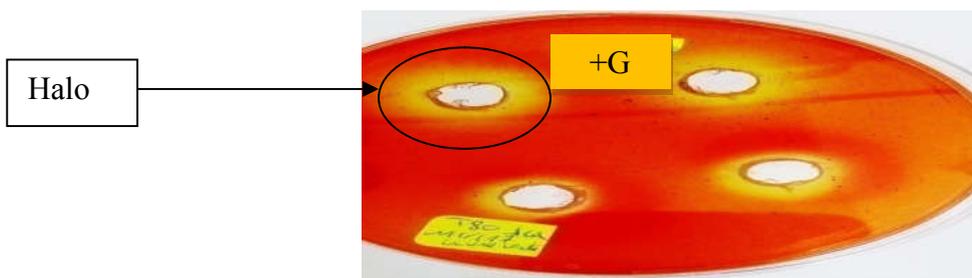


Figure 10: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Trichoderma* sp. sur milieu à base de T80, après 6 jours d'incubation. La lipase est sécrétée en présence de glucose.



Figure 11 : Zones d'hydrolyse produites par la souche *Mucor* sp. repérés sur des puits de gélose à base du T80 après 6 jours d'incubation.



Figure 12: Zones d'hydrolyse produites par la souche *A. versicolor* repérés sur des puits de gélose à base du T 80 après 6 jours d'incubation.



Figure 13: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Penicillium* sp. repérées sur des puits de gélose à base de T 80 après 6 jours d'incubation.

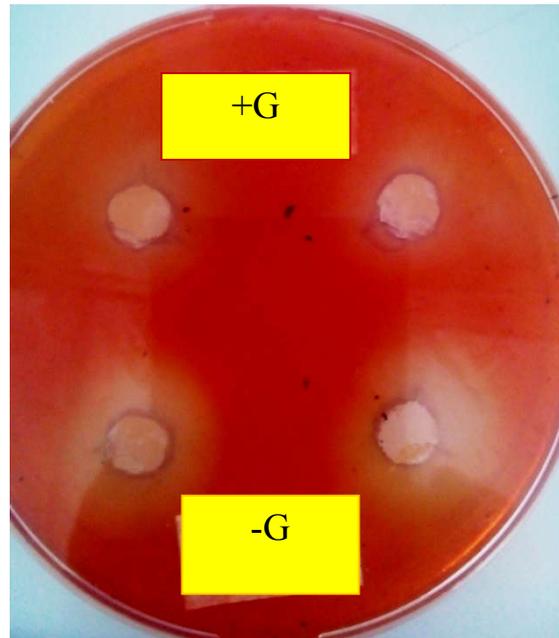


Figure 14: Zones d'hydrolyse produites par la souche *Candida albicans* repérées sur des puits de gélose après 6 jours d'incubation. Lipase sécrétée en présence de glucose (+G) et en absence de glucose (-G).



Figure 15: Zones d'hydrolyse produites par la souche *A. fumigatus* repérées sur des puits de gélose après 6 jours d'incubation.

Ces résultats montrent que la majorité des moisissures isolées présentent une activité lipolytiques sur le milieu solide à base de T80.

L'activité lipolytique de ces micro-organismes est due à leur capacité à produire et sécréter des lipases. Seuls, les isolats potentiellement lipolytiques sont retenues pour la production de lipase sur milieu liquide à base de l'huile d'olive.

Le développement d'une zone claire de Tween 80 autour du champignon était également une indication de l'activité lipolytique en accord avec **Mukunda** et ses collaborateurs (2012).

L'apparition des halos clairs sur les milieux solides à base de T80 est indicative d'activité lipolytique de ces souches. Ce résultat est en accord avec **Kawasaki et al., (1995)**.

L'hydrolyse catalysée par des lipases donnant lieu à des zones claires ou d'opacité développées autour de colonies de microorganismes lipolytiques. En effet, l'activité lipasique a été détectée par des zones claires dues à l'hydrolyse de Tween 80 par les souches fongiques qu'on a testées. Par détermination des zones d'opacité développées autour des colonies des microorganismes lipolytiques constitués de calcium (**Ionita et al., 1997**).

La productivité lipolytique des souches a été analysée après comparaison de la zone obtenue; **Cihangir et ses collaborateurs, (2004)** ont observé que l'activité lipolytique mesurée par les zones d'hydrolyse dépend du temps de culture.

#### **1.4 Poids secs des souches testées**

La figure 16 nous renseigne sur l'évolution de poids sec (Biomasses) de différentes souches. Les microorganismes ont été cultivés dans des flacons avec 50 ml de milieu de production pendant 96h d'incubation à 30° C avec agitation à 120 rpm.

La plus grande quantité de biomasse a été synthétisée par la souche *Mucor* sp. et par la souche *Trichoderma* sp. (794.5 mg  $\pm$  0.71 et 622.5 mg  $\pm$  9.19 respectivement), lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu minéral à 2% de l'huile d'olive en comparaison avec d'autres espèces fongiques utilisées comme représenté sur la Figure 16.

La plus faible quantité de biomasse a été notée pour la souche *Aspergillus versicolor* (260.5.mg  $\pm$  26.16).

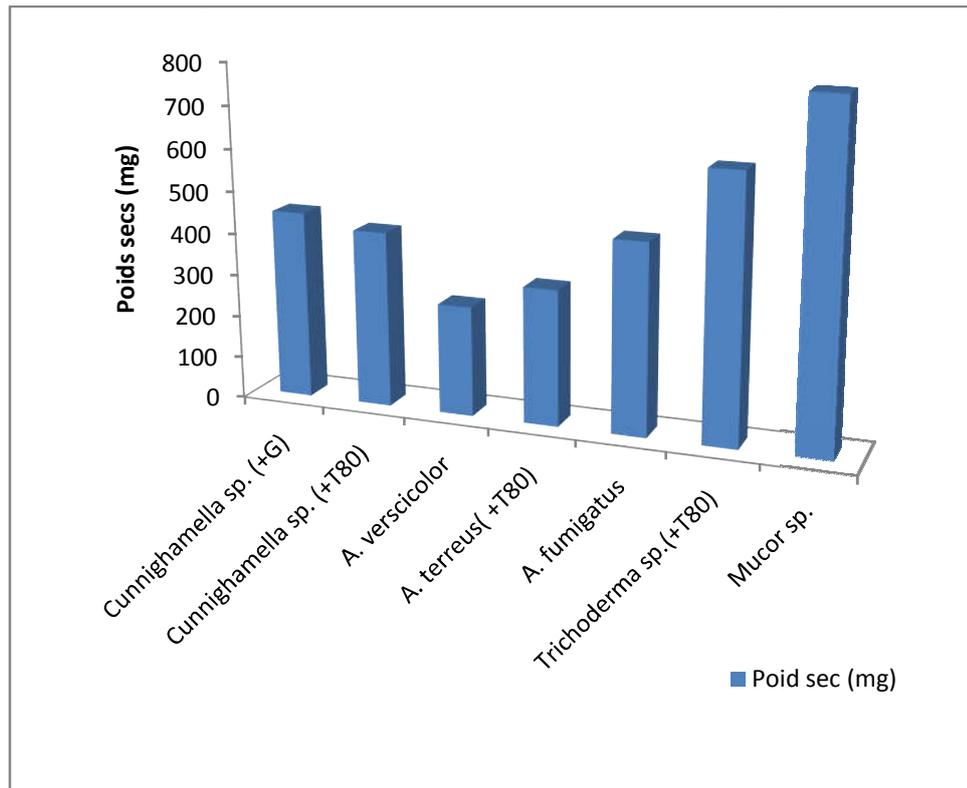


Figure 16: Comparaisons de poids sec de différentes souches après 96 h d'incubation à 30° C.

### 1.5. Production de lipases

La culture a été réalisée dans un milieu minéral additionné d'huile d'olive et de glucose (2%).

Comme le montrent les figures 17 et 18, la production de lipase extracellulaire augmente régulièrement avec le temps de culture. Elle atteint les valeurs de 1.83 et 1.01 U/ml pour les souches *Aspergillus terreus* et *Aspergillus versicolor* respectivement.

Cependant, le pH de milieu de culture pour les souches a diminué avec le temps de culture vers le côté acide à partir du pH initial ajusté à 6,1 et il atteint 3.29 pour *A. versicolor* Figure (17) et pour *A. terreus* il atteint 3,51 Figure (18) après 96 h d'incubation.

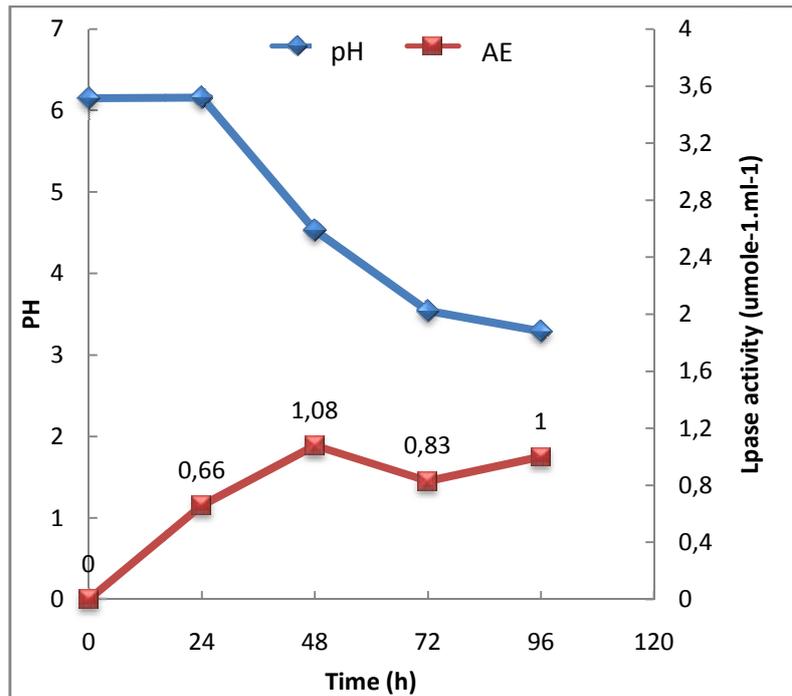


Figure 17 : Effet du temps d'incubation sur l'activité lipasique d'*A. versicolor*, et sur la variation de pH du milieu de culture.

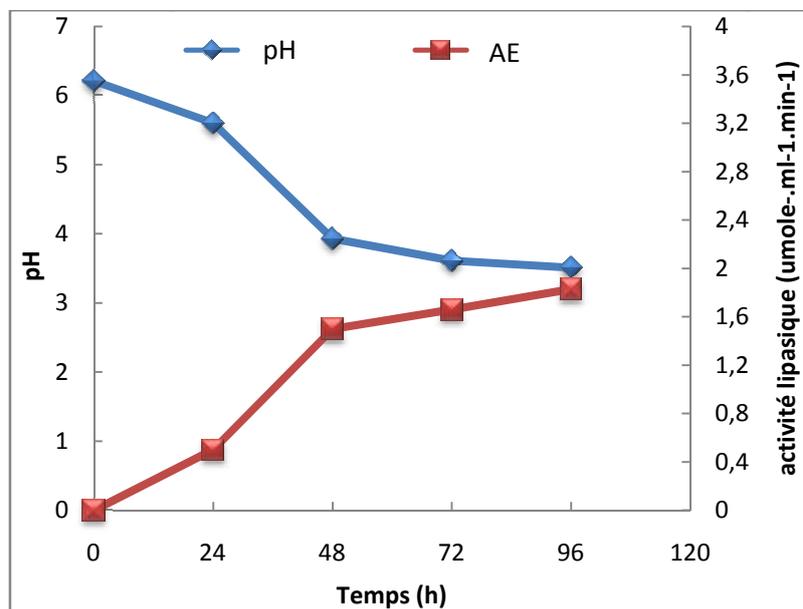


Figure 18 : Effet du temps d'incubation sur l'activité lipase d'*Aspergillus terreus* et sur la variation de pH du milieu de culture.

Pour la production de lipase, le choix d'un milieu de fermentation approprié est essentiel pour la souche choisie, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes,

Il a été démontré que l'activité lipasique est induite par la présence de substrats lipidiques dans le milieu comme huile d'olive. Ce résultat a été confirmé par **Falony et ses collaborateurs (2006)**.

La synthèse de l'enzyme a commencé autour du deuxième jour de la fermentation et l'activité maximale a été enregistrée après avoir atteint la phase logarithmique de la croissance. **Falony et al., (2006)** et **Ire et al. (2014)** ont démontré que la production de lipase par *A. niger* était partiellement associée à la croissance, la lipase maximale de cette souche est apparue au 4<sup>ème</sup> jour d'incubation, ce qui est similaire à nos découvertes.

En plus, **Ire et al. (2014)** ont rapporté que la production de lipase augmente en tant que le temps d'incubation augmente, mais elle diminue plus tard avec l'augmentation de la période d'incubation. Cette tendance de la production de lipase pourrait être attribuée à la dégradation protéolytique du système enzymatique.

La souche *A. versicolor* a présenté une production maximale de lipase dans les 48 h, mais la production de biomasse a diminué de 48 h à 72 h avec une activité lipolytique pratiquement identique, ce qui correspond à **Colen et al. (2006)**.

L'activité lipasique était à son maximum pendant la phase de croissance exponentielle, diminuait progressivement à la phase de croissance logarithmique tardive en raison de la production d'acide citrique dans le milieu. Des résultats similaires ont été documentés par **(Hiol et al., 2000)** qui ont observé une activité lipasique maximale après 4 jours d'incubation avec *Rhizopus oryzae* (**Amin et al., 2014**).

Nos résultats sont en accord avec les études réalisées par **Thota et al., (2012)** qui ont observé que la lipase a été sécrétée au maximum à 96 h (4 jours) de la période d'incubation par quatre souches fongiques ; *A. terreus* en présence de glucose ou T80 , *Mucor sp.* en présence de Tween 80 et *A. versicolor* Tween 80 à 2% et *Cunninghamella sp.* en présence de Tween 80 à 1%.

Par contre, pour la souche *penicillium sp.* la lipase a été sécrétée au maximum à 72h de la période d'incubation et *Cunninghamella sp.* en présence ou en absence de glucose.

En accord avec d'autres auteurs qui ont rapporté la faible quantité de lipase produite (1,84 U.mL<sup>-1</sup> après 66 heures et 12,55 U.mL<sup>-1</sup> après 72 heures sécrété par *Candida rugosa.*, 4,0 et 13 U.mL<sup>-1</sup> avec *Aspergillus niger* et *Penicillium restrictum* dans des conditions de

fermentation submergée, la production de lipase de *Penicillium verrucosum* est obtenu un rendement enzymatique maximal de 3.22 U.mL<sup>-1</sup> à 96 heures et de 2,63 U.mL<sup>-1</sup> à 72 heures dans un milieu de fermentation conventionnel et industriel respectivement. De plus, *Mucor griseocyanus* a produit 0.113 UI.mL<sup>-1</sup> dans des conditions optimales de fermentation (Naqvi et al., 2012).

La réduction du rendement en lipase après une période optimale est probablement due à un pH acide du milieu. De plus, Il est suggéré que la baisse du rendement en lipase après des périodes d'incubation prolongées pourrait être due à la production de protéases conduisant à l'inactivation de l'enzyme (Sanchez et al., 1999). Il se pourrait aussi qu'au début, le micro-organisme s'adapte aux conditions environnementales.

De plus, Rywińska et al. (2008) ont attribué les réductions de la production de lipase à une activité accrue des enzymes protéolytiques produites simultanément.

Dans une autre étude, Les diminutions de l'activité lipolytique étaient probablement dues à la fois à la diminution du pH et de quantités du substrat (Corzo et Revah, 1999).

D'après Loo et al.,(2006), la diminution du pH du milieu pendant la croissance pourrait également contribuer à la perte d'activité.

Globalement, dans la dernière phase de croissance, la diminution du nombre de champignons ainsi que du taux de biodégradation et de l'activité lipasique peut s'expliquer par l'appauvrissement du substrat, l'effet inhibiteur des métabolites et un déclin du pH remarquable. Le pH du milieu diminue même jusqu'à une valeur de 3,8 après 72 h de culture. Une corrélation similaire entre l'acidification du milieu et le taux de dégradation des lipides a été rapportée dans la littérature (Čipinytė et al., 2009).

### **1.5.1 Effet de tween 80 sur la production de lipase**

L'addition dans les milieux de cultures d'huile d'olive ou d'un ester tensioactif comme le Tween 80 a un effet beaucoup plus complexe. Leur présence est favorable à la production de lipase acide, en particulier elle limite l'effet inhibiteur que peuvent présenter certaines sources de carbone ou certains anions comme les phosphates ou le succinate.

Comme le montre la figure 19 (a), la souche *A. versicolor* a présenté une production optimale de lipase jusqu'à 48 h et elle atteint  $1.25 \text{ UI.ml}^{-1}$  puis elle a diminué un peu. La production de biomasse a augmenté au maximum à 48 h (DO est 3.04) à 72 h elle a diminué un peu à 2.95 avec une activité lipolytique pratiquement identique.

La souche *A. versicolor* a présenté une production maximale de lipase à 96 h et elle atteint  $1.58 \text{ UI.ml}^{-1}$ .

On a constaté que l'activité lipolytique maximale était de  $2,5 \text{ UI.ml}^{-1}$  à 48 h dans un milieu contenant 1% de Tween 80 Comme le montre la figure 19 (b), alors que la production de lipase extracellulaire a diminué à  $1,6 \text{ UI.ml}^{-1}$  dans un milieu à 2% de Tween 80.

Donc, la concentration de tween 80, dans le milieu de culture, peut influencer, mais d'une manière faible, la production de la biomasse et de l'enzyme de la souche *A. versicolor*. En effet, Le Tween 80 d'une concentration de 1% était le meilleur inducteur pour la production de lipase extracellulaire d'*A. versicolor* et ceci est similaire aux résultats de **Sathish Yadav et ses collaborateurs (2011)**.

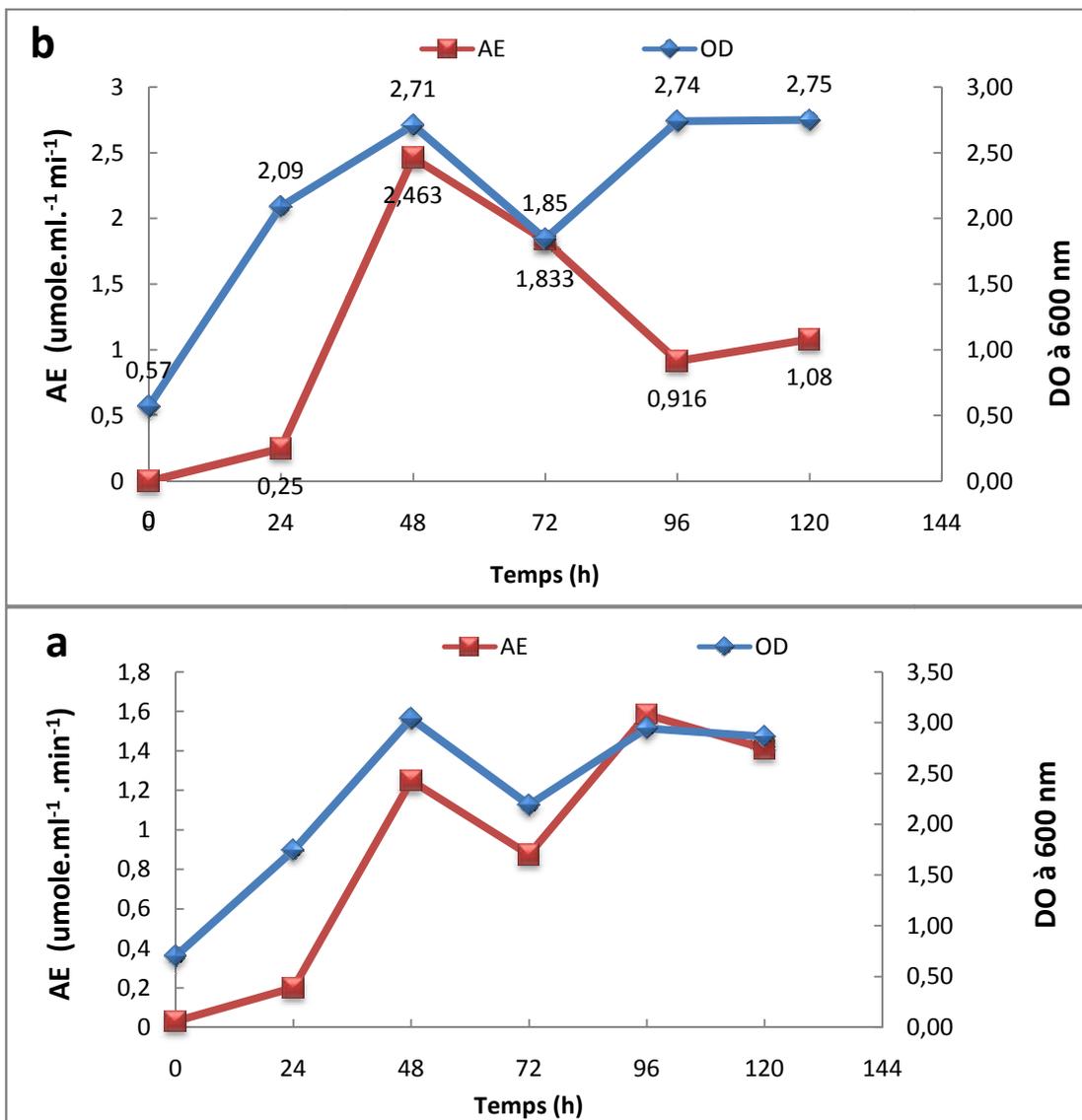


Figure 19: Effet de la concentration de tween 80 sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de *A. versicolor*, dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur supplémenté par Tween 80 à 2% (a), Tween 80 à 1% (b).

L'évaluation de la croissance cellulaire et de l'activité lipolytique des souches *Mucor* sp, en ajoutant de faibles concentrations de l'huile d'olive (1%), en présence de tween 80, sont représentées dans la figure 20.

Comme le montre la figure 20, la souche *Mucor* sp. a présenté une production maximale et tardive de lipase après les 96 h et elle atteint 1.70 UI.ml<sup>-1</sup>, ainsi la production de biomasse a augmenté après 48 h d'incubation, tandis que le pH a diminué de 6.8 à 5.9.

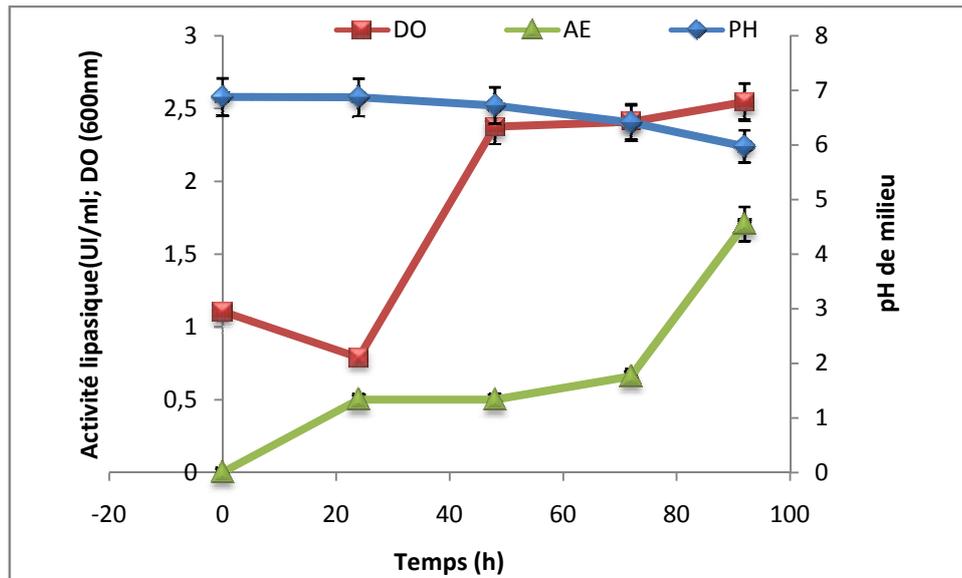


Figure 20: Évolution de l'activité enzymatique (AE), la croissance de souche *Mucor* sp. (DO) et le pH de milieu en fonction de temps dans un milieu minéral contenant l'huile d'olive et Tween 80 à 1%.

L'évolution dans le temps de la synthèse des lipases dans le milieu minéral par *A. fumigatus* était suivi par la mesure de l'activité lipasique, de la biomasse et du pH. Les résultats sont représentés sur la figure 21.

Le milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et supplémenté par Tween 80.

La production de lipase a commencé à 24 h et a atteint son maximum à 96 h. Cependant, une augmentation supplémentaire du temps d'incubation n'a pas entraîné une augmentation correspondante dans l'activité de la lipase.

La variation du pH du milieu de croissance avec le temps est représentée aussi sur la même figure 21. Le pH diminue fortement de 7,1 à 4,2 pendant les 24 premières heures, puis augmente légèrement à 4,9 dans les 24 heures suivantes et diminue progressivement à partir de là.

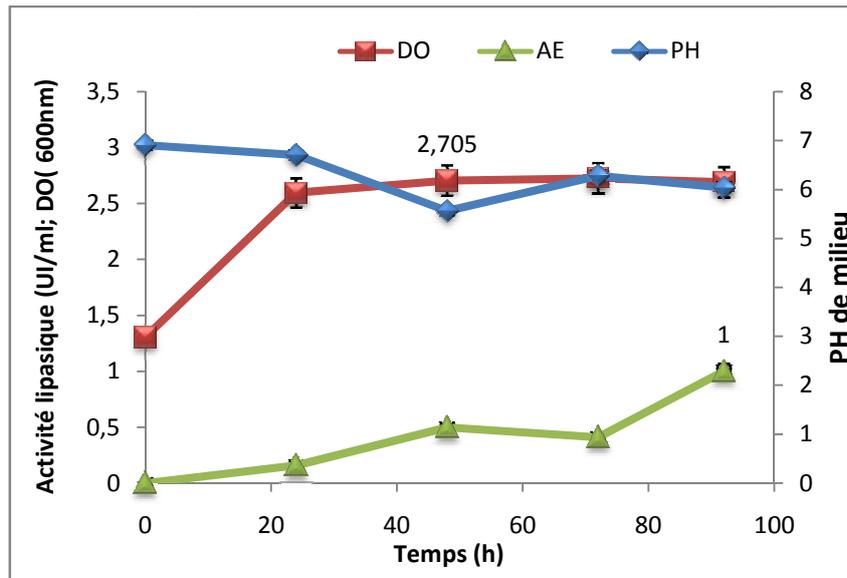


Figure 21 : Évolution de l'activité enzymatique (AE) et la croissance de souche la souche *A. fumigatus* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et supplémenté par Tween 80 (1%).

La figure 22 montre l'évolution de la croissance cellulaire et la production de lipase, au cours de la fermentation de souche *Cunnigamella sp.* dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive en présence (A) et en l'absence (B) de T80.

Comme le montre la figure 22, la souche fongique *Cunnigamella sp.* a présenté une production maximale et tardive de lipase après les 96 h dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive en présence de T80; elle atteint  $1.33 \text{ UI.ml}^{-1}$ , ainsi la production de biomasse a augmenté après 72 h d'incubation ( $\text{DO}=2.56$ ) puis elle commence à diminuer un peu. Cependant on remarque un déclin du pH remarquable; il a diminué progressivement de 6.89 à 6.16.

D'après les résultats, on peut remarquer que la biomasse cellulaire atteint des concentrations maximales, en présence de tween 80, après 48h de culture. En revanche, l'activité enzymatique atteint le maximum en absence de tween 80.

Donc, la disponibilité du tween 80, dans le milieu de culture, peut augmenter la production de la biomasse mais pas la production de l'enzyme.

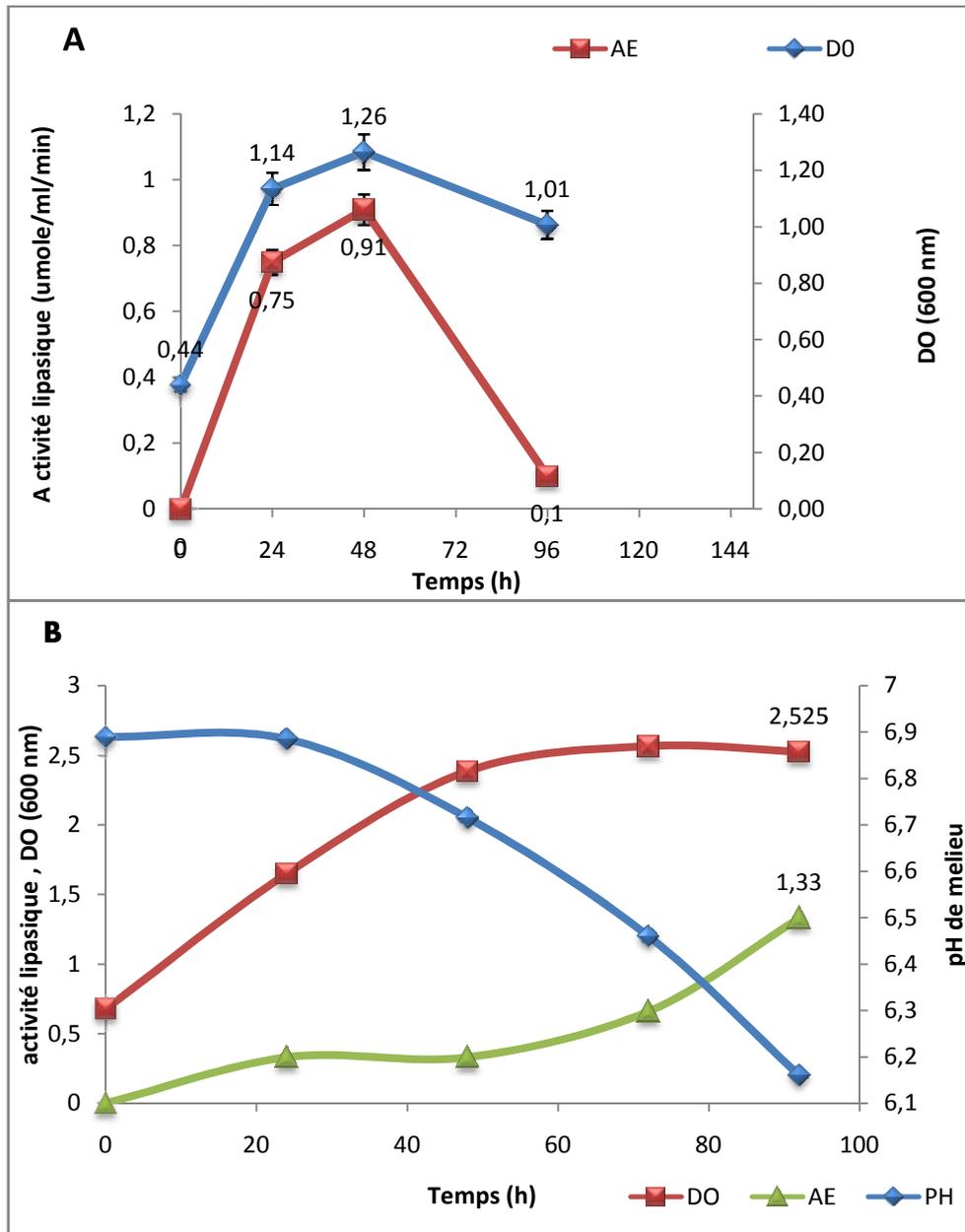


Figure 22 : Effet de T80 (1%) sur la production de lipase extracellulaire, sur l'évolution de la biomasse et le pH de milieu de la souche fongique *Cunninghamella sp.* (A) en absence de T80 et (B) en présence de T80.

L'huile d'olive et le tween 80 sont souvent, utilisés dans les milieux de fermentations, non seulement, comme inducteur de la production d'enzyme mais aussi, comme source de carbone et d'éléments nutritifs essentiels pour la croissance microbienne (Dalmou et al., 2000). Il est à noter que Corzo et Revah (1999) ont montré que l'activité de la lipase est influencée positivement chez *Y. lipolytica* dans le milieu contenant 1% d'huile d'olive ( $32 \mu\text{M mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), par la présence, en même temps, des deux inducteurs dans le milieu

de culture. Or, les souches isolées dans notre étude, donne une bonne activité de lipase sans ajout de tween 80 comme *Mucor sp.* *Cunnigamella sp.*

Par conséquent, cet agent tensioactif a augmenté la biomasse, en fin de culture. Cependant, son ajout à un effet réducteur sur la production de l'enzyme pour la souche *Cunnigamella sp.*

Contrairement à certaines études, il a été déterminé que les concentrations de Tween 80 entre 0,5 et 2 g / l ont augmenté l'activité de la lipase extracellulaire sans modification de la concentration de biomasse (**Corzo et Revah, 1999**). Ils ont rapporté aussi que l'activité lipasique dans le milieu sans Tween 80 était significativement plus faible que l'activité lipasique dans le milieu avec Tween 80.

Les lipases peuvent être induites par la présence de composés lipidiques mais une trop forte concentration de cet inducteur a un effet inhibiteur (**Chennouf, et al.,1995**)

#### ***1.5.2. Étude de l'influence du glucose***

L'étude de l'influence du substrat inducteur a été réalisée dans le but d'améliorer la production d'enzyme par les isolats sélectionnés.

L'activité enzymatique mesurée durant la croissance du champignon *Penicillium sp.* est présentée dans la figure 23.

L'activité lipolytique la plus élevée a été trouvée dans la culture supplémentée par le glucose figure 23 (b) (environ 4,3 UI.mL<sup>-1</sup>), mais l'activité lipolytique a été trouvée en culture sans glucose autour de 2,12 UI.mL<sup>-1</sup> figure 23(a), le glucose a également donné différents niveaux de biomasse; le poids sec de la souche *Penicillium sp.* atteint 794 ± 1,41 (mg) de glucose, et en absence de glucose était de 200 ± 0,71 (mg /ml) pendant 96 (h).

L'évolution de la courbe de DO de la souche *Penicillium sp.* est passée par trois phases présentée dans la figure (23 b) en présence de glucose : la première phase on remarque une croissance lente ; en deuxième phase une croissance rapide, la DO atteint 2.64 à 48h et après on remarque une augmentation faible et maximale à 72h, la DO atteint 2.72 et en fin un déclin de croissance.

En revanche, en absence de glucose on remarque une perturbation de la DO avec une valeur maximale de 1.22.

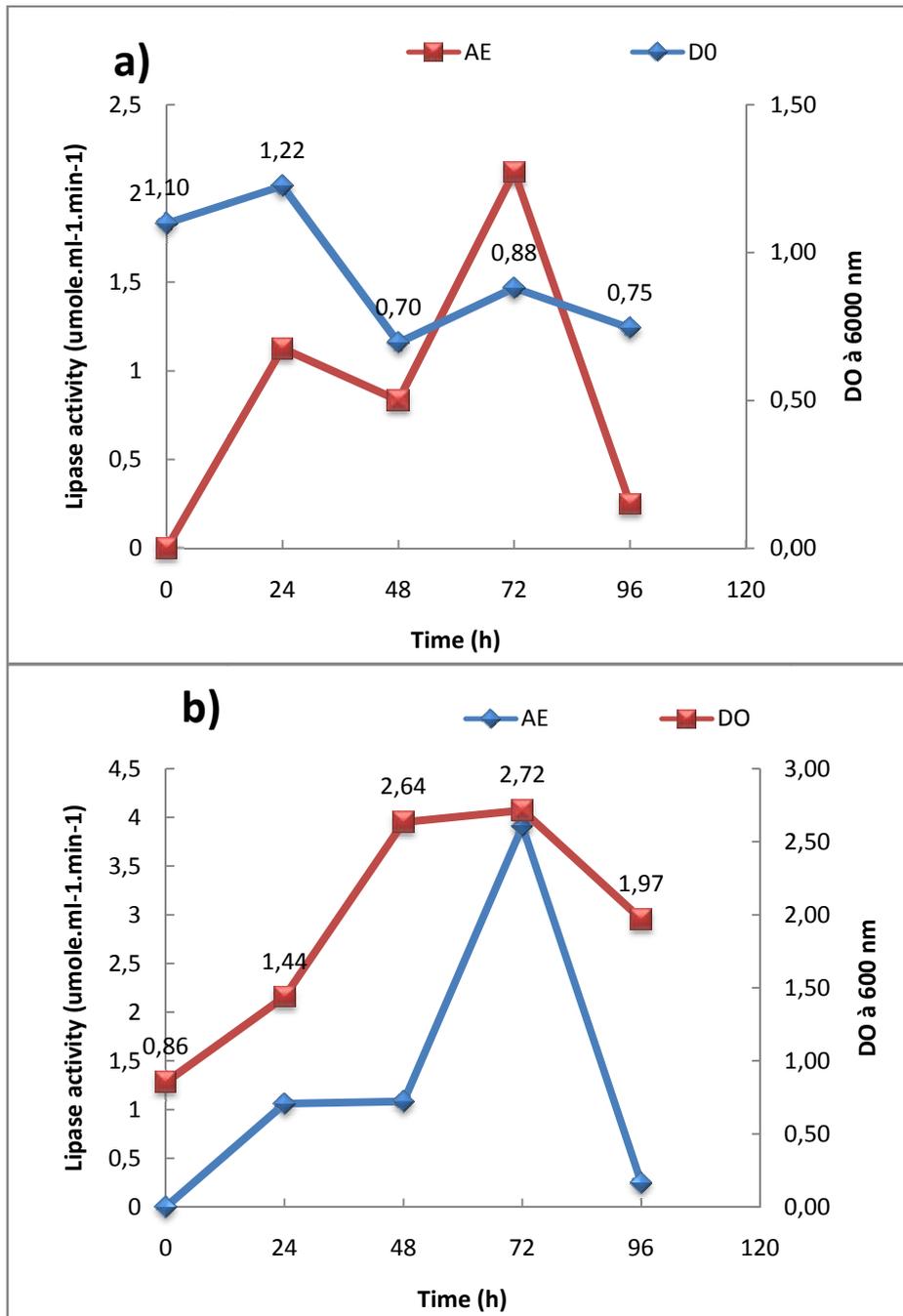


Figure 23 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de *Penicillium sp.* dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive comme inducteur. (a) en l'absence de glucose et (b) en présence de glucose.

La figure 24 montre l'évolution de la croissance cellulaire et la production de lipase, au cours de la fermentation de souche *Cunningamella sp.* en présence de glucose (a) et en l'absence de glucose (b).

En absence de glucose, le taux de croissance maximum ainsi la production de lipase a été observé à 48 h de fermentation; 1.26 de la DO et 0.91 UI.mL<sup>-1</sup> de l'activité lipasique ont été présente. Après 96 h, il y avait une grande diminution de la biomasse et de l'activité lipasique (figure 24 b).

En présence de glucose, la plus grande quantité de lipase (2.80 UI.ml<sup>-1</sup>) a été synthétisée par *Cunnigamella sp.* lorsqu'elle est cultivée sur un milieu minéral à 2% de l'huile d'olive supplémenté par le glucose en comparaison avec d'autres espèces fongiques utilisées, comme représenté sur la figure 24 (a). Donc le glucose est un stimulateur pour la production de lipase par cette souche.

Dans cette étude, l'activité lipasique de la souche *cunniugamella sp.* est également stimulée par l'ajout de glucose au milieu liquide de production, Des résultats similaires ont été rapportées par **Ülker et ses collaborateurs (2011)**.

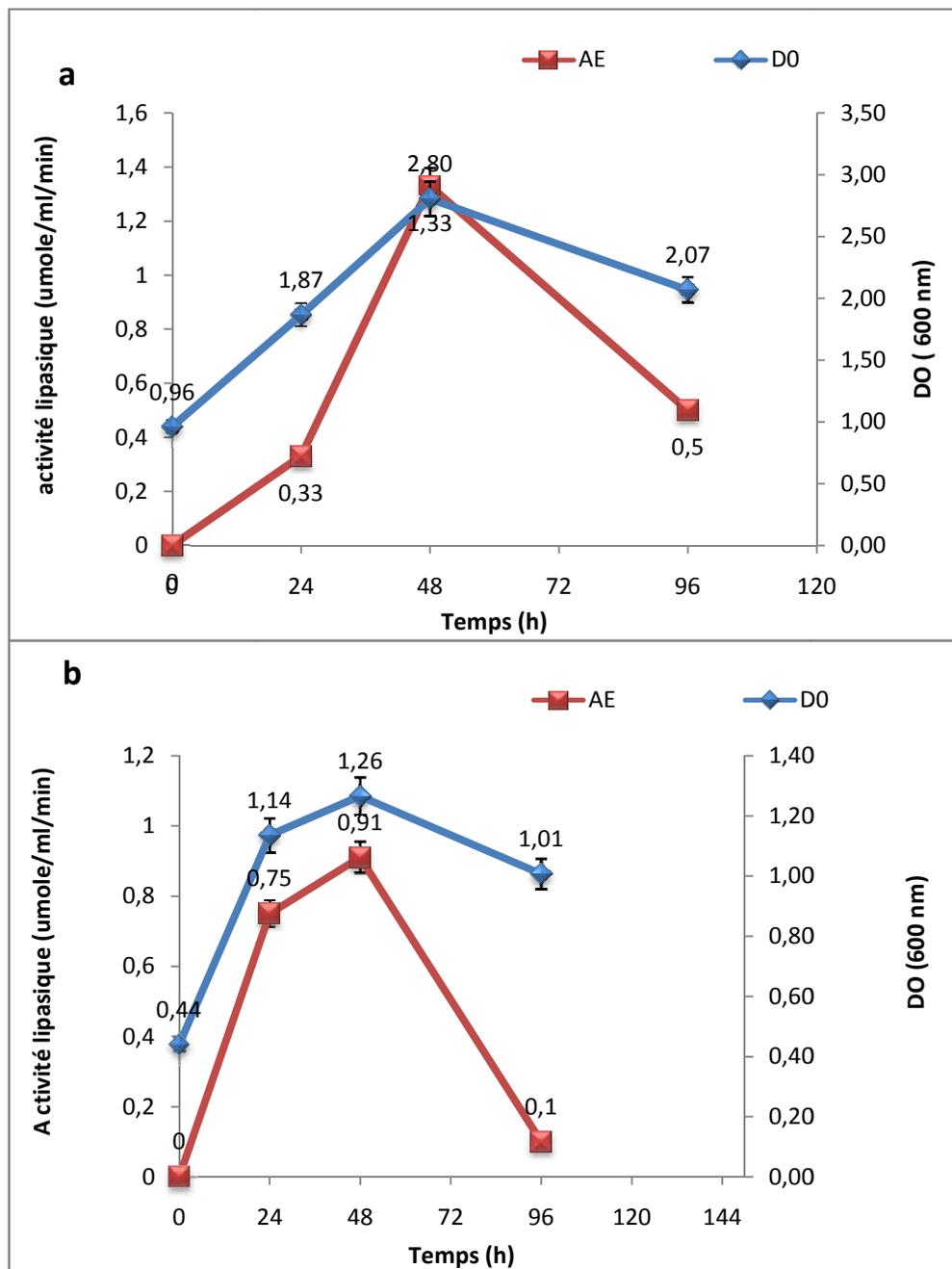


Figure 24: Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse de *Cunninghamella sp.* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur, en présence de glucose (a) en l'absence de glucose (b).

La figure 25 montre l'évolution de la croissance cellulaire, la production de lipase et le pH de milieu, au cours de la fermentation de souche *Mucor sp.*

Le taux de croissance maximum a été observé entre 24 h et 48 h de fermentation. À 48h 0.91 UI.mL<sup>-1</sup> de l'activité lipasique était présente. Après 96 h, il y avait une grande diminution de la biomasse.

La synthèse de l'enzyme a commencé autour du premier jour de la fermentation. L'activité lipasique a augmenté progressivement et elle atteint son maximum 1.33 UI pendant la phase de croissance à 92 h.

La présence de glucose dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive comme inducteur induit fortement la production de lipase et de la biomasse de souche *Mucor sp.*

En revanche, le pH de milieu a diminué progressivement de 6.9 à 6.16.

La synthèse de l'enzyme a commencé autour du deuxième jour de la fermentation et l'activité maximale a été enregistrée après avoir atteint la phase de la croissance.

La plus grande quantité de lipase a été synthétisée par *Mucor sp.* lorsqu'elle est cultivée sur un milieu minéral à 2% de l'huile d'olive supplémenté par du glucose en comparaison avec d'autres espèces fongiques utilisées.

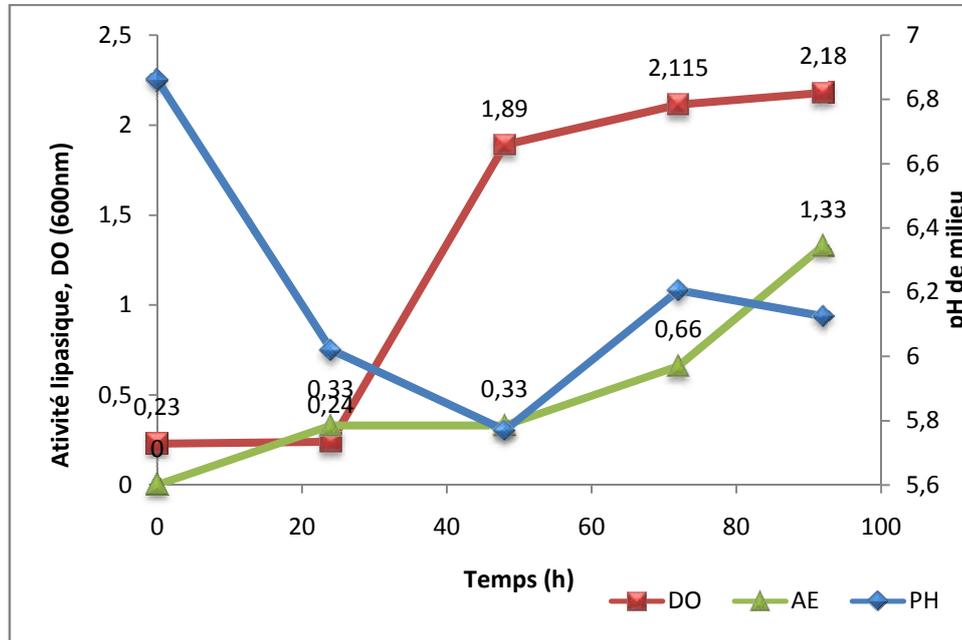


Figure 25: Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse *Mucor sp.*, dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive 1% comme inducteur.

L'évolution de trois paramètres d'*A. terreus* a été suivie en ajoutant 2% de glucose dans un milieu liquide contenant l'huile d'olive comme source de carbone et d'énergie. Les résultats sont représentés sur la figure 26 en présence de glucose (a) et en l'absence de glucose (b).

Le suivi de la production de l'enzyme par la souche *A. terreus*, dans le milieu de la culture, au cours de la fermentation a révélé que le maximum est atteint après 72h de culture (1.24 UI.ml<sup>-1</sup>) dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive sans glucose. Comme on le voit sur la figure 26 (B), mais l'activité enzymatique a diminué lorsqu'on a ajouté du glucose (1,12 UI.ml<sup>-1</sup>) Figure 26 (A).

La variation du pH du milieu de croissance avec le temps est représentée également sur la figure 26. Le pH diminue de 6,86 à 5,39 pendant les 24 premières heures, puis augmente légèrement à 6,29 dans les 24 heures suivantes et diminue progressivement jusqu'au 6.17 (figure 26 b).

Le pH de milieu sans ajout de glucose a diminué progressivement de 6.86 à 6.48 (voir figure 26 B).

Par contre, dans un milieu supplémenté par le glucose le pH a diminué fortement de 6,86 à 5,39 pendant les 24 premières heures, puis il a augmenté légèrement à 6,29 dans les 24 heures suivantes et il a diminué progressivement à partir de là (figure 42 A).

Le changement de pH durant la croissance des cultures n'a pas pu être attribué à la libération des AG car la concentration des AG dans le lipide résiduel extrait du milieu de croissance était plus élevée aux premiers stades de croissance de la culture tandis que le pH diminuait pendant toute la période de croissance. La baisse du pH pourrait donc être due au métabolisme des sources de carbone, telles que le glucose, comme expliqué par **Tan et Gill (1984)**.

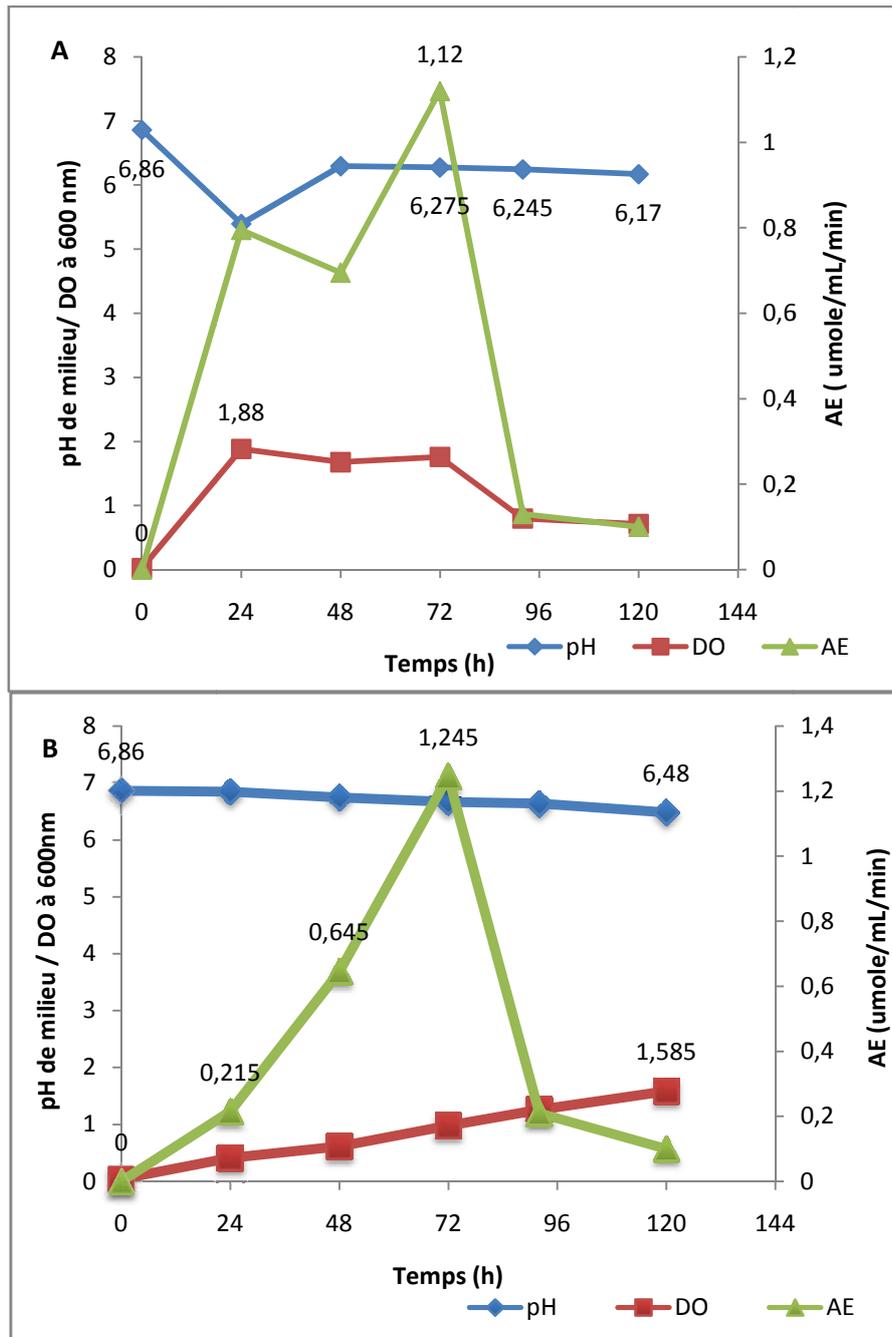


Figure 26 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse d'*A. terreus* dans un milieu minéral supplémenté par l'huile d'olive et glucose à 2% (A) et sans ajout de glucose (B).

La souche *A. terreus* n'a révélé pas une grande différence pour la production enzymatique dans un milieu minéral avec glucose ou sans glucose. Cependant, en présence de glucose le milieu devient un peu plus acide. Donc, la disponibilité du glucose dans le milieu de culture, peut influencer, mais d'une manière faible, la production de la biomasse et de l'enzyme de cette souche.

La figure 27 montre l'évolution de la croissance cellulaire, la production de lipase et le pH de milieu, au cours de la fermentation de souche *Candida albicans* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et supplémenté par 1% de glucose (A) et 2% glucose (B).

Comme on le voit sur cette figure, Le suivi de la production de l'enzyme, dans le milieu de la culture, au cours de la fermentation a révélé que le maximum est atteint après 48h de culture ( $1.24 \text{ UI.ml}^{-1}$ ) pour la souche *Candida albicans* un milieu minéral avec une concentration de 1% et 2% du glucose.

En outre, la production de lipase se trouve être associée à la croissance des souches et sa sécrétion débute lorsque la souche est en phase de croissance exponentielle. On a remarqué une production maximale de lipase après 3 jours de fermentation à  $30^\circ \text{C}$  puis une baisse du rendement en lipase. Cependant, on a remarqué une perturbation de pH de milieu de culture.

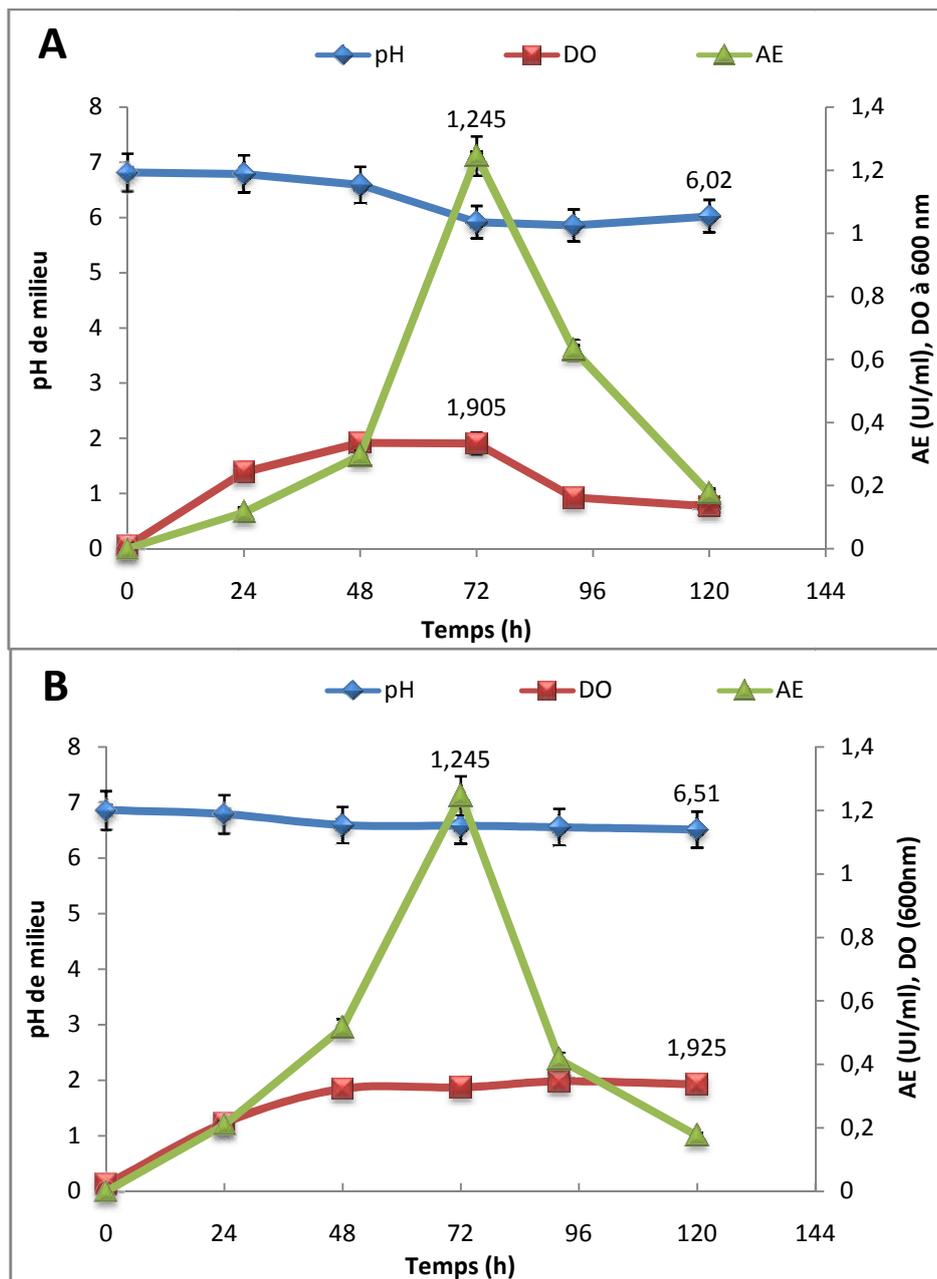


Figure 27: Effet de la concentration de glucose sur la production de lipase et de la biomasse de *Candida albicans* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive comme inducteur et 1% de glucose (A), 2% glucose (B).

La souche *Candida albicans* n'a révélé aucune différence pour la production enzymatique dans un milieu minéral avec une concentration de 1% et 2% du glucose. Donc la concentration de glucose n'a aucune influence sur la production lipasique de la souche *Candida albicans*.

La figure 28 montre l'évolution de la croissance cellulaire, la production de lipase et le changement de pH au cours de fermentation de *Trichoderma* sp.

*Trichoderma* sp. a produit un rendement maximal de lipase d'environ 1.58 UI.mL<sup>-1</sup> à 72 heures d'incubation et à 30 ° C ± 2 ° C dans un milieu minéral sans glucose. De même, la croissance de la biomasse a augmenté rapidement tout au long de la période de fermentation.

On remarque que l'évolution de DO à 600 nm passe par trois phases de croissance. Tout d'abord, durant les 2 premiers jours d'incubation sur le milieu liquides, une augmentation importante de DO a été remarquée passant de 0.05 à 1,76. Entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation, on observe une augmentation continue. Par contre, entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour d'incubation, un plateau de biomasse a été obtenu à partir de 4<sup>ème</sup> jours un plateau de stabilisation situé à 2,3 de DO.

L'évolution de l'activité de la lipase est passé par deux étapes, dans les premiers 3 jours on a remarqué une augmentation jusqu'à elle atteint 1.58 UI.mL<sup>-1</sup> à 72h, figure 28 (B).

En outre le pH du milieu a diminué jusqu'à une valeur de 6.08.

D'après **Chennouf, et al.,(1995)**, les glucides solubles (sucres, polysaccharides), en fonction des souches, peuvent être activateurs ou inhibiteurs de la synthèse lipasique .

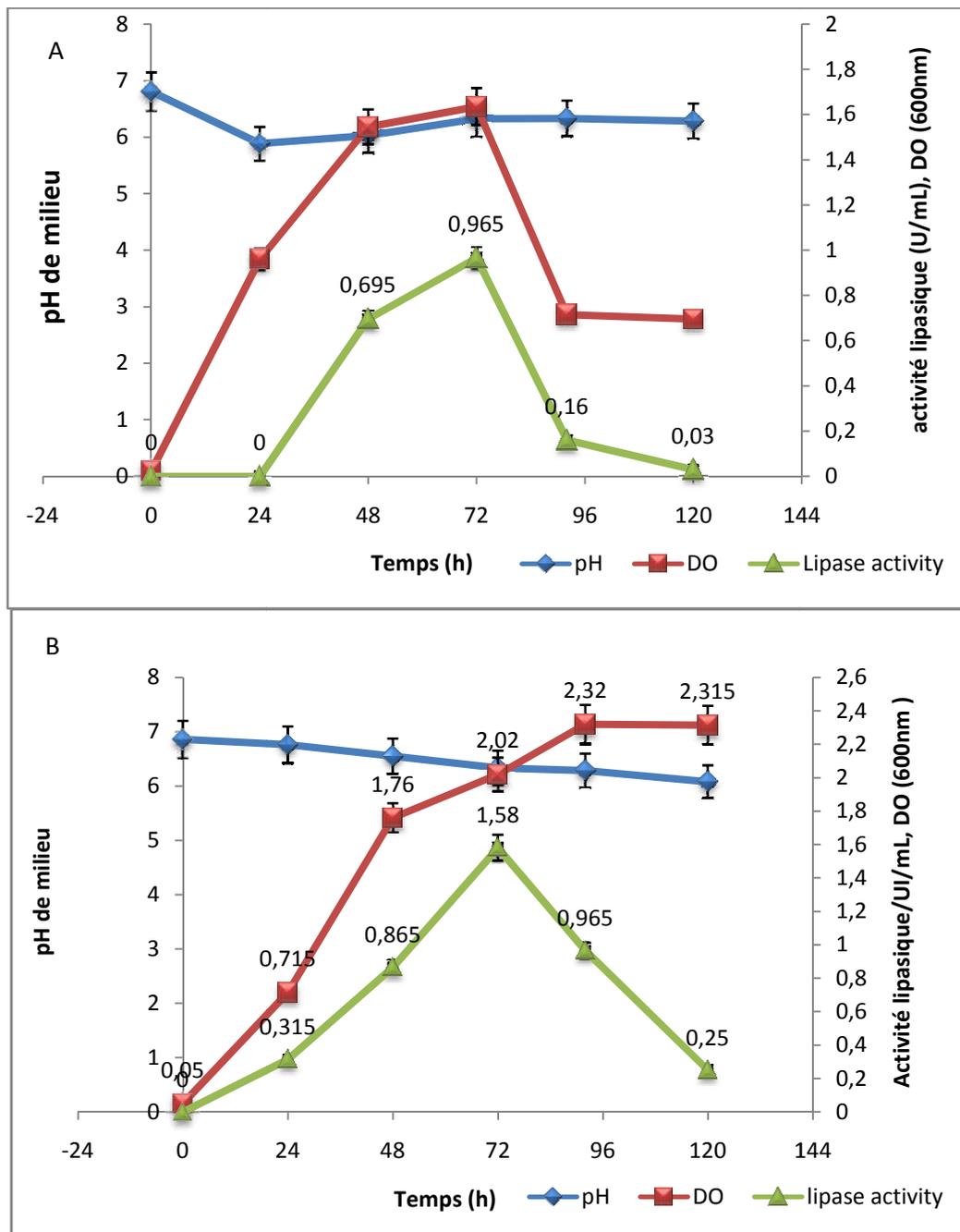


Figure 28 : Évolution de taux de production de la biomasse fongique, activité de lipase et le pH moyen pendant la culture de fermentation de *Trichoderma* sp. (Milieu minéral additionné d'huile d'olive et glucose (A) et un milieu minéral additionné d'huile d'olive (B)).

La figure 29 montre le taux de production de biomasse fongique, la production de l'activité lipasique et le changement de pH moyen au cours de fermentation par la souche *A. versicolor* à  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant jusqu'à 72 heures d'incubation. Le taux de croissance maximal a été observé entre 24 h et 48 h de fermentation. Cette figure montre aussi que l'activité lipolytique la plus élevée ( $1.03 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) atteint après 48h heures de croissance. L'activité de la lipase a ensuite diminué régulièrement.

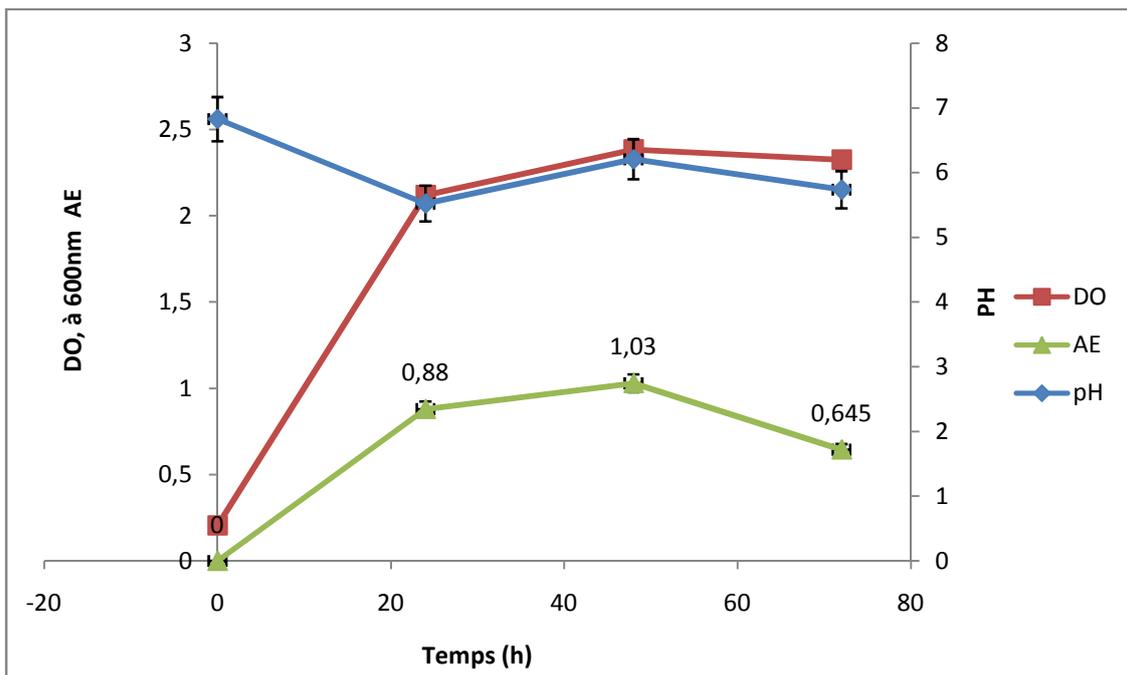


Figure 29 : Effet de glucose sur la production de lipase extracellulaire et de la biomasse d'*A. versicolor* dans un milieu minéral contenant de l'huile d'olive et additionné du glucose.

#### 1.4.5 Détermination du pH en fin de cultures

Les résultats de mesure du pH obtenus sont illustrés dans toutes les figures. Les pH des cultures de toutes les souches ont pratiquement diminué, à la fin de chaque fermentation, vis-à-vis de sa valeur initiale (6,8) avec quelques perturbation du pH.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le champignon est capable de dégrader simultanément des huiles d'olive au cours de sa croissance, ce qui a été confirmée par la diminution du degré de pH. D'ailleurs, les acides gras provenant des triglycérides sont libérés dans le milieu sous l'action hydrolytique des lipases (Čipinytė et al., 2009).

Le pH final des milieux fermentés a été noté vers le côté acide à partir du pH initial ajusté à 6,0. Les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux confirment ceux de **Corzo et Revah (1999)** qui ont constaté que la diminution du pH de la culture pourrait résulter de la production d'acides organiques tels que l'acide oléique, ce qui pourrait affecter l'activité lipasique. Contrairement au résultat de **Naqvi et al., (2012)**, qui ont démontré que le pH a été augmenté.

En effet, l'augmentation de l'acidité est peut être due à la libération des acides gras grâce à la présence de lipase dans le milieu. Ces constatations sont en accord avec les données publiées par **Margesin et al. (2003)**, révélant que la capacité des microorganismes à dégrader les huiles est en relation avec leurs enzymes impliquées dans les processus de dégradation.

### ***1.6. Caractérisation partielle de la lipase de la souche *Trichoderma* sp.***

#### ***1.6.1. Effet des additifs à base de carbone***

L'effet de l'ajout d'autre source de carbone comme T80 et glucose sur l'évolution de biomasse (poids secs) et l'activité enzymatique de *Trichoderma* sp., a été testé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Le tableau 3 montre le poids sec et l'activité lipolytique de *Trichoderma* sp. dans différentes sources de carbone. L'activité maximale de la lipase (1,58 U / mL) a été détectée dans un milieu à base d'huile d'olive en l'absence de glucose et de Tween 80.

Une plus grande biomasse a été obtenue lorsque du glucose (2%) a été ajouté au milieu ( $47.6 \text{ mg.ml}^{-1} \pm 4,58$ ).

La production d'une vraie lipase a été effectuée sur un milieu à base de l'huile d'olive utilisée comme inducteur.

L'étude de l'influence du substrat inducteur a été réalisée dans le but d'améliorer la production d'enzyme par les isolats sélectionnés .

Tableau 3: Effet des additifs à base de carbone sur la production de lipase et la biomasse de *Trichoderma* sp.

Milieu	Poids sec (mg.mL <sup>-1</sup> ) 72h	Activité lipasique (IU mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Milieu minéral additionné d'huile d'olive (milieu minimal)	6.1 ± 1.41	1.58 ± 0.11
Milieu minimal plus Tween 80	15.5 ± 9.19	1 ± 0.04
Milieu minimal plus glucose (1%)	13.3 ± 0.71	0.96 ± 0.05
Milieu minimal plus glucose (2%)	47.6 ± 4.58	0.45 ± 0.06

De nombreux chercheurs ont rapporté l'effet positif des sucres sur la production de lipase (**Falony et al., 2006**). Cependant, au regard de cette étude, les substrats de sucre ne favorisent que la croissance du micro-organisme mais pas la synthèse de la lipase par la souche *Trichoderma* sp. ce qui est en accord avec notre étude.

L'activité maximale de la lipase (1,58 U / mL) a été détectée dans un milieu à base d'huile d'olive en l'absence de glucose et de Tween 80 pour la souche *Trichoderma* sp. Ce résultat est en contradiction avec le rapport d'une étude réalisée par **Ülker et al., (2011)** et par **Ire et al., (2014)**. Une plus grande biomasse a été obtenue lorsque du glucose (2%) a été ajouté au milieu (47.6 mg.mL<sup>-1</sup> ± 4,58) Tableau 3. D'après **Ülker et ses collaborateurs (2011)**, la biomasse maximale a été produite à une concentration de 1,25 g / L, en 7 jours.

Dans une autre étude, la production de lipase est influencée par le type et la concentration des sources de carbone et d'azote, ainsi que par le pH et la température de la culture (**Silva et al., 2005**). Une plus grande biomasse a été obtenue lorsque du glucose (2%) a été ajouté au milieu (47.6 mg.mL<sup>-1</sup> ± 4,58), confirmant les résultats obtenus par (**Bancerz et al., 2005**). Des résultats similaires ont été obtenus par (**Falony et al., 2006**), et (**Ramos-Sánchez et al., 2015**), ils ont rapporté que les substrats de sucre ne favorisent que la

croissance du microorganisme mais pas la synthèse de la lipase. Alors que l'acide oléique et l'huile d'olive améliorent sa synthèse.

### **1.6.2. Effets de la température sur l'activité de la lipase**

Le champignon produit une lipase à une température comprise entre 25 ° C et 40 ° C. l'activité lipasique a diminué à 40 ° C (figure 30).

Il ressort de cette étude qu'environ 40% de l'activité enzymatique est perdue à 50 ° C après 20 minutes d'incubation.

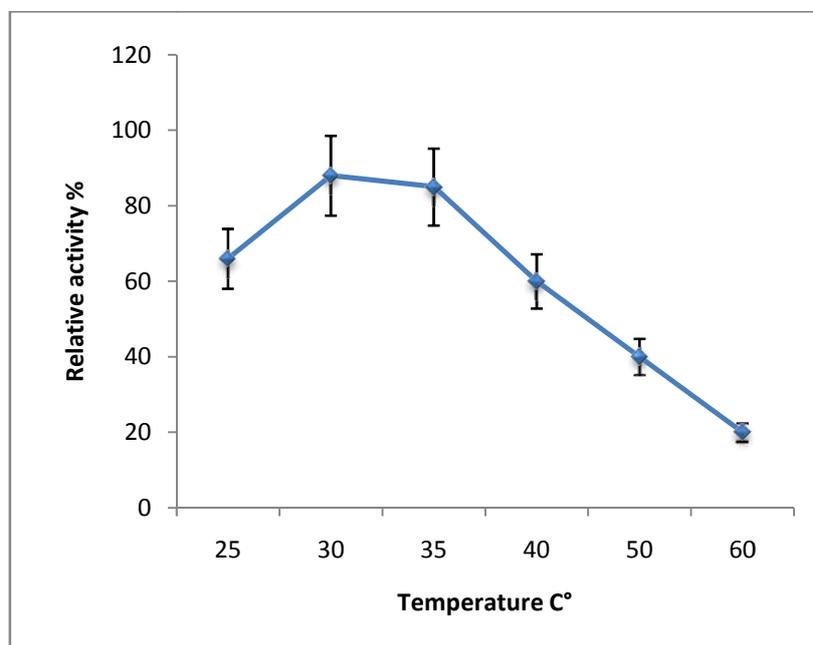


Figure 30 : Effet de la température sur l'activité lipasique de *Trichoderma* sp. (- □ -)  
 Activité relative.

La fermentation submergée a été réalisée à 20-50°C pour évaluer l'effet des températures d'incubation sur la production de lipase. L'effet de la température sur la production de lipase a été présenté à la figure 30. La production maximale de lipase a été observée à une température de 30 ° C. Les données obtenues ont révélé que l'incubation à des températures inférieures à 30°C et supérieures à 30°C diminuait la production d'enzymes. La température maximale de 30 ° C a été obtenue comme la meilleure température pour la production de lipase extracellulaire par deux souches fongiques (Thota et al., 2012).

Notre constat est similaire aux rapports de **Rajendra et Ashok (2011)**. Ils ont constaté que *Penicillium notatum* et *Fusarium oxysporum* produisaient une lipase maximale à 30 ° C.

Les résultats sont similaires à ceux de **Kamimura et al. (1999)** et **Burkert et al. (2004)** qui ont travaillé sur *Geotrichum* sp. et qu'ils ont rapporté que les flacons d'agitation avaient une activité lipasique maximale en 48 h.

Cependant, Ils ont également indiqué que seulement 10 h étaient nécessaires pour obtenir une activité lipasique maximale dans un fermenteur agité en utilisant un milieu complexe contenant de la liqueur de macération de maïs, de l'huile d'olive et du nitrate d'ammonium (**Kashmiri et al., 2006**).

### 1.6.3. Effets du pH sur l'activité de la lipase

L'activité lipasique la plus élevée a été trouvée à pH 6-7, mais aucune activité lipolytique n'a été détectée dans la culture de pH acide (pH = 5).

La figure 31 a montré que l'activité de l'enzyme a augmenté de pH 5,0 à pH 7,0 a diminué rapidement à un pH supérieur à 7,5. L'activité enzymatique la plus élevée a été obtenue à pH 7,0.

Au-delà du pH 9, nous avons noté une diminution de l'activité lipasique.

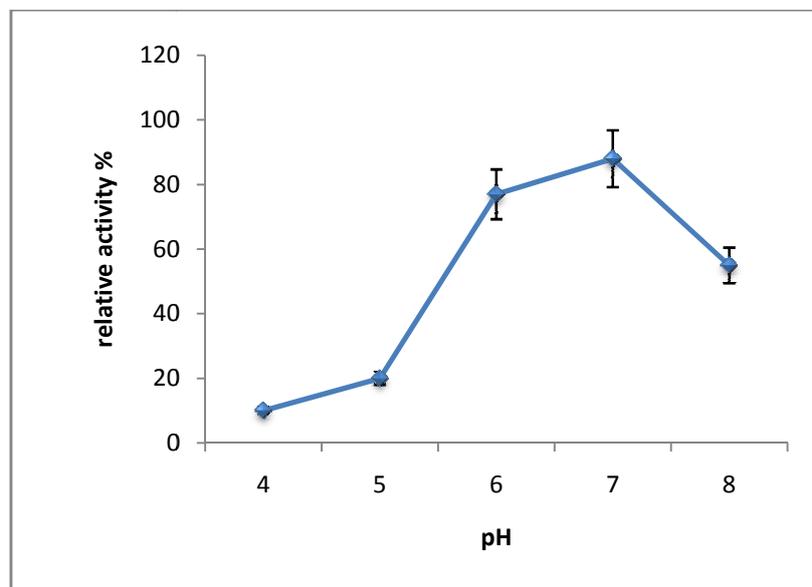


Figure 31: Effet du pH sur l'activité lipasique de *Trichoderma* sp. (- □ -) Activité résiduelle.

L'activité lipasique la plus élevée a été trouvée à pH 6-7, mais aucune activité lipolytique n'a été détectée dans la culture de pH acide (pH = 5) en confirmant les résultats obtenus par **Leow et al., (2007)**, ils ont rapporté qu'aucune ou une faible activité lipasique a été observée à un pH inférieur à 6,0.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

Cette étude a été réalisée dans le but d'identifier des souches fongiques productrices d'enzymes lipolytiques. Le screening fongiques réalisés à partir de deux types d'échantillons de différentes origines a permis d'identifier six souches bactériennes toutes aptes à dégrader les différents substrats lipidiques additionnées dans le milieu de fermentation.

L'hydrolyse d'huile d'olive catalysée par une lipase a été étudiée. Les genres de champignons appartenant à *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor sp.*, *Cunninghamella sp.* et levure ont été identifiés par leurs caractéristiques macro et micro-morphologiques qui était l'outil d'identification de base.

Les souches fongiques ont été cultivées avec agitation et testées pour l'activité lipolytique. Les différentes sources de carbone présentes dans les constituants du mélange peuvent influencer de façon positive ou négative sur l'activité et la production lipasique.

On conclut à partir des résultats de cette étude que les champignons les plus prometteurs en termes d'activité lipolytique ont été identifiés comme appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor sp.*, *cunnigamelle sp.* et levure *Candida albicans*, ils pourraient être utilisés comme une source microbienne potentielle de lipase et leur production est induite par la présence d'une source de lipides qui est l'huile d'olive. Cependant le glucose est un stimulateur pour la production de lipase par la souche *Mucor sp.* et *Penicillium sp.*

Les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de l'huile d'olive induirait fortement la production de lipase par les souches quand elle est utilisée comme seule source de carbone dans le milieu de culture.

Cependant le glucose et le tween 80 améliorent la croissance de quelques souches comme *Trichoderma sp.*, alors qu'ils diminuent la production de lipase extracellulaire par cette souche.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, ces études doivent être poursuivies et approfondies en ciblant une production qualitative et quantitative des lipases suivie d'une caractérisation de celles-ci. Il serait également important d'étudier l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la production des lipases par les souches fongiques isolées.

Mais il y a plusieurs facteurs comme la température, le pH, la méthode de fermentation, les facteurs environnementaux, etc. cela peut affecter la production d'enzymes. Ces paramètres doivent être analysés en détail pour optimiser la production de lipase par les souches fongiques couramment disponibles.

De nombreuses perspectives déroulent de cette recherche, en l'occurrence :

- Purification et caractérisation (chimique et moléculaire) de l'enzyme lipolytique produites par les différentes souches ;
- Utilisation de ces souches comme starters dans la biodégradation de grignon d'olive , dans l'intérêt de la préservation de l'environnement.

LES RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

**Références bibliographique**

1. Abbas H., Hiol A, Deyris V., Comeau L.(2002).Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 968–975.
2. Abd-Elhakeem M.A., Elsayed A.M., Taher A. Alkhulaqi T.A. (2013).New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media. *American Journal of Analytical Chemistry*. 4: 442-444.
3. Abed Samad M. Y., Abed Razak C. N., Salleh A. B., Zin wan yunus W. M., Ampon K. & Basri M.(1989).A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 9: 51-56.
4. Adamczak M, Bednarski W.(2004).Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*. 39:1347–1361.
5. Alford J. A., Pierce D.A., Suggs F. G.(2008).Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. *Journal of lipid research*. 5: 390-394.
6. Ali Haider M. Pakshirajan K.(2007). Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statically designed experiments. *Applied biochemistry and biotechnology*. 141: 337-390.
7. Allen D. K. & Tao B. Y.(2007).Kinetic characterization of enhanced lipase activity on oil bodies. *Bioprocess Biosyst. Eng*. 30: 271–279.
8. Alloue W. A. M., Aguedo M., Destin J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J. P. & Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leur application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 12: 57-68.
9. Alloue W.A.M. (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. Pp.165.
10. Amin M., Bhatti H. N., Zuber M., Bhatti I. A. & Asgher M. (2014) Potential use of agricultural wastes for the production of lipase by *Aspergillus melleus* under solid state fermentation. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 24: 1430-1437.
- Ayinla A. Z., Ademakinwa A.N. & Agboola F.K. (2017).Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of

- a Palm Oil Processing Shed Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5: 030-037.
11. Ayinla Z.A., Ademakinwa A.N., & Agboola F.K.(2017). Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus sp.* ZAC3 isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5 (02) : 030-037.
  12. Babu I. S. & Rao H.(2007).Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Research journal of microbiology. 1:88-93.
  13. Baffi M.A., Romo-sanchez S., Ubida-Irranzo J., & Briones-Pérez A.I. (2012). Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. New biotechnology. 29:456-456.
  14. Bancercz R. Ginalska G., Fiedurek J. & Gromada A. (2005).Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9. Journal Ind Microbiol Biotechnol. 32: 253–260.
  15. Benamia F., Djeghaba Z. & Tahar A.(2008).Étude de l'influence des solvants organiques sur l'activité lipasique dans les réactions d'alcoolyse. JNC 15 Yasmine Hamammet. PP 76.
  16. Benjamin S. & Pandey A.(1998). *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. Yeast. 14: 1069–1087.
  17. Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20: 433-437.
  18. Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
  19. Boudih S. 2011. Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers: évaluation de la toxicité sur des cellules \_epitheliales respiratoires in vitro. Sciences agricoles Thèse de doctorat. Université de Paris Est. France.
  20. Brito-Madurro A. G., Prade R. A., Madurro J. M., Santos M.A., Peres N. T. A., Cursino-Santos J. R., Martinez-Rossi N.M. & Rossi A. (2008).A Single Amino Acid

- Substitution in One of the Lipases of *Aspergillus nidulans* Confers Resistance to the Antimycotic Drug Undecanoic Acid. *Biochem. Genet.* 46: 557–565.
21. Cai Y., Wang L., Liao X., Ding Y. & Sun J.(2009).Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBCWU-3. *Process Biochemistry.* 44:786–790.
  22. Cardenas F., Alvarez E., Castro –Alvarez M.S., Sanchez- Montero J.M., Valmaseda M., Elson S.W. & Sinisterra J.V. (2001).Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic.* 14:111-123.
  23. Cardenas F., Alvarez E., Castro –Alvarez M.S., Sanchez- Montero J.M., Valmaseda M., Elson S.W. & Sinisterra J.V. (2001). Novel microbial lipases: Catalytic activity in reaction in organic media. *Enzyme and microbial technology.* 28: 145-154.
  24. Cescut J. (2009). Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés. Thèse de doctorat. Université de toulouse, France. Pp. 333.
  25. Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P.2002. Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.
  26. Chahinian H. & Sarda L.(2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein. Pept. Lett.*16: 1149-1161.
  27. Chahinian H., Nini L., Boitard E., Dubès J.P., Comeau L.C. & Sarda L. (2002). Distinction between Esterases and Lipases: A Kinetic Study with Vinyl Esters and TAG. *Lipids.* 37: 653-661.
  28. Chahinian H., Vanot G., Ibrik A., Rugani N., Sarda L. & Comeau L.C. (2000).Production of extracellular lipase by *Penicillium cyclopium* Purification and characterization of a partial acylglycerol lipase.*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 215- 222.
  29. Chang W. J., Moon Y. H. & Koo Y. H. (1997).Mathematical modeling for the estimation of lipase activity by agar diffusion method. *Journal of chem. Eng.* 14: 179-183.
  30. Chen L., Daniel R. M. & Coolbear T. (2003).Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal.* 13: 255–275.

31. Ciafardini G., Zullo B.A. & Iride A.(2006).Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*. 23: 60–67.
32. Cihangir N. & Sarikaya E.(2004).Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 193–197.
33. Čipinytė, V., Grigiškis, S. et Baškys, E. (2009). Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija*. 55 (3–4) : 84–92.
34. Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F. & Belo I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. 930 -944
35. Colen G., Gonc R. Junqueira A. & Moraes-Santos T.(2006).Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 881–885.
36. Cordova L.J.A. (1998). Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. n° 10 Maestro en Biotecnologia, UAM-I, Mexique. Pp 267.
37. Corzo G., Revah S. (1999). Production and characteristics of lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 70:173-180.
38. Costas M., Dieve F. J. & Longo M. A. (2004).Lipolytic activity in submerged cultures of *Issantchankia orientalis*. *Process biochemistry*. 39: 2109-2114.
39. Csutak O., Stoica I. & Vassu T.(2015). Lipolytic activity of a new yeast strain *Candida rugosa* CMGB-CR6 isolated from oil-polluted soil. *Romanian Biotechnological Letters*. 20: 10547–10557.
40. D’Annibale A., Giovannozzi Sermanni G., Federici F. & Petruccioli M.(2006) . Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*. 97:1828–1833.
41. da Silva V.C.F., Contesini F.J. & Carvalho P.D. O. (2008). Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. *J. Braz. Chem. Soc*. 19: 1468-1474.
42. Dalmau E., Montesinos J.L., Lotti M., Casas C.(2000).Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and microbial technology*. 26:657-663.

43. Davet, P. et Rouxel, F. (1997). Détection et isolation des champignons du sol. (edn) INRA.Paris.
44. Davranov K. & Khalameiser V. B. (1997). Current state of the study of microbial lipases. Chemistry of natural compounds. 33: 113-126.
45. Delmotte A. (1958). L'activité lipolytique microbienne décelée par la méthode de Sierra avec référence spéciale au *M. pyogenes*. 309-330.
46. Dicko M. H. (2010). Travaux pratique. Biochimie structurale & Enzymologie .Licence de Biochimie DUT- Contrôle Qualité- IAA- 2ème Année, TP. Licence Biochimie, DUT-CQA- 2 ème Année.
47. Dominguez de Maria P., Sanchez-Montero J. M., Sinisterra J. V. & Alcantara A. R. (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. Biotechnology Advances. 24 : 180– 196.
48. Dominguez de Maria P., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V. & Alcantara A.R.(2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview Biotechnology Advances. 24:180– 196.
49. El marrakchi A., Tantaoui-Elaraki A., Hamama A. & Grini A.(1988). La flore microbienne du smen marocain. Flore lipolytique et caséolytique. Le lait.68 : 333-348.
50. Falony G., Armas J.C., Dustet Mendoza J.C. & Martínez Hernández J. L. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. Food Technol. Biotechnol. 44: 235–240
51. Feng J., Liu G., Selvaraj G., Hughes G.R. & Yangdou Wei Y.(2005). A secreted lipase encoded by *LIP1* is necessary for efficient use of saturated triglyceride lipids in *Fusarium graminearum*. Microbiology. 151: 3911–3921
52. Fickers P., Ongena M., Destain J., Weekers F. & Thonart P.(2006).Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Enzyme and Microbial Technology.38: 756–759.
53. Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008).Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12: 119-130.
54. Gandhi N. N. (1997).Applications of lipase. Review. 74:621-634.

55. Garcia-Martos P., Marin P., Hernandez-Molina J.M., Garcia-Agudo L., Aoufi S. & Mira J. (2000). Extracellular enzymatic activity in 11 *Cryptococcus* species. *Mycopathologia*. 150: 1–4.
56. Gargouri M., Akacha N.B., Kotti F. & Ben Rajeb I. (2008). Voie de la lipoxygénase valorisation d’huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12:185-202.
57. Ghorri S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti-Fusarium. Thèse de Doctorat, Université frères Mentouri. Pp 154 .
58. Ghosh, P.K; Saxena, R.K; Gupta, R; Yadav, R.P; Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci. Progr.* 79 (2): p119-157.
59. Gilham D. & Lehner R.(2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods.* 36: 139-147.
60. Ginalska G., Bancercz R. & Kornilłowicz-Kowalska T.(2004). A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31: 177–182.
61. Gonçalves C., Lopes M., Ferreira J.P. & Belo I. (2009). Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology.* 100: 3759–3763.
62. Gopinath S. C. B., Anbu P. & Hilda A.(2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience.* 46: 119–126.
63. Gopinath S.C.B., Anbu P., Lakshmipriya T. & Hilda A. ( 2013). Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. *BioMed Research International.* 1-10.
64. Gopinath S.C.B., Hilda A., Lakshmi priya T. & Annadurai G.(2002). Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 18: 449–458.
65. Griebeler N., Polloni A.E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Cechet J.L., Marco Di Luccio M.D., de Oliveira D., Treichel H., Cansian .L., Rigo .& Ninow J.L. (2011). Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess Technol.* 4:578–586

66. Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F. , Favati F. , Gardini F.& Suzzi G.( 2001).Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. International Journal of Food Microbiology. 69: 79–89.
67. Guiraud J. P.(1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321
68. Gunstone F. D.(1999).Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79: 1535-1549.
69. Hachaichi-Sadouk Z., Tazerouti A. & Hacene H.(2008). Production d'esters d'alkyle d'acides gras par bioconversion d'une l'huile végétale. Journal de la société Algérienne de chimie. 18:173-183.
70. Haider M.A. & Pakshirajan K. (2007).Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by soil microorganism using statistically designed experiments. Copyright Humana press Inc. Applied biochemistry and biotechnology. 141: 377-390.
71. Hasan F., Shah A. A. & Hameed A.(2006).Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology. 39: 235–251.
72. Hasan F., Shah A.A. & Hameed A.(2009).Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology advances. 27: 782-798.
73. Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R. & Gupta G.(2013) Production of extracellular enzymes in the *entomopathogenic* fungus *Verticillium lecanii*. Bioinformation 9: 238-242.
74. Helistö P. & Korpela T.(1998). Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitro phenyl alkanoate esters method. Enzyme and microbial technology. 23:113-117.
75. Hermansyah H., Wijanarko A., Dianursanti, Gozan M., Wulan P. P. D. K., Arbianti R., Soemantojo R.W., Utami T.S., Yuliusman, Kubo M., Shibasaki-Kitakawa N. & Yonemoto T. (2007). Kinetic model for triglyceride hydrolysis using lipase: Review. 11: 30-35.
76. Hernandez I. , de Renobales M. , Virto M., Perez-Elortondo F.J., Barron L. J.R., Flanagan C. & Albisu M. (2005).Assessment of industrial lipases for flavour development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. Enzyme and Microbial Technology. 36: 870–879.

77. Hernández-Rodríguez B., Córdova J., Bárzana E. & Favela-Torres E.(2009).Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.61:136–142.
78. Hills M. J. & Mukherjee K. D.(1990).Triacylglycérol lipase from rape (*Brassica napus*) suitable for biotechnological purposes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26: 1-10.
79. Hiol A., Jonzo M. D., Druet D. & Comeau L.(1999).Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 25: 80–87.
80. Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L. & Comeau L.C.(2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 421–430.
81. Ho W. C. & Ko W. H. (1982).Characteristics of soil microbiostasis. *Soil Biol. Biochem.* 14:589-599.
82. Hooker A. D., Hardy J. & Stacey K. A.(1997). Is induction of the exocellular lipase of *Xanthomonas maltophila* NK7 by fats and detergents simply the result of continual detachment from the cell surface? *World journal of microbiology & biotechnology.* 13: 677-681.
83. Hupé J-F. (2008). Enrichissement et recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles. Mémoire en microbiologie appliquée Université de Québec. Pp 149.
84. Iftikhar T., & Hussain A.(2002).Effect of nutrients on the extracellular lipase production by mutant strain of *Rhizopus oligosporus*. *Biotechnology.* 1: 15-20.
85. Iftikhar T., Niaz M. & Haq I.U. (2010). Comparative studies on the lipolytic potential of wild and mutant strains of *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporous IIB-63* isolated from lipid rich habitats .*Pak. J. Bot.,* 42(6): 4285-4298.
86. Iftikhar T., Niaz M., Afzal M., Haq I. & Rajoka M. I. (2008).Maximization of Intracellular Lipase Production in a Lipase-Overproducing Mutant Derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A Kinetic Study. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 402–412.

87. Ionita A., Moscovici M., Popa C., Vamanu A., Popa O. & Dinu L. (1997). Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.3: 147-151.
88. Ire F.S. & Ike V.C. (2014). Screening and Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Submerged Fermentation by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) IMI 366159 Annual Research & Review in Biology. 4(16): 2587-2602.
89. Jaeger K. E. & Eggert T.(2002).Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13: 390-397.
90. Jaeger K. E. & Reetz M. T.(1998).Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol*. 16: 396-403.
91. Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O. (1994).Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews*. 15:29-63.
92. Janda K. (2005). The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. *International Bio deterioration & Biodegradation*. 55:149–152.
93. Joseph B., Ramteke P. W. & Thomas G.(2008). Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments *Biotechnology Advances* .26: 457–470
94. Joseph B., Ramteke P. W., Thomas G. & Shrivastava N.(2007).Standard review cold-active microbial lipases: A versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and molecular biology review*. 2: 39-48.
95. Joseph B., Shrivastava N. & Ramteke P.W. (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 10: 137–144.
96. Kakde R.B. (2011 ).Extracellular Lipase Enzyme Production by Seed-Borne Fungi under the Influence of Physical Factors. *International Journal of Biology*. 3:94-100.
97. Kamini N.R., Fujii T., Kurosu T. & Iefuji H. (2000).Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*. 36: 317–324.
98. Kapoor M. & Gupta M.N. (2012).Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. 47: 555–569.

99. Karam R. (2007). Lipase-catalyzed acidolysis of fish liver oil with dihydroxyphenylacetic acid in organic solvent media. Doctoral thesis. McGill University Montreal, Canada.. Pp 89.
100. Kashmiri M.A., Adnan A., & Butt B.W. (2006). Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. African Journal of Biotechnology. 5 :878-882.
101. Kawasaki L., Farrés A., & Aguirre J.(1995). *Aspergillus nidulans* mutants affected in Acetate metabolism isolated as lipid non utilizers. Experimental Mycology. 19: 81-85.
102. Ko W. H., wang I. T. & Ann P. J. (2005). A simple methods for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil biology & biochemistry. 37: 597-599.
103. Kokusho Y., Machida H. & Iwasaki S.(1982). Studies on alkaline lipase: Isolation and identification of lipase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 46: 1159-1164.
104. Kotogán A., Németh B., Vágvölgyi C., Papp T.& Takó M.(2014).Screening for Extracellular Lipase Enzymes with Transesterification Capacity in *Mucoromycotina* Strains. Food Technol. Biotechnol. 52: 73–82.
105. Kouker G, Jaeger KE . (1987). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. Appl. Environ. Microbiol. 53(1): 211-213.
106. Kown D. Y. & Rhee J. S. (1986). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. Technical. 63: 89-92.
107. Kumar S.S. & Gupta R. (2008). An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. Process Biochemistry. 43 :1054–1060.
108. Lakshmi B.S., Kanguane P. & Pennathur G.(1999). Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031).Letters in applied microbiology. 29: 66-70.
109. Lambert G. & Lenoir J.(1972). Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes lipolytiques. Le Lait. 513-514. pp.175-192.
110. Lecellier A. (2013). Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. THESE Pp. 196 Université de Reims Champagne-Ardenne ; Ecole doctorale sciences technologie sante.

111. Ledesma-Amaro R. & Nicaud J.-M.(2016). *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 61: 40–50.
112. Leow T. C. , Abd Rahman R. N. Z. R., Basri M. & Salleh A. B. (2007) .A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles*. 11: 527–535.
113. Leuschner R.G., Kenneally P.M. & Arendt E. K. (1997).Methods for the rapid quantitative detection of lipolytic activity among food fermenting microorganisms. *International journal of food microbiology*. 37: 237-240.
114. Leyral G. & Joffine J. N.(1998). *Microbiologie technique* 2<sup>ème</sup> édition.
115. Li Y. & Chrost R. J. (2006). Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and microbial technology*. 39: 568-572.
116. Lie E., Person A. & Molin G. (1991).Screening for lipase-producing microorganisms with a continuous cultivation system. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 35: 19-20.
117. Lima N., Teixeira J.A. & Mota M.(1991).Deep agar-diffusion test for preliminary, screening of lipolytic activity of fungi .*Journal of Microbiological Methods*. 14:193-200.
118. Liu R., Jiang X., Mou H., Guan H., HwangH. & Li X.( 2009). A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation *Biochemical engineering journal*. 46: 265-270.
119. Liu Z., Chi Z., Wang L. & Li J. (2008). Production, purification and characterization of extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical engineering journal*. 40: 445-451.
120. Lock L.L., CorbelliniV.A., Valente P. (2007). Lipases produced by yeasts: powerful biocatalysts for industrial purposes. *TECNO-LÓGICA*, Santa Cruz do Sul. 11 : 18-25,
121. Loo, J.L., Lai, O.M., Long, K.and Ghazali, H.M. (2006). Identification and Characterisation of A Locally Isolated Lipolytic Microfungus - *Geotrichum candidum* *Malaysian Journal of Microbiology*. 2(1): 22-29.
122. Loperena L., Ferrari M.D., Diaz A. L., Inglood G., Pérez L. V., Carvalho F., Travers D., Menes R.J. & Lareo C. (2008). Isolation and selection of native microorganisms

- for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. *Bio resource technology*. pp 5.
123. Lopes D.B, Fraga L.P., Fleuri L.F., & Macedo G.A.(2011). Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 31: 608-613.
  124. Lotti M. & Alberghina L.(2002). Lipases: Molecular structure and function. *Industrial enzymes*. 16: 263-281.
  125. Maldonado R. R. , Lopes D. B., Aguiar-Oliveira E., Kamimura E. S, and Macedo G. A. (2016). A Review on Geotrichum Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 30(4): 439-454.
  126. Maldonado R.R., Macedo G.A. & Rodrigues M.I. (2014). Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. *International Journal of Applied Science and Technology*. 4: 108-115.
  127. Margesin, R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A.M. and Schinner, F. (2003) Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 7, 451-458.
  128. Mateos J.C., Ruiz K., Rodriguez J.A., Coedova J. & Baratti J. (2007). Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*. 49: 104-112.
  129. Mayne R.Y.(1956). Lipolytic activity of various microorganisms isolated from cottonseed. *Appl. Microbiol*. 4: 270-273.
  130. Mayordomo I., Randez-Gil F. & Prieto J.A.(2004). Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem*. 48: 105–109.
  131. Mehta A., Bodh U., Gupta R.( 2017) Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research* 8:58-77.
  132. Meng Y., Wang G., Yang N., Zhou Z., Li Y., Liang X., Chen J., Li Y. & Li J. (2011).Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*. 4: 1-9.
  133. Moraleda-Munoz A. & Shimkets L. J.(2007). Lipolytic Enzymes in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*. 183: 3072 –3080.

134. Mukunda S., Onkarappa R. & Prashith Kekuda T.R. (2012). Isolation and Screening of Industrially Important Fungi from the Soils of Western Ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal*. 1:27-32.
135. Muralider R. V., chiromamilla R. R., Marchan R., Ramachandran V. N., Ward O. P. & Nigan P. (2002). Understanding lipase stereo selectivity. *World journal of microbiology & biotechnology*. 18: 81-97.
136. Muralider R. V., chiromamilla R. R., Marchan R., Ramachandran V. N., Ward O. P. & Nigan P.(2002). Understanding lipase stereo selectivity. *World journal of microbiology & biotechnology*. 18: 81-97.
137. Musa H. & Adebayo-Tayo C. B. (2012) Screening of Microorganisms Isolated from Different Environmental Samples for Extracellular Lipase Production. *AU J.T*. 15: 179-186.
138. Najjar A. (2010). Étude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat. Université de la méditerranée (AIX-MARSEILLE II), Pp 168.
139. Naqvi S. H., Khan M.Y., Rafiq M. & Dahot M. U. (2012). Screening of lipase producing Fungi and Catalytic Activity from Molasses Culture Medium .*Sindh University Research Journal.(Science Series)*.44:105-112.
140. Nini L.,Sarda L., Comeau L-C, Boitard E. , Dubes J-P, Chahinian H.(2001). Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*.1534: 34-44.
141. Niu C., Graves J. D., Mokuolu F. O., Gilbert S.E. & Gilbert E. S.(2005). Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *Journal of microbiology methods*. 62: 129-132.
142. Nwuche C.O & Ogbonna J.C. (2011). Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (pome) dump sites at nsukka. *Brazilian archives of Biology and technology*. 54:113-116.
143. Orlando Beys Silva W., Mitidieri S., Schrank A. & Vainstein M.H.(2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the *entomopathogenic* fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321–326.

144. Osman M.E., Abo El-Nasr A. A. & Abdullah H.N. ( 2012). Screening of some fungal isolates for lipase production and optimization of cultural conditions for the most potent isolate. Egypt. J. Microbiol. 47: 79-95
145. Ota Y., Sawamoto T. & Hasuo M.(2000).Tributyryn specifically induces a lipase with a preference for the Sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2497-2499.
146. Pabai F.(1997).Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for inter esterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179.
147. Pandey H., Kestwal A., Chauhan D., Kumari S., Dhalwal V., Singh G.J., Singh P., Mann P., Sharma A., Saxena G., Kapoor A. et Bhoopander Giri B. Isolation and screening of potential fungi and standardization of a process for the production of extracellular lipase. DU Journal of Undergraduate Research and Innovation.
148. Parades C., Bernal M. P., Roig A. & Cegarra J.(2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agro industrial and urban wastes. Biodegradation. 12: 225–234.
149. Paskevicius A. (2001).Lipase activity of yeasts and yeast-like fungi functioning under natural conditions. Biologia. 4: 16-18.
150. Pera L.M., Romero C.M., Baigori M.D. & Castro G.R. (2006). Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. Food Technol. Biotechnol. 44: 247–252.
151. Pereira E.O., Tsang A., Tim A McAllister & Rima Menassa.(2013).The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. Biotechnology for Biofuels. 6:1-10.
152. Petersen M. & Daniel R.(2006).Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphom*. World journal of microbiology & Biotechnology. 22: 431-435.
153. Plou F. G., Ferrer M., Nuero O. M., Calvo M. V., Alcalde M., Reyes F. & Ballesteros A.(1998).Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnology techniques. 12:183-186.

154. Pogori N., Cheikhyoussef A., Xu Y. & Wang D. 2008. Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. *Biotechnology*. 7(4): 710-717.
155. Prabhakar T., Kumar K.A. & Ellaiah P.(2002). The effect of culture conditions on the production of lipase by fungi. *Journal of scientific and industrial research*. 61: 123- 127.
156. Qin L-N, Cai F-R, Dong X-R., Huang Z-B, Tao Y., Huang J-Z & Dong Z-Y.(2012).Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. *Bioresource Technology*. 109:116–122.
157. Rajendra BK & Ashok MC. (2011). Extracellular lipase enzyme production by seed-borne fungi under the Influence of Physical Factors. *International Journal of Biology*. 3:94-100.
158. Rajendran A. & Thangavelu V.(2009). Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Science and Technology*. 1-26.
159. Ramírez C.M.G., Rivera-Ríos J.M., Téllez-Jurado A., Maqueda Gálvez A.P., Mercado-Flores Y. & Arana-Cuenca A.(2012). Screening for *thermotolerant ligninolytic* fungi with lactase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management*. 95: 256-259.
160. Ramos-Sánchez L.B., Cujilema-Quitio M.C., Julian-Ricardo M.C., Cordova J. & Fickers P. (2015). Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Journal Bioprocess Biotech* , 5:1-9
161. Razak C.N.A., Salleh A.B., Musani R., Samad M.Y. & Basri M. (1997).Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent .*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 3: 153-159.
162. Reetz M. T. (2002).Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6: 145–150.
163. Reis P., Holmberg K., Miller R., Leser M. E., Raab T. & Watzke H.J.(2008).Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes.*C.R.Chimie*. 1-8.
164. Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R.(2008). Lipases at interfaces: A review. *Advances in colloid and interface science*.

165. Roberts R. G., Morrison W. H., Robertson J.A. Hanlin T. (1987). Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. *Mycologia*. 79: 265-273.
166. Romdhane I.B.-B. Ahmed Fendri, Gargouri Y., Gargouri A., Belghith H.(2010). A novel thermo active and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*. 53: 112–120.
167. Rouillard H.( 2012). Étude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde. Université de La Rochelle,. Français. Pp 269.
168. Rywińska A., Witkowska D., Juszczak P., Rymowicz W., Kita A. (2008). Waste Frying Oil as Substrate for Lipase Production by *Geotrichum candidum* Strains *Polish J. of Environ. Stud.* 17( 6 ): 925-931
169. Salihu A., Alam Md. Z., AbdulKarim M.I., Salleh H.M.(2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 58:36–44.
170. Sanchez A., Gordillo M.A., Montesinos J.L., Valero F. & Lafuente J.(1999 ). On-Line Determination of the Total Lipolytic Activity in a Four-Phase System Using a Lipase Adsorption Law. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.87:500-506.
171. Sathish Yadav K.N., Adsul M.G., Bastawde K.B., Jadhav D.D., Thulasiram H.V., Gokhale D.V.(2011) .Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*.102: 10663–10670.
172. Schinke C., Germani J.c.(2012).Screening Brazilian *Macrophomina phaseolinai* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases. *International microbiology*. 15: 1-7.
173. Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. & Bornscheuer U. T.(2004). Directed evolution of Lipases and Esterases. *Methods in enzymology*. 388:199-207.
174. Schrag J.D., Cygler M.(1993).1.8 A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.* 230: 575-591.
175. Scioli c, & Vollaro L.(1997).The use of *Yarrowia lipolytica* reduce pollution in olive mill wastewaters. 31: 2520-2524.

176. Sharma A.K. , Sharma V., Saxena J. (2016). A short review on extracellular lipase producing microorganisms. *Advance Pharmaceutical Journal*. 1(3): 59-65.
177. Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. (2001). Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances*. 19: 627-662.
178. Sharon C., Nakazato M., Ogawa H. & Kato Y.(1998). Lipase induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 21: 292-29.
179. Shu C-H, Xu C-J, Lin G-C.(2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 41:734–738.
180. Sierra G.(1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23:15-22.
181. Silva W.O.B., Mitidieri S., Schrank A. & Vainstein M.H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from *entomopathogenic* fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process biochemistry*. 40: 321-326.
182. Singh A. K. & Mukhopadhyay M.(2012). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl.Biochem.Biotechnol.* 166: 486–520.
183. Singh R., Gupta N., Goswami V. K. & Gupta R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterase. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 70:679-682.
184. Sorokin D.Y. & Jones B.E.(2009). Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology*.78: 125-130.
185. Stehr F., Kretschmar M., Kröger C., Hube B. , Schäfer W.(2003) .Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22:347–355.
186. Stency Mariam Thomas, S. Kavitha. Isolation and Screening of Lipase Producing Microorganism from Soil and Comparative Study of Enzyme Activity with Different Substrates .*International Journal of scientific engineering and technology research*. 4: 5778-5781.
187. Stéphanie H.( 2000). Utilisation alimentaire des levures. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie. Université Henri Poincaré - NANCY 1, France . Pp 188.
188. Stern A.M., Ordal Z. J., Halvorson H.O. (1954). Utilization of fatty acids by and lipolytic activities of *Mucor muced*.68:24-27.

189. Sumathy. R, Vijayalakshmi. M. & Deecaraman. M.(2012). Studies on Lipase production from fungal strains by different inducers at varied concentrations - A comparative study .International Journal of Environmental Sciences.3:1072-1078.
190. Tabuc C. (2007). Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production Des mycotoxines. Thèse de doctorat. UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Pp 190.
191. Tan T., Zhang M., Wang B., Ying C. & Deng L.(2003).Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. Process Biochemistry.39: 459-465
192. Tan T., Zhang M., Xu J., Zhang J. (2004).Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. Process Biochemistry. 39: 1495-1502.
193. Thakur S. (2012). Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. International Journal of Scientific & Engineering Research. 3: 1-29.
194. Thota P., Bhogavalli P.K., VallemP.R., Srirangam V. J. (2012) Studies on optimization of extracellular lipase from potential fungal strain(s) isolated from oil contaminated soil Microbiol. Biotech. Res., 2 (3): 418-425.
195. Tom R.A. & Crisan E. V. (2005). Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine substrates. Applied Microbiology. 29: 206-210.
196. Toscano L., Montero G., Cervantes L., Stoytcheva M., Gochev V., & Beltrán M.(2013) Production and partial characterization of extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* by solid-state fermentation. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 27(2): 3776-3781.
197. Tsuzuki W., Kitamura Y., Suzuki T. & Mase T. (1999). Effects of glucose on lipase activity. Biosci. Biotechnol. Biochim. 63: 1467 - 1470.
198. Ülker S., Özel A., Çolak A., Alpay Karaoğlu Ş. (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. Turk J. Biol. 35: 543-550.
199. Vakhlu, J. & Kour, A.(2006).Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Journal of Biotechnology. 9: 0717-3458.
200. Vardanega R., Remonato D., Arbter F., Polloni A., Rigo E., Ninow J. L., Treichel H., Oliveira D. & Diluccio M. (2008). A systematic study on extraction of lipase

- obtained by solid state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. World journal of chemistry. 3: 55-60.
201. Vargas V.A., Delgado O. D., Hatti-Kaul R. & Mattiasson B.(2004).Lipases-producing microorganisms from Kenyan alkaline soda lake. Biotechnology Letters. 26: 81-86.
  202. Vayssier Y. & Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle, 2<sup>ème</sup> ed. Masson ed, Paris.
  203. Veerapagu M., Sankara Narayanan D.A., Ponmurugan K. & Jeya K.R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. Asian J Pharm Clin Res. 3: 62-67.
  204. Venkata Rae P., Jayaraman K. & Lakshmanan C. M. (1993). Production of Lipase by *Candida rugosa* in Solid State Fermentation. 1: Determination of Significant Process Variables. Process Biochemistry. 28:385-389.
  205. Verger R. (1985). Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Paris, Édition : Gauthier Villars. 313-329.
  206. Verger R. & de Haas G. H. (1976). Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5: 77-117.
  207. Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J. & Haas M.J.(2000).Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 9: 113–148.
  208. Wang D., Xu Y. & Shan T.(2008).Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. Biochemical Engineering Journal. 41: 30–37.
  209. Winkler F. K., D'arcy A. & Hunziker W.(1990).Structure of human pancreatic lipase. Nature. 343: 771-774.
  210. Wu X. Y., Jääskeläinen S. & Linko Y.Y. (1996).An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme and microbial Technology. 19: 226-231.

211. Yang Q., Zhang H., Li X., Wang Z. , Xu Y., Ren S., Chen X., Xu Y., Hao H. & Wang H. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource Technology*. 129: 264–273.
212. Yesilada O., Sik S. & Sam M.(1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 14: 37-42.
213. Yu M., Qin S., Tan T. (2007). Purification and characterization of the extracellular lipase Lip 2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*. 42: 384–391.
214. Zanolto S.P., Romano I. P., Lisboa L. U. S., Duvoisin Jr. S., Martins M. K., Lima F. A., Silva S. F. & Albuquerque P. M.(2009). Potential Application in Biocatalysis of Mycelium-Bound Lipases from Amazonian Fungi. *J. Braz. Chem. Soc.* 20: 1046-1059.

# ANNEXES

---

**ANNEXE 1****➤ Pomme de terre Dextrose Agar (PDA)**

Composition :

Pomme de terre .....200g

Saccharose .....20g

Agar .....20g

Eau distillée stérile ..... 1000 mL

(Nous avons également utilisé le milieu P.D.A commercialisé)

Préparation :

- Laver la pomme de terre et la couper en petit cubes
- Mettre dans 500 mL d'eau distillée et porter à ébullition pendant 1 heure
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 mL d'eau distillé
  - Ecraser et filtrer la pomme de terre pour obtenir l'extrait, puis ajouter à la solution d'agar
  - ajouter le Glucose
- Agiter ce milieu jusqu'à homogénéisation
- stériliser par autoclavage à 120°C / 20 min

**➤ PDA commercialisé**

Trente neuf grammes de PDA (Sigma) ont été dissous dans un litre d'eau distillée. Le milieu a été porté à ébullition et stérilisé à 120°C pendant 20 min et distribué en boîtes de Pétri (9 cm) en raison de 20 mL par boîte.

➤ **Sabouraud dextrose agar « SDA »**

Glucose .....	20g
Peptone .....	10g
Agar .....	17g
Eau distillée.....	1000 mL

➤ **Milieu de conservation à 20 % glycérol**

Glycérol .....	20 mL
Eau distillée .....	100 mL

**Tableau :** Fermentation de sucres :

Glucose	+
Xylose	+
Saccharose	+/-
Lactose	+/-
Maltose	+
Sorbitol	+
Galactose	+
Glycerol	-
Maltose	+
Inositol	-
Raffinose	-
Sorbitol	+
Xylitol	+/-
Cellobiose	-
Trehalose	+/-
Adonitol	+
huphe	+

Les symboles correspondent à, + : positif, - : négatif, +/- variable

➤ **Poids secs**

Tableau : La biomasse des souches après fermentation à 30 C

Souches testées	Milieu de culture	Poids sec (mg.mL)
<i>Candida albicans</i>	MM+HO+G	271.5 ±0.71
<i>A. terreus</i>	MM+ HO	234.5± 0.71
<i>A. terreus</i>	MM+HO+G	502.5±0.71
LEVURE 1	MM+HO	263.5±0.71
LEVURE 2	MM+250U HO	230± 4 jr
<i>Cunninghamella</i> sp.	MM+ HO+G	446±8.49
<i>Cunninghamella</i> sp.	MM+HO+T80	416.5± 2.12
<i>A. fumigatus</i>	MM+HO	450± 14.14
<i>Mucor</i> sp.	MM+HO	794.5± 0.71
<i>Trichoderma</i> sp. +T80	MM+HO+T80	622.5± 9.19
<i>A. versicolor</i>	MM+HO	260.5± 26.1

MM: Milieu minéral HO : huile d'olive / G : glucose

## ANNEXE 2

### Publication Internationale

**Alima RIHANI**, Lazhari TICHATI, Boudjema SOUMATI.(2018). Isolation and identification of lipase-producing fungi from local olive oil manufacture in East of Algeria. Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 19 (1): 013 – 022.

### Communications Internationales

1. Action des lipases bactériennes sur la formation des biofilms. (2010). Premières journées scientifiques internationales sur les biofilms. 31 mai 02 juin. Université badji mokhtar Annaba, Algérie .
2. Effets de différents substrats sur l'activité lipolytique des souches bactériennes. (2015). 26<sup>ème</sup> forum international de science biologique et de biotechnologie de ATSB. 23-26 mars, Sousse, Tunisie.