

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement supérieur et de recherche scientifique*



**Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi**



*Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département des Sciences de la Nature et de la vie*

*N °d'ordre.....*

*N ° de série.....*

**MEMOIRE**

*Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en biologie*

*Filière : sciences biologiques.*

*Spécialité : Microbiologie appliquée.*

**Thème :**

***Isolement et caractérisation de souches levuriennes à partir  
d'échantillons de grignons d'olive et criblage de leur activité  
lipolytique***

*Méchantel Khadidja*

*Présenté par :  
Sahraoui Amina*

*Thabet Nadjjet*

*Devant le jury :*

*Examinatrice : Mme. Khanouchi Nour Chams .*

*M.C.B. à l'université OEB .*

*Encadrante : Mme. Benslama ouided .*

*M.C.A. à l'université OEB.*

*Présidente : Mme. Meradi Laaem.*

*Pr. à l'université OEB .*

***Soutenu le : 06/06/2023***

***Promotion : 2022-2023***

## **Remerciement**

*On remercie dieu le Tout Puissant de nous avoir donné la Santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout D'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de l'encadrement de **Madame Benslama Ouided**, On la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel,*

*pour sa patience sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous adressons nos remerciements á*

***Mme.Meradi Laarem Professeur** à l'université Oum El Bouaghi d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions également*

***Mme. Khenouchi Chams Nour***

*Maitre de conférences à l'université*

*d'Oum El Bouaghi d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*Nos remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

## *Dédicace*

À l'aide de **DIEU** tout puissant, qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À mon cher Père «**Nabil**». À la lumière de mes yeux et aux ailes de mon vol, mon père qui n'a jamais cessé de me chérir et me soutenir durant toutes mes années d'études et qui ma rendu une personne digne de porter son nom. Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amour.

*j'espère que le Dieu Tout Puissant te donne longue vie.*

À ma chérie Mère «**Ouarda** ». À celle qui ma donnée le gout de la vie ;À mon soleil et à la source de mon pouvoir; qui ma mis dans ses yeux et veiller a ce que je deviens sa fierté ,pour ma mère, je te souhaite santé et bien-être .Que Dieu te garde pour nous.

À mes belles sœurs «**Abir** » et «**Aya** » qui n'ont jamais cessé de m'encourager et Soutien tout au long de mes études, j'espère que Dieu les sauvera et leur donnera l'opportunité et beaucoup de bonheur.

À mon adorable petite frère «**Okba** » qui sait toujours comment répandre la joie et le bonheur pour tout la famille, à qui je souhaite beaucoup de bonheur.

À ma mignonne petite sœur «**Shiraz** » La dernière du groupe et la proximité de mon cœur . Je vous souhaite tout le succès dans le monde .

À le personne le plus chère à mon cœur et le plus proche de mon âme «**Y** » Je vous souhaite tout le bonheur du monde et que Dieu vous sauve .

*Je voudrais aussi dédier très chaleureusement mes copines au travail «**Nadjet** » et«**Amina** »,Pour les aider et les soutenir .*

À mes chéries amies «**Rania** » «**Chaima** » «**Bouchra** » «**Hanen** »,Merci pour tous les souvenirs irremplaçables et les moments inoubliables passés ensemble .

À tous ceux et celles qui me sont chers.

Merci à vous tous.

**Khadidja**

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*À mon cher père « Djemai » qui m'a soutenu tout au long de mon parcours scolaire.*

*À ma chère mère bien-aimée « Nina ». Tu es la lumière de mes yeux et je te souhaite une bonne santé et le bien-être.*

*Pour leur soutien, leur patience, leur amour et leur encouragement tout au long de ma vie, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers eux.*

*À ma belle sœur « Asma » et son mari « Ibrahim ».*

*À mon cher frère « Abd El Nour »*

*À ma chère petite sœur « Hadjer ».*

*Je vous souhaite à tous un bonheur infini dans ce monde.*

*Aussi, je le dédie à mes très chère amis les plus sources de mon bonheur « Chaima » et « Manale ».*

*À mes amis : « khadidja », « Nadjet » et « Bouthaina ».*

*Je vous remercie pour votre soutien.*

*A tous ceux qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ce travail .*

*Amina*

## *Dédicace*

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail*

*À « Allah » : Le tout puissant, le miséricordieux créateur des terres et des Cieux, merci de m'avoir accordé la santé et la force pour réaliser ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail, en deuxième lieu à mes chers parents pour toutes ces années de sacrifices,*

*À toi **papa** le pilier de la famille, qui m'as toujours fait confiance et poussée à donner le meilleur de moi-même,*

*À toi **maman** la bougie de ma vie. qui m'as appris que la persévérance fini toujours par payer et qui as toujours cru en moi et m'as offert la meilleure des éducations,*

*À la mémoire de ma sœur « **Sonia** » Ma source d'inspiration. Qui a béni mon désir d'apprendre et m'a toujours encouragé pour être devenue ce que je suis, merci, avec tout mon amour et mon désir.*

*À ceux qui m'ont toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'étude et ma vie.*

*Merci pour votre amour et votre confiance totale :*

*À mes sœurs Les fleurs de ma vie. « **Moufida** », « **Hassina** », « **Ibtissam** », « **Nozha** » et ainsi*

*Mes frères, mes pilier « **Mohammed (Abd El Salam)** » et « **Fares** ».*

*Et bien sur a les maries de mes sœurs , Surtout « **Annab Aissa** » qui je considère comme un deuxième père ,ainsi leurs **chères enfants** sans exception .*

*Au journaliste Monsieur « **Annab Aadl** », qui m'a aidé avec tout ce qu'il pouvait de conseils et d'orientation.*

*À mes « **Amina** » et « **Khadidja** ».*

*À tous ce qui m'ont aidée de près ou de loin*

*Dans la réalisation de ce travail.*

**Nadjet**

# SOMMAIRE

## Table des matières

### Remerciement

### Liste des figures

Liste des photographies

### Liste des tableaux

### Liste des abréviations

Introduction.....2

## Partie 01 : Partie Bibliographique

### Chapitre 01 : Les levures

<b>1. Historique.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Définition.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Taxonomie.....</b>	<b>8</b>
3.1. Critères taxonomique.....	8
3.2. La classification de levures .....	9
3.2.1. Les ascomycètes .....	9
3.2.2. Les basidiomycètes .....	9
3.2.3. Les deutéromycètes .....	9
3.3. Méthode classique d'identification.....	10
<b>4. Habitats.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Morphologie et structure.....</b>	<b>12</b>
<b>6. Reproduction.....</b>	<b>13</b>
6.1. A sexuée.....	13
6.2. Sexuée .....	14
6.3. Cycles biologiques .....	15
<b>7. Physiologie de la croissance .....</b>	<b>16</b>
7.1. Besoins nutritionnels.....	16
7.1.1. Source de carbone .....	16
7.1.2. Source d'azote.....	17
7.1.3. Les lipides.....	17
7.1.4. Oligo-éléments .....	17
7.1.5. Autres composé .....	17
7.1.5.1. Pyridoxine (vitamine B 6).....	17
7.1.5.2. Thiamine (vitamine B1 ).....	18
7.2. Besoins physico-chimique.....	18
7.2.1. Température .....	18
7.2.2. PH.....	19

7.2.3. Oxygène.....	19
7.2.4. Aw et pression osmotique .....	20
<b>8. Métabolisme .....</b>	<b>20</b>
8.1. Métabolisme oxydatif.....	20
8.2. Métabolisme fermentaire.....	21

## **Chapitre 02 : Enzyme Lipase**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Définition.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Nomenclature.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Structure.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Classification des lipases.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Mode d'action.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Source de lipase.....</b>	<b>28</b>
7.1. Les lipases de mammifères .....	28
7.1.1. Les lipases pancréatiques.....	29
7.1.2. Les lipases gastriques.....	29
7.1.3. La lipase hépatique .....	29
7.2. Les lipases végétales.....	30
7.3. Les lipases microbiennes.....	30
7.3.1. Lipases des levures.....	31
<b>8. Production de lipases.....</b>	<b>31</b>
<b>9. Facteurs influence l'activité de lipase.....</b>	<b>32</b>
<b>10. Utilisations des lipases levuriennes dans divers procédés industriels.....</b>	<b>32</b>
10.1. Les lipases dans l'industrie agroalimentaire.....	33
10.2. Les lipases dans la cosmétique.....	33
10.3. Lipase dans les produits pharmaceutiques.....	33
10.4. Les applications médicales des lipases.....	34
10.5. Production de biocarburants.....	34
10.6. Les lipases dans les détergents.....	36

## **Partie 02 : partie pratique**

### **Matériels et Méthodes**

<b>1. Echantillonnage.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Traitement des échantillons de grignons d'olive.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Isolement des souches levuriennes.....</b>	<b>39</b>
<b>4. Purification des levures (Réensemencement ).....</b>	<b>40</b>
<b>5. Conservation des souches isolées.....</b>	<b>40</b>
5.1. Pour une courte durée.....	40
5.2. Pour une longue durée.....	40

<b>6. caractérisation des souches.....</b>	<b>41</b>
6.1.Etude des caractères culturaux .....	41
6.2.Etude des caractères microscopiques.....	41
6.3.Aptitude à la filamentisation.....	41
6.4.Etude des caractères biochimiques.....	42
6.4.1. Test d'Indole.....	42
6.4.2. Test Triple Sugar Iron (TSI).....	42
6.4.3. Réduction des nitrates .....	42
6.4.4. Test VogesProskauer et Rouge de Méthyle.....	42
6.4.5. Test Mannitol Mobilité.....	43
6.4.6. Test du citrate de Simmons.....	43
6.5. Etude Fermentation des sucres .....	43
<b>7. Criblage de l'activité lipolytique et estérolitique.....</b>	<b>43</b>

## **Résultats et Discussion**

<b>1. Isolement des souches levuriennes.....</b>	<b>46</b>
<b>2. Caractérisation des souches.....</b>	<b>48</b>
2.1.Etude des caractères culturaux et microscopiques.....	48
2.2.Etude des activités lipolytiques et estérolitique .....	54
2.3.Aptitude à la filamentisation.....	57
2.4.Etude des caractères biochimiques.....	59
2.4.1. Test d'Indole.....	62
2.4.2. Test Triple Sugar Iron (TSI).....	63
2.4.3. Réduction des nitrates .....	63
2.4.4. Test Voges Proskauer et Rouge de Méthyle.....	64
2.4.5. Test Mannitol Mobilité.....	64
2.4.6. Test du citrate de Simmons.....	65
2.5.Fermentation des sucres .....	65

## **Conclusion générale**

## **Références bibliographiques**

## **Résumé**

## **Annexe**

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Schéma structural d'une cellule de levure.....	8
<b>Figure 02 :</b> Morphologie des cellules de levure et des mycelium.....	12
<b>Figure 03:</b> Filamentisation des levures. <b>(A) :</b> Pseudomycélium. <b>(B) :</b> Vrai mycélium. Barre = 10 µm (LAB ).....	13
<b>Figure 04:</b> Schéma d'interprétation de la reproduction asexuée d'une levure.....	14
<b>Figure 05 :</b> Schéma d'interprétation de la reproduction sexuée d'une levure.....	15
<b>Figure 06 :</b> Cycle de reproduction de la levure.....	16
<b>Figure 07 :</b> structure dimensionnelle de lipase : Diagramme en ruban de CRL avec les états ouvert et fermé du couvercle superposés. La feuille L centrale mixte est de couleur bleu clair et la plus petite feuille L N-terminale est de couleur bleu foncé. Les hélices qui s'alignent contre la feuille L centrale sont de couleur vert foncé. La conformation fermée du couvercle est jaune et la conformation ouverte est rouge. Les résidus formant les triades catalytiques sont indiqués en rouge.....	26
<b>Figure08 :</b> Classification des lipases basée sur la base de données d'ingénierie des lipases.....	27
<b>Figure 09 :</b> Mécanisme d'action de la lipase sur les triglycérides.....	28
<b>Figure 10 :</b> Carte représentant les cinq wilayas d'échantillonnage.....	36
<b>Figure11 :</b> Cercle proportionnel représentant le pourcentage des souches de levures de chaque échantillon.....	45
<b>Figure12 :</b> Diagramme à barres montrant les résultats du test d'activité lipolytique et estérolytique par apport aux souches de chaque échantillon.....	55

## Liste des photographies

<b>Photographie 01</b> : échantillons de grignons d'olive utilisées dans l'étude.....	37
<b>Photographie 02</b> : Grignons d'olive séchés.....	38
<b>Photographie 03</b> : Préparation des dilutions des échantillons.....	39
<b>Photographie 04</b> : Résultats de test lipolytique et estérolytique.....	53
<b>Photographie 05</b> :Résultats du test d'aptitude à la filamentisation.....	57
<b>Photographie 06</b> : Résultats des tests biochimiques pour les levures actives.....	61
<b>Photographie 07</b> :Résultats du test de fermentation des sucres.....	68

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Place des levures dans l'Eumycotina.....	10
<b>Tableau 02</b> :Température maximale de croissance de quelques espèces de levures.....	19
<b>Tableau 03</b> :Les souches levuriensélectionnés.....	46
<b>Tableau 04</b> : Caractérisation macroscopique des 20 souches sélectionnées.....	47
<b>Tableau 05</b> :Caractérisation microscopique des 20 souches sélectionnées.....	49
<b>Tableau 06</b> :Résultats du test d'activité lipolytique et estérolylique.....	54
<b>Tableau07</b> : Résultats de l'aptitude à la filamentisation.....	57
<b>Tableau 08</b> : Résultats des tests biochimiques des souches actives.....	58
<b>Tableau 09</b> : Résultats du test de fermentation des sucres.....	64

## Liste des abréviations

### ❖ C

**C** : *Candida*.

**C** : Colonne.

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Calcium.

### ❖ E

**E** : Echantillon.

**E** : *Escherichia coli*.

### ❖ F

**FeSO<sub>4</sub>** : Sulfate de fer.

### ❖ G

**Gal** : Galactose.

**Glu** : Glucose.

### ❖ H

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène.

### ❖ K

**KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>** : Phosphate de Potassium Monobasique.

### ❖ L

**Lac** : Lactose.

### ❖ M

**Mal** : Maltose.

**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de Magnésium.

### ❖ N

**NI** : Nitrate-réductase I.

**N II** : Nitrate-réductase II.

**N<sub>2</sub>** : Azote gazeux.

**NO<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Hydrogénophosphate de Sodium.

**NaCl** : Chlorure de Sodium.

**NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate d'ammonium.

### ❖ R

**RM** : Rouge de Méthyle .

### ❖ S

**SM** : Solution mère .

**Sac** :Saccharose.

**S** :Souche.

**Suc** :Sucrose.

**S. cerevisiae** : *Saccharomyces cerevisiae*.

❖ **T**

**T20** : Tween20.

**T80** :Tween80.

**TSI** :Triple Sugar Iron.

❖ **V**

**VP** :VogesProskauer.

❖ **Y**

**YEME** : Yeast Extract Malt Extract.

# Introduction

*Introduction*

Les levures sont des micro-organismes unicellulaires appartenant au phylum des champignons (dénomination internationale : Fungi) (**Defosse *et al.*, 2018**).

L'importance des levures est soulignée par notre consommation souvent quotidienne de pain et de boissons fermentées. Les progrès récents de la biotechnologie ont accru notre dépendance aux levures pour les produits pharmaceutiques et pour les produits biochimiques en vrac tels que l'acide citrique (**Kurtzman *et al.*, 2011**).

Les levures ont un large éventail d'applications principalement dans l'industrie alimentaire (vinification, brassage, production de spiritueux distillés et boulangerie) et dans la production de biomasse (protéine unicellulaire). Plus récemment, la levure a également été utilisée dans l'industrie des biocarburants et pour la production de composés hétérologues (**Żymaniak-Duda *et al.*, 2017**).

De nos jours, des recherches récentes ont généré de nouveaux développements passionnants de produits et de bioprocédés utilisant des levures (**Mattanovitch *et al.*, 2014**).

L'industrie oléicole, est une industrie agroalimentaire, génère des déchets lipophiles qui sont souvent mal recyclés ou non recyclés du tout, posant ainsi un défi en termes de gestion environnementale (**Tsagariki *et al.*, 2007**). Cette industrie produit des déchets de nature solide tels que les grignons d'olive, les feuilles et le bois, ainsi que des déchets liquides tels que les margines. Cependant, la gestion adéquate de ces déchets représente un défi en termes de recyclage et de valorisation (**Rizoun , 2012**). Les déchets oléicoles, tels que les grignons d'olive, les feuilles et les margines, sont souvent brûlés ou rejetés sans traitement adéquat, ce qui représente un risque environnemental. Leur toxicité peut contaminer les sols, les nappes phréatiques et les cours d'eau. La valorisation de ces déchets par les microorganismes est une méthode récente, déjà utilisée dans les pays développés, offrant une solution prometteuse pour leur traitement durable (**Perraud-Gaime *et al.* , 2009**).

La production d'enzymes a été largement dominée par les bactéries et les moisissures, qui sont les micro-organismes les plus couramment utilisés en raison de leur capacité à produire de grandes quantités d'enzymes (**Gupta *et al.*, 2003**).

En revanche, les études sur la production d'enzymes à usage industriel par les levures sont moins répandues. Bien que les levures ne soient pas aussi omniprésentes que les bactéries dans l'environnement naturel, elles peuvent néanmoins être isolées du sol, de l'eau, des

aliments, des plantes, des animaux et des insectes, offrant ainsi un potentiel intéressant pour la production d'enzymes (**Techapun et al., 2017**).

D'autre part, les enzymes sont considérées comme des catalyseurs de la nature. La plupart des enzymes aujourd'hui (et probablement presque toutes à l'avenir) sont produites par la fermentation de matériaux biosourcés (**Hasan et al., 2006**).

Les enzymes de levures sont de plus en plus utilisées dans l'industrie agroalimentaire (IAA) pour améliorer les procédés de production et réduire les coûts énergétiques. La recherche se poursuit pour découvrir de nouvelles enzymes de levures ayant un potentiel d'application industrielle. Des levures telles que *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula polymorpha* sont couramment utilisées dans la production industrielle de protéines et d'enzymes, y compris les protéines pharmaceutiques (**Johnson et Echavarii –Erasun, 2011**).

Le marché mondial des enzymes industrielles est dominé par les hydrolases de la famille EC 3, telles que les protéases, les lipases et les carbohydrases. Ces enzymes représentent plus de 85% des ventes totales d'enzymes et plus de 95% de la production totale d'enzymes techniques. Les protéases et les amylases sont les groupes les plus importants en termes de ventes, suivis par les lipases. Ces enzymes ont également été l'objet de nombreuses publications au cours des dernières années, avec une moyenne d'environ 1000 publications par an (**Rigo et al., 2010; Salihu et al., 2012**).

En Algérie, l'utilisation des lipases dans les applications biotechnologiques présente un grand intérêt, mais leur importation complète crée un besoin de développement d'industries locales pour leur production. Cependant, le principal défi réside dans les coûts élevés de production, ce qui limite leur utilisation. Par conséquent, une réforme est nécessaire pour explorer de nouvelles voies qui exploitent les déchets industriels et agroalimentaires, afin de réduire les coûts de production. Cette approche permettrait de trouver des solutions innovantes et durables pour l'utilisation des lipases, en utilisant des ressources sous-utilisées et en diminuant la dépendance vis-à-vis des importations coûteuses (**Bataiche , 2014**).

L'objectif de cette étude est de trouver une source alternative de lipase afin de l'exploiter à des fins industrielles, et également d'investir de manière économique en produisant de la lipase à partir de levures dérivées de résidus d'olives.

Pour cette raison, plusieurs échantillons de grignons d'olive ont fait l'objet d'un isolement de souches de levures. Ces dernières ont été caractérisées par une batterie de test morphologiques et biochimiques et criblés pour leur activité lipolytiques à fin de les proposer comme des souches productrices potentielles d'enzymes lipolytiques.

# Partie 01: Bibliographique

*Partie 01: Bibliographique*

## Chapitre 01: Levures

*Chapitre 01: Levures*

## 1. Historique

L'étude des levures est intimement liée à celle de la fermentation. L'idée que les fermentations alcooliques sont provoquées par des organismes vivants est due à Linné. En 1680, Leewenhoek décrit pour la première fois les levures par le microscope. Il les décrit comme des corps globulaires, de forme ovale ou sphérique. En 1799, Fabroni a comparé les levures aux albuminoïdes. Vers 1825, et pendant un certain temps après, Mitscherlick, Cagnard-Latour, Schwann et Kützing ont démontré que les levures de bière et de vin étaient composées de cellules qui se multipliaient par bourgeonnement. En 1839, Schwann observe pour la première fois des endospores dans les levures. Il a prouvé qu'elles pouvaient être libérées par une rupture de la paroi cellulaire (**Guilliermond, 2003**).

Les premières traces de l'utilisation empirique par l'espèce humaine de la levure pour fermenter les sucres en alcool, ou comme agent de levage pour la panification, remontent à plus 5000 ans. Une simple visite dans la section égyptienne du musée du Louvre, dans laquelle des scènes de brasserie ou encore des pains fossilisés sont exposés, suffit à s'en persuader (**Bachet *al.*, 2020**).

Mais la nature des levures est définitivement connue depuis l'époque où Pasteur a commencé ses recherches sur la fermentation. Jusqu'à cette époque, on savait que la levure de bière se multipliait lorsqu'on l'introduisait dans le moût sacchariné ; on croyait qu'elle se formait spontanée et que, dans la levure, une force occulte produisait la fermentation ; c'était tout ce qu'il y avait à savoir, Avec Pasteur, les connaissances définitives sur les levures commencent. C'est en 1859 qu'il établit, par ses mémorables expériences que la fermentation est corrélative à la vie des levures. Quelques années plus tard, il démontre l'impossibilité de la génération spontanée et a introduit les méthodes de culture pure qui ont permis une étude morphologique des levures (**Guilliermond, 2003**).

Un peu plus tard, C'est le travail de Hansen, qui est le véritable fondateur de cette étude, et dont le nom marque une deuxième étape dans l'histoire des levures. Grâce à ses recherches minutieuses pendant 30 ans, ce mycologue a mis au point des méthodes qui ont été les méthodes introduites par Pasteur pour cultiver et isoler les levures. Il a réussi à inoculer des cultures avec une seule cellule et à séparer une espèce d'une autre. Par des études minutieuses sur les morphologiques et physiologiques des levures, Hansen a trouvé les caractéristiques qui permettent de différencier une espèce d'une autre. Il a ainsi pu caractériser un grand nombre d'espèces dont la majorité est connue. Hansen est à l'origine de notre connaissance du cycle de

vie et des relations systématiques des levures. Ces dernières années, il a proposé une classification qui a été universellement acceptée, La troisième étape dans l'étude des levures a été la découverte, par Buchner, de la zymase, qui a permis une avancée considérable dans l'étude de la nutrition des levures et du mécanisme de la fermentation alcoolique (**Guilliermond, 2003**).

## 2. Définition

Le terme « levure » est dérivé de l'ancien mot néerlandais « giste » et du mot allemand « gischt », qui fait référence à la fermentation. Certaines levures sont pathogènes pour les plantes et les animaux (**Kutty et Philip, 2008**).

Le mot anglais "yeast" (levure) et ses équivalents dans de nombreuses autres langues sont basés sur des mots qui signifient "écume" et "mousse". D'autres langues sont basées sur des mots qui signifient de monter, références directes aux processus de fermentation de la bière et du pain. (**Kurtzman, 1998**).

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire (**Guiraud, 1998**).

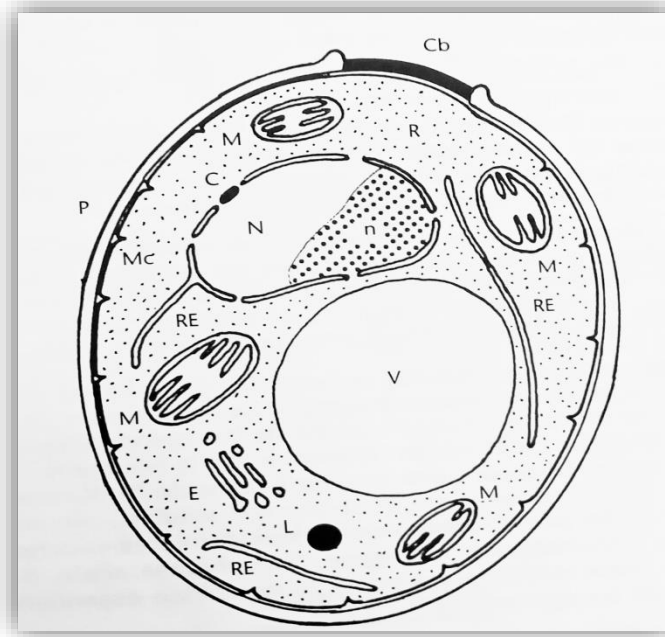
Les Levures sont des champignons microscopiques, aux cellules ovoïdes de quelques millièmes de millimètres de largeur, se détachant facilement les unes des autres et de ce fait, bien adaptées à la propagation dans les liquides (**Boidin et al., 2023**).

La découverte que certains taxons sont des basidiomycètes a élargi notre perception de la nature des levures. En conséquence, nous en sommes venus à considérer les levures comme des champignons qui se reproduisent sexuellement par bourgeonnement ou fission, ce qui se traduit par une croissance composée principalement de cellules uniques (**Kurtzman, 1998**).

On sait à présent que leur origine est clairement polyphylétique puisqu'elles se classent dans les deux phyla majeurs des fungi qui sont les Ascomycota et les Basidimycotina.

Sur le plan écologique, elle colonisent des niches très diversifiées (sol, eaux, fruits, animaux) (**Defosse et al., 2018**).

Les représentants les plus utilisés par l'homme sont les levures de bière et de boulangerie, agents très actifs de la fermentation alcoolique. Elles transforment rapidement, quand l'air fait plus ou moins défaut (**Boidin J et al., 2023**).



**Figure 01** : Schéma structural d'une cellule de levure.

C :centriole ;Cb :cicatrice de bourgeonnement ; E :ergastoplasme ;L :liposome ; M :mitochondrie ; Mc :membrane cytoplasmique ; N :noyau ; n :nucléole ; P : paroi ; R :ribosomes ;RE :réticulum endoplasmique ;V :vacuole.(**Bourgeois et Larpent , 1996**) .

### 3. Taxonomie

Jusqu'à présent, environ 1 500 espèces de levures ont été décrites, classées et sont disponibles dans les collections de cultures du monde entier (**Kurtzman et Piškur 2006**).

Environ 500 espèces de "vraies" levures, réparties en 69 genres, sont décrites dans l'édition la plus récente de *The Yeasts : a Taxonomic Study*. Il existe un certain nombre d'autres organismes relativement importants qui présentent une phase semblable à celle des levures dans certaines conditions de croissance (**Spencer, 1997**).

#### 3.1. Critères taxonomiques

Les levures sont classées selon les critères suivants :

- Formation ou non d'une capsule
- La forme et la taille de la cellule de levure.
- Mécanisme de formation des bourgeons (conidiogenesis).
- Formation de pseudohyphae ou vrai hyphes (pseudohyphae or true hyphae).
- La présence de spores sexuées.
- Information physiologiques (**Nekhilane ,2011**).

### 3.2. Classification de levures

Les levures sont des champignons unicellulaires qui appartiennent à différents groupes taxonomiques ( **Sicard et Legras , 2011**). Il existe environ 100 genres et 800 espèces décrites de levure qu'environ 1% des espèces qui existent dans la nature, le reste étant non cultivable (**Kutty et Philip, 2008**).

Les levures appartiennent à trois grandes classes de champignons (à l'intérieur de ces classes, les levures sont regroupées en ordre, famille, sous famille éventuellement genre et espèce) (**Leveau et Bouix ,1993**). (Tableau 1)

#### 3.2.1. Les ascomycètes

Ces levures se reproduisent par un processus sexué dans une asque, qui résulte de la transformation d'une cellule après méiose (**Leveau et Bouix, 1993**). Les Ascomycètes sont principalement classés en Saccharomycètes et Schizosaccharomycètes (**Labhani, 2015**).

#### 3.2.2. Les basidiomycètes

Ces levures présentent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside (**Leveau et Bouix, 1993**). Les Basidiomycètes sont distribués dans les classes suivantes: Hymenomycètes, Urediniomycètes et Ustilaginomycètes (**Labhani, 2015**).

#### 3.2.3. Les deutéromycètes

Ces levures regroupent les formes imparfaites des levures ayant des affinités avec les ascomycètes ou les basidiomycètes (**Leveau et Bouix, 1993**). Ces deutéromycètes regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée.

**Tableau 01** : Place des levures dans l'Eumycotina (**Spencer, 1997**)

<b>Ascomycotina</b>	<b>Spermophthoraceae</b>
Hemiascomycetes	(avec spores en forme d'aiguilles)
Endomycetales	Coccidiascus
	Metschnikowia
	Nematospora
	<b>Saccharomycetaceae</b>
	(toutes les autres levures ascomycètes )
<b>Basidiomycotina</b>	<b>Filobasidiaceae</b>
Ustilaginales	Levures formant des téliosporos
Tremellales	Sirobasidiaceae
	Tremellaceae
<b>Deuteromycotina</b>	Cryptococcaceae
Blastomycetes	Sporobolomycetaceae

### 3.3. Méthode classique d'identification

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure, préalablement isolée sur un milieu gélosé pour levure. Les critères d'identification des levures peuvent être répartis en 3 groupes :

- Les caractéristiques de la reproduction végétative.
- Les caractéristiques sexuelles.
- Les caractéristiques biochimiques et physiologiques (**Leveau et Bouix, 1993**).

Depuis longtemps, seuls des caractères botaniques, morphologiques et biochimiques ont permis de différencier les levures et les classer. Cependant, l'isolement et la culture de micro-organismes font appel à des techniques de laboratoire pouvant entraîner des modifications de comportement des espèces, notamment l'aptitude à sporuler. Aujourd'hui, les méthodes d'investigation de la structure moléculaire sont des moyens précis d'identification des êtres vivants (**Ribéreau-Gayon, 2012**).

Depuis leur facilité de culture et l'innocuité d'un grand nombre d'espèces en ont fait les micro-organismes les plus utilisés pour la production des boissons alcoolisées et de produits de boulangerie, mais aussi comme source de protéines et de vitamines en alimentation humaine et animale (**Leveau et Bouix, 1993**). Les levures ne sont pas aussi omniprésentes que les bactéries dans l'environnement naturel (**Walker, 2009**).

Chez certaines levures, on note l'existence d'une capsule constituée de phosphomannane soluble dans l'eau (*Hansenula, Pichia*), de mannane plus ou moins ramifié (*Rhodotorula*) ou d'hétéropolysaccharides (*Cryptococcus*). Des structures protéiques filamenteuses ont été signalées chez des souches de *Saccharomyces* ; elles pourraient jouer un rôle dans la floculation (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

## 4. Habitat

Les levures sont largement distribuées dans la nature ; il se rencontrent fréquemment dans le sol ou dans l'air (**Leclerc et al., 1983**). Elles peuvent être isolés du sol, de l'eau, des plantes, des animaux et des insectes (**walker, 2009**). On les trouve également fréquemment dans habitats créés par l'homme, tels que les aliments (**Deak, 2006**). Les milieux fortement concentrés en sucre sont leurs environnements préférés : tels que les sirops, miel, fleurs, de nombreux fruits comme les pommes, raisins, et les prunes (**Leclerc et al., 1983**).

Cependant, quelques espèces se sont trouvées en relations symbiotiques ou parasitaires avec les animaux. Certaines levures comme l'espèce *Candida albicans*, sont des pathogènes opportunistes de l'homme (**walker, 2000**).

Le sol ne constitue probablement qu'un large réservoir assurant leurs suivie dans des conditions défavorables (**Leclerc et al., 1983**).A la fin de l'automne, les levures sont introduites dans le sol par la chute des fruits et les pluies et y passent l'hiver (**Guilliermond, 2003**).

Bien que certains rapports aient suggéré que les levures se reproduisent dans le brouillard, l'atmosphère est plutôt un réservoir qu'un site de croissance et de reproduction des levures. Les levures pigmentées, en particulier, ont une capacité exceptionnelle à survivre dans l'atmosphère (**Péter et al.,2017**).

Elles sont distribuées dans presque toutes les parties de l'environnement aquatique c'est à dire dans les océans et les mers, les estuaires, les lacs et les rivières (**Kutty et Philip,2008**).

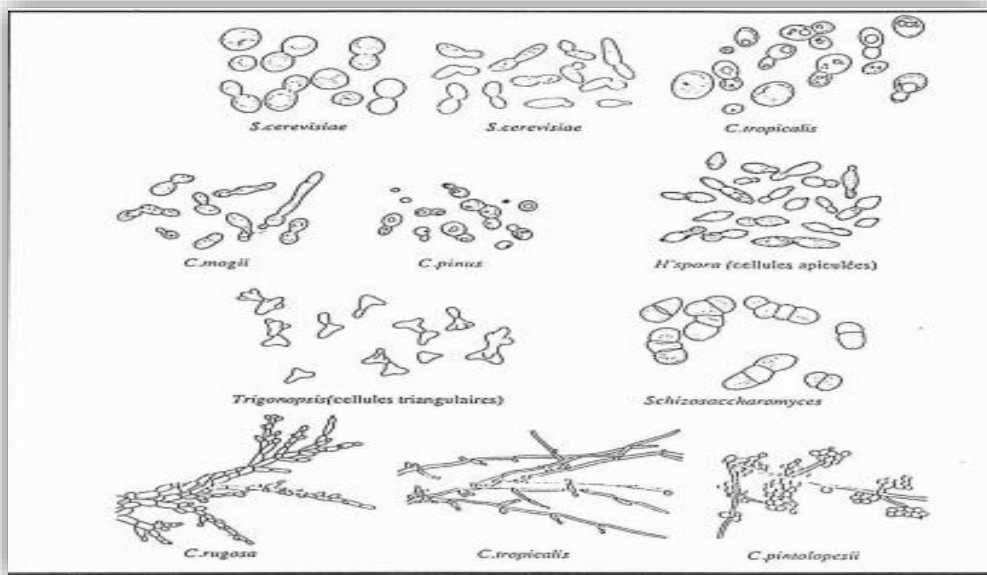
De nombreuses *Torula*, *Mycoderma* et quelques levures vraies ont été observées dans les eaux salées de la mer (**Guilliermond, 2003**).

De nombreuses espèces levuriennes peuvent être isolées à partir d'environnements extrêmes, tels que les milieux à faible potentiel hydrique (fortes concentrations de sucre ou de sel), les basses températures (ex., les levures psychrophiles isolées des régions polaires) et la faible disponibilité en oxygène (ex., le tractus intestinal des animaux) (**walker , 2000**).

## **5. Morphologie et structure :**

Il existe une grande diversité dans les aspects morphologiques .Les dimensions et l'aspect des cellules peuvent varier considérablement en fonction de l'environnement, du milieu de culture, de l'âge, ...etc (**Leclerc et al.,1983**).

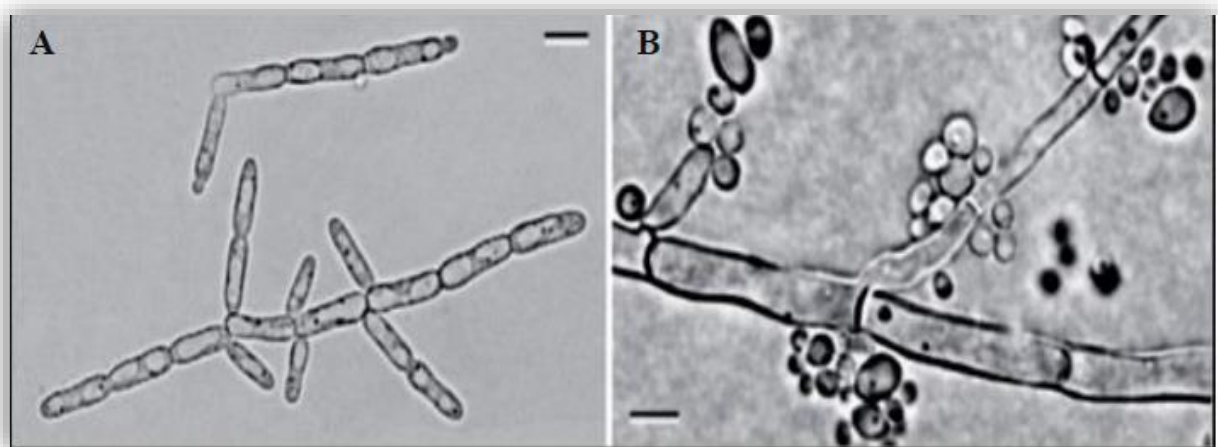
Les cellules végétatives des levures peuvent être sphérique, ovoïdes allongées, cylindriques, apicules, ogivales, triangulaire ou en forme de bouteille (Figure 2). La taille cellulaire varie de 20\_50µm de long. La largeur est moins variable et se situe entre 1 et 10µm (**Larpent et Larpent-Gourgade,1997**).



**Figure 02** : Morphologie des cellules de levure et des mycélium (Hencké, 2000).

La paroi des levures à une épaisseur de 150 à 230 nm. Par sa rigidité, elle confère à la cellule une forme caractéristiques .Sa composition chimique est la suivante : polysaccharides 80%, protéines 5-10%, lipides 7-10%, sels minéraux 5% (Larpen & Larpen-Gourgade,1997).

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires eucaryotes. Néanmoins, de nombreuses espèces sont capables de former un pseudomycélium comme l'espèce *Candida albicans*, voir un véritable mycélium comme l'espèce *Lindnera bimundalis* ,*Candida ontarioensis* (Figure 03) (Labbani,2015).



**Figure 03** : Filamentation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. Barre = 10 µm (Labbani,2015).

## 6. Reproduction

Les levures sont reconnues comme des champignons unicellulaires qui se reproduisent principalement par bourgeonnement et occasionnellement par fission, et qui ne forment pas leurs états sexuels (spores) dans ou sur un organe de fructification (**Walker, 2009**).

On appelle levures Sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée, soit de façon asexuée, suivant les conditions de milieu, et levures Asporogènes, celles se reproduisent uniquement de façon asexuée (**Walker, 2009**).

Il existe deux modes de reproductions :

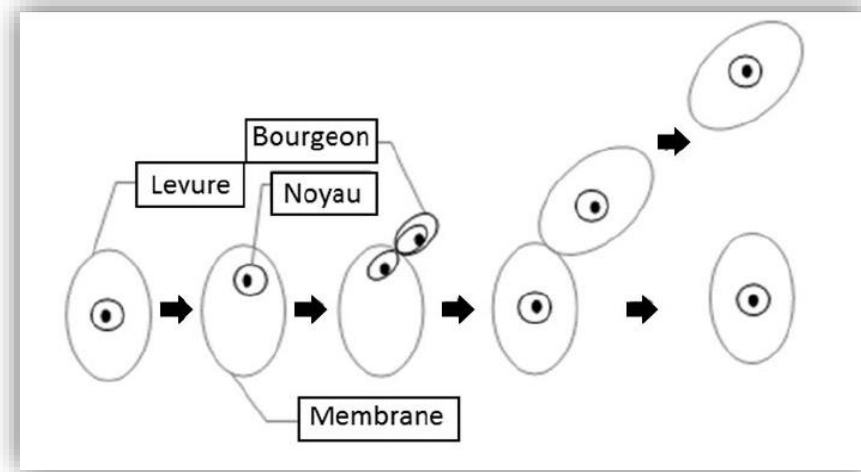
- La reproduction sexuée par sporulation qui consiste en la fusion de deux cellules préexistantes.
- La reproduction asexuée par bourgeonnement où la cellule mère donne naissance à deux cellules filles.

Si le milieu est favorable (présence de sucres et de minéraux), elles bourgeonnent tandis que si le milieu est défavorable, elles sporulent. Pour la majorité des levures, la multiplication asexuée est la forme majeure de multiplication (**Castan, 2016**).

### 6.1. Asexuée

Le bourgeonnement, le mode de reproduction végétative le plus fréquent, est représenté par une évagination qui apparaît à un point de la cellule mère (**Figure 04**). Un autre mode de reproduction végétative peut être rencontré : la fission, caractéristique du genre *Schizosaccharomyces*, qui se manifeste par la formation d'une paroi transversale au grand axe de la levure (**Labani, 2015**).

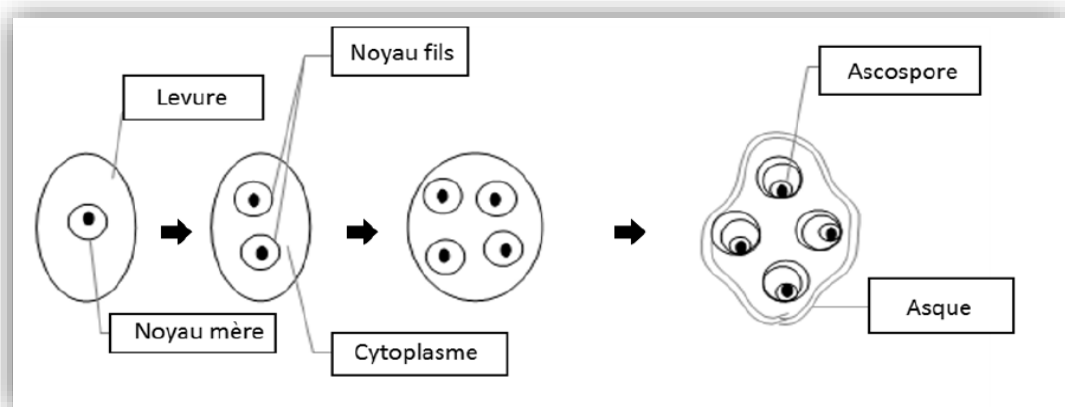
Dans le mode de multiplication par bourgeonnement, il ne se forme pas deux bourgeons sur le même site (sauf cas du bourgeonnement bipolaire); le nombre de bourgeon par cellule se trouve donc limité. L'examen d'une population levurienne en phase stationnaire montre que la majorité des cellules n'a pas de cicatrice de bourgeonnement, une minorité en présente 1 à 6 voire 12 à 15 . Dans des conditions de milieu favorables, le temps de génération de *S. cerevisiae* est de 1,5 à 2h (**Bourgeois et Larpent, 1996**).



**Figure 04:** Schéma d'interprétation de la reproduction asexuée d'une levure. (Castan,2016).

## 6.2.Sexuée

Lorsque le milieu de culture est défavorable (températures extrêmes, absence de nutriments...), les cellules se reproduisent par sporulation. Les levures (cellules diploïdes) forment des spores (cellules haploïdes) par méiose. À partir d'une cellule diploïde, on obtient ainsi quatre spores ou ascospores enfermés dans un sac appelé asque. Arrivé à maturité, l'asque libère les ascospores qui peuvent se multiplier pour donner des cellules haploïdes. On obtient alors un zygote, cellule diploïde, après fusion de deux cellules haploïdes (Figure 05) (Castan, 2016).



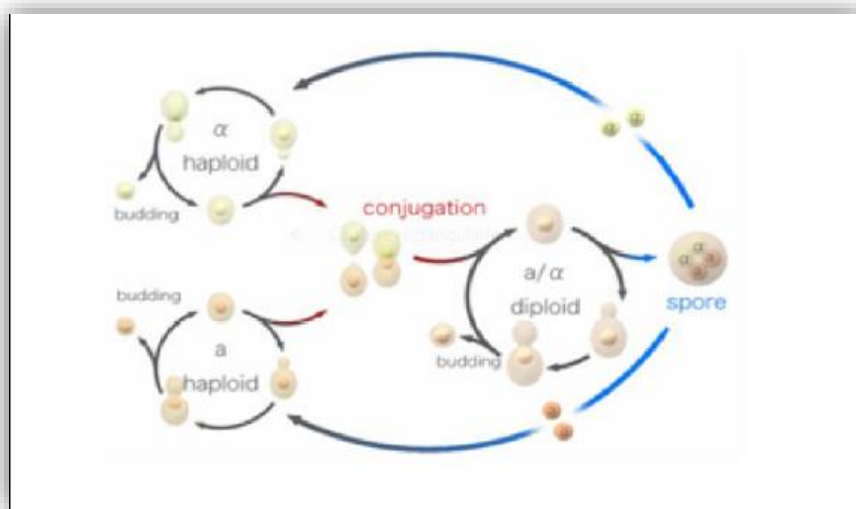
**Figure 05 :** Schéma d'interprétation de la reproduction sexuée d'une levure (Castan,2016).

La persistance de la membrane nucléaire pendant la division conduit à une structure en 4 lobes autour desquels se forme une paroi qui entraîne la rupture de la membrane nucléaire et l'individualisation des spores (**Bourgeois et Larpent,1996**).

Chez beaucoup de levures telles que *S. cerevisiae*, les spores ne sont libérées qu'après la germination ; celle-ci provoque en effet la rupture mécanique de la cellule constituant l'asque. Dans d'autres cas, il y a autolyse de la paroi de l'asque (**Bourgeois et Larpent,1996**).

### 6.3.Cyclesbiologiques

Dans la nature les levures sont soit homothalliques, soit hétérothalliques : le passage d'une forme à l'autre étant génétiquement contrôlé. A l'heure actuelle, il existe encore un certain nombre d'espèces levuriennes dont la sexualité n'est pas connue. Il en résulte que les levures peuvent présenter divers types de cycles biologiques. Les levures ascosporegènes peuvent être subdivisées en deux groupes suivant que la phase végétative est à l'état haploïde (*Zygosaccharomyces*) ou diploïde(**Bourgeois et Larpent,1996**).



**Figure 06** : Cycle de reproduction de la levure (**Kara Ali,2014**).

## 7. Physiologie de la croissance

### 7.1.Besoin nutritionnel

Comme tous les micro-organismes, les levures doivent, pour se développer, puiser dans leur environnement toutes les substances nécessaires à la synthèse de leurs matériaux cellulaires et à la fourniture de l'énergie nécessaire à ces processus de biosynthèse. Le milieu de culture utilisé doit donc contenir tous les éléments essentiels à la croissance, dans des

proportions similaires à celles de la biomasse levurienne (**BerryetBrown,1987**). Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat (**Kara Ali,2014**).

### 7.1.1. Source de carbone

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les protéines, les acides nucléiques. Etc (**Kara Ali,2014**).

Le carbone représente environ 50% du poids sec de la levure. Les glucides simples(monosaccharides, disaccharides et trisaccharides) sont fermentescibles par les levures (**Amillastre,2012**).

Les sources de carbone les plus utilisées sont les sucres, bien que les sucres particuliers qui peuvent être assimilés varient selon les espèces et les souches. Les levures métabolisent normalement les mêmes sucres en aérobiose lorsqu'elles fermentent (**Berryet Brown,1987**).

### 7.1.2. Source d'azote

C'est le deuxième élément le plus abondant de la cellule : il permet la synthèse de la matière vivante (**Castan,2016**). La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines. L'azote est utilisé par les levures sous plusieurs formes (inorganique ou organique) (**Kara Ali,2014**).

### 7.1.3. Les lipides

Ils peuvent être indispensables pour la croissance : ainsi, *Pityrosporum ovale* a besoin d'acide palmitique. D'ailleurs, de nombreuses espèces sont lipolytiques : *Saccharomyces lipolytica*, *Candida lipolytica*, *C. melinii*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. magnoliae*, *C. versatilis*, *Leucosporidium scottii*, *R. rubra*, *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Zygosaccharomyces baillii* (**Hencké, 2000**).

A l'opposé, des lipides extracellulaires et glycolipides sont formés par de nombreuses levures en culture aérée. Il existe des levures avec 20 % maximum de la M.S. de lipides (la moyenne étant de moins de 10 %). Entre 20 et 80 %, on parle de levures « oléagineuses » (**Hencké, 2000**).

#### 7.1.4. Oligo-éléments

Une carence en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore) ou en oligo-éléments (fer, cuivre, zinc, sélénium) réduit le pouvoir fermentaire. Ils stimulent la croissance et sont des constituants essentiels des systèmes enzymatiques (**Castan,2016**).

Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliqués dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (**Kara Ali,2014**).

#### 7.1.5. Autres composés

Les vitamines du groupe B, elles ont été identifiées comme étant des facteurs de croissance (biotine, acide pantothénique, inositol, thiamine, pyridoxine, niacine) (**Castan,2016**).

##### 7.1.5.1.Pyridoxine (vitamine B 6)

Lorsqu'elle est absorbée, elle est convertie en phosphate de pyridoxal et en phosphate de pyridoxamine, qui servent de coenzymes impliqués dans la désamination et la décarboxylation des acides aminés. On sait également qu'elle joue un rôle important dans le métabolisme des polyamines, des hydrates de carbone et des acides nucléiques (**Castan, 2016**).

##### 7.1.5.2.Thiamine (vitamine B1 )

L'effet d'une carence ou d'un déséquilibre en thiamine sur la physiologie de la levure a été largement étudié par Kamihara et Nakamura (1982). Il a été démontré que la thiamine influence plusieurs domaines du métabolisme de la levure, notamment : la capacité respiratoire; la formation d'acides gras, de stérols et de lipides ; et la glycolyse et la production d'éthanol (**Berry et Brown ,1987**).

L'eau constituant essentielle des organismes vivants. Les levures sont constituées de 75% d'eau et 25% de matière sèche (**Amillastre ,2012**).

#### 7.2.Besoins physico-chimiques

##### 7.2.1. Température

Le facteur physique le plus important influençant la vie des levures est la température. Les limites de température et la plage de croissance des levures varient selon les espèces (**Deak ,2006**).

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, on trouve des levures psychrophiles,

mésophiles et thermophiles (50°C pour *Candida slooffii*, *Saccharomyces telluris*) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Les levures sont en général acidophiles et mésophiles : elles se multiplient à des pH compris entre 3 et 7,5 et à des températures voisines de 25-28°C. La température optimale de croissance se situe vers 20-25°C mais elle peut osciller de 5 à 30, voire 37°C, et différer de la température courante de culture. Parfois, la multiplication végétative a encore lieu vers 0°C, et même légèrement en dessous mais le taux de croissance est faible (genres *Debaryomyces* et *Rhodotorula*) (**Hencké, 2000**).

Les levures ne sont pas aussi tolérantes que les bactéries aux températures élevées (**Hencké, 2000**).

**Tableau 02 :** Température maximale de croissance de quelques espèces de levures (**Deak, 2006**).

Les espèces	Température maximale (°C)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	44–47
<i>Candida glabrata</i>	43–46
<i>Candida albicans</i>	42–46
<i>Pichia guilliermondii</i>	38–43
<i>Pichia anomala</i>	35–37
<i>Yarrowia lipolytica</i>	33–39
<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	31–39
<i>Candida zeylanoides</i>	32–34
<i>Candida vini</i>	27–31
<i>Leucosporidium scottii</i>	22–24

### 7.2.2. Le pH

L'optimum de pH pour la croissance des levures varie de 4,5 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH. Elles peuvent encore se développer à pH 2,8-3, (g.*Torulopsis*) et à pH 8-8,5. En dessous de pH 5,5 elles entrent facilement en compétition avec les bactéries. La nature de l'acide a une grande importance car si les levures supportent la plupart des acides organiques rencontrés dans les aliments, elles sont fortement inhibées par les acides lactique et acétique (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

La plupart des levures peuvent se développer dans une plage de pH comprise entre 7 et 8, ce qui est considéré comme optimal pour leur croissance. Cependant, certaines levures ont la

capacité de tolérer des pH très acides, proches de 1,5, tout comme d'autres champignons. Ces levures qui présentent une tolérance accrue aux environnements acides comprennent *Candida gnilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hansenula anomala*, *Picliia fermentans*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces ballii*, *S. cerevisiae*, *S. exigutts*, *S. rosei*, *Trichosporon fermentans*, *Zygosaccharomyces* et *Zygosaccharomyces rouxii*. (Gournier-Château ,1994).

### 7.2.3. Oxygène

L'oxygène est nécessaire pour le développement des levures. L'oxygène et l'hydrogène proviennent de l'eau et de l'air et interviennent dans la constitution de l'eau et des composés organiques. Comme l'a démontré Louis Pasteur, leur croissance est accélérée en présence d'air tandis que la consommation de sucre est diminuée (Bourgeois et Larpent,1996).

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, ce qui signifie qu'il n'y a pas de levures strictement anaérobies. Cependant, certaines levures, comme les *Rhodotorula*, sont strictement aérobies, ce qui signifie qu'elles ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme. D'autres levures sont aéro-anaérobies facultatives, ce qui signifie qu'elles peuvent utiliser à la fois la fermentation et la respiration, en fonction des conditions environnementales. Par exemple, les *Saccharomyces* préfèrent un métabolisme fermentaire, tandis que les *Candida*, les *Kluyveromyces*, et d'autres préfèrent un métabolisme respiratoire. (Bouix et Leveau, 1991).

### 7.2.4. Aw et pression osmotique

La pression osmotique joue un rôle important dans le développement des levures, mais son effet peut varier d'une souche à une autre. La plupart des souches de levures ne peuvent se développer que dans des conditions où l'activité de l'eau est inférieure à 0,90. Cependant, certaines souches tolèrent des pressions osmotiques plus élevées, correspondant à une activité de l'eau d'environ 0,60, bien que leur métabolisme soit ralenti. Ces levures sont qualifiées de xérotolérantes, car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs tels que le glycérol et la bétaine (Leveau et Bouix, 1979-Larpent etLarpent-Gourgaud ,1997).

## 8. Métabolisme

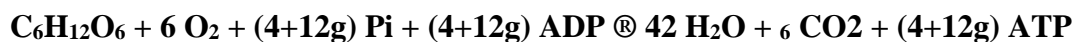
Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Pol, 1996). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate. En se référant au catabolisme

du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (**Larpent, 1991**).

### 8.1.Métabolisme oxydatif

Les levures utilisant les sucres simples en présence d'oxygène, par conséquent, leurs métabolismes est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournit par la chaîne respiratoire. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (**Berber, 2017**).

En présence d'oxygène, le glucose est en partie dégradé en H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>, après avoir emprunté successivement la voie de la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques et la chaîne respiratoire, selon l'équation bilan suivante :



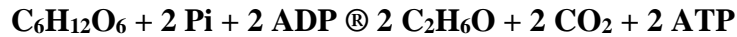
Le rendement g, aussi appelé P/O car c'est le nombre de moles d'ATP formées par mole d'oxygène (1/2 O<sub>2</sub>) consommée, dépend de l'efficacité de la chaîne respiratoire (**Verduyn et al., 1991**). Le rendement P/O est en théorie de 1,5 mais in vivo, il est inférieur, de l'ordre de 1,2 à 1,3 (**van Gulik et Heijnen 1995**).

Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires utilisés pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournie par la chaîne respiratoire. Le rendement théorique en biomasse en conditions oxydatives est d'environ 0,5 g/g de glucose (**Kappeli, 1986**).

### 8.2.Métabolisme fermentaire

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub>. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (**Berber, 2017**).

Comme il n'y a pas chez la levure d'autre accepteur d'électron que l'oxygène (O<sub>2</sub>), en présence de glucose et en absence d'oxygène, l'ATP nécessaire à la cellule provient de la production d'éthanol selon l'équation suivante :



Le rendement théorique en éthanol est de 0,51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (glycérol, acide acétique, substances de réserve) limitent ce rendement à 80-90 % de sa valeur théorique. Le rendement en biomasse est de l'ordre de 0,10 g.g<sup>-1</sup> de glucose (**Kappeli,1986**). En plus de l'éthanol, se forment d'autres sous-produits dont le plus important est le glycérol. Le but de la production de glycérol est de rééquilibrer la balance rédox en réponse à la production de biomasse associée à la réaction fermentaire (**Nevoigt et Stahl, 1997; Van Dijken et Scheffers , 1986**).

# Chapitre 02: Enzyme Lipase

*Enzyme Lipase  
Chapitre 05:*

## 1. Introduction

Il y a près de 100 ans, le microbiologiste C. Eijkman a signalé que plusieurs bactéries pouvaient produire et sécréter des lipases. Lorsqu'il a été généralement admis que les lipases restent actives enzymatiquement dans les solvants organiques, les études ont commencé à développer ces enzymes pour en faire des outils idéaux pour la chimie organique (**Jaeger et Eggert , 2002**).

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capable d'hydrolyser les triglycérides, elles ont été mises en évidence, dès 1901, chez les bactéries (**Fickers et al.,2008**).

Ce qui rend ces enzymes intéressantes est le fait qu'elle présente généralement une chimiosélectivité régiosélectivité et stéréosélectivité. Elles sont facilement disponibles en grandes quantités, car nombre d'entre elles peuvent être produites à haut rendement à partir d'organismes microbiens, à savoir des champignons et des bactéries(**Jaeger et Eggert, 2002**).

## 2. Définition

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) font partie de la famille des hydrolases qui agissent sur les liaisons ester carboxylique. La fonction naturelle des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Les lipases sont largement répandues dans les règnes végétal et animal, ainsi que chez les moisissures et les bactéries (**Houde et al.,2003**).

Les lipases d'origine microbienne, principalement bactériennes et fongiques, représentent la classe d'enzymes la plus utilisée dans les applications biotechnologiques et en chimie organique (**Gupta et al.,2004**).

La lipase est une enzyme ayant un rôle d'hydrolyse ou de transestérification (**Lanteigne Roch,2010**), catalyse plusieurs réactions d'intérêt industriel tels que hydrolyses, estérification, interestérification et transestérification (**Ochoa,2012**), l'activité de la lipase est considérablement accrue avec un substrat insoluble (comme l'émulsion) (**Gargouri et al.,2008**).

La lipase est spécifique au type de processus de bioconversion qu'elle catalyse, ce qui la rend pertinente dans un large éventail de processus industriels. On constate qu'elle est utile

pour catalyser diverses réactions liées aux industries alimentaire, pharmaceutique, médicale et diagnostique, laiterie, acides gras, cuir, cosmétique, détergents, boissons et papier (**Ilesanmi et al.,2020**).

Les lipases jouent un rôle essentiel dans le transfert des lipides entre les organismes, notamment lors de la digestion et de la mobilisation des réserves d'énergie stockées en cas de besoin métabolique (**Gilham et Lehner, 2005**).

### 3. Nomenclature

La nomenclature des lipases est basée sur la classification proposée par l'International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Selon cette classification, les lipases sont désignées par un numéro d'EC (Enzyme Commission) suivi d'un nom spécifique.

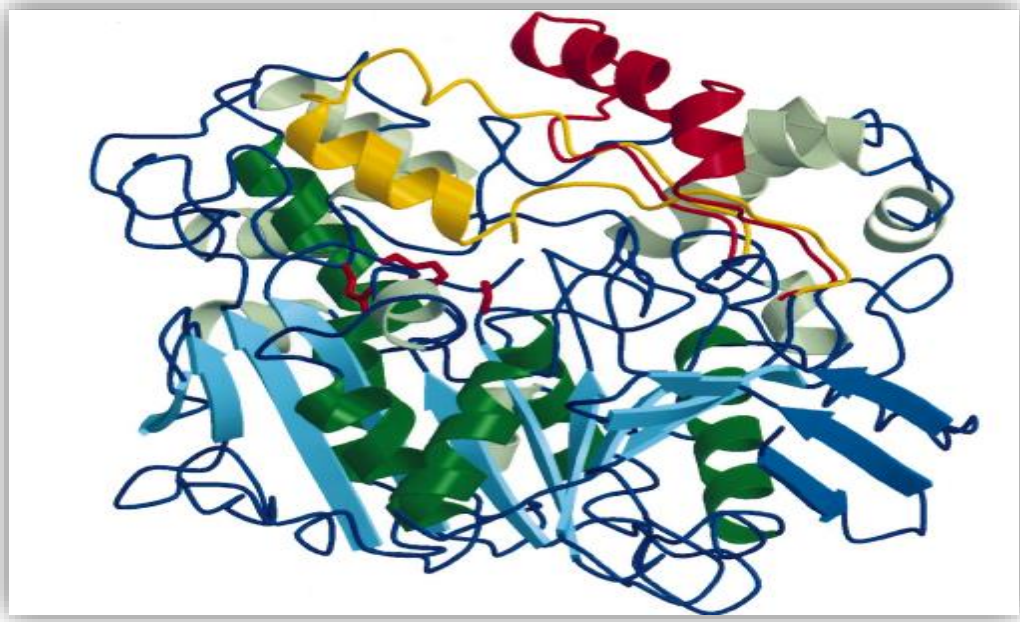
- 3.1.1. 3 : Triacylglycérol lipase.
- Réaction : Triacylglycérol + H<sub>2</sub>O = diacylglycérol + un carboxylate.
- Autre(s) nom(s) : Lipase ; Triglycéride lipase ; Tributyrase.
- Nom systématique : Triacylglycérol acylhydrolase.
- Commentaire : L'enzyme pancréatique n'agit que sur une interface ester-eau ; les liaisons ester externes sont préférentiellement hydrolysées (**NC-IUBMB,1992**).

Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques et ont pour classification internationale : glycérol-ester-hydrolase (E.C 3.1.1.3) (**Gargouri et al.,2008**).

### 4. Structure

La famille d'enzymes lipases présente une structure caractéristique appelée "K/L-hydrolase fold" qui est composée d'une feuille L centrale principalement parallèle, avec plusieurs hélices de chaque côté de la feuille (**Cygler,1999**).

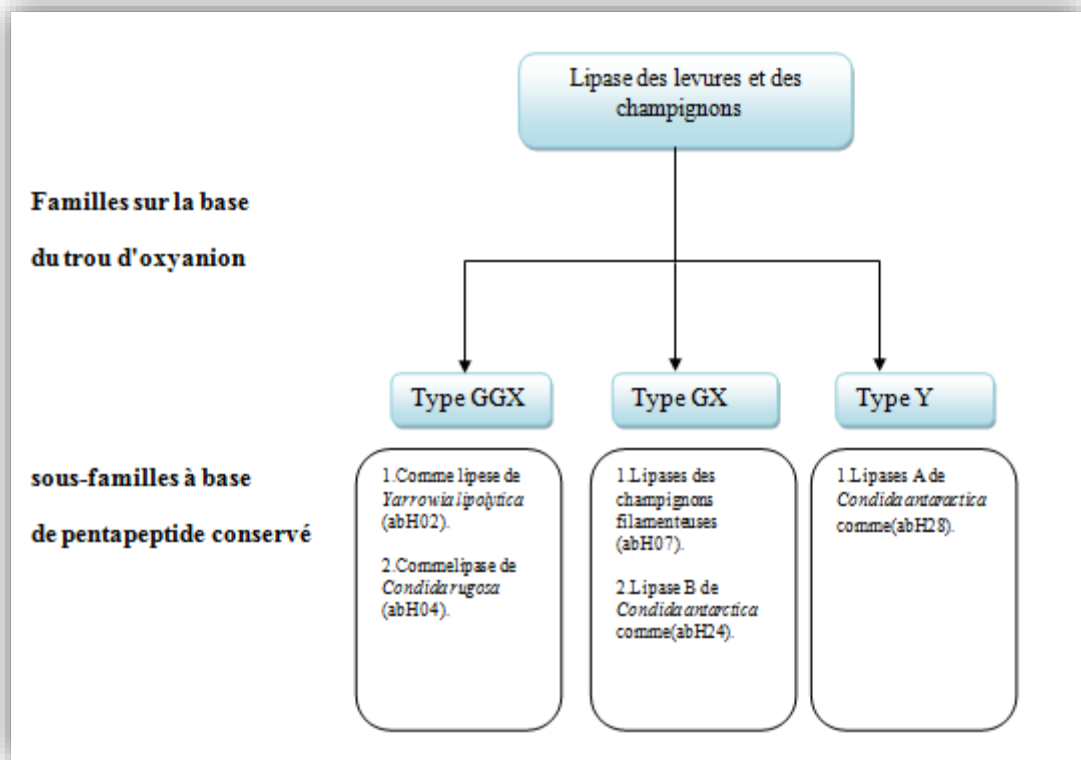
Les lipases sont des enzymes très variables de par leurs origines et leurs spécificités de substrat. Les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 kDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 kDa (Figure 07) (**Fickers et al.,2008**).



**Figure 07 : structure** dimensionnelle de lipase : Diagramme en ruban de CRL avec les états ouvert et fermé du couvercle superposés. La feuille L centrale mixte est de couleur bleu clair et la plus petite feuille L N-terminale est de couleur bleu foncé. Les hélices qui s'alignent contre la feuille L centrale sont de couleur vert foncé. La conformation fermée du couvercle est jaune et la conformation ouverte est rouge. Les résidus formant les triades catalytiques sont indiqués en rouge (Cygler,1999).

## 5. Classification des lipases

La classification des lipases a d'abord été présentée pour les lipases bactériennes sur la base de la topologie des protéines, car les lipases ont une divergence de séquence élevée. La Base de Données la base de données sur l'Ingénierie des Lipases (LED) est principalement basée sur le trou d'oxyanion où les lipases sont classées en trois classes différentes : les types GGX, G X et Y et divisées en superfamilles sur la base du pentapeptide conservé (Figure08) (Gupta *et al.*,2015).



**Figure 08 :** Classification des lipases basée sur la base de données d'ingénierie des lipases (Gupta *et al.*,2015).

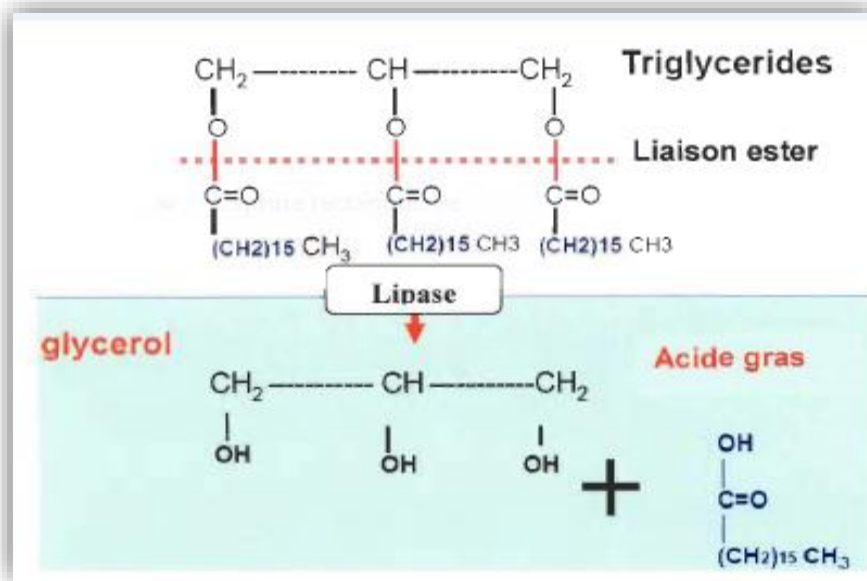
## 6. Mode d'action

Lipase responsable du catabolisme des triglycérides leur substrats préférentiels en acides gras et en glycérol (Fickerset *et al.*,2008).

Les lipases possèdent la particularité d'agir à l'interface entre les phases aqueuse et non aqueuse, ce qui est unique et les distingue de toutes les autres estérases. Les autres propriétés uniques des lipases sont les suivantes : spécificité, activité catalytique dans les solvants organiques et leur nature non toxique. Les caractéristiques les plus souhaitables des lipases incluent également leur capacité à traiter tous les types (mono-,di-et triglycérides) de glycérides ainsi que les acides gras libres lors de la transestérification, leur excellente activité dans les milieux non aqueux, un faible niveau d'inhibition du produit et une tolérance aux fluctuations de température et de pH. De plus, les lipases sont stables dans les solvants organiques et actives sans cofacteurs (Ali *et al.*,2023).

Les lipases sont plus actives dans les substrats insolubles, en particulier les triglycérides fabriqués d'acides gras à longue chaîne avec plus de 10 atomes de carbone, les lipases ont

besoin d'une concentration minimale de substrat pour montrer une concentration élevée niveaux d'activité (Figure 09) (Ribeiro *et al.*,2011).



**Figure 09 : Mécanisme d'action de la lipase sur les triglycérides (Lanteigne Roch,2010).**

## 7. Source de lipase

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

### 7.1. Les lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses (Fickers *et al.*,2008).

#### 7.1.1 Les lipases pancréatiques

La lipase a été découverte par Clade Bernad en 1856 dans le jus pancréatique en tant qu'enzyme qui hydrolyse les gouttelettes d'huile insolubles et les convertit en produits solubles (Ilesanmiet *al.*,2020).

La lipase pancréatique (triacylglycérol acyl hydrolase) remplit une fonction clé dans l'absorption des graisses alimentaires en hydrolysant les triglycérides en diglycérides et par la suite en monoglycérides et gras libres acides. L'activation interfaciale, une propriété caractéristique des enzymes lipolytiques agissant sur les substrats insolubles dans l'eau aux interfaces eau-lipides, probablement implique une réorientation de ce lambeau, pas seulement dans les lipases pancréatiques mais aussi dans la lipase hépatique et lipoprotéique homologue (**Winkler et al.,1990**).

### 7.1.2. Les lipases gastriques

La lipase gastrique humaine (HGL) est une enzyme lipolytique sécrétée par la muqueuse gastrique et joue un rôle crucial dans la digestion des lipides alimentaires chez l'homme (**Miled et al.,2003**).

La lipase gastrique humaine (HGL, EC 3.1.1.3) est sécrétée par les cellules principales situées dans la partie fundique de l'estomac, où elle initie la digestion des triacylglycérols (**Canaan et al.,1999**).

Elle ne nécessite pas la présence de cofacteurs pour être active ; elle est stable et active à des valeurs de pH proche de 1 et elle est résistante à la pepsine ainsi qu'aux protéases gastriques (**Fickers et al.,2008**).

### 7.1.3. La lipase hépatique

La lipase hépatique appartient à une famille de gènes de lipase qui comprend la lipoprotéine lipase, la lipase pancréatique et la lipase des cellules endothéliales. La plupart des molécules de lipase hépatique sont synthétisées et sécrétées par les hépatocytes, Les premières études sur la fonction de la lipase hépatique, ont révélé que l'enzyme était impliquée dans la métabolisation des lipoprotéines résiduelles et dans celle des lipoprotéines riches en lipoprotéines de haute densité riches en triglycérides (HDL2). En raison de l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides, la lipase hépatique favorise l'absorption du cholestérol HDL par le foie (**Galan et al.,2002**).

La lipase hépatique joue également un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines circulant dans le sang. Elle est capable d'hydrolyser les glycérides, les phospholipides et les

esters de cholestérol. Elle peut aussi catalyser la trans-estérification entre glycérides (**Fickers et al.,2008**).

### 7.2. Les lipases végétales

Dans les plantes, les lipases se trouvent dans les graines ou les céréales, les fruits, les feuilles, entre autres. Cependant, la principale source de l'enzyme est les graines, où elles présentent également une activité hydrolytique plus importante, car il y a généralement une concentration élevée d'huile dans les graines, qui sera une source d'énergie pour le développement ultérieur de la plante (**Filho et al.,2019**).

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (**Fickers et al.,2008**).

### 7.3. Les lipases microbiennes

Les lipases microbiennes sont obtenues à partir de champignons, de levures et de bactéries. Elles sont les plus populaires en termes de prudence marketing ainsi que d'études approfondies. Ces lipases présentent de grands avantages par rapport aux autres, elles sont plus abondantes, les microorganismes produisant ces enzymes peuvent être facilement modifiés génétiquement, et elles ont une grande diversité de caractéristiques et de spécificités. La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaires et dérivent de bactéries et d'espèces fongiques (**Filho et al.,2019**).

Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques (**Fickers et al.,2008**).

Un avantage particulier des lipases d'origine microbienne par rapport à celles d'autres origines est qu'aucune colipase n'est requise pour l'activité, comme c'est le cas de certaines lipases pancréatiques trouvées chez les mammifères. En plus de ce qui précède, les lipases microbiennes ont une plus grande gamme de conditions opératoires (pH, température, force ionique, Aw, etc.) en conséquence de l'adaptation de ses microorganismes produits aux conditions environnementales (**Godoy et al.,2022**).

### 7.3.1. Lipases des levures

La levure a été utilisée dans différentes procédures de transformation des aliments et d'autres industries depuis l'Antiquité. Les lipases de levures sont faciles à manipuler et à cultiver par rapport aux champignons et bactéries filamenteux. La plupart des lipases de levure sont produites de manière extracellulaire et plus de 50% des lipases productrices de levure rapportées se présentent sous la forme de diverses isoenzymes (Ali *et al.*,2023).

Les lipases fongiques sont celles qui se démarquent dans les applications biotechnologiques en raison de leur stabilité, de leurs spécificités et de leur facilité de production. Elles sont donc plus facilement produites et étudiées que les autres microorganismes (Filho *et al.*,2019).

La levure *Candida rugosa* est la source de lipases la plus couramment utilisée à des fins commerciales. Les lipases de *Candida rugosa* présentent une activité élevée à la fois en hydrolyse et en synthèse et sont utilisées dans plusieurs procédés différents (Ali *et al.*,2023).

## 8. Production de lipases

L'une des limites à l'utilisation industrielle extensive des lipases microbiennes est leur coût, qui est déterminé par les rendements de production, les exigences de traitement en aval et la stabilité de l'enzyme. Il est donc intéressant d'augmenter la productivité des processus de fermentation en optimisant la culture des lipases microbiennes (Domínguez *et al.*,2003).

Pour isoler une lipase destinée à des applications biotechnologiques, la première étape consiste généralement à surexprimer le gène d'intérêt correspondant. Bien que cette étape soit considérée comme facile grâce aux systèmes de surexpression commercialement disponibles qui peuvent faciliter la surexpression et la sécrétion de plusieurs protéines, cela peut ne pas être réalisable pour toutes les enzymes. Par exemple, les lipases bactériennes de différentes espèces de *Bacillus* peuvent être facilement surexprimées dans *E. coli* en utilisant des systèmes de surexpression conventionnels. Cependant, certaines enzymes peuvent ne pas se prêter à ces systèmes. Les lipases des espèces de *Pseudomonas* nécessitent l'assistance fonctionnelle d'environ 30 protéines cellulaires différentes avant de pouvoir être récupérées dans un état enzymatique actif à partir du surnageant de culture (Jaeger et Eggert, 2002).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la production de lipase extracellulaire, tels que le pH, la température, l'aération et la composition du milieu. En outre, la présence de triacylglycérols ou d'acides gras a été signalée comme augmentant la sécrétion d'enzymes lipolytiques par un certain nombre de micro-organisme ( Domínguez *et al.*,2003).

## 9. Facteurs influençant l'activité de lipase

Les lipases ont la capacité de rester actives sur une large plage de pH et de température. Leur stabilité est préservée sur une plage de pH allant de 4,0 à 11,0, tandis que leur température optimale se situe entre 10°C et 96°C. Les lipases extracellulaires produites par *Aspergillus niger* et *Rhizopus arrhizus* sont particulièrement efficaces dans un environnement de pH bas. Quant aux lipases d'*Aspergillus niger* et de *Rhizopus japonicus*, elles sont stables à 50°C. Enfin, la lipase thermotolérante d'*Humicola lanuginosa* peut maintenir sa stabilité à 60°C (Mehta *et al.*, 2017).

## 10. Utilisations des lipases levuriennes dans divers procédés industriels

Les lipases microbiennes sont des enzymes d'une grande importance en biotechnologie en raison de leur polyvalence et de leur facilité de production à grande échelle. Leur grande diversité en termes de propriétés enzymatiques et de spécificité de substrat les rend particulièrement intéressantes pour les applications industrielles. Dans le domaine industriel, les lipases et les cellulases sont susceptibles de générer les meilleurs rendements (Hasan *et al.*, 2006).

L'industrie demande de plus en plus de sources de lipases présentant des caractéristiques catalytiques spécifiques, ce qui conduit à l'isolement et à la sélection de nouvelles souches. Ces microorganismes producteurs de lipases ont été découverts dans différents habitats tels que les déchets industriels, les usines de transformation d'huiles végétales, les usines laitières et les sols contaminés par des huiles et des graines oléagineuses, entre autres. Cette diversité de sources permet la découverte de nouvelles lipases aux propriétés uniques, qui peuvent être utilisées pour diverses applications industrielles, telles que la production d'esters méthyliques d'acides gras et d'autres produits biotechnologiques. Par conséquent, l'exploration de nouveaux habitats est cruciale pour la découverte de nouvelles lipases et leur utilisation dans des applications industrielles (Treichel *et al.*, 2010).

D'un point de vue industriel, les lipases produites par les levures et les champignons filamenteux sont particulièrement attrayantes, car elles peuvent être obtenues en concentrations élevées. Parmi les enzymes d'origine fongique, les lipases produites par *Candida*, *Géotrichum*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* et *Thermomyces* sont les plus importantes. Certaines de ces lipases ont été optimisées pour obtenir de meilleures propriétés industrielles et sont disponibles dans le commerce (Contesini *et al.*, 2020).

### 10.1. Les lipases dans l'industrie agroalimentaire

Les graisses et les huiles sont des composants alimentaires essentiels, dont la modification constitue un domaine clé de l'industrie alimentaire, qui cherche constamment à développer de nouvelles technologies économiques et respectueuses de l'environnement. Les lipases sont des enzymes utilisées dans la transformation des aliments, principalement pour le développement des arômes dans les produits laitiers et la modification des propriétés des aliments tels que la viande, les légumes, les fruits, les produits de boulangerie, les produits laitiers et la bière. Les lipases d'*Aspergillus niger*, de *Rhizopus oryzae* et de *Candida cylindracea* sont couramment utilisées dans la production de produits de boulangerie (Mehta et al.,2017).

### 10.2. Les lipases dans la cosmétique

Les lipases sont considérées comme les enzymes les plus importantes dans la production de différents types de cosmétiques car elles sont importantes à la fois en tant qu'ingrédients actifs dans la formulation d'un matériau cosmétique et en tant que biocatalyseurs dans la synthèse de produits chimiques spécifiques utilisés dans les cosmétiques. Les lipases actives sont principalement utilisées en cosmétique pour le nettoyage superficiel (Ali et al.,2023).

### 10.3. Lipase dans les produits pharmaceutiques

Exemple d'utilisation pharmaceutiques la lipase B provenant de *Candida antarctica* (CALB) est l'une des lipases les plus utilisées dans la fabrication de produits pharmaceutiques, notamment pour obtenir des intermédiaires énantiosélectifs clés, ainsi que des produits pharmaceutiques finaux énantiomériquement purs. Cette enzyme présente plusieurs caractéristiques qui la rendent largement utilisée dans les processus pharmaceutiques, notamment sa bonne stabilité, la production de produits optiquement purs, les réactions d'estérification et les modifications régiosélectives de substrats multifonctionnels (Contesini et al.,2020).

Les lipases sont également applicables pour le traitement de la perte de cheveux et des maladies du cuir chevelu. Les lipases sont utilisées pour la production industrielle de glycolipides aryl aliphatiques, de laurate de citronellole à partir de citronellole et d'acide laurique, et d'estérification méthylique de l'acide docosahexaénoïque en docosahexaénoate

d'éthyle, En tant que constituant des crèmes topiques anti-obésité, les lipases sont utilisées dans la fabrication de l'ondulation des cheveux et également utilisées pour le traitement des tumeurs malignes comme aides digestives, car les lipases sont initiées en tant qu'activateurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) (Chandra *et al.*,2020).

#### 10.4. Les applications médicales des lipases

Les lipases font partie de la famille des hydrolases qui agissent sur les liaisons ester carboxyliques. Elles sont impliquées dans la catalyse de l'hydrolyse des triglycérides (TG) en chylomicrons et en particules de lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Les utilisations des lipases évoluent rapidement et, à l'heure actuelle, on estime qu'elles présentent un potentiel élevé en médecine. Des études et des recherches intensives ont conduit les chercheurs à explorer les lipases pour leur utilisation dans la thérapie de substitution, où la déficience enzymatique dans des conditions pathologiques est compensée par leur administration externe. Dans notre corps, elles sont utilisées pour décomposer les graisses présentes dans les aliments afin qu'elles puissent être absorbées dans l'intestin, et une carence en lipases entraîne une malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles. Les lipases aident les personnes atteintes de mucoviscidose, de la maladie d'Alzheimer et d'athérosclérose et constituent une cible potentielle pour la prévention et la thérapie du cancer. Elles servent d'outil de diagnostic et leur présence ou l'augmentation de leur taux peut indiquer une infection ou une maladie. L'obésité provoque des maladies métaboliques et constitue un grave problème de santé dans le monde entier. Ainsi, l'inhibition de la lipase digestive pour réduire l'absorption des graisses est devenue la principale approche pharmacologique du traitement de l'obésité au cours des dernières années (Loli *et al.*,2015).

#### 10.5. Production de biocarburants

Au cours des dernières années, les lipases fongiques ont suscité une attention croissante en tant que biocatalyseurs pour la production de biocarburants, qu'elles soient utilisées sous forme libre et/ou immobilisée, ou même en tant que biocatalyseurs à cellules entières. L'estérification directe d'acides gras et d'alcools catalysée par des lipases fongiques pour la production de biocarburants est une alternative prometteuse aux méthodes existantes en raison de la polyvalence de leurs propriétés, de leur spécificité de substrat et de leur facilité de production en série. Les lipases fongiques de nombreux genres tels que *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida* et *Penicillium* sont

considérées comme importantes en raison de leur stabilité et de leur potentiel d'estérification (Stergiou *et al.*,2013).

### **10.6. Les lipases dans les détergents**

De nombreuses lipases différentes provenant d'autant de micro-organismes sont désormais disponibles et l'industrie des détergents, en particulier, en a profité. L'industrie des détergents a particulièrement bénéficié de ce développement et constitue aujourd'hui le plus grand domaine d'application des lipases industrielle (Jaeger *et al.*,1994).

# Partie 02:Pratique

*Partie 02:Pratique*

## Matériels et méthodes

*Matériels et méthodes*

Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Microbiologie département de microbiologie appliqué Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi. Le but est Isolement et caractérisation morphologique et biochimique des souches productrices de lipase.


### 1. Echantillonnage

Dans cette étude les souches de levures ont été isolées à partir de 5 échantillons des grignons d'olive récupérés à partir de différentes périssoires (Figure 10, Photographie 1):

- Wilaya d'Oum El Bouaghi commune d'Oum El Bouaghi , village de Sidi R'ghis.
- Wilaya Bouira, commune El Asnam.
- Wilaya Souk Ahras, commune de Mechroha, village de Ain Seynour
- Wilaya Skikda, commune Tamalous.
- Wilaya Batna, commune Boumia.



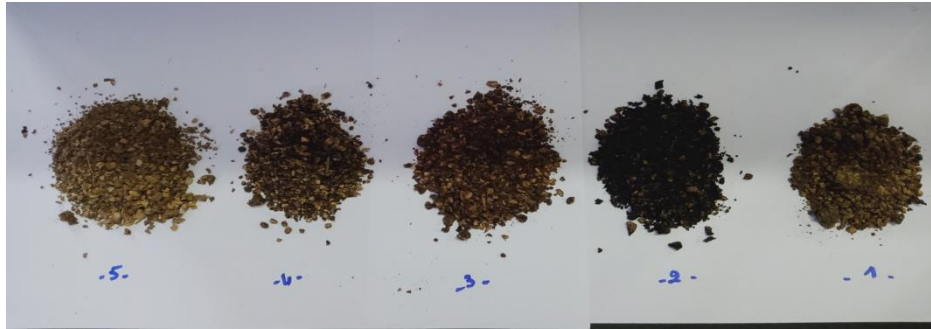
Figure 10 : Carte représentant les cinq wilayas d'échantillonnage.

Echantillons	Localisation	Image
1	Wilaya d'Oum El Boughi	
2	Wilaya de Bouira	
3	Wilaya de Souk Ahras	
4	Wilaya de Skikda	
5	Wilaya de Batna	

**Photographie01** : échantillons de grignons d'olive utilisées dans l'étude.

## 2. Traitement des échantillons de grignons d'olive

Avant aucune opération les échantillons de grignons d'olive ont été séchés à l'air ambiant dans laboratoire de microbiologie, puis broyés, filtrés et conservés jusqu'à leur utilisation (Photographie 2).


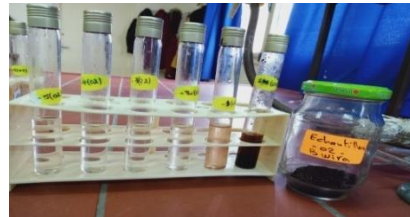


**Photographie 02 :** Grignons d'olive séchés.

### 3. Isolement des souches levuriennes

L'isolement des levures à partir des grignons d'olive a été réalisé par dilution en série de 1g de chaque échantillon et ensemencement en surface. Pour l'isolement de la levure, un milieu spécifique a été utilisé, à savoir YEME (extrait de levure extrait de l'orge) (Annexe).

Un gramme (1g) de chaque échantillon est introduit dans un tube qui contient 9ml d'eau physiologique stérile, puis bien homogène par un vortex pendant 3 min. Pour la préparation des dilutions 1 ml de la SM est transféré dans un autre tube de 9mL d'eau physiologique stérile (Annexe, de la même manière les dilutions sont préparées jusqu'à la dilution  $10^5$  (Photographie 3).

Echantillons	Dilutions
1	
2	



**Photographie 03** : Préparation des dilutions des échantillons.

Un volume de 0,1 ml des dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  a été étalé en surface (par râteau) sur la gélose YEME (Annexe) après la solidification de la gélose. Les boîtes de pétri ont été ensuite incubées à  $30^{\circ}\text{C}$ , pendant 2 à 3 jours dans l'étuve de laboratoire.

#### **4. Purification des levures (Réensemencement)**

Après le développement des isolats, les colonies présentant les caractères culturaux et macroscopiques des levures ont été purifiées par réensemencement en surface par stries sur boîtes contenant le milieu YEME (Annexe) à l'aide d'une anse de platine stérile par la technique de quatre cadrans. L'incubation des boîtes est effectuée en aérobiose, à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 3 jours (72 heures).

#### **5. Conservation des souches isolées**

Les souches ont été conservées selon deux méthodes :

**5.1. Pour une courte durée** : Les souches pures ont été conservées sur le milieu YEME à  $4^{\circ}\text{C}$  pour une conservation courte.

**5.2. Pour une longue durée** : Les souches pures ont été conservées sur le milieu incliné d'YEME à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une conservation plus longue.

## **6. Caractérisation des souches**

L'identification des isolats levuriens a été effectuée selon les techniques décrites par Kreger-Van (1984).

### **6.1. Etude des caractères cultureux**

L'étude des caractéristiques culturelles des isolats est une étude macroscopique basée sur l'observation de l'aspect des colonies, leur couleur, texture et leur forme.

### **6.2. Etude des caractères microscopiques**

Les caractéristiques morphologiques des cellules sont étudiées d'après des préparations microscopiques effectuées entre lame et lamelle à partir de cultures milieu solide. Pour l'observation microscopique des préparations à l'état frais au grossissement X 100 sont préparées puis effectuées une coloration des levures par le bleu de méthylène. L'étude microscopique permet de définir :

- La forme des cellules qui peut être sphérique, ovoïde, allongée.
- La taille des cellules : grande, petite ou moyenne.
- Le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et la position des bourgeons sur la cellule mère (polaire ou latérale).
- La mobilité.

### **6.3. Aptitude à la filamentation**

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique. Le milieu YEME fondu est déposé sur une lame microscopique stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale. La lame est ensuite incubée 48-72H à 30°C.

L'observation microscopique se fait après 2 à 3 jours d'incubation (grossissement X100). La bordure de la culture, sa filamentation ainsi que la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance et sa ramification sont observés et notés.

## 6.4. Etude des caractères biochimiques

### 6.4.1. Test d'Indole

Ce test permet de déterminer la capacité de la levure à former de l'indole à partir du tryptophane. Le milieu eau peptonée exempt de l'indole estensemencé et incubé 24 h à 37°C. L'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs. Une réaction positive est exprimée par un anneau rouge à la surface du milieu (**Kovacs, 1956**).

### 6.4.2. Test Triple Sugar Iron (TSI)

Ce test permet de déterminer la capacité de la levure d'utiliser plus d'un des sucres (glucose, lactose ou sucrose), avec ou sans production de gaz, et de produire du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). En partant d'une colonie, le culot est inoculé en piquant avec un fil droit au centre puis la pente est inoculée en effectuant une strie sinueuse. Le milieu est incubé à 37°C pendant 24h (**Kligler, 1917**). Les résultats sont interprétés comme suit :

- Fermentation du glucose seulement : culot jaune et pente rouge.
- Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose): culot et pente jaune.
- Aucun sucre dégradé : pente rouge et culot rouge ou orange.
- Production de gaz : bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé.
- Production de H<sub>2</sub>S : précipité noirâtre plus ou moins abondant.

### 6.4.3. Réduction des nitrates

La présence ou l'absence de la nitrate-réductase se fait par la mise en évidence de la transformation de nitrate en nitrite en milieu bouillon nitraté. Les bouillons sontensemencés et incubés pendant 24 h à 37°C. Après incubation, on ajoute quelques gouttes des réactifs nitrate-réductase I et II (réactifs spécifiques à la recherche de nitrate-réductase). Une coloration rose ou rouge du milieu désigne une réaction négative, mais certaines levures réduisent les nitrates directement en azote gazeux (N<sub>2</sub>), c'est-à-dire une coloration rose obtenue après addition de poudre de zinc. (Le zinc est un agent réducteur qui a la capacité de réduire les nitrates en nitrites) (**Jones, 1926**).

### 6.4.4. Test Voges Proskauer et Rouge de Méthyle

La mise en évidence des voies fermentaires est de grande utilité pour le diagnostic des micro-organismes. Ce test est opéré à partir d'une culture sur milieu Clark et Lubs qui servira à la détermination des réactions de Voges Proskauer (VP) et Rouge de Méthyle (RM). Un tube contenant le milieu Clark et Lubs estensemencé à l'aide de quelques gouttes de la

suspension levurienne, puis l'incubé à 37°C pendant 24h, le lendemain la moitié du tube est versée dans un autre tube stérile. L'un servira à la recherche de la réaction VP, après adjonction des réactifs VP I, puis VP II, attende environ 15 minutes puis noter la couleur ; si elle vire au rouge orangé, il s'agit d'une réaction positive. L'autre servira à la recherche de la réaction RM, après adjonction du réactif RM ; s'il y a virage de la couleur au rouge, il s'agit d'une réaction positive (**Voges et Proskauer, 1898**).

#### 6.4.5. Test Mannitol Mobilité

Ce test est utilisé pour les levures fermentatives. Il permet de mettre en évidence deux caractères : l'utilisation du mannitol et la mobilité sur le milieu de mannitol, un ensemencement a été effectué par pique centrale et incubation à 30°C pendant 24 heures. Si le milieu devient jaune : la levure est Mannitol (+), s'il reste rouge elle est Mannitol(-). Pour la mobilité, elle se traduit par l'envahissement de la gélose molle (**MacConkey,1905**).

#### 6.4.6. Test du citrate de Simmons

Le principe est de placer les germes dans un milieu contenant une seule source de carbone, le Citrate. Seules les levures qui possèdent les enzymes de dégradation de cette molécule peuvent se multiplier dans ce milieu. Le milieu est ensemencé par des stries à la surface de la pente. Incuber à 37°C pendant 48 heures ou plus. L'utilisation de citrate se traduit par le virage de l'indicateur de pH au bleu (**Simmons, 1962**).

#### 6.5. Etude de la fermentation des sucres

Les sucres à étudier concernent le glucose, le saccharose, le lactose, le maltose et galactose. Cette étude nécessite la présence d'un témoin. Le milieu d'eau de levure (Annexe) est réparti dans des tubes à essai à raison de 10 ml par tube. Une cloche de Durham est rajoutée pour chaque tube. Les sucres utilisés comme sources de carbones sont additionnés au milieu à raison de 20 %. Les tubes sont ensemencés avec des colonies purifiés de levure. Puis les cultures sont incubées à 28°C, pendant 3 jours à 4 semaines. La fermentation des sucres est révélée par le dégagement de CO<sub>2</sub> et l'apparition de bulle dans la cloche (**MacFaddin, 2000**).

#### 7. Criblage de l'activité lipolytique et estérolytique

Pour cribler la production de lipase, le milieu minéral minimum gélosé additionné de 1% de Tween 20 ou Tween 80 est préparé. Le Tween 80 est utilisé pour la détection des lipases car il contient des esters d'acide oléique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour les estérases car il contient des esters d'acides gras à courte chaîne (**Ramnath et al., 2017**). Les souches sont ensemencées sur les boîtes de Pétri et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours.

L'activité lipolytique a été déterminée par la formation d'une zone de précipité autour de la colonie (**Kanimozhi et Perinbam, 2010**).

# Résultats et Discussion

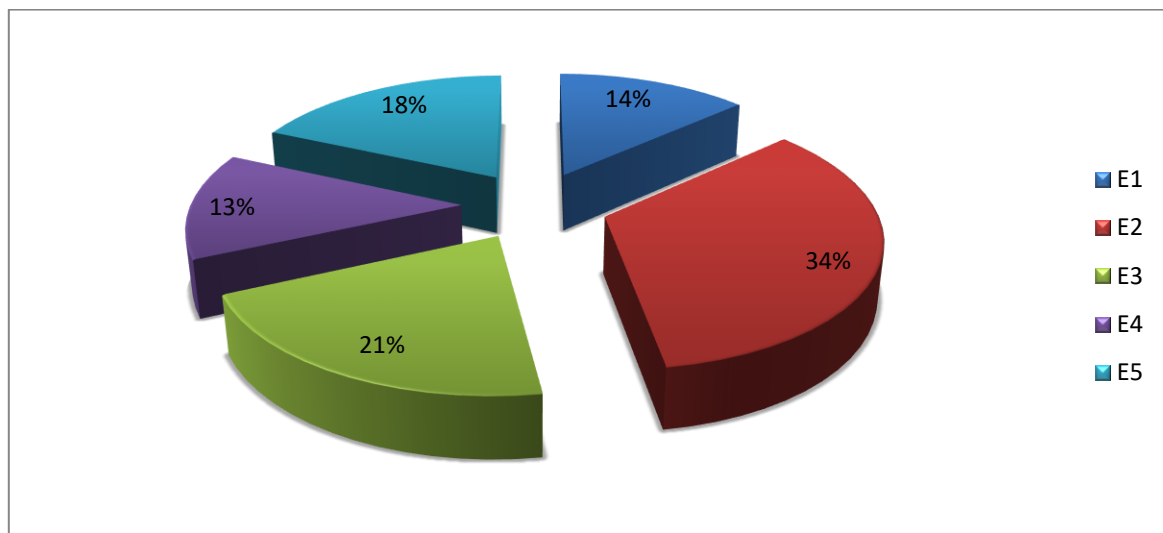
*Résultats et Discussion*

### 1. Isolement des souches levuriennes

L'isolement des levures a été réalisé à partir de 5 échantillons des grignons d'olives collectés à travers des pressoirs trouvées dans le Nord-Est Algérien : Oum El Bouaghi, Bouira, Souk Ahras, Skikda et Batna. L'isolement et la purification a permis l'obtention de 82 souches levuriennes.

L'analyse des **82** souches résulte de la purification (comme mentionné précédemment) montre que les échantillons des grignons d'olive collectés à partir des régions Bouira (E2) et Souk Ahras (E3) renferment plus des souches de levures (34 % et 21 %, respectivement) par rapport à l'échantillon du grignon d'olive de la région de Batna (E5), Oum El Bouaghi (E1) et Skikda (E4) (18 %, 14% et 13%, respectivement).

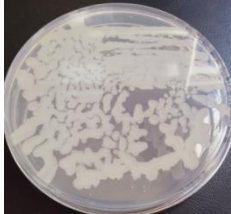
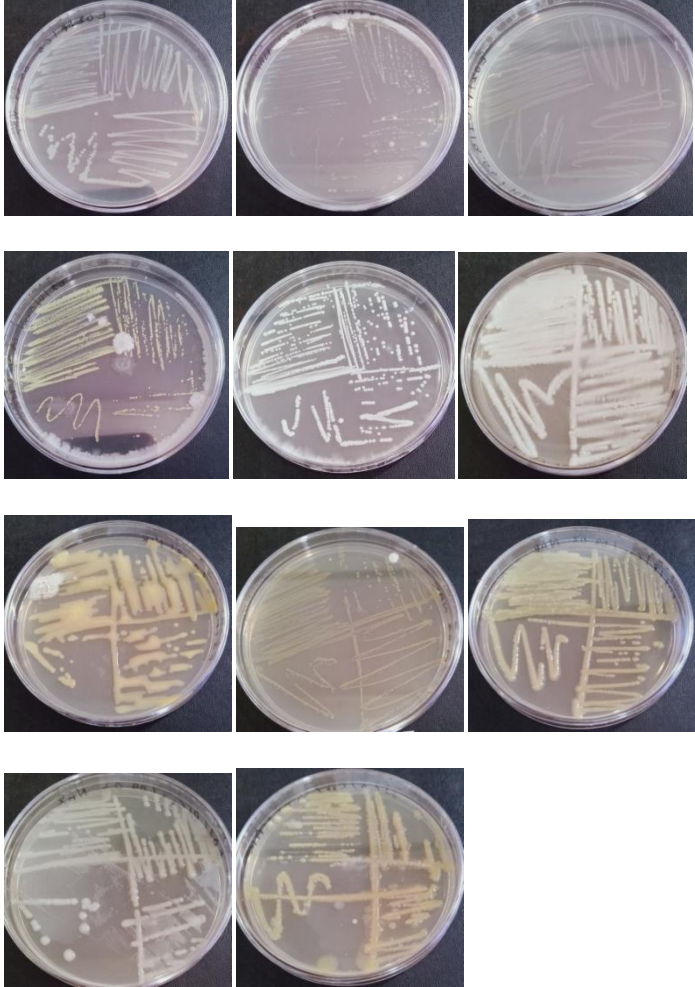

Ce résultat indique que l'environnement géographique ainsi que les conditions climatique et géologique du sol influence la richesse des grignons d'olive par les levures.

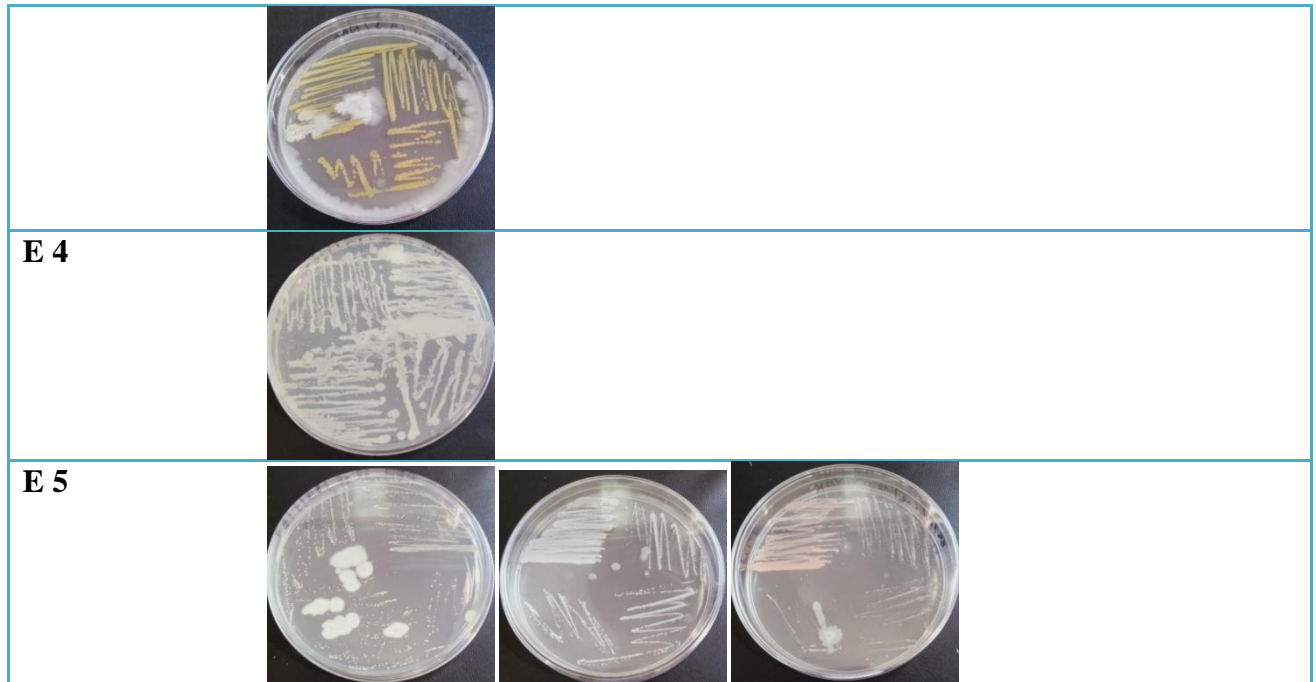


**Figure 11 :** cercle proportionnel représentant le pourcentage des souches de levures de chaque échantillon.

20 isolats levuriens ont été sélectionnés sur la base de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Le tableau ci-dessous regroupe les 20 souches levuriens sélectionnées dans cette étude.

Tableau 03 :Les souches levuriens sélectionnés.

Échantillon	Aspect macroscopique des isolats		
<b>E 1</b>			
<b>E 2</b>			
<b>E 3</b>			



## 2. Caractérisation des souches

### 2.1. Etude des caractères cultureux et microscopiques :

Les caractères macroscopiques des isolats levuriens sélectionnés sont résumés dans le tableau 04.

**Tableau 04 :** caractérisation macroscopique des 20 souches sélectionnées.

Souches	Opacité	Aspect	Forme	Taille	Couleur
E01/C02	Opaque	Lisse	Régulière	Moyenne	Rose
E02/C05	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Blanche
E02/C06	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Transparente
E02/C07	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Saumon
E02/C12	Opaque	Lisse	Régulière	Très petite	Jaune
E02/C17	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Blanche
E02/C20	Translucide	Rugueuse	Irrégulière	Moyenne	Blanche
E02/C21	Opaque	Lisse	Régulière	Petite	Jaune

E02/C24	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Saumon
E02/C26	Translucide	Lisse	Irrégulière	Très grande	Jaune
E02/C27	Translucide	Lisse	Régulière	Moyenne	Blanche
E02/C28	Translucide	Lisse	Irrégulière	Grande	Saumon
E03/C11	Opaque	Lisse	Irrégulière	Grande	Beige
E03/C14	Translucide	Lisse	Régulière	Grande	Crème
E03/C15	Opaque	Lisse	Irrégulière	Moyenne	Beige
E03/C16	Opaque	Lisse	Régulière	Très petite	Jaune
E04/C06	Translucide	Rugueuse	Irrégulière	Moyenne	Blanche
E05/C08	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Blanche
E05/C14	Translucide	Lisse	Régulière	Petite	Blanche
E05/C15	Opaque	Lisse	Régulière	Moyenne	Rose

En analysant les critères des souches étudiées, on peut observer que les souches présentent des variétés culturelles remarquables. Une opacité variable, variant entre opaque et translucide. La majorité des souches ont une surface lisse. La (E02/C20) présente une surface rugueuse, ce qui peut indiquer la présence de structures particulières sur la levure. La plupart des souches ont une forme régulière, mais quelques souches (E02/C26, E02/C28, E03/C11, E03/C15) présentent une forme irrégulière, ce qui peut indiquer une plus grande variabilité morphologique au sein de ces souches. Les tailles des souches varient de très petites à grandes. Certaines souches sont de taille petite (E02/C05, E02/C06, E02/C07, E02/C21, E02/C24, E05/C08, E05/C14) tandis que d'autres sont de taille moyenne (E01/C02, E02/C20, E02/C27) ou grande (E02/C26, E03/C11, E03/C14, E04/C06). La taille des souches peut être un indicateur de la croissance et du développement de la levure. Les couleurs des souches varient considérablement. Les couleurs observées incluent le rose, le blanc, le saumon, le jaune, le beige, la crème et le rouge. Les variations de couleur peuvent être le résultat de pigments spécifiques produits par les levures ou de différences dans leur composition chimique.

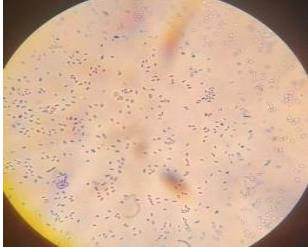
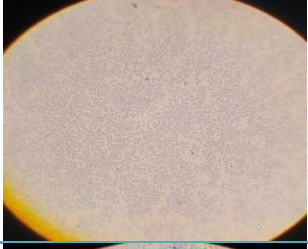
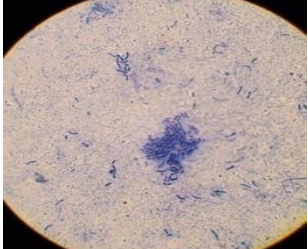
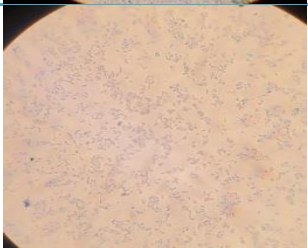
En combinant ces observations, il est possible de voir des variations significatives entre les souches isolées à partir de grignons d'olive. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que la diversité génétique des levures, les conditions de croissance,

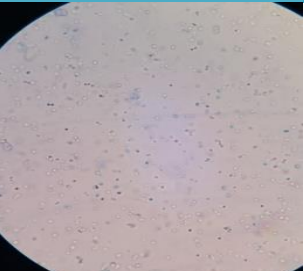


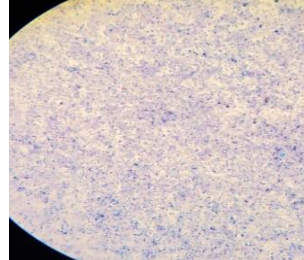
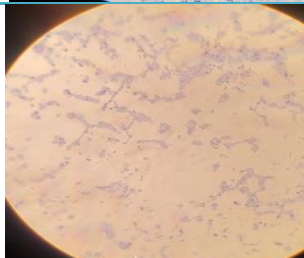
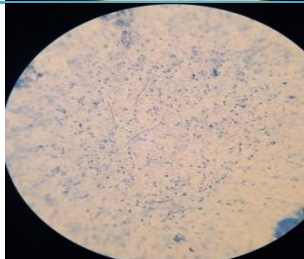
l'environnement et les interactions avec d'autres micro-organismes présents dans les grignons d'olive.

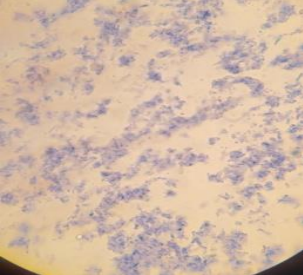
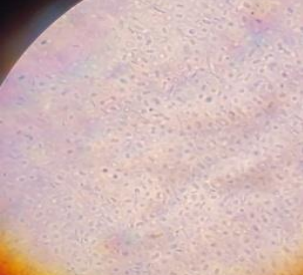
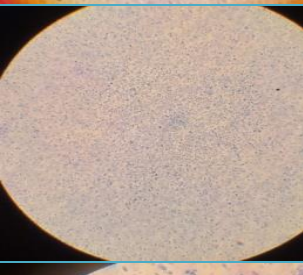
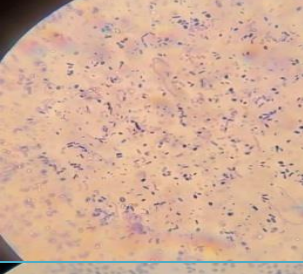
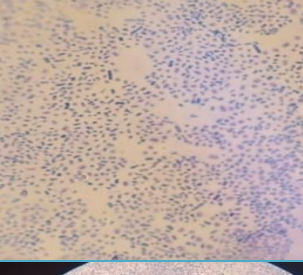
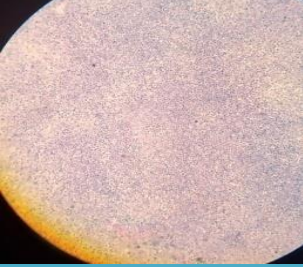
Pour une analyse plus approfondie et une meilleure compréhension de ces levures, des études supplémentaires, comportant l'analyses microscopiques et biochimiques ont été réalisées.

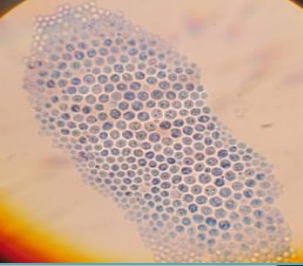
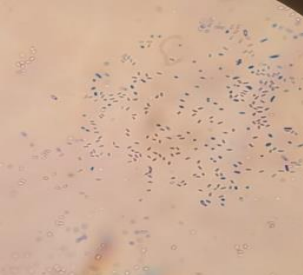
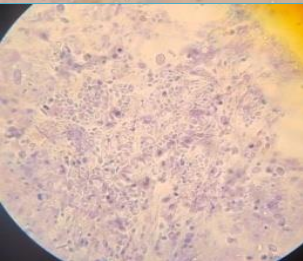
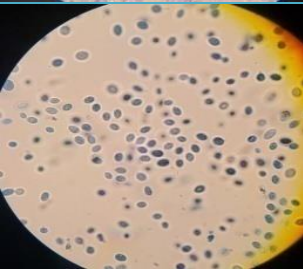
Le tableau 05 regroupe les caractères microscopiques des isolats en se basant sur la forme, la mobilité, le mode de regroupement et la taille des cellules.

**Tableau 05** : caractérisation microscopique des 20 souches sélectionnées.

Échantillons	Colorée (avec bleu de méthylène)	Mobilité	Mode de regroupement	La forme Microscopique	Taille
E01/C02		(-)	Libre	Ovoïde	Petite
E02/C05		(-)	Libre	Allongée	Petite
E02/C06		(-)	Amas	Allongée	Petite
E02/C07		(-)	Libre	Allongée	Très petite

E02/C12		(-)	Libre	Ronde	Petite
E02/C17		(+)	Libre	Allongée	Très petite
E02/C20		(+)	Amas + Libre	Allongée + ovoïde	Moyenne + Petite
E02/C21		(-)	Libre	Allongée	Petite
E02/C24		(-)	Chaînette	Ronde	Très petite
E02/C26		(-)	Libre	Ronde	Très petite

E02/C27		(-)	Amas	Ovoïde	Très petite
E02/C28		(-)	Libre	Allongée	Petite
E03/C11		(-)	Paires	Ronde	Très petite
E03/C14		(+)	Libre	Ronde + Ovoïde	Petite
E03/C15		(-)	Libre	Allongée	Petite
E03/C16		(-)	Libre	Ovoïde	Petite

E04/C06		(-)	Amas	Ronde	Moyenne
E05/C08		(-)	Libre	Allongée	Petite
E05/C14		(+)	Libre	Allongée + Ovoïde	Grande
E05/C15		(-)	Libre	Ovoïde	Moyenne

En analysant les observations microscopiques des échantillons de levures, on constate que la plupart des souches montrent une mobilité négative (-), ce qui signifie qu'elles ne présentent pas de mouvement actif. Quelques souches (E02/C17, E03/C14) ont une mobilité positive (+), indiquant qu'elles sont capables de se déplacer de manière active. Concernant le mode de regroupement, les souches peuvent être observées soit en tant qu'amas, soit en tant qu'individus libres. Certaines souches (E02/C06, E02/C20, E02/C27, E04/C06) ont tendance à former des amas, tandis que d'autres sont principalement observées sous forme d'individus libres.

Les formes microscopiques des souches varient, avec des observations telles que des ovocytes, des allongées, des rondes, des ovoïdes et des chaînettes. Les tailles des souches peuvent être petites, très petites, moyennes ou grandes.

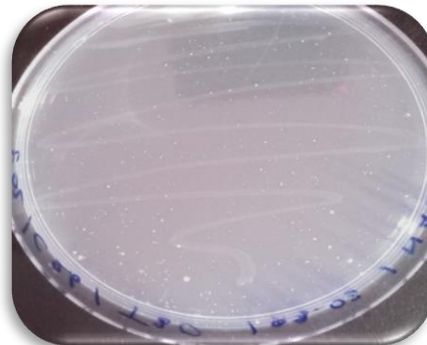
Ces observations microscopiques fournissent des informations supplémentaires sur les caractéristiques morphologiques des souches de levures isolées à partir des grignons d'olive. Cependant, il est important de noter que l'interprétation microscopique seule ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur l'identité des souches ou leurs propriétés spécifiques. Des analyses supplémentaires, telles que des tests biochimiques pourraient être nécessaires pour obtenir une caractérisation plus approfondie des souches de levures isolées.

## 2.2. Etude des activités lipolytiques et estérolytiques

Les tests de la mise en évidence des activités lipolytiques et estérolytiques (lipase et estérase) chez les 20 souches de levures à partir de grignon d'olive indiquent que la majorité des souches isolées présente au moins une activité enzymatique.



Test d'activité lipolytique (+)



Test d'activité lipolytique (-)



Test d'activité estérolytique (+)



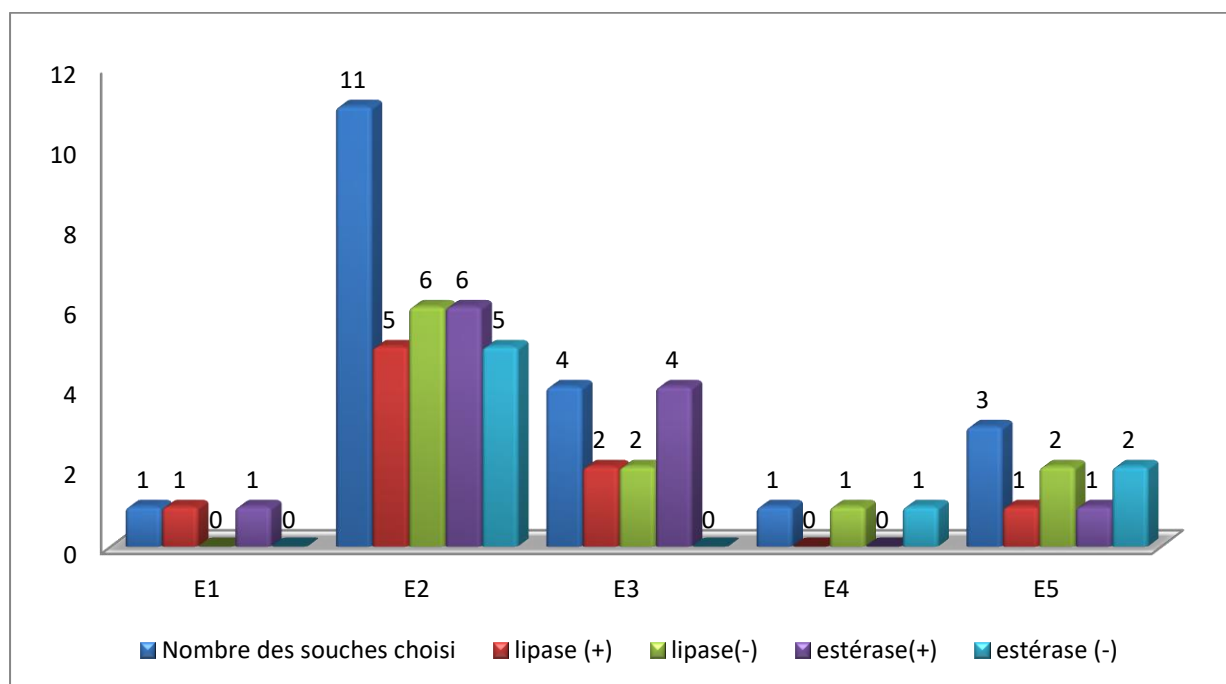
Test d'activité estérolytique (-)

**Photographie 04** : résultats de test d'activité lipolytique et d'activité estérolytique.

Les résultats des tests enzymatiques sont présentés dans le tableau (06) et la photographie (04):

**Tableau 06 : Résultats** du test d'activité lipolytique et estérolylique.

Echantillons	T80	T20
<b>E01/C02</b>	(+)	(+)
<b>E02/C05</b>	(-)	(+)
<b>E02/C06</b>	(+)	(+)
<b>E02/C07</b>	(-)	(-)
<b>E02/C12</b>	(-)	(-)
<b>E02/C17</b>	(-)	(-)
<b>E02/C20</b>	(+)	(+)
<b>E02/C21</b>	(+)	(+)
<b>E02/C24</b>	(-)	(-)
<b>E02/C26</b>	(+)	(+)
<b>E02/C27</b>	(-)	(-)
<b>E02/C28</b>	(+)	(+)
<b>E03/C11</b>	(-)	(+)
<b>E03/C14</b>	(+)	(+)
<b>E03/C15</b>	(-)	(+)
<b>E03/C16</b>	(+)	(+)
<b>E04/C06</b>	(-)	(-)
<b>E05/C08</b>	(-)	(-)
<b>E05/C14</b>	(-)	(-)
<b>E05/C15</b>	(+)	(+)



**Figure 12 :** Diagramme à barres montrant les résultats du test d'activité lipolytique et estéro-lytique par rapport aux souches de chaque échantillon.

En analysant les résultats du test lipolytique (utilisant un milieu contenant Tween 80) et estéro-lytique (utilisant un milieu contenant Tween 20) pour les échantillons de levures, une variété de la capacité enzymatique entre les isolats étudiés peut être constatée.

La révélation des deux activités enzymatiques est basée sur le principe de la précipitation des sels de calcium l'hydrolyse du Tween libère des acides gras qui se lient au calcium du milieu pour former des cristaux insolubles autour du point d'inoculation. Le Tween 80 est utilisé pour la détection des lipases car il contient des esters d'acide oléique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour les estérases car il contient des esters d'acides gras à chaîne inférieure (Plou, 1998 ; Ramnath, 2017).

Dans le cas de l'activité lipolytique, les souches qui ont été testées positives (+) indiquent qu'elles sont capables de dégrader les lipides présents dans le milieu contenant Tween 80. Alors que les souches qui ont été testées négatives (-) n'ont pas montré d'activité de dégradation des lipides.

Pour le test estéro-lytique, les souches qui ont été testées positives (+) montrent une capacité à dégrader les esters présents dans le milieu contenant Tween 20. Les souches qui ont été testées négatives (-) ne montrent pas d'activité de dégradation des esters.

En analysant les résultats, on peut noter les observations suivantes :

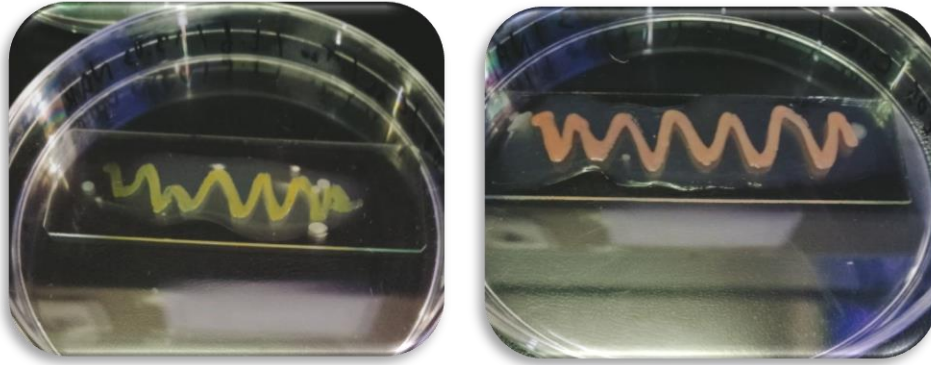
- La plupart des souches (E01/ C02 , E02/C06, E02/C20, E02/C21, E02/C26, E02/C28, E03/C14, E03/C16, E05/C15) ont montré une activité positive pour les tests lipolytique et estérolytique, ce qui suggère leur capacité à dégrader les lipides et les esters.
- Certaines souches (E02/C05, E03/C11, E03/C15) ont montré une activité positive pour le test estérolytique, mais pas dans le test lipolytique, indiquant qu'elles sont capables de dégrader les esters mais pas les lipides.
- Plusieurs souches (E02/C07, E02/C12, E02/C17, E02/C24, E02/C27, E04/C06, E05/C08, E05/C14) ont été testées négatives dans les deux tests, ce qui suggère qu'elles n'ont pas montré d'activité de dégradation des lipides ou des esters.

Ces résultats indiquent que certaines souches de levures isolées à partir des grignons d'olive peuvent avoir des capacités lipolytiques et estérolytiques, ce qui signifie qu'elles peuvent jouer un rôle dans la dégradation des lipides et des esters. Cela pourrait avoir des implications potentielles dans divers domaines tels que l'industrie alimentaire ou la production d'enzymes spécifiques.

En effet, les grignons d'olive sont connus pour contenir des lipides, notamment des acides gras, qui peuvent être des substrats potentiels pour l'activité lipolytique des levures. Les levures sont en contact avec les lipides présents dans les grignons d'olive pendant leur croissance, cela peut favoriser le développement de souches ayant une activité lipolytique. Les levures peuvent produire des enzymes, telles que les lipases, qui sont capables de dégrader les lipides en acides gras et en glycérol, leur fournissant ainsi une source d'énergie et de nutriments.

### **2.3.Aptitude à la filamentation**

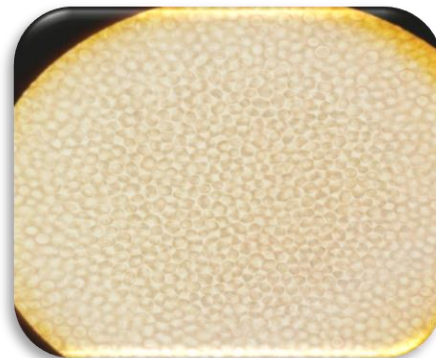
L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique se fait en (G X 100) après 3 jours d'incubation à 30°C. Les résultats de ce test sont regroupés dans le tableau 07.



Test d'aptitude à la filamentation



Observation microscopique d'une souche filamenteuse.



Observation microscopique d'une souche pas filamenteuse.

**Photographie 05** : résultats du test d'aptitude à la filamentation .

**Tableau07**: Résultats de l'aptitude à la filamentation .

Souche	Résultats
S1	Pas filamente
S2	Filamente
S3	Pas filament
S4	Filamente
S5	Pas filament
S6	Pas filament
S7	Filament
S8	Pas filament
S9	Pas filament
S10	Pas filament
S11	Filament
S12	Pas filament

Les souches S2, S4, S7 et S11 ont montré une capacité à former des filaments, ce qui indique qu'elles ont la capacité de se filamenter dans des conditions spécifiques. La filamentation peut être une réponse adaptative à certaines conditions environnementales ou à des signaux biochimiques. Les souches S1, S3, S5, S6, S8, S9, S10 et S12 n'ont pas montré de filamentation. Cela signifie qu'elles ne sont pas capables de former des filaments dans les conditions expérimentales utilisées.

La filamentation peut être influencée par plusieurs facteurs, tels que la souche spécifique de levure, les conditions de croissance, la composition du milieu et d'autres signaux environnementaux. Il est important de noter que la capacité à former des filaments peut être variable même au sein d'une même espèce de levure (Sudbery *et al.*, 2011).

Il est également possible que la filamentation soit liée à des processus de différenciation ou de réponse au stress chez les levures. Par exemple, la filamentation peut être un mécanisme de survie utilisé par les levures dans des conditions défavorables ou de stress environnemental (Finkel et Mitchell, 2011).

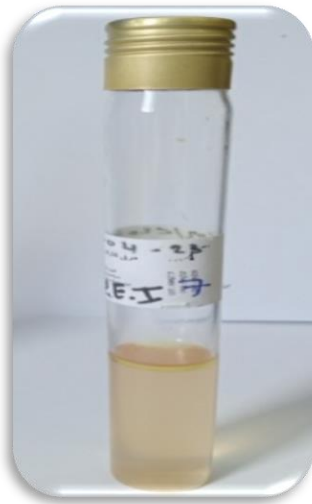
#### 2.4. Etude des caractères biochimiques

Les résultats des tests biochimiques des souches actives sont regroupés dans le tableau 08 et la Photographie( 06).

**Tableau 08 :** Résultats des tests biochimiques des souches actives

Souche	Indole	Glu	Lac	Gaz	H <sub>2</sub> S	Nitratase	VP	RM	Mannitol	Citrate de Simmons
S <sub>1</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
S <sub>2</sub>	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
S <sub>3</sub>	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
S <sub>4</sub>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>5</sub>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
S <sub>6</sub>	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
S <sub>7</sub>	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
S <sub>8</sub>	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
S <sub>9</sub>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>10</sub>	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

S11	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S12	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)



Test d'indole (+).



Test d'indole (-).



TSI(+).



TSI (-)



Résultat de nitratase(+).



Résultat de nitratase(-).



Test VP(+).



Test VP(-).



Test RM(+).



Test RM(-).



Mannitol Mobilité (-).



Mannitol Mobilité (+).



Citrate de Simmons (+).

Citrate de Simmons (-).

**Photographie06** : Résultats des tests biochimiques pour les levures actives.

Les résultats obtenus à partir des tests biochimiques indiquent que les souches de levures isolées à partir de grignons d'olive montrent une diversité dans leurs caractéristiques biochimiques.

#### 2.4.1. Test d'Indole

À travers les résultats exprimés dans le tableau, le nombre des souches Indole positif est 8S, qui sont S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>8</sub>, S<sub>10</sub> et S<sub>11</sub>; et le nombre des souches Indole négatif est 4S, qui sont S<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>9</sub> et S<sub>12</sub>.

Le test d'indole est utilisé pour détecter la production de l'enzyme tryptophanase par un micro-organisme, qui catalyse la dégradation du tryptophane en indole, pyruvate et ammoniac. Si le test d'indole est positif, cela signifie que la souche de micro-organisme est capable de produire de l'indole à partir du tryptophane. Cela est généralement déterminé en ajoutant du réactif de Kovac au milieu de culture contenant la souche testée. Si le réactif de Kovac se colore en rouge ou en rose (la présence d'un anneau rouge à la surface du milieu), cela indique une réaction positive. Si le test d'indole est négatif, cela signifie que la souche de micro-organisme ne produit pas d'indole à partir du tryptophane. Dans ce cas, le réactif de Kovac ne change pas de couleur ou ne forme pas d'anneau rouge à la surface du milieu (**Li et al., 2020**).

#### **2.4.2. Test Triple Sugar Iron (TSI)**

Le test Triple Sugar Iron (TSI) a permis de déterminer la capacité de la bactérie d'utiliser plus d'un des sucres (glucose, lactose), avec ou sans production de gaz, et de produire du sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ). Le milieu est incubé à  $37^{\circ}C$  pendant 24h .

Selon les résultats montrés dans le tableur on regroupe les souches dans :

- Des souches qui dégradent le glucose et le lactose, avec production de gaz avec absence de production de  $H_2S$ :  $S_1$  ,  $S_4$  ,  $S_9$  ,  $S_{11}$  et  $S_{12}$ .
- Une souche qui dégrade le glucose et le lactose, sans production de gaz et de  $H_2S$  :  $S_2$ .
- Des souches qui ne dégradent pas le Glucose et dégradent Lactose sans production de gaz et de  $H_2S$ :  $S_3$  ,  $S_6$  ,  $S_7$  ,  $S_8$  et  $S_{10}$ .
- Une souche qui ne dégrade pas les 2 sucres :  $S_5$ .

#### **2.4.3. Réduction des nitrates**

A partir du test de la réduction des nitrates les résultats sont comme suit :

- Les souches  $S_1$  ,  $S_2$  ,  $S_4$  ,  $S_5$  ,  $S_6$  ,  $S_9$  ,  $S_{10}$  et  $S_{11}$  sont positives.
- Les souches  $S_3$  ,  $S_7$  ,  $S_8$  et  $S_{12}$  sont négatives.

Un test de nitrate positif ou négatif fait référence à la présence ou à l'absence de réduction du nitrate ( $NO_3^-$ ) en nitrite ( $NO_2^-$ ) par un micro-organisme. Un test de nitrate est positif indique que la souche de micro-organisme est capable de réduire le nitrate en nitrite. Cela peut être dû à la présence de l'enzyme nitratase qui catalyse cette réaction. Le nitrite peut être détecté à l'aide d'un réactif approprié qui le convertit en une couleur ou un précipité spécifique. Un test de nitrate est négatif signifie que la souche de micro-organisme n'a pas la

capacité de réduire le nitrate en nitrite. Cela peut être dû à l'absence de l'enzyme nitratase nécessaire pour la réaction de réduction (**MacFaddin et al., 1982**).

#### **2.4.4. Test VogesProskauer et Rouge de Méthyle**

Selon les resultants obtenus:

- Toutes les souches sont VP positif saufs S<sub>3</sub>.
- Toutes les souches sont RM positif saufs S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>et S<sub>5</sub>.

Pour le test VP, une coloration rose ou rouge après l'addition des réactifs VP indique un résultat positif. Cela signifie que le micro-organisme produit de l'acétone à partir du glucose via le métabolisme du butylène glycol. L'absence de coloration rose ou rouge après l'addition des réactifs VP indique un résultat négatif. Cela signifie que le micro-organisme n'est pas capable de produire de l'acétone à partir du glucose via le métabolisme du butylène glycol (**Michael, 2016**).

Pour le test du Rouge de Méthyle (RM), une coloration rouge ou rose intense après l'addition du réactif du Rouge de Méthyle indique un résultat positif. Cela signifie que le micro-organisme est capable de métaboliser les acides mixtes produits par la fermentation du glucose en métabolites acides, ce qui entraîne l'acidification du milieu et le changement de couleur. L'absence de coloration rouge ou rose intense après l'addition du réactif du Rouge de Méthyle indique un résultat négatif. Cela signifie que le micro-organisme ne métabolise pas les acides mixtes en quantité suffisante pour provoquer un changement de couleur notable (**Michael, 2016**).

#### **2.4.5. Test Mannitol Mobilité**

Ce test permet de mettre en évidence deux caractères : l'utilisation du mannitol et la mobilité sur le milieu de mannitol.

A partir les résultats du test les souches qui utilise le mannitol sont mobile : S<sub>1</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>9</sub> , S<sub>11</sub> et S<sub>12</sub>, et les souches qui n'utilise pas le mannitol sont pas mobile :S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>8</sub> et S<sub>10</sub>.On observe qu'il y a une production de gaz dans S<sub>6</sub>, qui s'explique par la fermentation du Mannitol.

Si la souche de micro-organisme est capable d'utiliser le mannitol comme source de carbone et le fermenter, cela entraînera la production d'acide, ce qui acidifie le milieu de culture. Un résultat positif est indiqué par un changement de couleur du milieu de culture, vers le jaune, en raison de l'acidification. Dans le cas contraire, li la souche ne peut pas

utiliser le mannitol comme source de carbone ou ne le fermenter pas, il n'y aura pas de production d'acide et le milieu de culture ne changera pas de couleur.

#### 2.4.6. Test du citrate de Simmons

Selon les résultats du test les souches qui utilisent le Citrate donc qui possèdent les enzymes de dégradation de cette molécule sont : S<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub>, S<sub>10</sub>, S<sub>11</sub> et S<sub>12</sub>. Les autres souches n'utilisent pas sont : S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>7</sub> et S<sub>8</sub>.

Si la souche est capable d'utiliser le citrate comme source de carbone, elle va métaboliser le citrate présent dans le milieu de culture et produire de l'acide citrique. Cela entraîne une augmentation du pH dans le milieu et un changement de couleur du milieu de culture de vert à bleu. Un résultat positif indique donc une utilisation du citrate par le micro-organisme. Si par contre la levure n'est pas capable d'utiliser le citrate comme source de carbone, elle ne métabolisera pas le citrate présent dans le milieu de culture. Le milieu de culture restera vert, et il n'y aura pas de changement de couleur.

#### 2.4.7. Fermentation des sucres

Les résultats du test de fermentation des sucres sont regroupés dans le tableau (09) et la photographie (07).

**Tableau 09** : Résultats du test de fermentation des sucres.

Souche	Glu	Mal	Gal	Sac	Lac
S <sub>1</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>2</sub>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
S <sub>3</sub>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
S <sub>4</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>5</sub>	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
S <sub>6</sub>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
S <sub>7</sub>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
S <sub>8</sub>	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
S <sub>9</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>10</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>11</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
S <sub>12</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

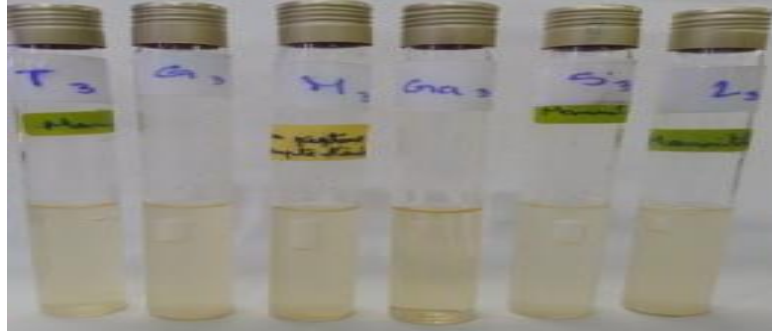
Les résultats test de fermentation des sucres pour les souches de levure indiquent la capacité de chaque souche à fermenter différents sucres spécifiques. Les résultats positifs (+)

indiquent une fermentation avec production d'acides, tandis que les résultats négatifs (-) indiquent l'absence de fermentation et de production d'acides pour les sucres correspondants.

- Pour le Glu (glucose) : Les souches S1, S2, S3, S4, S6, S7, S9, S10, S11 et S12 fermentent le glucose et produisent des produits finaux acides. Les souches S5 et S8 ne fermentent pas le glucose et ne produisent pas d'acides.
- Pour le Mal (maltose) : Les souches S1, S2, S3, S4, S9, S10, S11 et S12 fermentent le maltose et produisent des produits finaux acides. Les souches S5, S6, S7 et S8 ne fermentent pas le maltose et ne produisent pas d'acides.
- Pour le Gal (galactose) : Les souches S1, S3, S4, S8, S9, S10, S11 et S12 fermentent le galactose et produisent des produits finaux acides. La souche S2 ne fermente pas le galactose et ne produit pas d'acides.
- Pour le Sac (saccharose) : Les souches S1, S4, S9, S10, S11 et S12 fermentent le saccharose et produisent des produits finaux acides. Les souches S2, S5, S6, S7 et S8 ne fermentent pas le saccharose et ne produisent pas d'acides.
- Pour le Lac (lactose) : Les souches S1, S9, S10, S11 et S12 fermentent le lactose et produisent des produits finaux acides. Les souches S2, S5, S6, S7 et S8 ne fermentent pas le lactose et ne produisent pas d'acides.

Souche	Résultats
S1	
S2	

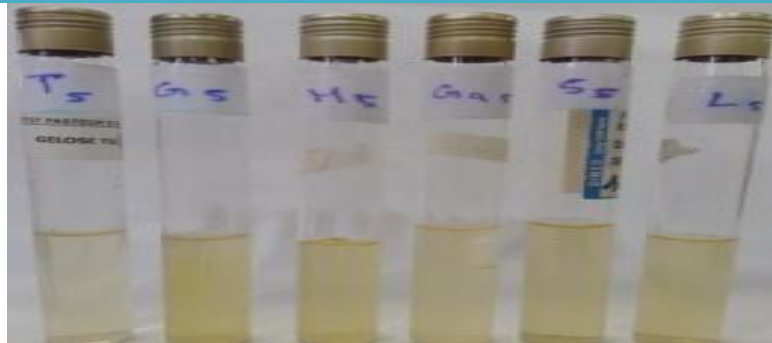
S3



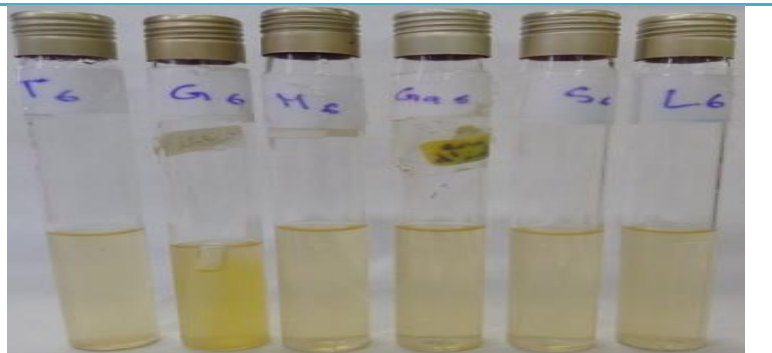
S4



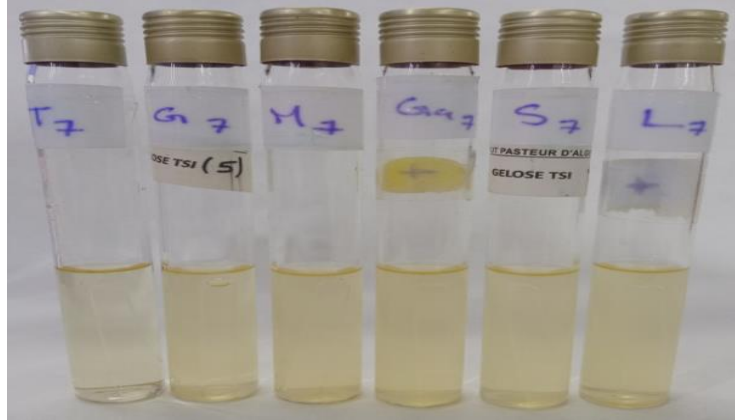
S5



S6



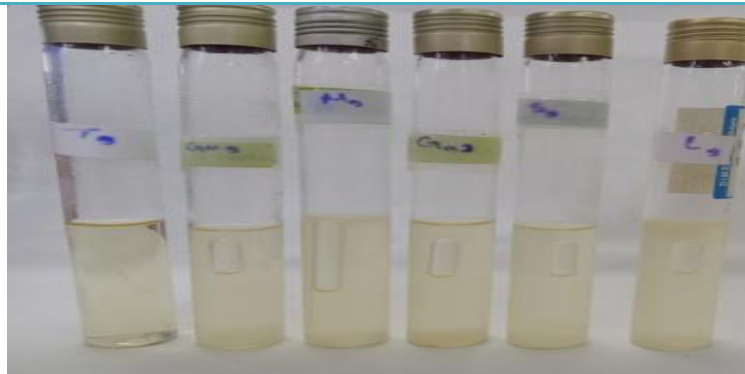
S7



S8

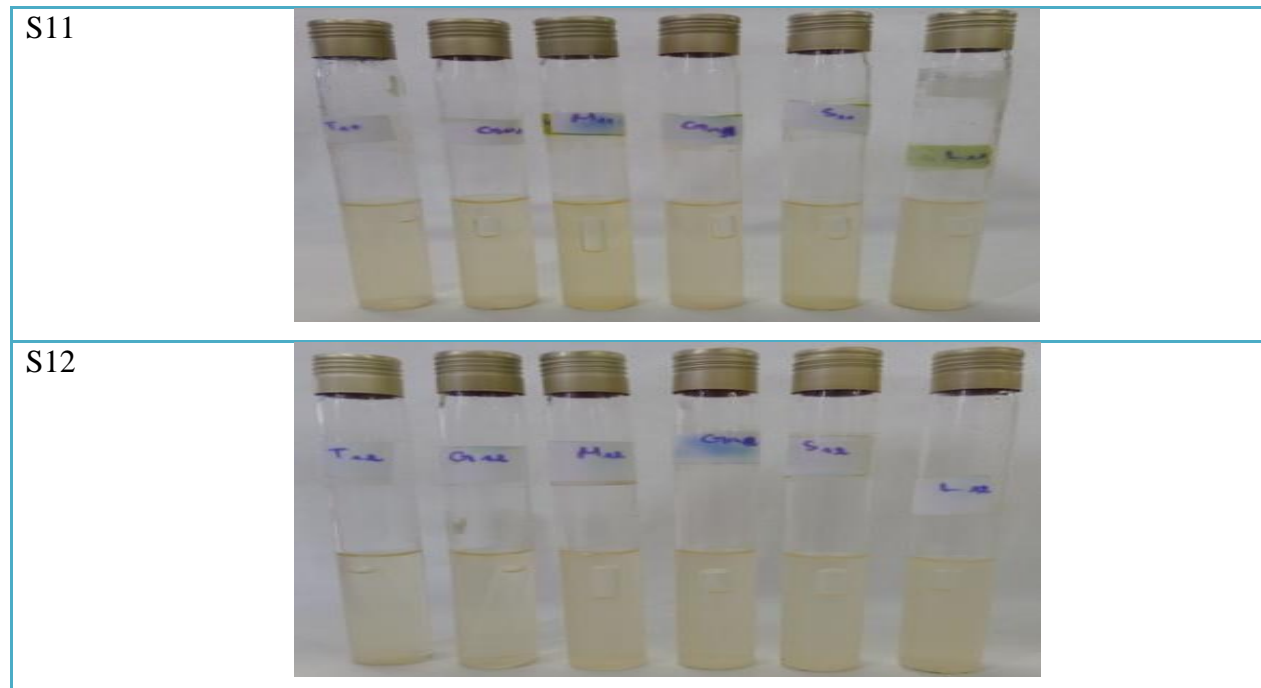


S9



S10





**Photographie 07 : Résultats** du test de fermentation des sucres.

Dans cette étude nous avons mis en évidence la capacité lipolytique et estéroytique chez 12 souches de levures. La caractérisation morphologique et biochimique des souches actives suggère leur variation taxonomique. Les caractères morphologiques et biochimiques peuvent être utiles pour l'identification préliminaire des souches de levures, mais ils ne sont généralement pas suffisants pour une identification précise. La classification et l'identification des levures nécessitent souvent une combinaison de différentes approches, y compris des caractères morphologiques, biochimiques, moléculaires et physiologiques. Pour une identification précise des souches de levures, il est généralement nécessaire de recourir à des méthodes complémentaires, telles que l'analyse de l'ADN (séquençage de gènes spécifiques, PCR, séquençage de l'ARNr, etc.).

Plusieurs souches levuriennes isolées de produits ou sous-produits d'oliviers ont été identifiées comme capables de dégrader les lipides (Salgado *et al.*, 2019). ont révélé que la souche JT5 de *Magnusiomyces capitatus* isolée des eaux usées des moulins à huile présentait 3,96 U/mL d'activité lipase après avoir été cultivée dans le milieu de production contenant de l'huile d'olive comme source de carbone. *Yarrowia lipolytic* était bien connue comme la levure productrice de lipase (Corzo et Revah ,1999). avaient étudié et trouvé que la souche 681 de *Y. lipolytica* produisait respectivement 31,9 et 30,9 U/mL dans le milieu de production

additionné d'huile de maïs et d'huile d'olive. De plus (Domínguez *et al.*,2003). ont rapporté que le niveau élevé d'activité lipolytique de la souche CECT 1240 de *Y. lipolytica* a été obtenu avec la culture liquide contenant de l'huile de tournesol (58 U/mL), de l'huile d'olive (49 U/mL) et de la tributyrine (33 U/mL).

Actuellement, *Candida tropicalis*, *Diutina rugosa*, *Moesziomyces antarcticus*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilosis*, *Cutaneo trichosporoncurvatum*, *Yarrowia deformans*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimanae*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia bispora*, *Pichia xylosa*, *Pichia mexicana*, *Pichia silvicola*, *Pichia burtonii*, *Saccharomyces cerevisiae* se sont révélés être les principales levures terrestres productrices de lipase (Vakhlu et Kour,2006 ; Ciafaidini *et al.*,2006 ; Treichel *et al.*, 2010).

# Conclusion

*Conclusion*

Les microorganismes sont une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Les levures, par exemple, se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes comme la lipase.

Cette étude a permis d'isoler et de caractériser **82** souches levuriennes à partir de grignons d'olive provenant de différentes régions du Nord-Est de l'Algérie. Les résultats ont révélé des variations significatives dans la distribution des souches de levures en fonction des régions géographiques, indiquant que l'environnement géographique, les conditions climatiques et géologiques du sol peuvent influencer la diversité des levures présentes dans les grignons d'olive.

Parmi les 20 souches sélectionnées pour une caractérisation plus approfondie, des variétés culturelles remarquables ont été observées, telles que des différences dans l'opacité, la surface, la forme, la taille et la couleur des souches. Ces caractéristiques morphologiques indiquent une certaine variabilité au sein des souches isolées.

Les tests d'activités lipolytiques et estérolytiques ont révélé que la majorité des souches isolées présentent au moins une activité enzymatique, suggérant leur capacité à dégrader les lipides et les esters présents dans les grignons d'olive. Cela souligne le potentiel de ces souches levuriennes dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes spécifiques.

Les observations microscopiques ont révélé des variations dans la mobilité, le regroupement et les formes des souches levuriennes. Certaines souches ont montré une capacité à former des filaments, tandis que d'autres non. Ces différences peuvent être influencées par des facteurs tels que la souche spécifique de levure, les conditions de croissance et les signaux environnementaux.

Les tests biochimiques ont permis de caractériser davantage les souches de levures isolées. Les résultats du test d'indole ont montré que certaines souches sont capables de produire de l'indole à partir du tryptophane, tandis que d'autres ne le sont pas. Le test Triple Sugar Iron (TSI) a révélé différentes capacités de dégradation des sucres, de production de gaz et de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) par les souches. Le test de réduction des nitrates a également fourni des informations sur les capacités de réduction des nitrates par les souches étudiées.

Ces résultats mettent en évidence la diversité et les caractéristiques des souches levuriennes isolées à partir des grignons d'olive, ainsi que leur potentiel enzymatique et leurs caractéristiques biochimiques. Ces informations sont essentielles pour une meilleure compréhension des levures présentes dans les grignons d'olive et ouvrent des perspectives pour leur utilisation dans divers domaines industriels et biotechnologiques. Des études supplémentaires, notamment des analyses génétiques et des tests fonctionnels, pourraient permettre une caractérisation plus approfondie de ces souches levuriennes et de leurs applications potentielles.

# Résumé

*Résumé*

**Résumé**

Cette étude a examiné la diversité des souches levuriennes isolées à partir de grignons d'olive en Algérie. Les résultats ont montré que la distribution des souches de levures varie en fonction des régions géographiques, indiquant l'influence des conditions environnementales sur la diversité levurienne. Parmi les souches sélectionnées, des variations morphologiques et des activités enzymatiques ont été observées, révélant un potentiel dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes. Les tests d'activités lipolytiques et estérolytiques ont révélé que certaines souches isolées présentent au moins une activité enzymatique, suggérant leur capacité à dégrader les lipides et les esters présents dans les grignons d'olive. Cela souligne le potentiel de ces souches levuriennes dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes spécifiques. Les caractéristiques biochimiques et les tests de dégradation des sucres ont permis de caractériser davantage les souches isolées. Cette étude met en évidence la diversité et le potentiel des souches levuriennes dans les grignons d'olive, ouvrant des perspectives pour leur utilisation dans diverses applications industrielles et biotechnologiques. Des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir la caractérisation et les applications de ces souches levuriennes.

**Mots clés :** Levures, Grignons d'olive, Enzyme Lipase, Enzyme Estérase.

**Abstract**

This study examined the diversity of yeast strains isolated from olive pomace in Algeria. The results showed that the distribution of yeast strains varied according to geographical region, indicating the influence of environmental conditions on yeast diversity. Among the selected strains, morphological variations and enzymatic activities were observed, revealing potential in fields such as the food industry and enzyme production. Lipolytic and esterolytic activity tests revealed that some isolated strains display at least one enzyme activity, suggesting their ability to degrade lipids and esters present in olive pomace. This underlines the potential of these yeast strains in fields such as the food industry and the production of specific enzymes. Biochemical characteristics and sugar degradation tests were used to further characterize the isolated strains. This study highlights the diversity and potential of yeast strains in olive pomace, opening up prospects for their use in various industrial and biotechnological applications. Further studies are needed to further characterize these yeast strains and their applications.

**Key words:** Yeasts ,Olive Pomace, Lipase Enzyme , Esterase Enzyme .

## ملخص

فحصت هذه الدراسة تنوع سلالات الخميرة المعزولة من ثقل الزيتون في الجزائر. وأظهرت النتائج أن توزيع سلالات الخميرة يختلف باختلاف المناطق الجغرافية ، مما يشير إلى تأثير الظروف البيئية على تنوع الخميرة. من بين السلالات المختارة ، لوحظت اختلافات مورفولوجية وأنشطة إنزيمية ، مما يكشف عن إمكانات في مجالات مثل صناعة الأغذية وإنتاج الإنزيم. كشفت اختبارات نشاط تحلل الدهون والإسترات أن بعض السلالات المعزولة تظهر نشاطا إنزيميا واحدا على الأقل ، مما يشير إلى قدرتها على تحلل الدهون والإسترات الموجودة في ثقل الزيتون. هذا يسלט الضوء على إمكانات سلالات الخميرة هذه في مجالات مثل صناعة الأغذية وإنتاج إنزيمات معينة. جعلت الخصائص البيوكيميائية واختبارات تحلل السكر من الممكن زيادة توصيف السلالات المعزولة. تسلط هذه الدراسة الضوء على تنوع وإمكانات سلالات الخميرة في ثقل الزيتون ، مما يفتح آفاقا لاستخدامها في مختلف التطبيقات الصناعية والتكنولوجيا الحيوية. دراسات إضافية ضرورية لتعميق توصيف وتطبيقات هذه السلالات الخميرة .

**الكلمات المفتاحية:** الخمائر ، ثقل الزيتون ، إنزيم الليباز ، إنزيم الإستراز.

# Références

*BIBLIOTHÈQUE*

- **Ali S , Khan S.A , Hamayun M , Lee I .(2023).** The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases : A Review .Microorganisms . 11:510.
- **Amillastre E. (2012).** Amélioration de la robustesse de souches de levures aux stress technologiques par une stratégie de génie microbiologique. Application à la production industrielle de bio éthanol à partir de matières premières agricoles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. Ingénieries Enzymatique et Microbienne:294.
- **Bach S , Colas P, Blondel M .(2020).**La levure modèle et outil... aussi pour la recherche thérapeutique. Médecine sciences.36(5):504-514.
- **Bataiche I. (2014).** Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat.Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine1.
- **Berber N.(2017).** Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de « *Saccharomyces cerevisiae* » issues des cépages Algériens.Thèse doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem .
- **Berry D . R. et Brown C .(1987).** Part III : Growth of yeast. Chapitre06 : Physiology of yeast growth. In Berry D.R , Russell I , Stewart G.G. Yeast biotechnology.Springer. Edition (01). London.p :157-199.
- **Boidin J, Fiol J-B, Poncet S.(2023).** LEVURES , Encyclopædia Universalis .source <https://www.universalis.fr/encyclopedie/levures/>.
- **Bouix M et Leveau J.Y. (1991).** Les levures *Ds*. InBourgeois C.M , Leveau Y.J. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition (21). Lavoisier-Tec et Doc. P : 206-229.
- **Bourgeois C. M et Larpent J.P.(1996).** Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Edition (02) .Lavoisier TEC et DOC Paris. p:36-50.
- **Canaan S , Roussel A, Verger R, Cambillau C. (1999).** Gastric lipase: crystal structure and activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. Elsevier .1441(2-3) :197–204.
- **Castan C. (2016).** La levure de bière: un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté. Thèse de doctorat. Université De Montpellier.
- **Chandra P , Enespa, Singh R, Arora P.K. (2020).** Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microb Cell Fact. 19:169.

- **Ciafaidini G, Zullo AB, Cioccia G, Iride A. (2006).** Lipolytic activity of *Willopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int J Food Microbiol.* 107(1):27–32.
- **Contesini F.J, Davanço M.G , Borin G.P, Vanegas K.G , Cirino J.P.G, Melo R.R , Mortensen U.H , Hildén K , Campos D.R , Carvalho P.O.(2020).** Advances in Recombinant Lipases : Production , Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts.*10.
- **Corzo G et Revah S. (1999).**Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *BioresourceTechnol.* 70(2):173–180.
- **Cygler M et Schrag J. D.(1999).** Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta.* Elsevier. 1441 : 205-214.
- **Dakhmouche-Djekrif S .(2016).** Production et caractérisation de l’amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides.Thèse doctorat . Université des Frères Mentouri Constantine , Algérie. Université de Technologie Compiègne, France . Biochimie et Microbiologie Appliquées .
- **Deak T. (2006).** Environmental Factors. Influencing yeasts. In Rosa C, Peter G. yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts. Edition(01). Springer Verlag Berlin Heidelberg. p: 155-174.
- **Defosse T.A , Le Govic Y , Courdavault V , Clastre M, Vandeputte P, Chabasse D, Bouchara J.-p, Giglioli-Guivarc’h N, Papon N. (2018).**Les levures du clade CTG(clade *Candida*) :biologie, incidence en santé humaine et applications en biotechnologie . *Journal de Mycologie Médicale.* 28(2) :257-268.
- **Domínguez A, Deive F.J, Sanromán M.A, Longo M.A. (2003).**Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J Chem Technol Biotechnol.* 78(11):1166–1170.
- **Fickers P , Destain J, Thonart P. (2008 ).**Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*12 :119-130.
- **Filho D. G, Silva A. G , Guidini C. Z. (2019).** Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.*Springer.p :1-25.
- **Finkel J. S et Mitchell, A. P. (2011).** Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology.* 9(2): 109-118.

- **Galan X, Peinado-Onsurbe J, Robert M. Q , Soley M, Llobera M , Ramírez I. (2002).** Acute regulation of hepatic lipase secretion by rat hepatocytes. *Biochemistry and Cell Biology*. 80(4) : 467–474.
- **Gargouri M, Ben Akacha N, Kotti F, Ben Rejeb I.(2008).** Voie de la lipoxgénase : valorisation d’huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. 12(2) :185-202.
- **Gilham .D et Lehner R .(2005).** Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 36 : 139–147.
- **Godoy C. A , Pardo-Tamayo J. S, Barbosa O.(2022).** Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks. *Int. J. Mol. Sci*, 23.
- **Gournier-Château N , Larpent J.P, CastellanosM.I. (1994).**Les probiotiques en alimentation animale et humaine . Lavoisier Tec & Doc .Paris.
- **Guilliermond A. (2003).** Yeasts: Culture, Identification, and Microbiology. Wexford College Press. États-Unis. p : 3-35.
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition(01). Dunod, Paris, p:256.
- **Gupta R , Kumari A, Syal P , Singh Y. (2015).** Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, 57 : 40–54.
- **Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami V.K., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38(11) : 1599-1616.
- **Gupta R . Gupta N , Rathi P.(2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64: 763–781.
- **Hasan F , Shah A.A , Hameed A .(2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* . 39 :235–251.
- **Hencké S. (2000).**Utilisation alimentaire des levures. Thèse Doctorat. Université Henri Poincar - Nancy I. Sciences pharmaceutiques.
- **Houde A, Kadmi A, Leblanc D .(2003).**Lipases and Their Indutrail Applications .*Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press Inc.118:155-170.  
<http://www.h2020.net/fr/library/publications/finish/161/1134.html>.
- **Ilesanmi O. I , Adekunle A. E , Omolaiye J. A, Olorode E. M , Ogunkanmi A. L. (2020).** Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*. Elsevier. 8 :1-10.

- **Jaeger K , Ransac S , Bauke W. D , Colson C , Heuvel M.V, Misset O.(1994).** Bacterial lipases. *Microbiology Reviews*.15 : 29-63.
- **Jaeger K-E et Eggert T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4): 390–397.
- **Johnson E. A et Echavarri C, Erasum. (2011).** Part II, Chapitre 3 : Yeast biotechnology. In Kurtzman C. P, Fzll J. W and Boekhout T. (eds). *The yeast. A taxonomic study*. Edition (05). Elsevier. London. 1: 21 -45.
- **Jones F.T. (1926).** The Nitrate Reduction Test for the Differentiation of Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*. 39( 3): 302-311.
- **Kanimozhi S et Perinbam K. (2010).** Optimization of Media Components and Growth Conditions to Enhance Lipase Production by *Pseudomonas sp . lp1*. *Biomedical and Pharmacology Journal*. . 3(2) : 329-338.
- **Kappeli O. (1986).** Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol*. 28 : 181-209.
- **Kara Ali M. (2014).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats. Thèse de doctorat. Université Constantine 1. *Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques*. p:129.
- **Kligler I.J .(1917).** The Lactose Fermentation of Certain Members of the Colon Aerogenes Group, and Its Significance in Bacteriology. *The Journal of Infectious Diseases*. 21( 2): 159-174.
- **Kovacs N .(1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 178( 4535):703-704.
- **Kurtzman C.P et Piškur, J. (2006).**Chapitre 02 :Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In: Sunnerhagen. P, Piskur. J. (eds) *Comparative Genomics. Topics in Current Genetics*, Edution(01). Springer, Berlin, Heidelberg.p :29-46.
- **Kurtzman C.P et Fell J.W. (1998).** Chapitre 01 : Classification of yeast. In *The Yeasts ,A Taxonomic Stady* . Edition (04). Elsevier. Amsterdam. p :1-6.
- **Kurtzman C.P, Fell J.W, Boekhout T, Robert V. (2011).** Chapitre 7 : Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In Kurtzman C P, Fell J W, Teun Boekhout. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Edition(5). Elsevier. p :87-110.
- **Kutty S. N et Philip R. (2008).**Marine yeasts a review *Yeast*. 25(7):465-483.

- **Labrani F. Z. K .(2015).**Activité « Killer chez des levures isolées des sois du Nord Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine. Biotechnologies Microbiennes.
- **Lanteigne Roche L.M. (2010).** Utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pate desencrée de papier journal. Mémoire de recherche Université du Québec à trois-rivières. Science de l'environnement.
- **Larpent J.P. (1991).** Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. p: 426.
- **Larpent J.P et Larpent Gourgaud M. (1997).** Mémento technique de microbiologie. Edition(03). Lavoisier TEC et DOC. Paris. p: 217-240.
- **Leclerc H, Izard D, Husson M.-O, Wattre P, Jakubczak E.(1983).** microbiologie générale. Edition(01). Doin Editeurs. Paris.p:29-32.
- **Leveau J.V et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC et DOC. Paris. p:2-92.
- **Leveau J.Y et Bouix M. (1979) .** Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. Ind. Alim. Agric.11: 1147-1151.
- **Li Q, Han Y, Dy A.B.C, Hagerman R.J. (2020).** Tryptophan metabolism by gut bacteria and its implications for neuro developmental disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 529
- **Loli H, Narwal S .K, Saun N.K, Gupta R. (2015).** Lipases in Medicine: An Overview. *Mini Rev Med Chem*.15(14):1209-1216.
- **MacConkey A.T. (1905).** Lactose-fermenting bacteria in faeces. *The Lancet*. 166(4274):1664-1665.
- **MacFaddin J.F. (2000).** Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins.
- **MacFaddin J.F , Menezes G.A , Schneidman M. (1982).** Voges-Proskauer and Citrate Utilization Tests Combined With Different Carbon Sources for Differentiation of Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 16: 107-109.
- **Mattanovich D, Sauer M, Gasser B. (2014).** Yeast biotechnology : teaching the old dog new tricks. *Microbial cell factories*. 13 :34.
- **Mehta A, Bodh U, Gupta R. (2017).** Fungal lipases: A review. *Journal of Biotech Research* .8(1):58-77.

- **Michael J. L.(2016).** Microbiology Laboratory Theory and Application, Brief .Edition(04). Morton Publishing Company.
- **Miled N , Bussetta C, De caro A, Rivière M , Berti L ,Canaan S. (2003).** Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.Elsevier .136(1) :131–138.
- **Nekhilane A.A.M. (2011).** Medical Mycology. Edition(01). Dardejlah.Ouman.p:26-27.
- **Nevoigt E, Stahl U. (1997).** Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 21 : 231-241.
- **Ochoa Estopier A .(2012).** Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel : application aux bascules du métabolisme lipidique chez *Yarrowia lipolytica*. Thèse Doctorat. Université de Toulouse. Systèmes Microbiens et Bioprocédés.
- **Perraud-Gaime I, Labrousse Y, Roussos S .(2009).**Conservation des résidus de l'agro-industrie oléicole pearsilage : de l'isolement de bactéries lactiques endogènes à l'étude de faisabilité.In Karray B, Khecharem J, Roussos S .(eds). Séminaire de proceedings Olivebioteq: Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif en Méditerranée. 15-19 /09/2009 . Sfax : Institut de l'Olivier. p :308-312.
- **Péter G, Takashima M , Čadež N. (2017).** Chapitre 02 : Yeast Habitats: Different but Global. In Buzzini P, Lachance M.A, Yurkov A. Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Edition (01). Springer.Switzerland.p : 39-72.
- **Plou F.J. (1998).** Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnology Techniques. 12(3): 183-186.
- **Pol D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Edition marketing. 158: 21-56.
- **Ramnath L, Sithole B, Govinden R. (2017).** Identification of Lipolytic Enzymes Isolated from Bacteria Indigenous to Eucalyptus Wood Species for Application in the Pulping Industry. Eelsevier. 15:114-124.
- **Recommendations of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. (1992).**Enzyme list. Inenzyme nomenclature. Academic Press. P:23-533.

- **Ribeiro B. D, Castro A. M. de , Coelho M. A. Z, Freire D. M. G. (2011).** Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research*. p :1–16.
- **Ribéreau-GayonP, DubourdieuD, DonècheB, LonvaudA. (2012).** *Traité d'œnologie: Microbiologie du vin, vinifications*. Edition (06). Paris .1 .
- **Rigo E, Ninow J.L , Luccio M, Oliveira J.V , Polloni A.E , Remonato D , Arbter F , Vardanega R, Oliveira D, Treichel H. ( 2010).** Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT-Food Science and Technologie*. 43 (7):1132-1137.
- **Rizoun L. (2012).** Situation environnementale de l'industrie oléicole en Algérie. Conférence à Athènes. Source :
- **Salgado V, Fonseca C, da Silva TL, Roseiro JC, Eusébio A. (2019).** Isolation and identification of *Magnusiomycescapitatus* as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater. *Waste Biomass Valor*.
- **Salihu A , Alam M. Z , AbdulKarim M. I , Salleh H. M. (2012).** Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*. Elsevier. 58 : 36–44.
- **Sicard D et Legras J.L. (2011).** Bread beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*.334(3):229-236.
- **Simmons H.A . (1962).** Citrate utilization by bacteria of the colon-aerogenes family. *Journal of Bacteriology*.12 ( 2): 161-176.
- **Spencer J.F.T et Spencer D.M. (1997).** Chapitre02 : Taxonomy: The Names of the Yeasts. In *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Edition (01).Springer .Berlin. p :11-32.
- **Stergiou P.Y , Foukis A , Filippou M , Koukouritaki M , Parapouli M, Theodorou L.G , Hatziloukas E , Afendra A , Pandey A , Papamichael E.M.(2013).** Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv*.14.
- **Sudbery P. E. (2011).** Growth of *Candida albicans hyphae*. *Nature Reviews Microbiology*. 9(10): 737-748.
- **Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Kuntiya A. (2017).** Utilization of yeast species for industrial production of enzymes. In *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer .p :339-359.

- **Treichel H, de Oliveira D, Mazutti M.A, Luccio M.D, Oliveira J.V.(2010).** A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 3(2):182–196.
- **Tsagariki E , Lazarides H.N , Petrotos K.B. (2007).** Chapitre 8 :Olive mill waste water treatment.In Oreopoulou V and Russ W. (eds) . *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry.* Springer. Boston. 3: 133- 157.
- **Vakhlu J et Kour A. (2006).**Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Eur J Biotechnol.* 9:69–81.
- **Van Dijken J. P et Scheffers W. A. (1986).** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 32 :199-224.
- **Van Gulik W et Heijnen J. J. (1995).** A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* 48 : 681-698.
- **Verduyn C, Stouthamer A.H, Scheffers W.A, van Dijken J.P. (1991).** A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 59 : 49-63.
- **Voges O et Proskauer B. (1898).**Die Beziehungen der Harnsäurezur Nucleinsäure undzuden Purinkörpern. *Zeitschriftfür Physiologische Chemie.* 26(6): 441-476.
- **Walker G. M. (2009).** Yeast. In M. Schaechter. *Desk Encyclopedia of microbiology.* Edition(02). Elsevier/Academic Press London. p:1174-1187.
- **Walker G.M . (2000).** Rôle des ions métalliques dans les performances de fermentation de la levure de bière . In Smart K A (Ed.), *Performances de fermentation de la levure de brassage .Edition (01).*p : 86-91.
- **Winkler F.K , D'arcy A, Hunziker W. (1990).** Structure of human pancreatic lipase. *Letters of nature .*343 :771-774.
- **Żymańczyk-Duda E , Brzezińska-Rodak M, Klimek-Ochab M , Duda M , Zerka A. (2017).** Chapitre 1 :Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. In Morata A and Loira I .(eds). *Yeast - Industrial Applications.* INTECH. Croatia. p :3-40.

# Annexe

*Annexe*

## Compositions des milieux de cultures :

- **YEME** ( extrait de levure extrait de malt) :

- Dextrose 10 g.
  - Extrait de levure 3g.
  - Peptone 5g.
  - Extrait de malt 3g.
  - Agar 20g.
  - 1000 ml d'eau distillée.
  - PH : 6,2(±0,2).
- Stérilisation à 120° C pendant 20 min.

- **Eau physiologie :**

- 9 g de NaCl.
  - 1000 ml d'eau distillée .
- Stérilisation à 120° c pendant 20 min.

- **Solution NaOH :**

1. Pour préparation de solution NaOH 1N :

- NaOH 8g.
- Eau distillée 200ml.

2. Pour préparation de solution NaOH 3N :

- NaOH 24g.
- Eau distillée 200ml.

→ Stérilisation à 120° C pendant 20 min.

- **Milieu d'étude de l'activité lipolytique et estérolytique : Milieu Minéral minimum (MMM) :**

- $\text{KH}_2\text{PO}_2$  1,5g.
- $\text{NO}_2\text{HPO}_4$  0,6g.
- NaCl 0,5g.
- $\text{NH}_4\text{SO}_4$  2g.
- $\text{MgSO}_4$  0,2g.
- $\text{CaCl}_2$  0,01g.
- $\text{FeSO}_4$  0,001g.
- Eau distillée 1000ml.

- PH : 7
  - Pour préparation de milieu d'étude de l'activité lipolytique en ajoutée au MMM  
10ml de Tween 80 ,
  - Pour préparation de milieu d'étude de l'activité estérolytique en ajoutée au MMM  
10ml de Tween 20.
  - Stérilisation à 120° C pendant 20 min.
  - **Milieu eau de levure :**
    - Extrait de levure 5g .
    - Eau distillée 1000ml.
    - PH : 7
  - Stériliser 20 min à 120°C.
  - **Milieu Mannitol :**
    - Mannitol 33g .
    - Eau distillée 1000ml.
    - PH : 7,8
  - Pour préparation de 200 ml de milieu Mannitol :200 ml de eau distillée avec 6,6g de Mannitol .
  - Stériliser 20 min à 120°C .
  - **Milieu Eau Peptonée Exempte d'indole :**
    - Eau Peptonée Exempte d'indole 15 g.
    - Eau distillée 1000ml.
  - Pour préparation de 200 ml de milieu Eau Peptonée Exempte d'indole :200ml de eau distillée avec 3g d' Eau Peptonée Exempte d'indole .
  - Stériliser 20 min à 120°C.
  - **Milieu Triple Sugar Iron( TSI) :**
    - TSI 68,6g .
    - Eau distillée 1000ml.
    - PH :
  - Pour préparation de 200 ml de milieu TSI: 200 ml de eau distillée avec 13,72g de TSI .
  - Stériliser 20 min à 120°C .

Présenté par :  
**Méchantel Khadidja.**  
**Sahraoui Amina.**  
**Thabet Nadjet.**

Date de Soutenance : **06/06/2020**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliquée.

Intitulé : **Isolement et caractérisation de souches levuriennes à partir d'échantillons de grignons d'olive et criblage de leur activité lipolytique.**

Résumé :

Cette étude a examiné la diversité des souches levuriennes isolées à partir de grignons d'olive en Algérie. Les résultats ont montré que la distribution des souches de levures varie en fonction des régions géographiques, indiquant l'influence des conditions environnementales sur la diversité levurienne. Parmi les souches sélectionnées, des variations morphologiques et des activités enzymatiques ont été observées, révélant un potentiel dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes. Les tests d'activités lipolytiques et estérolytiques ont révélé que certaines souches isolées présentent au moins une activité enzymatique, suggérant leur capacité à dégrader les lipides et les esters présents dans les grignons d'olive. Cela souligne le potentiel de ces souches levuriennes dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes spécifiques. Les caractéristiques biochimiques et les tests de dégradation des sucres ont permis de caractériser davantage les souches isolées. Cette étude met en évidence la diversité et le potentiel des souches levuriennes dans les grignons d'olive, ouvrant des perspectives pour leur utilisation dans diverses applications industrielles et biotechnologiques. Des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir la caractérisation et les applications de ces souches levuriennes.

Mots clés : Levures, Grignons d'olive, Enzyme Lipase , Enzyme Estérase .

Jury :

Examinatrice: **Mme. Khenouchi Nour Chams**

M.C.B. à l'université OEB .

Encadrante : **Mme. Benslama ouided .**

M.C.A. à l'université OEB .

Présidente : **Mme. Meradi Laaem.**

Pr. à l'université OEB .

Année universitaire : **2022/2023**