

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie  
Département de Microbiologie

N° d'ordre :  
N° de série :

## ***Thèse***

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle  
En Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et  
Biotechnologies, Applications Mycologiques

Par :BATAICHE Insaf

## ***Thème***

**Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques**

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. DEHIMAT L.  
Directeur de thèse : Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Prof. Univ. Constantine 1.  
Prof. Univ. Constantine 1.

Examineurs: Mr. HARZELLAH D.  
Mr. LAAROUS L.  
Mme. MIHOUBI I.  
Mr. KITOUNI M.

Prof. Univ. Sétif 1.  
Prof. Univ. Sétif 1.  
Prof. Univ. Constantine 1.  
M. C. A. Univ. Constantine 1.

**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2013-2014**

## Dédicaces

*Je dédie cette thèse à celle qui m'a donné la vie; qui s'est sacrifiée pour ma réussite  
et mon bonheur, à ma mère*

*Puisse Dieu de m'aider à la rendre plus fière de moi; merci maman Farida*

*A Mon père Nouredidine symbole de tendresse, qui a veillé tout au long de ma vie  
à m'encourager; m'aider et me protéger*

*Je t'aime papa*

*Merci ma grand-mère Fella (Zineb) de m'avoir comblé de tant de tendresse,  
d'amour et de générosité; que dieu te prête longue vie*

*A Mon adorable sœur Bouchra à qui je souhaite tout le bonheur du monde*

*A Mes frères Abderraouf et Abdeljalil à qui je souhaite beaucoup de succès*

*A Toute la famille Bataiche ainsi que la famille Boufenara pour lesquelles  
j'éprouve beaucoup d'affection et de respect*

*A Tous ceux que j'aime*



# Remerciements

En préambule, je remercie mon Dieu ALLAH qui m'a aidé et m'a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Mes remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, Monsieur **Kacem Chaouche Noreddine**, Professeur à l'Université Constantine 1. Sa grande compétence et ses précieux conseils ont permis l'accomplissement de ce travail. Sa confiance en mes capacités a contribué à me faire aimer ces cinq ans de recherche. Je le remercie chaleureusement pour son contact si généreux sur le plan humain comme scientifique. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Mr. **Dehimet L.**, doyen de la faculté des sciences naturelles, pour sa disponibilité, son dévouement, sa bonne humeur, ses conseils, et pour m'avoir ouvert les portes de la faculté tous les jours.

Je tiens à remercier également tous les membres du jury,

- Mme. **Mihoubi I.**, Professeur à l'Université 1
- Mr. **Kitouni M.**, Maître de conférences à l'Université 1
- Mr. **Larouss L.**, Professeur à l'Université de Sétif
- Mr. **Harzallah D.**, Professeur à l'université de Sétif

pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de siéger à ma soutenance de thèse. Je les remercie de plus de leurs remarques positives et constructives.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Université Constantine 1, dans le Laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBaM). Je tiens à remercier l'ensemble des membres du personnel de l'établissement pour m'avoir offert un cadre et une atmosphère de travail agréable.

Je remercie particulièrement l'enseignante Mme **Bahri Fathya** pour son aide, son attention et sa gentillesse durant la période de correction de la thèse.

Je tiens enfin, à exprimer ma profonde gratitude pour tous les enseignants du département de Biologie de l'Université Constantine 1 qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.

Merci également à mes camarades, Monira, Kaki, Mounia, Sara, Milet, Hiba et Imene, pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Pour terminer, merci à ma famille, qui s'est intéressée à mes études et à mes travaux de thèse. Merci également à mes parents, qui m'ont toujours soutenu tout au long de ma scolarité. Sans eux, je n'aurais probablement pas pu arriver à ce niveau d'étude.

## Liste des abréviations

AGL : Acide gras libérés

B: Bourgeonnements

Bt: Blastospores

CFU : Colony forming unit « unité formant colonie »

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

FFA : free fatty acids

G : grignon d'olive

GOC : grignon d'olive Chemlal

hm<sup>3</sup> : hectomètre cube

L : lait cru

Lb : Leben

LF : lait fermenté-Raïb

MEH : Matière Extractible à l'Hexane

MFGM : Milk Fat Globule Membrane

ml : millilitre

MPM : marqueur du poids moléculaire

Nu : nucléophile

pb: paire de base

PDA : Potato Dextrose Agar

Ps: pseudohyphes

rpm : round per minute

SH : Substrats Hydrophobes

SmF : Fermentation submergée ou Submerged Fermentation

SPPVL : Souches Potentiellement Productrices de Vraie Lipase

SSF : fermentation solide ou Solid State Fermentation

T<sub>d1</sub> : premier tétraédrique intermédiaire

T<sub>d</sub>2 : deuxième tétraédrique intermédiaire

TG : Triglycérides

TTA : Acidité Titrable Totale

YCB : Yeast Carbon Base

YNB : Yeast Nitogene Base

YPD : Yeast Peptone Dextrose

YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 Première étape d'hydrolyse des triglycérides par la lipase de type B de <i>Candida antarctica</i> .....                                                 | 11 |
| Figure 2 Schéma explicatif de la structure $\alpha$ / $\beta$ -hydrolase .....                                                                                   | 12 |
| Figure 3 Mécanisme de catalyse des lipases .....                                                                                                                 | 13 |
| Figure 4 Voies métaboliques principales de dégradation des substrats hydrophobes.....                                                                            | 17 |
| Figure 5 Globules gras du lait.....                                                                                                                              | 20 |
| Figure 6 Coupe schématique d'une olive.....                                                                                                                      | 26 |
| Figure 7 Grignon d'olive brut, variété de <i>Chemlal</i> .....                                                                                                   | 33 |
| Figure 8 Evaluation de la production de vraie lipase des isolats levuriens.....                                                                                  | 52 |
| Figure 9 Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des deux souches levuriennes.....                                                                     | 60 |
| Figure 10 Evolution de la croissance cellulaire et de la production de lipase, au cours de la fermentation, de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                  | 61 |
| Figure 11 Cinétique de croissance et de la production de lipase au cours de la fermentation, de <i>Candida boidinii</i> .....                                    | 62 |
| Figure 12 Effet de tween 80 sur la production de la lipase et de la biomasse de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                                                 | 63 |
| Figure 13 Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la production de la lipase et la biomasse de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                         | 64 |
| Figure 14 Effet de tween 80 sur la production de lipase et de biomasse de <i>Candida boidinii</i> .....                                                          | 65 |
| Figure 15 Effet de la concentration de l'huile d'olive (avec tween80) sur la production de biomasse et lipase de <i>Candida boidinii</i> .....                   | 66 |
| Figure 16 Valeurs du pH du milieu de culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> , en fin de la culture.....                                                           | 67 |
| Figure 17 Valeurs du pH du milieu de culture de <i>Candida boidinii</i> , en fin de la culture.....                                                              | 67 |
| Figure 18 Effet de différentes valeurs de pH sur la lipase de la souche <i>Y. lipolytica</i> ...                                                                 | 68 |
| Figure 19 Effet de différentes valeurs de pH sur la lipase de la souche <i>C. boidinii</i> ...                                                                   | 69 |
| Figure 20 Effet de la température sur la lipase de la souche <i>Y. lipolytica</i> .....                                                                          | 70 |
| Figure 21 Effet de la température sur la lipase de la souche <i>C. boidinii</i> .....                                                                            | 70 |
| Figure 22 Evaluation de la viabilité cellulaire et la production de lipase, durant SSF, de la levure <i>Y. lipolytica</i> .....                                  | 72 |
| Figure 23 Evaluation de la viabilité cellulaire et de la production de lipase, durant SSF, de la souche <i>C. boidinii</i> .....                                 | 73 |
| Figure 24 Valeurs du pH du milieu de culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> et <i>Candida boidinii</i> .....                                                      | 74 |
| Figure 25 Suivi de la culture de la souche <i>Y. lipolytica</i> , en fermenteur de 20l.....                                                                      | 75 |
| Figure 26 Profile du développement cellulaire, MEH et acidité du milieu, durant la culture de <i>Y. lipolytica</i> dans un milieu minimal à l'huile d'olive..... | 76 |
| Figure 27 Interaction entre la levure <i>Y. lipolytica</i> et l'huile d'olive.....                                                                               | 76 |
| Figure 28 Profil d'acides gras majeurs trouvés dans le milieu minimal à l'huile d'olive, détectés par CPG.....                                                   | 77 |

## Liste des tableaux

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 Micro-organismes potentiellement producteurs de lipases.....                                             | 14 |
| Tableau 2 Composition lipidique moyenne du lait de vache.....                                                      | 19 |
| Tableau 3 Composition chimique indicative de différents types de grignons d'olives..                               | 26 |
| Tableau 4 Isolement et purification des levures à partir des différents échantillons naturels.....                 | 49 |
| Tableau 5 Activité lipolytique des isolats levuriens obtenus à partir de produits laitiers de vache.....           | 50 |
| Tableau 6 Activité lipolytique des isolats levuriens obtenus à partir de grignon d'olive <i>Chemlal</i> (GOC)..... | 51 |
| Tableau 7 Caractères morphologiques, culturels et cellulaires, de la souche L2.....                                | 53 |
| Tableau 8 Caractères morphologiques, culturels et cellulaires, de la souche G5.....                                | 55 |
| Tableau 9 Tests biochimiques et physiologiques de SPPVL.....                                                       | 58 |

# Table des matières

---

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1-Introduction.....                                                            | 1  |
| 2-Revue bibliographique.....                                                   | 4  |
| 2.1- Contexte général de l'étude.....                                          | 4  |
| 2.1.1- Déchets en Algérie : État actuel.....                                   | 4  |
| 2.1.2- Pollution du secteur oléicole.....                                      | 4  |
| 2.1.3- Manque à gagner.....                                                    | 5  |
| 2.1.4- Valorisation des déchets oléicoles.....                                 | 5  |
| 2.2- Les deux souches levurienne lipolytiques modèles.....                     | 6  |
| 2.2.1- <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                                        | 6  |
| 2.2.1.1- Taxonomie.....                                                        | 6  |
| 2.2.1.2- Habitat.....                                                          | 6  |
| 2.2.1.3- Caractéristiques physiologiques.....                                  | 7  |
| 2.2.1.4- Lipases de <i>Y. lipolytica</i> .....                                 | 7  |
| 2.2.1.5- Applications industrielles et environnementales.....                  | 8  |
| 2.2.2- <i>Candida boidinii</i> .....                                           | 8  |
| 2.2.2.1- Taxonomie.....                                                        | 8  |
| 2.2.2.2- Habitat.....                                                          | 8  |
| 2.2.2.3- Caractéristiques physiologiques.....                                  | 9  |
| 2.2.2.4- Applications industrielles.....                                       | 9  |
| 2.3- Les enzymes lipolytiques : lipases.....                                   | 10 |
| 2.3.1- Généralités sur les enzymes.....                                        | 10 |
| 2.3.2- Marché des enzymes.....                                                 | 10 |
| 2.3.3- Les lipases.....                                                        | 10 |
| 2.3.3.1- Définition.....                                                       | 10 |
| 2.3.3.2- Structure biochimique.....                                            | 11 |
| 2.3.3.3- Mécanisme d'action.....                                               | 12 |
| 2.3.3.4- Sources des lipases .....                                             | 13 |
| 2.3.3.5- Hydrolyse des substrats hydrophobes via les souches lipolytiques..... | 15 |
| 2.4- Le lait de vache et ses dérivés.....                                      | 17 |
| 2.4.1- Lait cru.....                                                           | 17 |
| 2.4.1.1- Caractéristiques physico-chimiques.....                               | 18 |
| 2.4.1.2- Matière grasse laitière.....                                          | 18 |
| 2.4.2- Produits laitiers fermentés.....                                        | 20 |
| 2.4.2.1- Lait fermentés.....                                                   | 20 |
| 2.4.3- Caractères microbiologiques du lait.....                                | 22 |
| 2.4.4- Principales activités des microorganismes dans le lait.....             | 22 |
| 2.5- Les sous-produits oléicoles.....                                          | 23 |
| 2.5.1- L'oléiculture en Algérie.....                                           | 23 |
| 2.5.1.1- Superficies plantées.....                                             | 23 |
| 2.5.1.2- Production d'huile d'olive.....                                       | 23 |
| 2.5.1.3- Les variétés de l'olivier à l'huile.....                              | 24 |
| 2.5.2- Trituration.....                                                        | 24 |
| 2.5.3- Les sous-produits oléicoles.....                                        | 25 |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.3.1- Le grignon d'olive.....                                                  | 25 |
| 2.6- Les types de fermentation.....                                               | 28 |
| 2.6.1- Généralités.....                                                           | 28 |
| 2.6.2- Les types de fermentations pratiqués.....                                  | 28 |
| 2.6.2.1- La fermentation solide ou Solid State Fermentation.....                  | 28 |
| 2.6.2.2- La fermentation liquide ou Submerged fermentation.....                   | 30 |
| 3- Matériel et méthodes.....                                                      | 32 |
| 3.1- Isolement et sélection de souches levuriennes productrices de lipase.....    | 32 |
| 3.1.1- Échantillonnage.....                                                       | 32 |
| 3.1.1.1-Les produits laitiers.....                                                | 32 |
| 3.1.1.2-Le grignon d'olive .....                                                  | 32 |
| 3.1.2- Isolement des levures.....                                                 | 33 |
| 3.1.3- Purification des levures.....                                              | 33 |
| 3.1.4- Conservation .....                                                         | 34 |
| 3.1.5- Sélection des souches à activités lipolytiques.....                        | 34 |
| 3.1.5.1- Mise en évidence de l'activité lipolytique.....                          | 34 |
| 3.1.5.2- Recherche de producteurs potentiels de vraie lipase « True Lipase »..... | 34 |
| 3.2- Identification des levures.....                                              | 35 |
| 3.2.1- Etude des caractères phénotypiques.....                                    | 35 |
| 3.2.1.1-Les caractères morphologiques.....                                        | 35 |
| 3.2.1.3- Etude des caractères biochimiques.....                                   | 36 |
| 3.2.1.4- Etude des caractères physiologiques.....                                 | 38 |
| 3.2.2- Etude des caractères génotypiques.....                                     | 38 |
| 3.2.2.1- Extraction d'ADN.....                                                    | 39 |
| 3.2.2.2- Amplification du gène ADNr 18S.....                                      | 39 |
| 3.2.2.3- Visualisation des produits de PCR par électrophorèse.....                | 40 |
| 3.2.2.4- Séquençage des ADN amplifiés.....                                        | 40 |
| 3.3- Production de lipase.....                                                    | 40 |
| 3.3.1- Suivi de la production de lipase.....                                      | 40 |
| 3.3.1.1-Préparation de l'inoculum.....                                            | 40 |
| 3.3.1.2-Conduite de la fermentation.....                                          | 40 |
| 3.3.1.3-Estimation de la biomasse.....                                            | 41 |
| 3.3.1.4-Dosage de l'activité enzymatique.....                                     | 41 |
| 3.3.2- Etude de l'influence du substrat inducteur.....                            | 41 |
| 3.3.2.1-Préparation des milieux de fermentation.....                              | 41 |
| 3.3.2.2-Conduite de la fermentation.....                                          | 42 |
| 3.4- Caractérisation partielle de la lipase.....                                  | 42 |
| 3.4.1- Effet du pH.....                                                           | 42 |
| 3.4.2- Effet de la température.....                                               | 42 |
| 3.5- Recherche de nouvelles potentialités de SPPLV.....                           | 42 |
| 3.5.1- Fermentation à l'état solide de SPPVL.....                                 | 42 |
| 3.5.1.1- Préparation du milieu de fermentation.....                               | 43 |
| 3.5.1.2- Conduite de la fermentation .....                                        | 43 |
| 3.5.1.3- Viabilité cellulaire à partir d'une culture solide.....                  | 43 |
| 3.5.1.4- Extraction de l'enzyme à partir de SSF.....                              | 44 |
| 3.5.1.5- Mesure du pH du SSF.....                                                 | 44 |
| 3.5.2- Fermentation sur un milieu minimal à l'huile d'olive.....                  | 44 |
| 3.5.2.1-Production de biomasse et de lipase de SPPLV.....                         | 44 |
| 3.5.2.2-Culture de SPPVL sur un milieu minimal à l'huile.....                     | 46 |

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4- Résultats.....                                                                                      | 48 |
| 4.1- Isolement des souches levuriennes.....                                                            | 48 |
| 4.2- Mise en évidence de l'activité lipolytique.....                                                   | 49 |
| 4.3- Production de vraie lipase.....                                                                   | 52 |
| 4.4- Identification des levures.....                                                                   | 53 |
| 4.4.1- Etude des caractères morphologiques.....                                                        | 53 |
| 4.4.1.1- Souche L2.....                                                                                | 53 |
| 4.4.1.2- Souche G5.....                                                                                | 55 |
| 4.2- Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....                                          | 57 |
| 4.3- Etude des caractères génotypiques.....                                                            | 60 |
| 4.5- Production de lipase dans un milieu liquide (SmF).....                                            | 61 |
| 4.5.1- Suivi de la production par <i>Y. lipolytica</i> .....                                           | 61 |
| 4.5.2- Etude de l'influence du substrat inducteur.....                                                 | 62 |
| 4.5.2.1- Cas de <i>Yarrowia lipolytica</i> L2.....                                                     | 62 |
| 4.5.2.2- Cas de <i>Candida boidinii</i> G5.....                                                        | 64 |
| 4.5.3- Détermination du pH en fin des cultures : <i>Y. lipolytica</i> L2 et <i>C. boidinii</i> G5..... | 66 |
| 4.6- Caractérisation partielle de lipases.....                                                         | 67 |
| 4.6.1- pH optimum de l'enzyme.....                                                                     | 67 |
| 4.6.2- Température optimale.....                                                                       | 69 |
| 4.7- Recherche de nouvelles potentialités de <i>Yarrowia lipolytica</i> L2.....                        | 70 |
| 4.7.1- Fermentation sur milieu solide (SSF).....                                                       | 71 |
| 4.7.1.1- Cas de <i>Yarrowia lipolytica</i> L2.....                                                     | 72 |
| 4.7.1.2- Cas de <i>Candida boidinii</i> G5.....                                                        | 72 |
| 4.7.1.3- Détermination du pH en fin de cultures.....                                                   | 74 |
| 4.7.2- Fermentation dans un milieu minimal à l'huile d'olive.....                                      | 74 |
| 4.7.2.1- Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> L2 en fermenteur.....                                   | 74 |
| 4.7.2.2- Culture de starter dans un milieu minimal à l'huile.....                                      | 75 |
| 4.7.2.3- Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....                                       | 77 |
| 5-Discussion.....                                                                                      | 78 |
| 6- Conclusion et perspectives.....                                                                     | 87 |
| 7-Références bibliographiques.....                                                                     | 89 |
| Annexe                                                                                                 |    |
| Résumés                                                                                                |    |
| Abstract                                                                                               |    |
| ملخص                                                                                                   |    |

# Introduction

---

# 1-Introduction

Les graisses et les huiles produites à l'échelle mondiale, représentent une masse annuelle de 60 millions de tonnes (**Alloue, 2008**). Par conséquent, les déchets domestiques, industriels et agricoles, engendrés sont en augmentation perpétuelles. Ceci, pousse les gouvernements et les communautés locales à rechercher des solutions technologiques permettant un traitement efficace et moins coûteux.

L'industrie oléicole est une industrie agroalimentaire qui génère les déchets lipophiles, souvent, non recyclés (**Tsagariki et al., 2007**). La culture de l'olivier est très répandue en Algérie, car elle fait partie des pays méditerranéens, dont le climat est un des plus propices et se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont, par ordre d'importance, les plus grands producteurs au monde de cet aliment. Le secteur oléicole joue un rôle très important sur le plan socioéconomique, dont la production est estimée à 55 000 tonnes de l'huile d'olive, durant la campagne oléicole 2008/2009 (**Mendil, 2009**).

L'industrie oléicole Algérienne génère, en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous-produits solides (grignons d'olive, feuilles et bois) et liquides (margines). La mise en décharge de ce type de déchets n'est pas autorisée par la législation Algérienne (**Rizoun, 2013**). Malgré les différentes voies de valorisations existantes, ces déchets oléicoles sont soit brûlés, soit rejetés dans l'environnement, sans traitement préalable réel. Or, ils sont toxiques pour l'environnement et peuvent contaminer les sols, les nappes phréatiques et les cours d'eau. La valorisation des déchets par les microorganismes est une méthode récente au niveau local, mais déjà connue dans les pays développés (**Perraud-Gaime et al., 2009**).

Les déchets oléicoles se constituent essentiellement des matières grasses, des huiles et des lipides. En fait, ces composés sont très énergétiques, insolubles et composés principalement de triglycérides qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. La biodégradation complète de ces matières comporte deux étapes successives, la lipolyse par libération des acides gras à partir des glycérides et ensuite, l'oxydation de ces acides gras. Pour une bonne élimination des composés gras, il est nécessaire de les hydrolyser par des enzymes lipolytiques. L'emploi de ces dernières « lipases » a rendu de nombreux procédés industriels moins nocifs pour l'environnement. Elles ont la capacité d'effectuer une transformation chimique très spécifique des lipides et les rendre de plus en plus utilisables dans différents domaines de bioindustrie (**Treichel et al., 2010**).

Les lipases sont soit d'origine animale, végétale ou microbienne. A cause de leur stabilité et leur efficacité, les lipases d'origine microbienne, y compris, celles issues des levures, représentent la classe d'enzymes la plus largement utilisées dans les applications biotechnologiques (Treichel *et al.*, 2010). Selon Vakhlu et Kour (2006), les principales levures productrice de lipase sont isolées des origines diverses notamment du sol et elles sont dominées par des espèces de *Candida*.

Récemment, une autre souche levurienne, *Candida boidinii*, a été ajoutée à la collection des souches lipolytiques, malgré qu'elle était, avant, connue comme une souche méthylotrophe, non productrice de lipase (Janatova, 1992 ; Ciafardini *et al.*, 2006 ; Arroyo-Lopez *et al.*, 2008 ; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2010 ; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2011).

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se focalise sur la recherche de nouvelles potentialités de la levure lipolytique *Yarrowia lipolytica* pour des applications biotechnologiques diverses. L'originalité de cette étude, repose sur plusieurs points importants ; (i) screening et isolement de la levure *Yarrowia lipolytica* et d'autres levures actives productrice de lipase, à partir de produits laitiers de vache et du grignon d'olive de la variété Algérienne *Chemlal* (GOC). En effet, l'exploration de GOC constitue une nouvelle approche qui n'a pas été exploité auparavant. (ii) la comparaison de potentialité de l'isolat *Y. lipolytica* vis-à-vis d'un autre isolat potentiel sélectionné en l'occurrence, *C. boidinii*, dans différents conditions de culture. (iii) la valorisation d'un déchet oléicole solide (GOC), provenant d'une huilerie locale, en fermentation solide pour les isolats sélectionnés ce qui constitue une nouvelle ébauche pour l'utilisation de ce déchet oléicole par voie microbienne. Durant ce processus, la cinétique de la biomasse et la production de la lipase sont évaluées. D'autre part, un processus de développement des deux isolats sur un milieu à base de l'huile d'olive comme seule source de carbone a été mis au point. Les conditions de scale-up sont vérifiées par l'application de ce processus en fermenteur de 20 litres ce qui a permis de produire de starters de *Y. lipolytica* pour des applications ultérieures.

Pour ce faire, une synthèse des principaux événements scientifiques en relation avec la valorisation des déchets oléicoles, l'hydrolyse de matières grasse par les lipases, ont été développées et le point est mis sur les deux souches lipolytiques modèles (*Y. lipolytica* et *C. boidinii*) (voir revue bibliographique). L'étude expérimentale et la partie résultats sont scindées en trois grandes parties ; la première est consacrée à l'isolement, à la sélection et à l'identification des souches potentielles productrices de lipases, la deuxième

partie, quant à elle, aborde l'étude et la comparaison des productions enzymatiques, des deux souches citées en présence de deux inducteurs (huiles d'olive avec ou sans tween 80). La troisième partie est consacrée aux deux nouvelles applications biologiques de la production de la biomasse, la consommation du substrat et la formation du produit en utilisant les levures sélectionnées dans des milieux solide (GOC) et liquide (milieu minimale à l'huile d'olive). Tous ces résultats ont fait l'objet d'une discussion approfondie qui a le mérite de comparer les résultats aux travaux publiés. La thèse se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

## Revue bibliographique

---

## 2- Revue bibliographique

### 2.1- Contexte général de l'étude

#### 2.1.1- Déchets en Algérie : État actuel

Les entreprises industrielles génèrent souvent des déchets polluants. Ces déchets sont généralement stockés sur les lieux de production sans tenir compte des normes et règles environnementales (**Louai, 2009**). L'Algérie comme tout pays, est marquée par un accroissement des flux de déchets conjugués à une poussée démographique et économique. D'ailleurs, elle stockerait plus de 2 millions de tonnes de déchets dangereux et environ 325.100 tonnes de ces déchets sont produits chaque année. Ceci constitue un risque majeur pour l'environnement et pour la santé publique (**Rebah, 2006**). Les gouvernements et les industries sont constamment à la recherche de solutions technologiques adoptées pour traiter ces déchets. En Algérie, d'après le ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, (**2014**), la loi n° 2001- 19 ; relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, encourage les mesures incitatives octroyées par l'Etat pour le développement des activités de collecte, de tri, de transport, de valorisation et d'élimination des déchets selon des modalités fixées par la réglementation.

#### 2.1.2- Pollution du secteur oléicole

Le secteur oléicole est très important au niveau national, bien par le nombre des huileries (1532), que par sa production industrielle de l'huile d'olive (environ 45mille tonnes/an) (**CNTPP, 2011**). Cette activité oléicole a pour conséquences d'importants problèmes environnementaux. Elle engendre des déchets solides et liquides qui sont peu utilisables ou encore souvent rejetés dans la nature.

Généralement, ce secteur se caractérise par des procédés mettant en jeu, la plupart du temps, la qualité de l'eau ce qui provoque une pollution hydrique. Le volume annuel des eaux usées rejetées, y compris ceux des huileries est estimé à environ 1400 hm<sup>3</sup>/an et passera à plus de deux milliard de m<sup>3</sup>/an à l'horizon 2020 (**Rizoun, 2012**).

L'évaluation et la quantification des déchets solides générés par l'industrie oléicole en Algérie, ont été établies par le réseau des entreprises maghrébines pour l'environnement (**REME**). Selon **REME (2011)**, chaque année, la production des déchets oléicoles solides

atteint plus de 30% des déchets totaux. C'est une situation assez alarmante qui nécessite d'être prise en charge pour des solutions rapides et efficaces.

### **2.1.3- Manque à gagner**

La gestion des déchets est devenue un des enjeux majeurs du génie urbain des décennies à venir. Il ne s'agirait plus désormais, de se débarrasser des déchets, mais plutôt d'essayer d'en dégager une valeur ajoutée et utilitaire, notamment, dans les conditions actuelles de raréfaction des ressources naturelles et de matières premières. La solution optimale pour disposer des déchets serait donc, leur valorisation (REME, 2011).

En Algérie, les pertes annuelles du secteur oléicole, sont importantes. Elles s'estiment pour les déchets liquides à : 650 tonnes de matière organique, 300 tonnes d'azote et près de 600 tonnes d'éléments minéraux (Potassium, Phosphore, Calcium, Magnésium, etc.) ; sans oublier la perte considérable d'eau (en moyenne 15.000 litres par jour au niveau de chaque huilerie). En outre, ces pertes dans les déchets solides atteignent environ 16.000 tonnes de matières organiques et 21.000 tonnes de matières énergétiques (équivalentes à 10.000 tonnes de Gasoil) (Moussouni, 2013).

### **2.1.4- Valorisation des déchets oléicoles**

La valorisation des déchets oléicoles présente un double intérêt. D'une part, elle permet de résoudre un problème environnemental, mais aussi, et surtout de subvenir au besoin économique national. Elle aura donc, pour rôle d'appuyer le pays dans l'élaboration de méthodes de protection de la nature par rapport aux rejets émanant des industries oléicoles en recherchant des solutions adaptées et durables selon une approche globale avec des applications spécifiques à des contextes locaux. Vue la Loi n° 2001-19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, la valorisation et/ou l'élimination des déchets doivent s'effectuer dans des conditions conformes aux normes de l'environnement, et ce notamment, sans mettre en danger la santé des personnes, des animaux et sans constituer des risques pour les ressources en eau, le sol ou l'air, ni pour la faune ni pour la flore. La valorisation des déchets par voie biologique est une solution, par excellence, pour ces conditions, elle semble être une solution intéressante sur le plan économique et environnemental dans notre pays. L'intérêt de cette approche, consiste à utiliser, par exemple, des levures à pouvoir lipolytique isolées à partir des milieux naturels Algériens comme les produits laitiers et le grignon d'olive *Chemlal* (GOC).

## **2.2- Les deux souches levuriennes lipolytiques modèles**

### 2.2.1- *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* est une levure aérobie considérée parmi les levures non conventionnelles. Elle est capable de produire divers métabolites. En outre, elle a une activité de sécrétion intense, ce qui justifie les efforts déployés pour son utilisation dans l'industrie (comme biocatalyseur), en biologie moléculaire et dans les études génétiques. C'est une levure non pathogène, portant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et elle a été approuvée dans plusieurs procédés industriels. Elle est retrouvée naturellement dans les produits riches en lipides comme les fromages, les produits laitiers, les huiles végétales ainsi que dans les eaux d'égouts (Coelho *et al.*, 2010).

#### 2.2.1.1- Taxonomie

*Yarrowia lipolytica* est un ascomycète de la famille des Saccharomycetaceae (sous famille des Saccharomycetoideae). Il fut dans un premier temps, classé comme *Candida lipolytica*, jusqu'à ce que la forme parfaite soit identifiée à la fin des années soixante par Wickerman. Selon les conditions de croissance, les cellules sont capables de former des asques, contenant de 1 à 4 ascospores haploïdes, à l'extrémité des hyphes. Parmi ces ascospores, deux types de cellule, dénommés A et B sont différenciés. La fusion entre deux cellules haploïdes de type opposé, aboutit à la formation d'un zygote diploïde se développant sous forme de mycélium et aboutissant à la formation d'ascospores. Cette découverte d'une reproduction sexuée a conduit à renommer la levure comme *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1970) puis comme *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) et finalement *Yarrowia lipolytica* (Van der Walt et Von Arx, 1980). La reproduction de la souche *Y. lipolytica* peut se réaliser également par la voie asexuée. Dans ce cas, elle consiste en un bourgeonnement bipolaire (Kreger van Rij, 1984). Actuellement, le génome de *Y. lipolytica* est entièrement séquencé (Rywinska *et al.*, 2013).

#### 2.2.1.2- Habitat

Cette souche est régulièrement retrouvée sur des substrats d'origine animale ou végétale (Sinigaglia *et al.*, 1994). Cette levure peut être isolée à partir des produits alimentaires riches en lipides et en protéines, tels que les produits laitiers (fromage, yaourt, kéfir), les saucissons, les viandes, les volailles, les crevettes, comme elle peut être isolée des hydrocarbures et des environnements pollués par le pétrole (Bankar *et al.*, 2009 ; Coelho *et al.*, 2010 ; Rywinska *et al.*, 2012).

### 2.2.1.3- Caractéristiques physiologiques

*Yarrowia lipolytica* est une levure dimorphique qui existe sous forme de cellules bourgeonnantes, d'hyphes ou de pseudo-hyphes selon différents facteurs du milieu de culture. La fréquence de sporulation est lente et la viabilité des spores est faible. C'est une levure aérobie stricte, qui se développe à des températures allant de 10 à 30°C et qui n'est pas capable de croître à des températures supérieures à 37°C. *Y. lipolytica* présente la particularité de pouvoir métaboliser des hydrocarbures comme les alcanes (hexadécane, décane) et les L-alcènes; aussi bien des lipides tels que les acides gras (acide palmitique, acide ricinoleique, acide laurique) et des triglycérides (trioléine, tripalmitine) (Klug et Markovetz, 1967 ; Kreger van rij, 1984 ; Romanos *et al.*, 1992). De plus, elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats carbonés tels que les sucres (comme le glucose, le galactose), le mannitol, l'acétate, le lactate et le citrate, ainsi des acides aminés tels que la méthionine (Cernat Bondar *et al.*, 2005 ; Coelho *et al.*, 2010) et d'autres composés tel que le glycérol (Workman *et al.*, 2013). D'autre part, cette levure peut produire des enzymes tels que les protéases et lipases (Brigida *et al.*, 2007).

### 2.2.1.4- Lipases de *Y. lipolytica*

La levure *Yarrowia lipolytica* possède 16 gènes paralogues codant pour la lipase. Seulement, trois isoenzymes Lip2p, Lip7p et Lip8p ont été partiellement caractérisé jusqu'à maintenant. Le gène LIP2 code pour une lipase extracellulaire (Lip2p) qui hydrolyse préférentiellement les triglycérides à longues chaînes et les résidus oléiques. Les deux autres gènes LIP7 et LIP8, codent pour des lipases membranaires qui semblent être spécifiques, respectivement du caproate (C6) et du caprate (C10) (Barth et Gaillardin, 1996 ; Fickers *et al.*, 2005.a ; Fickers *et al.*, 2011). Le gène de *Y. lipolytica* possède une forte adaptation à des milieux hydrophobes qui a été caractérisé génétiquement. En effet, la synthèse de lipase dépend de l'acide gras ou de l'huile utilisée comme source de carbone (Fickers *et al.*, 2011).

### 2.2.1.5- Applications industrielles et environnementales

La levure *Yarrowia lipolytica* a acquis beaucoup d'attention en raison de son potentiel biotechnologique. Grâce à ses propriétés dimorphiques et à sa capacité à exprimer différentes protéines hétérologues, elle est enregistrée comme un modèle de micro-organisme de type sauvage ou génétiquement modifié. Les acides organiques, les arômes, les enzymes (protéases, lipases, phosphatases etc.), les protéines d'organismes unicellulaires « *single cell proteins* » et les huiles d'organisme unicellulaire « *single cell oils* » sont les principaux produits obtenus par cette souche (Barth et Gaillardin, 1997; Beckerich *et al.*, 1998; Dominguez *et al.*, 2003; Wache *et al.*, 2003 ; Makri *et al.*, 2010). Récemment, plusieurs applications, dans le domaine environnemental, sont recherchées en utilisant *Y. lipolytica* (Rywinska *et al.*, 2012).

### 2.2.2- *Candida boidinii*

#### 2.2.2.1- Taxonomie

Cette souche est actuellement connue sous le nom *Candida boidinii* (Ramirez, 1953), mais, elle peut, également, être trouvée sous divers synonymes: *Candida koshuensis*, *Candida methanolica*, *Candida olivarium*, *Candida ootensis*, *Candida queretana*, *Candida silvicola* var. *melibiosica*, *Hansenula alcoolica*, *Candida alcomigas* et *Torulopsis enokii*. L'analyse des séquences du gène d'ARNr place *C. boidinii* dans un clade qui contient de nombreux autres espèces de levures méthylophiles, y compris plusieurs téléomorphes dans le genre *Ogataea* (Negruta *et al.*, 2010 ;Kurtzman *et al.*, 2011).

#### 2.2.2.2- Habitat

La levure *Candida boidinii* a été isolée à partir du sol et des milieux marins. Il semble que la présence du genre *Candida* est un marqueur, très important, de pollution des milieux marins. De nombreuses souches de *C. boidinii* ont été isolées à partir d'olives fermentées avec d'autres espèces du genre *Candida*, ainsi que les genres *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* et *Saccharomyces* (Janatova, 1992 ; Negruta *et al.*, 2010).

### 2.2.2.3- Caractéristiques physiologiques

La levure *C. boidinii* a été classée dans le groupe des levures méthylotrophes, qui sont capable d'utiliser le méthanol comme seule source de carbone et d'énergie. Ce phénomène a été décrit en 1975, lorsque les chercheurs ont remarqué que les peroxyosomes de ces levures sont massifs, lors de la croissance des cellules sur le méthanol. La biochimie et la physiologie de *C. boidinii* sur des milieux à base du méthanol ont été bien étudiées, par différents auteurs (**Sahm et al., 1975 ; Volfova et al., 1992 ; Waterham et al., 1992 ; Aggelis et al., 2000 ; Van der klei et Veenhuis, 2006 ; Zhai et al., 2012**). Cette souche peut utiliser, par ailleurs, différentes sources simples de carbone, y compris le galactose, le ribose, l'arabinose, le saccharose, le maltose, le lactose, le L-rhamnose, et l'éthanol. Sur le plan morphologique, la souche *C. boidinii* est une levure anamorphique et asporogène (**Sakai et Tani, 1992 ; Negruta et al., 2010**). Elle a des petites cellules ovales, avec pseudo-hyphes (simples ou élaborés) multilatérales en herbe. Elles forment, sur le milieu solide, des colonies blanchâtres et crémeuses. De plus, elle se développe à des températures allant de 25 à 30°C et qui n'est pas capable de croître à des températures supérieures à 37°C (**Negruta et al., 2010**).

### 2.2.2.4- Applications industrielles

La levure *Candida boidinii* a fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques qui ont abouti à des applications biotechnologiques, industrielles et médicales. Une des plus importantes applications, étant son usage comme outil pour la production de protéines hétérologues. Il a été démontré que, des promoteurs forts liés aux gènes de métabolisme du méthanol commandent, l'expression des gènes hétérologues. En outre, *C. boidinii* peut produire d'autres métabolites tels que le Formaldéhyde, l'Adénosine triphosphate (ATP), L-méthionine, le glycérol, le nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD), ainsi que la production et l'accumulation de l'acide citrique, lorsque cette souche est cultivée sur le méthanol (**Sakai et Tani, 1992 ; Hui et Khachatourians, 1995**). Récemment, elle est utilisée pour la production industrielle de diverses précieuses protéines pharmaceutiques, comme l'antigène de l'hépatite B (**Van der Klei et Veenhuis, 2006**).

## **2.3- Les enzymes lipolytiques : lipases**

### **2.3.1- Généralités sur les enzymes**

Tous les processus de la vie, que ce soit végétales, animales ou microbiens, dépendent d'un réseau complexe de réactions chimiques catalysées par des enzymes pour la croissance et la maintenance cellulaires (McAuliffe, 2012). Les enzymes sont des macromolécules, majoritairement, de nature protéique. Elles sont des polypeptides de masses moléculaires élevées situées entre 10 à 1000 kDa (Jarrar, 2011).

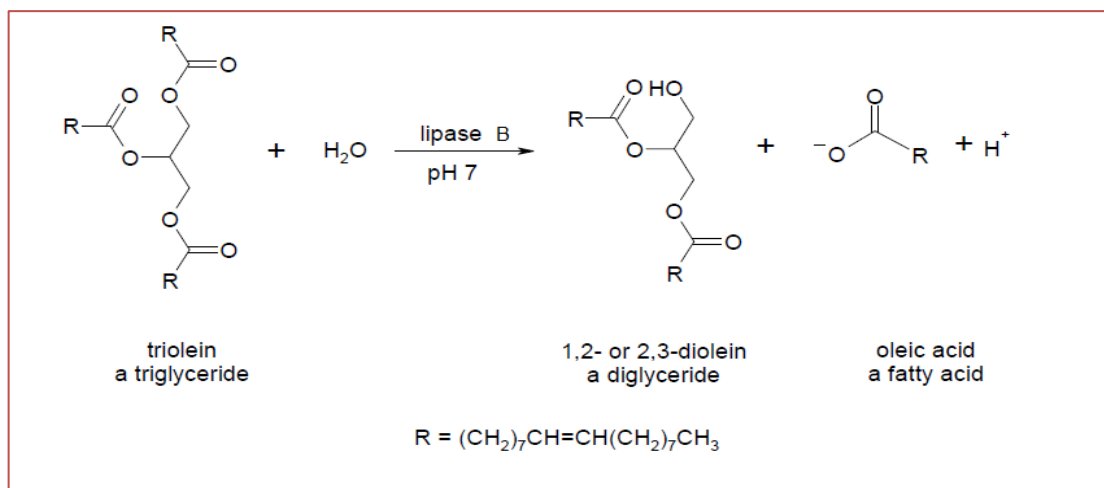
### **2.3.2- Marché des enzymes**

En 2010, le marché mondial des enzymes industrielles a dépassé 3.5 milliards US\$ et a progressé à un taux de 5-8% par an ces dernières années (McAuliffe, 2012). Par ailleurs, il est dominé par des hydrolases de la famille EC 3, à savoir ; les protéases, les lipases et les carbohydrases. L'ensemble de ces dernières représentent plus de 85% des ventes totales d'enzymes et plus de 95% de la production totale d'enzymes techniques. Après les protéases et les amylases, les lipases sont considérées comme le troisième grand groupe en matière de ventes. De plus, ces enzymes ont fait l'objet, ces dernières années, de 1000 publications par an (Rigo *et al.*, 2010; Salihu *et al.*, 2012).

### **2.3.3- Les lipases**

#### **2.3.3.1- Définition**

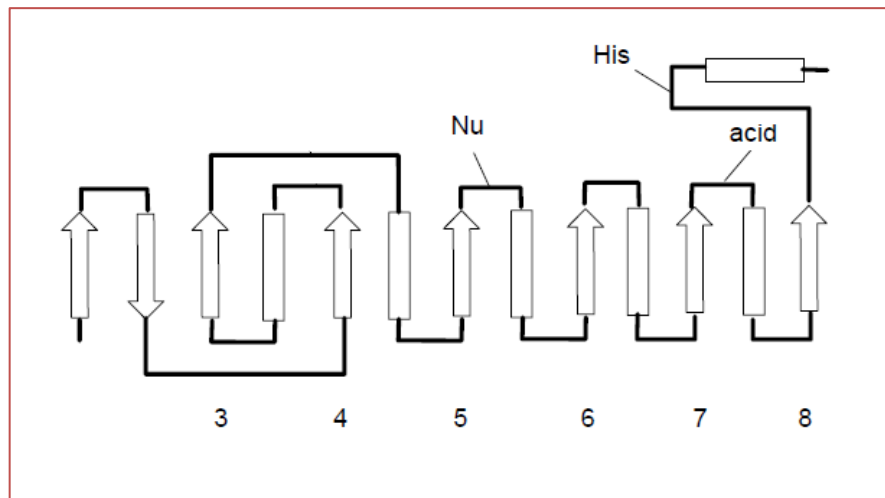
Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) ; les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides (figure 1), monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques, insolubles dans l'eau, se produit à l'interface entre lipide et eau (Alloue *et al.*, 2008).



**Figure 1** Première étape d'hydrolyse des triglycérides par la lipase de type B de *Candida antarctica* (Karpushova, 2004).

### 2.3.3.2- Structure biochimique

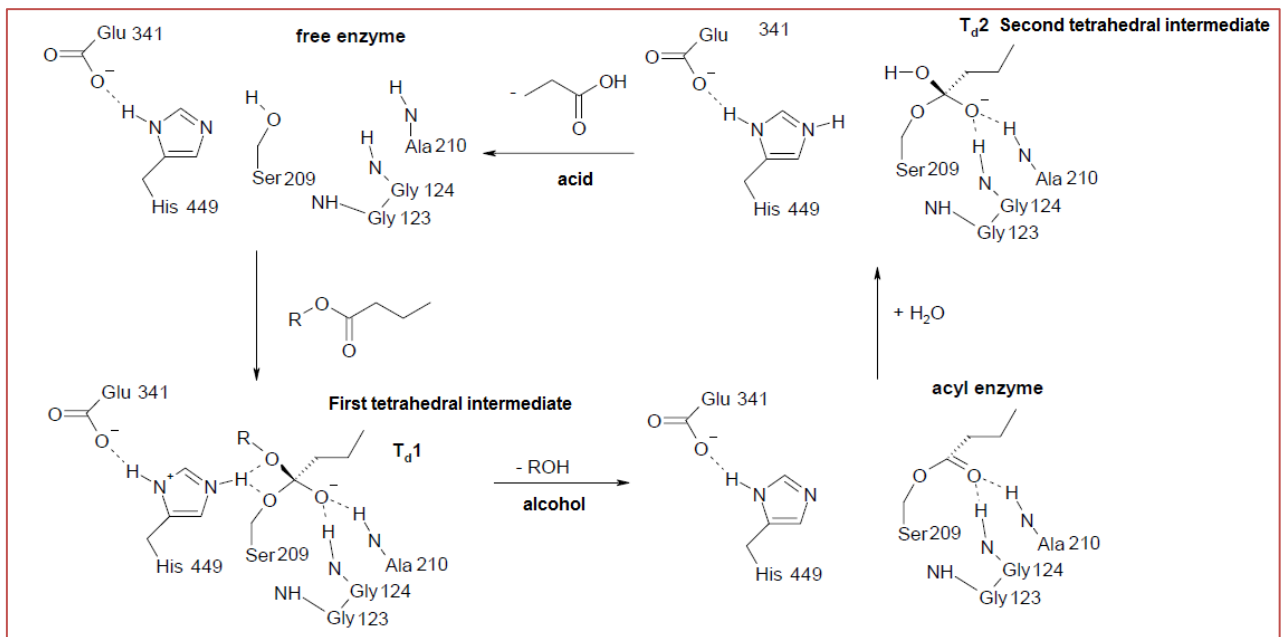
Toutes les sérines hydrolases, y compris les lipases, ont un élément similaire dans leurs structures tridimensionnelles. Ces enzymes appartiennent à la super-famille structurale de  $\alpha/\beta$ -hydrolases, dont l'activité hydrolytique repose, principalement, sur une triade catalytique, qui est formée par les résidus Serine, Histidine et Asparagine. Le résidu serine apparaît, généralement, intégré dans le pentapeptide conservé Gly- X -Ser- X -Gly, formant un motif caractéristique  $\beta$ - tourne -  $\alpha$  nommée nucléophile ou nucleophilic elbow. Dans ce cas, le X représente un acide aminé quelconque, et donc, le noyau de chaque lipase est composé de huit différents brins  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ), reliés avec six hélices  $\alpha$  (figure 2) (Ollis *et al.*, 1992). Le résidu acide carboxylique situé généralement à l'extrémité du 7ème brin peut être l'acide aspartique ou l'acide glutamique (Destain, 1998). Tous ces éléments se trouvent dans le même ordre dans toutes les séquences d'acides aminés de lipases, et sont orientés dans la même direction tridimensionnelle dans toutes les structures de la super-famille structurale de  $\alpha/\beta$ -hydrolases (Fickers *et al.*, 2011).



**Figure 2** Schéma explicatif de la structure  $\alpha / \beta$ -hydrolase ; Nu : nucléophile,  $\alpha$ -hélices sont présentés sous forme de rectangles,  $\beta$ -feuilles des flèches (Oills *et al.*, 1992).

### 2.3.3.3- Mécanisme d'action

Le site actif dans les lipases et estérases est très similaire à ceux retrouvés dans les sérines protéases. Le mécanisme catalytique supposé pour les lipases est centrée sur le site actif Serine. Tout d'abord, l'ester se lie à l'enzyme, ensuite le résidu catalytique sérine attaque le carbonyle, en formant le premier tétraédrique intermédiaire ( $T_d1$ ) (figure 3). En outre, cette réaction libère l'alcool et laisse une acyl-enzyme intermédiaire. En addition, dans une deuxième réaction d'hydrolyse, l'eau attaque cette acyl-enzyme pour former un deuxième tétraédrique intermédiaire ( $T_d2$ ). La désagrégation de ce dernier libère l'acide, ce qui régénère une enzyme libre. Dans d'autres conditions, l'alcool peut attaquer le nucléophile de l'enzyme acyl ce qui donne un nouvel ester (réaction de transestérification). Cependant, dans la plupart des cas, il semble que la formation de l'enzyme acyl est plus rapide (Mezzetti, 2003).



**Figure 3** Mécanisme de catalyse des lipases (Karpushova, 2004).

Plus les réactions d'hydrolyse, les lipases ont la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) (Alloue *et al.*, 2008 ; Salihu *et al.*, 2012).

#### 2.3.3.4- Sources des lipases

Les lipases sont omniprésentes dans la nature et peuvent être obtenues à partir de nombreuses sources, telles que les plantes, les microorganismes et les animaux (Treichel *et al.*, 2010 ; Liua *et al.*, 2011 ; Salihu *et al.*, 2012 ; Casas- Godoy *et al.*, 2012).

##### ➤ Source végétale

Les lipases se trouvent au sein de la plante, principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (oil bodies) (Fickers *et al.*, 2007 ; Casas- Godoy *et al.*, 2012).

##### ➤ Source animale

La plupart des lipases d'origine animale sont obtenues à partir du pancréas des bovins, d'ovins, de porcs et de cochons. Malheureusement, les lipases extraites du pancréas des animaux sont rarement pures pour être utilisées dans l'industrie alimentaire. En effet, la lipase pancréatique du porc est polluée par des traces de trypsine. D'autres impuretés comprennent

des virus et des hormones animales peuvent coexister avec ces enzymes (**Casas- Godoy et al., 2012**).

➤ *Source microbienne*

De nombreux microorganismes sont connus comme des producteurs potentiels de lipases extracellulaires, notamment les bactéries, les levures et les moisissures (tableau 1) (**Rigo et al., 2010**). A cause de leur stabilité, efficacité et pureté, les lipases d'origine microbienne sont les plus utilisées dans les applications biotechnologiques et de la chimie organique (**Treichel et al., 2010**).

**Tableau 1** Micro-organismes potentiellement producteurs de lipases (**Rigo et al., 2010**).

| Microorganismes                      | Types      | Références                                    |                                                                |
|--------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                                      |            | Fermentation submergée                        | Fermentation solide                                            |
| <i>Aspergillus sp.</i>               | Moisissure | Cihangir et Sarikaya (2004)                   |                                                                |
| <i>Geotrichum candidum</i>           | Moisissure | Burkert <i>et al.</i> (2005)                  |                                                                |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>             | Moisissure | Tan et Yin (2005) ; Yang <i>et al.</i> (2005) |                                                                |
| <i>Colletotrichum gloesporioides</i> | Moisissure | Colen <i>et al.</i> (2006)                    |                                                                |
| <i>Aspergillus carneus</i>           | Moisissure | Kaushik <i>et al.</i> (2006)                  |                                                                |
| <i>Penicillium citrinum</i>          | Moisissure | D'Annibale <i>et al.</i> (2006)               |                                                                |
| <i>Rhizopus homothallicus</i>        | Moisissure | Diaz <i>et al.</i> (2006)                     |                                                                |
| <i>Penicillium restrictum</i>        | Moisissure | Azeredo <i>et al.</i> (2007)                  |                                                                |
| <i>Rhizopus oryzae</i>               | Moisissure | Surribas <i>et al.</i> (2007)                 |                                                                |
| <i>Geotrichum sp.</i>                | Moisissure | Yan et Yan (2008)                             |                                                                |
| <i>Rhizopus sp.</i>                  | Moisissure | Bapiraju <i>et al.</i> (2005)                 | Martinez-Ruiz <i>et al.</i> (2008)                             |
| <i>Penicillium simplicissimum</i>    | Moisissure |                                               | Cavalacanti <i>et al.</i> (2005) ; Vargas <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Aspergillus niger</i>             | Moisissure |                                               | Dutra <i>et al.</i> (2008)                                     |
| <i>Penicillium verrucosum</i>        | Moisissure | Pinheiro <i>et al.</i> (2008)                 | Kempka <i>et al.</i> (2008)                                    |
| <i>Rhizopus chinensis</i>            | Moisissure | Teng <i>et al.</i> (2009)                     |                                                                |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      | Levure     | Ciafardini <i>et al.</i> (2006)               |                                                                |
| <i>Williopsis californica</i>        | Levure     | Ciafardini <i>et al.</i> (2006)               |                                                                |
| <i>Candida sp.</i>                   | Levure     | He et Tan (2006)                              |                                                                |

|                                    |          |                                                    |                                |
|------------------------------------|----------|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Candida cylindracea</i>         | Levure   | D'Annibal <i>et al.</i> (2006) ; Kim et Hou (2006) |                                |
| <i>Candida utilis</i>              | Levure   | Grbavcic <i>et al.</i> (2007)                      |                                |
| <i>Trichosporon asahii</i>         | Levure   | Kumar et Gupta (2008)                              |                                |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>     | Levure   | Liu <i>et al.</i> (2008)                           |                                |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>    | Levure   | Potumarthi <i>et al.</i> (2008)                    |                                |
| <i>Candida rugosa</i>              | Levure   | Zaho <i>et al.</i> (2008)                          | Benjamin et Pandey (2001)      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>         | Levure   | Lopes <i>et al.</i> (2009)                         | Dominguez <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Bacillus sp.</i>                | Bactérie | Ertugrul <i>et al.</i> (2007)                      |                                |
| <i>Bacillus coagulans</i>          | Bactérie |                                                    | Alkan <i>et al.</i> (2007)     |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Bactérie | Takaç et Marul (2008)                              |                                |
| <i>Pseudomonas sp.</i>             | Bactérie | Kiran <i>et al.</i> (2008)                         |                                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | Bactérie | Rushi <i>et al.</i> (2008)                         | Mahanta <i>et al.</i> (2008)   |
| <i>Staphylococcus caseolyticus</i> | Bactérie | Volpato <i>et al.</i> (2008)                       |                                |

(Suite Tableau 1)

### 3.3.5- Hydrolyse des substrats hydrophobes via les souches lipolytiques

Le catabolisme des Substrats Hydrophobes (SH), tels que les alcanes, les acides gras et les triglycérides, est un métabolisme assez complexe, qui implique plusieurs voies métaboliques et qui ait lieu dans différents compartiments cellulaires (figure 4) (Fickers *et al.*, 2005.b). Les étapes principales de la dégradation des SH par les levures sont :

- *l'absorption et le transport de SH*

La levure absorbe et transporte les SH jusqu'au site de *l'oxydation primaire*, dans lesquels les mécanismes sont pour la plupart inconnus. En fait, ces substrats (SH) ne sont pas miscibles à l'eau, leur absorption nécessite des modifications morphologiques et physiologiques, notamment dans les propriétés d'adhérence cellulaire ou dans la production d'émulsifiants. Les triglycérides (TG) sont tous d'abord hydrolysés en acides gras, par les enzymes lipolytiques sécrétées (lipases), alors que les alcanes entrent directement dans la cellule (Lindley, 2005).

- *L'oxydation de l'alcane primaire en acides gras*

L'oxydation de l'alcane primaire (monoterminal) dans les cellules implique une hydroxylation terminale par le cytochrome P450 (NADPH). Il en résulte une production d'alcool gras (*Fatty alcohol*). Ce dernier se convertit par le biais de différentes enzymes d'oxydation en acides gras à longues chaînes. Cette réaction se fait au niveau de peroxysomes (**Tanaka et Fukui, 1989**).

- *L'activation des acides gras libres (FFA)*

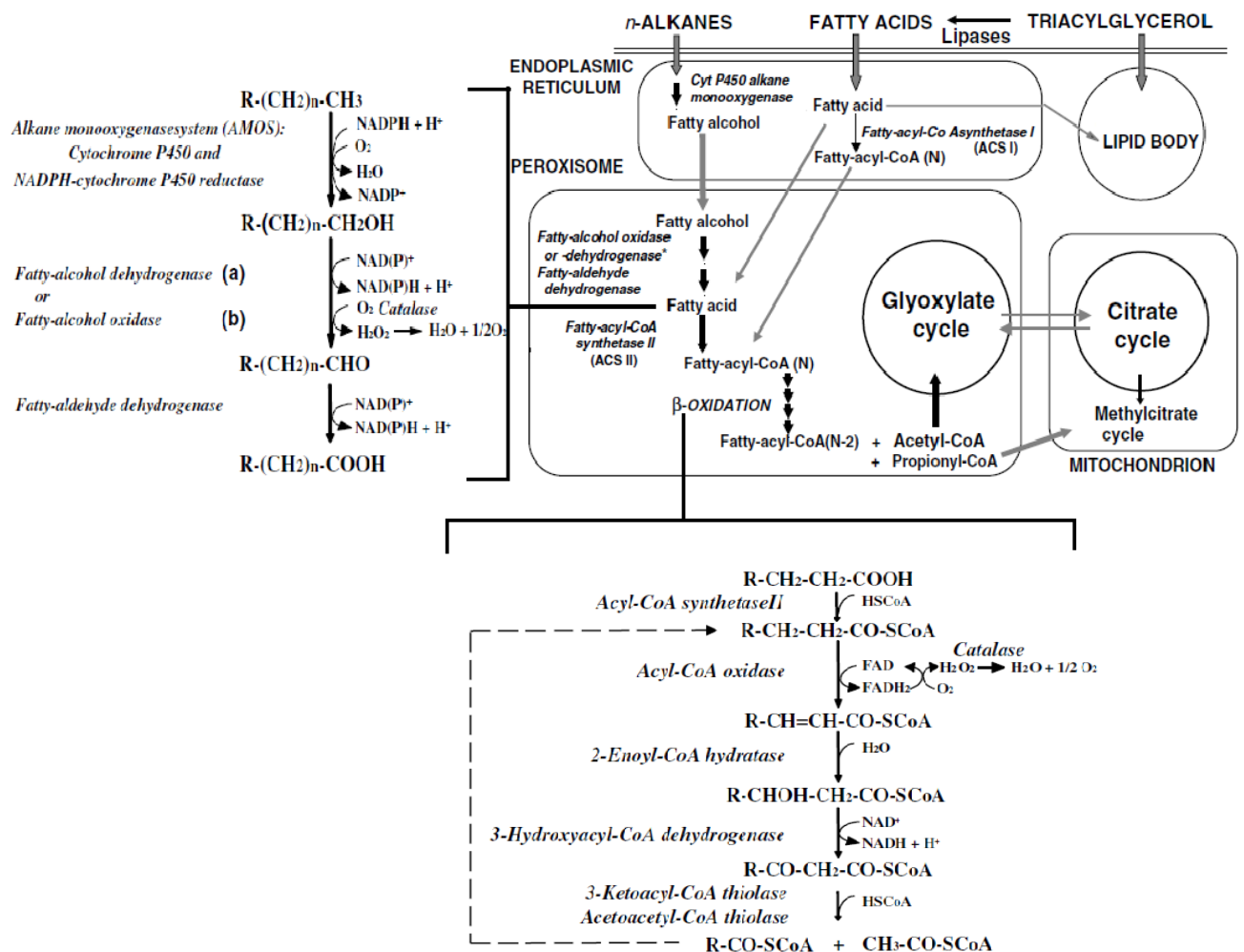
L'activation des acides gras libres FFA (pour *free fatty acids*) aboutit à leurs correspondants esters-CoA, qui sont ensuite dégradés suivant la  $\beta$ -oxydation peroxysomale en acétyl-CoA et de propionyl-CoA (dans le cas des alcanes à chaîne impaire) (**Kamiryo et al., 1977**).

- *Le stockage des lipides*

Les cellules levuriennes « oléagineuses » accumulent les FFA ou TG dans les corps lipidiques. L'accumulation peut se faire en fonction de conditions environnementales (**Murphy, 2001**).

- *La synthèse de l'acide tricarboxylique intermédiaire*

Les cellules levuriennes lipolytiques synthétisent des acides tricarboxyliques intermédiaires, à partir de l'acétyl-CoA et le propionyl-CoA produits par la  $\beta$ -oxydation. D'une part, l'acétyl-CoA commence le cycle du glyoxylate, suivie par la gluconéogenèse. D'autre part, le propionyl-CoA est utilisé pour l'activation du cycle de citrate de méthyle dans la mitochondrie (**Tanaka et Fukui, 1989**).



**Figure 4** Voies métaboliques principales de dégradation des substrats hydrophobes (SH) (Fickers *et al.*, 2005).

## 2.4- Le lait de vache et ses dérivés

### 2.4.1- Lait cru

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance du nouveau né. C'est un liquide de composition complexe, blanc et opaque, plus ou moins jaunâtre (selon la  $\beta$ -carotène), d'une saveur douce, d'un pH voisin de la neutralité. Après la naissance, le lait est un aliment exclusif des jeunes mammifères (Alais, 1984 ; FAO, 1998). Dans nos traditions, le lait de vache a été considéré comme un aliment de base dans de nombreux régimes alimentaires. C'est une boisson saine puisque sa consommation est associée à une alimentation de qualité. Il fournit une matrice facilement accessible, riche en une grande variété de nutriments essentiels : des minéraux, des vitamines et des protéines

faciles à digérer. Il est par conséquent essentiel à l'ensemble des fonctions du corps (**Steijns, 2008**).

#### **2.4.1.1- Caractéristiques physico-chimiques**

Le lait présente des caractéristiques liées à sa nature biologique, à savoir: variabilité, complexité, hétérogénéité et altérabilité (**FAO, 1998**). Il existe en effet, de fortes variations de composition entre les laits provenant de différentes exploitations. Ces variations sont dues essentiellement à l'état de l'animal : hérédité, âge, état de santé, équilibre neurovégétatif, régime alimentaire, période de lactation, qualité du trayeur, vitesse de la traite et au conditionnement au moment de la traite (**Ercolini et al., 2009**) .

Cette émulsion naturelle, de matière grasse et de solution aqueuse, comprend de nombreux éléments, dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous la forme colloïdale. La matière grasse, qui représente environ 4% de la composition globale du lait de vache (P/P), y est présente sous forme de globules gras dispersés dans le lait écrémé. De plus, Le lait renferme une grande quantité d'eau 87%, le lactose (4.8 %), les lipides (3.7%), la caséine (2.6%), l'azote non protéique (urée, créatinine), les protéines du petit lait (0.6%) et les sels minéraux : cations: sodium (58mg/100g), potassium (140mg/100g), calcium (118mg/100g) et magnésium (12mg/100g) ; anions : citrate (176mg/100g), chlorure (104mg/100g) et phosphore (74 mg/100g). Le pH du lait est légèrement acide (compris entre 6,4 et 6,8 pour le lait de vache). L'acidité du lait augmente avec le temps. En effet, sous l'action des micro-organismes du lait, le lactose va être dégradé en acide lactique (**Doyle et al., 2001 ; Jeantet et al., 2009**).

#### **2.4.1.2- Matière grasse laitière**

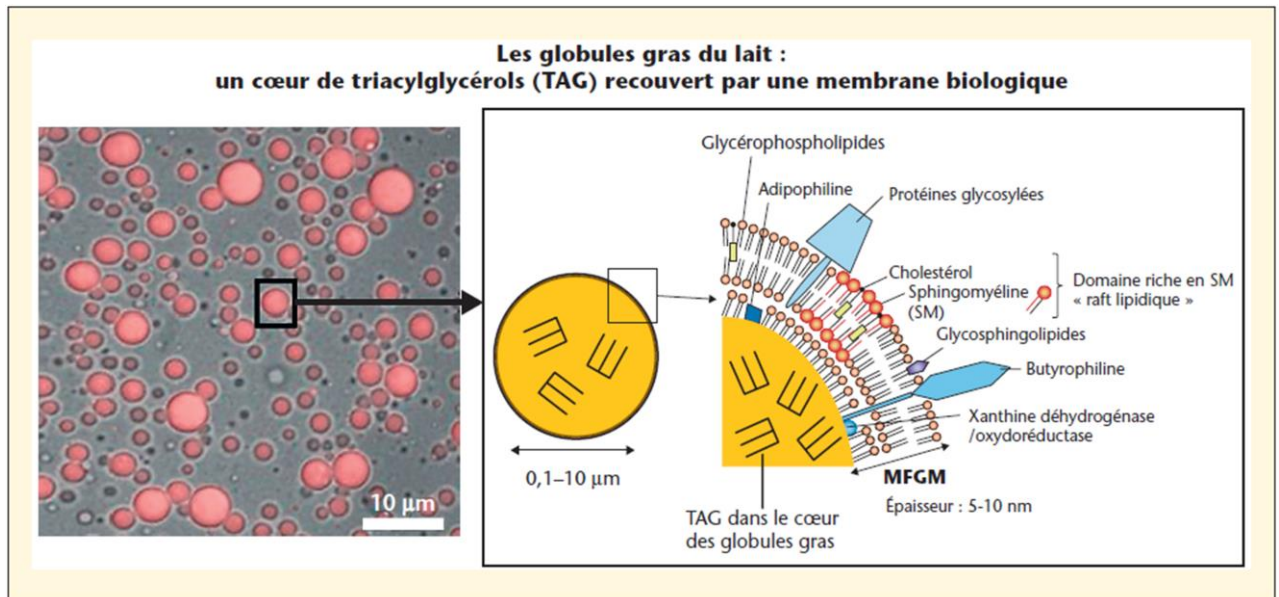
La teneur en matière grasse de lait de vache varie entre environ 3.3 et 4.7% (P/P) suivant la race, le stade de lactation, la saison, etc. la matière grasse du lait est majoritairement présente sous forme de globules gras de diamètres compris entre 0.2 et 15µm. Environ 75% des globules gras ont une taille inférieure à 1µm, mais représentent moins de 10% du volume total de matière grasse laitière. De même, les globules gras dont la taille est supérieure à 8µm sont très peu nombreux et représente moins de 3% de ce volume. Ainsi, près de 90% de la matière grasse laitière se trouve incluse dans des globules gras dont la taille varie de 1 à 8µm. généralement, le diamètre moyen des globules gras est d'environ 4µm. le cœur des globules gras contient la presque totalité des lipides neutres (triacylglycérols (TAG), monoacylglycerides (MAG) et diacylglycerides (DAG)) (tableau 2), tandis que la membrane

des globules gras MFGM (pour *Milk Fat Globule Membrane* ) est constituée de lipides polaires complexes (glycérophospholipides, adipophilines, cholestérol, sphingomycélines, glycosphingolipides, butyrophilines) et la xanthine déhydrogénase, mais également de protéines glycosylées. Leurs propriétés amphiphiles facilitent la création d'interface et permettent de maintenir la matière grasse à l'état dispersé (**Jeantet *et al.*, 2009; Raynal Ijutovac *et al.*, 2011**).

La membrane MFGM agit comme une anti-infection ou une anti-adhésion, et par conséquent, elle protège le nouveau-né contre diverses infections virales et bactériennes. Elle constitue également une barrière contre l'hydrolyse par les microorganismes lipolytiques et contribue à la stabilité physique des globules gras dans le lait. Ces structures moléculaires de TAG et de lipides polaires sont organisées sous forme de structures supramoléculaires natives (**Lopez *et al.*, 2010**) (figure 5).

**Tableau 2** Composition lipidique moyenne du lait de vache (**Jeantet *et al.*, 2009**).

| Classe de lipides  | Pourcentage des lipides totaux |
|--------------------|--------------------------------|
| Triacylglycérols   | 97.5                           |
| Diacylglycérols    | 0.36                           |
| Monoacylglycérols  | 0.027                          |
| Acides gras libres | 0.027                          |
| Cholestérol        | 0.31                           |
| Hydrocarbures      | Traces                         |
| Caroténoïdes       | 0.008                          |
| Phospholipides     | 0.6                            |



**Figure 5** Globules gras du lait (Lopez *et al.*, 2010).

## 2.4.2- Produits laitiers fermentés

Les fondements de transformation du lait en produits laitiers reposent sur l'influence de facteurs biochimiques, physicochimique (pH, force ionique, couple (temps/température)) et biologiques (action des enzymes ou des flores) sur la stabilité de ce système. La transformation du lactose par voie microbienne est à l'origine d'une grande diversité de produits fermenté (Jeantet *et al.*, 2009).

### 2.4.2.1- Lait fermentés

La fermentation des produits laitiers est un processus au cours duquel le lactose est transformé en acide lactique, sous l'action des microorganismes indigènes du lait ou ajoutés sous forme de ferments lactiques ou levains. D'après la **FAO (1998)**, La fermentation modifie les composants du lait et les caractères organoleptiques de celui-ci. Certaines de ces transformations sont communes aux divers laits fermentés; c'est le cas de l'acidification et de la gélification. D'autres sont spécifiques de chaque type de lait fermenté, comme la formation de composés aromatiques, de gaz, d'éthanol et l'hydrolyse des protéines. Les laits fermentés se différencient les uns des autres par leur état final: coagulum (ou gel) plus ou moins ferme et crème plus ou moins visqueuse ou liquide.

Les produits laitiers fermentés traditionnels ont une part très importante dans l'alimentation quotidienne des gens de différents pays. Ces produits ont fait l'objet de plusieurs études : en Algérie (**Zarour et al., 2013**), en Tunisie (**Samet-bali et al., 2012**), au Maroc (**Ouadghiri et al., 2009**), au Soudan (**Abdelgadir et al., 2001**), en Egypt (**Ayad et al., 2004**), en Italie (**Mucchetti et al., 2009**), en Grèce (**Tsakalidou et al., 1994**), a Zembabwe (**Gadaga et al., 2000**), au Kenya (**Lore et al., 2005**), en Afrique du sud (**Beukes et al., 2001**), etc.

En Algérie ces produits sont une partie intégrante d'héritage algérien et ont une grande importance, culturelle, médicinale et économique. Ils ont été développés, sur une longue période, avec les compétences culinaires de femmes. Les produits laitiers traditionnels algériens qui ont la signification commerciale sont *Raïb*, *Leben*, *Klila*, *Bouhezza* et *Jben*.

#### ➤ *Raïb*

Le lait caillé ou Raïb est un lait acidifié obtenu, soit par fermentation naturelle après ensemencement à l'aide de levains lactiques préparés à l'avance, ou du lait caillé de la veille, avec ou sans addition de substances coagulantes (présure, pepsine) (**Dieng, 2001**). Les levains lactiques dégradent le lactose en acide lactique et confèrent par la suite une acidité favorable à la conservation du produit et à la coagulation de la caséine qui forme un gel avec très peu d'exsudation du lactosérum. Contrairement au Leben, le Raïb ne subit pas une opération de barattage et d'écémage, il s'agit d'un lait fermenté entier.

#### ➤ *Lait fermenté écrémé « Leben »*

La préparation du traditionnelle du Leben débute par la coagulation en Raïb (pendant 24 à 72 h selon la saison), il subit après un barattage et un écémage dans une peau de chèvre ou de brebis Chekoua. La peau de l'animal non fondue est tannée puis confectionnée sous forme de sac imperméable par nouaison des différentes ouvertures. L'ouverture du cou de l'animal constituera le col ou la bouche de la Chekoua (**Aissaoui et al., 2006**). L'écémage est réalisé généralement le matin ; la Chekoua est remplie à moitié de Raïb puis tendue par gonflement. Ensuite, la Chekoua est bien nouée et secouée vigoureusement durant une demi-heure. La formation des globules gras (beurre) est jugée par le changement du son qui se produit à l'intérieur de la Chekoua, pour aider l'agglomération des particules du beurre, L'eau est habituellement ajouté, chaude ou froide en fonction de la température du lait. Le beurre frais est retiré manuellement en une seule motte appelé Zebda.

### 2.4.3- Caractères microbiologiques du lait

La flore microbienne du lait englobe différents types de micro-organismes. Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles (Lapointe-Vignola, 2002). D'après Chye *et al.* (2004), les genres : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus* spp., constituent la flore bactérienne du lait. De plus, plusieurs auteurs ont confirmé la présence des levures comme les genres *Candida* sp. et *Cryptococcus* sp. et des moisissures du genre *Eurotium* sp. et *Cladosporium* sp. dans ce produit (Godič-Torkar et Golc-Teger, 2008 ; Ledenbach *et al.*, 2009 )

### 2.4.4- Principales activités des microorganismes dans le lait

Les activités métaboliques des microorganismes présents dans le lait peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'apparence, l'odeur, la consistance ou la texture et le goût des produits laitiers. Parmi ces activités on peut citer l'acidification, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz (Conte, 2008).

- L'**acidification** : c'est une production d'acide lactique à partir du lactose par les ferments lactiques lors de leur croissance.
- La **protéolyse** : c'est la dégradation des protéines du lait avec formation de peptides, dont certains donnent des mauvais goûts aux produits laitiers.
- La **lipolyse** : c'est la libération d'acides gras à partir des triglycérides du lait, entraînant un goût de rance.
- La **production de gaz** : certaines bactéries (hétérofermentaires, bactéries telluriques) au cours de leur croissance produisent des gaz. Dans le cas de certains fromages on peut assister à l'apparition d'un défaut d'aspect, dû à la production de gaz, associé ou non à un défaut de goût.

## **2.5- Les sous-produits oléicoles**

### **2.5.1- L'oléiculture en Algérie**

#### **2.5.1.1- Superficies plantées**

L'olivier de son nom scientifique *Olea europaea*, est l'un des rares arbres qui occupent une place importante dans l'arboriculture fruitière méditerranéenne. Actuellement, il est considéré comme un élément majeur de l'économie agricole dans certains pays de cette région et surtout dans notre pays. L'oléiculture est la première richesse arboricole de l'Algérie, elle constitue une source de subsistance pour plusieurs familles. Le nombre d'oliviers y est estimé à environ 20 millions et occupent une superficie de l'ordre de 239 350 hectares. Il se repartit principalement dans trois régions : le Centre (Ain Defla, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bouira et Bejaia), l'Est (Jijel, Skikda, Mila et Guelma) et l'Ouest (Tlemcen, Ain Timouchent, Mascara, Sidi Belabes et Relizan), avec respectivement 54,3%, 28,3% et 17% de la surface totale (COI, 2004).

#### **2.5.1.2- Production d'huile d'olive**

L'Algérie fait partie des pays méditerranéens dont le climat est un des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus grands producteurs au monde (Tsagariki *et al.*, 2007). La filière huile, dans notre pays, accuse un retard de développement en amont et en aval ; la production d'huile d'olive, par exemple, ne représente que le tiers de la production Tunisienne. Avec les nouvelles mesures de restructuration du développement agricole, l'Algérie, veut développer son secteur oléicole, en augmentant les surfaces plantées et en modernisant les industries d'extraction d'huile d'olive dans un objectif de se placer parmi les premiers pays producteurs d'huile d'olive. Au cours des dix campagnes oléicoles (1990/1991 à 1999/2000), la production moyenne a atteint 31250 tonnes, avec un minimum en 1990/1991 de 6000 tonnes d'huile d'olive. En 1998/1999, la production a atteint un maximum avec 54500 tonnes d'huile d'olive. Durant la campagne 2003/2004, la production atteint son maximum avec plus de 69500 tonnes d'huiles d'olive par comparaison avec les années précédentes. La

production nationale pourrait donc passer à une moyenne d'environ 50 000 t par an à l'horizon 2010 (COL, 2007).

#### 2.5.1.3- Les variétés de l'olivier à l'huile

La description des variétés d'olives (à l'huile) cultivées en Algérie a déjà fait l'objet de nombreuses études. Dans cette section, nous ne ferons que rappeler les noms de variétés de base des principales régions oléicoles.

- *Chemlal* : variété vigoureuse et de grande dimension (masse de 2,5g), c'est la variété dominante, elle représente environ 50% du verger oléicole Algérien, elle est réputée pour sa bonne qualité de l'huile (Tamendjari *et al.*, 2004).
- *Azeradj* : elle constitue une variété mixte (huile et olive de table en vert ou noir), résistante à la sécheresse. Elle pèse environ 5 g. Elle est très estimée pour la conservation en olive verte, mais moins recommandable pour l'huilerie.
- *Aberkane* : est une autre olive de conserve qui s'emploie à pleine maturité dans la région de Seddouk (Béjaia), mais peut également procurer des résultats satisfaisants en huilerie (Hadjou *et al.*, 2013).
- *Limli* : donne un fruit de 2g, utilisé pour la fabrication de l'huile. Elle est cultivée surtout dans la basse vallée (jusqu'à Béjaïa). La relative acidité de son huile est compensée par la régularité de sa production.

Ces variétés cohabitent avec une multitude d'autres : locales (Sigoise, Bouricha...) et étrangères (Cornicabra, Sevillane, Blanquette, Lucques, Picholine).

La qualité de l'huile d'olive varie non seulement en fonction de la variété, du sol et des conditions climatiques mais également selon de nombreux facteurs ayant trait au cycle de production, de transformation et de commercialisation des olives et des huiles.

#### 2.5.2- Trituration

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive consiste à broyer l'olive pour éclater les cellules de la pulpe et libérer l'huile, puis à la séparer par tous les moyens disponibles (pression,

centrifugation et percolation). Ce processus est réalisé par une succession d'opérations : lavage, broyage, malaxage de la pâte obtenue, puis l'extraction proprement dite (**Boskou, 1996 ; Argenson et al., 1999; Espiard, 2002**).

### **2.5.3- Les sous-produits oléicoles « grignons d'olive »**

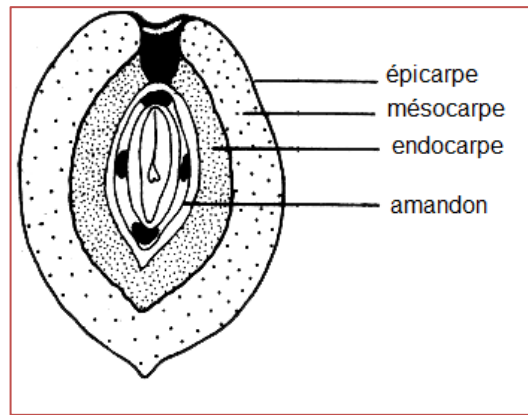
L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux principaux résidus, l'un liquide appelé margine et l'autre solide appelé les grignons d'olive. En plus, l'olivier, à travers la taille engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois. La production mondiale de grignons bruts peut être estimée à environ 2,9 millions de tonnes. Chaque année, les pays oléicole enregistrent des volumes importants de ce sous-produit. En moyenne, le traitement de 100 kg d'olives produit environ 35 kg de grignon, 100 litres de margines et 25 kg de feuilles et de brindilles annuellement (**Nefzaoui, 1991**).

#### **2.5.3.1- Le grignon d'olive**

##### **➤ Définition**

Ce sous-produit résulte de l'extraction de l'huile d'olive. Il renferme la plus grande partie de la matière sèche de l'olive, constituée essentiellement de l'épicarpe du fruit (pellicule), le mésocarpe (pulpe ou chair de l'olive) et l'endocarpe (coque et amandon de noyau) (figure 6). De plus, il peut contenir une certaine proportion d'eau de végétation qui contient à son tour les composants hydrosolubles de l'olive. Ces derniers dépendent du système d'extraction utilisé. De ce fait, le grignon d'olive a été classé comme suit, (**Nefzaoui, 1987**):

- *Grignon brut* : c'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive.
- *Grignon épuisé* : produit après une seconde extraction avec un solvant chimique tel que l'hexane. Il est caractérisé par une faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'il a été déshydraté pour permettre le processus de l'extraction.
- *Grignon d'olive partiellement dénoyauté* : produit après dénoyautage du grignon brut.
- *Grignon épuisé et partiellement dénoyauté* : les grignons épuisés et partiellement dénoyautés sont constitués essentiellement par la pulpe et contiennent encore une petite proportion de coques qui ne peuvent pas être séparés complètement par les procédés de tamisage ou de ventilation.



**Figure 6** Coupe schématique d'une olive (Nefzaoui, 1984).

➤ **Composition chimique**

La composition chimique de grignons varie selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction et l'épuisement par solvants (traitement des grignons par hexane), (Nefzaoui, 1984). Le tableau 3 représente la composition chimique, des différents types des grignons d'olives.

**Tableau 3** Composition chimique indicative de différents types de grignons d'olives (Nefzaoui, 1984).

| Types de grignons                             | Matière Sèche (MS) % | Matières Minérales (MM) % | Matières Azotées Totales (MAT) % | Cellulose brute (CB) % | Matières Grasses (MG) % |
|-----------------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Grignon brut</b>                           | 75-80                | 3-5                       | 5-10                             | 35-50                  | 8-15                    |
| <b>Grignon épuisé</b>                         | 85-90                | 7-10                      | 8-10                             | 35-40                  | 4-6                     |
| <b>Grignon épuisé partiellement dénoyauté</b> | 85-90                | 6-8                       | 9-14                             | 15-35                  | 4-6                     |
| <b>Grignon gras partiellement dénoyauté</b>   | 80-95                | 6-7                       | 9-12                             | 20-30                  | 15-30                   |

Généralement, on peut considérer que le grignon est composé d'une fraction riche en lignine, provenant des fragments de noyaux et une autre fraction renfermant principalement des glucides, comme les hémicelluloses, des cendres, des protéines et de l'huile résiduelle qui dépend de la technique d'extraction (**Nefzaoui, 1984**). Les grignons d'olive contiennent quelques composés phénoliques dont le glucoside amer est le composé phénolique le plus abondant. Ces composants se trouvent dans le grignon avec des quantités non appréciables par rapport aux ceux trouvés dans les autres déchets oléicoles (tel que les margines) (**Nefzaoui, 1991**).

#### ➤ *Pollution des grignons d'olives*

La majorité des grignons rejetés dans la nature, se considère comme une source de pollution ; soit parce qu'ils sont contaminés par des champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou les composés polyphénoliques qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent alors se lixivier, et polluer les sources d'eau à proximité ; menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement.

#### ➤ *Valorisation des grignons d'olives*

Les grignons d'olive peuvent causer plusieurs problèmes dans l'environnement. Pour pallier à cette pollution, ils sont revalorisés en produits bénéfiques notamment dans les pays développés. La fermentation des grignons d'olives, par des champignons, en milieu solide produit une panoplie de composés d'arômes d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique (**Kademi et al., 2003**). Tandis que, la fermentation anaérobie des lisiers de vaches avec des grignons d'olives aboutit à la production du méthane (**Hammad et al., 1999**). Dans le domaine agricole, les grignons d'olives peuvent être employés comme fertilisants, après avoir subi un compostage pour faciliter sa dégradation et éliminer ses effets phytotoxiques. Mieux encore, le grignon peut servir en tant qu'aliment pour bétail. Il peut être amélioré au niveau de la valeur alimentaire par le tamisage. Ce dernier consiste à séparer la coque (indigeste) de la pulpe (digeste), autrement dit un dénoyautage (**Nefzaoui, 1984**). L'huile récupérée après le traitement des grignons brutes par solvant est appelée huile de grignon d'olive. Cette dernière est utilisée pour la consommation humaine après le raffinage ou pour la fabrication du savon, en industrie (**Kadi et Fellag, 2001**). La valorisation thermique des grignons d'olives constitue l'alternative la plus pertinente pour la

réduction de ces sous-produits oléicoles. En effet, des procédés thermiques convertissent ces grignons en énergie utilisable sous différentes formes. La biocombustion est une des formes calorifiques (3500 Kcal/kg), utilisée pour alimenter en énergie le secteur oléicole et d'autres secteurs (**Fedeli, 1997**). En effet, le plus grand pouvoir calorifique se trouve dans la coque beaucoup plus que la pulpe, ce qui assure tout l'intérêt de tamisage (**Nefzaoui, 1991**).

## **2.6- Les types de fermentation**

### **2.6.1- Généralités**

La fermentation est un procédé utilisé pour produire des biomolécules comme les enzymes, les acides organiques, les métabolites secondaires et la biomasse. Généralement, la production des enzymes (telles que les lipases) est effectuée, en utilisant, deux types de fermentations ; une solide SSF (pour *Solid State Fermentation*) et l'autre liquide ou submergé SmF (pour *Submerged Fermentation*). Ces deux techniques sont des approches communes et conventionnelles, et chaque technique possède quelques avantages par rapport à l'autre (**Ul-Haq et al., 2002 ; Rigo et al., 2009 ; Wolski et al., 2009 ; Martins et al., 2011 ; Salihu et al., 2012** ).

### **2.6.2- Les types de fermentations pratiqués**

#### **2.6.2.1- La fermentation solide ou *Solid State Fermentation***

##### **➤ Définition**

La fermentation en milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides, qui jouent le rôle d'un support physique et source de nutriments en l'absence (ou quasi absence) d'eau libre. La quantité d'eau dans cette matrice solide doit être suffisante pour la croissance et le métabolisme des micro-organismes (**Mitchell et al., 2002**). Les micro-organismes ne se développent pas seulement sur ou à proximité de la surface de la matière solide, mais aussi elles pénètrent profondément dans les espaces intercellulaires et intracellulaires du support, montrant un contact étroit ou associé (**Dominguez et al., 2003** ). Parmi les différents groupes de micro-organismes utilisés dans SSF, les champignons filamenteux, qui sont les espèces les mieux adaptées, indiquées dans plusieurs recherches et applications pratiques. Ceci est dû à leur capacité à croître sur des surfaces de substrats variables et de pénétrer dans les espaces inter-particulaires des substrats

solides, tandis que les bactéries et les levures sont largement cultivées dans SmF (**Viniegra - Gonzalez et Favela-Torres, 2006**).

Les facteurs pouvant influencer la SSF sont : la nature du support et de ses propriétés ( taille des particules, capacité de rétention d'eau ), les micro-organismes (type , taille de l'inoculum et période de culture ) et les paramètres physiques (température, oxygène, taux de dégagement de dioxyde de carbone) ( **Salihu et al . , 2012**).

#### ➤ ***Les types de supports utilisés***

Une large gamme de matériaux solides est utilisée dans SSF. Ces matériaux peuvent être classés en deux grandes catégories: les matériaux inertes, qui n'agissent que comme un lieu de fixation pour le matériel biologique (microorganismes) et matériaux non inertes, qui ne fonctionnent pas, seulement, comme un lieu d'attachement, mais fournissent aussi, des nutriments aux microorganismes. Les matériaux inertes, en raison de leur double rôle, sont également nommés soutien-substrat. Ils sont généralement des composés agro-industrielles et leurs dérivés tels que l'amidon (riz, pomme de terre, etc.), ou de produits agricoles à base de cellulose (déchets de fruits) ou des céréales et leur produits dérivés (**Pandey et al., 2000 ; Rodriguez-Couto et Sanroman, 2006**).

#### ➤ ***Applications***

Cette technique a été utilisée depuis des milliers d'années dans les pays orientaux pour la préparation d'aliments traditionnels comme le Tempeh, le Shoyu, le Koji et le Miso et dans les pays occidentaux pour la production du pain, du yogourt et du fromage (**Mahadik et al., 2002 ; Bellon-Maurel et al., 2003**). Actuellement, les applications de la fermentation solide concernent : le compostage, l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites (éthanol, acides organique, acide citrique, etc.) (**Assamoi et al., 2009**).

#### ➤ ***Avantages***

Les avantages de la fermentation solide sont nombreux. Ce bioprocédé a gagné de plus en plus d'attention, au cours des dernières années, en raison de la possibilité d'utiliser les déchets agro-industriels bon marché comme substrats pour produire plusieurs métabolites (**Castilho et al., 2000**). En outre, plusieurs études ont démontré que SSF peut conduire à des rendements plus élevés avec une productivité importante et de qualité meilleure par rapport à la fermentation submergée (SmF) (**Ul-Haq et al., 2002 ; Martins et al., 2011**).

Sur le plan technologique, SSF ne nécessite pas d'équipements sophistiqués pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). L'absence d'eau libre permet de réduire le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. En plus, la non nécessité de stérilisation préalable du substrat réduit considérablement le cout énergétique de la fermentation (**Pandey et al., 2000 ; Assamoi et al., 2009**).

#### ➤ **Inconvénients**

Les inconvénients du SSF sont surtout rencontrés, dans le Scale-up. En effet, les limitations de ce bioprocédé sont liées principalement au contrôle et la surveillance, à grande échelle, des paramètres directs (température, pH, débit d'air). De plus, ce contrôle est rendu plus difficile à cause de la nature solide et hétérogène des substrats. Le SSF comporte d'autres limites telles que le choix restreint de microorganismes, le développement des souches dans des conditions d'humidité réduite, l'estimation délicate de biomasse à cause de la difficulté de séparation des microorganismes du substrat, l'accumulation des produits inhibiteurs lors de la fermentation et la difficulté d'extraction des enzymes lipophiles (**Mahadik et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2006 ; Assamoi et al., 2009 ; Salihu et al., 2012**).

### 2.6.2.2- La fermentation liquide ou *Submerged fermentation*

#### ➤ **Définition**

Une large gamme de produits commercialisés issus de la fermentation industrielle sont produits par SmF. Il s'agit d'une technique dans laquelle les microorganismes sont en suspension dans un milieu liquide contenant les éléments nutritifs dissous. Elle consiste à utiliser des substrats liquides libres, tels que les mélasses et les bouillons. Les substrats sont utilisés rapidement par les microorganismes pour produire différentes molécules bioactives (**Colla et al., 2010 ; Subramaniyam et Vimala, 2012 ; Salihu et al., 2012**). Cette technique est mieux adaptée pour les microorganismes qui nécessitent une haute teneur en humidité tels que les bactéries (**Subramaniyam et Vimala, 2012**).

#### ➤ **Applications**

La fermentation submergée est une méthode bien établie pour la production de divers composés bioactifs tels que les antibiotiques, les pigments, les enzymes, les agents hypercholestérolémiques, les antioxydants, les antihypertenseurs, les agents antitumoraux, les biosurfactants et les peptides bioactifs (**Subramaniyam et Vimala, 2012**).

#### ➤ **Avantages**

La fermentation submergée a été couramment utilisée dans l'industrie biotechnologique et enzymatique au cours des dernières décennies (**Wolski *et al.*, 2009**). Elle est avantageuse dans le contrôle des paramètres de la fermentation, la récupération facile des métabolites, des mycéliums ou des spores et fournit de bons rendements en enzymes (extraits enzymatiques plus stable) (**Sun et Xu, 2009 ; Colla *et al.*, 2010 ; Subramaniam et Vimala, 2012**).

➤ ***Inconvénients***

La fermentation submergée est un procédé séduisant par ses avantages et son rendement élevé mais il présente certains inconvénients tels que les contaminations microbiennes et le développement naturel, sous forme mycélien, des microorganismes fongiques. Ce dernier provoque une augmentation de la viscosité préjudiciable à la solubilisation de l'oxygène dans le milieu (**Sun et Xu, 2009**).

## Matériel et Méthodes

---

### **3- Matériel et méthodes**

Le présent travail porte sur l'isolement de la souche lipolytique *Y. lipolytica* et d'autres levures lipolytiques actives, à partir des produits laitiers et grignons d'olives pour la recherche de nouvelles potentialités, à savoir l'activité lipolytique et évaluation de la biomasse, par comparaison avec un isolat performant. Différentes applications biologiques de ces potentialités sont effectuées sur des milieux solides et liquides.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à Constantine et au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) en Belgique.

#### **3.1- Isolement et sélection de souches levuriennes productrices de lipase**

##### **3.1.1- Échantillonnage**

L'isolement de la souche levurienne lipolytique *Yarrowia lipolytica*, a été effectué à partir de milieux naturels riches en matière grasse, à savoir : les produits laitiers de vache et le grignon d'olive « variété de *Chemlal* ».

###### **3.1.1.1- Les produits laitiers**

Les échantillons de produits laitiers de vache (Lait cru, Raïb et Leben) proviennent d'une ferme qui se situe dans la région de Constantine. La production des laits fermentés (Raïb et Leben) a été effectuée selon la méthode traditionnelle (voir section 2.4.2).

Trois échantillons par produit laitier ont été recueillis dans des flacons stériles de 250 ml, dans conditions aseptiques, et ensuite, acheminés directement au laboratoire pour une mise en analyse immédiate.

###### **3.1.1.2- Le grignon d'olive**

Le grignon d'olive utilisé au cours de cette étude provient de la trituration des olives de la variété « *Chemlal* » récoltées au cours de la saison oléicole 2010/2011. Ce grignon est de type brut (figure 7), provient d'une huilerie algérienne située à la région de Skikda « El harrouch ».

Pour l'échantillonnage, environ 200 g de grignon sont prélevés et introduits dans un sachet en plastique stérile, puis, emmenés au laboratoire et gardés au frais (4°C) jusqu'à utilisation. Une partie de ce grignon sera utilisée pour SSF (voir section 2.6.2.1).



**Figure 7** Grignon d'olive brut, variété de *Chemlal*.

### **3.1.2- Isolement des levures**

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

A partir de cette solution, des dilutions décimales sont préparés par l'ajout successif de 1 ml de la solution à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de  $10^{-6}$ . L'ensemencement se fait en surface, par étalement de 0,1ml de chaque dilution (**Hammer et al., 1998**) sur gélose Saboraud Chloramphenicol (Institut Pasteur, Algérie). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C, en aérobiose pendant 3 jours.

### **3.1.3- Purification des levures**

La purification des souches est réalisée à partir de colonies bien isolées, sur Yeast-Peptone-Dextrose-Agar (YPDA) (Annexe) par plusieurs repiquages successifs. L'incubation est réalisée en aérobiose, à 30°C pendant 48h. L'aspect macroscopique et microscopique est ensuite, examiné afin de vérifier la pureté de la souche.

### 3.1.4- Conservation

Des cultures jeunes de levures sont préalablement préparées sur milieu gélosé YPDA. A partir de ces cultures, des colonies bien développées sont prélevées et ensemencées sur milieu liquide YPD additionnée du glycérol (Annexe) comme cryoprotecteur. Les cultures préparées sont incubées pendant 3 à 4 jours, pour permettre une croissance maximale des cellules, et ensuite congelées à -20°C. La congélation à -20°C permet la préservation d'une fraction riche en cellules viables pendant 1 à 2 ans (**Larpent, 1997**).

### 3.1.5- Sélection des souches à activités lipolytiques

#### 3.1.5.1- Mise en évidence de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique est mise en évidence sur milieu tributyrine-agar modifié composé de 3% tributyrine, 1% peptone, 1,2% extrait de levure et 1% agar (pH 6.2) (**Hasan et al., 2009**).

Dans un premier temps, des cultures jeunes de levures sont préparées sur milieu YPDA. Les colonies obtenues, bien séparées, sont ensuite coupées avec de la gélose (par un perforateur) et placées en surface du milieu tributyrine-agar modifié. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72 h. la production de lipase se traduit par la formation d'halos claires autour des cylindres gélosés. L'activité lipolytique est calculée par mesure des diamètres des zones de lipolyses selon la formule suivant  $D-d$  dont D est le diamètre du halo total hydrolysé y compris le diamètre du disque et le d c'est le diamètre du disque (**Griebeler et al., 2009; Hasan et al., 2009**). Les souches exhibant les diamètres les plus élevés (D-d) sont sélectionnées en tant que potentiellement productrices de lipases (fausses lipases).

#### 3.1.5.2- Recherche de producteurs potentiels de vraie lipase « *True Lipase* »

La recherche de souches productrices de vraie lipase est réalisée selon la méthode de (**Burlina et Galzigna, 1973**). Pour ce faire, des cultures jeunes des souches sélectionnées comme potentiellement lipolytiques sont préparées sur milieu liquide YPD. Dix millilitres de chaque préculture sont inoculés dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de production. Ce dernier est composé de 1% glucose, 3% lactosérum, 0,8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 1% corn steep liquor et 0,5 % huile d'olive (pH 6,5). L'incubation est réalisée à 30°C avec agitation à 120rpm, pendant 48h. L'activité lipolytique est mesurée pour chaque souche à la

fin de la culture (**Destain et al., 1997 ; Fickers et al., 2003**). Les Souches Potentiellement Productrices de Vraie Lipase (SPPVL) sont retenues pour la suite du travail.

## **3.2- Identification des levures**

L'identification des levures, est basée sur l'étude des caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques et physiologiques) **Wickerham (1951) ; Kurtzman et Robnett (1998)** et **Guiraud (1998)** et les caractères génotypiques (identification moléculaire).

### **3.2.1- Etude des caractères phénotypiques**

#### **3.2.1.1- Les caractères morphologiques**

##### **➤ Les caractères cultureux**

Dans un premier temps, les souches levuriennes sont réactivées par ensemencement sur un milieu YPDA et incubées à 30°C pendant 48 h. Les caractères morphologiques sont étudiés sur YPD liquide et gélosé.

Le milieu YPD liquide permet d'observer, après incubation de 3 jours à 30°C, la sédimentation des cellules (culot), la présence d'une pellicule en surface (voile) et la formation de gaz.

Le milieu YPD gélosé permet de définir, après incubation de 3 jours à 30°C, la taille des colonies, leur forme (contour net ou irrégulier, convexes ou concaves), leur aspect (mat ou brillant) et leur pigmentation. L'examen macroscopique est réalisé grâce à une loupe binoculaire.

##### **➤ Etude des caractéristiques de la reproduction végétative**

Les caractéristiques de la reproduction végétative des levures sont observés par examen microscopiques à l'état frais (grossissement x 40 et/ou grossissement x100) de frottis préparés à partir de cultures jeunes sur bouillon YPD et gélose YPD.

##### **- Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative**

L'observation microscopique permet de définir la forme, la taille, l'arrangement et le mode de division des cellules.

- *Aptitude à la filamentation*

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique. De ce fait, le milieu PDA (Annexe) 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 incubée dans la boîte de Pétri modérément humidifiée par l'ajout d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 2 à 5 jours d'incubation (grossissement x 40 ou x100). Par conséquent, 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.

### **3.2.1.3- Etude des caractères biochimiques**

L'étude des caractères biochimiques est réalisée par la mise en évidence du profil fermentaire des sucres, le test d'assimilation des sources carbonées- test API20C AUX (Biomérieux, Belgique) et quelques tests classiques.

➤ ***Fermentation des sucres***

Les sucres testés sont : D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-xylose, D-lactose, D-maltose, D-saccharose et l'amidon. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres, est le milieu d'eau de levure (extrait de levure à 0,5% dans l'eau), conditionné avec une cloche de Durham. Les sucres utilisés comme sources de carbones sont additionnés au milieu à raison de 2 %. Les tubes sontensemencés avec 3 gouttes d'une suspension de levure. Les cultures sont incubées à 28°C, pendant 48 h à 3 semaines. La fermentation des sucres est révélée par le dégagement de CO<sub>2</sub> dans la clochette, perçu par les bulles d'air.

➤ ***Assimilation des sources carbonées***

Pour l'étude de l'assimilation des hydrates de carbone ; le milieu minimum YNB (Yeast Nitrogen Base) (Annexe), additionné de 0,5% de source de carbone est utilisé. Les substrats carbonnés sont : D-glucose, glycérol, calcium 2-céto-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, méthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside, N-acétyl-glucosamine, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-saccharose, D-tréhalose, D-mélézitose, D-raffinose, fructose et mannitol. L'assimilation de la source carbonnée se traduit par une

croissance de la souche dans le milieu après 3 à 7 jours à 28°C. Comme témoins, nous avons utilisé le milieu minimum contenant le glucose (témoin positif), et le même milieu exempt de source de carbone (témoin négatif).

➤ ***Tests d'assimilation des substrats carbonés « Test API 20C AUX »***

Afin de confirmer le test d'assimilation des sources carbonées, l'identification des souches par système API a été utilisée. L'API 20 C AUX est un système d'identification spécifique pour les levures les plus couramment rencontrées. La galerie API 20 C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation (Biomérieux, Belgique). Les substrats carbonnés sont donc, D-glucose, glycérol, calcium 2-céto-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, méthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside, N-acétyl-glucosamine, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-saccharose, D-tréhalose, D-mélézitose et D-raffinose. Les cupules sont chargées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Les plaques sont incubées pendant 48-72 heures ( $\pm 6$  heures), à une température de  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La lecture de résultats se fait par comparaison aux témoins de croissance (cupule avec milieu minimum seul). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Biomérieux, Benelux, Belgique**).

➤ ***Assimilation des nitrates***

L'assimilation des nitrates comme seule source d'azote représente un critère taxonomique très important. Elle représente un caractère d'ordre générique. Le milieu YCB-glucose (YCB : *Yeast Carbon Base*) (Annexe), additionné au 0,8% de nitrate de potassium a été utilisé. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 3 à 7 jours. L'assimilation de nitrate de potassium se manifeste par la présence d'un trouble dans le milieu de culture.

➤ ***Test de l'uréase***

L'activité uréase des levures est mise en évidence sur milieu Christensen (Annexe). L'uréase transforme l'urée en ammoniac, ce qui provoque l'augmentation de pH qui vire l'indicateur coloré. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose à violette vive dans le milieu de culture après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.

➤ **Résistance au cycloheximide**

Un milieu synthétique complet YNB–glucose est additionné avec 0,01% de cycloheximide. Ce test est utilisé pour mettre en évidence la résistance des souches levuriennes à cet inhibiteur, qui bloque la traduction chez les cellules eucaryotes. L'incubation des boîtes se fait à 25°C pendant 3 semaines. La croissance des levures après incubation révèle leur résistance au cycloheximide.

#### **3.2.1.4- Etude des caractères physiologiques**

L'étude des caractères physiologiques est réalisée par le test de croissance à 37°C et le test d'assimilation de NaCl.

➤ **Croissance à 37°C**

Les levures sont testées pour leur capacité à croître à une température de 37°C. Les souches ont été inoculées dans le milieu de culture YNB-glucose et les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 7 jours. Une culture positive se traduit par la présence d'un trouble dans le milieu de culture.

➤ **Résistance au NaCl**

L'osmophilie a été étudiée sur un milieu liquide YNB- glucose, contenant 16% de NaCl. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 3 à 7 jours. La croissance des levures dans ce milieu est considérée comme un résultat positif.

#### **3.2.2- Etude des caractères génotypiques**

Cette identification nécessite l'extraction de l'ADN à partir d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de régions spécifiques des unités de répétition de l'ADNr, tels que, le gène imbriqué codant pour l'ARNr 18S. Cette région comporte des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre des souches d'espèces différentes (**Heras-Vazquez et al., 2003**).

### 3.2.2.1- Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait à partir d'une culture liquide de l'isolat levurienne, par le kit «Wizard Genomic DNA Purification Kit (**Promega**)», selon le protocole suivant: un millilitre de la culture levurienne est d'abord centrifugé à 13,000x g pendant 3 minutes et le surnageant obtenu est éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré est suspendu dans 293 µL d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 7,5µl de l'enzyme lytique (lyticase) sont rajoutés et le mélange obtenu, est incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 300µL de «nuclei lysis solution» sont rajoutés et mélangés par pipetage. Les protéines sont éliminées par précipitation en rajoutant 100 µL de «protein precipitation solution», le mélange obtenu est incubé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13,000x g pendant 3 minutes et le surnageant obtenu est récupéré. Par ailleurs, la précipitation de l'ADN est effectuée par le transfert du surnageant dans des tubes propres contenant 300µL d'isopropanol et les mélanger par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN. Le mélange obtenu est centrifugé à 13,000-16,000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Ensuite, 300 µL d'éthanol 70% sont rajoutés et la préparation est centrifugée à 13,000-16,000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Après, l'éthanol est aspiré et le culot est séché (tube ouvert). Enfin, l'ADN séché a été remis en suspension dans 50µL de l'eau bi-distillée.

### 3.2.2.2- Amplification du gène ADNr 18S

L'amplification de la région 18S a été réalisée dans les conditions suivantes (protocole Promega) : chaque mélange réactionnel 25 µL contenait 250 ng ADN; 2,5 µL Taq buffer 10x avec KCl Fermentas, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chacun de dNTP; 0,5µM de chaque amorce de 18S et 0,62 U d'ADN Taq polymérase (Promega, France). Les amorces utilisées pour amplifier cette région sont, PROTO-1 (5'- CTT-TCG-ATG-GTA-GTG-TAT-TGG-ACT-AC-3') (**Karnati et al., 2003**) et PROTO-2 (5'- TGA -TCC -TTC- TGC- AGG -TTC -ACC- TAC - 3') (**Medlin et al., 1988**). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Bio-Rad programmé comme suit : une dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 min ; puis un programme de 35 cycles d'où, une dénaturation à 94 ° C pour 1min, une hybridation à 51 ° C pour 1 minute, une élongation à 72 ° C pour 3 min. Finalement, une étape d'extension à 72 ° C pendant 6 min. Les échantillons amplifiés ont été conservés à -20 ° C jusqu'à utilisation ultérieure.

### 3.2.2.3- Visualisation des produits de PCR par électrophorèse

Les produits de PCR amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant un système de gel horizontal. L'agarose est utilisé à une concentration de 1% (p/v). L'électrophorèse est réalisée dans le tampon TBE (5,4 g de tris base, 2,75 g d'acide borique et 2 ml de 0,5 M EDTA [pH 8,0] dans 1 litre d'eau distillée) à 100V. Le marqueur de taille utilisé est le 1kb ADN ladder (Fermentas). L'ADN est visualisé et photographié sous la lampe UV en utilisant un Transilluminateur (Bio-Rad).

#### **3.2.2.4- Séquençage des ADN amplifiés**

Les deux brins des produits amplifiés par PCR ont été séquencés par Progenus (Belgique). Les séquences obtenues sont corrigées par le programme bioedit (version 7.0.8.0). La comparaison de séquences corrigées avec celles des bases de données a été effectuée avec Blastn (BLAST, outil local de base de recherche d'alignement) au NCBI via le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

### **3.3- Production de lipase**

#### **3.3.1- Suivi de la production de lipase**

##### **3.3.1.1- Préparation de l'inoculum**

Les souches SPPVL sont repiquées préalablement sur boîte de Pétri contenant le milieu solide YPD. Après 48h d'incubation, une colonie bien séparée de chaque souche, est ensemencée dans des fioles de 250ml contenant 100ml du milieu liquide YPD. L'incubation est réalisée à 30°C, pendant 24h, avec agitation orbitale de 120rpm. Dix millilitres de ces précultures serviront à inoculer le milieu de production d'enzyme.

##### **3.3.1.2- Conduite de la fermentation**

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de fermentation. Le milieu de fermentation utilisé est le même milieu de production de lipase cité précédemment (voir section 3.1.5.2). La stérilisation du milieu est effectuée à 120°C pendant 20 min. Les erlenmeyers sont ensemencés par les inoculums préparés précédemment et puis incubées à 30°C sous agitation (120 rpm) pendant 120 h (**Destain *et al.*, 1997**). Le nombre de cellules et la production de lipase sont évalués chaque 24 heures.

### **3.3.1.3- Estimation de la biomasse**

Le nombre de cellules a été estimé par la méthode de comptage sur la cellule de Thomas ou Burkner (selon sa disponibilité dans le laboratoire). Des dilutions décimales des suspensions levuriennes ont été effectuées séparément dans 9mL d'eau physiologique stérile. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention de la dilution appropriée. Ensuite, une goutte de cette dernière est déposée sur la cellule de comptage afin de déterminer le nombre de cellules.

### **3.3.1.4- Dosage de l'activité enzymatique**

Les surnageants sont préparés par centrifugation de cultures de levures à 4°C, 8000 rpm. Ils sont utilisés comme source d'enzyme brute. L'activité enzymatique de la lipase est calculée par titrage des acides gras libérés à partir de la dégradation d'huile d'olive (**Mafakher et al., 2010**). Pour ce faire, une émulsion d'huile d'olive est préparée comme suit : huile d'olive (15ml), NaCl (30ml) et alcool polyvinylique (155ml). Pour la réalisation de la technique, un millilitre de chaque surnageant est ajouté à 5 ml de l'émulsion de l'huile d'olive et 4 mL de tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (0,1M, pH 7,0) (**Destain, 1998**). Des échantillons témoins sont préparés sans l'ajout de la solution enzymatique. Les milieux réactionnels sont incubés pendant 15 min à 37°C, sous agitation de 120 rpm. La réaction est arrêtée par addition de 20ml de solution stop (V : V, éthanol : acétone). Les acides gras libérés au cours de la réaction enzymatique sont déterminés par titrage avec du NaOH (0,05 N), en présence de phénolphthaléine comme indicateur. Une unité d'activité de lipase est définie comme l'activité qui libère 1  $\mu\text{mol}$  d'acide gras par minute.

## **3.3.2- Etude de l'influence du substrat inducteur**

L'effet de deux substrats inducteurs de production de lipase, en l'occurrence; l'huile d'olive et le tween 80, sur la croissance et l'activité lipolytique a été étudié.

### **3.3.2.1- Préparation des milieux de fermentation**

Pour la culture des SPPLV, un milieu de base composé de lactosérum et de liqueur de maïs (*corn steep liquor*) est préparé (voir section 3.1.5.2). Il est supplémenté, suivant le besoin, par l'huile d'olive et du tween 80 qui sont utilisés comme substrats cataboliques inducteurs de production de lipase. Pour ce faire, des concentrations progressives de l'huile d'olive sont ajoutées au milieu de base (0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% et 15%), cependant, la concentration de tween 80 est maintenue à 20% (W/W) de celles de l'huile d'olive pour toutes les cultures

(Papagora *et al.*, 2013). Le pH du milieu est ajusté à 6,5 et est réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 100 ml, puis stérilisé à 121°C pendant 20 min. Il est à rappeler qu'une culture sans tween 80 est réalisée pour établir des comparaisons.

### **3.3.2.2- Conduite de la fermentation**

Les erlenmeyers préalablement préparées avec différentes concentrations d'huile d'olive avec ou sans ajout du tween 80 sont inoculés avec 10 ml des précultures levuriennes et sont incubés en aérobiose, à 30°C pendant 48 h, sous agitation de 120 rpm. L'estimation de la biomasse et de l'activité lipolytique sont effectuées tous les 24 h. Le pH des cultures est mesuré à la fin de la fermentation.

## **3.4- Caractérisation partielle de la lipase**

### **3.4.1- Effet du pH**

L'effet du pH est mis en évidence par dosage de l'activité enzymatique comme il a été décrit précédemment (section 3.3.1.4) en modifiant le pH du milieu réactionnel. Les pH 5,0, 6,0, 7,0 et 8,0 sont obtenus à partir des solutions  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1M). Le pH 9,0 est obtenu par ajout de NaOH (0,1N). Les pH 3,0 et 4,0 sont obtenus par ajout d'acide citrique (0,1M).

### **3.4.2- Effet de la température**

Le dosage de l'activité enzymatique est réalisé selon la technique décrite dans la section 3.3.1.4, en faisant varier la température de la réaction, en l'occurrence 4, 20, 30, 37, 40, 50, 60 et 70°C.

## **3.5- Recherche de nouvelles potentialités de SPPVL**

### **3.5.1- Fermentation à l'état solide de SPPVL**

L'utilisation de grignon d'olive, de la variété algérienne *Chemlal*, comme substrat principal des SPPVL a été étudiée par fermentation solide.

#### **3.5.1.1- Préparation du milieu de fermentation**

Le grignon brut d'olive *Chemlal* est séché dans une étuve, pendant 1 heure à  $105 \pm 5$  ° C. Il est mis par la suite, dans un broyeur, bien nettoyé, pendant une demi-heure pour réduire la taille de particules. Par la suite, un tamisage est effectué afin d'avoir une taille régulière de toutes les particules (800µm) (**Moftah et al., 2012**). Dix grammes de GOC sont introduits dans les erlenmeyers de 250 ml, puis stérilisés. Ensuite, les erlenmeyers sont remplis par l'eau distillée stérile et un agent humidifiant pour former une concentration finale d'humidité de 70% et 90% (Annexe) (**Khoramnia et al., 2011**). Notant que, l'agent humidifiant est ajouté à raison de 1ml pour chaque erlenmeyer. Il est constitué essentiellement de milieu YPD supplémenté de 0,5% d'huile d'olive, avec ou sans ajout de tween 80 (20% de la concentration de l'huile d'olive). Les pH initiaux des milieux de culture sont ajustés à 6,5.

#### **3.5.1.2- Conduite de la fermentation**

Les milieux de culture préparés précédemment sont inoculés par un millilitre de préculture de SPPVL (section 3.3.1.1). L'eau ajoutée avec l'inoculum est pris en considération dans la concentration initiale d'humidité. L'incubation est réalisée à 30°C, pendant 120h. Un échantillonnage est effectué chaque 24 h, pendant 5 jours afin d'estimer la viabilité cellulaire et de mesurer l'activité lipolytique (section 3.3.1.4), après extraction. La mesure de pH n'est effectuée qu'à la fin des cultures.

#### **3.5.1.3- Viabilité cellulaire à partir d'une culture solide**

Cette méthode ne dénombre que les cellules viables. Elle consiste tout d'abord à réaliser une série de dilutions décimales en prélevant 1 g de l'échantillon et en l'homogénéisant dans 9mL d'eau physiologique stérile. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention de la dilution appropriée. Ensuite 100µl de cette dilution sont étalés sur milieu YPDA. Le comptage a été réalisé après l'incubation des boîtes pendant 48h, à 30C°. La concentration des cellules est obtenue en multipliant le nombre de colonies comptées dans une boîte par le facteur de dilution par gramme.

#### **3.5.1.4- Extraction de l'enzyme à partir de SSF**

Un gramme de chaque culture solide est prélevé, ajouté à 4 ml de tampon phosphate puis incubé à 30°C, pendant 30 min, sous une agitation de 120 rpm. Les échantillons sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min afin de récupérer le surnageant qui sera par la suite, dosé par la méthode titrimétrique (**Wolski et al., 2009**).

### 3.5.1.5- Mesure du pH du SSF

La mesure de pH en SSF sert à détecter l'acidité du milieu. Un gramme de l'échantillon solide (SSF) est dissous dans 10ml d'eau distillée. Le pH de la suspension obtenue est mesuré par un pH mètre (**Cordova et al., 1997**).

### 3.5.2- Fermentation sur un milieu minimal à l'huile d'olive

Cette application consiste à utiliser les SPPVL comme starters de culture dans un milieu minimal à base de l'huile d'olive. Les starters sont produits dans un fermenteur de 20 litres, afin de récupérer de grandes quantités de biomasse de chaque souche.

#### 3.5.2.1- Production de biomasse et de lipase de SPPLV

##### ➤ *Préparation physico-chimique du fermenteur de 20 l*

La composition chimique du milieu de fermentation est la même utilisée précédemment dans la section 3.1.5.2. Une fois préparé, le milieu est versé dans le fermenteur de 20l, à raison de volume réactionnelle de 10l. Ce dernier est stérilisé, après étalonnage de la sonde pH, placement des autres sondes (T°, oxygène dissous). La stérilisation est effectuée à 121°C pendant 20min.

Après ceci, les paramètres de la fermentation sont réglées à : une température de 30°C, un pH de  $6,5 \pm 2,0$ , une vitesse d'agitation de 284rpm et un débit d'oxygène dissous de 0,5VVM. Le milieu de fermentation est saturé en oxygène après 30 minutes et la sonde de mesure de la pression partielle en oxygène est alors étalonnée à 100% (**Destain, 1998**). Les consignes de cultures sont liées à une chambre de contrôle. La fermentation est arrêtée après 44h.

##### ➤ *Procédé de culture en fermenteur de 20l*

Le procédé de fermentation à grande échelle exige de faire un scale-up de culture. De ce fait, deux précultures sont préparées afin d'inoculer le fermenteur de 20l. Il s'agit, tous d'abord, de repiquer les souches SPPVL sur boîte de Pétri contenant le milieu solide YPD. Après 48h d'incubation, la première préculture est obtenue après ensemencement des colonies (de chaque souche), dans des fioles de 250ml contenant 100ml du milieu liquide YPD.

L'incubation est réalisée à 30°C, pendant 16h, avec agitation orbitale de 120rpm. Ensuite, dix millilitres de cette première précultures serviront à inoculer la deuxième préculture c.-à-d. l'inoculum proprement dit.

L'inoculum du fermenteur est préparé dans des fioles de 2l, contenant 500ml de milieu YPD stérile. Ces dernières sont inoculées par les premières précultures. Ils sont par la suite incubées, pendant 8h, dans les mêmes conditions citées précédemment (**Destain et al., 1997**). Le suivi de la production concerne principalement la viabilité cellulaire par la prise d'échantillons durant les 44h.

➤ ***Viabilité cellulaire à partir d'une culture liquide***

Cette méthode ne dénombre que les cellules viables. Elle consiste à réaliser une série de dilutions décimales en prélevant 1 ml de l'échantillon et en l'homogénéisant dans 9mL d'eau physiologique stérile. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention de la dilution désirée. Ensuite 100µl de cette dilution sont étalés sur milieu YPDA. Le comptage a été réalisé après l'incubation des boîtes pendant 48h, à 30°C. La concentration des cellules est obtenue en multipliant le nombre de colonies comptées dans une boîte par le facteur de dilution par millilitre.

➤ ***Séparation de la biomasse***

A la fin de la fermentation, le fermenteur est vidé et les cellules levuriennes sont lavées à l'eau physiologique ; puis récoltées par centrifugation. La centrifugeuse est de type AS 16 YRR de Sharpless (U.K.), dont le bol clarificateur tourne à une vitesse correspondant à un effet centrifuge de 4699g pendant 15 minutes. A la fin, la crème levurienne obtenue est utilisée comme starter pour la prochaine application.

### **3.5.2.2- Culture de SPPVL sur un milieu minimal à l'huile**

➤ ***Les conditions de culture***

Les cultures sont effectuées dans une émulsion de l'huile d'olive / eau distillée, dont l'huile d'olive est ajoutée à 5 % (W/V). Le milieu est préparé dans des erlenmeyers coniques de 2l, contenant un volume réactionnel de 800 ml. Chaque crème obtenue de SPPVL est utilisée comme starter dans ce milieu gras synthétique. Les SPPVL sont inoculées à une concentration finale dans le milieu est de  $10^7$  cellules/ml. Les cultures sont, ensuite, incubées à 30 ° C sous une agitation de 140 rpm. Le pH du milieu est ajusté à  $6,0 \pm 0,1$  et les échantillons sont

prélevés chaque 24h, pendant 10 jours. La concentration cellulaire est estimée en comptant les colonies sur milieu solide YPD.

➤ ***Matière Extractible à l'Hexane (MEH)***

Cette technique consiste à extraire et quantifier les acides gras non consommés par les levures, présents dans le milieu de fermentation. Pour ce faire, 10ml de milieu contenant des lipides non consommés, sont extraits deux fois en utilisant 20ml de l'hexane comme solvant. La phase organique est séchée à 60 ° C, dans un rotavapeur (Bunchi). le résidu restant dans le ballon est pesé après avoir incubé à 105 ° C ; c'est la Matière extractible d'hexane (MEH) (Alloue *et al.*, 2005).

➤ ***Mesure de la proportion d'acides gras libres des MEH***

La fermentation de milieu minimum à l'huile d'olive par SPPVL, engendre des acides gras libres qui provoquent le changement d'acidité. Celui-ci est exprimé par la mesure de l'acidité titrable totale (TTA) et le pH du milieu. Ces deux paramètres sont suivis au cours de la fermentation. Le dosage des acides gras libres (TTA) est fait par neutralisation à l'aide d'une base forte (NaOH, 0,1N) (Alloue *et al.*, 2005). Une masse connue de MEH est homogénéisée avec 50 ml de l'éthanol en présence de phénolphthaléine (comme indicateur). Le pourcentage d'acides gras libres est estimé par la formule qui suit:

**Acides gras libres (%)** = volume de base  $\times N_{\text{NaOH}} \times 282 \times 10^{-1}$  / (Masse de l'échantillon en g).

282 : correspond à la masse molaire de l'acide oléique.

N: Normalité du NaOH.

➤ ***Analyse des acides gras par Chromatographie en Phase Gazeuse***

La dérivation des acides gras en esters méthyliques est la technique la plus utilisée pour réaliser l'analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse. Les esters méthyliques sont couramment préparés par transestérification directe des triglycérides ou des phospholipides en présence d'un catalyseur comme le méthanol-BF<sub>3</sub> (Berdeaux *et al.*, 1998). La technique consiste à prendre 10mg de MEH, 0,2 ml d'hexane et 0,5 ml du mélange de transestérification (Méthanol-Bf<sub>3</sub>/Hexane/Méthanol: 25/20/55), qui sont introduits dans un tube Sovirel et placés sous agitation à une température de 70 ° C pendant 1h 30min. Après

refroidissement, les esters méthyliques d'acide gras (*Fatty Acids Methylic esters, FAME*) sont extraits par 8 ml d'hexane, 0,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de 0,5 ml de NaCl saturé. Les acides gras méthylés sont pris à partir de la phase supérieure après décantation. 1 µl de la phase hexane est injectée en chromatographie en phase gazeuse (CPG) (**Alloue et al., 2005**).

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des esters méthyliques est réalisée sur un Hp 6890 (Hewlett Packard) chromatographe à gaz équipé d'un détecteur à ionisation de flamme à 250 ° C. La colonne capillaire utilisée est de type Agilent Technologie de 30m de longueur, de 0,25 mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de 0,25 µm. L'injecteur est de type cool on column et le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1ml/min.

Le programme de température du four appliqué est le suivant :

- 55°C à 150°C à raison de 30°C/min ;
- 150°C à 250°C à raison de 5°C/min ;
- 250°C pendant 10 minutes.

La température de l'injecteur suit la même évolution, exception faite, que la température de l'injecteur est toujours supérieure de 3°C à la température du four.

Les témoins utilisés sont les suivants : acide butyrique (C4) acide heptanoïque (C7), acide caprique (C10), acide laurique (C12), acide palmitique (C16), acide stéarique (C18), acide oléique (C18 :1), acide linoléique (C18 :2) et acide arachidique (C20).

Les acides gras sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention et profils de fragmentation de masse avec celles des normes FAME 37 (Supelco component). Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif de chaque acide gras (**Alloue et al. , 2005**).

## Résultats

---

## 4- Résultats

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles potentialités de *Y. lipolytica*, isolée à partir de produits laitiers de vache et étude de sa potentialité à dégrader des déchets oléicoles. Pour ce faire, une comparaison est effectuée avec une autre souche levurienne isolée à partir de grignon d'olive, variété algérienne « *Chemlal* » GOC. Cette approche constitue une application biologique dans l'intérêt de la préservation de l'environnement.

### 4.1- Isolement des souches levuriennes

Les résultats d'isolement des levures sont exposés dans le tableau 4. L'isolement a permis de collectionner 98 isolats à partir de produits laitiers de vache et 25 isolats à partir de GOC. Les isolats sont répertoriés de manière que «L » code pour les levures isolées à partir du lait cru, « LF » code pour les levures isolées du lait fermenté - Raïb et « Lb » pour les levures isolées de Leben, par ailleurs, les isolats obtenus à partir de GOC sont codés par « G ».

Le regroupement des isolats est réalisé en tenant compte de l'aspect des colonies développées sur milieu gélosé en boîtes (YPD), des colonies, de diverses formes et de tailles (grandes, moyennes, petites), de reliefs variés (planes, élevées) et de couleurs multiples (blanches, jaunes, oranges, roses).

**Tableau 4** Isolement et purification des levures à partir des différents échantillons naturels explorés.

| Echantillons et leurs codes                  | Date d'échantillonnage | Provenance  | Milieux de culture utilisés    | Nombre d'isolats levuriens obtenus |
|----------------------------------------------|------------------------|-------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Grignon d'olive<br>« <i>Chemlal</i> »<br>“G” | Janvier                | Skikda      | Sab+chloramphenicol<br>et YPDA | 25                                 |
| Lait de vache cru<br>“L”                     | Septembre              | Constantine | Sab+chloramphenicol<br>et YPDA | 51                                 |
| Lait de vache fermenté-Raïb<br>“LF”          | Septembre              | Constantine | Sab+chloramphenicol<br>et YPDA | 25                                 |
| Le petit lait ou Leben<br>“Lb”               | Septembre              | Constantine | Sab+chloramphenicol<br>et YPDA | 22                                 |

## 4.2- Mise en évidence de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique des isolats levuriens est mise en évidence sur milieu à base de tributyrine. Après une incubation à 30°C pendant 3 jours, des zones de lyse sont observées. Le diamètre de ces zones est calculé selon la méthode de (**Griebeler *et al.*, 2009**). Les résultats sont mentionnés dans les tableaux 5 et 6. D'après ces derniers, 116 souches sur 123 testées sont positives à la production de lipase extracellulaire. Ceci peut être expliqué par la richesse de produits laitiers de vache (lait cru, Raïb et Leben) et le grignon d'olive *Chemlal*, en matière grasse. Seules, les isolats potentiellement lipolytiques sont retenues pour la production de vraie lipase sur milieu à base de l'huile d'olive (tableaux 5 et 6). Ces dernières sont réparties comme suit :

- Cinq souches provenant de produits laitiers, **L2, L30, LF2, Lb3a et Lb** dont le diamètre de zone de lyse est plus de 20mm.
- Une souche provenant de grignon d'olive *Chemlal*, **G5** dont le diamètre de la zone est égal à 20 mm.

**Tableau 5** Activité lipolytique des isolats levuriens obtenus des produits laitiers de vache.

| Isolat      | Origine         | Tributyryne | Isolat    | Origine         | Tributyryne |
|-------------|-----------------|-------------|-----------|-----------------|-------------|
| L3''        | Lait cru        | ++          | <b>L2</b> | <b>Lait cru</b> | ++++        |
| L''1        | Lait cru        | ++          | L4''      | Lait cru        | ++          |
| L5''        | Lait cru        | ++          | L6''      | Lait cru        | ++          |
| L'28        | Lait cru        | ++          | L'29      | Lait cru        | +++         |
| <b>L'30</b> | <b>Lait cru</b> | ++++        | L'24      | Lait cru        | +           |
| L'19        | Lait cru        | +           | L'13      | Lait cru        | ++          |
| L'20        | Lait cru        | +           | L'30      | Lait cru        | ++          |
| L'21        | Lait cru        | +           | L'22      | Lait cru        | +           |
| L'25        | Lait cru        | +           | L'26      | Lait cru        | +           |
| L'23        | Lait cru        | ++          | L'27      | Lait cru        | +           |
| L'29        | Lait cru        | +           | L'12      | Lait cru        | +           |
| L'14        | Lait cru        | +           | L7        | Lait cru        | ++          |
| L15         | Lait cru        | ++          | L8        | Lait cru        | ++          |
| L16         | Lait cru        | ++          | L27       | Lait cru        | ++          |
| L5          | Lait cru        | +           | L34       | Lait cru        | +++         |
| L29         | Lait cru        | ++          | L28       | Lait cru        | +           |
| L14         | Lait cru        | ++          | L10       | Lait cru        | +           |
| L5p2        | Lait cru        | ++          | L5p1      | Lait cru        | +           |
| L5a2        | Lait cru        | ++          | L5a1      | Lait cru        | ++          |
| L13         | Lait cru        | ++          | L33       | Lait cru        | +++         |
| L23         | Lait cru        | +           | L         | Lait cru        | ++          |
| L33         | Lait cru        | ++          | L34       | Lait cru        | ++          |
| L19         | Lait cru        | +           | L'13      | Lait cru        | -           |
| L19p        | Lait cru        | -           | L'23      | Lait cru        | -           |
| L'23g       | Lait cru        | -           | L1        | Lait cru        | -           |
| L2          | Lait cru        | -           |           |                 |             |
| LF'3        | Raïb            | +           | LF'2a     | Raïb            | ++          |
| LF'2        | Raïb            | ++          | LF'       | Raïb            | +           |
| LF'b        | Raïb            | +++         | LF'2b     | Raïb            | +++         |
| <b>LF'2</b> | <b>Raïb</b>     | ++++        | LF'p      | Raïb            | ++          |
| LF'm        | Raïb            | ++          | LF'1      | Raïb            | +           |
| LF3         | Raïb            | ++          | LFp2      | Raïb            | +++         |
| LF          | Raïb            | ++          | LF''1     | Raïb            | +           |

|         |       |     |             |              |      |
|---------|-------|-----|-------------|--------------|------|
| LF''p   | Raïb  | ++  | LF''2       | Raïb         | +    |
| LF''    | Raïb  | +++ | LF''b       | Raïb         | +++  |
| LF''3   | Raïb  | ++  | LF''4       | Raïb         | ++   |
| LF''6   | Raïb  | ++  | LF''5       | Raïb         | +++  |
| LF''tp1 | Raïb  | ++  | LF''tp2     | Raïb         | ++   |
| LF''tp  | Raïb  | ++  |             |              |      |
| Lb21''  | Leben | +   | Lb21'       | Leben        | +    |
| Lb8''   | Leben | +++ | Lb8'        | Leben        | +    |
| Lb39''a | Leben | ++  | Lb18''      | Leben        | ++   |
| Lb18'   | Leben | ++  | Lb39'       | Leben        | ++   |
| Lb1     | Leben | +   | Lb21        | Leben        | ++   |
| Lb4     | Leben | +   | Lb6         | Leben        | +    |
| Lb7     | Leben | +   | Lb2         | Leben        | +    |
| Lb8     | Leben | +   | <b>Lb3a</b> | <b>Leben</b> | ++++ |
| Lb3b    | Leben | +++ | Lb3         | Leben        | ++   |
| Lb1''   | Leben | +++ | Lb5         | Leben        | +    |
| Lb2''   | Leben | +++ | <b>Lb</b>   | <b>Leben</b> | ++++ |

(Suite Tableau 5) ; Les symboles représentent les diamètres des halos: + <10mm; + + entre 10 et 15 mm; + + + entre 15 mm et 20 mm; + + + + > 20 mm; - test négatif. **L** : lait cru, **LF** : lait fermenté-Raïb, **Lb** : Leben.

**Tableau 6** Activité lipolytique des isolats levuriens obtenus à partir de grignon d'olive *Chemlal* (GOC).

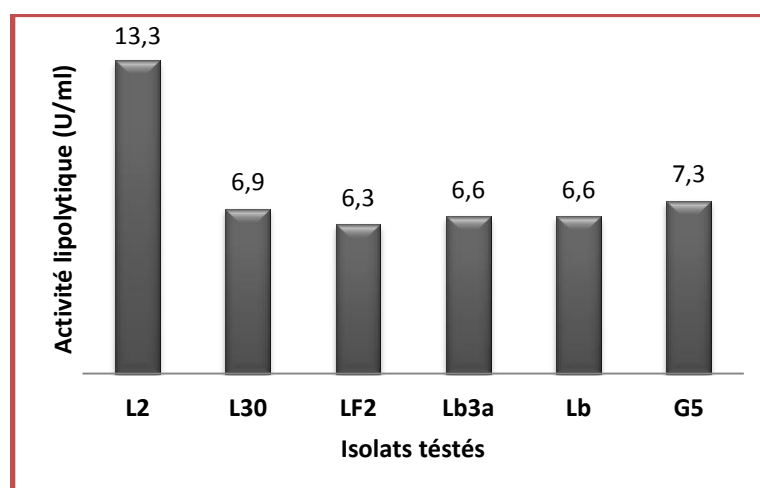
| Isolat | Tributyryne | Isolat    | Tributyryne |
|--------|-------------|-----------|-------------|
| G4     | ++          | <b>G5</b> | ++++        |
| G9     | ++          | G13       | ++          |
| G1b    | ++          | G2b       | ++          |
| G3b    | +           | G4b       | +           |
| G5b    | ++          | G6b       | +           |
| G1lb   | ++          | G2lb      | +           |
| G3lb   | +++         | G33lb     | ++          |
| G7lb   | ++          | G1G       | +           |
| G2G    | ++          | G3G       | ++          |

|     |    |     |    |
|-----|----|-----|----|
| G4G | +  | G5G | +  |
| G1g | -  | G2g | ++ |
| G3g | ++ | G4g | ++ |
| G6g | +  |     |    |

(Suite Tableau 6) ; Les symboles représentent les diamètres des halos: + <5 mm; + + entre 5 et 10 mm; + + + entre 10 et 15 mm; + + + + est 20 mm; - test négatif. **G** : grignon d'olive.

### 4.3- Production de vraie lipase

Les isolats potentiellement lipolytiques sélectionnées précédemment, sont cultivés dans un milieu liquide à base de l'huile d'olive. Après 48h d'incubation, l'activité lipolytique est dosée par titrage des acides gras libérés dans le milieu. Les résultats, représentés dans la figure 8, révèlent une variabilité de production de l'enzyme en fonction des souches. Par ailleurs, les plus fortes productrices sont L2 et G5 dont l'activité lipolytique est de 13,3 U / ml et 7,3 U/ml, respectivement. **Ces deux isolats sont considérés comme Souche Potentielles Productrice de Vraie Lipase (SPPVL).**



**Figure 8** Evaluation de la production de vraie lipase des isolats levuriens après 48h de culture; (■) activité lipolytique (U/ml).

### 4.4- Identification des levures

L'identification des SPPVL repose sur l'étude des caractères phénotypiques par la détermination du profil morphologique, biochimique et physiologique des souches identifiées comme telles ; à savoir L2 et G5. Elle est réalisée selon les clefs de détermination de **Wickerham (1951) ; Kurtzman et Robnett (1998)** et **Guiraud (1998)**.

L'identification génotypique des souches L2 et G5 est réalisée par extraction de leur ADN respectif, l'amplification du gène ADNr 18S et son séquençage.

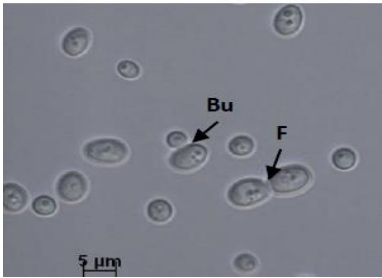
#### 4.4.1- Etude des caractères morphologiques

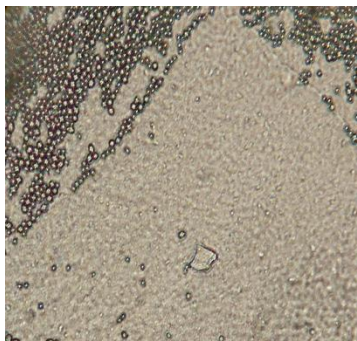
##### 4.4.1.1- Souche L2

L'étude des caractères morphologiques (cultureux et cellulaires) de la souche L2 sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7** Caractères morphologiques, cultureux et cellulaires, de la souche L2.

| Souche L2            | Milieux de cultures                                                                                    | Photos                                                                                |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Caractères cultureux | <b>Sur milieu solide (YPDA) :</b>                                                                      |  |
|                      | -des colonies arrondies, crémeuses, de couleur blanchâtre ;<br>-une taille des colonies de 4 mm à 5mm. |                                                                                       |
|                      | -des colonies à surface plate, lisses et brillantes.                                                   |  |
|                      | -une culture abondante sur gélose inclinée.                                                            |                                                                                       |

|                                              |                                                                                                                                                 |                                                                                                     |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              | <b>Sur milieu liquide (YPD)</b>                                                                                                                 |                  |
|                                              | - une culture en milieu liquide sous forme de voile et un culot au fond du tube.                                                                |                                                                                                     |
| <b>Caractères morphologiques cellulaires</b> | <b>A partir d'un milieu YPDA</b>                                                                                                                |                                                                                                     |
|                                              | <p>-une morphologie cellulaire ovale à ronde ;</p> <p>-un mode de reproduction par bourgeonnement (uni, bi et multipolaire) ou par fission.</p> | <p>(G×40)</p> <p>(G×100)</p>                                                                        |
|                                              | <b>A partir de milieu YPD</b>                                                                                                                   |  <p>(G×100)</p> |
|                                              | -une taille cellulaire d'environ 6μm de longueur et 4μm de diamètre.                                                                            |                                                                                                     |

|  |                                                                           |                                                                                                |
|--|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |                                                                           |                                                                                                |
|  | <b>Sur milieu PDA « test de filamentation »</b><br>-absence de filaments. | <br>(G×100) |

(Suite Tableau 7) ; **Bu** : bourgeonnement unipolaire, **Bb** : bourgeonnement bipolaire, **Bm** : bourgeonnement multipolaire, **F** : fission.

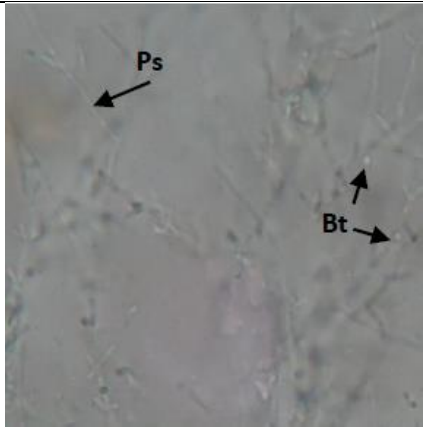
#### 4.4.1.2- Souche G5

L'étude des caractères morphologiques (cultureux et cellulaires) de la souche G5 sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8** Caractères morphologiques, cultureux et cellulaires, de la souche G5.

| Souche G5                   | Milieux de cultures                            | Photos                                                                                |
|-----------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Caractères cultureux</b> | <b>Sur milieu solide (YPDA) :</b>              |                                                                                       |
|                             | -des colonies crémeuses, ternes et rugueuses ; |  |
|                             | -une taille de colonies de 2 à 3mm.            |                                                                                       |
|                             | -des colonies d'aspect transversal convexes.   |  |
|                             | -une culture ondulée sur gélose inclinée.      |                                                                                       |

|                                              |                                                                                                                                |                                                                                                     |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              |                                                                                                                                |                                                                                                     |
|                                              | <b>Sur milieu liquide (YPD)</b>                                                                                                |                  |
|                                              | -une culture en milieu liquide sous forme de voile et un culot au fond du tube.                                                |                                                                                                     |
| <b>Caractères morphologiques cellulaires</b> | <b>A partir d'un milieu YPDA</b>                                                                                               |                                                                                                     |
|                                              | -une forme de cellules ovale allongée ;<br>-un mode de reproduction par des bourgeonnements unipolaire axial ou multilatérale. |  <p>(G×100)</p> |
|                                              | <b>A partir de milieu YPD</b>                                                                                                  |                                                                                                     |
|                                              | -une taille cellulaire d'environ 3µm de diamètre et 8µm de longueur.                                                           |  <p>(G×100)</p> |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                     |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p><b>Sur milieu PDA « test de filamentation »</b></p>                                                                                                                                                                                                                       |   |
|  | <p>-une filamentation sous forme de gros pseudo-mycéliums présentant des ramifications et des courts pseudo-mycéliums disposés en forme d'arbre ;</p> <p>-Présence de formes spécifiques ovoïdes formées correspondant aux <i>Blastospores</i> ou <i>Blastoconidies</i>.</p> |  |

(Suite Tableau 8) ; B : bourgeon, Ps : pseudohyphe, Bt : blastospore.

## 4.2- Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Les résultats de tests biochimiques et physiologiques des SPPVL : L2 et G5 sont présentés dans le tableau 9. Ils révèlent que la souche L2 n'a pas pu fermenter les sucres mis en test. En revanche, elle est capable d'assimiler le glucose, le fructose, le galactose, le glycérol et le N-acetyl glucosamine et aussi, d'utiliser le nitrate de potassium (comme source d'azote) et l'urée par production d'uréase. Les résultats montrent, aussi, que la souche L2 peut pousser sur des cultures avec 16% de NaCl et 0,01% de cycloheximide.

La souche G5 ne fermente que le glucose et le fructose ; malgré qu'elle est capable d'assimiler une panoplie de sources carbonées à savoir le glucose, le fructose, le saccharose, le xylose, le glycérol, l'adonitol, le xylitol, le sorbitol, le mannitol et le nitrate de potassium.

**Tableau 9** Tests biochimiques et physiologiques de SPPVL.

| <b>Souche</b><br><b>Substrat</b>            | <b>L2</b> | <b>G5</b> |
|---------------------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Fermentation de sucres :</b>             |           |           |
| Glucose                                     | -         | +         |
| Fructose                                    | -         | +         |
| Xylose                                      | -         | -         |
| Saccharose                                  | -         | -         |
| Lactose                                     | -         | -         |
| Maltose                                     | -         | -         |
| Amidon                                      | -         | -         |
| <b>Assimilation de substrats carbonés :</b> |           |           |
| Glucose                                     | +         | +         |
| Fructose                                    | +         | +         |
| Galactose                                   | +/-       | -         |
| Xylose                                      | -         | +/-       |
| L- Arabinose                                | -         | -         |
| Saccharose                                  | -         | +         |
| Lactose                                     | -         | -         |
| Maltose                                     | -         | -         |
| Amidon                                      | -         | -         |
| Glycerol                                    | +         | +         |
| calcium 2-Keto-Gluconate                    | -         | -         |
| Adonitol                                    | -         | +         |
| Xylitol                                     | -         | +         |
| Inositol                                    | -         | -         |
| D-Sorbitol                                  | -         | +         |
| Methyl- $\alpha$ D-                         | -         | -         |

|                      |   |   |
|----------------------|---|---|
| Glucopyranoside      |   |   |
| N-Acetyl-Glucosamine | + | - |
| D-Cellobiose         | - | - |
| D-Trehalose          | - | - |
| D-Melezitose         | - | - |
| D-Raffinose          | - | - |
| Mannitol             | - | + |
| Nitrate de potassium | + | + |
| 0,01% Cycloheximide  | + | - |
| Uréase               | + | - |
| 16%NaCl              | + | - |
| Croissance à 37°C    | - | - |

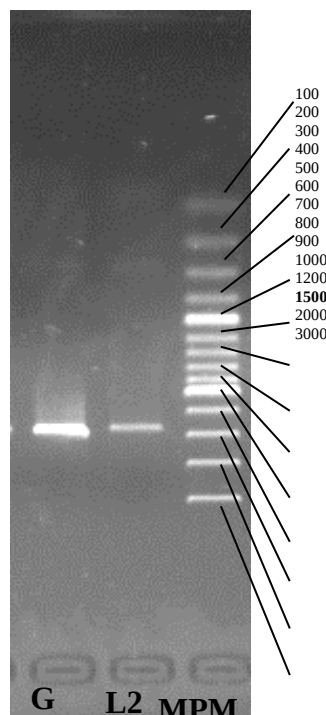
(Suite Tableau 9) ; Les symboles correspondent à, + : positif, - : négatif, +/- variable

L'identification des SPPVL par la fermentation et l'assimilation des sucres, en s'appuyant sur les critères morphologiques précédemment décrits, ont conduit aux espèces présumées : *Yarrowia lipolytica* (L2) et *Candida boidinii* (G5).

L'étude du profil d'assimilation des sucres des SPPVL par API 20 C AUX a confirmé l'identification précédente des deux souches *Yarrowia lipolytica* (L2) (99%) et *Candida boidinii* (G5) (99%), en se basant sur les résultats traités et fournis par la firme Biomérieux, Benelux (Belgique).

#### 4.3- Etude des caractères génotypiques

Pour assurer la position taxonomique des souches étudiées, nous avons fait appel à la méthode ADN<sub>r</sub> 18S. Cette technique compare les séquences nucléotidiques amplifiées de gène ADN<sub>r</sub> 18S à des séquences de la banque des données NCBI. La figure 9 illustre les résultats obtenus de la migration des produits PCR du gène ADN<sub>r</sub> 18S des deux souches L2 et G5.



**Figure 9** Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des deux souches levuriennes ; **G5** : produit PCR d'une souche levurienne isolée à partir de GOC ; **L2** : produit PCR d'une souche levurienne isolées à partir de lait cru de vache; **MPM (pb)**: marqueur de poids moléculaire d'ADN (1kb+ ladder).

Les produits PCR sont séquencés par Progenus (Belgique) et les séquences obtenues des ADN<sub>r</sub> 18S, des deux souches (L2 et G5), sont comparées à la banque des données (NCBI). Les résultats sont présentés sous forme d'un pourcentage d'identité exprimant le taux de similarité entre nos séquences d'ADN<sub>r</sub> et les séquences disponibles dans la banque des données. La souche L2 est identifiée comme *Yarrowia lipolytica* (99%) et enregistrée à la GenBank sous le numéro d'accèsion KF156787. Ce résultat confirme ceux, obtenu par les tests phénotypiques. La souche G5 est identifiée comme *Candida boidinii* (99%) et *C. ootensis* (99%). En notant, les résultats des tests phénotypiques réalisés précédemment il a été conclu, qu'il s'agit bel et bien du *C. boidinii*, enregistrée à la GenBank sous le numéro d'accèsion KF156789.

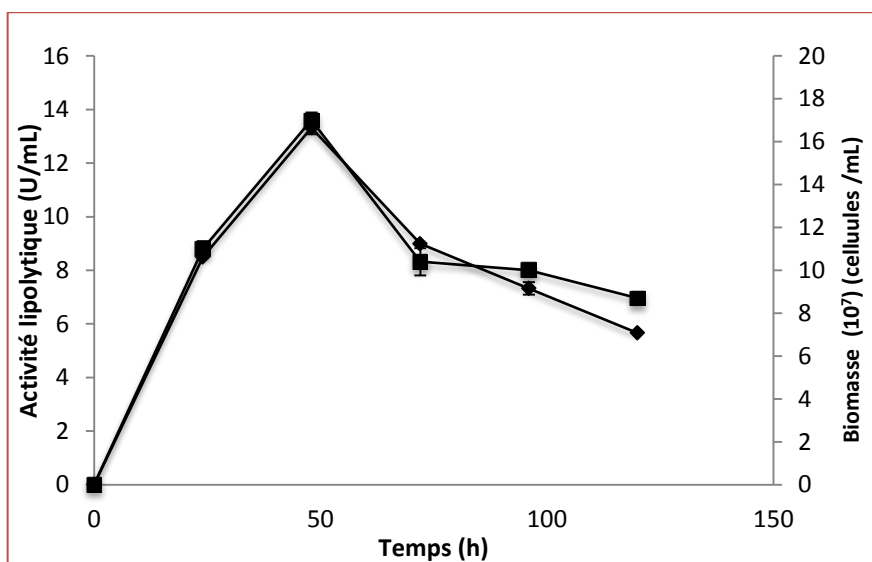
## 4.5- Production de lipase dans un milieu liquide (SmF)

### 4.5.1- Suivi de la production par *Y. lipolytica*

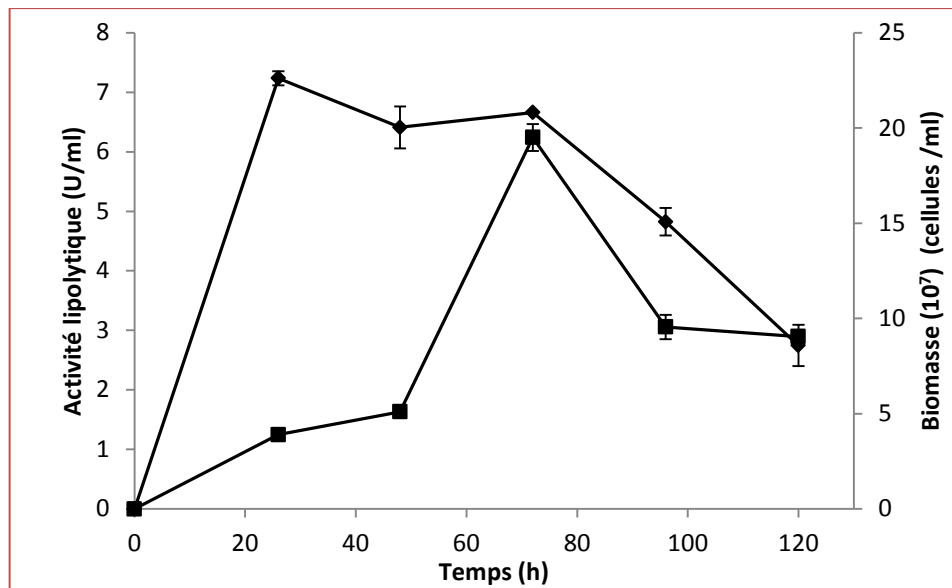
De nouvelles potentialités de la souche reposent sur la production de la lipase. La cinétique de la production de l'enzyme par *Y. lipolytica* L2 est effectuée par comparaison à la souche isolée *C. boidinii* G5. Les cultures sont réalisées sur milieu liquide à base de l'huile d'olive. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 10 et 11. D'après celles-ci, on peut remarquer que la production de biomasse, des deux souches, évolue selon la courbe de croissance microbienne dans un système batch. L'évaluation de cette biomasse pour *Y. lipolytica* L2, atteint son maximum de  $1,7 \cdot 10^8$  cellule/ml, après 48h de culture (figure 10), en revanche, *C. boidinii* G5 enregistre sa meilleure croissance ( $1,9 \cdot 10^8$  cellule/ml) après 72h de culture (figure 11).

Pour la production enzymatique, on peut constater que la lipase est produite, en tant que métabolite primaire, dans les premières phases de la croissance des deux souches.

Le suivi de la production de l'enzyme, dans le milieu de la culture, au cours de la fermentation a révélé que le maximum est atteint après 48h de culture pour *Y. lipolytica* L2 (13,3 U/ml) et après 24h de culture pour *C. boidinii* G5 (7,3U/ml).



**Figure 10** Evolution de la croissance cellulaire et de la production de lipase, au cours de la fermentation, de *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 : (■) biomasse (cellules/ml), (♦) activité lipolytique (U/ml).



**Figure 11** Cinétique de croissance et de la production de lipase au cours de la fermentation, de *Candida boidinii* G5 KF156789 : (■) biomasse (cellules/ml), (♦) activité lipolytique (U/ml).

#### 4.5.2- Etude de l'influence du substrat inducteur

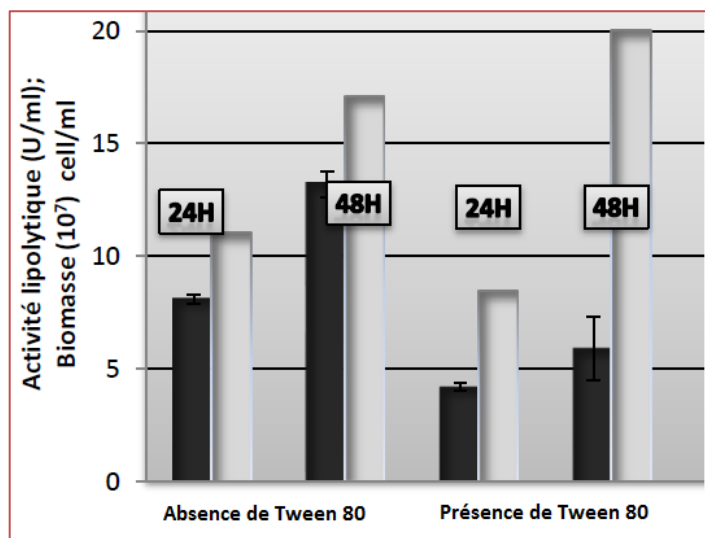
L'étude de l'influence du substrat inducteur a été réalisée dans le but d'améliorer la production d'enzyme par les isolats sélectionnés en l'occurrence, *Y. lipolytica* L2 et *C. boidinii* G5. La méthode repose sur la mise de la souche levurienne dans des conditions optimales de croissances, en présence des inducteurs de l'enzyme. Pour ce faire, les cultures de *Y. lipolytica* L2 et *C. boidinii* G5 sont testées sur différentes concentrations de l'huile d'olive avec ou sans tween 80. Le pH des milieux sont estimés à la fin de culture.

##### 4.5.2.1- Cas de *Yarrowia lipolytica* L2

###### ➤ Effet de tween 80 sur la production de la lipase

L'effet de la présence ou l'absence de tween 80 sur la production de lipase de *Yarrowia lipolytica* L2, est mentionné dans la figure 12. Dans un premier essai, l'huile d'olive est ajoutée à une faible concentration (0,5%), en présence et en absence de tween 80. D'après les résultats, on peut remarquer que la biomasse cellulaire atteint des concentrations maximales de  $1,9 \cdot 10^8$  cellules/ml, en présence de tween 80 et de  $1,7 \cdot 10^8$  cellules/ml, en absence de ce dernier, après 48h de culture. En revanche, l'activité enzymatique atteint le maximum de 5,7U/ml, en présence de tween 80 et de 13U/ml, en absence de celui-ci.

Par conséquent, cet agent tensioactif a augmenté légèrement la biomasse, en fin de culture. Cependant, son ajout a un effet réducteur sur la production de l'enzyme.



**Figure 12** Effet de tween 80 sur la production de la lipase et de la biomasse de *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787; (■) activité lipolytique (U/ml), (■) biomasse (cellules/ml).

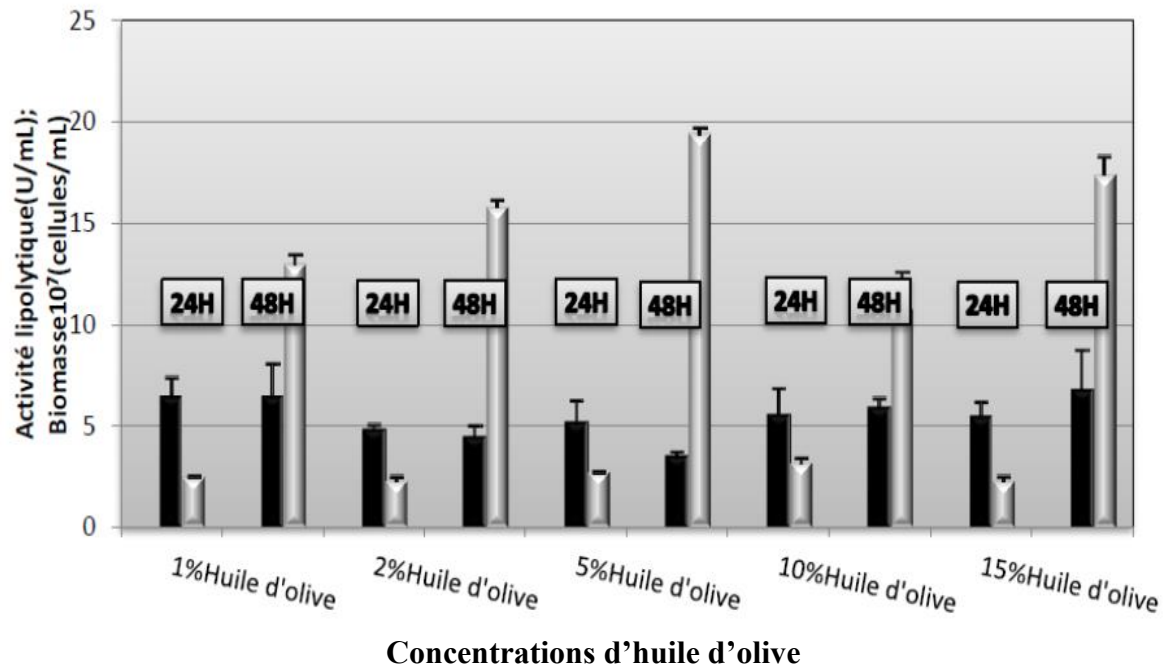
#### ➤ Détermination de la concentration optimale du substrat (huile d'olive)

Suivant les résultats obtenus précédemment, une étude sur l'effet de différentes concentrations de l'huile d'olive, sur la biomasse et l'activité lipolytique, a été effectuée (figure 13).

D'après les résultats, la production de biomasse a évolué d'une manière remarquable, avec l'augmentation des doses de l'huile d'olive (de 1% à 15%), correspondant à des valeurs de  $1,3 \cdot 10^8$  cellule/ml à  $1,7 \cdot 10^8$  cellule/ml, dont le maximum ( $1,9 \cdot 10^8$  cellules/ml) est observé avec la concentration 5%, après 48h de culture.

De même, l'activité enzymatique a connu une évolution variable, avec l'augmentation des doses de l'huile d'olive (de 1% à 15%), correspondant à des valeurs de 4,8U/ml à 6,8U/ml, dont le maximum (6,8U/ml) est observé avec la concentration 15%, après 48h de culture.

D'après les résultats exposés dans la section précédente et dans cette section, il est à noter que la concentration 0,5% d'huile d'olive est celle qui donne le meilleur rendement de l'enzyme.

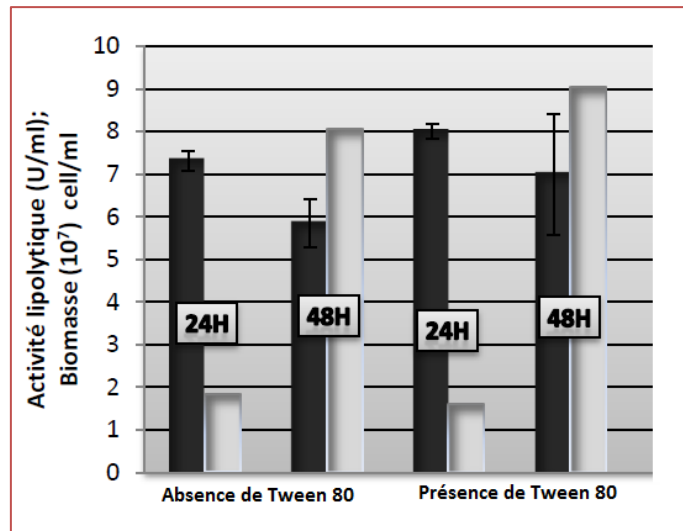


**Figure 13** Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la production de la lipase et la biomasse de *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 ; (■) activité lipolytique (U/ml), (■) biomasse (cellules/ml).

#### 4.5.2.2- Cas de *Candida boidinii* G5

##### ➤ Effet de tween 80 sur la production de lipase

L'évaluation de la croissance cellulaire et de l'activité lipolytique de la souche *Candida boidinii* G5, en ajoutant de faibles concentrations de l'huile d'olive (0.5%), en présence et en absence de tween 80, est représentée dans la figure 14. Les résultats montrent que la biomasse cellulaire atteint une concentration maximale de  $9.10^7$  cellules/ml, en présence de tween 80 qui est légèrement supérieure à celle observée en absence de celui-ci ( $8.10^7$  cellules/ml), après 48h de culture. De même, une légère différence est observée avec le maximum de l'activité enzymatique en présence de tween 80 (8 U/ml) et en absence de celui-ci (7,3U/ml) après 24h de culture. **Donc, la disponibilité de tween 80, dans le milieu de culture, peut influencer, mais d'une manière faible, la production de la biomasse et de l'enzyme.**



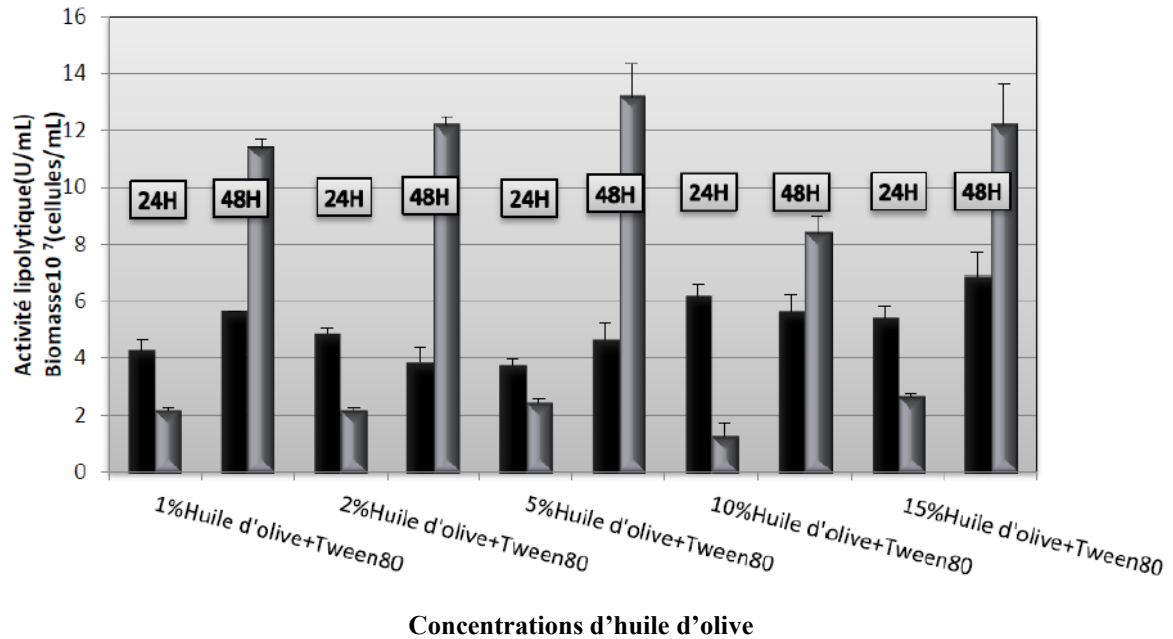
**Figure 14** Effet de tween 80 sur la production de lipase et de biomasse de *Candida boidinii* G5 KF156789; (■) activité lipolytique (U/ml), (■) biomasse (cellules/ml).

#### ➤ Détermination de la concentration optimale de substrat (huile d'olive et tween80)

Les résultats de l'effet des différentes concentrations de l'huile d'olive et le tween 80, sur la biomasse et l'activité lipolytique sont présentés dans la figure 15.

L'étude montre que la production de biomasse augmente avec l'augmentation de la concentration d'huile d'olive et tween 80 dont le maximum ( $1,3 \cdot 10^8$  cellules/ml) est observé, après 48h de culture, avec la concentration 5% d'huile d'olive avec tween 80. Par ailleurs, l'évolution de l'activité enzymatique est influencée d'une manière variable, d'une concentration à une autre, des deux inducteurs de production d'enzymes, mais le maximum 6,8U/ml est observé avec la concentration 15% d'huile d'olive avec le tween 80.

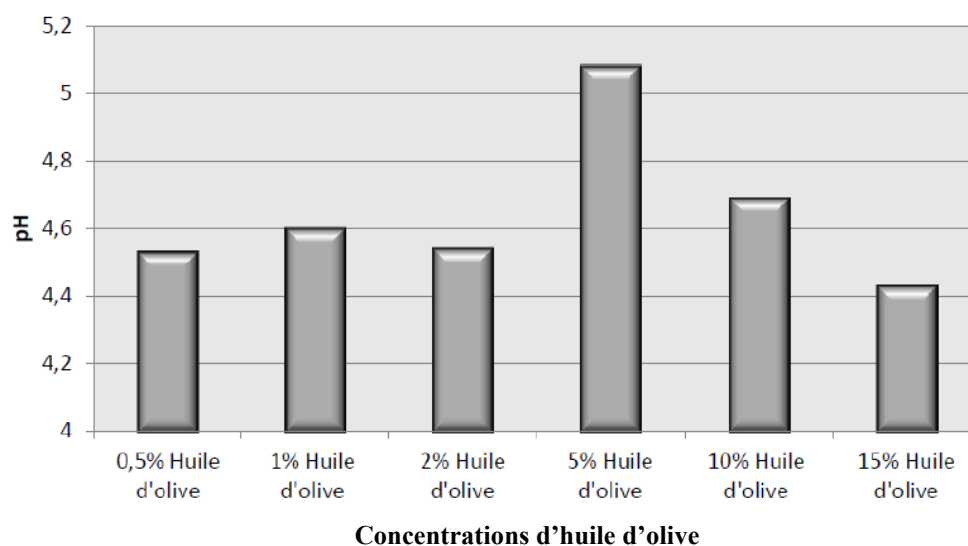
**D'après les résultats exposés jusqu'au là, il est à noter que la concentration 0,5% d'huile d'olive avec tween 80 est celle qui donne le meilleur rendement de l'enzyme et la concentration 5% d'huile d'olive avec celle correspondante de tween 80 donne la meilleure croissance cellulaire de *C. boidinii* G5.**



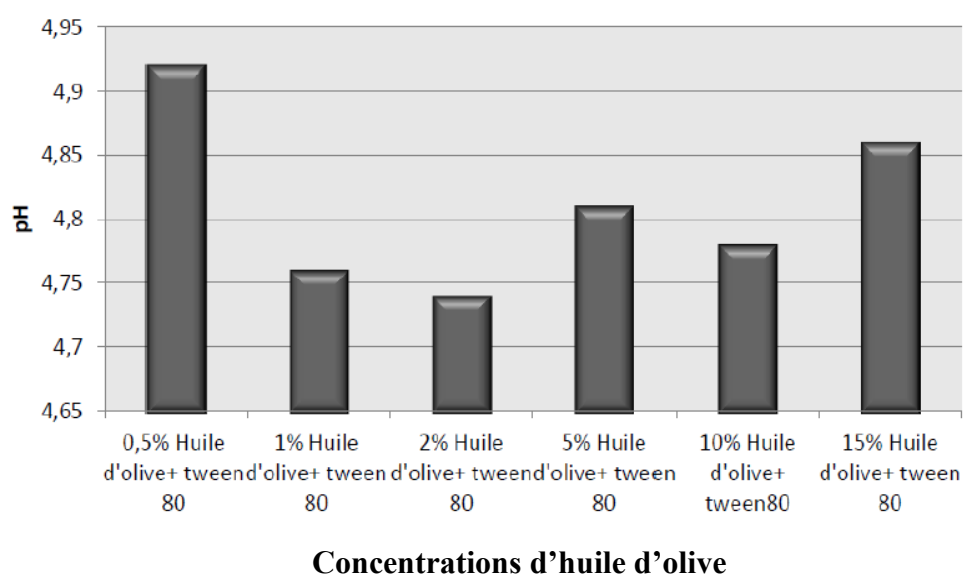
**Figure 15** Effet de la concentration de l'huile d'olive (avec tween80) sur la production de biomasse et lipase de *Candida boidinii* G5 KF156789; (■) activité lipolytique (U/ml), (■) biomasse (cellules /ml).

#### 4.5.3- Détermination du pH en fin des cultures : *Y. lipolytica* L2 et *C. boidinii* G5

Les résultats de mesure du pH, en fin de la culture (48h) de *Y. lipolytica* L2 montrent qu'il diminue par rapport à sa valeur initiale (6,5) (figure 16). Cette diminution reste variable selon la concentration d'huile d'olive. De même, la baisse de pH est observée avec *C. boidinii* G5, toujours, avec une variabilité en fonction des concentrations des deux inducteurs de production d'enzyme (figure 17).



**Figure 16** Valeurs du pH du milieu de culture de *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787, en fin de culture.



**Figure 17** Valeurs du pH du milieu de culture de *Candida boidinii* G5 KF156789, en fin de culture.

## 4.6- Caractérisation partielle de lipases

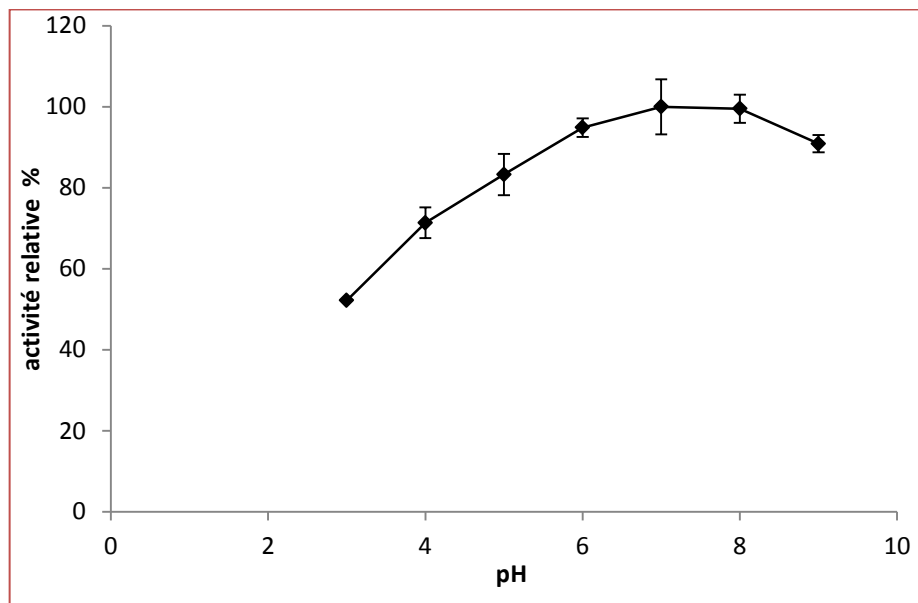
### 4.6.1- pH optimum de l'enzyme

Pour déterminer le pH optimum de lipases des deux souches levuriennes, différentes valeurs de pH sont testées.

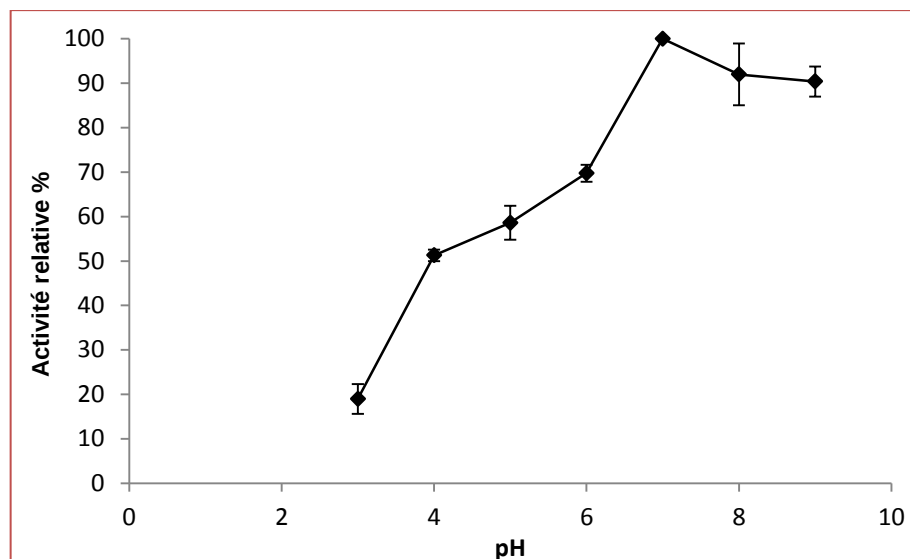
Les résultats représentés dans la figure 18, montrent que l'optimum de pH de lipase de la souche *Y. lipolytica* L2 est estimé à 7,0. En outre, l'enzyme produite est active dans un large

intervalle de pH. En effet, elle a pu conserver plus de 80% de son activité relative entre les pH 5,0 et 9,0 et environ 70% de son activité à pH 4.

Pour la souche *C. boidinii* G5, le pH optimum de sa lipase est de 7,0. Elle est plus active à pH alcalin, dans un intervalle compris entre 7,0 et 9,0, où elle conserve plus de 90% de son activité à pH 8,0 et 9,0. Contrairement, en pH acide, l'enzyme montre une diminution progressive de son activité relative allant de 70% à pH 6,0 jusqu'à 20% à pH 3,0 (figure 19).



**Figure 18** Effet de différentes valeurs de pH sur la lipase de la souche *Y. lipolytica* L2 KF156787 ; (♦) activité relative.

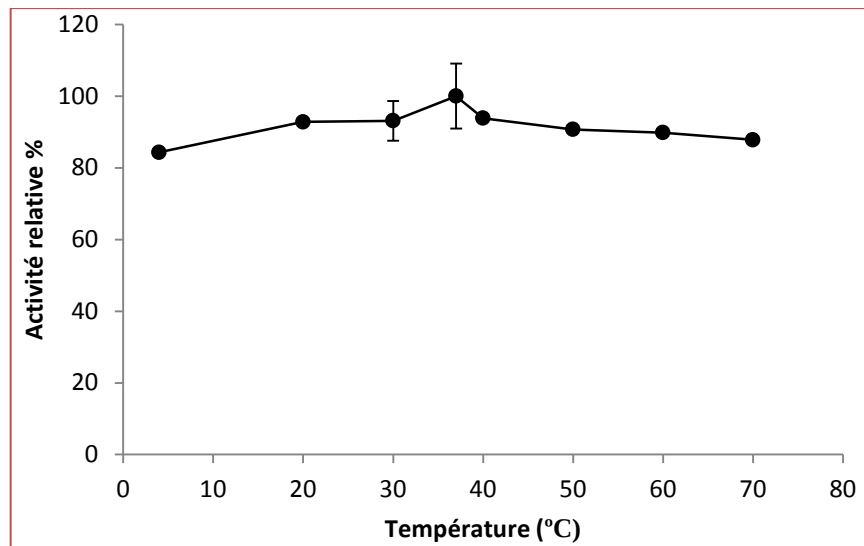


**Figure 19** Effet de différentes valeurs de pH sur la lipase de la souche *C. boidinii* G5 KF156789; (♦) activité relative.

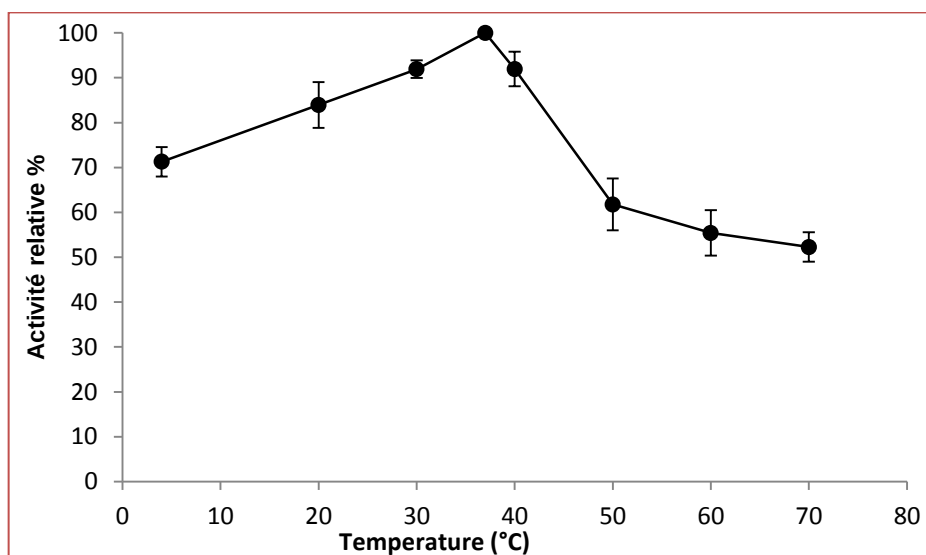
#### 4.6.2- Température optimale

Les résultats de l'étude de la température optimale de lipase de la souche *Y. lipolytica* L2 sont représentés dans la figure 20. La lipase produite par cette souche présente une activité relative maximale (100%) à une température de 37°C. Elle est très active dans une large gamme de température et garde plus de 90% de son activité entre 20 et 50°C et plus de 80% dans les températures 4, 60 et 70°C.

De même, la lipase produite par la souche *C. boidinii* G5 présente une activité relative maximale (100%) à une température de 37°C. Elle conserve environ 80% de son activité entre les températures 20 et 40 ° C et 70% de son activité à 4 ° C (figure 21).



**Figure 20** Effet de la température sur la lipase de la souche *Y. lipolytica* L2 KF156787; (●) activité relative.



**Figure 21** Effet de la température sur la lipase de la souche *C. boidinii* G5 KF156789; (●) activité relative.

#### 4.7- Recherche de nouvelles potentialités de *Y. lipolytica* L2

Le comportement de la souche lipolytique *Y. lipolytica* L2 a été étudié sur des milieux à base de matière grasse solide et liquide. Pour ce faire, une comparaison a été, toujours, effectuée avec *C. boidinii* G5, afin de ressortir les potentialités de la souche *Y. lipolytica* L2. Pour rappel, cette dernière a été isolée à partir du lait cru de vache.

#### 4.7.1- Fermentation sur milieu solide (SSF)

Cette application vise la valorisation de ce déchet, produit en quantité importante en Algérie, pour la production de la lipase. En effet, la souche *Y. lipolytica* L2 est utilisée dans cette approche accompagnée d'une comparaison dans les mêmes conditions expérimentale de *C. boidinii* G5. La fermentation est réalisée en utilisant le grignon d'olive *Chemlal* (GOC). Des cultures sont effectuées en erlenmeyers, à base de grignon d'olive, supplémenté de 1ml de l'agent humidifiant. L'effet du taux d'humidité (70% et 90%) sur la production de biomasse et de la lipase est mis en évidence. Les analyses sont accomplies tous les 24h, pendant les cinq jours.

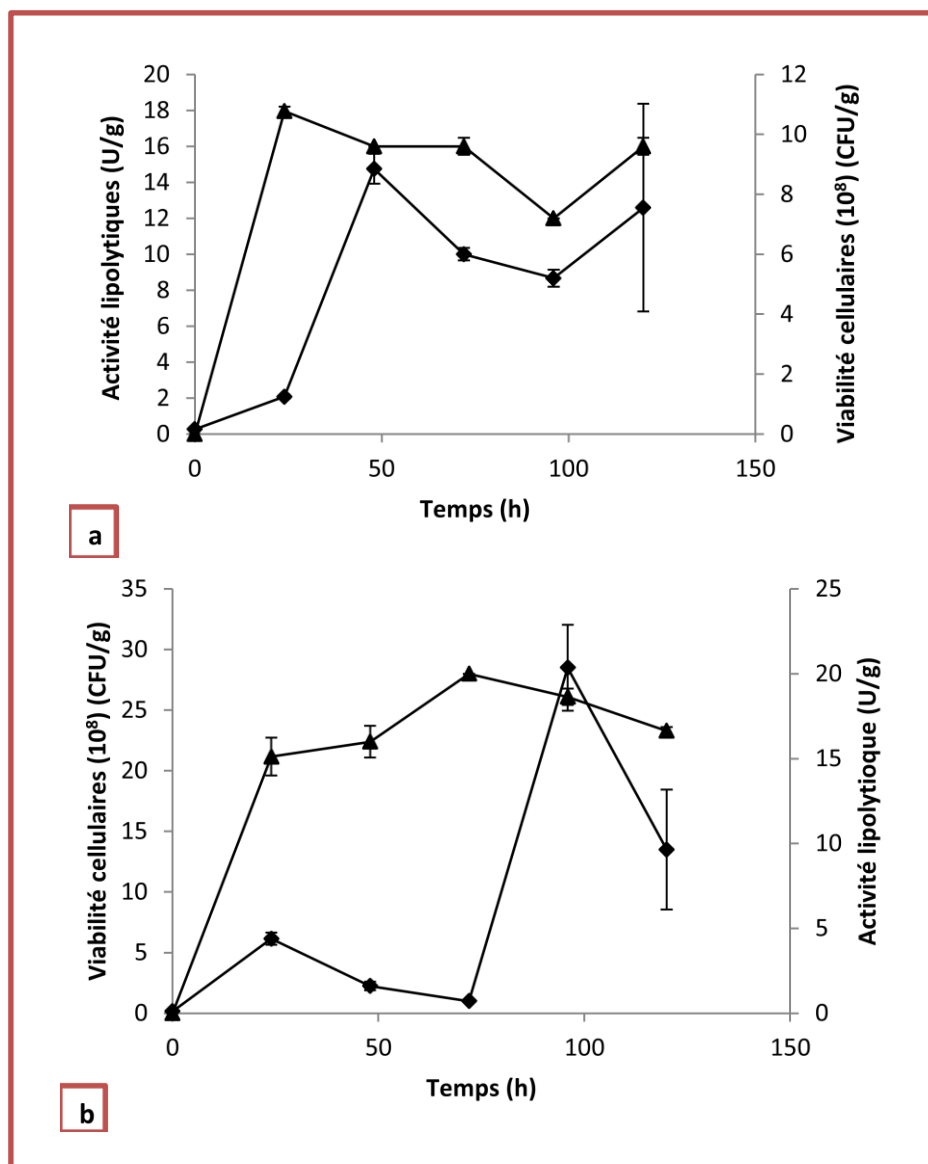
##### 4.7.1.2- Cas de *Yarrowia lipolytica* L2

Les résultats de l'étude de la fermentation sur milieu GOC par *Y. lipolytica* L2 sont illustrés dans la figure 22.

Cette souche subit différentes phases de croissance et de production de l'enzyme, durant la fermentation SSF, sous différents taux d'humidité.

A 70% d'humidité initiale, la production de biomasse et d'enzyme sont proportionnelle. De ce fait, il a été remarqué que, la concentration cellulaire maximale a atteint  $8,8 \cdot 10^8$  CFU/g après 48h et  $7,5 \cdot 10^8$  CFU/g, après 120h de culture. Par ailleurs, l'activité lipolytique atteint une valeur maximale de 18 U/g, après 24h de culture.

A 90% d'humidité initiale, il est à noter que la production de biomasse de *Y. lipolytica* L2 a atteint son maximum ( $2,8 \cdot 10^9$  CFU/g) après 96h de culture. D'autre part, l'activité lipolytique maximale (20 U/g) est obtenue après 72h heures de culture.



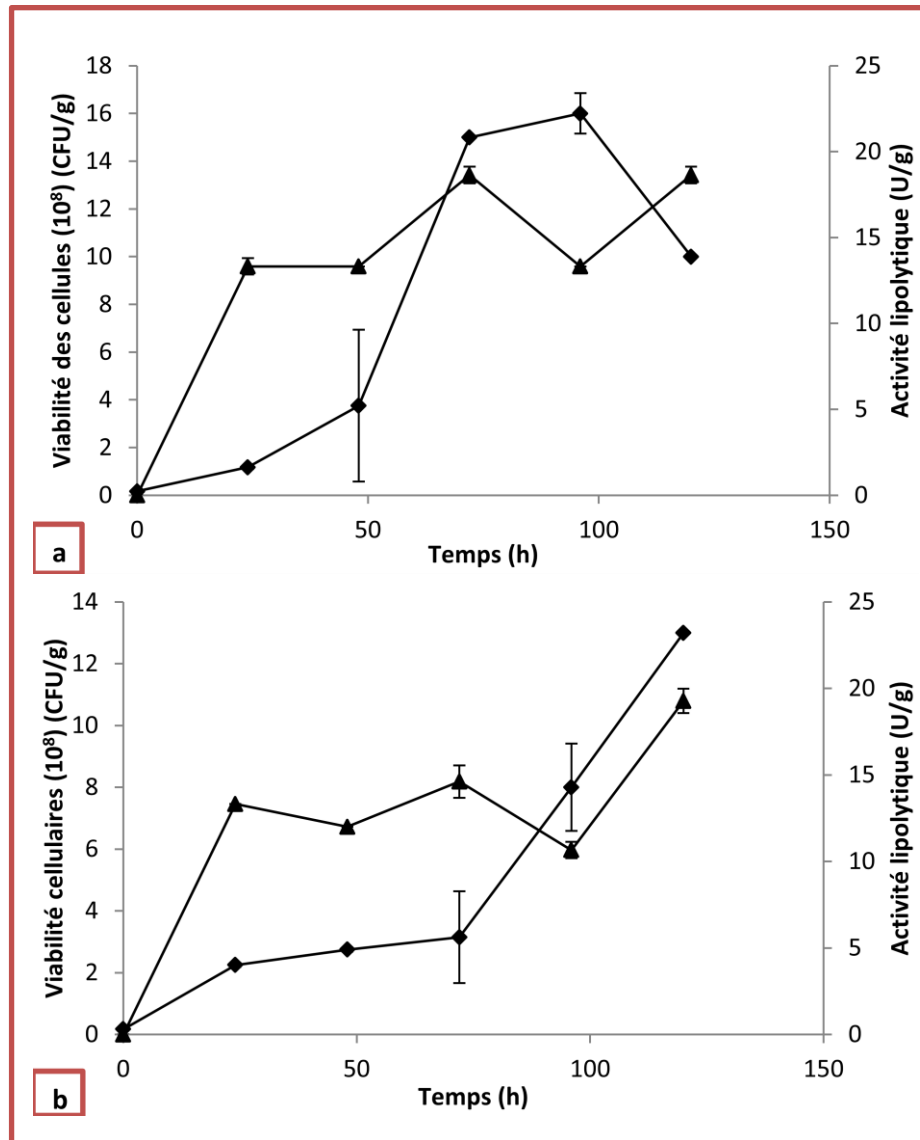
**Figure 22** Evaluation de la viabilité cellulaire et la production de lipase, durant SSF, de la levure *Y. lipolytica* L2 KF156787; (a) humidité initiale 70%, (b) humidité initiale 90% ; (▲) activité lipolytique (U/g), (◆) viabilité cellulaire (CFU/g).

#### 4.7.1.2- Cas de *Candida boidinii* G5

La production de biomasse et de l'enzyme par la souche *C. boidinii* G5 ont évolué progressivement, au cours de la fermentation solide à 70% d'humidité initiale. La concentration cellulaire a atteint un maximum de  $1,6 \cdot 10^9$  CFU/g, après 96h. Par ailleurs, la production maximale de lipase a atteint une valeur de 18,6 U/g, à 72h et à 120h (figure 23.a).

A 90% d'humidité initiale, les deux paramètres analysés précédemment évoluent proportionnellement, en fonction de temps. La viabilité cellulaire et de l'activité lipolytique

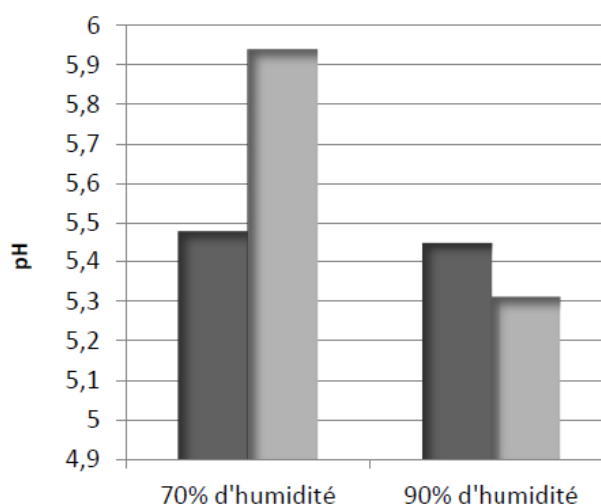
atteignent des valeurs maximales de  $1,3 \cdot 10^9$  CFU/g et 19,2U/g, respectivement, en fin de culture (figure 23.b).



**Figure 23** Evaluation de la viabilité cellulaire et de la production de lipase, durant SSF, de la souche *C. boidinii* G5 KF156789; **a** : humidité initiale 70%, **b** : humidité initiale 90% ; (▲) activité lipolytique (U/g), (♦) viabilité cellulaire (CFU/g).

#### 4.7.1.3- Détermination du pH en fin de cultures

En culture solide, les résultats de mesure du pH obtenus sont illustrés dans la figure 24. Les pH des cultures de *Y. lipolytica* L2 et de *C. boidinii* G5 sont diminués, à la fin de chaque fermentation, vis-à-vis de sa valeur initiale (6,5). Ceci est remarqué beaucoup plus en humidité initiale à 90% où l'activité lipolytique a été plus importante.



**Figure 24** Valeurs du pH du milieu de culture de *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 et *Candida boidinii* G5 KF156789, en fin de la fermentation solide ; (□) *Yarrowia lipolytica* (■) *Candida boidinii*.

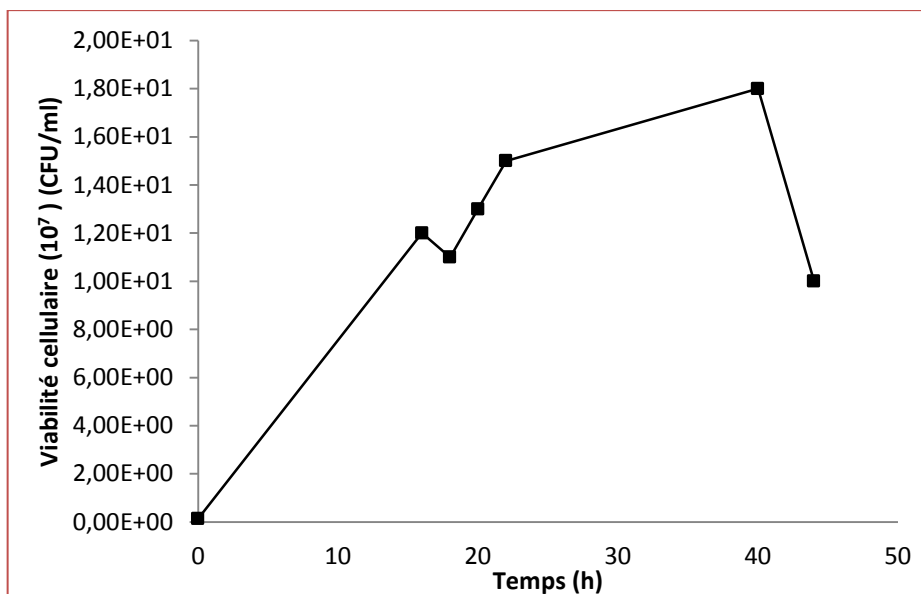
#### 4.7.2- Fermentation dans un milieu minimal à l'huile d'olive

La fermentation de *Y. lipolytica* L2, sur milieu liquide à base de corn steep et de l'huile d'olive, dans le fermenteur de 20l a été réalisée pour produire de la biomasse afin de l'utiliser comme starter dans un minimal liquide.

Pour des raisons techniques, cette partie de notre travail n'a pas été réalisée pour la souche *Candida boidinii* G5.

##### 4.7.2.1- Culture de *Yarrowia lipolytica* L2 en fermenteur

La figure 25 montre l'évolution de la viabilité cellulaire de *Y. lipolytica* L2, durant les 44 heures. Il a été remarqué que, la viabilité cellulaire atteint son maximum de  $1,8 \times 10^8$  CFU/ml, après 40h de culture. Après ce temps, la séparation de biomasse du reste du milieu, a permis de récupérer 747g de crème de levure *Y. lipolytica* L2.

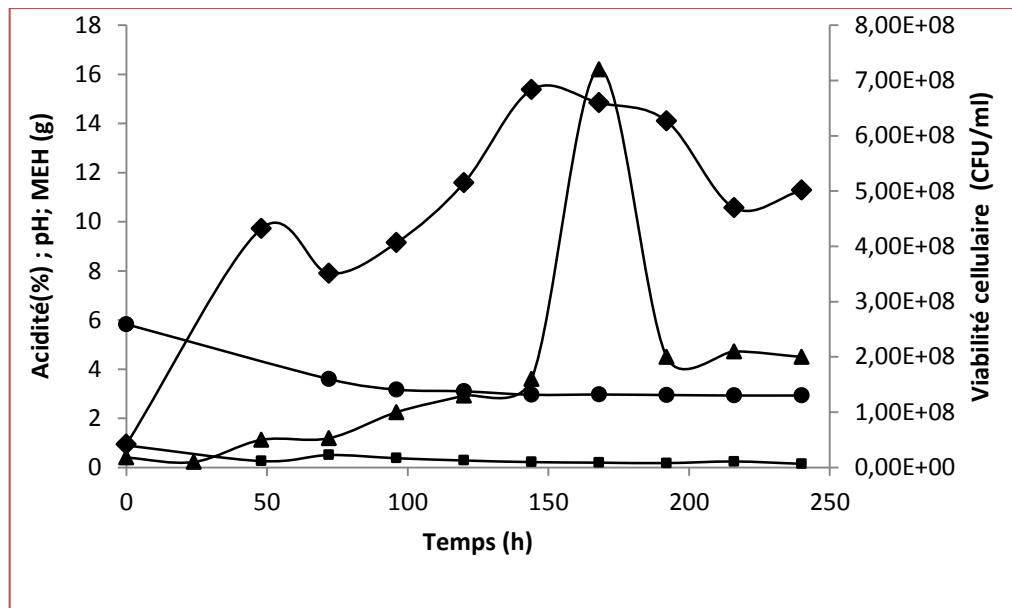


**Figure 25** Suivi de la culture de la souche *Y. lipolytica* L2 KF156787, en fermenteur de 20l ; (■) viabilité cellulaire (CFU/ml).

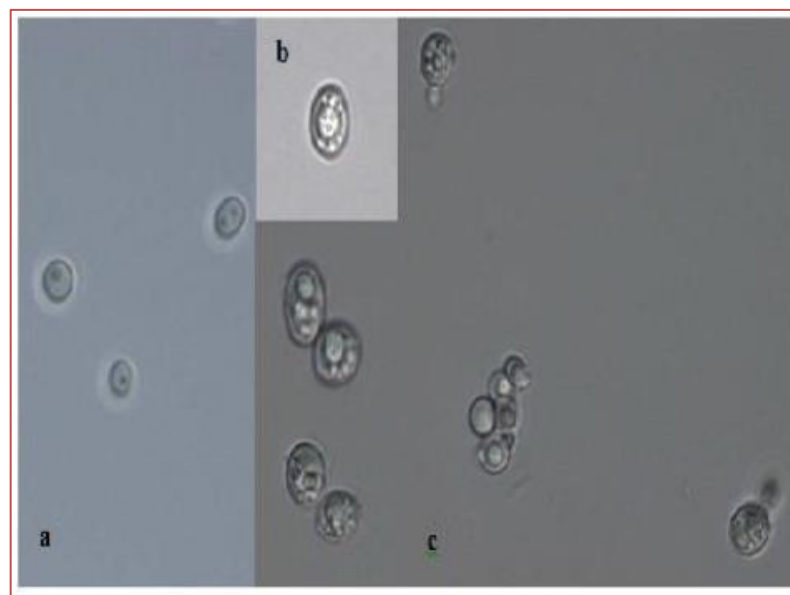
#### 4.7.2.2- Culture de starter dans un milieu minimal à l'huile d'olive

Un milieu minimal à base de l'huile d'olive a été préparé afin d'étudier le comportement de la souche *Y. lipolytica* L2. Cette dernière, est utilisée comme starter de culture, par inoculation de  $10^7$  cellules/ml dans ce milieu. Le profil de dégradation des acides gras totaux est représenté dans la figure 26. D'après celle-ci, on constate que la courbe de croissance montre un maximum de biomasse ( $7,2 \cdot 10^8$  CFU / ml) atteint, après un temps assez long, de 7 jours, tout en diminuant durant la dernière phase de la fermentation. En outre, des changements physico-chimiques dans le milieu de culture, engendrés par la croissance des cellules, ont été détectés. En effet, la quantité de substrat restant dans le milieu exprimée par la MEH (Matière extractible à l'hexane) a diminué de 0,8g à 0,1g, durant la culture. Cependant, l'acidité du milieu a augmenté pour atteindre son maximum (>15%) au 6<sup>ème</sup> jour, exprimée aussi par la baisse du pH de 6.0 à 2.9 mesuré, au début et au 7<sup>ème</sup> jours, avec une tendance de stabilité vers la fin de la fermentation.

La figure 27.b montre clairement la présence des corps gras lipidiques dans les cellules de *Y. lipolytica* L2 dans le milieu minimal à l'huile d'olive par comparaison à leur présence dans un milieu ordinaire YPD (figure 27.a). La colonisation des grosses gouttelettes d'huile d'olive se fait par les cellules de *Y. lipolytica* L2 pour les transformer en fines gouttelettes (figure 27.c).



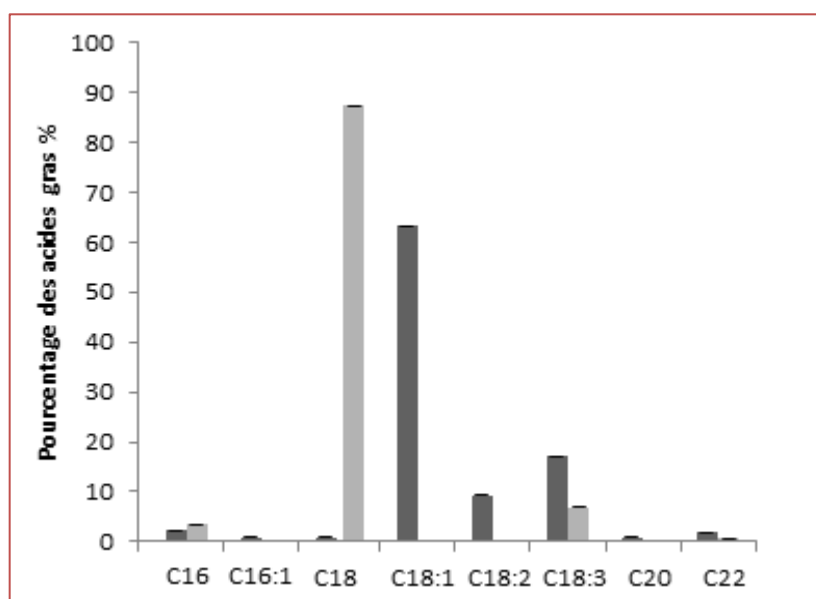
**Figure 26** Profil du développement cellulaire, MEH et acidité du milieu, durant la culture de *Y. lipolytica* L2 KF156787 dans un milieu minimal à l'huile d'olive ; (▲) viabilité cellulaire (CFU/ml), (■) MEH (g), (♦) acidité titrable (%), (●) pH.



**Figure 27** Interaction entre la levure *Y. lipolytica* L2 KF156787 et l'huile d'olive; (a) cellules dans un milieu YPD (comme témoin), (b) stockage de l'huile à l'intérieur des cellules, (c) la colonisation de la goutte d'huile par *Y. lipolytica* L2.

#### 4.7.2.3- Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse qualitative et quantitative des fractions lipidiques, issues de la dégradation d'huile d'olive présente dans le milieu minimal, par les cellules de *Y. lipolytica* L2, a été effectuée par CPG. Les résultats montrent des changements au niveau de quantités des acides gras libérés (AGL), au début et à la fin de la culture, c'est-à-dire, après 10 jours (figure 28). Au début de la culture, la composition en acides gras totaux indiquent que l'acide oléique (C18: 1,63%), a prévalu la composition chimique de milieu de fermentation ; c'est le composant principal de l'huile d'olive. En fin de la culture, il semble que la consommation d'acides gras a eu lieu pendant les 10 jours de fermentation. Les quantités des acide gras, à savoir : l'acide palmitique (C16), l'acide palmitoleique (C16 :1), l'acide oléique (C18 : 1), l'acide linoléique (C18 : 2), l'acide linolénique (C18 : 3), l'acide arachidique (C20) et l'acide béhénique (C22) ont été épuisées à la fin de la culture. D'autre part, il est à signaler qu'une quantité d'acide stéarique (C18) a augmenté fortement (87%), en fin de culture.



**Figure 28** Profil d'acides gras majeurs trouvés dans le milieu minimal à l'huile d'olive, détectés par CPG; (■) au début de culture; (□) après 10 jours de culture.

## Discussion

---

## 5-Discussion

L'Algérie est parmi les pays méditerranéens producteurs de l'huile d'olive. Une fois l'huile extraite, les déchets de l'industrie oléicoles sont souvent lâchés dans la nature, or, ces résidus sont toxiques (**Benyahia et al., 2003**). Lorsque ceux-ci sont rejetés dans la nature sans traitement, une contamination des nappes phréatiques, des cours d'eau et des sols est enregistrée.

L'approche de cette étude s'inscrit dans la contribution à développer des systèmes biologiques permettant de prévenir à ce problème environnemental. Ceci passe par la récupération et la valorisation des déchets oléicoles, en produits à haute valeur ajoutée. A notre connaissance, ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement au niveau national. Les méthodes de valorisations, par voie microbiologique (en utilisant des levures lipolytiques), semblent être efficaces et moins coûteuses. C'est dans cette optique que l'objectif de ce travail trouve son évolution en traitant les points suivants :

- La réalisation d'un screening des levures capables de dégrader les déchets oléicoles. Ces levures sont recherchées dans le lait de vaches et du grignon d'olive de la variété Algérienne *Chemlal* (GOC), développant la potentialité lipolytique. Il est à signaler que l'utilisation de GOC comme source de levures lipolytiques peut être considérée comme une nouvelle piste qui n'a pas été exploitée auparavant.
- L'application du procédé est effectuée sur un déchet oléicole solide (GOC), provenant d'une huilerie locale.

L'isolement des levures à partir de produits laitiers de vache et de grignon d'olive variétés *Chemlal* a été effectué sur milieu Sabouraud additionné du chloramphénicol. Le chloramphénicol sert comme un inhibiteur de la croissance bactérienne ; car les bactéries sont naturellement présentes en grande quantité dans les produits laitiers (**Wouters et al., 2002**). La purification des souches levuriennes sur milieu Yeast Peptone Dextrose Agar a permis de collectionner 51 souches à partir du lait cru, 25 souches à partir du raïb et 22 à partir de leben, ainsi que, 25 souches à partir du grignon d'olive *Chemlal*. Selon **Corbaci et al., 2011**, les produits laitiers constituent un bon environnement pour le développement des souches levuriennes à cause de leur richesse en protéine, en sucres, en lipides, en acides organiques et en sels minéraux. En effet, différentes espèces de levures ont été isolées à partir des produits laitiers de vache à savoir : *Cryptococcus curvatus*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon*

*cutaneum*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *Yarrowia lipolytica* et *Kluyveromyces marxianus* / *Kluyveromyces lactis* (Gadaga *et al.*, 2000 ; Alvarez-Martina *et al.*, 2007 ; Deak, 2007 ; Lopandic *et al.*, 2006).

De par sa composition riche en cellulose, en matière grasse, en matière azotée et en matière minérale (Nefzaoui, 1984), le grignon d'olive peut, également, constituer une bonne source d'isolement de levures. D'après Obradors *et al.* (1993), les corps gras naturels ont un effet stimulant sur la production de lipase. **Dans ce contexte, nous avons choisi les produits laitiers de vache et le grignon d'olive de la variété algérienne Chemlal comme source pour isoler les souches levuriennes lipolytiques.** Des études antérieures ont utilisé des produits laitiers de vache pour l'isolement des levures lipolytiques, à cause de leur richesse en matières grasses (4,7% de la matière sèche pour le lait cru) (FAO, 1998 ; Papanikolaou *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2007 ; Fickers *et al.*, 2011). Par ailleurs, et à notre connaissance, l'isolement de levures lipolytiques à partir de grignon d'olive n'a pas été, au paravent, exploité, malgré, la proportion de matière grasse (37,5% de la matière sèche) (Moussaoui et Youyou, 2005).

La culture des levures lipolytiques, effectuée sur milieu solide à base de tributyrine, a permis de présélectionner 116 souches positives à la production de lipase. La tributyrine constitue l'inducteur de la production lipolytique dans ce milieu. En effet, les levures lipolytiques oxydent la tributyrine en acide butyrique par la libération de l'enzyme, ce qui se traduit par la formation d'un halo clair autour des colonies (Dommen, 1954). Seules, six souches levuriennes ont été retenues comme des présumées fortes productrices de lipase, pour être confirmées comme des productrices de vraies lipases.

La production d'une vraie lipase a été effectuée sur un milieu à base de l'huile d'olive utilisée comme inducteur. A ce stade, deux souches sur six se sont révélées comme potentiellement productrices de vraie lipase par quantification de l'enzyme. Il s'agit de la souche L2 et la souche G5. D'après, Glogauer *et al.* (2011), les vraies lipases attaquent les triglycérides, qui contiennent des acides gras à longue chaîne, comme l'huile d'olive.

L'identification, des deux souches potentiellement productrices de vraie lipase, par caractérisation phénotypique, a révélé qu'il s'agit de *Yarrowia lipolytica* L2 et *Candida boidinii* G5. Le séquençage du gène ADNr 18S a permis de confirmer leur identification préalable. Elles ont été enregistrées à la GenBank sous les codes d'accès *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 et *Candida boidinii* G5 KF156789. Il est intéressant de rappeler que

*Yarrowia lipolytica* L2 est isolé du lait de vache, quant à *Candida boidinii* G5, il est obtenu de grignon d'olive *Chemlal*.

L'identification de la souche potentiellement productrice de lipase, *Y. lipolytica* L2 confirme les résultats retrouvés par **Yu et al. (2007)** ; **Lopes et al. (2008)** ; **Corbo et al., (2001)** ; **Lopandic et al., (2006)**, qui ont révélé que des souches lipolytiques de *Y. lipolytica* ont été isolées à partir du lait cru de vache.

Par ailleurs, les souches de *Candida boidinii* sont considérées comme des souches méthylotrophe (**Janatova, 1992**) non productrices de lipase (**Ciafardini et al., 2006**). Par la suite, ces données ont été controversées par d'autres études qui ont rapporté que les souches de *C. boidinii*, isolées durant le processus de fermentation d'olive, peuvent produire de la lipase (**Arroyo-Lopez et al., 2008** ; **Bautista-Gallego et al., 2011** et **Rodriguez-Gomez et al. , 2010** ; **Rodriguez-Gomez et al. , 2011**). **Dans notre étude, *C. boidinii* isolée d'un déchet oléicole, ne produit pas seulement de lipase, mais elle est sélectionnée comme étant potentiellement productrice de lipase.**

Dans ce travail, une étude comparative entre ces deux souches lipolytique potentielles, en l'occurrence, *Y. lipolytica* L2 et *C. boidinii* G5, a été effectuée, afin de ressortir les nouvelles potentialités de la souche *Y. lipolytica* L2.

Pour la production de biomasse et de lipase en erlenmeyers, il a été constaté que la production de lipase est plus rapide mais, moins importante chez *C. boidinii* (7,3U/ml après 24 heures), en comparaison à celle de *Y. lipolytica* L2 (13,3U/ml après 48heures). Nos résultats concordent avec ceux signalés par certaines études qui ont montré que plusieurs souches du genre *Candida sp.* produisaient de l'enzyme à des quantités, variant selon les souches, allant de 5,5U/ml (**Krastanov et al., 2008**), jusqu'à un maximum de 11 U/ml (**Tan et al., 2003**). Cependant, les travaux de **Destain et al. (1997)**, ont montré que la souche sauvage *Y. lipolytica* CBS 6303 a pu produire jusqu'à 28U/ml de lipase, après 72heures de culture.

Il est intéressant, aussi, de signaler que la production de biomasse et celle de l'enzyme de *Y. lipolytica* L2 sont corrélativement liées, ce qui concorde avec les résultats trouvés par **Corzo et Revah (1999)**. Par contre pour la souche *C. boidinii* G5, la production de biomasse et de lipase ne sont pas vraiment corrélées, où la production de l'enzyme est plus rapide que la production de biomasse. Ceci peut s'expliquer, par l'activité enzymatique de lipase, produite par les cellules levuriennes, qui dégrade l'huile d'olive en conduisant à la formation des

acides gras libres dans le milieu et qui sont par la suite, assimilés par les levures (**Obradors et al., 1993**).

A la fin des fermentations, la production de biomasse et de l'activité lipolytique des deux souches levuriennes diminuent brutalement. Ceci est probablement dû à l'influence de différents facteurs physicochimiques qui deviennent défavorables à leur croissance et par conséquent, à la production d'enzyme et de son activité lipolytique ; telles que l'épuisement du substrat, la diminution du pH, la production des inhibiteurs et la présence des protéase (**Ghosh et al., 1996 ; Borkar et al., 2009 ; Açikel et al., 2011**).

L'étude de l'influence de deux substrats inducteurs, l'huile d'olive et le tween 80, sur la production de biomasse et de lipase a été réalisée pour les deux souches lipolytiques.

D'après les résultats il a été constaté que la production de biomasse et de l'enzyme par *Y. lipolytica* L2 sont affectées par l'ajout de tween 80 dans le milieu. En effet, la souche se développe légèrement mieux en présence de tween 80, en revanche, l'activité enzymatique de lipase est plus prononcée en absence de celui-ci. L'huile d'olive et le tween 80 sont souvent, utilisés dans les milieux de fermentations, non seulement, comme inducteur de la production d'enzyme mais, aussi, comme source de carbone et d'éléments nutritifs essentiels pour la croissance microbienne (**Dalmau et al., 2000 ; Haba et al., 2000 ; Ferrer et al., 2001 ; He et Tan, 2006 ; Contesini et al., 2009**). Il est à noter que **Corzo et Revah (1999)** ont montré que l'activité de la lipase est influencée positivement chez *Y. lipolytica*, par la présence, en même temps, des deux inducteurs dans le milieu de culture. **Or, la souche *Y. lipolytica* L2, isolée dans notre étude, donne une bonne activité de lipase sans ajout de tween 80.** En outre, l'augmentation des concentrations d'huiles d'olive (>0,5%) a un effet inhibiteur sur la production de lipase chez *Y. lipolytica* L2. En effet, **Lima et al. (2003)** ont trouvé les mêmes résultats, dans une étude effectuée sur l'effet de différentes concentrations de l'huile d'olive sur la souche *Penicillium aurantiogriseum*, où ils ont remarqué qu'avec l'augmentation de la concentration de l'huile d'olive (1,5% - 2%), l'activité lipolytique diminue.

Dans le cas de *C. boidinii* G5, les résultats obtenus révèlent clairement que le tween 80 a un effet positif sur la production de biomasse et de l'enzyme. Le tween 80 est un stimulant de la biosynthèse et la sécrétion de la lipase, car il augmente la perméabilité cellulaire et favorise l'exportation de la lipase à travers la membrane cellulaire. Cet agent tensioactif a été utilisé pour augmenter l'activité lipolytiques des cultures cellulaires d'*Acinetobacter calcoaceticus* 69V (**Fischer et Kleber, 1987**), de *Humicola lanuginosa* (**Omar et al., 1987**), de *Rhizopus*

*oligosporus* (Nahas, 1988), de *Geotrichum candidum* (Jacobsen et al., 1989), d'*Acremonium strictum* (Okeke et Okolo, 1990) et de *Bacillus* sp. (Handelsman et Shoham, 1994).

L'augmentation simultanée des concentrations d'huiles d'olive (>0,5%) et les concentrations de tween 80 accroît un effet positif sur la production de biomasse, mais inhibiteur sur la production de lipase de chez *C. boidinii* G5. De ce fait, on peut dire qu'une faible concentration de l'huile d'olive avec tween 80 est peut être suffisante pour développer une production satisfaisante. Ceci est en accord avec les résultats de Lo et al. (2012), qui ont remarqué que la souche *Burkholderia* sp. donne le maximum de son activité lipolytique dans un milieu contenant de faible quantité de l'huile d'olive et de tween 80.

La diminution du pH en fin de fermentation et l'acidification du milieu de culture peut s'expliquer par la présence des acides gras libérés, suite à la dégradation de l'huile d'olive et celle de tween 80, par les lipases extracellulaires (Rihani, 2012), des deux souches levuriennes (L2 et G5).

Les propriétés physicochimiques des lipases des souches, révèlent l'enzyme produite est plus active à pH 7,0 et à température 37°C. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par différents auteurs, pour les lipases des souches: *Candida rugosa* (Ferrer et al., 2000), *Staphylococcus Warneri* (Walavalkar et Bapal, 2002) et *Bacillus mycoides* (Achamman et al., 2003).

En outre, la lipase de *Y. lipolytica* L2 conserve son activité dans un large intervalle de températures et de pH. Par ailleurs, l'activité lipolytique de la souche *C. boidinii* G5 est limitée par les conditions de pH alcalin et de températures modérées (de 20 à 40°C). D'après Brigida et al. (2007), l'enzyme de la souche *Y. lipolytica* est active dans un intervalle de pH de 7,0 à 9,0 et de température de 25 à 37°C, tandis que, la lipase de la souche *Candida antarctica* est active dans un pH alcalin (pH 7 à 11) et a des températures de 26 à 37°C.

Pour la recherche des nouvelles potentialités de *Y. lipolytica*, le développement de cette dernière est effectué sur milieu à base de grignon d'olive de la variété Algérienne *Chemlal*. Il est à signaler que, la quantification de la biomasse levurienne à l'état solide reste une approche approximative. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer l'activité lipolytique, en utilisant ce substrat particulier ; à savoir, la taille des particules et la teneur en humidité (Salihu et al., 2012). D'après Moftah et al. (2012), la taille des particules de substrat

lorsque, elles ont une dimension de 800µm, ceci, offre une meilleure efficacité d'aération due à l'augmentation de l'espace interparticulaire. Tandis que, les petits microparticules de ce substrat solide peuvent entraîner une agglomération de substrat dans la plupart des cas, ce qui conduit à des limitations de transfert de l'oxygène et une faible croissance (**Pandey et al., 2000 ; Bellon-Maurel et al., 2003 ; Moftah et al., 2012**). L'influence de la taille des particules de grignon d'olive dans la production de la lipase de *Candida utilis* en SSF semble évidente. Une taille de particule supérieure ou inférieure à 800 µm a été la moins est inappropriée pour le processus de fermentation solide de cette souche (**Moftah et al., 2012**). D'un autre côté, l'estimation de la biomasse et l'extraction des enzymes lipophiles peuvent s'avérer difficiles sur milieu solide (SSF) (**Salihu et al., 2012**).

Les résultats de l'utilisation du le milieu GOC préparé (en ajoutant 1ml de l'agent humidifiant et l'eau), avec 70% et 90% d'humidité initiale, ont montré que pour la souche *Y. lipolytica* L2, la production maximale de biomasse et celle de l'activité sont obtenues avec 90% d'humidité initiale, après 96h et 72h de culture respectivement. Sachant que des résultats très proches sont obtenus avec l'humidité initiale 70%, mais, avec un temps plus court, c'est-à-dire, après 48h et 24h, respectivement. **Par conséquent, on peut dire que la souche *Y. lipolytica* L2 s'adapte mieux en SSF avec 70% d'humidité initiale.** Ces résultats vont en accord de ceux d' **Imandi et al. (2010)** ; ces auteurs ont remarqué que le maximum d'activité lipolytique de *Y. lipolytica* NCIM 3589 est obtenu à 70% d'humidité initiale sur les résidus de palmiste (tourteaux de palmier).

De même, les résultats de la souche *C. boidinii* G5 montrent que la biomasse atteint son maximum avec l'humidité initiale 70%, après 96h et atteint le même maximum avec l'humidité 90%, mais après un temps plus long de 120h. Aussi, la production de lipase atteint son maximum avec 90% d'humidité initiale après 120h de culture et un résultat très proche est obtenue à 70% d'humidité initiale mais après 72h seulement. **En fonction de ces résultats, on peut dire que la souche *C. boidinii* G5 s'adapte mieux à 70% d'humidité initiale.** Ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Rekha et al. (2012)**, qui ont rapporté que la production de lipases de *Candida rugosa*, est maximale (57,2U/g), à 60% d'humidité initiale.

Il est à mettre en exergue que, l'humidité ne joue pas un rôle déterminant pour des valeurs fixes dans la production fermentaire chez les microorganismes.

D'après nos résultats, on peut constater que la production de lipase en SSF (en présence ou absence de tween80) donne des meilleurs rendements qu'en SmF (en présence ou absence de tween 80), pour les deux souches. Ces constatations sont confirmées par plusieurs études (**UI-Haq et al., 2002 ; Martins et al., 2011**).

L'utilisation de l'agent humidifiant à faible quantité sert, en premier lieu, comme inducteur de production de l'enzyme (**Mahadik et al., 2002**). Durant les cinq jours de fermentation, les deux souches levuriennes utilisent le grignon d'olive variété *Chemlal* comme substrat essentiel contenant une source de carbone et de nitrogène (**Nefzaoui, 1984**). Les informations à propos de la composition chimique de GOC ne sont pas disponibles pour se prononcer quant à une comparaison des résultats obtenus ce qui peut classer nos résultats comme une approche novatrice.

Généralement, la littérature consultée révèle que l'utilisation de l'huile d'olive est préférée parmi les autres huiles additionnées en SSF pour la production de lipase par des microorganismes comme, *Rhizopus chinensis* (**Sun et Yu, 2008**).

La diminution de pH en fin de culture SSF indique qu'il y ait une dégradation de substrat par les lipases des deux souches et donc, une libération des acides gras, ce qui acidifie le milieu. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en fermentation liquide. La forte croissance de la biomasse dans ce milieu solide (surtout à 90% d'humidité initiale) a pu engendrer différents métabolites, qui peuvent baisser le pH du milieu. En ce qui concerne, cette partie de notre travail, aucune étude n'est disponible pour confirmer ou contre-verser nos résultats.

Une autre application biologique, des souches levuriennes potentiellement lipolytiques, consiste à utiliser la souche *Y. lipolytica* L2 comme starter dans un milieu minimal à l'huile d'olive. La production de biomasse a été effectuée sur milieu liquide en fermenteur de 20l, afin de la récupérer. La culture de cette souche, sur milieu minimal à base d'huile d'olive, a montré qu'elle s'est bien adaptée à ces conditions de limitation en source de carbone, avec un maximum de biomasse obtenu au bout de 7 jours. Selon **Zullo et al. (2010)**, certains microorganismes peuvent s'adapter à de nouveaux habitats, en fonction de la composition chimique du milieu. L'huile d'olive est une source de carbone, très riche en triglycérides liés à des acides gras (saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés), tels que l'acide oléique, acide linoléique et acide linolénique (**CODEX STAN 33, 1981 ; Moftah et al., 2013**). Dans notre étude, la croissance de la souche *Y. lipolytica* L2, a augmenté après la consommation de

l'huile d'olive par les cellules, d'où la diminution de la matière extractible à l'hexane. De plus, l'augmentation de l'acidité est peut être due à la libération des acides gras grâce à la présence de lipase dans le milieu. Ces constatations sont en accord avec les données publiées par **Margesin et al. (2003)**, révélant que la capacité des microorganismes à dégrader les huiles est en relation avec leurs enzymes impliquées dans les processus de dégradation. D'ailleurs, les acides gras provenant des triglycérides sont libérés dans le milieu sous l'action hydrolytique des lipases (**Čipinytė et al., 2009**).

Les acides gras détectés par CPG au début de la fermentation, à savoir : l'acide palmitique (C16), l'acide palmitoléique (C16 :1), l'acide stéarique (C18), l'acide oléique (C18 : 1), l'acide linoléique (C18 : 2), l'acide linolénique (C18 : 3), l'acide arachidique (C20) et l'acide béhénique (C22) sont les composants majeur de l'huile d'olive (**Ollivier et al., 2006**).

Les résultats de la croissance cellulaire de *Y. lipolytica* L2, sur le milieu minimal, indique que la souche a bien dégradé l'huile d'olive. D'ailleurs, les quantités des acides gras détectés au début de la culture sont épuisées à sa fin (après 10 jours) ; exception faite pour l'acide stéarique C18 dont la concentration a augmenté en ayant la plus grande proportion en fin de culture, et par conséquent, il a acidifié le milieu.

L'apparition de forte concentration d'acide stéarique en fin de culture est peut être due à la conversion de C18 :1 (acide oléique) et C18 :2 (acide linoléique) en C 18. **Kamzolova et al. (2005)** ont rapporté des résultats similaires, avec la souche *Y. lipolytica* LGAMS cultivée sur un mélange d'acides gras saturés et insaturés de l'industrie de l'huile de tournesol. **Dans notre étude, la production de l'acide stéarique sur ce milieu minimal à faible coût, peut fournir une application biotechnologique intéressante dans le but de l'utiliser en industrie cosmétiques (shampooing et crème), détergents (savon), textile et industrie plastique.**

Le stockage des triglycérides sous forme de corps gras dans les cellules de *Y. lipolytica* L2 a été déjà observé par d'autre auteurs. **Katre et al. (2012)** ; **Abert-Vian et al. (2013)** ont rapporté que l'accumulation de l'huile dans les corps lipidiques dépend des conditions de culture, comme le ratio C/N, la source d'azote et la concentration en sels dans le milieu de culture. Or, dans notre étude l'huile d'olive a été utilisée comme seule source de carbone, ce qui a stimulé le stockage des corps gras. Plusieurs auteurs ont remarqué que *Y. lipolytica* peut accumuler un taux de lipides de 40 % et même plus de 70 % sous forme de triglycérides

par rapport à leurs poids sec, dans les conditions défavorable (**Beopoulos *et al.*, 2008 ; Seip *et al.*, 2013** ). Elle s'agit donc d'une souche oléagineuse (**YE *et al.*, 2012**). Actuellement, les chercheurs utilisent les corps gras stockés dans la cellule oléagineuse comme une source alternative de biodiesel (**Harder *et al.*, 2013 ; Abert-Vian *et al.*, 2013**). Les potentialités développées par nos isolats en l'occurrence, *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 obtenu à partir du lait cru de vache et l'isolat de comparaison *Candida boidinii* G5 KF156789 obtenu du grignon d'olive de la variété Algérienne *chemlal*, constituent plusieurs points forts discutés précédemment. Ces points, méritent d'être développés car, ils forment l'originalité de cette thèse.

## **Conclusion et perspectives**

---

## 6- Conclusion et perspectives

Le but principal de la présente étude est, la recherche de nouvelles potentialités de la souche lipolytique *Yarrowia lipolytica*, isolée de différents milieux naturels pour des applications biologiques diverses. Le screening a abouti à l'obtention de plusieurs isolats levuriens à partir de matières premières riches en matières organiques et inorganiques, à savoir : des produits laitiers de vache (lait cru, raïb et leben) et de grignon d'olive d'une variété Algérienne « *Chemlal* » (GOC). Le test de l'activité lipolytique a permis de présélectionner six souches levuriennes, néanmoins, le test de production de lipase sur milieu liquide à base de l'huile d'olive a abouti à la sélection deux souches uniquement, comme étant souches productrices potentielles de vraies lipases. Ces derniers sont identifiées comme *Yarrowia lipolytica* L2 KF156787 (souche isolée de lait cru) et *Candida boidinii* G5 KF156789 (souche isolée de GOC). **Il est important de signaler que, *Y. lipolytica* est habituellement isolée à partir du lait cru, cependant, l'isolement de *C. boidinii*, comme une souche potentielle de production de lipase à partir de grignon d'olive *Chemlal* (GOC), constitue une première pour ce travail.**

La recherche de nouvelles potentialités de *Y. lipolytica* L2 est réalisée par comparaison de son aptitude à produire de la biomasse et de la lipase, sous différentes conditions de culture (SmF et SSF), à celle de la souche *C. boidinii* G5. Les résultats obtenus de cette partie nous ont permis de conclure que :

**-La quantité de lipase produite par *Y. lipolytica* est plus importante que celle produite par *C. boidinii*, malgré que cette dernière produise une lipase précoce mais, à des faibles quantités.** Ce qu'élite la première à jouer un rôle éminent dans des applications biotechnologiques diverses.

**-La culture de ces souches levuriennes (L2 et G5) dans des milieux de culture contenant des inducteurs de la production lipolytique (huile d'olive avec ou sans tween 80) a révélé que ; *Y. lipolytica* L2 a produit une quantité considérable de biomasse et de lipase, à des faibles concentrations de l'huile d'olive et en absence de tween 80. En revanche, l'ajout de l'huile d'olive et du tween 80 à des faibles concentrations, a influencé positivement la production de lipase par *C. boidinii* G5. Tandis que, sa biomasse maximale, est obtenue lorsque des concentrations plus élevées de l'huile d'olive (5%) et de tween 80 sont ajoutées dans le milieu. De ce fait, il est à conclure que contrairement à la souche *Y. lipolytica* L2, la**

**souche *C. boidinii* G5 est considérée comme souche exigeante pour des exploitations biologiques ultérieures.**

- *Y. lipolytica* L2 et *C. boidinii* G5 sont mieux adaptées à la fermentation solide à base de grignon d'olive *Chemlal*, et par conséquent, **La quantité de lipase y produite est, en moyenne, deux fois plus importante que celle produite par les mêmes souches sur milieu submergé enregistrant un temps d'incubation plus long. Ces caractères procurent aux souches la potentialité d'être appliquée dans la dépollution par la dégradation de déchet oléicole.**

Il est à mettre en exergue que, *Y. lipolytica* L2 se développe sur le grignon d'olive et l'utilise comme source de carbone malgré, qu'il est isolé à partir du lait cru de vache. **Cette constatation révèle le degré d'adaptation de la souche à des milieux variés, permettant de conclure qu'elle peut être utilisée dans des applications diverses.**

Le développement de *Y. lipolytica* L2 dans les conditions de scale-up et sa viabilité élevée lui procure la faculté de starter. Lors de sa croissance sur un milieu minimal, *Y. lipolytica* L2; possède la capacité de produire de la lipase, de stocker les triglycérides sous forme de corps gras à l'intérieur des cellules et de produire une grande quantité de l'acide stéarique. **Ces résultats sont considérés intéressants, vu l'utilisation des triglycérides comme biodiesel et l'utilisation de l'acide stéarique dans les industries cosmétiques, textiles, de détergents et plastique. De ce qui a précédé il est à conclure que les applications biologiques de la souche sélectionnée, *Y. lipolytica*, sont très diverses et nettement intéressantes ce qui justifie largement l'objectif assigné à cette recherche.**

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

- Purification et caractérisation (chimique et moléculaire) de l'enzyme lipolytique produites par *Y. lipolytica* L2 ;
- Utilisation de *Y. lipolytica* L2 comme souche modèle productrice de biodiesel ;
- Utilisation de la souche *Y. lipolytica* L2 comme starter dans la biodégradation de grignon d'olive *Chemlal*, sous différents taux initiaux d'humidités.

## Références bibliographiques

---

## 7- Références bibliographiques

- Abert-Vian, M., Dejoye-Tanzi, C. et Chema, F. (2013). Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de micro-organismes. *OCL*. 20(6).
- Abdelgadir, W. S, Hamad S.H, Mollerc P.L. et Jakobsen M. (2001). Characterisation of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk Rob. *Int. Dairy J.* 11( 1–2): 63–70.
- Achamman, T., Monoj, M. K., Valsa, A., Mohan, S. et Manjula, R. (2003). Optimization of growth condition for the production of extra cellular lipase b y *Bacillus mycoides*. *Ind. J. Microbiol.* 43: 67 – 69.
- Açikel, Ü., Erşan M. et Sağ Açikel Y. (2011). The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *Rhizopus deleamar*. *Turk. J. Biol.* 35: 35-44.
- Aggelis, G., Margariti, N., Kralli, C. et Flouri, F. (2000). Growth of *Candida boidinii* on methanol and the activity of methanol-degrading enzymes as affected from formaldehyde and methylformate. *J. Biotechnol.* 80(2):119-25.
- Aissaoui, O., Zitoun, M. et Zidoune, N. (2006). Le fromage traditionnel algérien « Bouhezza ». Séminaire d'animation régional. Technologie douce et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT- Tunis, Tunisie.
- Alais, C. (1984). Science du lait, principes des techniques laitieres. (edn) *SEPAIC*. Paris.
- Alloue, M., Aldric, J.M., Destain, J., Boutahir, Y. et Thonart, P. (2005). Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives. *La Tribune de l'eau*. 58(636): 37-43.
- Alloue, M., Destain, J., Ghalfi H., Thonart, P., Aguedo, M., Wathelet, J.P. et Blecker, C. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12.
- Alvarez-Martina, P., Belen Floreza A., Lopez-Diazb T. M., Mayo B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *Inter. Dairy J.* 17 :961–967.
- Argenson, C. et al. (1999). L'olivier. les Editions Ctifl. pp. 204.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J. et Garrido-Fernández ,A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 189–196.

- Assamoi, A.A., Destain, J. et Thonart, P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotech. Agron. Soc. Env.* 13 (2): 271-280.
- Bankar, A., Kumar, A. et Zinjarde, S. (2009). Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:847-865.
- Barth, G. et Gaillardin, C. (1996). Non conventional yeasts in biotechnology. *Yarrowia lipolytica*. 1: 313-388. In K. Wolf (ed) Springer – Verlag, Berlin- Heidelberg- New York.
- Barth, G. et Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 219-237.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. Food Microbiol.* 147: 89–96.
- Beckerich, J. M., Boisrame-Baudevin, A. et Gaillardin, C. (1998). *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int. Microbiol.* 1: 123-130.
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O. et Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Proc. Bioch.* 38: 881–896.
- Benyahia, N. et Zein, K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates, Suisse.
- Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T. et Nicaud, J.M. (2008). Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica* down-pointing small open triangle. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(24): 7779–7789.
- Beukes, E.M., Bester, B.H. et Mostert, F.J. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.* 63:189–197.
- Bondar, C., D., Beckerich, J. M. et Bonnarme, P. (2005). Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4585-4591.

- Borkar P.S., Bodade R.G., Rao S.R. et Khobragade C.N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain - *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Braz. J. Microbiol.* 40 (2).
- Boskou, D. (2006). *Olive oil chemistry and technology*. (2e edn). AOCS Press.
- Brígida, A. I. S., Amaral, P. F., Gonçalves, L. R. et Coelho, M. A. Z. (2007). Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)* Copenhagen.
- Burlina A. et Galzigna L. (1973). Turbidimetric procedure for determination of lipase activity. *Clinical Chemi.* 19 (4) : 384-386.
- Casas- Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. et Marty, A. (2012). Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. *Meth. Mol. Bio.* 861.
- Centre National des Technologies de Production plus Propre (CNTPP). (2011). Industrie oléicole : Valorisation des sous-produits de l'activité oléicole. pp. 6-7. Source : <http://www.cntppdz.com/uploads/revue-N%C2%B08%20pdf.pdf>
- Chye, F.Y., Abdullah, A. et Ayob, M.K. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.* 21: 535–541.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A., Cioccia, G. et Iride, A. (2006). Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int. J. Food Microbiol.* 107(1) : 27–32.
- Čipinytė, V., Grigiskis, S. et Baškys, E. (2009). Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija.* 55 (3–4) : 84–92.
- CODEX STAN 33. (1981). Norme codex pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive. Source : [http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/88/CXS\\_033f.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/88/CXS_033f.pdf).
- Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F. et Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Curr. Reas. Tech. Educ. Topics in Appl. Microb. Biotech.* A. Mendez-Vilas (Ed.).

- Colla, L., Rizzardi, J., Pinto, M., Reinehr, C., Bertolin, T. et Vieira- Costa, J. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour. Tech.* 101: 8308–14.
- Conseil oléicole international. (2004). Indicateur macroéconomique et agricole: l'oléiculture en Algérie.
- Conte, S. (2008). Evolution des caracteristiques organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques du lait caillé traditionnel. *Memoire d'études approfondies de productions animales*.
- Contesini, F.J., Silva, V.C.F., Maciel, R.F., Lima, R.J., Barros, F.F.C. et Carvalho, P.D. (2009). Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *J. Microbiol.* 47(5): 563–71.
- Corbaci, C., Ucar, F.B. et Yalcin, H.T. (2011). Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(3): 534-542.
- Corbo, M. R., Lanciotti, R., Albenzio, M. et Sinigaglia, M. (2001). Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J. Food Microbiol.* 69 : 147–152.
- Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaili-Alaoui, M., Morin, A, Roussos, S., Raimbault, M. et Benjilali, M. (1997). Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 5:75–78.
- Corzo, G. et Revah, S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresour. Tech.* 70 ( 2) : 173-180.
- Cranor, D.F. (1929). Nature, Manufacture, and General Use of Stearic Acid. *Ind. Eng. Chem.* 21 (8) : 719–721.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M. et Casas, C. (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 657–63.
- Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétales*. (edn) INRA. Paris.
- Davet, P. et Rouxel, F. (1997). *Detection et isolation des champignons du sol*. (edn) INRA.Paris.

- Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts second edition*. CRC press Taylor and francis groupe. USA.
- Destain, J. (1998). Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. *Thèse doctorat*. Université Gembloux.
- Destain, J., Roblain, D. et Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Lett.* 19: 105-107.
- Dieng, M. (2001). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur les marchés dakarois. *Thèse doctorat*. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
- Dominguez, A., Costas, M., Longo, M. A. et Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Lett.* 25: 1225-1229.
- Dommen, G. (1954). Recherches sur la flore microbienne superficielle de fromages d de Tilsit (Etude des systèmes lipasique, phosphatasique et protéasique). *Thèse doctorat*. Université de Californie, USA.
- Doyle, M.P. Beuchat, L.R. et Montville, T.J. (2001). Food Microbiology fundamentals and Frontiers. 2nd Ed. Michael P. Doyle, Larry R. Beuchat, Thomas J. Montville, eds. Washington, DC: ASM Press.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. et Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol.* 26: 228–231.
- Espiard, E. (2002). *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. (edn). TEC et DOC.
- FAO. (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Source: <http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f00.HTM>.
- Fedeli, E. (1997). *Technologie de production et de conservation de l'huile*. Encyclopédie mondiale de l'olivier. pp.253-283.
- Ferrer, P., Montesinos, JL., Valero, F. et Sola, C. (2001). Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Appl. Bioch. Biotechnol.* 95: 221-55.

- Ferrer, M., Lou, F.J. P, Reyes, F. et Ballesteros, A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Pencillium chrysogenum* isolated from industrial waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 : 569- 576.
  
- Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M S. et Nicaud, J M. (2005.b). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 5: 527-543.
  
- Fickers, P., Destain, J. et Thonart P. (2007). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (2): 119-130.
  
- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M.T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P. et Nicaud, J.M. (2005.a). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal. Genet. Biol.* 42(3):264-74.
  
- Fickers, P., Le Dall, M. T., Gaillardin, C., Thonart, P. et Nicaud, J. M. (2003). New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods.* 55, 727–737.
  
- Fickers P., Marty B. A. et Nicaud J. M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotech. Adv.* 29 : 632–644.
  
- Fischer, B.E. et Kleber, H.P. (1987). Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *J. Basic Microbiol.* 27: 427-432.
  
- Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N. et Narvhus J.A. (2000). Enumeration and identi"cation of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *Int. Dairy J.* 10: 459-466.
  
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P. et Davidson, S. (1996). Microbial lipases : production and applications. *Sci. Progr.* 79 (2) :119-157.
  
- Glogauer A., Martini V. P., Faoro H., Couto G. H., Müller-Santos M.,Monteiro R. A., Mitchell D. A., De Souza E. M., Pedrosa F. O. et Krieger N. Identification and

characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*. 10:54 .

-Godič- Torkar, K.et Golc- Teger, S. (2008). The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica*. 92(1) : 61–74.

- Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonatto, D., Arbter,F., Vardanega, R., Cechet, J.L., Di Luccio, M., De Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R.L., Rigo, E. et Ninow, J.L. (2009). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Biopro. Tech.* 4(4): 578-586.

- Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. pp. 310-321.

- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M. et Manresa, A. (2000). Isolation of lipase secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enz.Microb. Technol.* 26: 40-4.

- Hadjou, L., Lamani, O. et Cheriet, F. Labellisation des huiles d'olive Algériennes: contraintes et opportunités du processus? *New Medit.* 2.

- Hammad, M., Badarneh, D. et Tahboub, K. (1999). Evaluating variable organic waste to produce methane. *Ene.Conv. Manage.* 40 : 1463-1475.

- Hammer, E ., Krowas, D., Schafer, A ., Specht, M ., Franche, W. et Schauer F. (1998). Isolation and characterization of a Dibenzofuran- Degrading Yeast: Identification of oxidation and ring cleavage products. *Appl. Env. Microbiol.* 64 :2215-2219.

- Handelsman, T. et Shoham, Y. (1994). Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 435-443.

- Harder, M. N. C., Delabio, A. S., Cazassa, S., Remedio, R. R., Pires, J. A., Monteiro, T. R. R. et Arthur, V. (2013). *Lipid production by Yarrowia lipolytica for biofuels*. Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments. A. Méndez-Vilas, Ed.

- Hasan, F., Ali Shah, A. et Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotech. Adv.* 27(6) : 782–798.

- He, Y. Q. et Tan, T. W. (2006). Use of response surface methodology to optimize culture medium for lipase for production of lipase with *Candida* sp. *J. Molec. Cata.. B, Enz.* 43 : 9 – 14.

- Heras-Vazquez, F. J. L., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M. et Rodriguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* 3 : 3-9.
- Hui, Y. H. et Khachatourians G. G. (1995). *Food biotechnology: Microorganisms*. Wiley-VCH. Canada.
- Imandi, S. B., Karanam, S. K. et Garapati, H. R. (2010). Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernel cake (*Elaeis guineensis*). *Adv. Biosci. Biotech.* 1(2).
- Jacobsen, T., Jensen, B., Olsen, J. et Alermana, K. (1989). Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 256-261.
- Janatova, I. (1992). Isolation of auxotrophic mutants of the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and determination of its ploidy. *Antonie van Leeuwenhoek.* 62: 167-171.
- Jarrar, H. (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. *Thèse de doctorat*. Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G. (2009). *Science des aliments*. (edn) Tec et Doc. Lavoisier. Paris.
- Kademi, A., Ismaili-Alaoui, M. et Houde, A. (2003). Des arômes synthétiques...au naturel. Centre de Recherche et de Développement sur les aliments Saint Hyacinthe, Québec.
- Kadi, H. et Fellg, H. (2001). Modelling of extraction from olive foot cake using hexane. *Grasas y Aceites.* 52(6).
- Kamiryo, T., Mishina, M., Tashiro, S.I. et Numa, S. (1977). *Candida lipolytica* mutants defective in an acyl-coenzyme A synthetase: isolation and fatty acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 4947–4950.
- Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G., Aurich, A., Perevoznikova, O.A., Shishkanova, N.V., Stottmeister, U. et Finogenova, T.V. (2005). Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol. Biotechnol.* 43 (2): 113–122.

- Karnati, S.K.R., Yu, Z., Sylvester, J. T., Dehority, B. A., Morrison, M. et Firkins, J. L. (2003). Technical note: specific PCR amplification of protozoal 18S rRNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J. Anim. Sci.* 81(3) : 812-815.
- Karpushova, A.A. (2004). Screening, Nucleotide Sequencing and Biochemical Characterisation of Novel Lipolytic Enzymes from *Bacillus* sp. 01-855 associated with Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Thèse doctorat*. Université Stuttgart.
- Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S. et RaviKumar, A. (2012). Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express*. 2:36.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K. et Lai, O. M. (2011). Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in Submerged and Solid-State Fermentations. *J. Biomed. Biotechnol.* Doi: 10.1155/2011/702179.
- Klug, M. J. et Markovetz, A. J. (1967). Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of n-alkanes and l-alkenes by *Candida lipolytica*. *J Bacteriol.* 93 : 1847-52.
- Krastanov, A., Govindarajan, A. et Daniel, D. (2008). Studies on lipase fermentation using *Candida cylindracea* NRRL y-17506 in a stirred tank bioreactor. *Bulgarian J. Agricult. Sci.* 14 (3) : 290-299.
- Kreger van Rij, N. (1984). The yeasts, a taxonomic study. *Elsevier Science & Technology*.
- Kurtzman, C., Fell, J.W. et Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Volume 1. Elsevier, USA.
- Kurtzman, C.P. et Robnett C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 73 : 331-371.
- Lapointe-Vignola, C. (2002). *Science et technologie du lait-transformation du lait*. Presses internationale polytechnique. Montréal, Canada.
- Larpent, J.P. (1997). *Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire*. Technique et documentation. pp. 1041.

- Ledenbach, L.H. et Marshall, R.T. (2009). *Microbiological Spoilage of Dairy Products*. W.H. Sperber, M.P. Doyle (eds.), Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety. Doi 10.1007/978-1-4419-0826-1\_2.
- Lima , V. M. G., Krieger, N. M., Sarquis, M. I., Mitchell, D. A., Ramos, L. P. et Fontana, J. D. (2003). Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase. Production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (2) 105–110 .
- Lindley, N. (1995). Bioconversion and biodegradation of aliphatic hydrocarbons. *Can. J. Bot.* 73: 1034–1042.
- Liua, C.H., Chena, C.Y., Wanga, Y.W. et Changa, J.S. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia sp.* C20. *Bioch. Eng. J.* 58– 59: 96– 102.
- Lo C.F., Yu, C.Y., Kuan, I.C. et Lee, S.L. (2012). Optimization of Lipase Production by *Burkholderia sp.* Using Response Surface Methodology. *Int. J. Mol. Sci.* 13(11): 14889–14897.
- Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microb.* 23 : 341–350.
- Lopes, M., Gomes, N., Gonçalves C., Coelho M.A.Z., M. Mota et Belo I. (2008). *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. *J. compilation.* 46 : 255–260.
- Lopez, C., Madec, M.N. et Jimenez-Flores, R. (2010). Presence of lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.* 120: 22-33.
- Lore, T.A., Mbugua, S. K. et Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of microflora in *Suusac*, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Food Sci. Techn.* 38 (2): 125–130.
- Louai, N. (2009). Evaluation énergétique des déchets solides en Algérie, une solution climatique et un nouveau vecteur énergétique. *Mémoire Magistère*. Université El-hadj Lakhdar, Batna.

- Mafakher, L., Mirbagheri, M., Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. et Emtiazi, G. (2010). Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotech.* 27(4).
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. et Gokhale, D. V. (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state Fermentation. *Proc. Bioch.* 38: 715-721.
- Makri, A., Fakas, S. et Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioress. Tech.* 101: 2351–2358.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F. Greer, C.W. et Whyte, L.G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3085–92.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N. et Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. *Biotech. Adv.* 29: 365–373.
- McAuliffe, J.C. (2012). *Industrial enzymes and biocatalysis*. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S. et Sogin, M.L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene.* 71(2) : 491-499.
- Ministère Algérien de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. (2014). Loi n° 2001-19 du 27 Ramadhan 1422 correspondant au 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets. Source : <http://www.mate.gov.dz/pdf/l%C3%A9gislation/DECHETS/Loi%2001-19.pdf>.
- Mitchell, D.A., Berovic, M. et Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. *Biotech. Annu. Rev.* 8: 183–225.
- Moftah, O.A.S., Grbavčić, S., Žuža, M., Luković, N., Bezbradica, D. et Knežević-Jugović Z. (2011). Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166:348–364.
- Moussaoui, R. et Youyou, A. (2005). Extraction de l'huile à partir du grignon d'olive avec le mélange : acétone – trichloroethylene. *Sci. Tech.* 23 : 47-51.

- Moussouni, A. (2013). La réalisation d'une étude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb, sous-secteur : huile d'olives. *REME*. Algérie.
- Mucchetti G., Ghiglietti R., Locci F., Francolino S., Bonvini B., Remagni M. C., Zago M., Iezzi R. et Carminati D. (2009). Technological, microbiological and chemical characteristics of Pannerone, a traditional Italian raw milk cheese. *Dairy Sci. Technol.* 89: 419–436.
- Murphy, D. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40: 325–338.
- Nahas, E. (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.* 134: 227-233.
- Nefzaoui, A. (1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales 43, Rome.
- Nefzaoui, A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'Olivier (CEE, CIHEAM, TUNISIE), Tunis.
- Nefzaoui, A. (1991). Valorisation des sous-produits de l'olivier. Options Méditerranéennes. Série A. Séminaires Méditerranéens. 16:101-108.
- Negruță, O., Csutak, O., Stoica, I., Rusu, E. et Vassu, T. (2010). Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Romanian Biotechn. Lett.* 15(4).
- Obradors, N. Montesinos, J.L., Valero F. (1993). Effect of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotech.letters.* 15 :357-360.
- Okeke, C.N. et Okolo, B.N. (1990). The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnol. Lett.* 12: 747-750.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S.J. et Silman I. (1992). The a/b hydrolase fold. *Protein Eng.* 5 : 197-211.
- Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C. Durbec, J.P., Guérère, M. (2006). Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions and chemometrics. *Food Chemistry.* 97 : 382-393.

- Omar, I.C., Nishio, N. et Nagai, S. (1987). Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agr. Biol. Chem.* 51: 2145-2151.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, G., Lefebvre, K., Swings, J. et Amar, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk lben'. *J. Appl. Microb.* 106: 486–495.
- Pandey, A., Soccol, C.R. et Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Proc. Bioch.* 35: 1153–1169.
- Papagora C., Roukas, T. et Kotzekidou, P. (2013). Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology Authors. *Food Bioprod. Proc.*
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I. et Aggelis, G. (2007). Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Elect. J. Biot.* 10 (3).
- Ramirez, C. (1953). Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos. *Microbiol. Esp.* 6: 249-253.
- Raynal-Ljutovac, K., Bouvier, J., Gayet, C., Simon, N., Joffre, F., Fine, F., Vendeuvre, J.L., Lopez, C., Chardigny, J.M., Michalski, M.C. et Genot, C. (2011). Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *OCL.* 18(6) : 324-351. Doi : 10.1684/ocl.2011.0415.
- Rebah, M. (2006). Les déchets qui nous menacent. *La Dépêche*. Journal Algérien.
- Rekha S., Lakshmi C., Devi S. et Kuma M.S. (2012). Production and optimization of lipase from *Candida rugosa* using groundnut oilcake under solid state Fermentation. *IJRET.* 1(4) : 571 – 577.
- Réseau des Entreprises Maghrébines pour l'Environnement (REME). (2011). Gestion de déchets organiques : Valorisation des Déchets dans le Secteur Agroalimentaire au Maghreb. Source :[http://www.reme.info/fileadmin/user\\_files/pdf/valorisationdechets/REME\\_Brosch%C3%BCre\\_3\\_final\\_1.pdf](http://www.reme.info/fileadmin/user_files/pdf/valorisationdechets/REME_Brosch%C3%BCre_3_final_1.pdf)
- Rigo, E., Ninow, J.L., Luccio, M., Oliveira, J.V., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Oliveira, D. et Treichel, H. ( 2010). Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Sci. Techn.* 43:1132-1137.

- Rihani, A. (2012). Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. *Mémoire Magister*. Université Badji Mokhtar-Annaba.
- Rizoun, L. (2012). Situation environnementale de l'industrie oléicole en Algérie. Conférence à Athènes. Source : <http://www.h2020.net/fr/library/publications/finish/161/1134.html>.
- Rodriguez, J.A., Mateos, J.C., Nungaray, J., Gonzalez-Bhagnagar, V.T., Roussos, S., Cordova J. et Baratti, J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Proc. Bioch.*41: 2264–2269.
- Rodríguez Couto, S. et Sanromán, M.Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry. *J. Food Eng.* 76: 291–302.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J. et Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiol.* 27 (5) : 604–612.
- Rodriguez-Gomez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernandez, A. et Arroyo-Lopez, F.N. (2011). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1761–1770.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. et Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* 8 : 423-488.
- Rywinska, A., Juszczuk, P., Wojtatowicz, M., Robak, M., Lazar, Z., Tomaszewska, L., et Rymowicz, W. (2013). Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and bioenergy.* 48: 148 -166.
- Sahm, H., Roggenkamp, R., Wagner, F. et Hinkelmann, W. (1975). Microbodies in methanol-grown *candida boidinii*. *J. Gen. Microbio.* 88 : 218-222.
- Sakai, Y. et Tani, Y. (1992). Directed mutagenesis in an asporogenous methylotrophic yeast: cloning, sequencing, and one-step gene disruption of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene (LEU2) of *Candida boidinii* to derive doubly auxotrophic marker strains. *J. Bacteriol.* 174(18): 5988.
- Salihu, A., Alam, Md. Z., Abdulkarim, M. I. et Salleh, H. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy.* 58: 36-44.

- Samet-Bali, O., Ennouri, M., Dhouib, A. et Attia, H. (2012). Characterisation of typical Tunisian fermented milk: *Leben*. *Afr. J. M. Res.* 6(9): 2169-2175.
- Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q. et Hong, S.P. (2013). Snf1 Is a Regulator of Lipid Accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23):7360-70.
- Sinigaglia, M., Lanciotti, R. et Guerzoni, M. E. (1994). Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can. J. Microbiol.* 40:54-59.
- Steijns, J. N. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix. *Int. Dairy J.* 18: 425–435.
- Subramaniam, R. et Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nature.* 3(3): 480-486.
- Sun, S.Y. et Xu Y. (2009). Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Biores.Tech.*100: 1336–1342.
- Sun, S.Y. et Xu, Y. (2008). Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Proc. Bioch.* 43: 219–224.
- Tamendjari, A., F. Angerosa, M.M. Bellal, 2004. Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of *Chemlal* olives. *Ital. J. Food Sci.* 16: 343-354.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C. et Deng, L. (2003). Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. *Proc. Bioch.* 39(4) : 459-465.
- Tanaka, A., Fukui, S. (1989). *Metabolism of n-alkanes In: The Yeasts.* (Rose, A.H. and Harrison, J.S., Eds.). (2 edn) *Metabolism and Physiology of Yeasts.* 3: 261–287. Academic Press, London.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M.A., Luccio, M.D. et Oliveira, J.V. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food Biop. Technol.* 3:182–196.
- Tsagariki, E., Harris, N., Lazarides. et Konstantinos, B. P. (2007). Olive mill waste water treatment. Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. 3: 133-157.

- Tsakalidou E., Manolopoulou E., Kabaraki E., Zoidou E., Pot B., Kersters K. et Kalantzopoulos G. (1994). The Combined Use of Whole-cell Protein Extracts for the Identification (SDS-PAGE) and Enzyme Activity Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Greek Dairy Products. *Sys. Appl. Microb.* 17(3): 444–458.
- Ulacio, D., Perez, C. et Pineda, J. 1997. Micoflora Asociada a las raíces de plantas de *Nicotiana tabacum* «tabaco» provenientes del estado Portuguesa. *Bioagro.* 9(1):3-11.
- Ul-Haq, I., Idrees, S. et Rajoka, I. (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Proc. Bioch.* 37: 637–641.
- Van der Klei, I.J. et Veenhuis, M. . Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Bioch. Biophys. Acta.* 1763 (12) 1364–1373.
- Van der Walt, J. et Von Arx, J. (1980). The yeast *Yarrowia*. *Gen. nov.* 46.
- Viniegra-Gonzalez, G. et Favela-Torres, E. (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Tech. Biotech.* 44:397–406.
- Volfova, O., Zizka, Z. et Anderova, M. (1992). Effect of increasing methanol concentrations on physiology and cytology of *Candida boidinii*. *Folia Microbiol.* 37 (6), 413-420.
- Wache, Y., Aguedo, M., Nicaud, J. M. et Belin, J. M. (2003). Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 393-404.
- Walavalkar, G. S. et Bapal, M. M. (2002). A new sources of lipase *Staphylococcus warneri* BW94. *Ind. J. Exp. Biol.* 40: 1280 – 1284.
- Waterham, H. R., Keizer-Gunnink, I., Goodman, J. M., Harder, W. et Veenhuis, M. (1992). Development of multipurpose peroxisomes in *Candida boidinii* grown in oleic acid-methanol limited continuous cultures. *J. Bacteriol.* 174(12): 4057–4063.
- Wickerham, L.J. (1951). *Taxonomy of yeasts*. VS. Dept. Agric. Washinton. D. C. Tech. Bull. 1029 : 1-56.
- Wickerman, L.J., Kurtzman, C.P. et Herman, A.I. (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science.* 167:1141-1147.
- Wolski, E., Menusi, E., Remonatto, D., Vardanega, R., Arbter, F., Rigo, E., Ninowb, J., Mazutti, M.A., Luccio, M.D., Oliveira, D. et Treichel, H. (2009). Partial characterization of

lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *Food Sci. Tech.* 42: 1557–1560.

- Workman, M., Holt, P. et Thykaer, J. (2013). Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express.* 3:3(1):58.

- Wouters, J. T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. et Smit G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91–109.

- Yarrow, D. (1972). Four new combinations in yeasts. *A Van Leeuw.* 38: 357-360.

-Ye, R.W., Sharpe, P.L. et Zhu, Q. (2012). Bioengineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for lycopene production. *Methods Mol. Biol.* 898:153-9.

- Yu, M., Lange, S., Richter, S., Tan T. et Schmid, R.D. (2007). High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expr.Purif.* 53 : 255–263.

- Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, J. E. et Kihal, M. (2012). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroïdes* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature and Techn.* 8: 39-47.

- Zullo, B.A., Cioccia, G. et Ciafardini, G. (2010). Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiol.* 27:1035-1042.

## **Annexe**

---

## • Milieux et Tampon

-Yeast Peptone Dextrose (bouillon à pH6.0) dans 1L d'eau distillée (**Guiraud, 1998**)

Extrait de levure.....5g

Peptone .....10g

Dextrose .....20g

-Yeast Peptone Dextrose Agar (milieu gélosé à pH 6.0) dans 1L d'eau distillée

Extrait de levure.....5g

Peptone .....10g

Dextrose .....20g

Agar .....20g

-Yeast Peptone Dextrose- Glycérol (milieu de conservation) dans 1L d'eau distillée

Extrait de levure.....5g

Peptone .....10g

Dextrose .....20g

Glycérol .....300ml

-Potato Dextrose Agar (gélose pomme de terre glucosée, pH5.6) dans 1L d'eau distillée (**Guiraud, 1998**)

Extrait de pomme de terre

(à partir de 200g).....1l

Glucose .....20g

Agar.....15g

-Yeast Nitrogene Base (**Wikerham, 1951**)

Ce milieu de composition complexe est disponible dans le commerce (Difco), sous forme déshydratée. 6,7g/l de ce composant déshydraté est stérilisé par filtration. Il est ensuite réparti aseptiquement en tubes à essais (9ml). Ce milieu est souvent préparé à concentration  $\times 10$ , ce qui facilite sa stérilisation. Il est alors réparti dans des tubes contenant 8ml d'eau stérile (1ml/tube). Les solutions de produits carbonés (0,5% pour chaque source) sont ajoutées aseptiquement (1ml/tube).

-Yeast Carbon Base (**Wikerham, 1951**)

Ce milieu de composition complexe est disponible dans le commerce (Difco), sous forme déshydratée. 11,7g/l de ce composant déshydraté est stérilisé par filtration. Il est ensuite réparti aseptiquement en tubes à essais (9ml). Ce milieu est souvent préparé à concentration  $\times 10$ , ce qui facilite sa stérilisation. Il est alors réparti dans des tubes contenant 8ml d'eau stérile (1ml/tube). Les solutions de produits carbonés sont ajoutées aseptiquement (1ml/tube).

-Milieu Christensen (gélose à l'urée, pH6.8) dans 1L d'eau distillée (**Guiraud, 1998**)

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| Peptone.....                  | 1g   |
| Chlorure de sodium .....      | 5g   |
| Glucose.....                  | 1g   |
| Phosphate monopotassique..... | 2g   |
| Urée.....                     | 20g  |
| Rouge de phénol.....          | 12mg |
| Gélose .....                  | 17,5 |

- **Calculé utilisé**

-Concentration d'humidité initiale :

Pour ajuster la teneur en humidité initiale du milieu solide, le GOC a été trempé avec la quantité désirée d'eau. Après le trempage, 10 grammes de l'échantillon ont été séchés à 105°C et le pourcentage de la teneur en humidité a été calculée de la manière suivante (**Khoramnia et al., 2011**):

$$\text{humidité initiale de culture solide (\%)} = \frac{(\text{GOC poid humide} - \text{GOC poid sec}) \times 100}{\text{GOC poid sec}}$$

## Résumés

---

## Abstract

A total of 123 yeasts strains was isolated from different samples of cow's milk products collected from Constantine region and spent olive " *Chemlal* variety " obtained from various mills located in Skikda. In fact, 116 strains were selected for their lipolytic activity. Six yeast isolates producing lipase were prescreened for their ability to develop important halos on tributyrine agar medium. Then, two isolates (L2 and G5) were screened for their ability to produce high levels of lipase reaching 13,32 U / ml et 7,15 U/ml, respectively. Preliminary and molecular identification showed that these strains are *Yarrowia lipolytica* (accession number: ACKF156787) and *Candida boidinii* (accession number: KF156789), respectively. In order to determine new potentialities of *Y. lipolytica* L2, a comparative study was carried out between the two strains (L2 and G5) taken onto consideration several parameters and under various conditions culture. The production of lipase by *C. boidinii* G5 is faster (24h), however, the quantity of lipase produced by *Y. lipolytica* L2 is higher (13,3U/ml). The effect of adding olive oil with/without tween 80 , in submerged medium, on biomass and lipase production allow showing that *Y. lipolytica* L2 produce biomass and lipase at low quantity of olive oil (0.5%) without tween 80. In contrast, the production of important biomass and lipolytic activity by *C. boidinii* G5 require adding olive oil and tween 80 to the medium.

Optimal conditions of lipase activity for L2 and G5 strains are found at pH 7.0 and temperature 37 ° C. the solid fermentation on GOC at different moisture content (70% and 90%) showed that the two strains adapt better when initial humidity is 70%. the maximal concentration of produced enzyme is 20U/ml for *Y. lipolytica* L2 and 19,2 U/ml for *C. boidinii* G5, allowing to investigate that the production of lipase in SSF (in presence or absence of tween80), is better than SmF (presence / absence of tween 80), for the two strains. This result open the way on the use of studied strains in solid oil waste degradation. Furthermore, good results were found when using *Y. lipolytica* L2, as a starter, in a minimal medium with olive oil. During fermentation, all fatty acids were decreased, excepted stearic acid which increases. To conclude, *Yarrowia lipolytica* present an important biotechnological potential allow it to be exploited at industrial and environmental level.

**Key words :** *Yarrowia lipolytica*, *Candida boidinii*, Lipase, Biomass, Submerged fermentation, Solid fermentation, minimal medium with olive oil.

## ملخص

تم الحصول على 123 عزلة خميرة من عينات مختلفة من منتجات حليب البقر المتواجدة في قسنطينة و من ثفل الزيتون "شمال"، المتحصل عليه من مطحنة الزيتون الواقعة في سكيكدة. حصلنا على 116 من العزلات لقدرتها على تطوير النشاط الإنزيمي-الليباز. تم اختيار ستة عزلات من الخمائر المنتجة للليباز لتنميتها من هالات مهمة على متوسط ثلاثي البوتيرين أجار. بعدها، تم اختيار اثنين من العزلات L2 و G5 لقدرتها على إنتاج كميات كبيرة من الليباز الحقيقي، ليصل إلى 13.32 و/مل و 7.15 و/مل، على التوالي. أظهر التحديد الجزيئي أن هذه العزلات هي

*Yarrowia lipolytica* L2 المسجلة تحت رقم KF156787 و *Candida boidinii* G5 ، المسجلة تحت رقم KF156789

لتسليط الضوء على إمكانات جديدة للسلالة *Y. lipolytica* L2 ، تم إجراء دراسة مقارنة بين سلالتين منتجتين للليباز ، بمعالجة العديد من العوامل تحت ظروف بيئية مختلفة. في هذا النهج، بات من الواضح أن إنتاج الليباز من قبل سلالة *C. boidinii* G5 أسرع (24h) ، في حين أن كمية الليباز التي تنتجها *Y. lipolytica* L2 أكبر (13.3 و/مل). أظهرت تأثير إضافة زيت الزيتون مع / بدون tween 80 في المتوسط السائل SmF على إنتاج الكتلة الحيوية والليباز أن سلالة *Y. lipolytica* L2 تنتج جيدا الكتلة الحيوية والليباز في كمية صغيرة زيت الزيتون (0.5٪) في غياب توين 80. ومع ذلك، فإن إنتاج الكتلة الحيوية الكبيرة ونشاط الليباز العالي من قبل *C. boidinii* G5 يتطلب إضافة الزيت و tween 80 في المتوسط. الظروف المثلى للنشاط الليبازي التي تنتجها كل من السلالات المختارة هي درجة الحموضة 7.0 و درجة الحرارة 37 درجة مئوية. أظهر التخمر في الظروف الصلبةSSF الذي أجري في نسب مختلفة من الرطوبة الأولية (70٪ و 90٪) أن كلا السلالتين تتلاءم بشكل أفضل عندما تكون الرطوبة الأولية 70٪. إنتاج الحد الأقصى من تركيز الانزيم هو 20 و/مل ل *Y. lipolytica* L2 و 19.2 و/مل ل *C. boidinii* G5، لنجد أن إنتاج الليباز فيSSF (في وجود أو غياب tween80) يعطي عوائد أفضل من SmF (في وجود أو عدم وجود tween80) لكلا السلالتين. هذه النتيجة تفتح الطريق لاستخدام السلالتين في تطبيقات إنحلال النفايات الزيتون الصلبة. وعلاوة على ذلك، تم الحصول على نتائج مرضية عند استخدام *Y. lipolytica* L2 في متوسط الحد الأدنى مع زيت الزيتون. حيث أنه لوحظ في نهاية التخمر ، أن تراكيز كل الأحماض الدهنية انخفضت ، إلا أن وحده *acide stéarique* زاد. في الختام، *Yarrowia lipolytica* لديها إمكانات تكنولوجية حيوية هامة مما يسمح لاستخدامها في المستوى الصناعي والبيئي.

**الكلمات الرئيسية :** *Yarrowia lipolytica* ، *Candida boidinii* ، الليباز ، الكتلة الحيوية ، التخمر في الوسط السائل ، التخمر في الوسط الصلب ، وسط الحد الأدنى مع زيت الزيتون.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nom/Prénom : BATAICHE Insaf                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Date de soutenance : 10/08/2014                                                                                                                                                                               |
| <b>Intitulé : Recherche de nouvelles potentialités de <i>Yarrowia lipolytica</i>, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                               |
| <p><b>Résumé :</b> Un total de 123 d'isolats levuriens est obtenu à partir de différents échantillons de produits laitiers de vache, récoltés de la région de Constantine et de grignon d'olive variété locale « <i>Chemlal</i> » (GOC), obtenu d'une huilerie située à Skikda. En effet, 116 isolats sont sélectionnés pour leur capacité de développer une activité lipolytique. Six isolats levuriens producteurs de lipase sont présélectionnés pour leur développement d'importants halos sur milieu tributyrine agar. Ensuite, deux isolats (L2 et G5), sont sélectionnés pour leur aptitude à produire de quantités élevées de lipase, atteignant 13,32 U / ml et 7,15 U/ml, respectivement. L'identification préliminaire et moléculaire a montré que ces isolats sont <i>Yarrowia lipolytica</i> L2 dont le numéro d'accension est KF156787 et <i>Candida boidinii</i> G5, enregistré sous le numéro KF156789. Afin de ressortir les nouvelles potentialités de la souche <i>Y. lipolytica</i> L2, une étude comparative entre les deux souches potentiellement lipolytiques est effectuée, abordant plusieurs paramètres et sous différentes conditions de cultures. De cette approche il ressort que la production de lipase par la souche <i>C. boidinii</i> G5 est plus rapide (24h), tandis la quantité de lipase produite par <i>Y. lipolytica</i> L2 est plus importante (13,3U/ml). L'influence de l'ajout de l'huile d'olive avec/sans tween 80, en milieu liquide SmF, sur la production de biomasse et de lipase a permis de constater que la souche <i>Y. lipolytica</i> L2 produit une bonne biomasse et la lipase à une faible quantité de l'huile d'olive (0,5%) en absence de tween 80. Cependant, la production de biomasse importante et d'une activité lipasique élevée par <i>C. boidinii</i> G5 nécessite l'ajout de l'huile d'olive et de tween 80 dans le milieu. Les conditions optimales d'activité des lipases produites par les deux souches sélectionnées se trouvent à pH 7,0 et à 37°C de température. La fermentation solide effectuée sur le GOC dans différentes concentrations d'humidité (70% et 90%) a montré que les deux souches s'adaptent mieux lorsque l'humidité initiale est de 70%. La concentration maximale de l'enzyme produite est de 20U/ml pour <i>Y. lipolytica</i> L2 et de 19,2 U /ml pour <i>C. boidinii</i> G5, permettant de constater que la production de lipase en SSF (en présence ou absence de tween80) donne des meilleurs rendements qu'en SmF (en présence ou absence de tween 80), pour les deux souches. Ce résultat ouvre la voie sur l'utilisation des souches étudiées dans les applications de dégradation de déchet solide oléicoles. Par ailleurs, Des résultats satisfaisants ont été obtenus lors de l'utilisation de <i>Y. lipolytica</i> L2, comme starter, dans un milieu minimal à l'huile d'olive. L'analyse des produits hydrolysés par CPG, a montré qu'à la fin de la culture, la concentration des acides gras a diminué, excepté, l'acide stéarique qui a augmenté. En conclusion, <i>Yarrowia lipolytica</i> présente un potentiel biotechnologique important lui permettant d'être exploité à l'échelle industrielle et environnementale.</p> |                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Mots clés :</b> <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida boidinii</i> , Lipase, Biomasse, Fermentation liquide, Fermentation solide, Milieu minimal à l'huile d'olive.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Constantine 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Jury d'évaluation :</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Président de jury :</b> Mr. DEHIMAT L.<br><b>Rapporteur :</b> Mr. KACEM CHAOUICHE N.<br><b>Examineur :</b> Mr. HARZELLAH D.<br>Mr. LAAROUS L.<br>Mme. MIHOUBI I.<br>Mr. KITOUNI M.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>Prof. Univ. Constantine 1.</b><br><b>Prof. Univ. Constantine 1.</b><br><b>Prof. Univ. Sétif 1</b><br><b>Prof. Univ. Sétif 1.</b><br><b>Prof. Univ. Constantine 1.</b><br><b>M.C.A. Univ. Constantine 1</b> |

