

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة
UNIVERSITE 20 AOUT 1955-SKIKDA



Faculté des sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière: Sciences Biologiques
Option: Microbiologie appliquée

Intitulé

**Isolement et caractérisation des levures productrices de lipase à partir
des grignons d'olives**

Présenté par

- Bouharouf Khawla
- Bourouba Ahlem
- Belouahem Wafa
- Boudaoud Loubna

Membre de jury:

Dr. BECHEKER Imène (MCA)	Présidente	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Dr. AGGOUN Asma (MCB)	Directrice de mémoire	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Dr. BOUDJELLAB Zine Eddine (MCB)	Examinateur	Université du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2021/2022




Remerciement

Nous voudrions, en premier lieu, remercier notre dieu Allah qui nous a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons en second lieu à remercier chaleureusement notre directrice de mémoire Dr. AGGOUN Asma qui a dirigé ce modeste travail de recherche de Master. Nous lui remercions pour tout ce qu'elle nous a apporté, pour ses conseils, sa présence, sa patience et de nous avoir fait confiance. Nos sincères remerciements s'adressent aux membres de jury Dr. BOUDJELLAB Zine Eddine et au Dr. BECHEKER Imène de nous avoir honorées de leur présence, d'avoir accepté de présider ce jury et d'évaluer ce travail.

Nous souhaiterions adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide, de près ou de loin, et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire de fin d'études ainsi qu'à la réussite de notre cursus universitaire





Dédicace

Tous d'abord, louangent au Mon Dieu qui nous a offert la chance et la force de poursuivre nos études.

Je dédie ce modeste travail, fruit de notre parcours universitaire :

♥ A la mémoire de mon très cher père, qui nous a quittés trop tôt en reconnaissance de son amour et sa gentillesse, il a été le guide vigilant et le conseil juste de mon enfance.

♥ A ma très chère mère, qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, car toute réussite dans ma vie est grâce aux sacrifices de ma tendre mère, rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude alors merci maman.

♥ A mes très chères sœurs Rayane ,Wiam et mon frère Zakaria

♥ A mon grand père et ma grand mère et ma Tante

♥ A tous ceux qui portent le nom Bourouba

♥ A mes meilleurs amis Hiba ,Iman,Khawla,Wafa et Loubna.

♥ A mes adorables chats (Katous ,Sanfoura ,Sanfour,Nani ,Dodi ,SaghronetSaghrona)

A ma belle chienne Bella

♥ A tous qui me connude près ou de loin.

Ahlem





Dédicace

Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour poursuivre mes études.

Je dédie ce modeste travail, fruit de notre parcours universitaire

♥ A ma très chère mère « Warda » et mon très cher père « Smain » qui m'ont permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, qui ont le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour tous les sacrifices et les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être et de n'avoir jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'études rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude et aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi, Je vous offre toutes mes années d'étude ainsi que mon diplôme. Dieu tout puissant te garde santé bonheur et longue vie. alors merci maman merci papa je vous aime.

♥ A ma très chère sœur Selma et mon très chère frère Abdesslem. Merci pour tout...pour votre amour, la confiance et l'énergie que vous m'aviez donnée...Merci beaucoup pour votre aide précieuse, gentillesse, bonne humeur.

♥ A la mémoire de mes grands-parents « Kerkoub Zabida », « Mechati Rabah » « Belouahem Mohamed » c'est vrai qu'ils n'ont pas été avec moi pour récolter le fruit de ses sacrifices, mais, ils restent toujours la plus présente dans mon cœur.

♥ A ma grand-mère maternelle « bouzaouit Fadjria » que j'aime beaucoup.

♥ Pour mes quadrinômes en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble. J'espère que cette période reste inoubliable.

♥ A tous ceux qui portent le nom : Belouahem et Mechati et à mes oncles et tantes et mes cousins et cousines.

♥ A mes meilleurs amis et surtout : Khawla, Aïcha, les deux Asma, Loubna, Ahlem, Abir, Norah je vous souhaite toute la prospérité et la réussite que vous méritez.

♥ A mes amis de parcours en microbiologie appliquée et tous les étudiants de biologie.

♥ A tous ceux et celles qui aiment me voir réussir dans ma vie et qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

♥ A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Wafa





Dédicace

Je dédie ce modeste travail particulièrement

**A ceux qui me sont les plus chers au monde, A mes très chers parents
aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer
toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte que
dieu les protège.**

**A Mon père Djamel symbole de tendresse, qui a veillé tout
au long de ma vie à m'encourager m'aider et me protéger.
Je t'aime papa**

**A ma mère qui m'a encouragée durant toute réussite n'aura
pas eu lieu. Qu'elle trouve ici mon amour et mon affection.
Je vous aime papa est maman**

**Merci mon grand père de m'avoir comblé de tant de
tendresse, vie**

**A mon chère frère Samir pour son soutien infini et
son aide incessante, à qui je souhaite que du meilleur.**

**Aux membres de ma famille paternelle et
maternelle.**

**A mes très chères amies qui ont su arroser dans mon coeur
la joie et le bonheur, wafa, chaima, Chahra, Ahlem, Loubna,
Abir, Aïcha
et Asma .**

**A tous ceux et celles qui aiment me voir réussir dans
ma vie.**

Khawla





Dédicace

Je dédie ce travail à



Mes très chers parents

« Bouzid et Hafida » : autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Qu'Allah, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.



A mes chers frères « Abdelghani et Ibrahim » et mon futur mari « Raid » et mes chères sœurs « Farida, Zahia, Fadila, Naziha » Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Puisse Allah vous garder et vous protéger et que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

A toute ma famille, je vous remercie pour vos encouragements.



A mes très chers amis : « khawla, wafa, hayat, zomoroda, maroua, zineb et ahlem » : pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passés avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert, de votre affection dont je ne peux me surpasser, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

Loubna



Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Première partie : synthèse bibliographique	
Chapitre 01 : Les grignons d'olive	
1. Origine et historique de l'olivier	3
2. Définition de l'olive	3
3. Classification botanique	3
4. Description de la plante	3
5. L'industrie oléicole	4
5.1. Procédés d'extraction d'huiles d'olives	4
5.1.1. Système discontinu d'extraction par presse	5
5.1.2. Système continu d'extraction par centrifugation	6
5.1.2.1. Système d'extraction continu avec centrifugation à trois phases	7
5.1.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases	8
6. Généralité sur le grignon d'olive	10
6.1. Définition des grignons d'olives	10
6.2. Les types de grignon d'olive	10
6.2.1. Le grignon brut	10
6.2.2. Le grignon épuisé	10
6.2.3. Le grignon partiellement dénoyauté	10
6.3. Caractéristiques physiques et chimiques du grignon d'olive	11
6.3.1. Caractéristiques physiques	11
6.3.2. Caractéristiques chimiques	11
6.3.3. Caractéristiques microbiologiques	12
7. Impact des grignons d'olive sur l'environnement	12
Chapitre 02 : les levures	
1. Historique	13
2. Généralités	13
3. Morphologie	14
3.1. La forme des levures	14

3.2. La forme pseudomycélium	14
3.3 .La forme mycélium	15
4. Habitats	16
5-Structure cellulaire de la levure	18
6. Caractéristiques des levures	20
6.1. Caractéristiques Physiologiques et nutritionnelles	20
6.1.1. Besoins nutritifs des levures	21
6.1.2. Besoins physico-chimiques	21
7. Reproduction des levures	22
7.1. Reproduction sexuée	23
7.2. Reproduction asexuée	23
8. Production des enzymes par les levures	24
9. Classification des levures	25
10. Importance des levures	27
Chapitre 03 : Les lipases	
1. Généralités sur les lipases	29
2. Définitions	29
3. Caractéristiques	30
4. Origine des lipases	30
4.1. Lipase végétale	31
4.2. Lipases animales	31
4.3 .Lipases microbiennes	31
5. Production de lipase	31
6. Microorganismes producteurs de lipases	32
7. Intérêt industriel des lipases	32
7.1. Détergents et agents nettoyants	32
7.2. Industrie alimentaire	33
7.3. Produits chimiques fins	33
7.4. Industrie de la pâte et du papier	33
7.5. Bioremédiation de la lipase et processus environnementaux	33
Deuxième partie : expérimentation et discussion des résultats	
Matériels et méthodes	
1. Cadre et objectif de l'étude	34
2. Méthodologie	35
3. Echantillonnage	36
3.1 Site de collecte	36
3.2 Technique de prélèvement	36

4. Analyses des échantillons	36
4.1. Isolement des levures	36
4.1.1. Préparation de solution mère	37
3.1.2. Préparation des dilutions	37
3.1.3. Encencement et incubation	37
4.2 Purification des levures	38
4.3. Conservation	39
4.4. Caractéristiques des souches levuriennes purifiées	39
4.4.1. Caractéristiques biologiques	39
4.4.2. Caractéristiques Physico-chimique	40
4.4.3. Caractéristiques biotechnologieques	41
- Coloration au noir de soudan	41
- Etude de l'activité enzymatique	41
- Dénombrement par cellule de Malassez	42
-Ensemencement sur milieu POA	42
-Révélation de l'activité enzymatique	43
Résultats et discussion	
1. Analyse des échantillons	44
1.1. Isolement des levures	44
1.2. Caraéctéristiques biologiques	47
1.3. Caraéctéristiquesphyscico-chimiques	51
1.4. Caraéctéristiques biotechnologiques	53
1.4.1 Résultats de la coloration par noir de Soudan III	53
Conclusion	58
Références bibliographiques	59
Annexes	76
Résumé	78
Abstract	78
ملخص	78

Liste d'abréviations

PDA = Potato Dextrose Agar (gélose pomme de terre glucosée, pH5.6)

L= Lipase

POA = phénol oil agar

Liste des figures

1 .Coupe schématique d' une olive	4
2. Diagramme de système d'extraction discontinue par pression	6
3. Diagramme de système d'extraction continue avec centrifugation à 2 phases	7
4. Diagramme de système d'extraction continue avec centrifugation à 3 phase	8
5 .Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu	9
6. Les grignons d'olive	10
7. Division de cellules levuriennes par bourgeonnement	13
8. Cellules levuriennes	14
9. Filamentation des levures	16
10. Structure cellulaire des levures	18
11 .Cycle de reproduction de la levure	23
12. La reproduction sexuée d'une levure	23
13. La reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure	24
14. Représentation schématique des différents domaines d'utilisation de la levure	28
15. Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase) .le feuillet beta enjaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha en bleu, et les motifs 'turn' en bleu ciel	30
16 .Carte géographique de laboratoire de santé MerdjEdibe	34
17. Schéma général des méthodes suivies	35
18 .La nouvelle huilerie de Sidi Mezghich	36
19 .Les grignons d'olives	36
20. Huilerie d'EmjazEdchich	36
21. La région de récolte	36
22. Pesée des grignons d'olives	37
23. Homogénéisation de la solution mère	37
24. Préparation des dilutions	37
25. Ensemencement des souches	38
26. Incubation dans l'étuve	38
27. Purification des levures dans des tubes inclinés	38
28. Différents étapes de purification des levures	39
29. Test de filamentation	40
30. Cellule de Malassez	42
31. Ajustement du pH	42
32. Milieu POA	42
33. Préparation des puits sur milieu POA	43
34. Ensemencement dans les puits	43
35. Observation macroscopique de test de croissance de 37°C	52

Liste des tableaux

Tableau 01: Composition physique des différents types de grignon	11
Tableau 02: Composition chimique indicative des différents types de grignons	12
Tableau 03: Habitats de <i>Candida</i>	17
Tableau 04: Exemple de quelques enzymes d'intérêt industriel produites par les levures.	24
Tableau 05 : Classification des levures	26
Tableau 06 : Aspect macroscopique des isolats sélectionnés (L1,L2 ,L3,L4,L5,L6,L7)	44
Tableau 07 : Observations microscopiques des souches levuriennes	47
Tableau 08 : Résultat du test de filamentation après deux jours d'incubation à 28 °C	50
Tableau 9: Résultat de croissance à 37 °C des 5 souches levuriennes sélectionnées	52
Tableau 10: Analyse qualitative et quantitative des lipides intracellulaires par coloration au noir de Soudan III .	54
Tableau 11 : Test de la production de lipase chez les levures isolées	56

Introduction

INTRODUCTION

La production d'huile d'olive a un impact vital sur le développement socio-économique dans la plupart des pays méditerranéens, qui restent prédominants avec 97.5 % de la production d'huile d'olive (**Munir, 2016**). L'industrie oléicole génère, en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous-produits solides (grignons d'olive, feuilles, bois) ou liquides (margines) (**Rizoun, 2013**). Les déchets oléicoles se constituent essentiellement des matières grasses, des huiles et des lipides. Le grignon d'olive possède toutes les caractéristiques propices pour qu'il devienne, en subissant au préalable des traitements chimiques et thermiques, un matériau adsorbant utilisable dans divers domaines en raison de sa structure physique, de sa richesse en constituants carbonés (**Benrachedi et al, 2001**)

En fait, ces composés sont très énergétiques, insolubles et composés principalement de triglycérides qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, mono insaturés ou polyinsaturés (**Treichel et al, 2010**).

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**Ibukun et Akindumila, 1998 et Abu et al., 2005**). De plus, les microorganismes constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques, grâce à des enzymes (**Vieille et Zeikus, 2001**)

Parmi ces enzymes, on recense les protéases, les cellulases et les lipases qui sont d'une grande importance en biotechnologie (**Scriban et al, 1999**). En effet, elles ont des applications commerciales diversifiées, (**Bolton et al, 1997 et Cordeiro et al, 2002**).

Les lipases, proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (**Burhan et al, 2003**).

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 productrices de lipase sont isolées des origines diverses notamment du sol et elles sont dominées par des espèces de *Candida*.

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se focalise sur l'isolement et la caractérisation des levures à partir des grignons d'olives. En effet, un isolement préliminaire des souches levuriennes pures sera entrepris. Suivis par une identification des levures selon leurs caractéristiques biologiques, physico-chimiques et biotechnologiques.

Première partie
synthèse bibliographique

Chapitre 01
les grignons d'olive

1. Origine et historique de l'olivier

L'olivier est considéré comme étant l'un des plus anciens produits de l'agriculture. Il a été cultivé dès l'an 3000 avant Jésus-Christ. Les découvertes archéo-botaniques de noyaux d'olive dans les habitats humains remontent à environ 780 000 ans, il a été démontré que des cavités de rochers ont servi pour le pressage des olives en crête (Bouhaddi et Idres, 2018).

2. Définition de l'olive

L'olivier, arbre spécifique du bassin méditerranéen, a été depuis la nuit des temps considéré comme symbole de la sagesse, de la paix, de la richesse et de la gloire (Benlemlih, 2016).

La composition génétique du fruit est identique pour tous les fruits d'un même arbre, ou d'un clone. (Breton et Berville, 2012)

3. Classification botanique

L'olive, *Olea europaea* L, appartient aux Oleaceae, une famille de taille moyenne comprenant environ 25 genres et 600 espèces réparties dans les régions tempérées et tropicales du monde (Hava et Sebastiani, 2016).

L'olive ou l'olive sauvage (Var. *Sylvestris*) et l'olive cultivée (Var. *Europaea*) sont deux formes coexistantes de la sous-espèce *europaea* (Rabiei et al., 2012)

- Clade : *Asteridae*
- Famille : *Oleaceae*
- Genre : *Olea*
- Espèce : *europaea*
- Sous-espèce : *cuspidata*, *Cerasiformis*, *guanchica*, *laperrinei*
Maroccana, *europaea*
- Variété : - *europaea* (ou *sativa* – *sylvestris*)

Taxonomie d'*Olea europaea* (Chiappetta et Muzzalupo, 2012).

4. Description de la plante

L'olive est appelé drupe botaniquement, de couleur verte au début et devenant généralement noirâtre pourpre à pleine maturité. Quelques variétés sont vertes même à maturité, et certaines virent au brun cuivré. Les olives sont constituées d'un carpelle et la paroi de l'ovaire présente des parties charnues et sèches. La peau (exocarpe) est exempte de poils et contient des stomates. La chair (mésocarpe) est le tissu que l'on mange et la fosse (endocarpe) renferme la graine. La taille, la forme, la teneur en huile et le goût des cultivars d'olivier varient considérablement. Les olives crues contiennent un alcaloïde qui les rend

amères et désagréables. Quelques variétés sont suffisamment sucrées pour être consommées après un séchage au soleil (**figure 01**)(**Rabiei, 2012**)

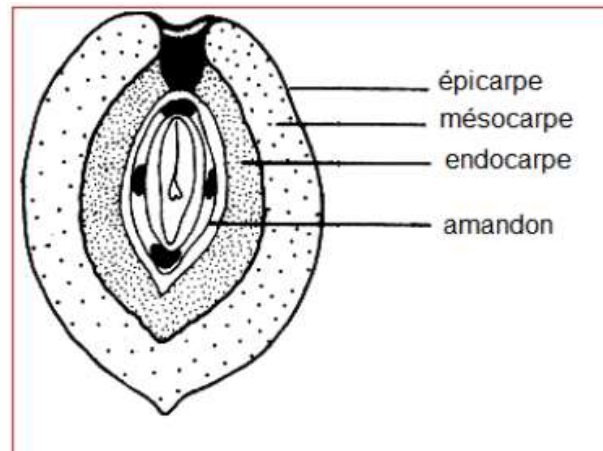


Figure01 : Coupe schématique d'une olive (**Nefzauoi, 1984**)

5.L'industrie oléicole

L'industrie oléicole est l'un des activités importantes pour l'homme à cause de sa production de l'huile d'olive, cette dernière se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen dont la production de ces pays représente 94% de la production mondiale (**Sbai et Loukili, 2015**)La production d'huile d'olive a un impact vital sur le développement socioéconomique dans la plupart des pays méditerranéens avec 97.5% de la production d'huile d'olive (**Munir et al., 2016**).

5.1. Procédés d'extraction d'huiles d'olives

L'extraction peut être réalisée par des procédés qualifiés de discontinus ou continus. Les techniques d'extraction de l'huile d'olive ont subi de nombreuses évolutions au cours du temps. Ces évolutions concernent le broyage des olives et la séparation des phases solide et liquide. Entre ces deux étapes, la pâte d'olive issue du broyage est malaxée afin d'être homogénéisée. Ce traitement permet la coalescence des gouttelettes d'huile. La pâte malaxée va ensuite être traitée par pressage ou centrifugation. A partir de ce protocole, deux catégories de méthodologies d'extraction ont été développées : le système discontinu qui est apparu en premier et les extractions continues par centrifugation horizontale à 2 ou à 3 phases qui sont apparues de façon plus tardive (**Nadour, 2015**)Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, il génère des sous-produits oléicoles appelés grignons et margines. Le grignon d'olive est constitué de la peau, de la pulpe et du noyau. Les margines correspondent, en plus de l'eau de végétation, à l'eau additionnée durant le processus d'extraction (**Nadour, 2015**)

5.1.1. Système discontinu d'extraction par pression

Traditionnellement, et jusqu'à l'apparition des méthodes modernes d'extraction par centrifugation, l'extraction par presse était l'unique procédé existant. La pression exercée sur la pâte d'olive conduit à la séparation des phases liquides (huile et margines) et solides (grignons) (Morillo *et al.*, 2009).

. Pour obtenir des rendements élevés en huile, il est nécessaire de libérer la plus grande partie d'huile contenue dans les vacuoles situées dans les cellules du mésocarpe des olives. A cet effet, les olives sont broyées, après leur lavage, dans un moulin en pierre (Aparicio *et Harwood*, 2013).

La pâte issue du broyage est étendue en fines couches sur des disques de matière filtrante (toile, ou plus récemment fibres plastiques) appelés scourtins. Les scourtins sont entassés les uns sur les autres dans un wagonnet en étant guidés par une aiguille centrale. L'ensemble formé par le wagonnet, l'aiguille et les scourtins entassés porte le nom de charge. Le pressage, initialement réalisé de façon manuelle, est désormais effectué par des presses hydrauliques plus puissantes et automatisées. La phase liquide obtenue est mise dans des réservoirs et la phase huileuse est séparée de la phase aqueuse (margines) par décantation dans des cuves ou plus récemment au moyen d'une centrifugation verticale. Beaucoup de facteurs affectent les rendements d'extraction par ce procédé. Parmi eux, la pression de pressage apparaît comme déterminante. Les presses les plus puissantes atteignent une pression maximale comprise entre 350 et 400 kg/cm² ce qui permet l'extraction d'un pourcentage élevé d'huile (entre 82–86 %) (Digiovacchino *et al.*, 1994).

Cette méthode offre des avantages tels que le faible coût de l'équipement, la simplicité de la technique et une consommation faible d'énergie (COI, 1990)

En outre, la quantité d'eau utilisée est relativement faible ce qui génère de faibles volumes de margines qui sont de l'ordre de 40 à 60 L/100 kg d'olives (Kapellakis *et al.*, 2008). Cependant, ces margines posent un sérieux problème de pollution de l'environnement du fait de leur demande chimique en oxygène (DCO) plus élevée que celle des margines plus diluées générées par les autres procédés d'extraction (DiGiovacchino *et al.*, 2002).

. Le système discontinu d'extraction par presse présente également des inconvénients, tels que les coûts élevés de la main d'œuvre et la discontinuité du processus. En effet, le nettoyage des scourtins doit s'effectuer soigneusement pour une élimination totale des particules restant dans la matière filtrante. Les conditions d'humidité et de température peuvent conduire à des

processus hydrolytiques et oxydants pouvant altérer les huiles (mauvais goût et acidité élevée). Ce système traditionnel, largement utilisé par le passé, a été peu à peu abandonné dans les années 1970 pour des raisons économiques (**Sanchez-Moral et Ruiz-Mendez, 2006**). On l'utilise néanmoins toujours de façon artisanale dans certains pays tels que l'Italie et le Portugal où 5000–6000 et 1000 d'huileries respectivement, fonctionnent en utilisant ce procédé (**Niaounakis et Halvadakis, 2006**)

On l'utilise néanmoins toujours de façon artisanale dans certains pays tels que l'Italie et le Portugal où 5000–6000 et 1000 d'huileries respectivement, fonctionnent en utilisant ce procédé (**figure02**)

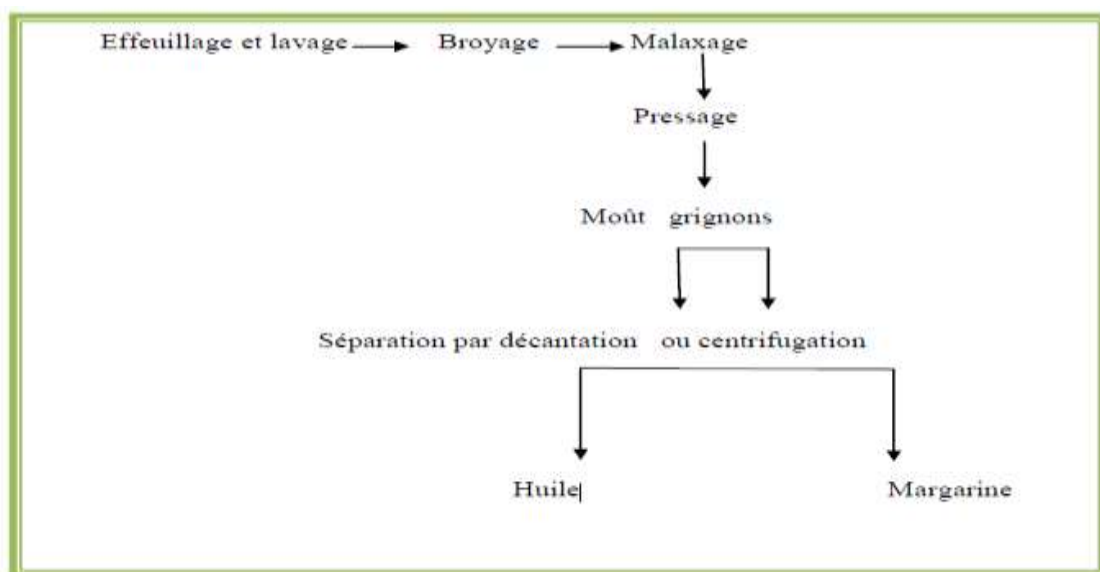


Figure 02:Diagramme de système d'extraction discontinue par pression (**Sekour, 2012**)

5.1.2 Système continu d'extraction par centrifugation

Le processus industriel de transformation le plus commun est un système d'extraction en continu avec deux centrifugations (horizontal puis vertical) (**Labdaoui, 2017**). Cette conception moderne de l'extraction remplace le pressage traditionnel avec comme conséquence la réduction de la main-d'œuvre et donc des coûts d'exploitation. La méthode de centrifugation est un processus continu qui peut séparer grâce à la force centrifuge l'huile d'olive des autres phases de la pâte d'olive que sont les margines et les grignons (**Nadour, 2015**).

La centrifugation verticale peut être à trois phases ou l'addition d'eau est indispensable.

A cet effet les sous-produits : huile, margines et de grignons incorporés avec de l'eau de végétation ou peut être à deux phases (sans l'injection d'eau ou très peu) avec obtention d'huile

et de grignons plus humides (Alba, 1997). Le principe de la séparation repose sur une augmentation des masses spécifiques des liquides non miscibles que sont l'huile et l'eau et la matière solide (grignons) sous l'effet de la vitesse élevée (3500–3600 rpm) générée par la centrifugeuse horizontale (Aparicio et Harwood, 2013).

5.1.2.1. Système d'extraction continu avec centrifugation à deux phases

Le procédé technologique d'extraction des huiles d'olive fonctionne avec un nouveau décanteur avec centrifugation à deux phases (huile et grignon) qui ne nécessite pas l'ajout d'eau pour la séparation des phases huileuse et solide contenant le grignon et les margines. Le rendement en huile généré par ce système est légèrement plus élevé que les autres. Le décanteur à deux phases permet d'obtenir une huile riche en polyphénols totaux et en orthodiphénols, il est donc plus stable. Ce système est plus respectueux de l'environnement car il ne procède pas à l'augmentation du volume d'effluent liquide appelé margines (figure 03) (Chimi, 2006).

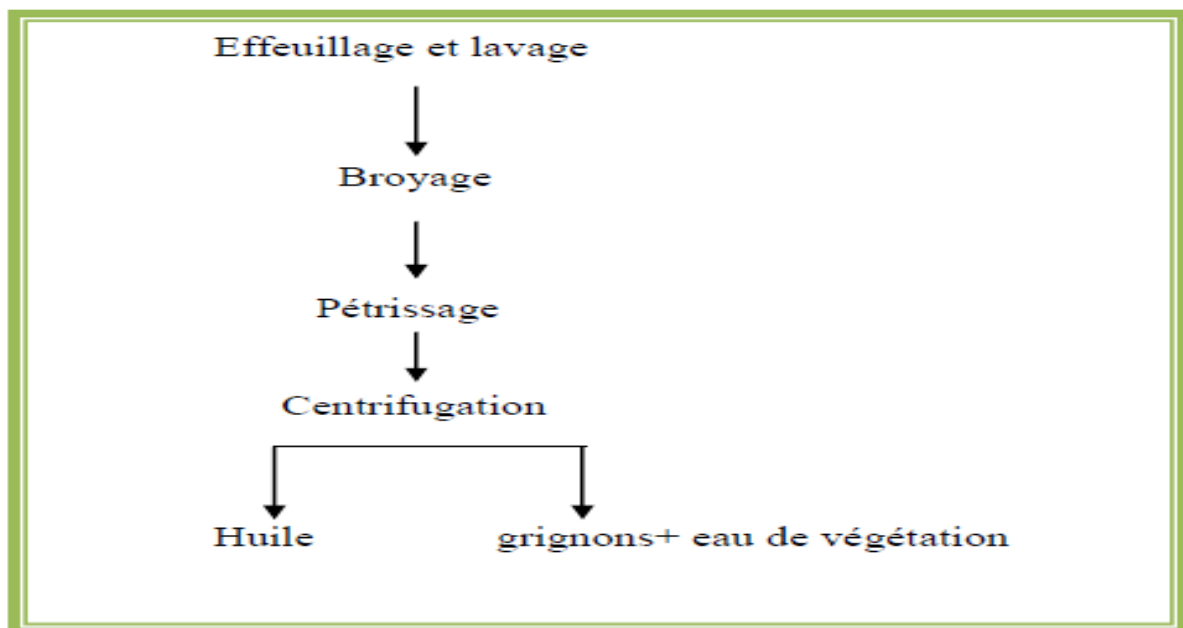


Figure 03: Diagramme de système d'extraction continue avec centrifugation à 2 phases (Sekour, 2012)

5.1.2.2. Système d'extraction continu avec centrifugation à trois phases

Les trois phases sont : huile, margine et grignon. L'introduction de ces installations «continues » a permis de réduire les coûts de transformation et la durée de stockage des olives avec comme conséquence une production d'huile de moindre acidité. Ce système présente les inconvénients suivants : les apports élevés en eau chaude (40 à 60% du poids de la pâte) font que l'huile extraite se trouve appauvrie en composés aromatiques et phénoliques. Ces composés passent dans les margines. Ce système donne aussi des grignons à teneurs élevées en humidité (45 à 55%) (Benitez et al., 1997).

Le système à 3 phases, en dépit de sa grande consommation d'eau, est toujours employé pour la production d'huile d'olive, particulièrement dans les pays producteurs de grandes quantités d'huile sur des périodes courtes. Ainsi, l'Italie, la Grèce et le Portugal sont de gros utilisateurs d'unités d'extraction fonctionnant avec le système à 3 phases.

A titre d'exemple, en Grèce, 70% des huileries sont de type système continu à trois phases, le reste fonctionnant avec le système traditionnel (figure 04) (Niaounakis et Halvadakis, 2006)

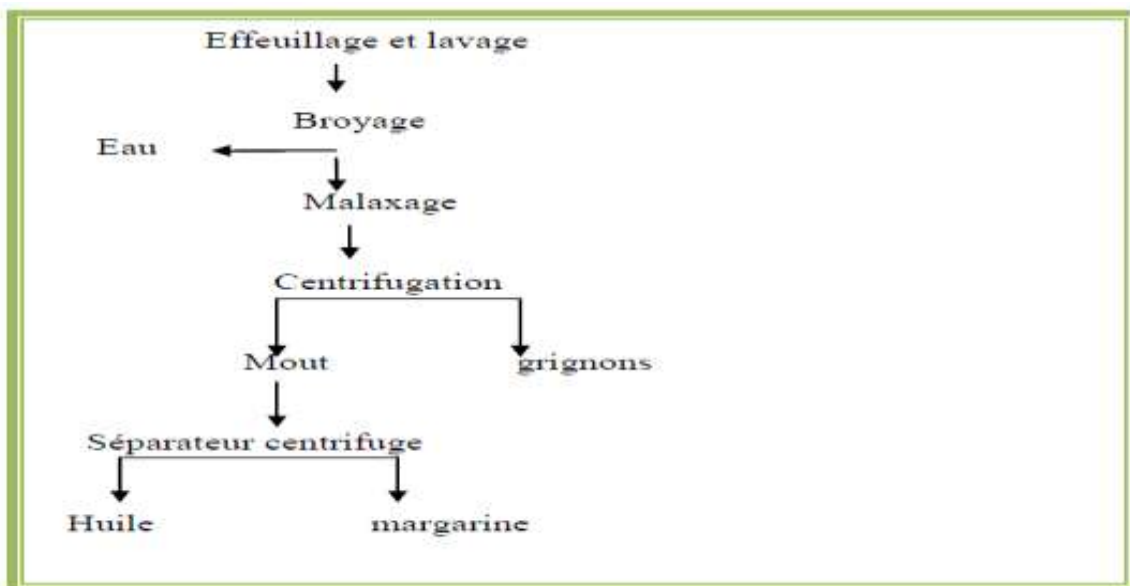


Figure 04 : Diagramme de système d'extraction continue avec centrifugation à 3 phases (Sekour, 2012)

La figure suivante (**figure 05**) récapitule les trois systèmes d'extraction selon Hammadi(2006)

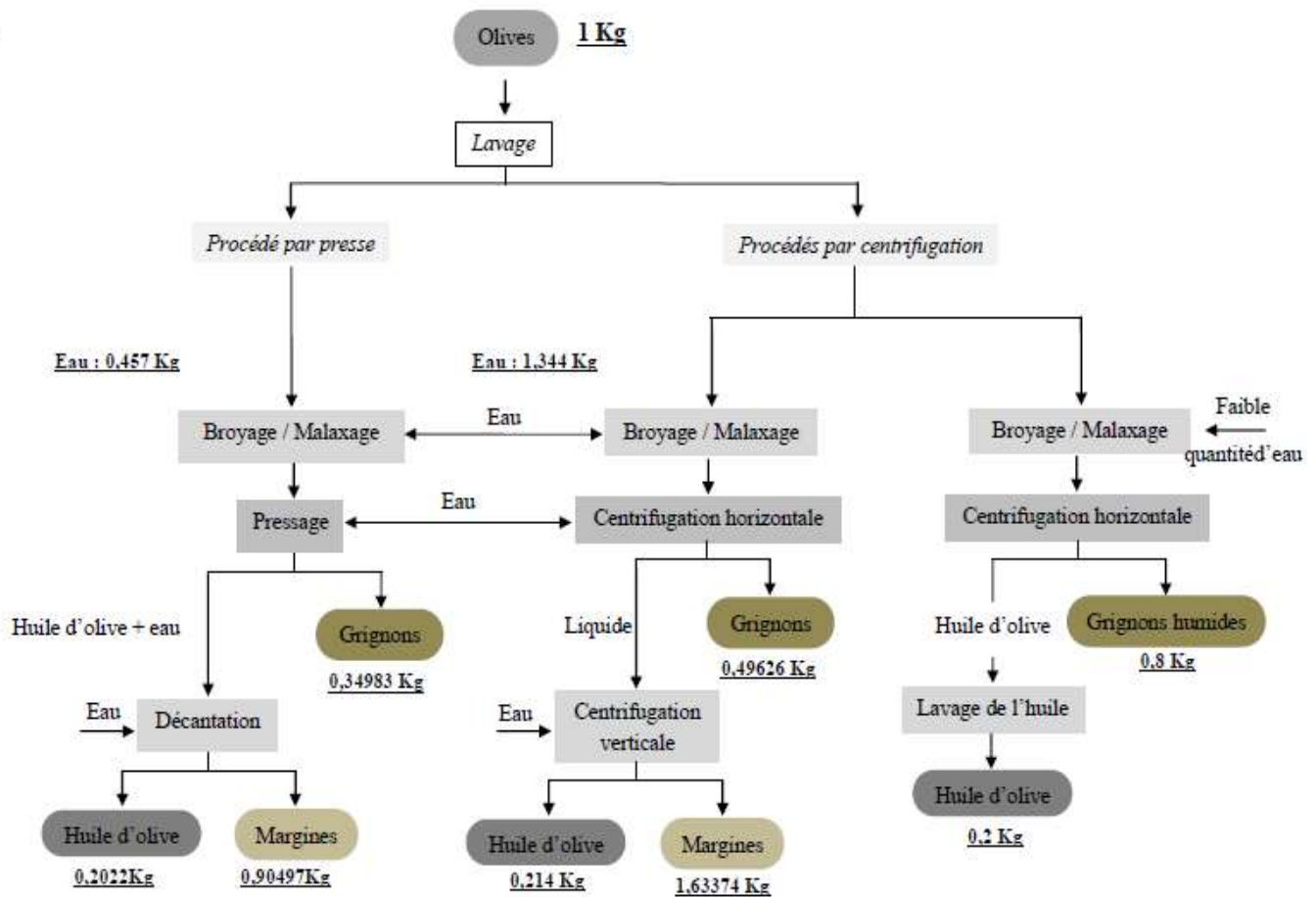


Figure 05 : Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu (Vlyssides *et al.*, 2004; Dermeche *et al.*, 2013).

6. Généralité sur le grignon d'olive

6.1. Définition des grignons d'olives

Le grignon d'olive est un résidu solide de couleur brune, résultant du processus de production d'huile d'olive, par pressage mécanique des fruits d'oliviers, sans aucun traitement chimique. Il se compose de la coque du noyau réduit en morceaux, de la peau et de la pulpe de l'olive ; il contient encore une certaine quantité de matières grasses et une importante quantité d'eau variable selon la variété des olives et surtout du procédé d'extraction utilisé (**figure 06**)



Figure 06 : Les grignons d'olive

6.2. Les types de grignon d'olive

Selon le traitement subit, les grignons se divisent en :

6.2.1. Le grignon brut

C'est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière, ses teneurs relativement élevées en eau et en huile favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.

6.2.2. Le grignon épuisé

C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par un solvant, généralement l'hexane (**El Hachemi, 2010**).

6.2.3. Le grignon partiellement dénoyauté :

Résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation

Il est dit "gras" si son huile n'est pas extraite par solvant. Il est dit "dégraissé ou épuisé" si son huile est extraite par solvant (**tableau 01**) (**Babakhouya, 2010**).

Tableau 01:Composition physique des différents types de grignon (Nefzaoui, 1987)

Composition Produit	M.S(%)	Pourcentage(%) en matière sèche.			
		Matière grasse	Noyau sec	Amandon Sec	Mésocarpe +épicarpe
Olive	51,4	27	14,1	1,3	9
Grignon brut	75,9	9,1	42,1	3	21,2
Grignon épuisé	72,3	4,2	-	5,6	39,3
Grignon tamisé	95,5	18,6	-	11,1	80,2

6.3. Caractéristiques physiques et chimiques du grignon d'olive

6.3.1 Caractéristiques physiques

Le grignon d'olive renferme la plus grande partie de la matière sèche de l'olive et une certaine proportion d'eau de végétation (margines) qui contient les composants hydrosolubles de l'olive et une certaine quantité d'huile résiduelle qui favorise leur altération rapide (Amrane et Belkacemi, 2017)

6.3.2. Caractéristiques chimiques

La composition chimique du grignon d'olive varie dans de très larges limites. Elle dépend des facteurs suivants : la variété d'olive, stade de maturité, du procédé d'extraction de l'huile et aussi de l'épuisement par solvant. Les teneurs en matières grasses et en cellulose brute présentent les variations les plus importantes (Nefzaoui, 1984)

Ces variations se répercutent directement sur la valeur nutritive du produit. Les teneurs en matières azotées sont en moyenne de l'ordre de 10%. L'olive contient des quantités élevées de phénols (0,3 à 5% de la matière sèche). Ce sont surtout des orthophénols. L'oleuropéine, glucoside amer, est le composé phénolique le plus abondant et le plus caractéristique des oléagineux (Vasquez-Roncero et al., 1970). La concentration de l'oleuropéine varie selon le type d'olive et diminue avec la maturation du fruit (Bouaziz et al., 2006). Les polyphénols sont utiles dans le fruit pour protéger l'huile mais deviennent polluants lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement à cause de leur caractère récalcitrant et antibactérien (tableau 02) (Hamdi, 1992).

Tableau 02: Composition chimique indicative des différents types de grignons (Nafzaoui., 1984)

Type	Matière Sèche	Matières minérales	Matières Azotée totales (%)	Cellulose brute	Matières Grasses
Grignon brut	75-80	3-5	5-10	35-50	8-15
Gr. gras part. dénoyauté	80-95	6-7	9-12	20-30	15-30
Grignon épuisé	85-90	7-10	8-10	35-40	4-6
Gr. épuisé part. Denoyauté	85-90	6-8	9-14	15-35	4-6
Pulpe grasse	35-40	5-8	9-13	16-25	26-33

6.3.3. Caractéristiques microbiologiques

Dans les effluents d'huileries d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures comme l'espèce *Trichosporoncutaneum* et des moisissures comme l'espèce *Aspergillus niger*. Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire. Le pouvoir antimicrobien des effluents d'huileries d'olive est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols et les pigments bruns (Hamdi et Ellouz, 1993)

Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli, 1991).

7. Impact des grignons d'olive sur l'environnement

La majorité des grignons sont rejetés dans la nature et de la source de pollution. Ils peuvent être contaminés par des champignons, ou bien ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou les composés poly phénoliques qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent se lixivier, menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement. Plusieurs sources d'eau ont été contaminées (Saoudi., 2017)

Chapitre 02

Les Levures

1. Historique

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation (**Bouix et Leveau, 1991 et Pol, 1996**). Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**Pol, 1996**).

Elle est largement utilisée comme « usine cellulaire » pour plusieurs applications, comme la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutiques, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol (**Lim et al., 2011; Martin et al., 2012 ; Neagu et Bahrim, 2012**).

2. Généralités

Selon Phaff et al., (1968), le mot levure provient du mot latin *levare* qui se traduit par lever, a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces microorganismes à produire du CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (**Oteng-Gyang, 1984**).

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes microscopiques avec un ADN double brin (**Kurtzman et al., 2011**) faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par une taxonomie basée à la fois sur des caractères morphologiques et physiologiques (caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium) (**Guiraud, 1998**).

Elles se reproduisent par bourgeonnement (**figure07**) ou par fission binaire (**Kreger-Van, 1984; François et al., 2001**)

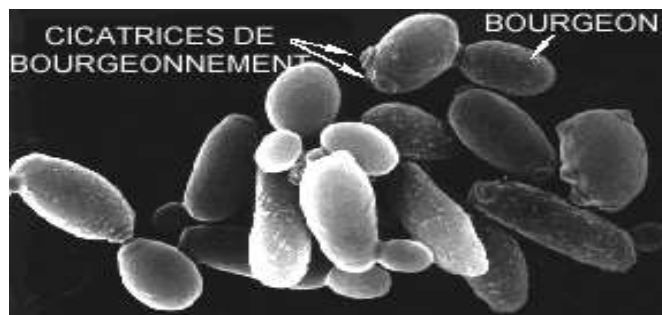


Figure07 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (**web 01**)

Leurs cellules sont ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques ou allongées se détachant facilement les unes des autres et de ce fait bien adaptées à la propagation dans les liquides (**figure08**)(Bouix et Leveau, 1991).

Leur cytoplasme abrite l'ensemble des organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Guiraud,1998).



Figure 08:Cellules levuriennes (Belmaziz et Djalal ,2017)

3. Morphologie

La morphologie des levures est très variée. On distingue trois formes : la forme levure, le pseudomycélium et le mycélium.

3.1. La forme levure

C'est la plus simple, il s'agit de cellules uniques, libres ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique : sphérique, ovoïde, globuleuse ou cylindrique. Des formes spécifiques sont parfois distinguées comme la forme apiculée (*Hanseniaspora* et *Kloeckera*), en bouteille (*Pityrosporum*), triangulaire (*Trigonopsis*) ainsi que la forme pyramidale et ogivale (*Dekkera*) (Walker et White, 2005). Ceci en plus des arthrospores, des ballistospores et des chlamydospores(Barnett et al., 1983). Sous cette forme unicellulaire, les dimensions sont de 2,5 à 10,5 um de large et de 4,5 à 21 um de long. Cette longueur peut dépasser, chez certaines espèces, les 30 um. Ces dimensions, ainsi que leurs aspects dépendent fréquemment de l'âge des cellules et des conditions de culture (Scherr et Weaver, 1953).

3.2. La forme pseudomycélium

Chez certaines espèces et après bourgeonnement, les cellules filles restent associées les unes aux autres et donnent des chaînettes constituées de plusieurs cellules formant un pseudomycélium. Ce dernier peut être rudimentaire ne comptant que quatre à cinq cellules comme il peut être plus important et présenter des ramifications. Souvent les cellules centrales

s'allongent et dessinent un axe principal, tandis que les cellules localisées aux extrémités restent courtes et forment des blastospores (ou blastoconidies) au niveau des constriction, l'anaérobiose favorisent la production de cette forme (**Belin, 1996**).

3.3. La forme mycélium

La propriété de donner un vrai mycélium séparé par des cloisons ou septa caractérise certaines espèces de levures. Cette différenciation résulte d'un allongement important des cellules et l'hyphe ainsi formée prolifère par une croissance apicale. Dans la majorité des cas, c'est le pseudomycélium qui se transforme en mycélium, mais existe des espèces chez lesquelles les levures donnent directement un filament sans passer par ce dernier. (**figure09**) Son élaboration débute par l'émergence d'un tube germinatif qui, par croissance apicale, génèrera un filament qui s'étendra à un rythme constant, se cloisonnera et se ramifiera pour constituer une hyphe et un mycélium qui se propagera pour donner un réseau bien enchevêtré (**Bouix et Leveau, 1980**). Occasionnellement un septum peut séparer la forme levure de la forme mycélium, c'est ce qui a été observé par Rahary et ses collaborateurs chez *C. albicans* en mettant en évidence l'action de la cytohélicase de la cellule mère dans la formation de ce septum (**Rahary et al., 1984**). La transition inverse existe également et selon plusieurs auteurs, les levures apiculées qui se multiplient par bourgeonnement bipolaire, seraient intermédiaires entre la forme mycélienne et la forme unicellulaire bourgeonnante (**Lodder, 1971**).

Ce dimorphisme, voire ce polymorphisme est un phénomène marquant de certaines espèces. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce mécanisme (**Nickerson et Falcone, 1956; Bartnicki-Garcia, 1963; Bartnicki-Garcia et Lippman, 1969; Kanetsuna et al., 1972 et San-Blast, 1979**), mais ces dernières sont très anciennes et reposent sur les observations de trois espèces seulement .

Ce phénomène reste donc inexpliqué. Cependant, il est sûr que cette transition levure-mycélium peut être provoquée par des facteurs externes variés comme la température, le pH et la teneur en glucose (**Pollack et Hashimoto, 1987 ; Vidotto et al., 1971**)

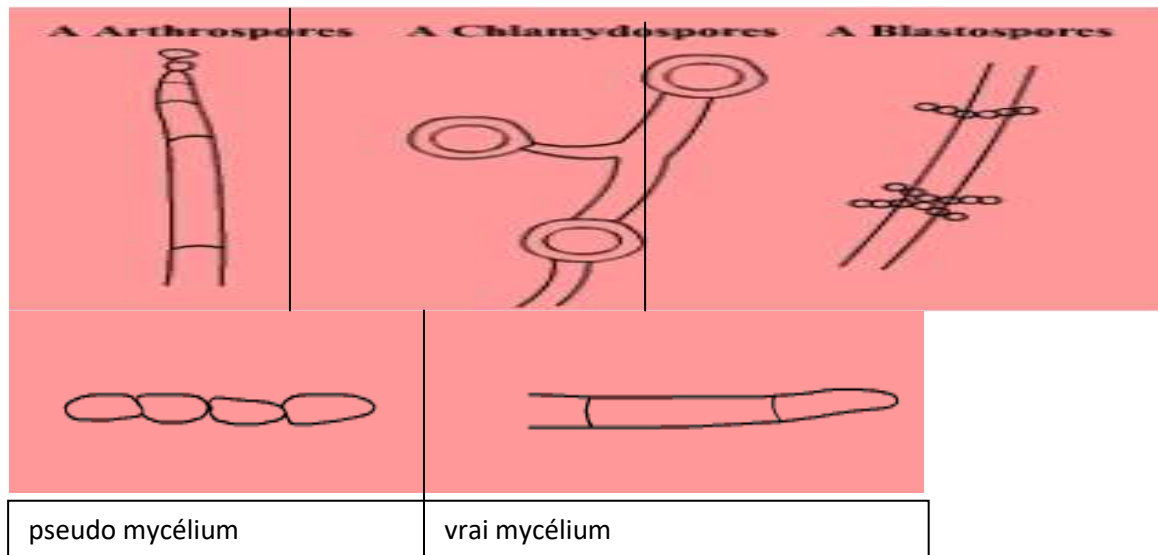


Figure 09:Filamentation des levures (Guiraud,1998)

4.Habitats

Dans la nature, les levures sont des espèces ubiquitaires, elles se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnements préférés (sirops, bière, miel, fleurs et de nombreux fruits) (Leclerc, 1975 ; Oteng-Gyang, 1984 et Jimoh et al., 2012; Greppiet al., 2013; Adewara et al., 2013). D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton (Van Uden et Fell, 1968 et Ahearn, 1973) d'autres sont parasites et se trouvent dans les tubes digestifs de certains vertébrés (Larpent, 1991)

Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levurienne associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface. Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat (Phaff et Starmer, 1987) les levures se trouvent dans diverses niches écologiques (Lachance, 2011b) : dans des milieux naturels (sur/dans les fruits, sur les arbres, ...) ou dans les milieux anthropisés (chez l'homme, dans les produits fermentés naturels et industriels de l'alimentation ou de pharmacie). Certaines espèces isolées de l'homme ou des produits fermentés sont des pathogènes opportunistes (comme *Candida tropicalis*, *C. zeylanoides*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* ou *Citeromyces matritensis*) (Anaisie et al., 2009 ; Dismukes et al., 2003 ; Euzéby 2008), c'est-à-dire pathogènes chez des personnes immuno-déficientes (Jacques et Casaregola 2008 ; Miceli et al., 2011).

D'autres espèces sont commensales à l'homme, naturellement présentes dans le tractus

digestif, sur les muqueuses et la peau, et également présentes dans des produits fermentés (Kurtzman *et al.*, 2011). Le **tableau 03** présente les différents habitats des levures du genre *Candida*.

Tableau 03:Habitats de *Candida*

Habitats	Références
Cornichons	(Rezki <i>et al.</i> , 2013) .
Dattes	(Rezki <i>et al.</i> , 2013).
Ecorces d'arbres	(Rao R. S. <i>et al.</i> , 2008).
Déchets de la pomme de terre	(Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012).
Fromage	(Prillinger <i>et al.</i> , 1999 ; Jacques <i>et Caseregola</i> ,2008 et Binetti <i>et al.</i> , 2013).
Lactosérum	(Jairath <i>et al.</i> ,2012).
Yaourt	(Lopandic <i>et al.</i> ,2006).
Jus d'orange Jus de fruits	(Covadonga <i>et al.</i> , 2002). (Jairath <i>et al.</i> , 2012).
Mezcal	(Verdugo Valdez <i>et al.</i> ,2011).
Grains de blé , Sol	(Djekrif, 2016)
Déchets industriels	(Lachance, 2011b ; Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012).
Agave	(Pérez-Brito <i>et al.</i> , 2015).
Spécimens cliniques	(Zhang <i>et al.</i> , 2010; Lachance, 2011 et Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012)

5. Structure cellulaire de la forme levure :

La structure cellulaire des levures, qui est sous la dépendance des conditions physico chimiques et de l'âge de la culture, est de type eucaryote et possède une paroi épaisse et rigide, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites et inclusions dont des mitochondries et une grande vacuole. Chez levures, on note l'existence d'une capsule constituée de phosphomannanes solubles dans l'eau (Hansenula, Pichia), de mannanes plus ou moins ramifiés (Rhodotorula) ou d'hétéropolysaccharides (Cryptococcus) (Larpent,1991)(figure10).

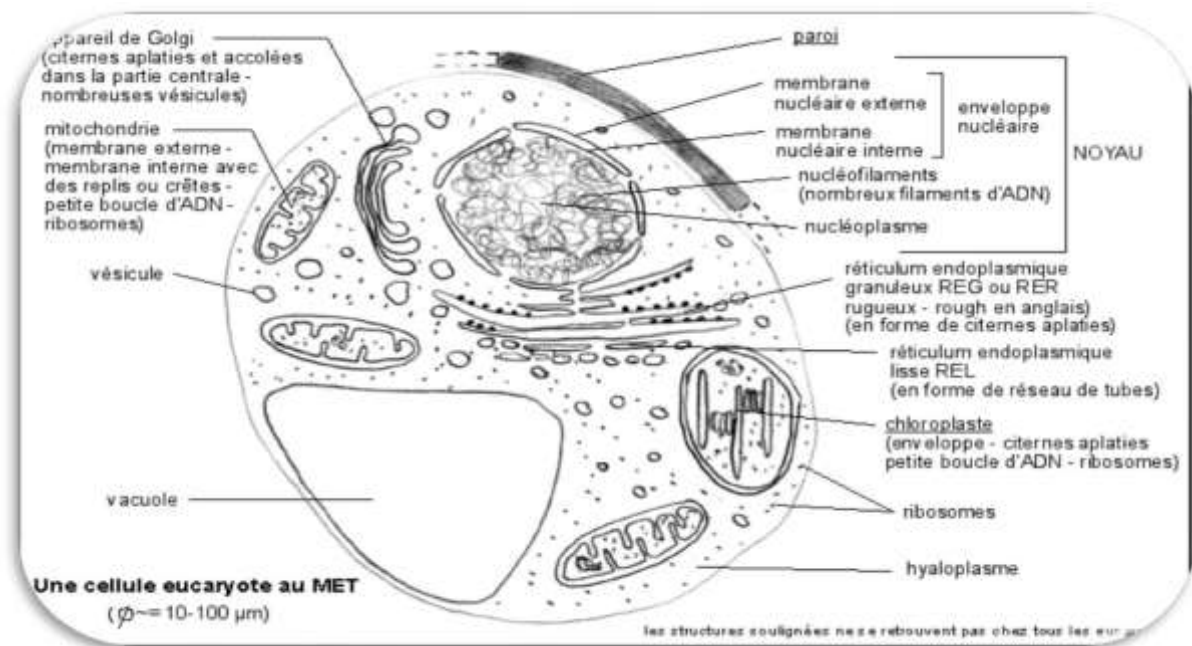


Figure 10: Structure cellulaire des levures (Thuriaux, 2004)

C'est une structure dynamique externe qui englobe toute la cellule conférant sa rigidité et sa forme caractéristique. Elle représente 15 à 20% de la matière sèche de la cellule, d'épaisseur 150 à 230 nm. Sa composition chimique qui est sujette à des variations importantes suivant les espèces, le cycle cellulaire et les conditions de culture (AguilarUscanga et François, 2003), comprend environ 80% de polysaccharides principalement des mannanes (Peat et al., 1969 et Manners et Masson, 1969), en proportion quasi égales, 10 à 20% de protéines, 7 à 10% de lipides, 5% de sels minéraux et 1 à 3% de chitine qui se trouve majoritairement au niveau des cicatrices de bourgeonnement afin de maintenir l'intégrité de la paroi (Suarit et al., 1988 et Lipke et Ovalle, 1998)

La couche intérieure de la paroi est en grande partie responsable de sa force mécanique et fournit aussi les sites d'attachement pour les protéines qui forment sa couche extérieure (Klis *et al.*, 2002).

Cette structure joue un rôle important en maintenant une structure élastique qui assure une protection osmotique et constitue une barrière physique

-L'espace périplasmique

C'est une espace qui est délimité par la membrane plasmique et la couche interne de la paroi et représente le seul site de localisation cellulaire des enzymes telles que l'invertase (Neumann et Lampen, 1967), la phosphatase acide (Schurr et Yagile, 1971 et Arnold, 1981), les -galactosidases, les -glucanases (1-3) et (1-6) et des protéases (Barnett et Robinow, 2002). C'est une membrane simple et fragile qui se trouve sous la paroi avec une épaisseur de 7,5 nm, retenant l'ensemble des constituants intracellulaires et résistante aux pH acides mais altérée par des pH alcalins. Les membranes biologiques sont composées de deux types de constituants principaux : les lipides et les protéines. La diversité des membranes étant très grande, les compositions lipidiques diffèrent selon les organismes. Dans la composition lipidique de la membrane plasmique, on distingue les phospholipides et les stérols. Parmi ces derniers c'est l'ergostérol qui est le dérivé majeur et dont la teneur varie d'une espèce à l'autre et en fonction de l'âge des cellules. Les autres stérols sont des précurseurs de l'ergostérol. Un grand nombre de travaux démontrent qu'en aérobiose les levures contiennent surtout des stérols insaturés tels que l'ergostérol, tandis qu'en anaérobiose elles renferment des quantités non négligeables de squalènes, triterpène linéaire intermédiaire de la biosynthèse des stérols. Ces derniers qui sont soit libres soit estérifiés avec un acide gras augmentent la rigidité de la membrane et diminuent sa perméabilité. Les phospholipides, qui sont intimement associés aux protéines et aux stérols, assurent à la membrane sa fluidité permettant ainsi le bon fonctionnement des processus métaboliques (Bayley et Parks, 1975).

- Le cytoplasme

Le cytoplasme renferme en plus des organites cellulaires tels que les mitochondries (qui contiennent des ADN, ARN, ARN polymérase et des enzymes respiratoires) et l'appareil de Golgi, des vacuoles (où se trouve le pool des acides aminés en plus des purines, des orthophosphates polymérisés et des hydrolases) et des ribosomes. Il contient également des enzymes, notamment celles de la glycolyse et de la fermentation alcoolique, des polysaccharides, des polyphosphates, du glycogène et du tréhalose (Larrent, 1991).

- Le noyau et le réticulum endoplasmique (RE)

La levure possède en général un seul noyau qui est entouré d'une enveloppe à deux

membranes ou la membrane externe est en relation continue avec un système membranaire cytoplasmique important, le réticulum endoplasmique. En de multiples endroits les membranes externe et interne fusionnent pour former des pores, ces derniers permettent les échanges entre le noyau et le reste de la cellule. Il contient le génome de la levure qui est réparti sur les chromosomes dont la structure est semblable à celle des autres eucaryotes avec un enroulement de l'ADN en « grains de chapelet » formés par des nucléosomes constitués d'histones de type H2a, H2b, H3 et H4. Ce nucléosome, découvert grâce aux progrès de la biophysique et de la microscopie électronique est considéré comme unité de base comprenant 146 paires de bases d'ADN, enroulés autour d'un octamère de protéines histones. Le nombre des chromosomes varie selon les espèces, pouvant atteindre 3 chez *Hansenulaholstii*, 2 chez *H.anomala* et 16 chez *S.cerevisiae* haploïde.

- Les mitochondries

Lorsque les levures se développent en aérobiose, elles possèdent de 30 à 50 mitochondries bien développées dans lesquelles la membrane interne forme de nombreux replis en crêtes. En anaérobiose, ces organismes dégénèrent, leur surface interne décroît, les crêtes disparaissent (Larpen, 1997).

- Des ribosomes

Qui sont des petites structures (ou organites) présentes dans le cytoplasme des cellules. Ils assemblent les acides aminés pour former les protéines. Ils suivent pour cela le plan de montage contenu dans l'ADN qui est transcrit dans les ARN messagers (Rose et al., 1987).

- Des vacuoles

Qui emmagasinent les diverses substances de réserve. (Rose et al., 1987)

6. Caractéristiques des levures

6.1. Caractéristiques physiologiques et nutritionnelles

Selon Beudeker et ses collaborateurs (1996) ; la notion de stress en biotechnologie peut être définie comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques, inhibition de croissance ou du développement. Suite à cette définition, on pourrait considérer le stress comme des variations effectuées dans le milieu de culture de la levure (température, pH, apport d'oxygène, apports nutritionnels) qui peuvent, en fonction de leur concentration, provoquer différentes « réponses dynamiques » du microorganisme à différents niveaux (macroscopique, microscopique, moléculaire) (Sainz et al., 2003), comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire, des capacités de croissance et des fonctions physiologiques, des rendements et des productivités.

Les substances inhibitrices sont parfois difficiles à éviter puisqu'elles sont souvent substrats ou produits de la réaction biochimique considérée (Gryta *et al.*, 2000). Une concentration élevée en éthanol inhibe l'activité enzymatique (Vincent T. *et al.*, 2016).

6.1.1. Besoins nutritifs des levures

Comme tous les organismes hétérotrophes, les levures doivent prélever dans leur milieu de vie les molécules organiques nécessaires à leur métabolisme.

- Source de carbone

Les levures utilisent des molécules carbonées préexistantes comme source de carbone et aussi d'énergie. Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés (Walker *et al.*, 1997). La majorité des levures utilisent surtout des composés glucidiques (glucose, saccharose, maltose.....), d'autres utilisent des composés non conventionnels comme l'éthanol, glycérol, acide lactique, protéine (Walker *et al.*, 1997).

- Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organique et inorganique pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpen, 1991). Les levures sont incapables de fixer l'azote libre (N_2). Par contre, l'assimilation des ions d'ammonium est largement répandue chez ces dernières. De nombreuses espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés organiques comme source d'azote (acides aminés, urée, biotine et bases puriques et pyrimidiques) (Walker *et al.*, 1997).

- Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Ils s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Walker *et al.*, 1997). De plus, d'autres facteurs, appelés facteurs de croissance, leur sont essentiels mais les levures sont incapables de les biosynthétiser, comme les vitamines (biotine, thiamine et acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques comme des coenzymes (Larpen, 1991).

6.1.2. Besoins physico-chimiques

Comme chez tout organisme vivant, un certain nombre de facteurs physiques et chimiques influent considérablement sur la croissance des levures dont les principaux sont :

-Température:

Les levures présentent un très large intervalle de température de croissance : la majorité a une température optimum entre 25 à 30°C (**Walker et al., 1997**). La température maximale de croissance se situe généralement entre 35°C et 45°C. Cependant, il existe des levures qui peuvent se développer à 0°C ou à plus de 50°C.

- pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides mais elles tolèrent des gammes de pH très large de 2,4 à 8,6 (**Leclerc, 1975**). En effet, leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 mais certaines peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5).

- Pression osmotique et activité de l'eau

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre (**Leclerc, 1975**). La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes, car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (bétaine, glycérol) (**Larpent, 1991**).

- Oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène. Il n'existe pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres : *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus* etc (**Larpent, 1991**). Les autres sont aéroanaérobies facultatives présentant un métabolisme soit fermentaire (comme *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces*) soit respiratoire (comme *Candida*, *Kluyveromyces* la plupart des espèces de *Pichia*, de *Hansenula* et de quelques *Torulopsis*) (**Hart, 1993**).

7. Reproduction des levures

Les levures sont des champignons unicellulaires, qui peuvent se reproduire de manière sexuée ou asexuée (**figure 11**).

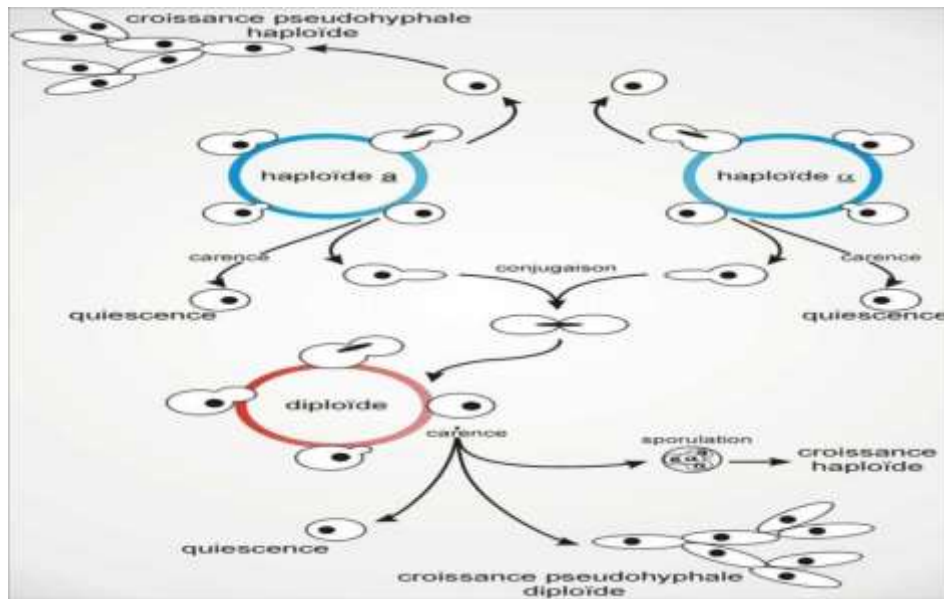


Figure 11: Cycle de reproduction de la levure (Leclerc *et al.*, 1995)

7.1. Reproduction sexuée

De plus, les populations des levures connaissent un cycle de vie complexe, dans lequel on trouve alternativement des cellules haploïdes et des cellules diploïdes. La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un zygote (figure12). Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (Oteng-Gyang, 1984).

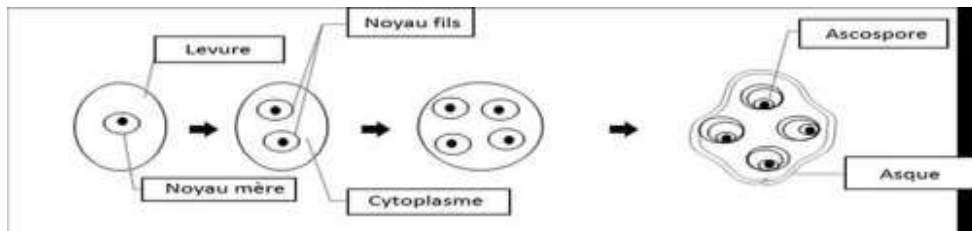


Figure12: La reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)

7.2. Reproduction asexuée

Leur mode de reproduction asexuée peut se faire soit par fission binaire, soit par bourgeonnement (figure13). Il leur permet de se multiplier très rapidement dans des conditions favorables. Par exemple, une seule cellule de levure de boulanger peut produire par bourgeonnement jusqu'à 40 cellules filles en moins de deux heures (Larousse 2006).

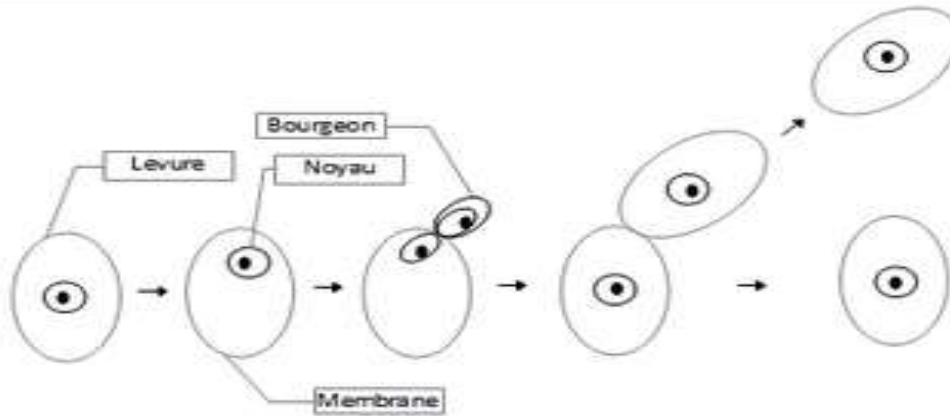


Figure13: La reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure
(Thuriaux, 2004).

8. Production des enzymes par les levures

Certaines enzymes industrielles produites par les levures sont regroupées dans le (tableau 04) ci-dessous.

Tableau 04: Exemple de quelques enzymes d'intérêt industriel produites par les levures.

Enzymes	Levures	Références
Protéase	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Chi et al. (2007).
<i>Candida lipolytica</i>	Tobe et al., (1976).	
α-amylase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Liese et al., (2000).
<i>Candida guilliermondii</i>	Akbache et Bariout (2007).	
<i>Candida tropicalis</i>	Liese et al (2000).	
<i>Candida sp.</i> <i>Pichia sp.</i>	Ruohonen et al., (1991).	
Cellulase	<i>Candida molischiana</i> , <i>Candida pulcherrima</i> <i>Candida stellata</i> <i>Candida wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>	Béguin et Aubert (1994).

Amylopullulanase	<i>Clavisporalusitaniae</i>	Dakhmouche(2016) .
Pectinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DjouldéDarman etal., (2005).
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Candida cylindracea</i>	D’Annibal et al. (2006) Kim et Hou (2006)
	<i>Candida utilis</i>	Grbavcic et al. (2007)
	<i>Candida rugosa</i>	Zahoet al. (2008) Benjamin et Pandey(2001)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Burkert et al. (2005)
	<i>Yarrowialipolytica</i>	Lopes et al. (2009) Dominguez et al. (2003)
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Tan et Yin (2005) Yang et al. (2005)
	<i>Rhizopus homothallicus</i>	Diaz et al. (2006)
	<i>Rhizopus oryzae-</i>	Surribaset al. (2007)
	<i>Rhizopus chinensis</i>	Tenget al. (2009)
	<i>Williopsis californica</i>	Ciafardini et al. (2006)
	<i>Aspergillus oryzae :</i>	Cihangir et Sarikaya (2004)
	<i>Aspergillus carneus</i>	Kaushik et al. (2006)
	<i>Aspergillus niger</i>	Dutra et al. (2008)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ciafardini et al. (2006)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Colenet al. (2006)
	<i>Penicillium restrictum</i>	Azeredo et al. (2007)
	<i>Penicillium verrucosum</i>	Pinheiro et al. (2008) Kempka et al. (2008)
	<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar et Gupta (2008)
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Liu et al. (2008)
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Potumarthi et al. (2008)

9. Classification des levures

Grâce au développement des techniques d'analyse, **Lodder(1971)** a pu établir une classification des levures basée sur les critères morphologiques, culturels, sexuels et physiologiques; mais l'isolement de nouvelles souche, ainsi que l'avènement des biotechnologies, ont permis par la suite à **Kreger-van rijen (1984)** de réactualiser cette classification qui, outre les critères cités plus haut, repose sur l'étude de certains organites (exemple : le noyau, l'ADN). Cette classification est devenue actuellement une référence et comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (**Kreger-van rij, 1984**).

Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- **Les ascomycètes** : également appelées levures ascosporeuses ou levures vraies, formant dans certaines conditions des ascospores à l'intérieur de la cellule ;
- **Les basidiomycètes** : capables d'élaborer des spores externes apparentées aux basidiospores;
- **Les deutéromycètes ou levures imparfaites** : genres asexués, qui se multiplient toujours par reproduction végétative.

La classification des levures selon est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Classification des levures (Kreger-van rij, 1984)

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures deutéromycètes
<p><i>Saccharomycetaceae</i></p> <p>1. Schizosaccharomycetoideae</p> <p><i>Schizosaccharomyces</i></p> <p>2. Saccharomycetoideae</p> <p><i>Ambrosiozyma</i></p> <p><i>Arthroascus</i></p> <p><i>Arxiozyma</i></p> <p><i>Citeromyces</i></p> <p><i>Clavispora</i></p> <p><i>Cyniclomyces</i></p> <p><i>Debaryomyces</i></p> <p><i>Dekkera</i></p> <p><i>Guilliermondella</i></p>	<p>Levures formant des teliospores</p> <p><i>Leucosporidium</i></p> <p><i>Rhodospodium</i></p> <p><i>Sporidiobolus</i></p> <p>Filobasidiaceae</p> <p><i>Filobasidiella</i></p> <p><i>Filobasidium</i></p> <p>Levures non classées</p> <p><i>Sterigmatosporidium</i></p>	<p><i>Porobolomycetaceae</i></p> <p><i>Bullera</i></p> <p><i>Sporobolomyces</i></p> <p>Cryptococcaceae</p> <p><i>Aciculoconidium</i></p> <p><i>Brettanomyces</i></p> <p><i>Candida</i></p> <p><i>Cryptococcus</i></p> <p><i>Eniella</i></p> <p><i>Fellomyces</i></p> <p><i>Kloeckera</i></p> <p><i>Malassezia</i></p> <p><i>Oosporidium</i></p>

<i>Hansenula</i>		<i>Phaffia</i>
<i>Issatchenkia</i>		<i>Rhodotorula</i>
<i>Kluyveromyces</i>		<i>Schizoblastosporion</i>
<i>Lodderomyces</i>		<i>Sterigmatomyces</i>
<i>Pachysolen</i>		<i>Sympodiummyces</i>
<i>Pachytichospora</i>		<i>Trichosporon</i>
<i>Pichia</i>		<i>Trigonopsis</i>
<i>Saccharomyces</i>		
<i>Saccharomycopsis</i>		
<i>Schwanniomyces</i>		
<i>Sporopachydermia</i>		
<i>Stephanoascus</i>		
<i>Torulaspora</i>		
<i>Wickerhamiella</i>		
<i>Wingea</i>		
<i>Yarrowia</i>		
<i>Zygosaccharomyces</i>		
3. Lipomycetoideae		
<i>Lipomyces</i>		
4. Nadsonioideae		
<i>Hanseniaspora</i>		
<i>Nadsonia</i>		
<i>Saccharomycodes</i>		
<i>Wickerhamia</i>		
5- Spermophthoraceae		
<i>Coccodiascus</i>		
<i>Metchnikowia</i>		
<i>Nematospora</i>		

10. Importance des levures

Les levures ont été utilisées par l'homme depuis des millénaires sans le savoir, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain (**Bouix, 1991**).

Au cours de la préparation du pain, la levure se développe en aérobiose. Ce type de développement augmente la production de CO₂, diminue l'accumulation d'alcool et donne

la texture légère de nombreux pains, les traces de fermentation contribuant au goût final (Bouix, 1994).

Cependant, en conditions anoxiques, les levures dirigent leur métabolisme vers la fermentation avec une production significative d'alcool (Hart, 1993).

Au-delà de leur importance en panification et en brasserie, les levures sont utilisées pour leurs cellules elles-mêmes ou pour les composés produits par ces cellules (métabolites). Certaines levures (exemple : *Saccharomyces cerevisiae*) se distinguent par leur capacité à transformer en anaérobiose les sucres en alcool.

Les levures sont aussi utilisées dans la fabrication de fromages. Leur action commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Pol, 1996). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs implications aux phénomènes tels que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (Hart, 1993).

La levure diététique, vendue comme complément alimentaire est riche en vitamine B et en protéines, mais carencée en acides aminés (Hart, 1993). Elle peut être par exemple ajoutée à la farine de blé ou de maïs pour augmenter la valeur nutritionnelle.

L'industrie agroalimentaire étant constamment en recherche de développement de nouveaux produits, les levures présentent de nouvelles pistes d'exploitation dans ce secteur (Mansour, 2009) (figure 14).

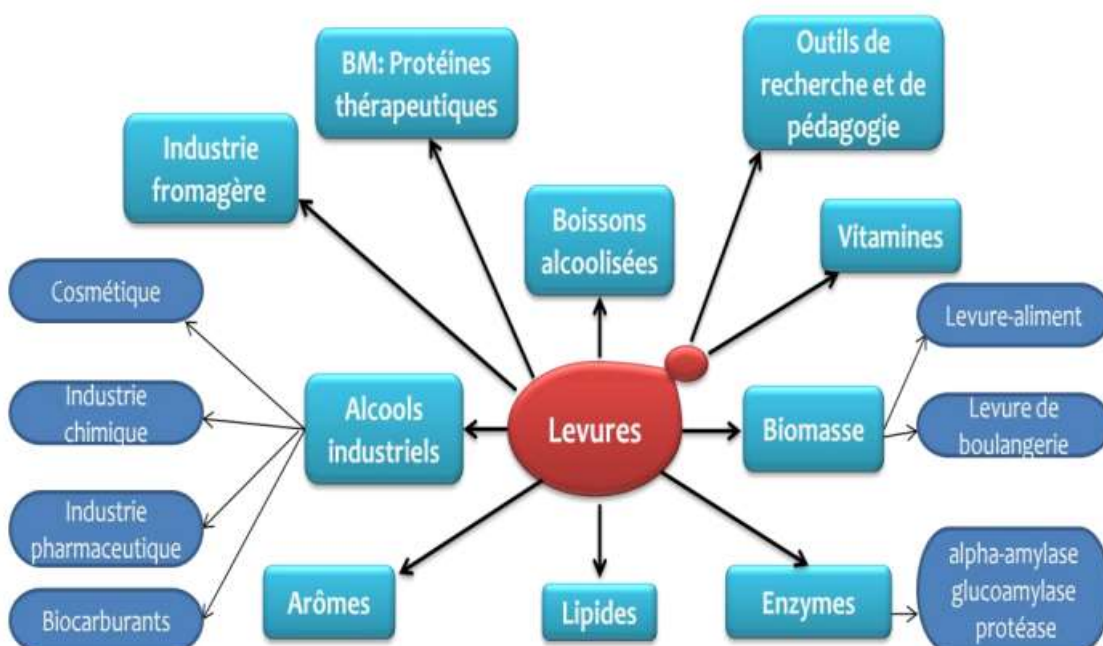


Figure 14: Représentation schématisée des différents domaines d'utilisation de la levure. (Rezki-bekki, 2014).

CHAPITRE 3

LES LIPASES

Le marché des enzymes industrielles, quant à lui est en plein croissance grâce, notamment à l'apparition de nouveaux domaines d'application ; l'industrie des détergents où on utilise les protéases et les lipases, l'agroalimentaire on utilise par exemple l'alpha acétolactate oxydase (**Ben ameur villain, 2012**). Et le domaine pharmaceutique où on utilise plusieurs enzymes comme l'alpha-amylase pancréatique (**Bustos, 2013**).

1. Généralités sur les lipases

Les carboxylestérases (Carboxyl ester hydrolase) comprennent deux groupes d'enzymes, à savoir non spécifiques estérases (E C 3.1.1.1) et les lipases (E C 3.1.1.3), différenciés sur la base de leur spécificité de substrat. Les estérases hydrolysent les solutions d'esters de chaîne acyl courte soluble dans l'eau et inactifs contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau (**Chahinian and Sarda, 2009**). Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique, le cytosol de différents tissus et abondantes dans le foie. Elles manifestent une large spécificité en substrat tels que amides, esters, thioesters, hydrolysent un grand nombre de composés de différentes structures et jouent un rôle très important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques (**Gilhamand Lehner, 2005**).

2. Définitions

Les lipases (Triacylglycerol acylhydrolases EC3.1.1.3) appartiennent à une classe d'hydrolases spécifiques à l'hydrolyse des graisses en acides gras et du glycérol à l'interface lipidique. Ils sont également capables d'inverser la réaction dans les milieux non aqueux et ils sont abondamment présents dans la nature (**Singh et al., 2017**). Claude Bernard, 1856, dans le jus pancréatique, a déterminé que la lipase était une enzyme qui hydrolysait les gouttelettes d'huile insoluble et les transformait en produits solubles (**Sangeetha et al., 2010**).

La structure des lipases a été déterminée par cristallogénèse et diffraction des rayons X (**Najjar, 2010**).

Toutes les lipases connues à ce jour présentent une organisation tridimensionnelle commune composée d'un feuillet bêta centrale formée de huit brins parallèles connectés entre eux par des hélices alpha (**figure 15**) (**Najjar, 2010**).

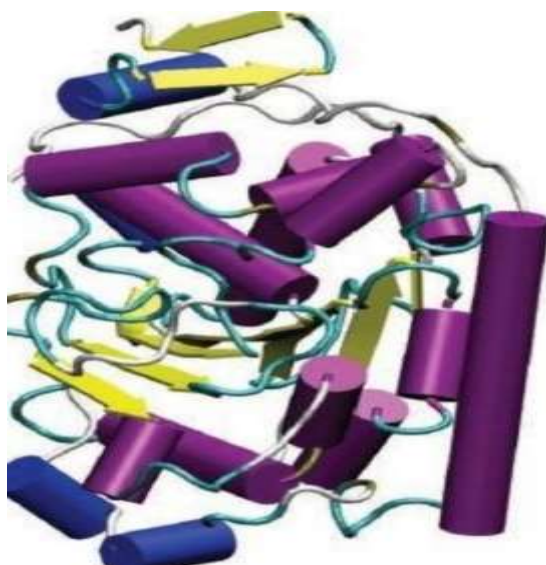


Figure 15: Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase) .le feuillet beta en jaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha en bleu, et les motifs 'turn' en bleu ciel
(Chaput, 2012)

3. Caractéristiques

Le poids moléculaire des lipases se situe entre 19 et 60 kDa et on a signalé qu'il s'agissait de protéines monomériques (Chandra *et al.*,2020). Les lipases agissent sur des substrats insolubles émulsionnés dans l'eau et catalysent l'hydrolyse (liaisons ester de clivage) de triacylglycérides composés d'acides gras à longue chaîne (plus de dix atomes de carbone) (Fatima *et al.*,2020).

Dans le milieu eau /solvant organique immiscible, elles sont également capable de catalyser la réaction réversible de synthèse et échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actives (figure 15). Les lipases diffèrent des estérases parce que ces dernières agissent sur des substrats solubles dans l'eau, tels que les esters simples avec des acides gras à chaîne courte (moins de six atomes de carbone) (Fatima *et al.*,2020)

4. Origine des lipases

Les lipases sont des enzymes lipolytiques extracellulaires qui peuvent agir d'une part comme hydrolases en milieu aqueux et d'autre part comme des catalyseurs dans un milieu organique sur des échelles de temps plus rapides et plus efficaces. (Aggoune 2017; Lopez, 1998). Ces enzymes ont une capacité qui permet d'aider les réactions chimiques à se produire plus facilement. (Lagrari 2019) Les lipases sont de nature hétérogène largement répandue dans la

nature qu'elles soient d'origine microbienne, animale, végétale, ce qui augmente leurs potentialités d'être utilisées dans de nombreuses applications d'importance industrielles. (Lopez, 1998).

4.1. Lipase 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 (Fickers *et al.*, 2007 ; Casas *et al.*, 2012). Ces derniers contiennent des lipases capables d'être utilisées dans la biotransformation des lipides dans les domaines suivants la papeteries, l'oléochimie, la farine de blé et les huiles essentielles (Wilfried *et al.*, 2011)

4.2. Lipases animales

La plupart des lipases d'origine animale sont obtenues à partir du pancréas des bovins, d'ovins, de porcs et de cochons ou par d'autres animaux hôtes présents dans le tractus gastro-intestinal chez les animaux, dont la fonction est la digestion des graisses et des lipides (Gonçalves Filho *et al.*, 2019 et Bataïche, 2014) Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes :

- A. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique.
- B. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, le foie et les tissus adipeux.
- C. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel (Fickers *et al.*, 2008)

4.3. Lipases microbiennes

Elles sont obtenues à partir de champignons, de levures et de bactéries. La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaires, ces lipases présentent de grands avantages par rapport aux autres, elles sont plus abondantes (tableau 15). Les microorganismes producteurs de ces enzymes peuvent être facilement modifiés génétiquement et présentent une grande diversité de caractéristiques et de spécificités (Gonçalves Filho *et al.*, 2019)

5. Production de lipase

La fermentation est une approche de transformation biologique de substrats complexes en molécules plus simples à travers différents microorganismes. Elle est largement utilisée pour la production industrielle de lipases et confère de grands avantages sur les approches conventionnelles (Fatima *et al.*, 2020).

La production de lipase est réalisée par la fermentation solide (FMS ou en anglais Solid- State Fermentation, SSF) et la fermentation liquide (FML ou en anglais Submerged Fermentation, SmF).

Plusieurs études sont portées sur la production de la lipase en FMS chez *Aspergillus niger* MTCC (872 (Nema et al.,2019); *Yarrowia lipolytica* (Dominguez et al.,2003), *Candida rugosa* (Benjamin et Pandey, 2001) et *Candida utilis* par FMS (Grbavcic et al., 2007) et aussi en FML chez *Candida guilliermondii* (Oliveira et al., 2014) et *Yarrowia lipolytica* (Lopes et al., 2009).

6. Microorganismes producteurs de lipases

Les lipases microbiennes sont universelles dans la nature et sont très commercialisées en raison de leur faible coût de leurs fabrications supérieures ainsi que leur grande disponibilité (Borrelli et Trono, 2015).

7. Intérêt industriel des lipases

En 2020, l'ampleur du marché mondial de la lipase a atteint 590,5 millions \$, à un CAGR (ou Compound annual growth rate) de 6,5 %. L'Asie-Pacifique était le plus grand marché pour la consommation de lipase en 2014 (Özgen et al., 2020 ;Ávila et al.,2019). Et pendant la période de prévision, on estime que le marché de l'Asie-Pacifique et le taux de croissance CAGR annuel augmentent. En outre, les perspectives croissantes dans les marchés en développement tels que l'Inde, la Chine et le Brésil devraient améliorer l'étendue du marché des lipases au cours de la période de prévision. Novozymes A/S (Danemark), E. I. du Pont de Nemours et Compagnie (Genencor) (États-Unis), Koninklijke DSM N.V. (Pays-Bas) et Chr. Koninklijke DSM N.V. (Pays-Bas) et Chr. Hansen Holdings A/S (Danemark) sont les plus importants de la consommation de lipases dans le monde (web 2). Grâce à ses propriétés spécifiques telles que l'énantiosélectivité, la régiosélectivité et la large spécificité du substrat, la lipase présentant le plus d'intérêt parmi toutes les enzymes (Lokha et al.,2020;Zhong et al.,2020).

Les lipases revêtent une grande importance dans l'industrie en raison de leur stabilité dans les solvants organiques, de leur grande variété de substrats, de leur sélectivité et de leur capacité à catalyser les réactions sans ajouter de cofacteurs coûteux. De plus, ils sont facilement produits et actifs dans des conditions de réaction légère (Casas-Godoy et al.,2018).

Par conséquent, les lipases sont utilisées dans de nombreux domaines industriels différents :

7.1. Détergents et agents nettoyants

Comme additifs puisqu'ils sont actifs et stable à des températures élevées et à un pH alcalin. Ils sont également essentiels dans la production de savon, de produits pour le lave

vaisselle, de solvants pour le nettoyage à sec et de lentilles de contact (**Li et al.,2014;Lailaja et Chandrasekaran ,2013**).

7.2. Industrie alimentaire

Y compris la production de produits laitiers, comme le fromage, la modification des graisses et des huiles (par exemple :fabrication de beurre et de margarine, nouvelles huiles de cuisson) et la production d'aliments pour bébés et de lipides structurés ayant des propriétés uniques (parexemple :équivalent beurre de cacao, succédané de lait humain, graisses riches en calories ouréduites, huiles enrichies en acides gras polyinsaturés (AGPI)) (**Chaurasia et al.,2016 ;Ferreira-Dias et al., 2013 ;Peng et al., 2014**). Ils sont utilisés comme émulsifiants dansl'aml'alimentation animale (**Melim et al.,2013**). Enfin, ils sont également utilisés pour modifierles arômes et produire des composés parfumés (**Peng et al.,2014**).

7.3. Produits chimiques fins

Dans l'industrie pharmaceutique pour produire des énantiomères purs par la résolution demélanges racémiques (par exemple, molécules chirales telles que les prostaglandines, lescéphalosporines, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les hydantoines, et les pénicillines)

(**Gérard et al., 2017 ;Tian et al., 2012**). Les molécules chirales sont également utilisées commeherbicides dans l'industrie agrochimique (**Bora et al.,2013**). Dans l'industrie du parfum et de lacosmétique, ils sont employés pour produire des tensioactifs et des parfums et comme émollientsdans les produits de soins personnels (**Khan et Rathod, 2015**)

7.4. Industrie de la pâte et du papier

Dans le contrôle du brai, pour l'élimination des triglycérides et des cires. De plus, leur présenceaugmente la blancheur et réduit la pollution des eaux usées (**Sharma et Kanwar, 2014**).

7.5. Bioremédiation de la lipase et processus environnementaux

Comme le traitement des eaux résiduelles riches en pétrole, la dégradation des débris organiqueset le traitement des eaux usées provenant d'un large éventail d'industries (**Salihu et Alam, 2015**).

Deuxième partie
Expérimentation et discussion des
résultats

Matériel et Méthodes

1 :Cadre et objectif de l'étude

Cette étude a été effectuée au sein du laboratoire de wilaya à Merdj Edib Kaayouche Fadila Skikda (figure16) au service d'épidémiologie et de médecine préventive, unité bactériologie alimentaire en premier lieu. En second lieu, le travail a été complété au laboratoire de microbiologie dans le hall technologie à l'université du 20 août 1955 Skikda du 21 mai au 19 avril 2022.

L'objectif principal de cette étude est d'isoler des souches pures de levures à partir des grignons d'olives qui sont des milieux naturels riches en matières grasses dans le but d'établir leurs caractéristiques : biologique, physico-chimiques et biotechnologiques.

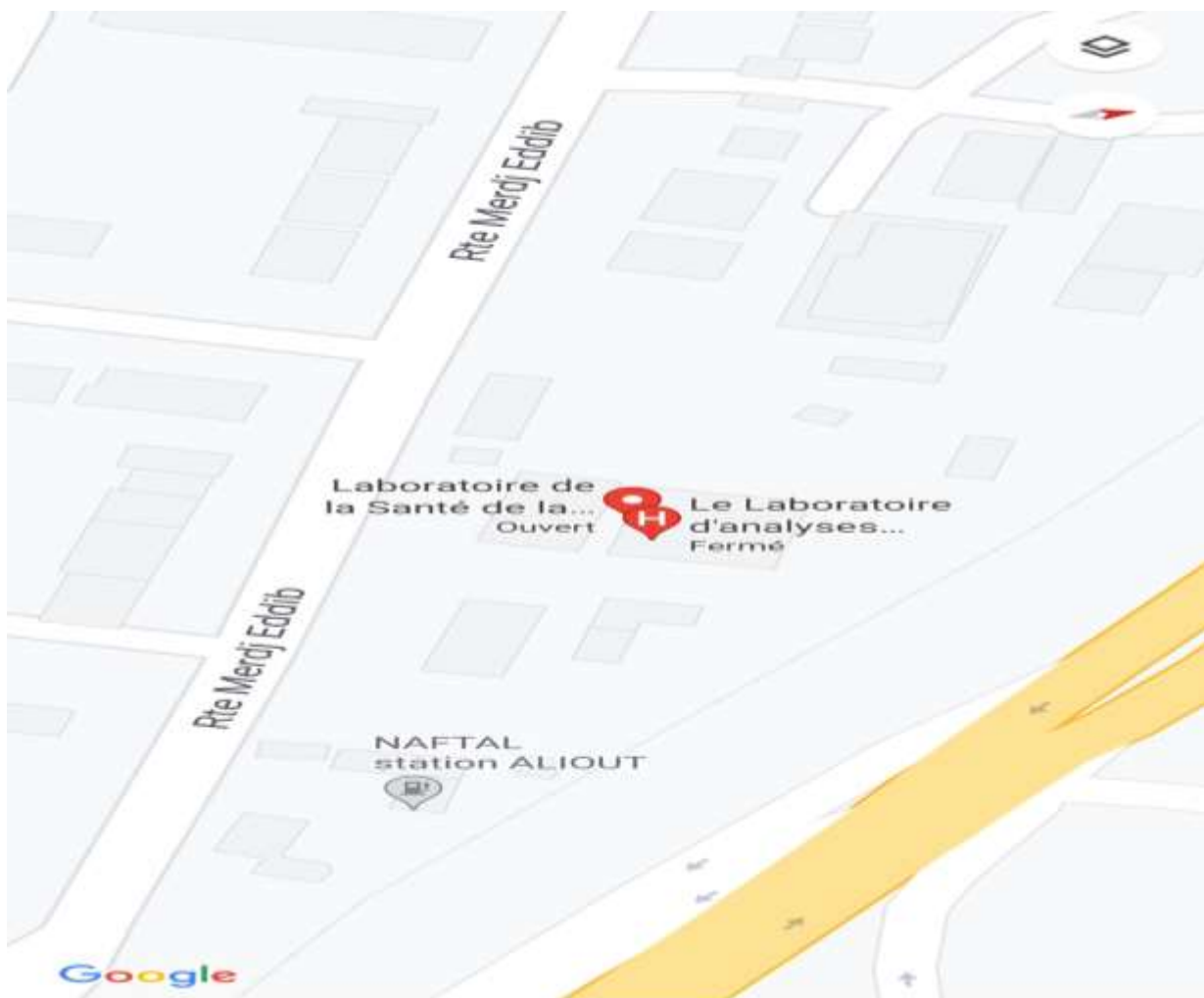


Figure16 :Carte géographique de laboratoire de santé Merdj Edib

2. Méthodologie

Les différentes analyses suivies dans notre étude sont bien définies dans le schéma suivant (figure 17).

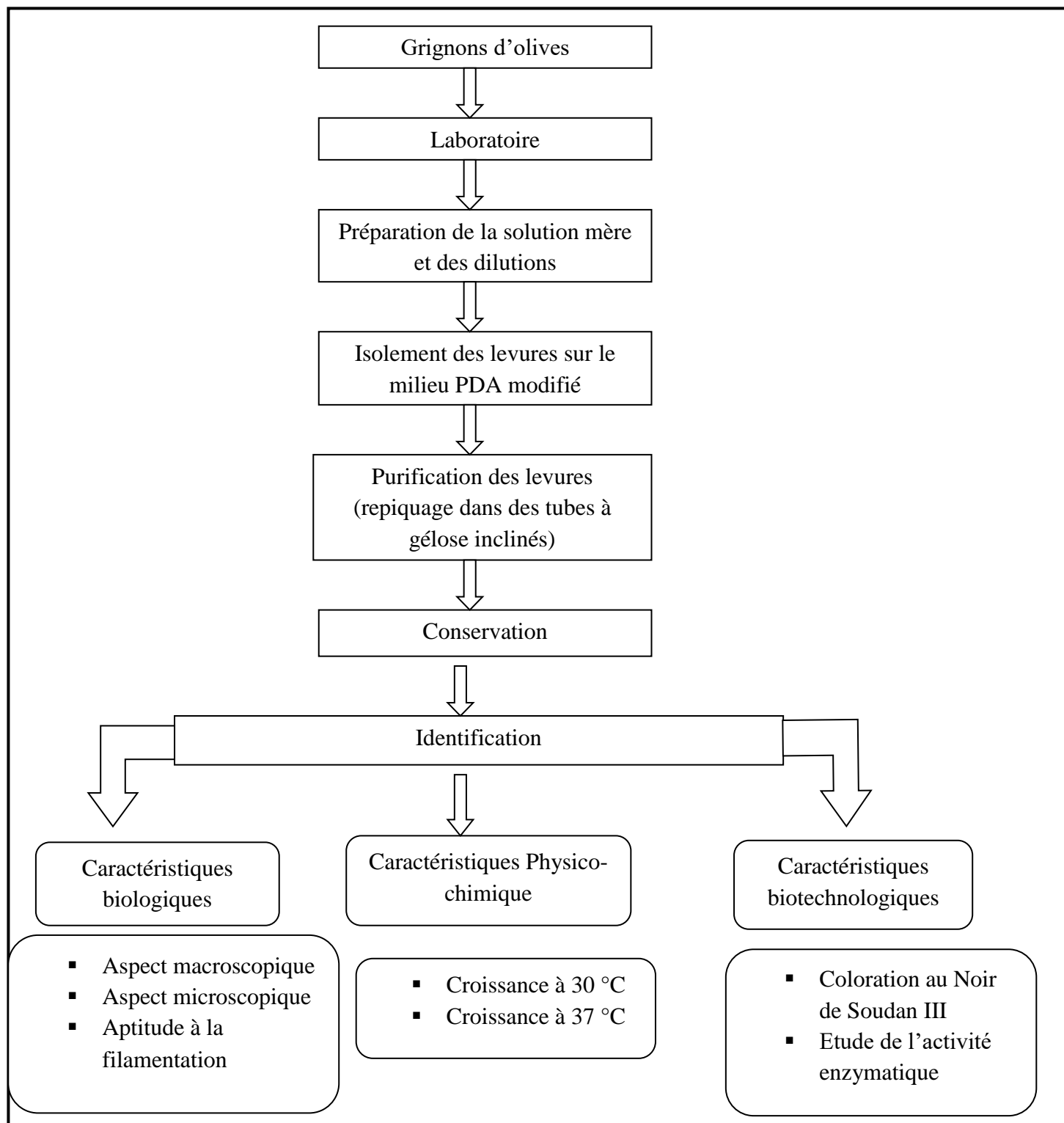


Figure17 : Schéma général des méthodes suivies

3. Echantillonnage

3.1 Sites de collecte

Les grignons d'olives (figure 19) ont été récupérés d'une nouvelle huilerie à Sidi Mezghiche (figure 18) ainsi que de deux anciennes huileries situés à Leghdir (figure 20.21) et à Emjaz Edchich. La collecte s'est fait au hasard pour récupérer beaucoup de souches.



Figure 18: La nouvelle huilerie de Sidi Mezghich



Figure 19: Les grignons d'olives



Edchich Figure 21: La région de récolte



Figure 20 : Huilerie d'Emjaz

3.2 Technique de prélèvement :

Pour éviter la contamination des échantillons des grignons d'olive par les microorganismes ainsi que leur altération on doit respecter les règles d'asepsie suivantes :

- Stérilisation des flacons à l'autoclave dans un emballage de papier aluminium.
- Transport des échantillons à l'aide d'une glacière avec blocs réfrigérants jusqu'au laboratoire.
- Conservation des échantillons au réfrigérateur à 4 °C.

4. Analyse des échantillons

4.1 Isolement des levures

Le travail a été effectué en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile. Les tubes à essai, l'eau physiologique, les pipettes graduées, doivent être stérilisés au préalable.

4.1.1 Préparation de la solution mère :

Une pesée de 1 gramme de grignons d'olives (figure 22) brute prélevé est introduite dans un volume de 9 ml d'eau physiologique stérile puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur pendant 10 minutes (figure 23).



Figure 22 : Pesée des grignons d'olives **Figure 23 :** Homogénéisation de la solution mère

4.1.2 Préparation des dilutions

Des dilutions décimales de 10^{-1} - 10^{-6} sont préparées à partir de la solution mère et ceci par l'ajout successif de 1 ml de la solution à 9 ml d'eau distillé stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-6} (figure 24).

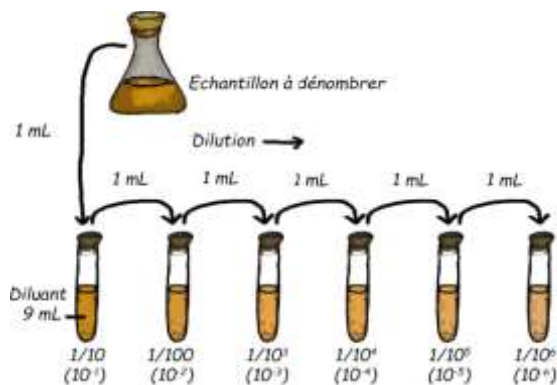


Figure 24: Préparation des dilutions

4.1.3 Ensemencement et incubation :

- Bien homogénéiser les tubes à essai contenant les dilutions.
- L'ensemencement se fait par étalement à l'aide des pipettes Pasteur sous forme de râtelier sur milieux de cultures gélosées de PDA modifié (annexe) additionné d'une concentration de 0,04 g/l de gentamicine, permettant l'inhibition de la prolifération des bactéries à Gram positifs et Gram négatifs.

- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de cette suspension. L'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Sur les boîtes ensemencées, les éléments nécessaires à la bonne exploitation des résultats ont été indiqués. Il s'agit du : numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.
- L'incubation s'est faite à 30 °C en aérobiose pendant 2-3 jours dans l'étuve (Figure 25 et 26)



Figure 25: Ensemencement des souches **Figure 26:** Incubation dans l'étuve

4.2 Purification des levures

- La purification des souches est réalisée à partir de colonies bien isolées, sur PDA modifié où plusieurs repiquages successifs, à l'aide de l'anse de platine, sont effectués jusqu'à obtention de cultures pures dans des tubes à gélose inclinée. (figure27 ;28)
- L'incubation est réalisée en aérobiose, à 28°C pendant 48 h.



Figure 27: Purification des levures dans des tubes inclinés

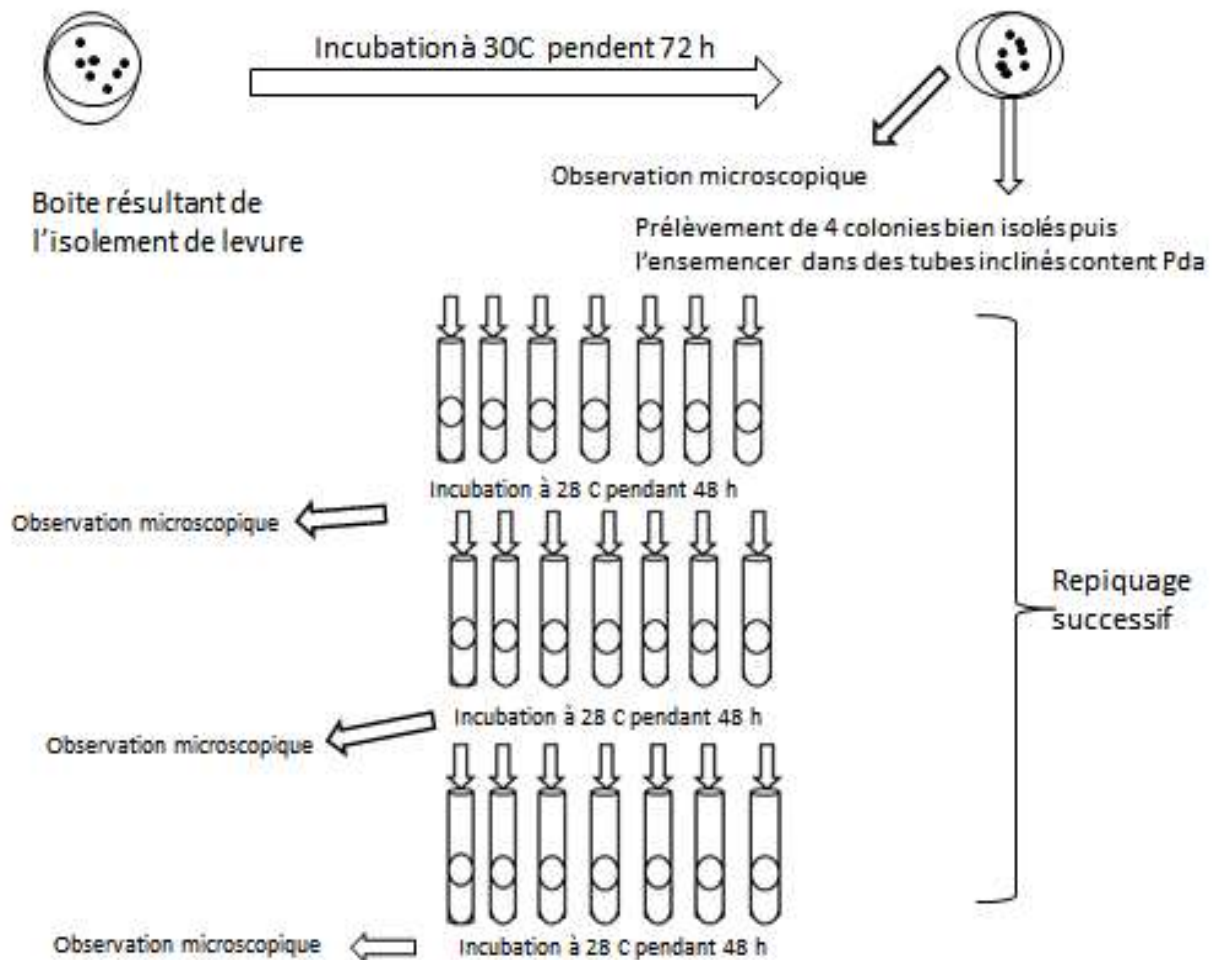


Figure 28: Différents étapes de purification des levures

4.3. Conservation

Les colonies levuriennes purifiées ont été d'abord transférées dans des tubes à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile, puis conservées au réfrigérateur à une température de 4°C pendant trois à six mois (Guiraud, 1998).

4.4 .Caractéristiques des souches levuriennes purifiées

4.4.1 Caractéristiques biologiques

➤ Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation des isolats. Les éléments d'identifications macroscopiques sont ceux qui sont déclarés par Guiraud (1998) et Joffine et Leyral (2006) ; en l'occurrence :

- Forme des colonies : rondes, irrégulières, régulière, punctiforme, etc.,
- Taille des colonies : par la mesure du diamètre,

- Couleur de la colonie : rose, blanche, etc.,
- Elévation : convexe, concave, plate, etc.,
- Opacité : opaque, translucide ou transparente, etc.,
- Surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.

➤ **Aspect microscopique**

Ces caractères sont étudiés à partir des préparations microscopiques (objectif x100) effectuées entre lame et lamelle à l'état frais. L'étude microscopique permet de définir ; d'une part la forme (sphérique, ovoïde, allongée), la taille des cellules en milieu liquide et sur milieu solide, et d'autre part, le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et dans ce cas le nombre et la position (polaire, latérale) du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (Bourgeois et Leveau, 1980).

➤ **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 modifiée fondu est déposé sur une lame microscopique stérile dans une boîte de Pétri modérément humidifiée par l'ajout d'eau distillée stérile pour éviter la dessiccation du milieu (figure 29).

L'observation microscopique se fait après 2 à 3 jours d'incubation (objectif X 40 et X 100). Par conséquent, la bordure de la culture, sa filamentation ainsi que la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance et ramification sont observés et notés.

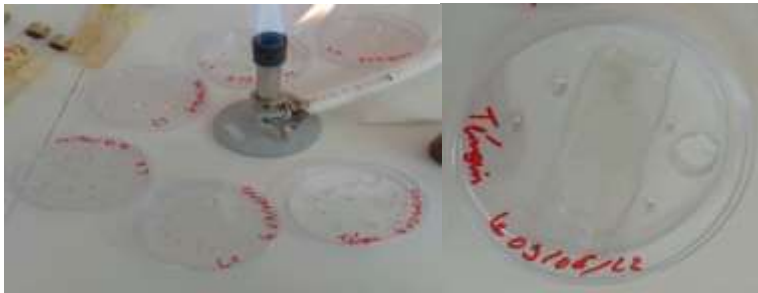


Figure 29: Test de filamentation

4.4.2 .Caractéristiques physico-chimique

L'étude des caractéristiques physico-chimiques est réalisée par le test de croissance à 30 °C et à 37 °C.

➤ **Croissance à 30 °C**

Les levures sont testées sur leur pouvoir de développement à une température de 30 °C (voir les figures dans le tableau de l'aspect macroscopique partie résultat)

➤ **Croissance à 37 °C**

Les levures sont testées sur leur pouvoir du développement à une température de 37 C

Les souches ont été inoculées dans le milieu de culture YPGA (PDA pour nous) les boites sont ensuite incubées à 37° C pendant 2 jours .une culture positive se traduit par une croissance remarquable dans le milieu.

4.4.3 .Caractéristiques biotechnologiques

Afin de sélectionner les souches lipolytiques, des frottis de levures ont été préparés en présence de noir de Soudan III (colorant). Ce dernier représente un composé très soluble dans les lipides. De plus, il est très employé en microscope optique à constante de phase car il permet de mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des micro-organismes (**Pandolfi, 2006**)/*REMRAM Zineb / MANA Yazid*

Isolement et caractérisation des levures oléagineuses, à partir de différents sols en Algérie 2015/2016

➤ **Coloration par le noir de Soudan III**

-Après avoir préparé les frottis, les lames ont été séchées à une température ambiante, puis quelques gouttes du colorant noir de Soudan III (Annexe) ont été déposées pendant 10minutes.

-Les lames sont ensuite immergés dans une solution de xylène pendant 10 secondes cequi mène à une décoloration complète.

-La contre coloration est effectuée à la solution de fuchsine (Annexe) pendant 15 secondes.

-Les lames subissent un lavage à l'eau courante puis égouttées sur papier absorbant.

-Les cellules colorées sont observées à l'objectif x 100 (**Ravikumar et al., 2012**)

➤ **Observation des souches colorées**

Les granules de PHB « poly-β-hydroxybutyrate » peuvent être observées en noir à l'intérieure des cellules colorées en rose. Les granules de PHB peuvent être quantifiées si la souche est une levure lipolytique dont le nombre indique la capacité de stockage. De ce fait, les isolats les plus performants (représentés par une meilleure capacité de stockage) sont sélectionnés pour la poursuite du travail./(**Pandolfi,2006**).

➤ **Etude de l'activité lipolytique**

À partir de jeunes cultures de levures de 3 jours incubés à 28 °C et purifiés sur milieu PDA modifié, nous avons dénombré les levures sur cellule de Malassez selon la concentration proche de 9.10^7 cellules/ml afin d'optimiser la production de lipase (Bataiche, 2014)

➤ **Dénombrement sur cellule de Malassez**

Le dénombrement des levures s'effectue par comptage direct à l'aide d'une cellule de Malassez. Le comptage permet de déterminer le nombre de cellules totales par unité de volume de milieu de culture. La relation suivante permet d'avoir accès à la concentration en cellules totales exprimé en nombre de cellules par ml :

Nombre de cellules totales/ml = nombre moyen des cellules \times facteur de dilution $\times 10^5$

Facteur de dilution : volume total / volume de la suspension de levures

Le volume total est le volume de la suspension de levures + volume de l'eau physiologique stérile.



Figure 30 : Cellule de Malassez

➤ **Ensemencement sur milieu POA**

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette activité est le milieu est POA (Phenol Oil Agar)(figure 30.31)



Figure 31 : Ajustement du pH



Figure 32: Milieu POA

-Creuser des puits de 6 mm de diamètre dans la gélose à l'aide d'un bout revers d'une pipette Pasteur stériles(figure 33)

-Ensemencer par dépôt de 60 µl de l'échantillon dans le puits (deux répétitions pour chaque levure)(figure34)

- Incuber à 28°C pendant 3 jours (**Dekhmouche,2016**).

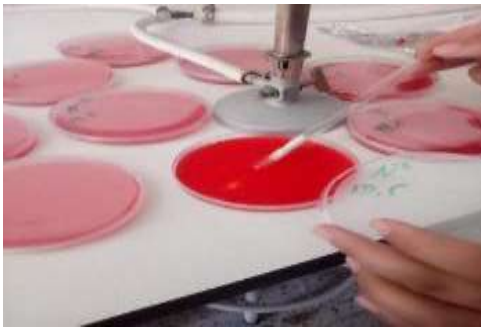


Figure 33: Préparation des puits sur milieu POA **Figure 34:** Ensemencement dans les puits

➤ **Révélation de l'activité enzymatique**

L'activité est révélée par l'apparition d'une zone claire de forme annulaire claire entourant la croissance de la levure. La zone est révélée directement sans détecteur (**Singh et al., 2006**).

La présence d'enzymes lipolytiques dans le milieu POA est révélée par l'apparence d'un halo autour de puit, les lipases attaquent les triglycérides, qui contiennent des acides gras à longue chaîne, comme l'huile d'olive (**Glogaueret al., 2011**)

Résultats et Discussions


Chapitre 02 : Résultats et discussion



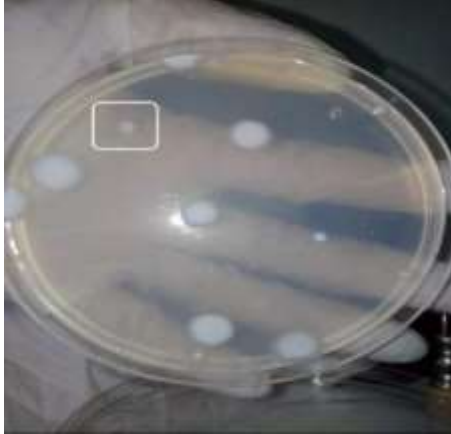
1. Analyse des échantillons

1.1. Isolement des levures

L'isolement des levures à partir de des grignons d'olives des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} a permis l'obtention de plusieurs souches levuriennes ainsi que la croissance de divers moisissures. En effet le milieu PDA est favorable à la croissance des champignons unicellulaires et pluricellulaires (Guiraud, 1998). Nous avons sélectionné 7 isolats qui ont donné une bonne croissance sur les milieux PDA modifié + gentamycine en boites incubés à 30°C pendant 3 jours, les résultats sont présentés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Aspect macroscopique des isolats sélectionnés (L1,L2 ,L3,L4,L5,L6,L7)

Dilution	Code	Caractéristiques macroscopiques	Observation macroscopique
10^{-1}	L1	-Les colonies sélectionnées sont lisses et blanches bombées à centre élevé, brillante avec un contour régulier à texture crémeuse .	

10 ⁻²	L2	-Les colonies sélectionné sont lisses et blanches, bombée à centre élevé, brillantes avec contour régulier à texture crémeuse .	
10 ⁻³	L3	-Les colonies sélectionné sont lisses blanche bombée à centre élevé brillante avec contour non régulier à texturer crémeuse .	
10 ⁻⁴	L4	Les colonies sélectionnées sont lisses blanc cassé convexe matte avec un contour régulier à texturer visqueuse .	

10 ⁻⁴	L5	-Les colonies sélectionné sont lisses blanches bombées, à centre élevé, brillante avec un contour régulier à texture crémeuse .	
10 ⁻³	L6	Les colonies sélectionné sont rugueuses, blanches, convexe brillante avec un contour régulier à texture crémeuse .	
10 ⁻¹	L7	-Les colonies sélectionné sont lisses blanche bombée à centre élevé matte avec un contour régulier à texture crémeuse	

Les isolats sont répertoriés de manière que «L » code pour les levures isolées à partir du grignon d'olive et le chiffre désigne chaque souche à part.

Les résultats montrent que toutes les colonies sont rondes.

Aussi :

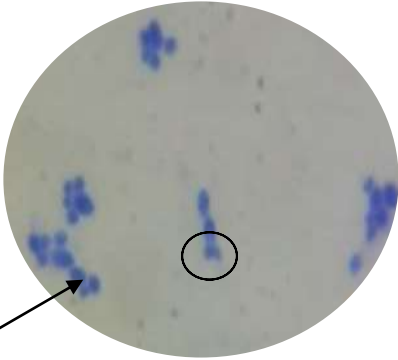
- Toutes les colonies sont bombées à part la L6
 - Les colonies convexes sont: L4
 - Les souches blanches sont: L1, L2, L3, L5, L6, L7
 - Les souches de couleur blancs cassées sont : L4
 - Les souches crémeuses sont : L1, L2, L3, L5, L6, L7
 - Les souches visqueuses sont : L4
 - Les souches mattes sont : L4, L7
 - Les souches brillantes sont: L1, L2, L3, L5, L6
 - Les souches lisse sont : L1, L2, L3, L4, L5, L7
 - Les souches rugueuses sont : L6
 - Tous les souches sont à contour régulier.
- Le pourcentage le plus élevé des souches levuriennes s'observe majoritairement sur les solutions mères.

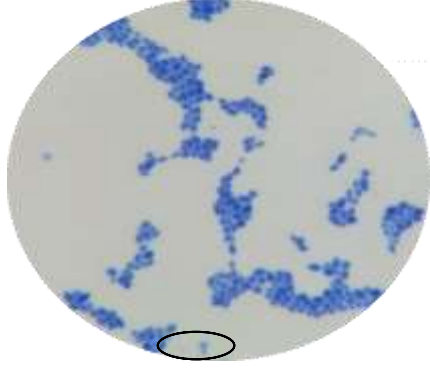
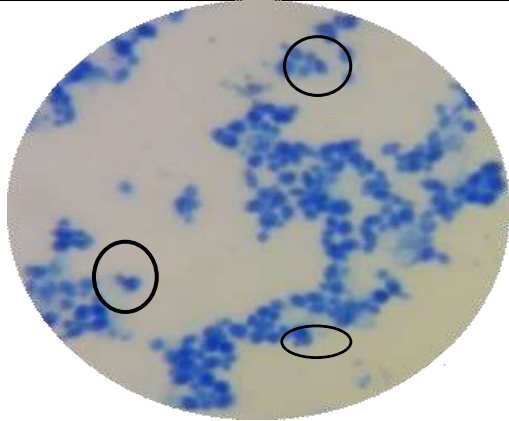
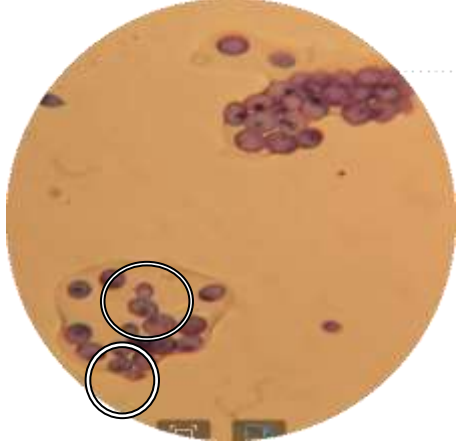
Après incubation des souches sur PDA modifié pendant 3 jours à 28°C. Les observations microscopiques sont réalisées et exposées dans le (tableau 08) suivant :


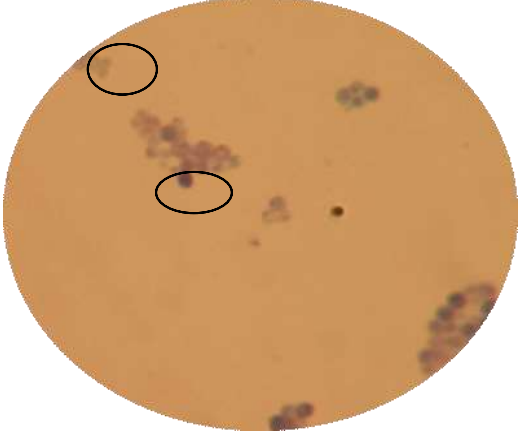
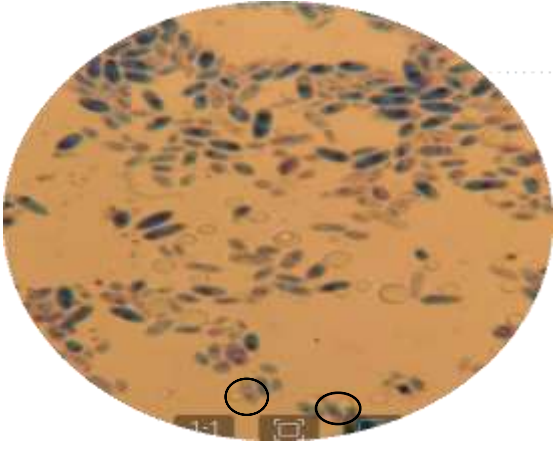
1.2. Caractéristiques biologiques

La purification des souches levuriennes dans des tubes de gélose inclinés a abouti aux résultats de l'observation microscopique après coloration au bleu de méthylène (tableau 07).

Tableau 07 : Observations microscopiques des souches levuriennes

Dilution	Origine	Code	Caractéristiques microscopiques	Observation microscopique (X40)
10 ⁻¹	Grignon d'olive	L1	Cellule ronde à allongé avec bourgeonnement monolatérale et présence de pseudomycélium	

10 ⁻²	Grignon d'olive	L2	Cellule ronde avec bourgeonnement mono et bilatérale et présence de pseudo mycélium	
10 ⁻³	Grignon d'olive	L3	Cellule ronde à allongée avec bourgeonnement mono et bilatérale et présence de pseudomycélium	
10 ⁻⁴	Grignon d'olive	L4	Cellule grande et ronde à allongé avec bourgeonnement bilatéral	

10^{-4}	Grignon d'olive	L5	Cellule ronde à allongé avec bourgeonnement monolatéral et présence de pseudomycélium	
10^{-3}	Grignon d'olive	L6	Cellule ronde avec bourgeonnement monolatéral et présence de pseudomycélium	
10^{-1}	Grignon d'olive	L7	Cellule ovale avec bourgeonnement monolatéral	

D'après les observations microscopiques X 100 et X 40, les levures isolées présentent différentes tailles, la souche levurienne L4 est la plus grande de toutes les souches.







- Les souches rondes sont : L2 ,L6
- Les souches rondes allongées sont : L1,L3,L4 ,L5
- Les souches ovales sont :L7
- Les souches avec bourgeonnement monolatéral et bilatéral : L1, L2, L3




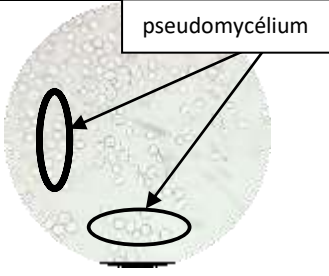


- Les souches avec bourgeonnement monolatéral :L5 , L6,L7
- Les souches avec bourgeonnement bilatéral :L4
- Les souches avec pseudo mycélium :toutes les souches présent un pseudomycélium à part L4, L7

Les résultats d'observation microscopiques des souches de levures isolées à partir du sol d'olivier de Djama et Hassi (2021) sont les suivants : des cellules rondes à allongées et bourgeonnement mono et bilatérale et présence de pseudomycélium.

Le tableau 08 présente les résultats du test de filamentation. Il est à noter que nous avons sélectionné 5 souches levuriennes pour la suite des expériences.

Tableau 08 : Résultat du test de filamentation après deux jours d'incubation à 28 °C

Souche	Figure	Observation microscopique ×40	Présence ou Absence de filament
Témoin (milieu PDA non encerné)			
L1			Absence
L2			Absence

L3			Absence
L4			Présence
L5			Absence

- La souche L4 un pseudomycélium.
- Le témoin est un signe de contamination

En comparant nos résultats avec ceux de Bataïche (2014) nous notons qu'une filamentation sous forme de gros pseudo-mycéliums présentant des ramifications et des courts pseudo-mycéliums disposés en forme d'arbre dans une souche. Ainsi que la présence de formes spécifiques ovoïdes formées correspondant aux *Blastospores* ou *Blastoconidies*.

Chez certaines espèces et après bourgeonnement, les cellules filles restent associées les unes aux autres et donnent des chaînettes constituées de plusieurs cellules formant un pseudomycélium. Ce dernier peut être rudimentaire ne comptant que quatre à cinq cellules comme il peut être plus important et présenter des ramifications. Souvent les cellules centrales s'allongent et dessinent un axe principal, tandis que les cellules localisées aux extrémités restent courtes et forment des blastospores (ou blastoconidies) au niveau des constriction, l'anaérobiose favorisent la production de cette forme (Belin, 1996).

1.3. Caractéristiques physico-chimiques

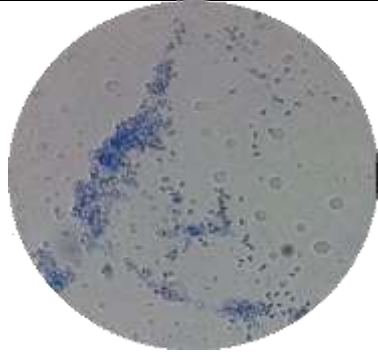
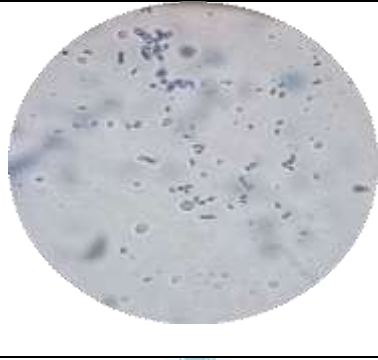
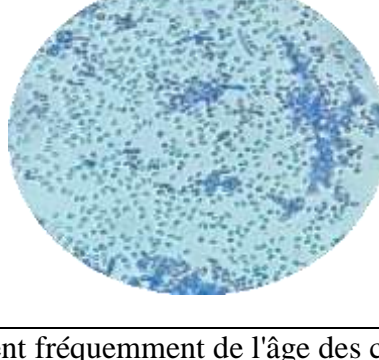
D'après l'incubation des souches levuriennes à 37 °C pendant 48 h (figure 35 et tableau 09), nous observons que les tailles des souches levuriennes ont changé par rapport à leur croissance à 30 °C et ceci peut s'expliquer par le changement de la température.



Figure 35 : Observation macroscopique de test de croissance de 37°C

Tableau 09: Résultat de croissance à 37 °C des 5 souches levuriennes sélectionnées

Souche	Croissance à 37 °C	Observation microscopique X40
L1	+	
L2	+	

L3	+	
L4	+	
L5	+	

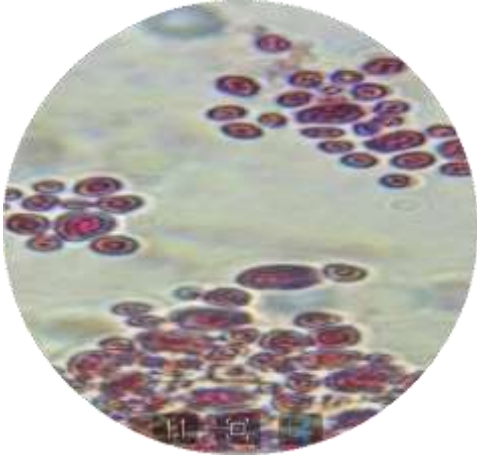
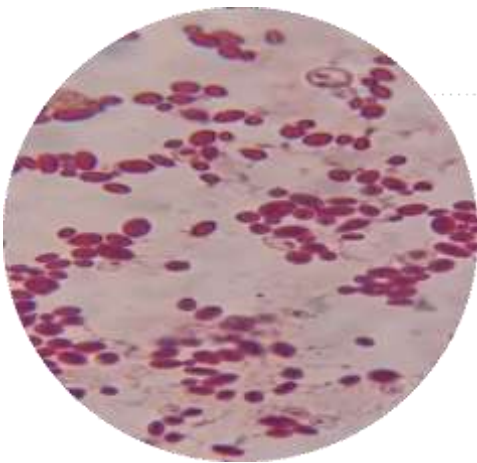
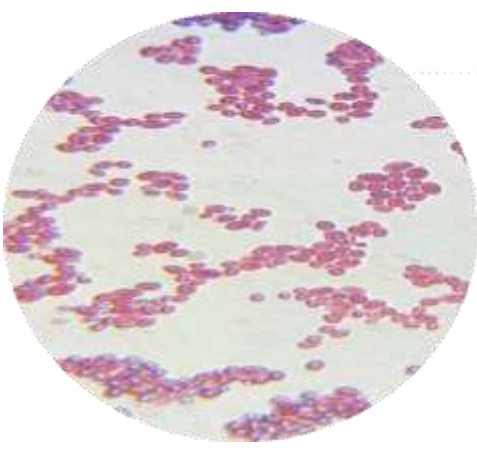
Ces dimensions, ainsi que leurs aspects dépendent fréquemment de l'âge des cellules et des conditions de culture (Scherr et Weaver, 1953).

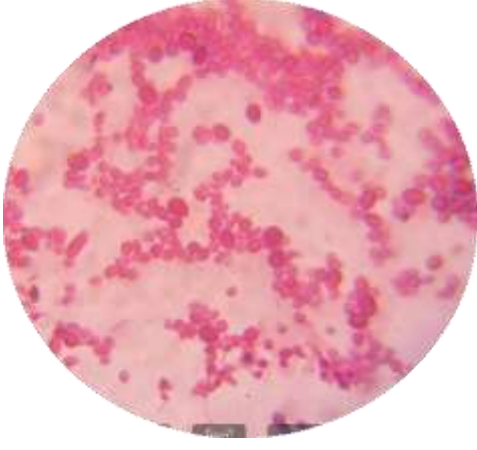
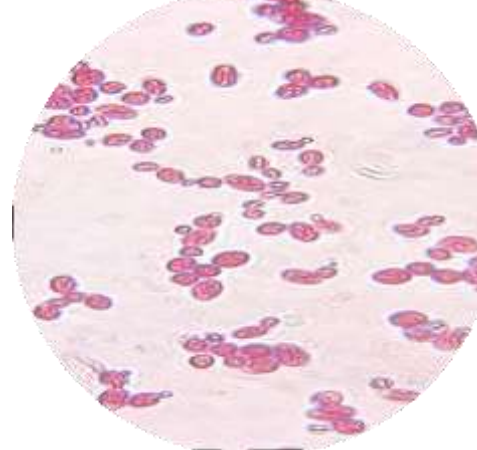
1.4. Caractéristiques biotechnologiques

1.4.1 Résultats de la coloration par noir de Soudan III

Les colonies pures des levures ont été, ensuite, criblées pour leur capacité de produire des lipides par l'analyse qualitative avec la technique de coloration en noir de Soudan III. Cette technique permis de sélectionner les souches lipolytiques, de préciser leur teneur et intensité des lipides cellulaires et donc, de donner des informations sur leur capacité d'accumulation lipidique. Les résultats sont montrés dans le tableau 10 (Remram et Mana, 2016).

Tableau10 :Analyse qualitative des lipides intracellulaires par coloration au noir de Soudan III .

Souche	Intensité	Observation microscopique X100
L1	Forte	
L2	Moyenne	
L3	Moyenne	

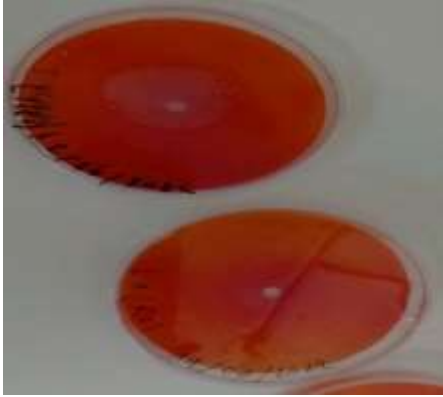

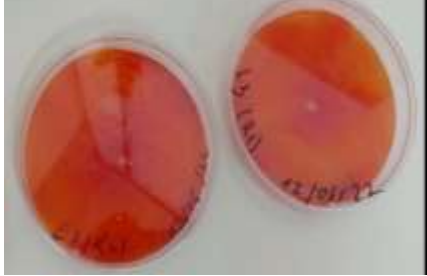


L4	-	
L5	Forte	

- Il existe une forte intensité dans les souches : L1, L5.
- Il existe une moyenne intensité dans les souches : L2, L3.
- Aucune intensité observée dans la souche L4.

- L'intensité des souches de la nouvelle huilerie est moyenne par contre L'intensité des souches de les anciennes huileries est forte et une souche n'a aucun intensité.

-La mise en évidence de la production supposée de la lipase chez les levures isolées et cultivées sur le milieu POA a été effectuée. Les résultats sont exposés dans le tableau11 ci-dessous :

Tableau 11: Test de la production de lipase chez les levures isolées

Souche	Figure	Zone claire
L1		Absence
L2		Absence
L3		Absence
L4		Absence
L5		Absence

- Après le test de révélation il a été observé qu'aucune des souches sélectionnées n'ont présenté une activité lipolytique car il n'y a pas de zones claires de couleur jaune, de forme annulaire entourant la croissance de la levure. En effet car la présence du rouge de phénol indiquerait le virage de coloration vers le jaune qui se traduit par la production d'acides, autrement dit par l'activité lipolytique présumée des souches levuriennes et l'hydrolyse des triglycérides présents dans le milieu de culture POA.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Notre étude a pu répondre aux différents objectifs à atteindre. L'objectif principal est l'isolement de levures présumées lipolytiques à partir des grignons d'olives. Ces derniers ont été prélevés de plusieurs huileries de la wilaya de Skikda au hasard.

Les résultats ont permis l'obtention d'un lot de 5 souches. Elles ont été identifiées de part leur caractéristiques biologiques, physico-chimiques et biotechnologiques. Toutes les souches ont présenté une bonne croissance à une température de 37 °C avec un changement de leur forme et taille. Parmi les cinq souches, seulement la L4 présentait un pseudomycélium après incubation et purification sur milieu PDA.

L'encemement des souches levuriennes sur milieu POA a révélé l'absence d'activité lyopolitique présumé chez toutes les souches.

En perspectives, il serait intéressant d'effectuer un plus grand screening des levures isolés des grignons d'olives ainsi que d'autres environnements tel que des sols riches en matières grasses.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Adewara A.O. & Ogunbanwo S.T. (2013). Effects of processing variables on the production of “Burukutu”. A Nigerian fermented beverage. *Nat. Sci.* 11:16-28
- Aggoune Wissem ,M.s. (2017). L’Optimisation de la production de lipases par *Aspergillus* sp. in: Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Vol. Master, Université des Frères Mentouri Constantine, pp. 70.
- Aguilar- Uscanga B. & François J.M.(2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth condition and mode of cultivation *Lett Appl Microbiol* , 37(3) :268-274
- Ahearn D.G. (1973). Estuarine Microbial Ecology : The Belle W. In . *Marine Science* 1, p: 433-440. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Alba-Mendoza J., Hidalgo Casado F., Ruíz Gómez M.A., Martínez Román F., Moyano Pérez M.J., Cert-Ventulá A., Pérez-Camino M.C. And Ruíz-Méndez M.V. (1996). Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas Aceites.*, 47, 163–181p
- Alloue W.A.M., Aguedo M., Destain J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J.P. and Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 57-68.
- Alloue, W.A.M. (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowialipolytica*: Thèse de Doctorat. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique, 165p
- Amrane T et Belkacemi T (2017). Valorisation de résidus agricoles par la culture d’une souche locale d’un champignon comestible. Mémoire de Master, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. P. 09
- Anaissie, Elias J., Michael R. McGinnis, et Michael A. Pfaller. (2009). *Clinical Mycology*. Elsevier Health Sciences
- Aparicio R and Harwood J. (2013). *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. 2nd ed. Springer
- Arnold W.M. (1981). Enzymes: In Yeast cell envelopes. *Biochemistry Biophysics and Ultrastructure*, 2: 1-46.
- Ávila SN, Gutarra ML, Fernandez-Lafuente R, Cavalcanti ED, Freire DM. (2019). Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis. *Biochem Eng J.*;144:1–7.

Références bibliographiques

-Azeredo, L. A. I., Gomes, P. M., Sant'Anna, G., Jr, Castilho, L. R., & Freire, D. G. (2007). Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, 54, 361–365.

B

-Barnett J.A. & Robinow C.F. (2002). A history of research on yeasts 4: cytology part I, 1890-1950. *Yeast*, 19: 151-182.

-Barnett J.A., Payne R.W. & Yarrow D. (1983). *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge Univ Press. Cambridge, 123-124.

-Bartnicki-Garcia S. & Lippman E. (1969). Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science NY*, 165: 302-304.

-Bartnicki-Garcia S. (1963). Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi: Molecular dimorphism of *Mucor*. *Bact Rev*, 27: 293-304.

-Bataïche I. (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

-Bayley. R-B et Parks. L-W. (1975). Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast. *J Bacterial*. PP:606-612.

-Belin J.M. (1996). Les levures. In «C.M. Bougeois & J.P. Larpent Edit, Microbiologie alimentaire, Tec et Doc Lavoisier. Paris. 36 p.»

-Belmaziz .M, et Djalal .F ,(2017) .Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane .Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.PP :110

-Ben Ameer Villain, S. (2012). Conception et Etude d'un réacteur enzymatique à membrane fonctionnant en milieu supercritique : Application à la synthèse enzymatique d'esters. Thèse de doctorat. Génie des procédés : Ecole Nationale Supérieure de chimie de Montpellier, p131

-Benitez J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J.L. And Cercas V. (1997). Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 185–8p.

-Benjamin, S., & Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(2), 213–221

-Benrachedi, A., Mekarzia., A. Gazet, A. (2001). Etude de l'adsorption de phénol sur marc de café transformé en charbon actif en poudre. *Journal de la société algérienne de chimie JSAC*. 11(1). P : 25-35

Références bibliographiques

- Binetti A., Carrasco M., Reinheimer J. and Suarez V (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, , 115:434-444
- Bolton D.J., Kelly C.T and Fogarty W.M .(1997). Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzy.Microbiol. Technol.* 20, p: 340-343
- Bora. L, Gohain. D, Das. R (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *J ChemTechnolBiotechnol* 88 (11):1959–1970.
- Borrelli GM, Trono D.(2015). Recombinant lipases and phospholipases and their uses as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci.*;16(9):20774–840.
- Bouhhadi Y., Idres A, Y.(2018). Caractéristiques physico-chimiques des huiles d'oléastre,- P 1,3-
- Bouix .M. et Leveau J-Y, (1991). Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229
- Bouix M. &Leveau J.Y. (1980). Les levures: Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires (Tome 3). In «Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. ed., Le contrôle microbiologique. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 130p.»
- Bourgeois, C., M., Leveau, J., Y. (1980), Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, 331p
- Breton C ;Berville A , (2012). Histoire de l'olive . Ed Quae .N°78026 .V ersaille Codex, France P147 ,148
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Ömer C., Ashabil A and OsmanG. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38, p: 1397-1403.
- Burkert, J. F. M., Maldonado, R. R., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2005). Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 61–67
- Bustos, I.J. (2013). Formes pharmaceutiques à base d'enzymes sans excipients. Mémoire Exigence partielle de maîtrise en biochimie : Biochimie. Québec : Université du Québec à Montréal .95P

Références bibliographiques

C

- Casas-Godoy L., Gasteazoro F., Duquesne. S, Bordes.F, Marty.A, and Sandoval.
- Ge. (2018). Lipases: An Overview. In: Sandoval G. (eds). Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology, vol 1835. Humana Press, New York, NY.
- Cassas-Goday, L; Duquesne, S; Bordes, F; Sandoval, G; et Marty, A. (2012). Lipases and phospholipases: Méthodes and protocols. Méth. Mol. Bio. 861
- Chahinian H. & Sarda L. (2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. Protein. Pept. Lett. 16: 1149-1161
- Chandra P., Enespa, Singh R. and Arora P. K.. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microb Cell Fact. 19:169
- Chaurasia .S.P, Bhandari .K, Sharma. A, Dalai.A.K. (2016). A review on lipase catalysed synthesis of DHA rich glyceride from fish oils. Int J Res Sci Innov 3(1A):3–19
- Chiappetta A., Muzzalupo I. (2012). Botanical Description. In Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, I. Muzzalupo, ed. (InTech)
- Chimi H. (2006). Qualité des huiles d'olive au Maroc. Transfert de Technologie en Agriculture. Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture, 79p.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., & Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food Microbiology, 23, 60–67.
- Cihangir, N., & Sarikaya, E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20, 193–197
- COI (International Olive Council) (1990) Collection: Technical Handbooks. Olive Oil Quality Improvement. International Olive Oil Council, Madrid.
- Colen, G., Junqueira, R. G., & Moraes-Santos, T. (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 881–885
- Cordeiro C. A., Leal M .L and Luciano A. B. (2002) Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Braz. J. Microbiol. 33 (1), São Paulo
- Cordova Lopez, J.A. (1998). Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide, pp. 248 f.

Références bibliographiques

-Covadonga R. Arias, Jacqueline K. Burns, Lorrie M. Friedrich, Renee M. Goodrich, and Mickey E. Parish, (2002). Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1955-1961

D

-D'Annibale, A., Sermanni, G. G., Federici, F., & Petruccioli, M. (2006). Olive-oil wastewaters: A promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, 97, 1828– 1833

-Dakhmouche, S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavisporalutitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. 72.

-Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F. & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532-1552p

-Di Giovacchino L., Sestili S. & Di Vincenzo D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 587-601p.

-Di Giovacchino L., Solinas M. and Miccoli M. (1994). Aspetti qualitativi e quantitativi delle produzioni olearie ottenute dalla lavorazione delle olive con i differenti sistemi di estrazione. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 71, 587–594p.

-Diaz, J. C., Rodriguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., et al. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1042–1050

-Dismukes, William E., Peter G. Pappas, et Jack D. Sobel. (2003). *Clinical Mycology*, 1^{ed}ition. Oxford ; New York: Oxford University Press

-Dominguez, A., Costas, M., Longo, M. A., & Sanroman, A. (2003). A novel application of solid state culture: Production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnological Letters*, 25, 1225–1229.

-Dutra, J. C. V., Terzi, S. C., Bevilaqua, J. V., Damaso, M. C. T., Couri, S., Langone, M. A. P., et al. (2008). Lipase production in solid state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147, 63–75.-

Références bibliographiques

E

-El hachemi C. (2010). Effet de différents modes de séchage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive Durant 3 mois de stockage. Thèse de Doctorat. Université d'Oran Es-Senia .p118

-Euzéby. (2008). Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Lavoisier

F

-F.e et al. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. in: Centre Wallon de Biologie Industrielle ,Université de Liège

-FatimaS., FaryadA.,AtaaA., JoyiaF.A. etParvaizA..(2020).Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. Biotechnology and Applied Biochemistry, - Wiley Online Library.445-458

-Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. Electron J .Biotechnol 16

-Ferhat R., Laroui S., Zitouni B., Lekbir A., Abdeddaim M., Smaili N., Mohammedi Y. (2014). Experimental study of solid waste olive's mill: extraction modes optimization and physicochemical characterization. J. Nat. Prod. Plant Resour. 4: 16-23.

-Fickers P, Destain J, Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. BiotechnolAgron Soc Environ.119-130.

-Fickers, P ; Destain, J ; et THonart, P. (2007). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et Application. Biotechnol.Agron. Soc. Environ 12(2) : 119-130

G

-Gérard. D, Gue´roult. M, Casas-Godoy. L, Condoret. J-S, Andre´ I, Marty. A et al. (2017). Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowialipolytica* Lip2p lipase. Tetrahedron Asymmetry:1–9

-Gilham D. &Lehner R. (2005).Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro.Methods. 36: 139-147

-Gilham D. &Lehner R. (2005).Techniques to measure lipase and esterase activity invitro.Methods. 36: 139-147.

-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

Références bibliographiques

- characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*. 10:54
- GonçalvesFilho D, Gonçalves S, ZanellaGuidini C. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:7399–7423.
- Grbavcic, S. Z., Dimitrijevic-Brankovic, S. I., Bezbradica, D. I., Siler- Marinkovic, S. S., &Knezevic, Z. D. (2007). Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(8–9), 757–765
- Greppi A. et al. (2013). Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int. J. Food microbiol.* 165 : 200-207
- Gryta M., Morawki A. and Tomaszewska M. (2000). Ethanol production in membrane distillation bioreactor. *Catalysis today*.(16) : 159-165
- Guiraud J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. : 310-321
- Guiraud. J, P. (1998). *microbiologie alimentaire. techniques d'analyse microbiologiques*. Ed. DUNOD. Paris : 163 -505.

H

- Hamdi , M., Khadiri ,A., Garcia, J.L. (1991). The use of *Aspergillusniger* for the bioconversion of olive mill waste-waters. *Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille cédex 3, France*. p : 828-83.
- Hamdi M. et Ellouz R. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environ. Technol.* 19: 183-188.
- Hammadi C., (2006). *Technologie d'extraction des huiles d'olives et gestion de sa qualité*. MADRM/ DERD, Maroc. 4p
- Haouhay N, E., Sanchez C, S., Asehrou A., MIR M,V & la Serrana HLG.(2016) .Effects of Storage Conditions on Antioxydant Capacity of Olive Oils Produced in Mills without Auto-Control Systems - P 01

I

- Ibukun E .O.,Akindumila F. (1998). Extracellular amylase production by isolates of *Bacilli* micro-organism cultured on different starchy food broths. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol.* 13, p: 91-95

Références bibliographiques

J

- Jacques Noémie and Serge Caseregola.(2008). « Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts ». International Journal of Food Microbiology, Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products, 126 (3): 321-26
- JairathSaloni, ParampalSahota and GulabPandove (2012). Preparation of NonAlcoholic Naturally Carbonated Beverage Using Yeast Isolate from Whey Beverage. Czech J. Food Sci., , 30 (2): 135-143
- Jeager, K.E ;Dijksta, B.W ; etreetz, M.T. (1999).Bacterial biocatalysts: Molécular biology three dimensional structure and biotechnological applications of lipases annu.Ret. Microbiol53: 315-351
- Jimoh S.O., Ado S.A., Ameh J.B. &Whong C.M.Z. (2012). Characteristics and diversity of yeast in locally fermented beverages sold in Nigeria. World J. Eng. Pure Appl. Sci. 2 : 40-44.
- Joffin, J. N., Leyral, G. (2006). Microbiologie technique, *Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine*

K

- Kanetsuna F., Carbonell L.M., Moreno R.E. & Rodriguez J. (1972). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioïdesbrasiliensis*. J Bacteriol,97 :1036-1041
- Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P. and Crowther J.C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 7, 1–26p.
- Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., &Saxena, R. K. (2006). Statistical optimization medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergilluscarneus*. Journal of Molecular Catalysis. B,Enzymatic,40, 121–126.
- Kempka, A. P., Lipke, N. R., Pinheiro, T. L. F., Menoncin, S., Treichel, H., Freire,D. M. G., et al. (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicilliumverrucosum* in solid-state fermentation.Bioprocess and Biosystems Engineering, 31, 119–125.
- Khan. N.R, Rathod .V.K (2015). Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. Process Biochem 50 (11):1793–1806
- Kim, B. S., &Hou, C. T. (2006). Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 29, 59–64.

Références bibliographiques

-Klis M. F., Piernella M., Klaas H. & Stanley B. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 23: 234-245.

-Kreger-Van- N.J. (1984), *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science publishing, Amsterdam.

-Kumar, S. S., and Gupta, R. (2008). An extracellular lipase from *Trichosporonasahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry*, 43, 1054–1060.

-Kurtzman C.P. (2011). Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 304.

-Kurtzman C. P., Part Iva.(2011). Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and anamorphic Ascomycetous and yeasts-like-taxa. In Kurtzman C. P., Fell J.157 W. and Boekhout T (Eds).

The yeasts, a taxonomic study. Fifth edition. Elsevier. 2 : 293-311.

-Kurtzman Cletus P., Jack W. Fell, Teun Boekhout and Vincent Robert. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (Eds). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier. 1(5) : 87-111.

L

-La Rubia-García M., Yebra-Rodríguez Á., Eliche-Quesada D., Francisco A. Corpas Iglesias , López-Galindo A. (2012) . Assessment of olive mill solid residue (pomace) as an additive in lightweight brick production. *Constr. Build. Mater.* 36: 495–500

-Labdaoui D. (2017). Impact socio-économiques et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie).

-Lachance Marc-André.(2011). Chapitre 21: *Clavispora* Rodrigues de Miranda (1979) in Kurtzman C; P., Fzll J. W. and Boekhout T. *The yeast. A taxonomic study*. Volume 2. Fifth edition. Elsevier.

-Lailaja. V.P, Chandrasekaran. M. (2013). Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World J Microbiol Biotechnol* 29(8):1349–1360

-Larpent J.P (1991) *Biotechnologie levures* .ED Masson , Paris, 445P

-Larpent J.P, Larpent G.M. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3ème édition, Technique et documentation Lavoisier, Paris. PP : 217- 240

Références bibliographiques

- Larpent J.P., (1991) Biotechnologie des levures. Ed. MASSON, Paris: 335-336.--Walker G.M., Wiley J. and Chihhster S. Yeast physiology and biotechnology, Nat Struct.Biol. 1997, 164p.
- Larpent J.P., (1991) Biotechnologie des levures. Ed. MASSON, Paris: 335-336.
- Larpent J-P, (1991).Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires - produits laitiers et carnés. Ed. APRIA. PP : 242-260.
- Larpent .J-P, (1991). Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. PP : 97-426.
- Leclerc H. (1975). Microbiologie générale, doin éditeurs, Paris. p : 28
- Leclerc H. 1975 « Microbiologie générale », 3ème édition, Paris, 828pages
- Leclerc H., Meyer A. et Deiana J. (1995). Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. Doin éditeurs, Paris. 73-92
- Li. X.L, Zhang. W.H, Wang. Y.D, Dai. Y.J, Zhang. H.T, Wang. Y et al.(2014).A high-detergentperformance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. *J MolCatal B Enzym*102:16–24
- Liese A., Weelbach K. and Wandrey C.(2000). *Industrial BioTransformations*, 2ndeds. Wiley VCH Verlag, Weinheim
- Lipke N. P. &Ovalle R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bacteriol*, 180(5): 3735-3740
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L., & Li, J. (2008). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidiumpullulans* HN2.3 withpotential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*,40, 445–451
- Lodder J. (1971). *The yeasts, a taxonomic study*, 2ème edition.North Holland, Amsterdam,Londres.p:1385.
- Lokha Y, Arana-Peña S, Rios NS, Mendez-Sanchez C, Gonçalves LR, LopezGallego F, Fernandez-Lafuente R.(2020). Modulating the properties of the lipase from *Thermomyceslanuginosus* immobilized on octylagarose beads by altering the immobilization conditions. *Enzym Microbial Technol*;133:109461.
- Lopandic K., Zelger S., Banzsky L. K., Eliskases-Lechner F. and Prillinger H.(2006).Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.*, , 23: 341-350
- Lopes, M., Gomes, N., Mota, M., & Belo, I. (2009). *Yarrowialipolytica* growth under increased air pressure: Influence on enzyme production. *AppliedBiochemistryandBiotechnology*

Références bibliographiques

M

- M. Benlemlih, J. Ghanam, «polyphénols d'huile d'olives, trésors santé», 2ème édition, 208 pages, (2016).
- Manners D.J. & Masson A.J. (1969). The structure of two glucans yeast cell walls. *F E B S Letters*, 4: 122-124.
- Melim Miguel. A.S, Martins-Meyer .T.S, da Costa Figueiredo. E.V, Paulo Lobo .B.W, Dellamora-Ortiz. G.M (2013). Enzymes in bakery: current and future trends. In: Muzzalupo I (ed) *Food industry. InTech*, pp 287–321
- Meziane S. (2013). Modélisation de la cinétique du séchage convectif du grignon d'olive. *Energies Renouvelables*. 16: 379 – 387
- Miceli, Marisa H., José A. Díaz, et Samuel A. Lee. (2011). « Emerging opportunistic yeast infections ». *The Lancet infectious diseases* 11 (2): 142-51.
- Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-millwastes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82 : 25–39p.
- MUNIR J., RUSAN M., AMMAR R., ALBALASMEH A., MALKAWI. (2016). Treated Olive Mill Wastewater Effects on Soil Properties and Plant Growth. *Water Air Soil Pollut*, 227:135.
- MUNIR J., RUSAN M., AMMAR R., ALBALASMEH A., MALKAWI. (2016). Treated Olive Mill Wastewater Effects on Soil Properties and Plant Growth. *Water Air Soil Pollut*, 227:135.

N

- N. Babakhouya, (2010) Récupération des métaux lourds par l'utilisation des absorbants naturels, université de boumerdes,.
- Nadour M, (2015). Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaires. Thèse Doctorat. Faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomique, Département de Biochimie Microbiologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Najjar, A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase. de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat : Microbiologie et biotechnologies : Université de la méditerranée (Aix Marseille II) 132P.

Références bibliographiques

- 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. *Olivae*. 19 : 17-21
- NEFZAOUI A(1991). contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits ; Option méditerranéennes série séminaire N 16, PP 101-108. École supérieure d'horticulture. Sousse Tunisie,
- Nefzaoui A(1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales, 43.
- Nema, A., Patnala, S.H., Mandari, V, S. Kota and S. Kumar .(2019). Production and optimization of lipase using *Aspergillusniger* MTCC 872 by solid-state fermentation. *Bull Natl Res Cent*43, 82
- Neumann N.P. & Lampen J.O. (1967). Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*, 6: 468-475
- Niaounakis M. and Halvadakis C.P. (2006). Olive processing waste management literature review and patent survey. *Waste management series*, vol. 5, 2nd ed. Elsevier.
- Nickerson W.Y. & Falcone G. (1956). Identification of protein disulfide reductase as a cellular division enzyme in yeasts. *Science N Y*, 124: 722-723
- O**
- Oliveira A. C. D., Fernandes M. L. et Mariano A. B..(2014). Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 4, 1503-1511
- Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris. 8, p : 43-51.
- Oteng-Gyang K.(1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation, Paris,.
- Ouédraogo N., Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *Int. Food Res. J.*, 19(4): 1463-1469
- Özgen FF, Vardar-Yel N, Roth OS, Shahbaz LS, Vardar-Schara G. (2020). Surface residues serine 69 and arginine 194 of metagenome-derived lipase influence catalytic activity. *Biochem Eng J*. 154:107442

Références bibliographiques

P

- Pandolfi, D. (2006). Caractérisation morphologique de la biomasse des boues actives par analyse d'image. THÈSE. Institut national polytechnique de lorraine
- Pandolfi, D. (2006). Caractérisation morphologique de la biomasse des boues actives par analyse d'image. THÈSE. Institut national polytechnique de lorraine
- Peat S., Turvey J.R. & Doyle D. (1961). The polysaccharides of baker's yeast V.A. Further study of the mannan. *J ChemSoc*, 7: 3918-3923.
- Peng Q, Wang X, Shang M, Huang J, Guan G, Li Y et al (2014). Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. *Microb Cell Factories* 13(1):1-1
- Pérez-Brito D., Magaña-Alvarez A., Lappe-Oliveras P., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Herrera-Suarez T., Larqué-Saavedra A. and Tapia-Tussell R. (2015). Genetic diversity of *Clavisporalutitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA finger printing. *J Microbiol*. 53(1): 14-20.
- Phaff H. J and Starmer W.T. (1987). Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil In: Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeasts*, V1, *Biology of yeast*. 2nd edition Academic Press. Londres. p :123-174.
- Pinheiro, T. L. F., Menoncin, S., Domingues, N., Oliveira, D., Treichel, H., Di Luccio, M., et al. (2008). Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2), 444-450
- Pol .D, 1996. Travaux pratiques de biologie des levures. *Pellisepe*, édition marketing. 158. PP : 21-151
- Pol D., 1999. Travaux pratique de biologie des levures : avant-propos et introduction [enligne]. Ed Ellipse. Disponibles sur : -<http://www.didier-pol.net /5AVPRPOS.html>>
- Pollack J.H. & Hashimoto T. (1987). The role of glucose in the pH regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, 133: 415-424
- Potumarthi, R., Subhakar, C., Vanajakshi, J., & Jetty, A. (2008). Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorulamucilaginosa*-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 700-710.
- Prillinger Hansjorg, Molnar Orsolya, Frieda Eliskases- Lechner and KsengaLapandic; (1999). Phenotypic and genotypic identification of yeast from cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek*., 75: 267-283

Références bibliographiques

R

- Rabiei Z., Tahma S. (2012). National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran : Traceability of Origin and Authenticity of Olive Oil -P165
- Rahary L., Poulain D., Reisinger O., Lematre J. & Bonaly R. (1984). Action de la cytohélicase sur les tubes germinatifs de *Candida albicans*. Bull Soc Franc Mycol Med, 13: 187-193
- Ranalli A. (1991). L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. Olivae. 39 : 18-34.
- Rao R. S., Bhadra B. and Shivaji S. (2008). Isolation and characterization of ethanolproducing yeasts from fruits and tree barks .Letters in Applied Microbiology. 47 (1): 19-24.
- Ravikumar, K., Dakshayini, J., Girisha, S.T. (2012). Biodiesel production from oleaginous fungi. international journal of life sciences. Volume 6, Issue 1
- Rezki-Bekki Meriem Amina, Laurent Benbadis, Gustavo DeBillerbeck, Zoubida Benbayer and Jean Marie François ,(2013). Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. Journal of Yeast and Fungal Research. 4(6): 75-83.
- Rihani, A. (2012). Screening de microorganismes producteurs de lipases : Application dans la biodécontamination de surface. Magister en Microbiologie. Université Badjimokhtard' Annaba, 55P
- 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, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., and Baratti, J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus* cultured in solid state fermentation. Process Biochem. 41, 2264–2269
- Rose A. H. Responses to the chemical environment. In : Rose A. H., Harrison J. S. edit. The yeast, vol. 2, 2nd edition, physiology and biochemistry of yeasts. Academic Press, Londres, Royaume Uni, 1987, p.5

S

- Sainz, J., F. Pizarro, J. R. Pérez-Correa et E. Agosin. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. Wiley periodicals Inc. 818.
- Salihu A, Alam. M.Z (2015). Solvent tolerant lipases: a review. Process Biochem 50 :86–9

Références bibliographiques

- San-Blast G. (1979). Biosynthesis of glucans by subcellular fractions of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol*, 3: 249-258
- Sánchez-Moral P. and Ruiz-Méndez M.V. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites*, 57(1), 47–55p
- Sangeetha.R, Geetha.A, Arulpani.I.(2010).Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization, *Braz. J. Microbiol.* 41 .179–185
- Saoudi S. Contribution à l'étude des sous-produits oléicoles générés par les huileries dans la région de M'chedallah. Mémoire de Master, Université de Akli Mohand Oulhadj, Bouira. 2017, P.12
- Sbai, G., Loukili, M. (2015). Traitement des margines par un procédé couplant la coagulation floculation et la voie électrochimique. Laboratoire des Procédés, Energies Renouvelables et Environnement Ecole Supérieure de Technologie. *European Scientific Journal*.11(9) ISSN : 1857-7881
- Scherr G.H. & Weaver R.H. (1953).The dimorphism phenomenon in yeasts.*Bact Rev*, 17: 51- 92
- Schurr A. &Yagile Y. (1971). Regulation and characterization of alkaline phosphate in yeast.*J Gen Microbiol*, 65: 291-303
- Scriban R. (1999). *Biotechnologie*. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier(éd.).p : 401-409.
- Sekour B. (2012). Phytoprotection de l'huile d'olive vierge par ajout des plantes végétales. Thèse Doctorat. Faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomique, Département de Biochimie-Microbiologie. UniversitéMhamedBougaraBoumerdes.
- Sharma. S, Kanwar. S.S. (2014).Organic solventtolerant lipases and applications.*SciWorld J*: 625258
- Singh M., Chandraveer ,Tripathi.A. (2017). Isolation and screening of lipases producing microorganisms from natural sources, *Indian J. Ecol.* 44 (1) 19–23.
- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K. and Gupta, R. (2006). A simple activitystaining protocol for lipases and esterases.*Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 679-682
- Suarit R., Gopal P. K. &Sherped M. G. (1988). Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*.*J Gen Microbiol*, 134: 2359-2368.

Références bibliographiques

-Surribas, A., Stahn, R., Montesinos, J. L., Enfors, S. O., Valero, F., & Jahic, M. (2007). Production of a Rhizopusoryzae lipase from Pichiapastoris using alternative operational strategies. *Journal of Biotechnology*, 130, 291–299

T

-Tan, T., & Yin, C. (2005). The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1, 3 position specific lipase from Rhizopusarrhizus. *Biochemical Engineering Journal*, 25, 39–45

-Teng, Y., Xu, Y., & Wang, D. (2009). Changes in morphology of Rhizopuschinensis in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

-Thuriaux P., (2004). *Les organismes modèles la levure*. Ed. Belin. Paris. PP: 15-44.

-Tian, X, Zhang, G, Lu, X, Zhang A, Lin, J, Zheng, L et al. (2012). Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine by using microgel beads containing Pseudomonas cepacia lipase. *Biocatal Biotransform* 30 (4):391–398

-Tony Hart : « l'atlas de microbiologie », 2ème édition, (1993), 1745 page

-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.

V

-Van Uden N and Fell J.W. (1968). *Advances in Microbiology of the Sea*. Academic Press, New York. 1, p: 167-201.

-Vasquez-Roncero, A., Maestro-Duran, R. et Graciani-Constante, E. (1974). Componentes fenolicos de la aceituna. II-Polifenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*. 25. p: 341-345

-Verdugo Valdez A. (2011). Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria R. and Gschaedler Mathis A. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 100 (4):497-506.

-Vidotto V., Picero G., Caramello S. & Paniate G. (1988). Importance of some factors on the dimorphism of *Candida albicans*. *Mycopathologie*, 104: 120-135

-Vieille C and Zeikus J.G. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* .65(1), p:1-43.

-Vincent T. Calabrese, Jason W. Minns, Arshad Khan. (2016). Suppression of α -Amylase inactivation in the presence of ethanol : Application of a two-step model. *Formulation and engineering of biomaterials*

Références bibliographiques

-Vlyssides A.G., Loizides M. and Karlis P.K. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.*, 12, 603–611p.

W

-Walker G. M. & White N. A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. In «Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 267 p.»

-Walker G.M., Wiley J. and Chihhster S(1997). *Yeast physiology and biotechnology*, Nat Struct.Biol., 164p.

-Wickerham, L.J. (1951).Taxonomy of yeast. Technical Bulletin No. 1029, United States.

Departement of Agriculture, Washington, D.C.--Kurtzman, C.P. etRobnett C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeastsfrom analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.Antonie Van Leeuwenhoek.73 : 331-371.

-Wilfried, R; Moussavou, M; Brunshwig, Ch; Villeneuve, P; Blin, J. (2011).6^{ème}Journées scientifiques du 2iE. Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV). 4-8 Campus 2iEOuagadougou, 6P.

Y

-Yang, X., Wang, B., Cui, F., & Tan, T. (2005). Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopusarrhizus*. *Process Biochemistry*, 40, 2095–2103

Z

-Zhang, L., Meng, X., Yang, J., Xu, X. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms.*Renew.Energ.* 34, 1–5

-Zhao, W., Wang, J., Deng, R., & Wang, X. (2008). Scale-upfermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichiapastoris* using the GAP promoter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 189–195

-Zhong L, Feng Y, Wang G, Wang Z, Bilal M, Lv H, Jia S, Cui J.(2020).Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production. *Int J Biol Macromol.*;152:207–22.

Rérérences internet

Web 1: http://gigilanenette.free.fr/TPE%20Marion/part1_3.htm

Web 2 : <http://www.marketsandmarkets.com>,(2020)

Annexes

ANNEXE 1

Instruments

- Sac stérile
- Glacière
- Tube & essais
- Bécher
- Boite de Pétri
- Agitateur
- Bain marie
- Erlenmeyer
- Micro pipette
- Eprouvette graduée
- Pipette Pasteur
- Lame et lamelle
- Spatule
- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Autoclave
- Microscope optique
- Bec Bunsen
- Incubateur

ANNEXE 2:

Composition milieu de culture:

POA :

Potato Dextrose Agar (gelose pomme de terre.glucoyée, pH5 6) danu 1L d'eau distillee (Gumuc.1998)

Extrait de pomme de terre(a partir de 200g)

Glucose.....20g

Agar.....15g

-Yeast Nitrogene Base (Wikerham, 1951)

Milieu de la mise en évidence de lipase POA :

Phenoloil Agar :

0.1g/l rouge de phénole

10ml/l huile d'olive

0.1g/l CaCl₂

20g Agar

Stérilisation dans l'autoclave à 1200 pendant 20min

Noir de soudonRemitem :

Noir de soudan III.....1g.

Éthanol à 70°.....100 ml.

Fuchsine (Guiraud, 1998)

Fuchsine basique1g

Phénol.....5g

Alcool éthylique a 90°.....10ml

Eau distillée.....1000ml

Résumé

Le but de ce travail est l'étude des caractères cultureux des colonies isolées à partir des grignons d'olive. Nous avons effectué des observations macroscopiques et microscopiques ainsi que d'autres analyses telles que l'aptitude à la filamentation, le test de croissance à 37 °C, coloration au noir de Soudan III, et enfin étude de l'activité lipolytique présumé. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a effectivement des granules de PHB dans 4 des cinq souches isolées. Tandis que le test de révélation de l'activité enzymatique a montré qu'aucune des souches n'est présumés lipolytique.

Mots clés : grignons d'olive, levure, lipolytique, granules PHB.

Abstract

The aim of this work is to study the cultural characteristics of isolated colonies of olive pomace. We performed macroscopic and microscopic observations as well as other analyzes such as the ability to filamentization, growth test at 37 °C, coloration with Noir de Soudan III, and lastly the study of the presumed lipolytic activity. The results showed the presence PHB granules in 4 of the five isolated strains. While the test of revelation of enzymatic activity showed that none of the strains are presumed lipolytic.

Key words: olive pomace, yeast, lipolytic, PHB granules.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة خصائص المستعمرات المعزولة من ثفل الزيتون. أجرينا ملاحظات مجهرية وميكروسكوبية بالإضافة إلى تحليلات أخرى مثل القدرة على الفتيل ، واختبار النمو عند 37 درجة مئوية والذي أظهر وجود 5 سلالات من الخميرة. هذه السلالات الخمس من الخميرة "تخضع لتحليلات للكشف عن الخمائر المحللة للدهون. في الواقع ، جميع السلالات ليس لها نشاط تحلل الدهون.

كلمات مفتاحية: ثفل الزيتون ، خميرة ، لبياز.