

Université du Québec  
Institut National de la Recherche scientifique  
Centre Eau Terre Environnement

**Production améliorée des lipases à partir du *Rhizopus oryzae* NRRL  
1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de  
fermentation liquide**

Par  
Chada Lagrari

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences de l'eau

**Jury d'évaluation**

Directeur de recherche	Satinder Kaur Brar INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Patrick Drogui INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Tarek Rouissi INRS-ÉTÉ
Examineur interne	Yann Le Bihan INRS-ÉTÉ
Examineur externe	Jean Robert GNEPE Mérinov



## REMERCIEMENTS

Avant de commencer la présentation de ce travail, je profite de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mon Master (formation bidiplômante INRS/ISHEDD).

J'adresse mes chaleureux remerciements à ma directrice de recherche professeure Satinder Kaur Brar pour la formation et l'encadrement que j'ai reçus d'elle a toujours été pour moi un guide précieux. J'adresse mes chaleureux remerciement à mes codirecteurs de recherche Pr. Drogui Patrick et Dr. Tarek Rouissi, pour le temps passé ensemble, leurs remarques, et aussi de m'avoir fourni tous les informations et les conseils pertinents concernant mon sujet.

Je remercie également le personnel du laboratoire qui m'a accompagné de près durant mon travail de recherche dans les laboratoires de l'INRS ETE, pour leurs disponibilités, leur précieuse aide qu'ils ont su m'accorder tout au long de la réalisation de ce projet.

Un grand merci à Monsieur EL haji Kamal le directeur général de l'Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable (ISHÉDD), de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un Projet de Fin d'études, aussi de m'avoir guidé pour l'acquisition de mes compétences grâce aux différentes notions fondamentales (dont les notions de planification, structuration, organisation) durant son cours de développement des compétences.

Et finalement, je remercie mes collègues, mes amis et ma famille pour leur soutien et leur encouragement continus.



## RÉSUMÉ

Le présent projet porte principalement sur la production améliorée de lipases à l'aide du champignon « *Rhizopus oryzae* NRRL 1526» par fermentation à l'état liquide. La production des enzymes est très coûteuse en raison du coût élevé de la matière première. Cette étude vise l'utilisation des déchets lignocellulosiques comme alternative utilisée pour la production de lipases. Cinq résidus lignocellulosiques ont été testés (la luzerne, le bois dur, le miscanthus, le panic érigé et les fibres de chanvre). Ces déchets ont été au préalable soumis à un procédé de saccharification permettant la transformation des sucres complexes en sucres plus simples (sucres fermentescibles) et ce, pour une meilleure croissance du champignon impliqué dans le processus de production de lipases. Après identification du substrat le plus approprié, une fermentation a été réalisée en imposant des conditions favorables à la bonne croissance du *Rhizopus oryzae* (168 h, 30°C, 150 rpm, pH 5.2) pour la production des lipases. Quatre inducteurs ont été testés (Tween 80, huile d'olive, huile de tournesol et glycérol) dans l'optique d'améliorer l'efficacité de la production des lipases. La luzerne a été identifiée comme étant le substrat le plus riche en sucres fermentescibles (19,37 mg/ml). La production maximale de lipases (40 U/g) a été obtenue en utilisant le glycérol comme inducteur. Cependant pour l'optimisation l'activité maximale (110 U/g) a été obtenue en inoculant 15% (v/v) de glycérol et 10% (v/v) du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

**Mots-clés:** déchets lignocellulosiques; fermentation à l'état liquide; *Rhizopus oryzae* NRRL 1526; Lipases.

## ABSTRACT

The present project focuses on the improved production of lipases using the fungus "*Rhizopus oryzae* NRRL 1526" by fermentation in the liquid state. The production of enzymes is very expensive because of the high cost of the raw material. This study aims to use lignocellulosic waste as an alternative used for the production of lipases. Five lignocellulosic residues were tested (alfalfa, hardwood, miscanthus, switchgrass and hemp fiber). These wastes were previously subjected to a process of saccharification allowing the transformation of complex sugars into simpler sugars (fermentable sugars) and this, for a better growth of fungi involved in the process of production of lipases. After identification of the most suitable substrate, a fermentation was carried out by imposing conditions favorable to the good growth of *Rhizopus oryzae* (168 h, 30 ° C., 150 rpm, pH 5.2) for the production of lipases. Four inducers were tested (Tween 80, olive oil, sunflower oil and glycerol) in order to improve the efficiency of lipase production. Alfalfa was identified as the richest substrate for fermentable sugars (19.37 mg /ml). The maximum lipase production (40 U/g) was obtained using glycerol as the inducer. However, for optimization the maximum activity (110 U/g) was obtained by inoculating 15% (v/v) of glycerol and 10% (v/v) of *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

**Keywords:** lignocellulosic waste; fermentation in the liquid state; *Rhizopus oryzae* NRRL 1526; Lipases.

# TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	1
<b>1 REVUE DE LITTERATURE .....</b>	<b>2</b>
1.1 GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX .....	2
1.1.1 Définition des champignons filamenteux .....	2
1.1.2 Caractéristiques morphologiques .....	2
1.1.3 Croissance des champignons filamenteux .....	4
1.1.4 Conditions de croissance des champignons filamenteux .....	5
1.1.5 Domaine d'application des champignons filamenteux .....	6
1.1.6 Problèmes liés aux champignons filamenteux .....	6
1.2 MOISSISSURE RHIZOPUS ORYZAE .....	7
1.2.1 Caractéristiques morphologiques du <i>Rhizopus oryzae</i> .....	8
1.2.2 La reproduction chez <i>Rhizopus oryzae</i> .....	9
1.2.3 Conditions de développement de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	9
1.2.4 Les applications industrielles de <i>R. oryzae</i> .....	10
1.2.5 La production d'enzymes .....	10
1.3 LIPASES .....	11
1.3.1 Définition et habitats des lipases .....	11
1.3.2 Réaction des lipases .....	12
1.3.3 Familles des lipases .....	12
1.3.4 Propriétés des lipases .....	13
1.3.5 Mécanisme d'action .....	13
1.3.6 Méthodes d'analyse des lipases .....	14
1.3.7 Applications industrielles .....	15
1.4 FERMENTATIONS EN MILIEU LIQUIDE OU SUBMERGE .....	15
1.4.1 Définition .....	15
1.4.2 Avantages et inconvénients de la FML : .....	16
1.4.3 Comparaison des technologies de fermentations en milieu liquide et de fermentation en milieu solide	17
1.4.4 Les microorganismes .....	17
1.4.5 Substrats .....	17
1.4.6 Les facteurs environnementaux et les paramètres de culture .....	18
1.4.7 Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des FML .....	18

<b>2</b>	<b>OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJECTIFS .....	18
2.1.1	<i>Objectif principal</i> .....	18
2.1.2	<i>Objectifs spécifiques</i> .....	19
2.2	HYPOTHESES DE RECHERCHE.....	19
2.3	PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE .....	19
2.3.1	<i>Problématique de la biomasse lignocellulosique</i> .....	19
2.3.2	<i>Problématique du cout élevé de production de lipases</i> .....	20
2.4	DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>20</b>
3.1	DETERMINATION ET CHOIX DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE LA PLUS RICHE EN SUCRE.....	20
3.1.1	<i>Conversion de la biomasse en sucres fermentescibles</i> .....	21
3.1.2	<i>Détermination de la quantité de sucres réducteurs</i> .....	21
3.2	PRODUCTION DES LIPASES PAR LA FERMENTATION LIQUIDE EN UTILISANT LA BIOMASSE LA PLUS RICHE EN SUCRE.....	23
3.2.1	<i>Milieu et conditions de culture</i> .....	23
3.2.2	<i>Croissance et conditions des spores</i> .....	23
3.2.3	<i>Fermentation en milieu submergé</i> .....	24
3.3	AMELIORATION DE LA PRODUCTION DES LIPASES EN FERMENTATION LIQUIDE PAR L'UTILISATION DES DIFFERENTS INDUCTEURS.....	24
3.4	OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION DU MEILLEUR INDUCTEUR .....	24
<b>4</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>26</b>
4.1	CHOIX DE SUBSTRAT .....	26
4.1.1	<i>Hydrolyse chimique</i> .....	26
4.1.2	<i>Hydrolyse biochimique</i> .....	27
4.1.3	<i>Hydrolyse chimique et biochimique</i> .....	28
4.1.4	<i>Traitement avec l'eau distillée (contrôle)</i> .....	29
4.1.5	<i>Conclusion</i> .....	30
4.2	FERMENTATION EN MILIEU SUBMERGE .....	31
4.2.1	<i>Production des lipases avec huile d'olive</i> .....	31
4.2.2	<i>Production des lipases avec huile de tournesol</i> .....	32
4.2.3	<i>Production des lipases avec Tween 80</i> .....	33
4.2.4	<i>Production des lipases avec glycérol</i> .....	33
4.2.5	<i>Conclusion</i> .....	34
4.3	OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION DU MEILLEUR INDUCTEUR .....	34



<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>PERSEPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>39</b>

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Températures cardinales des différents microorganismes .....	6
<b>Tableau 2:</b> Conditions de développement de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	10
<b>Tableau 3:</b> Les enzymes produites par <i>Rhizopus oryzae</i> et leurs champs d'application. ....	11
<b>Tableau 4:</b> les points forts et faibles de deux types de fermentations liquide et solide .....	17
<b>Tableau 5:</b> les facteurs environnementaux nécessaires pour la croissance du champignon et la production des enzymes dans une fermentation submergée .....	18
<b>Tableau 6:</b> Différente concentration de glycérol et d'inoculum. ....	25
<b>Tableau 7:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse acide (en mg/ml).....	26
<b>Tableau 8:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse enzymatique (en mg/ml). ....	28
<b>Tableau 9:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse combinée (en mg/ml).....	29
<b>Tableau10 :</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par le traitement avec l'eau (en mg/ml). ....	30
<b>Tableau 11:</b> Coefficients statistiques des variables dépendantes (Glycérol, inoculum). ....	35
<b>Tableau 12:</b> Valeurs critiques d'inoculum (%) et de glycérol (%v/v) selon le modèle statistique. ....	36

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Structure d'un mycélium .....	3
<b>Figure 2:</b> A : hyphe coenocytique), (B : hyphe cloisonne) .....	3
<b>Figure 3:</b> Schéma représentatif de la structure de la paroi fongique .....	4
<b>Figure 4:</b> Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des champignons filamenteux .....	5
<b>Figure 5:</b> Exemple de quelque contamination par les champignons filamenteux.....	7
<b>Figure 6:</b> Structure visible de <i>R. oryzae</i> .....	9
<b>Figure 7:</b> Le cycle biologique d'un zygomycète .....	9
<b>Figure 8:</b> Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride .....	14
<b>Figure 9:</b> Courbe d'étalonnage pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs.....	22
<b>Figure 10:</b> Milieu de la culture du <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 1526. ....	23
<b>Figure 11:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse acide (en mg/ml).....	26
<b>Figure 12:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse enzymatique (en mg/ml).....	27
<b>Figure 13:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse combinée (en mg/ml). ....	29
<b>Figure 14:</b> Quantité de sucres réducteurs obtenus par le traitement avec l'eau distillée (en mg/ml). ....	30
<b>Figure 15:</b> Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur.(temps d'incubation 168h; inducteur : huile d'olive).....	31
<b>Figure 16:</b> Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 420h; inducteur : huile de tournesol).....	32
<b>Figure 17:</b> Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 168h; inducteur : Tween 80).....	33
<b>Figure 18:</b> Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 168h; inducteur : Glycérol). ....	34
<b>Figure 19:</b> Model statistique des différentes variables utilisées (glycérol, inoculum). ....	35
<b>Figure 20:</b> Model statistique des différentes variables utilisées (glycérol, inoculum). ....	36



## INTRODUCTION

De nos jours, nous utilisons dans notre quotidien un taux élevé des biens issus essentiellement de la biotechnologie, comme un médicament, un détergent, des aliments ou des produits cosmétiques. Cependant, la production de ces bioproduits nécessite la présence et l'action des enzymes (El-okki, 2017; Kirk O, 2002). Étant donné que la compétition entre les industries est devenue forte, ces enzymes ont connu un grand progrès depuis le début des années 80 (El-okki, 2017), leur marché mondial est estimé à 7,4 milliards de dollars (Deb P, 2013) avec une augmentation annuelle de 4%. 25% de ce marché est occupée par les lipases, ces derniers perçus parmi les enzymes les plus importants en industries, selon (Cordova Lopez, 1998) il existe deux raisons :

La diversité d'applications en industries ;

Les lipases sont spécialisées dans la transformation de glycéride en glycérol et en acides gras.

Dans cette optique, ce travail de recherche est axé sur la production des lipases, le principal obstacle qui freine l'application des lipases repose sur le coût de production élevée. Pour cette raison, il est impératif de chercher des nouvelles voies afin de diminuer leur coût de production (Kirk O, 2002). La biomasse lignocellulosique a été choisie comme milieu de croissance, en raison, de son faible besoin en eau pour la croissance dans tous types de sols (terres arides).

La biomasse lignocellulosique est composée de trois principales fractions. La première, de l'ordre de 35 à 50 %, est la cellulose (N. Eloutassi 2012). La seconde, appelée hémicellulose, de l'ordre de 20 à 30 %, est aussi un polysaccharide, on le distingue de la cellulose par le fait qu'il est hétérogène (N. Eloutassi 2012). Le troisième est la lignine (15 à 25 %), présente dans les interstices qui cimentent la chaîne cellulose et hémicellulose.

Dans ce travail, la première partie est dédiée à la synthèse bibliographique ensuite les objectifs visés par ce travail (principal et spécifique), après la problématique accompagnée des hypothèses. Le deuxième chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux employés au cours de l'étude. Ensuite le chapitre consacré aux résultats acquis au cours de la thèse. Le rapport se termine par les conclusions et les perspectives envisagées à ce travail.

# 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Afin de bien comprendre l'état d'avancement scientifique de mon projet de recherche, cette partie sera divisée en trois parties :

La première partie présente les champignons filamenteux en donnant leurs définitions, les caractéristiques morphologiques et les conditions de leur croissance. Ensuite nous présentons sur les champignons filamenteux thermophiles, spécifiquement le « *Rhizopus oryzae* » pour la production de lipases ;

La deuxième partie présentera la définition, habitat, mécanisme d'action et les différentes applications industrielles de lipases ;

Pour finir, la troisième et la dernière partie seront consacrées à l'étude générale sur la fermentation en milieu liquide en prenant en compte tous les paramètres nécessaires pour la croissance et la production de lipases dans des bonnes conditions (Température, pH, Agitation) au niveau du laboratoire.

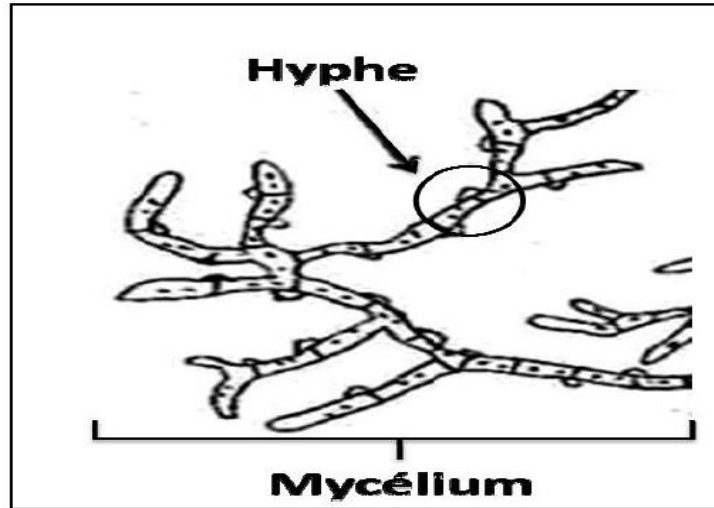
## 1.1 Généralités sur les champignons filamenteux

### 1.1.1 Définition des champignons filamenteux

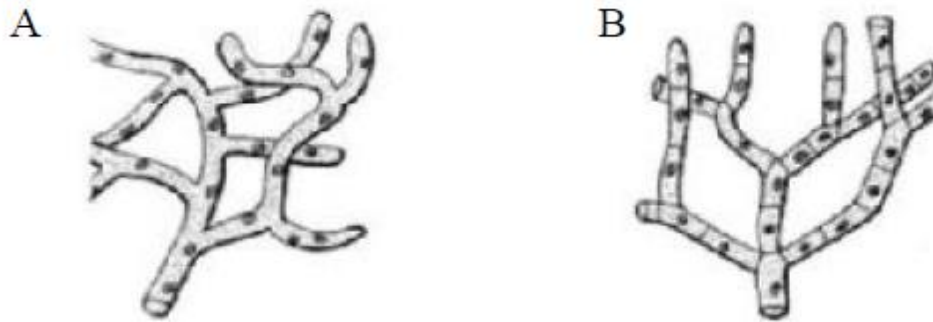
Les champignons filamenteux sont des organismes ubiquitaires omniprésents dans la nature, il s'agit des microorganismes hétérotrophes eucaryotes caractérisés par la présence de mitochondries et de membrane nucléaire (Aggoune wissem 2017).

### 1.1.2 Caractéristiques morphologiques

Les champignons filamenteux sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle composé de filaments ou des hyphes plus ou moins ramifiés de type circulaire ou fins, l'ensemble de ces hyphes constituent une structure mycélium. (Cordova Lopez, 1998; El-okki-, 2017; Surribas et al, 2007) chez « *Rhizopus* » et « *mucor* » le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » cela due leurs cellules qui ne sont pas séparées par une cloison transversale, tandis pour d'autres moisissures par exemple *Aspergillus*, il existe des thalles cloisonnés ou septé. Cependant, ces cloisons dites septé permettent d'assurer la communication entre les cellules par des perforations.



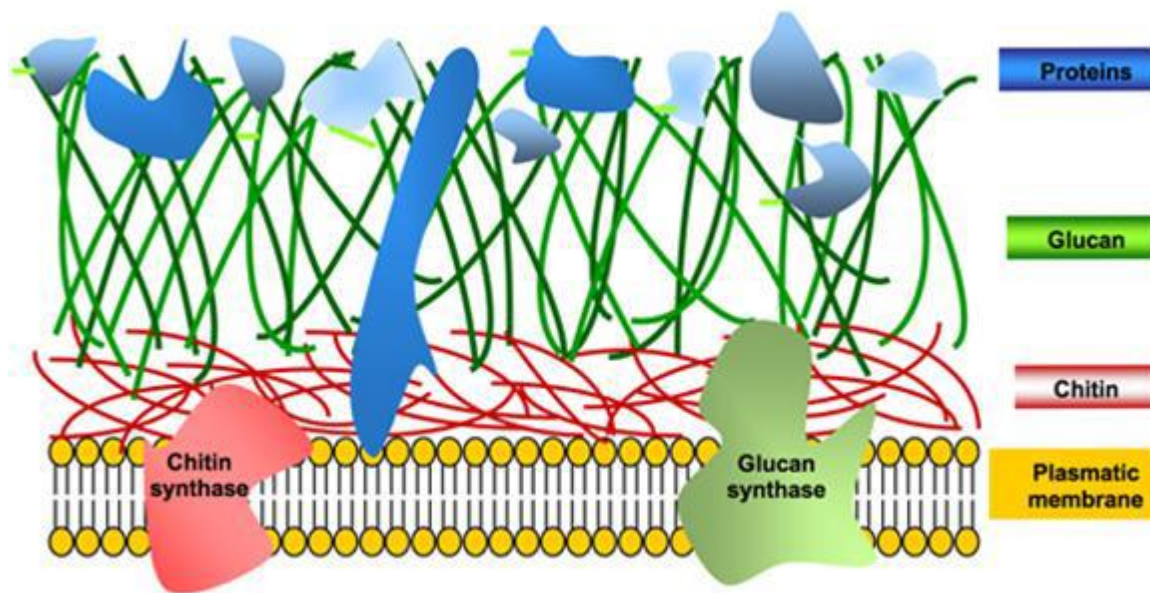
**Figure 1:** Structure d'un mycélium (Ross, 2010)



**Figure 2:** A : hyphe coenocytique), (B : hyphe cloisonne) (Aggoune wissem 2017; Lecellier, 2013).

Les caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux sont liées à leurs à leur substrat nutritif, tel que le carbone organique et l'azote qui sont nécessaires à la stimulation de leur développement (Aggoune wissem 2017). Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de trois éléments : des glycoprotéines, des mannoprotéines et des polysaccharides. Chacun de ces éléments joue un rôle important dans la structure de la paroi fongique (Aggoune wissem 2017; Lecellier, 2013). Les mannoprotéines sont des formateurs de la matrice qui entoure la paroi, ensuite les polysaccharides spécifiquement la chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi et protège les champignons vis-à-vis les agressions du milieu extérieur, et cela par les deux polymères N-acétylglucosamine liés entre eux par une liaison de type  $\beta$ -1,4 et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liés entre eux

par des liaisons  $\beta$ . Tandis pour les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence (Lecellier, 2013).



**Figure 3:** Schéma représentatif de la structure de la paroi fongique (Lecellier, 2013)

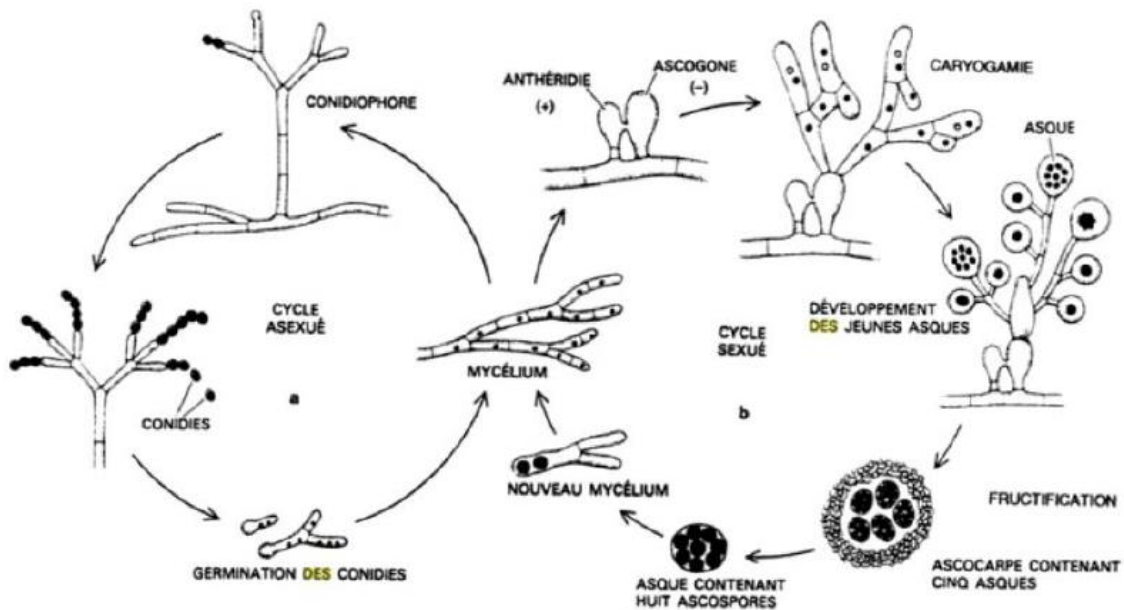
### 1.1.3 ***Croissance des champignons filamenteux***

La croissance des champignons filamenteux se fait en deux phases : la phase végétative, qui est considérée comme étant la phase de croissance, a pour rôle de coloniser le substrat par ramification de type dichotomie (apex) ou par bourgeonnement (latéral) au niveau des hyphes. Cependant, cette phase est consacrée également à la phase de nutrition. Les hyphes absorbent à travers leur paroi fongique de l'eau et les éléments nutritifs tout en dégradant le substrat par une action d'émission d'acide et d'enzymes, ensuite un réseau appelé le mycélium qui constitue une phase de développement active, dont la responsabilité est de dégrader et altérer le substrat (Aggoune wissem 2017; Cordova Lopez, 1998; El-okki, 2017; Lecellier, 2013). La phase reproductive comprend deux types de reproduction :

- La reproduction asexuée est appelée la sporulation et correspond à la forme anamorphe. Durant ce type de reproduction les spores croissent en grande quantité et se développent sur un substrat à partir du mycélium. Leur diamètre varie de 2 à 250  $\mu\text{m}$  (Lecellier, 2013).
- La reproduction sexuée, correspond à la forme téléomorphe. Ce qui implique la rencontre des deux mycéliums de structure positive (+) et négative(-) pour engendrer la



fusion des cytoplasmes en donnant naissance un nouveau mycélium à 2n chromosomes (Lecellier , 2013).



**Figure 4: Cycle** de la reproduction sexuée et asexuée des champignons filamenteux  
( Lecellier, 2013; Meyer, 2004)

#### 1.1.4 Conditions de croissance des champignons filamenteux

Les éléments nutritifs les plus importants éléments nutritifs qui servent à orienter, produire et transformer l'énergie nécessaire pour le processus vital des champignons sont le carbone, l'azote, les ions minéraux comme le phosphore, le fer, le magnésium, calcium ou le potassium, les acides aminés et certaines vitamines. En effet, ces éléments sont omniprésents dans la nature et facilement accessible à ces champignons.

Selon (Cordova Lopez, 1998; El-okki, 2017; Lecellier, 2013), les éléments environnementaux sont : L'activité de l'eau (aW) est un paramètre qui mesure la disponibilité de l'eau nécessaire pour la croissance fongique, la plupart des champignons se développent à une activité comprise entre 0,85 et 0,99. Par exemple la limite inférieure de (aW) pour la croissance de *Penicillium Martens* et *Aspergillus nidulans* est de 0.8, tandis que pour celle d'*Aspergillus candidus* est de 0,75.

pH : les champignons filamenteux peuvent se développer dans des pH compris entre 3 et 8, néanmoins leur pH optimal est compris entre 5 et 6.

Température : chaque microorganisme a une température minimale, maximale et optimale de croissance.

**Tableau 1:** Températures cardinales des différents microorganismes  
(Dix N.J., 1995; El-okki , 2017)

Microorganismes	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophiles	0	15	20
Psychrotolérants	0	25-30	35
Mésophiles	5	25-30	35
Thermotolérants	5	25-30	50
Thermophiles	20	45	>50

#### 1.1.5 **Domaine d'application des champignons filamenteux**

Les microorganismes filamenteux sont impliqués dans différents domaines avec une grande importance spécifiquement industrielle tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi que dans le secteur médical.

#### 1.1.6 **Problèmes liés aux champignons filamenteux**

Bien qu'ils soient importants dans différents domaines, les champignons filamenteux présentent des conséquences néfastes pour certains secteurs.

Dans le secteur agroalimentaire, les champignons sont utilisés pour la production du camembert et le fromage d'une part, d'autre part pour la production de l'alcool de riz et cela durant le processus de fermentation alcoolique. Néanmoins ils peuvent entraîner des perturbations au niveau de la qualité alimentaire, la dégradation dans les différentes caractéristiques des produits alimentaires la saveur, l'odeur et la texture incluant déclin économique de l'industrie agroalimentaire(Kirk O, 2002;Lecellier, 2013).



**Figure 5:** Exemple de quelque contamination par les champignons filamenteux  
(Lecellier, 2013)

### **Dans le secteur médical et pharmaceutique**

Étant donné que les champignons filamenteux sont utilisés pour la production des antibiotiques, leur contamination par voie directe présente une source majeure pour la perturbation de la santé humaine. En effet il existe deux types de contamination « alimentaire » responsable d'une intoxication alimentaire soit aiguë (dépression, anorexie, diarrhée, ictère ou anémie) ou chronique et « affectueuse » responsable à un taux de mortalité élevé. L'infection fongique la plus fréquente est l'aspergillose invasive due à la contamination par *Aspergillus*. Il existe également d'autres champignons filamenteux responsables d'une brûlure ou d'une injection intraveineuse ou sous-cutanée telle *Rhizopus* et *Rhizomucor* (Lecellier, 2013).

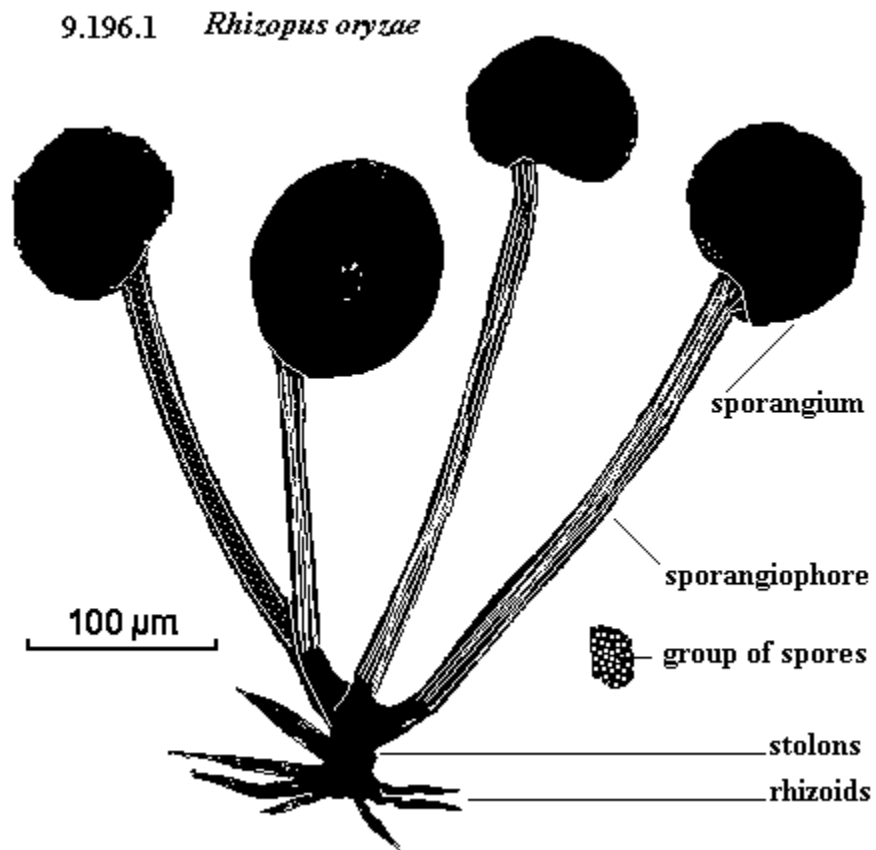
#### **1.2 Moisissure *Rhizopus oryzae***

*Rhizopus oryzae* est un champignon filamenteux à croissance rapide de nature omniprésente, qui se développe sur différents milieux, et qui se trouve largement dans des matières organiques en décomposition y compris dans une grande variété de sols principalement de pays tropicaux chauds et subtropicaux, végétation en décomposition, de fruits, de légumes, de fumier, les composts, et dans les eaux usées. (Domsch KH, 1980; Ghosh B, 2013). En effet, ce microorganisme est connu par sa capacité de produire un large métabolite sous forme des enzymes, molécules de la plateforme durable L - (+) - acide lactique, acide fumarique, éthanol, les polymères « chitosane, chitine », des esters, et bioalcools (Ghosh B, 2011).

### 1.2.1 *Caractéristiques morphologiques du Rhizopus oryzae*

Les caractères morphologiques de *Rhizopus. oryzae* se représentent ainsi :

Selon (Campbell C.K, 1996; Cordova Lopez, 1998; Domsch KH, 1980; El -okki, 2017; Lecellier, 2013), Le *Rhizopus oryzae* comprend un appareil végétatif appelé thalle qu'on nomme coenocytique ou "siphonné" chez ces moisissures vu que les cellules ne sont pas séparées par une septé transversale ou qu'on dit parfois cloison transversale et qui a pour rôle d'assurer la communication entre les cellules. Des hyphes aériennes plus ou moins ramifiées et fines avec un diamètre venant entre 2 et 15  $\mu\text{m}$ , qui comprennent un mycélium avec rhizoïdes, stolon, et des spores. Les rhizoïdes sont des structures rassemblent à des racines (figure 6) de taille moyenne qui se forment des sporangiophores ou des sporocystophores et qui ont pour rôle de fixer le mycélium à la base (substrat). Les sporangiophores sont des spores avec une forme gonflement ellipsoïdal produit par un sporange et qui peuvent être, soit seul, ou de 2 à 5 groupes avec un diamètre qui varie entre 6 à 14  $\mu\text{m}$  et une hauteur de 150 à 2000  $\mu\text{m}$ .

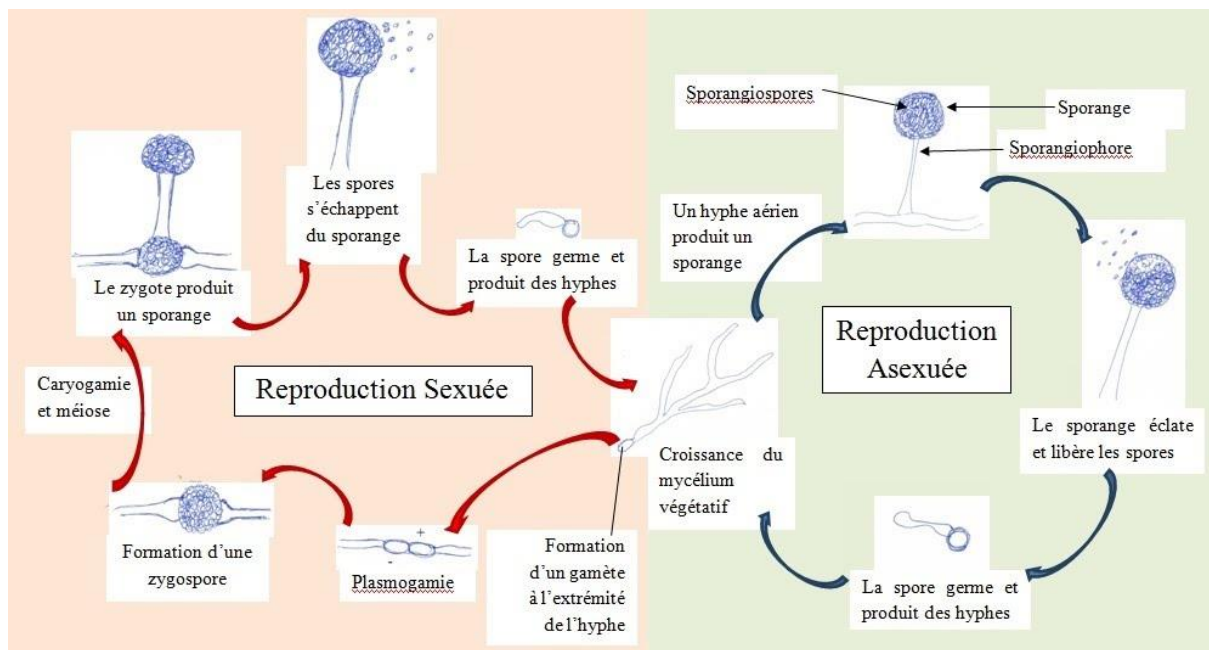


**Figure 6:** Structure visible de *R. oryzae*

([https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Overview\\_of\\_Rhizopus\\_oryzae](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Overview_of_Rhizopus_oryzae), consulté le 09/10/2018)

### 1.2.2 La reproduction chez *Rhizopus oryzae*

Le *Rhizopus oryzae* se reproduit à la fois par deux différentes méthodes asexuées et sexuées. (Ghosh B., 2011) Dans un environnement riche en nutriments, les sporanges produisent les spores asexués et lors de la maturation sont libérés. C'est la méthode de reproduction la plus couramment utilisée par l'espèce. Tandis que la reproduction sexuée, qui est assez rare, elle se fait dans un milieu d'origine mycologique, et se produit lors de l'accouplement entre deux noyaux de type sexué (positive et négative) à l'intérieur de cellules « zygospores » (Cordova Lopez, 1998; El-okki, 2017; Lecellier, 2013).



**Figure 7:** Le cycle biologique d'un zygomycète

(<https://sites.google.com/site/microbiologieaz/classification-embranchements/zygomycetes>, consulter le 09/10/2018)

### 1.2.3 Conditions de développement de *Rhizopus oryzae*

*Rhizopus oryzae* champignon filamenteux qui nécessite un écosystème pour survivre, peut se développer et cela dépend de certaines conditions favorables:

**Tableau 2:** Conditions de développement de *Rhizopus oryzae*

Éléments nutritifs (carbone et l'Azote)	production d'énergie nécessaire à leurs processus vitaux (El-okki, 2017)
pH	Développement dans une large gamme de pH : compris entre 3 et 8.
Température	température optimale compris entre 25 et 45 °C (Ghosh B, 2011) étant donné que le <i>R.oryzae</i> est un champignon thermophile.

Le *Rhizopus oryzae* des autres espèces de *Rhizopus* et cela d'une part par ses grands sporangiospores et d'une part ses incapacités à se développer à plus de 45 °C. (Ghosh B, 2011).

#### 1.2.4 **Les applications industrielles de *R.oryzae***

Les souches de *R.oryzae* sont utilisées dans plusieurs applications alimentaire, pharmaceutique, textile, cosmétique, pas seulement ça, mais il existe d'autres champs d'applications qui ont une grande importance industrielle ,l'industrie des détergents, papetière, ainsi que les tanneries (El-okki, 2017; Ghosh B, 2011).

#### 1.2.5 **La production d'enzymes**

Durant sa fermentation, le *R. oryzae* produit plusieurs types d'enzyme extracellulaire et intracellulaire à savoir (cellulase, xylanase, pectinases, tannase, phytase, amylase, lipase et protéase). Selon Ghosh B. (2011). Le comité mixte d'experts FAO / OMS sur les additifs alimentaires (JEFCA) et Food and Drug Administration, Département des services de santé et humains, États - unis ont certifiés que les enzymes produites par *Rhizopus oryzae* comme étant des additifs alimentaires pour la consommation humaine (Ghosh B, 2011).

Les enzymes produits par diverses souches de *Rhizopus oryzae*, ainsi que leurs applications industrielles sont décrit ci-dessous:

**Tableau 3:** Les enzymes produites par *Rhizopus oryzae* et leurs champs d'application.

<b>Enzymes</b>	<b>Applications</b>	<b>Références</b>
Cellulase	Aliment, vin, aliments pour animaux, pharmacie, textiles, lessive pâtes à papier et l'agriculture	(Durand G, 1982; El -okki, 2017)
Lipases	Industrie des détergents, Industrie fromagère, Pharmacie, médical, et la chimie fine	(Durand G, 1982) (Ghosh B, 2013)
Pectinases	Clarification des jus de fruits, extraction des huiles fermentation du café et du thé	(Ghosh B, 2013)
Protéase	Tannerie, Aide digestif, les aliments, Pharmacie, les détergents, le cuir	(Ghosh B, 2011)
$\alpha$ -Amylase	Boulangerie industrielle, Brasserie, textile, Pharmacie	(Freitas A., 2014 ) (Ghosh B, 2011) (G.F, 1999)
Glucoamylase	Boissons sucrées, Sirops de sucre, les produits pharmaceutiques, textiles, le cuir, les détergents	(Ghosh B, 2013)

### 1.3 Lipases

#### 1.3.1 *Définition et habitat des lipases*

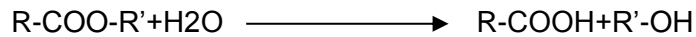
Les lipases sont des enzymes lipolytiques extracellulaires qui peuvent agir d'une part comme hydrolases en milieu aqueux et d'autre part comme des catalyseurs dans un milieu organique sur des échelles de temps plus rapides et plus efficaces. (Aggoune wissem 2017; al, 2008; Cordova Lopez, 1998) Ces enzymes ont une capacité qui permet d'aider les réactions chimiques à se produire plus facilement.

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 utilisé dans de nombreuses applications d'importance industrielles.(Cordova Lopez, 1998).

### 1.3.2 Réaction des lipases

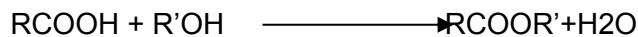
Du point de vue industriel les lipases sont des biocatalyseurs en fonction de leur environnement qui peuvent catalyser un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification (réaction entre un acide et un alcool). (Aggoune wissem 2017; Alloue, 2008; Cordova Lopez, 1998; Rihani, 2012).

**Réactions d'hydrolyse** : la conversion des acides gras en alcool et en glycérol par l'hydrolyse des triglycérides (Aggoune wissem 2017; Rihani, 2012).



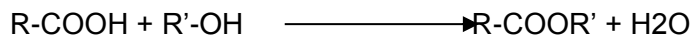
**Synthèse** :

**Réaction d'ester** :

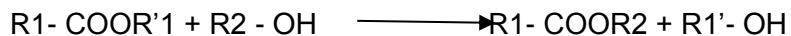


**Réaction de transestérification**: implique que le groupe acyle d'un triglycéride réagit avec le glycérol ou par l'interestérification (Aggoune wissem 2017; Rihani, 2012).

**Réaction d'interestérification**: Le groupe acyle d'un triglycéride est transformé à un acide gras ou un ester d'un acide gras. (Aggoune wissem 2017; Alloue, 2008; Rihani, 2012).



**Réaction alcoolise** : production d'ester avec différent niveau alkyle par la réaction d'ester et alcool polyvalent tels que la glycérine ou un alcool monovalent tels que l'éthanol (Aggoune wissem 2017; Alloue, 2008; Gunstone, 1999).



**Réaction acidolyse** : transformation en acides gras par la réaction d'un ester avec un acide (Aggoune wissem 2017; Gunstone, 1999).



### 1.3.3 Familles des lipases

Selon (Aggoune wissem 2017; al, 2008; Gilhan, 2005; Jeager, 1999; Rihani, 2012; Wilfried, 2011), Il existe de nombreuses lipases qui diffèrent par leur origine végétale, microbienne et mammifère.



### **1. Les lipases végétales :**

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes :

- a) Acylhydrolases qui est présente dans les tissus de plants ;
- b) les phospholipases C et D.

### **2. Les lipases de mammifères :**

Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois grands groupes :

- Les lipases associées à la digestion, les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique.
- Lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les reins, la langue, le foie.
- Lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel.

### **3. Les lipases microbiennes :**

Les lipases microbiennes sont produites par les champignons filamenteux, les bactéries, les levures.

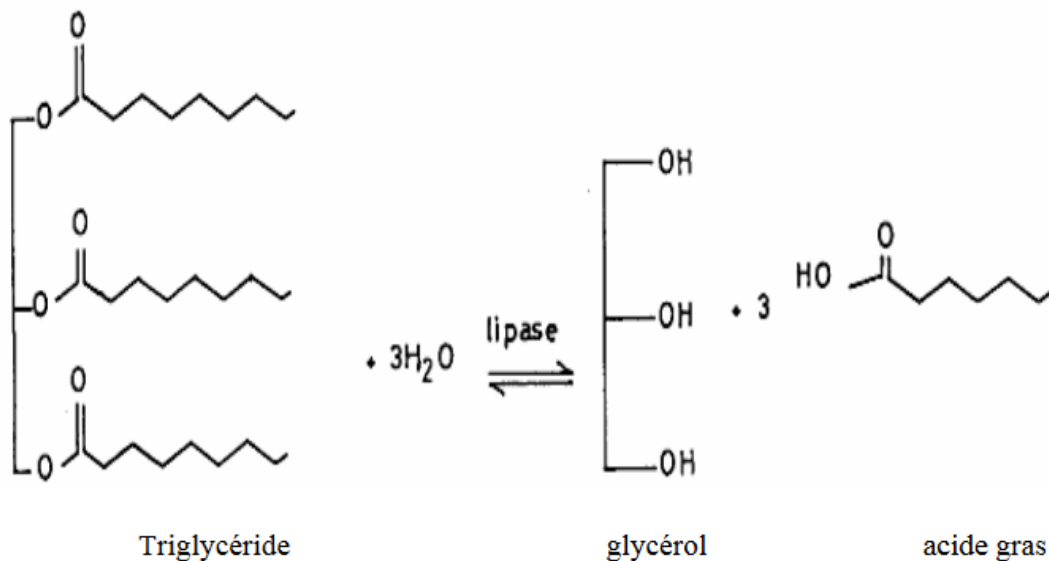
- Les lipases sont produites chez les bactéries à Gram (+) Bacillus et Gram (-) Pseudomonas.
- les lipases sont produites chez les champignons filamenteux tels que Rhizopus.

#### **1.3.4 Propriétés des lipases**

Le nombre des lipases a augmenté au début des années 1980 (Aggoune wissem 2017). Ces enzymes occupent une grande partie dans le marché d'enzymes et cela est due à des spécifiques propriétés leurs faibles couts de production, leurs utilisations d'une large gamme de pH et de température, grande spécificité, efficacité, dépendance, la nature non toxique, stabilité, actif dans des solvants organiques et leurs biodégradabilités (Herrington, 1954).

#### **1.3.5 Mécanisme d'action**

Selon (Aggoune wissem 2017; Cordova Lopez, 1998), les lipases sont des hydrolases qui appartiennent à la classe de la sérine, pour la génération de leur activité , la présence d'aucun cofacteur n'est pas exigée. Le triacylglycérols est de très faible solubilité dans l'eau. Sous certaines conditions, les lipases catalysent des liaisons ester des triglycérides monoglycérides, d'une part, d'autre part et en absence d'eau. Ces lipases sont capables d'inverser la réaction à partir de gras acides et glycérol.



**Figure 8:** Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride  
(Rihani, 2012)

### 1.3.6 **Méthodes d'analyse des lipases**

Les principales méthodes utilisées pour la mesurer quantitatives des lipases sont :

- Spectrophotométrie : la mesure spectrophotométrique des lipases est basée sur l'hydrolyse du palmitate de p-nitrophényle (p-NPP) qui donne comme produit de la réaction le p-nitrophénol, dont la coloration jaune (en milieu alcalin) est lue à 410 nm, l'hydrolyse de la tributyrine, dans une émulsion, provoque une clarification du milieu qui est lu à 450 nm, et l'hydrolyse de la tributyrine provoque un changement de couleur du rouge de phénol utilisé comme un indicateur de pH, les données quantitatives sont obtenues avec la mesure de la diminution d'I' absorbance à 557 nm (Cordova Lopez, 1998).
- Titrimétrie : la mesure titrimétrique des lipases est basée sur la méthode du pH-stats (Cordova Lopez, 1998).

### 1.3.7 **Applications industrielles**

#### **En tant qu'hydrolases :**

- l'industrie alimentaire : la maturation des charcuteries telle que les saucissons, la maturation des fromages boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie, et la fabrication de produits laitiers(Herrington, 1954).
- L'industrie des détergents : la lipase est l'ingrédient le plus important, ils ont comme rôle fragmentation en petites particules les taches de graisse qui sont difficiles à enlever tels que par exemple les huiles et des produits de beauté (Cordova Lopez, 1998; Herrington, 1954).
- Tannerie : l'obtention de peaux plus souples par la présence de lipase qui a pour rôle de diminuer le détergent à utiliser dans les bains de lavage, et d'éliminer les graisses (Cordova Lopez, 1998; Herrington, 1954).

**En tant que catalyseur :** L'industrie des cosmétiques et de la parfumerie : les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arôme du produit cosmétique et de la parfumerie et cela soit par estérification ou bien par la réaction de transestérification (Herrington, 1954).

L'industrie pharmaceutique : les lipases sont largement utilisées pour la synthèse des médicaments par exemple les anti-inflammatoires non stéroïdiens, de certains antibiotiques ou vitamines (Herrington, 1954).

## 1.4 **Fermentations en milieu liquide ou submergé**

La fermentation est un processus de production considéré très important à l'échelle industrielle en raison de son coût économique et ses bénéfices pour l'environnement. La technologie de fermentation a largement évolué, ceci a permis de bien optimiser la productivité et d'augmenter la rentabilité. En effet, il existe deux grands types de fermentation : la fermentation submergée (SMF) et la fermentation à l'état solide (SSF) (Ravichandran, 2012) ,appliquées dans plusieurs secteurs (Ravichandran & R, 2012).

### 1.4.1 **Définition**

La fermentation à l'état liquide est un bioprocédé technologique établie depuis longtemps par rapport à la fermentation à l'état solide incluant la production les conditions de vie naturelles des

microorganismes dans un liquide tel que le bouillon liquide nutritif, alcool ou huile d'une part, d'autre part la production des enzymes industrielles. Dans le processus submergé les microorganismes libèrent les enzymes recherchées lors de la décomposition des nutriments (carbone et l'azote) par les microorganismes de fabrication de biomolécules dans laquelle des enzymes et d'autres composés réactifs sont immergés dans un liquide tel que l'alcool, l'huile ou un bouillon nutritif (Cordova Lopez, 1998; Ravichandran, 2012).

#### 1.4.2 **Avantages et inconvénients de la fermentation à l'état liquide (FML) :**

Selon (Cordova Lopez, 1998; Prevot, 2013b), pour chaque procédé il existe des points forts et des points faibles à savoir :

##### **Avantages de la FML :**

- Équipements industriels disponibles ;
- Milieu de culture homogène (souche, nutriments, métabolites) ;
- Cultures pures ;
- Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement ;
- Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures) ;
- Contrôle et régulation aisés des paramètres environnementaux de la culture (pH, humidité, concentration en nutriments) ;
- Capteurs *on line* disponibles du procédé de la culture ;
- une productivité et un rendement élevés ;
- de main-d'œuvre, plus faible
- risque moindre de contamination.

##### **Inconvénients de la FML :**

- Volume important d'eaux résiduelles à traiter;
- Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures);
- Consommation d'eau et d'énergie (stérilisation, agitation, aération) importante;
- Matière première coûteuse.

### 1.4.3 Comparaison des technologies de fermentations en milieu liquide et de fermentation en milieu solide

Tableau 4: les points forts et faibles de deux types de fermentations liquide et solide

(Prevot, 2013b)

Fermentation en milieu solide	Fermentation en milieu liquide
Besoin d'équipement à l'échelle industrielle	Équipements industriels disponibles
Milieu de culture hétérogène	Milieu de culture homogène
Matière première abondante	Matière première coûteuse
Quantité d'eau limitante	Quantité d'eau non limitante
Quantité d'air non limitant	Quantité d'air limitant
Volume faible d'eaux résiduaires à traiter	Volume important d'eaux résiduaires à traiter
Risque de contamination limité	Risque de contamination élevé
Favorable aux organismes pluricellulaires (champignon filamenteux et champignon supérieur)	Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures)
Produit fermenté	Produit très dilué

### 1.4.4 Les microorganismes

Selon Cordova Lopez (1998), les organismes unicellulaires tels que les levures et les bactéries sont les mieux adaptées à la FML en raison de leur capacité à coloniser les substrats liquides. L'utilisation de *Rhizopus oryzae* dans un milieu de culture liquide est un défi important à prendre dans les expériences.

### 1.4.5 Substrats

Les substrats sont les paramètres les plus importants en fermentation liquide pour le développement des microorganismes et de production des enzymes industrielles. Choix des substrats, se fait soigneusement et cela en fonction des facteurs comme leur disponibilité, coût, compositions, capacité à contenir les nutriments (carbone, azote, sels minéraux) nécessaires à la croissance. Leur capacité à retenir l'eau et de même leur productivité. Dans le processus immergé, les substrats utilisés pour la fermentation sont toujours à l'état liquide, les plus utilisées sont les sucres solubles, la mélasse, les milieux liquides, les jus de fruits et de légumes

et eaux usés (Ravichandran & R, 2012). L'utilisation des déchets de natures linocellulosique comme substrats pourrait contribuer à l'accumulation des enzymes recherchée (lipases).

#### 1.4.6 **Les facteurs environnementaux et les paramètres de culture**

Le développement des champignons et la production des enzymes souhaités sur des matériaux liquides dépendent de plusieurs paramètres à savoir:

**Tableau 5:** les facteurs environnementaux nécessaires pour la croissance du champignon et la production des enzymes dans une fermentation submergée

(Prevot, 2013b)

<b>Facteurs environnementaux</b>	<b>Activité en FML</b>
Températures du milieu	Contrôle aisé Température homogène
pH	Contrôle aisé Régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques
Taux d'aération	Nécessaire et compliquée
Vitesse d'agitation	homogène du milieu
L'activité de l'eau	Nécessaire et non limitants dans le milieu de culture.

#### 1.4.7 **Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des FML**

**Au laboratoire :**

Au niveau du laboratoire, on utilise pour la fermentation submergée une méthode simple qui consiste à inoculer le substrat dans un dispositif avec agitation (Cordova Lopez, 1998).

## **2 OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE**

### **2.1 Objectifs**

#### **2.1.1 Objectif principal**

L'objectif principal de cette étude est la biovalorisation des résidus de culture ligneuse pour la production améliorée de lipases en utilisant « *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 ».

### 2.1.2 **Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

- Détermination et choix de la biomasse lignocellulosique la plus riche en sucre ;
- Production des lipases par la fermentation liquide en utilisant la biomasse la plus riche en sucre ;
- Amélioration de la production de lipases en fermentation liquide par l'utilisation des différents inducteurs et
- Optimisation de la concentration du meilleur inducteur.

## 2.2 **Hypothèses de recherche**

Nous proposerons dans cette étude deux hypothèses de recherche qui sont compatibles et complémentaires:

### 1) Hypothèse

L'utilisation des déchets de culture ligneuse comme milieu de croissance à l'aide du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 dans un milieu de fermentation liquide permettrait la production des lipases;

### 2) Hypothèse

L'ajout des inducteurs (Tween 80, huile d'olive, huile de tournesol et glycérol) dans le milieu de culture sélectionnée permettrait d'améliorer la production de lipases.

## 2.3 **Problématique de recherche**

### 2.3.1 **Problématique de la biomasse lignocellulosique**

La biomasse lignocellulosique est l'une des ressources renouvelables les plus abondantes sur le globe terrestre, parmi cette biomasse, se trouve le panic érigé, une espèce végétale avec de grandes performances agronomiques, une culture dont la productivité et l'adaptabilité suscitent un grand intérêt pour valoriser tout type de sol (Huguette Martel, 2018), lors de la récolte, la biomasse laisse un résidu tout en conservant une couverture végétale permanente à la surface qui permet de réduire les pertes annuelles de la matière organique du sol. Cependant, la culture

permet également à améliorer la qualité de l'eau en filtrant les sédiments et en captant les éléments fertilisants elle est cultivée en bandes riveraines.

### 2.3.2 **Problématique du coût élevé de production de lipases**

La production de lipases reste toujours très coûteuse en raison du coût élevé de la matière première, qui présente (40% à 60%) du coût de production (Gassara, 2012). Pour cela les déchets lignocellulosiques ont été choisis comme matière première pour la production d'enzymes en raison de leur présence en très grande quantité, leur haute biodégradabilité et leur richesse en source de carbone (Gassara, 2012).

## 2.4 **Démarche expérimentale**

La démarche expérimentale se présente comme suit :

- La première partie consiste à choisir la culture lignocellulosique la plus riche en sucre comme milieu de croissance et de production des lipases;
- La deuxième partie porte sur l'utilisation des résidus lignocellulosiques à l'aide de la fermentation à l'état liquide d'une part, d'autre part l'utilisation des différents inducteurs pour améliorer la production durant le processus et
- la troisième partie, l'optimisation de la production en utilisant différentes concentrations du meilleur inducteur dans le but d'avoir une production élevée des lipases.

## 3 **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### 3.1 **Détermination et choix de la biomasse lignocellulosique la plus riche en sucre**

Le procédé de production de lipases débute par un prétraitement du matériel lignocellulosique (miscanthus, panic érigé, luzerne, bois dur et fibre du chanvre). Ces substrats ont été broyés avec un broyeur à café, ensuite tamisés avec un tamis séparateur de 0,8 mm pour finalement n'obtenir que des particules fines faciles à hydrolyser.



### 3.1.1 **Conversion de la biomasse en sucres fermentescibles**

Un processus d'hydrolyse est utilisé pour rompre les polymères cellulosiques en monomères, tout en évitant des conditions trop sévères susceptibles d'entraîner la dégradation des sucres. Deux types d'hydrolyse ont été utilisés : hydrolyse chimique et hydrolyse biochimique.

#### **a) Hydrolyse chimique**

Dans cette technique, une concentration de 1% d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) exprimée par rapport à la matière sèche présente (luzerne, bois dure, miscanthus, fibre de chanvre, panic érigé) dans une fiole de 125 ml ensuite stérilisés à une température de  $121^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ . Après l'hydrolyse d'une durée de 20 minutes, des échantillons de 1,5 ml ont été prélevés dans des tubes Eppendorf®.

#### **b) Hydrolyse biochimique**

L'enzyme cellulase a été utilisée pour l'hydrolyse enzymatique. La production des enzymes a été faite par la souche *Trichoderma reesei* (NRRC-207F) (Mohamed Amine Laadila a, 2017), il s'agit de l'espèce la plus utilisée pour la production de la cellulase. La partie culot de l'hydrolyse acide a été prélevée après lavage avec l'eau distillée et séchage, ensuite 0.19 µl de cellulases et 0.8 µl solution tampon citrate pH = 4,8 ont été ajoutés.

#### **c) Hydrolyse chimique/ biochimique**

Dans le traitement combiné, 1 ml du surnageant de l'hydrolyse acide ont été ajoutées à des tubes Eppendorf® de 1,5 ml. Après centrifugations à 9660 rotations par minutes durant cinq minutes. Ensuite 0,19 µl de cellulases et 0,8 µl solution tampon citrate pH = 4,8 ont été ajoutés

#### **d) Traitement avec l'eau distillée (contrôle)**

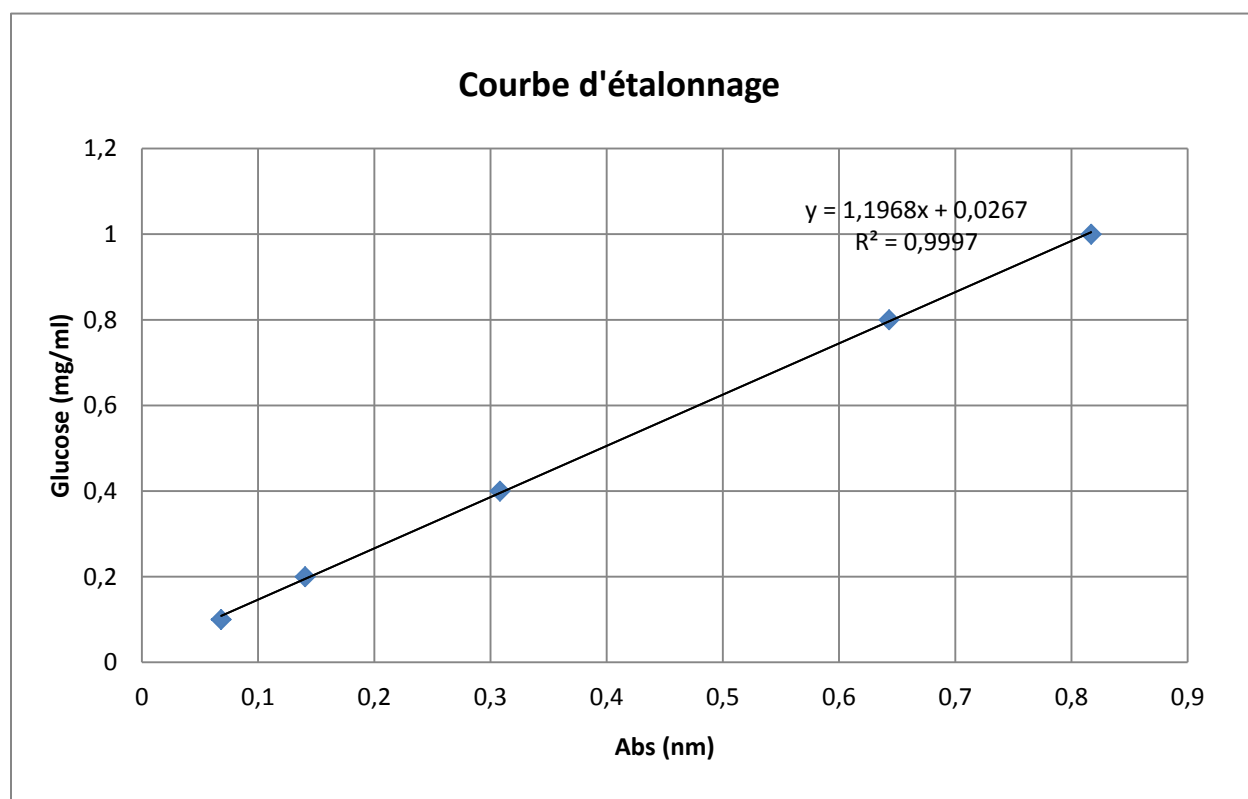
Nous avons utilisé dans cette technique une concentration de 1% d'eau distillée exprimée par rapport à la matière sèche dans des fioles de 125 ml ensuite stérilisés à une température de  $121^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$  pour une durée d'hydrolyse de 20 minutes. Ensuite, des échantillons ont été prélevés dans des tubes Eppendorf® de 1,5 ml. Pour finir, les expériences ont été réalisées en duplicatas.

### 3.1.2 **Détermination de la quantité de sucres réducteurs**

La concentration en sucres réducteurs a été estimée avec la méthode de l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Une fois la durée de l'hydrolyse écoulée, 0,5 ml de chaque échantillon ont été

prélève dans un tube Eppendorf® et cela en prenant bien la précaution de n'extraire que la partie surnageant. Ensuite nous avons ajouté 1,5 ml de réactif DNS, homogénéisé au vortex et chauffé à 100°C pendant 5 minutes dans un bain-marie. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, 4 ml d'eau déminéralisée ont été ajoutés avant la lecture de l'absorbance à 540 nm à l'aide un spectrophotomètre (Cordova Lopez, 1998; Mohamed Amine Laadila, 2017; Sauvageon, 2012).

Les résultats obtenus du spectrophotomètre sont sous forme d'absorbance. Pour traduire ces valeurs en concentration de sucres réducteurs (exprimée en mg/ml). Une courbe d'étalonnage à l'aide d'une solution de glucose a été dressée. La linéarité de la courbe est bonne si le coefficient de détermination  $R^2$  est de 0,99 (Cordova Lopez, 1998; Prevot, 2013b; Sauvageon, 2012).



**Figure 9:** Courbe d'étalonnage pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs.

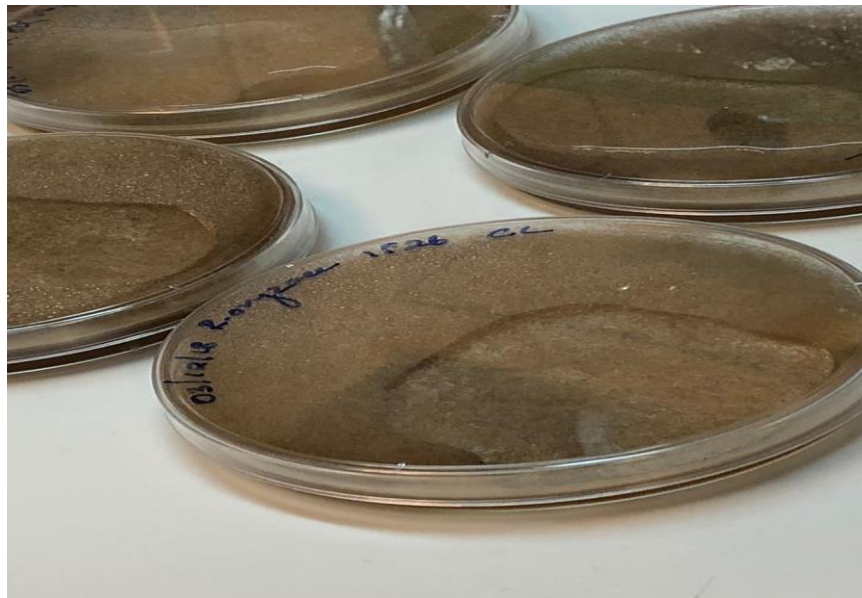
## 3.2 Production des lipases par la fermentation liquide en utilisant la biomasse la plus riche en sucre

### 3.2.1 Milieu et conditions de culture

*R. oryzae* NRRL 1526 a été obtenu à partir de la collection de culture ARS. La suspension de spores pour l'inoculation a été obtenue en cultivant les champignons sur des plaques de PDA incubées à  $30 \pm 1$  °C pendant 96 heures. Les spores ont été récupérées en lavant les plaques de PDA avec de l'eau distillée stérilisée et en filtrant la suspension sur du coton stérile pour éliminer le mycélium fongique, puis stockées à 4 °C. La concentration de la solution mère de spores a été maintenue à  $1 \times 10^7$  spores par ml.

### 3.2.2 Croissance et conditions des spores

La croissance a été effectuée en inoculant  $1 \times 10^7$  spores par ml dans des boîtes pétries contenant du PDA et incubées à  $30 \pm 1$  °C pendant 96 heures. Les spores ont été récupérées en lavant les plaques de PDA (pomme de terre-dextrose-gélose) avec de l'eau distillée stérilisée et en filtrant la suspension sur du coton stérile pour éliminer le mycélium fongique, la concentration de la solution mère de spores a été maintenue à  $1 \times 10^6$  spores par ml.



**Figure 10:** Milieu de la culture du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

### 3.2.3 **Fermentation en milieu submergé**

La culture principale en milieu submergé a été réalisée dans un Erlenmeyer de 800 ml à col large contenant 20 g de substrat sélectionné avec une concentration de 1% d'acide sulfurique pour un volume final de 600 ml. Avant et après le traitement thermique à 121°C ±1 °C pendant 20 minutes, un ajustement du pH 5.0 a été effectué pour un bon développement des spores durant la fermentation. Ensuite 30 ml du milieu ont été inoculés dans des fioles de 125 ml avec un taux de 5% de 10<sup>6</sup> spores par ml et mis dans une table d'agitation thermostatée pendant 7 jours à 30 ± 1 °C et 150 rpm. La prise des échantillons ont ensuite été effectuée chaque 24 heures et puis une centrifugation à 12000 rpm (Tr /min) pendant 5 min avant la lecture de l'absorbance à 410 nm à l'aide du spectrophotomètre pour la mesure de l'activité des lipases.

### 3.3 **Amélioration de la production des lipases en fermentation liquide par l'utilisation des différents inducteurs**

Afin de chercher une amélioration de la production de lipases en fermentation à l'état liquide, l'influence de cinq inducteurs sur *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 a été étudiée. Les inducteurs ont été choisis parmi ceux qui ont montré l'effet le plus marqué sur l'augmentation de la production de l'enzyme, ces principaux inducteurs sont Tween 80, huile d'olive, huile de tournesol et de glycérol. Pour réaliser cette expérience, 1% des différents inducteurs ont été ajoutés séparément dans des fioles de 125 ml avec un taux de 5% de 10<sup>6</sup> spores par ml les conditions de culture ont été fixées comme il a été décrit précédemment dans la fermentation à l'état liquide sans inducteurs.

### 3.4 **Optimisation de la concentration du meilleur inducteur**

L'optimisation de la production des lipases par fermentation était réalisée à l'aide d'un plan factoriel « Factoriel Design », comportant 9 essais (1 à 9). Les variables étudiées étaient la concentration du meilleur inducteur et d'inoculum (2,5% (v/v) à 10%% (v/v), le plan factoriel est un outil d'aide à la décision qui permet d'obtenir le maximum d'informations sur l'effet de chaque facteur et l'effet d'interaction des facteurs sur la réponse. Ainsi, pour « k » facteurs, il est possible de construire une matrice d'expérience de 2<sup>k</sup> valeurs possibles permettant de planifier les différents essais expérimentaux à réaliser. Le concept factoriel permet d'étudier les effets que plusieurs facteurs peuvent avoir sur le processus. Lors de la réalisation d'une expérience, faire varier les niveaux des facteurs simultanément plutôt que l'un après l'autre est

efficace en termes de temps et de coût. Sans l'utilisation d'expériences factorielles, des interactions importantes peuvent ne pas être détectées (Minitab's). L'activité de lipases (U/g) a été utilisée comme réponse dans toutes les conceptions factorielles (Colla *et al*, 2016).

**Tableau 6:** Différente concentration de glycérol et d'inoculum.

Traitements	Entrée		Réponse
	Meilleur inducteur(?) % (v/v)	Inoculum % (v/v)	Activité des lipases (U/g)
1	2.5	2.5	?
2	2.5	5	?
3	2.5	15	?
4	5	2.5	?
5	5	5	?
6	5	15	?
7	10	2.5	?
8	10	5	?
9	10	15	?

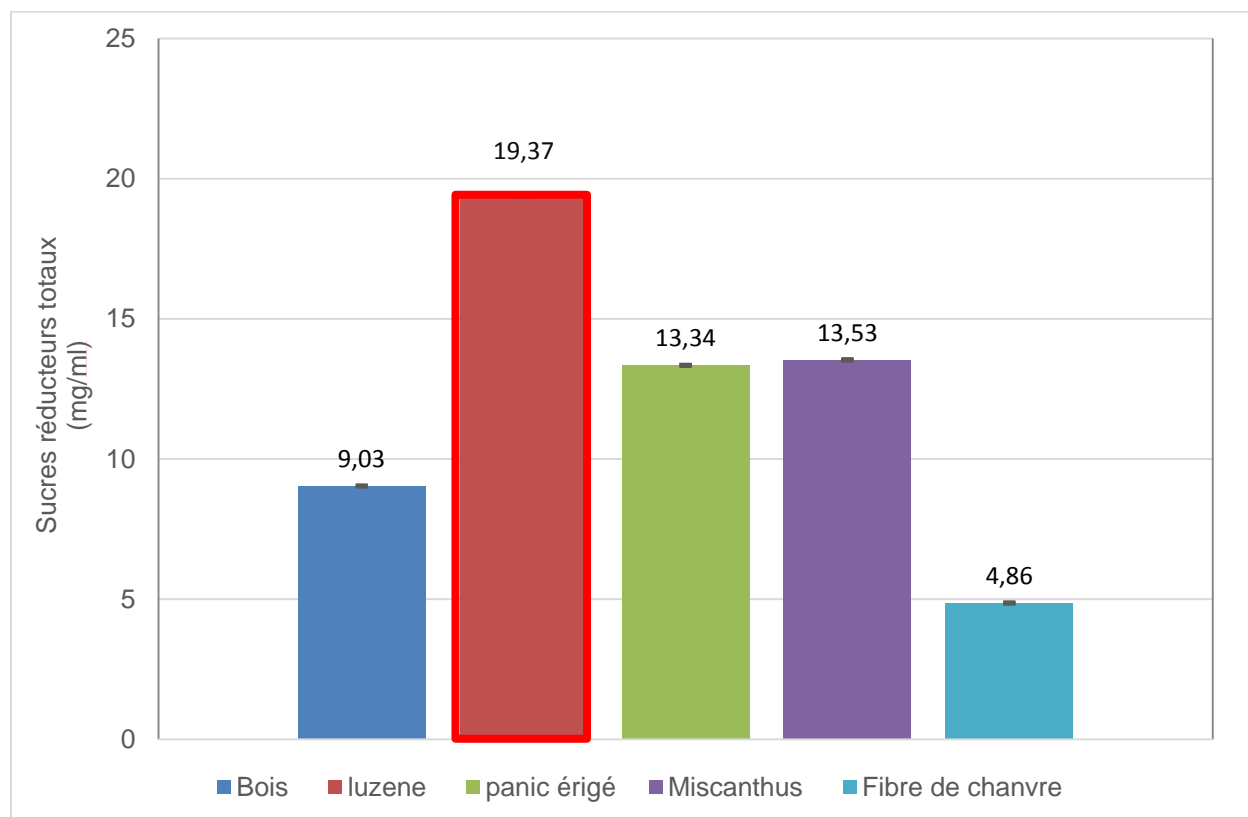
## 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre résume les principaux résultats obtenus lors cette étude composée de trois chapitres. Le premier présente une comparaison entre les différents résidus de nature ligneuse afin d'identifier le meilleur substrat organique. Le deuxième chapitre présente le meilleur inducteur pour l'amélioration de la production de lipases. Le troisième chapitre présente les meilleures conditions requises pour l'optimisation du processus de production des lipases.

### 4.1 *Choix de substrat*

Les quantités des sucres réducteurs obtenus dans chacun des cas sont exprimées dans les graphes suivant :

#### 4.1.1 *Hydrolyse chimique*



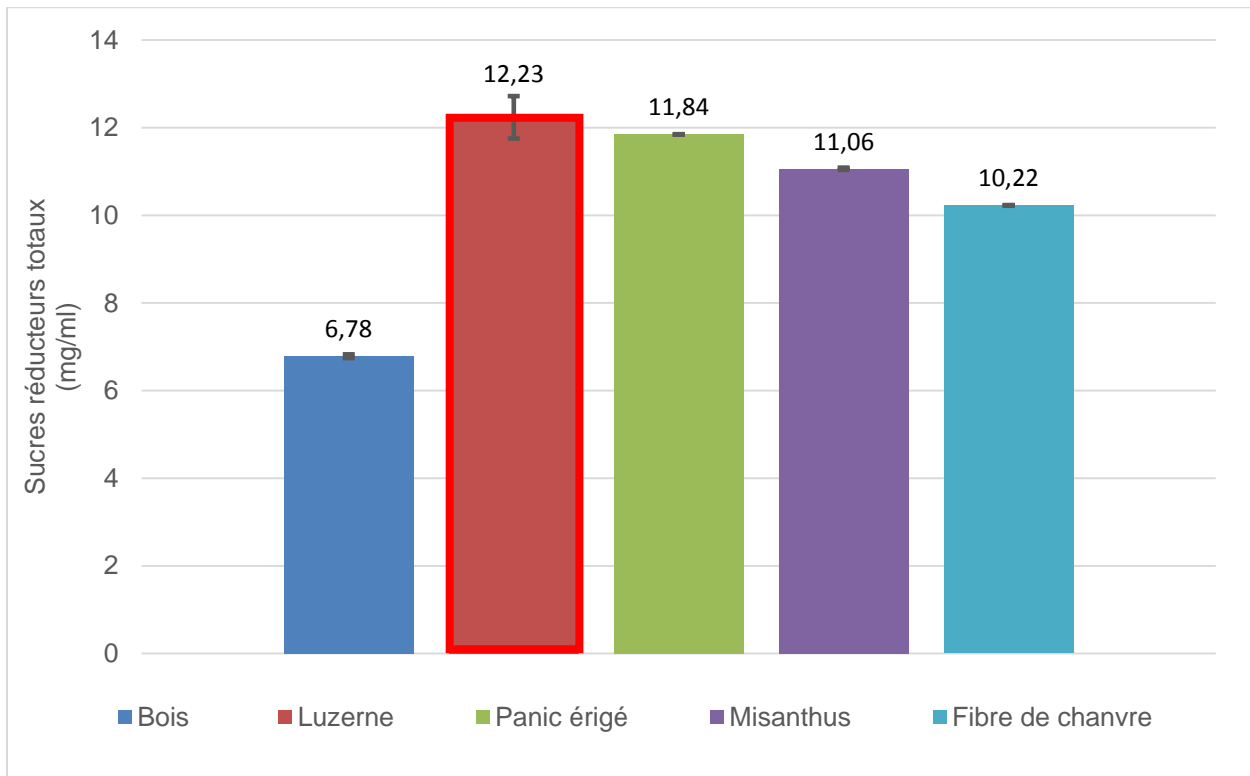
**Figure 11:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse acide (en mg/ml).

**Tableau 7:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse acide (en mg/ml).

Substrats	[TRS] mg/ml
Bois	9,03
luzerne	19,37
Panic érigé	13,34
Miscanthus	13,53
Fibre de chanvre	4,86

La figure 11 présente la quantité (mg/ml) de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse acide. La concentration de sucre (19,37 mg/ml) la plus importante a été enregistrée avec la luzerne les quantités de sucres enregistrées suite à l'hydrolyse acide du panic érigé et du miscanthus sont plus aux moins similaires (13,3 mg/ml versus 13.5 mg/ml). Les concentrations les plus faibles ont été enregistrées avec le bois (9,04 mg/ml) et la fibre de chanvre (4,86 mg/ml). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'hydrolyse chimique a pu rapidement libérer les sucres fermentescibles, tout en détruisant les chaînes de cellulose (Sauvageon, 2012).

#### 4.1.2 Hydrolyse biochimique



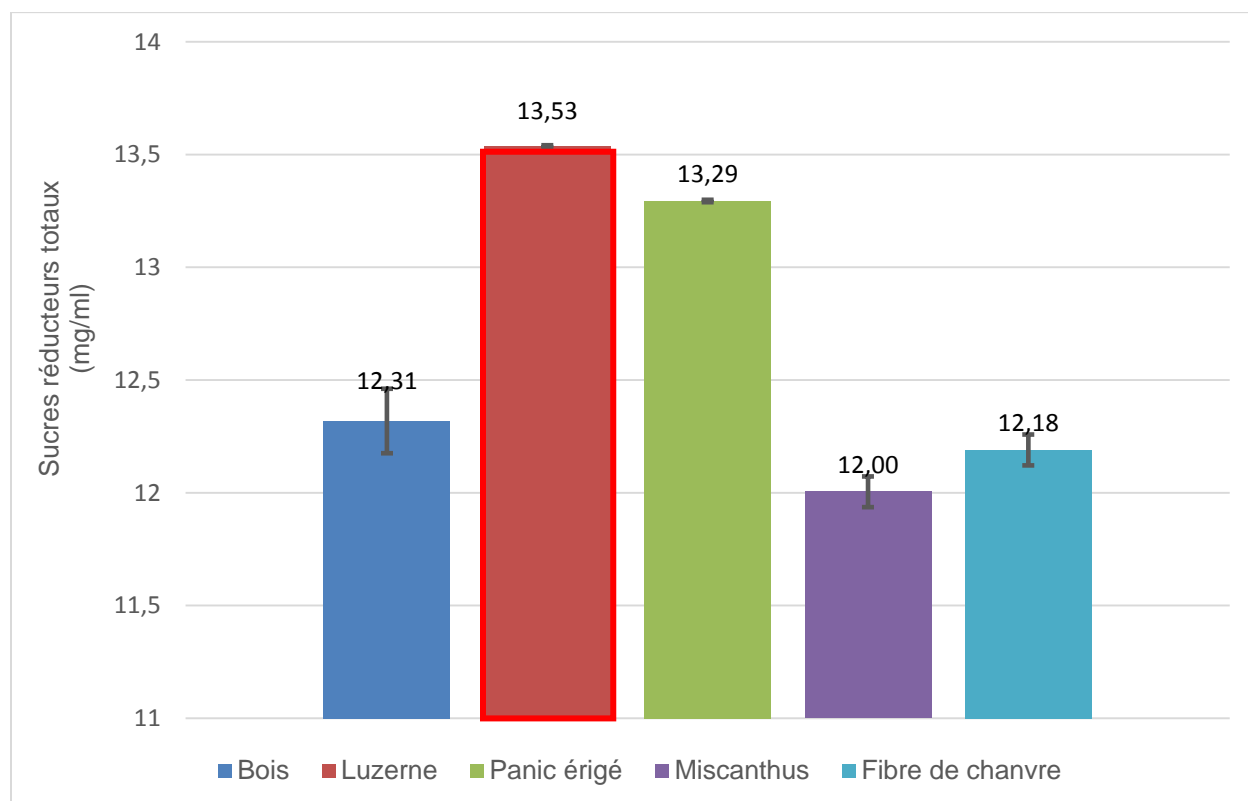
**Figure 12:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse enzymatique (en mg/ml).

**Tableau 8:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse enzymatique (en mg/ml).

Substrats	[TRS] mg/ml
Bois	6,78
Luzerne	12,23
Panic érigé	11,84
Miscanthus	11,06
Fibre de chanvre	10,22

La figure 12 correspond aux quantités de sucres réducteurs obtenues par l'hydrolyse enzymatique. Les concentrations en sucres sont relativement plus faibles que celle mesurée lorsqu'une hydrolyse acide est utilisée. Nous avons la luzerne à 12,23 mg/ml, cependant le panic érigé est de 11,84 mg/ml et le miscanthus de 11,06 mg/ml. En ce qui concerne la fibre de chanvre, nous constatons une augmentation de 6%, alors qu'avec le bois, la quantité de sucres réducteurs a diminué de 3%. Cela peut s'expliquer par le fait que les substrats utilisés n'ont pas pu libérer assez suffisamment de sucres fermentescibles lors de leurs interactions avec l'enzyme (cellulases).

#### 4.1.3 *Hydrolyse chimique et biochimique*





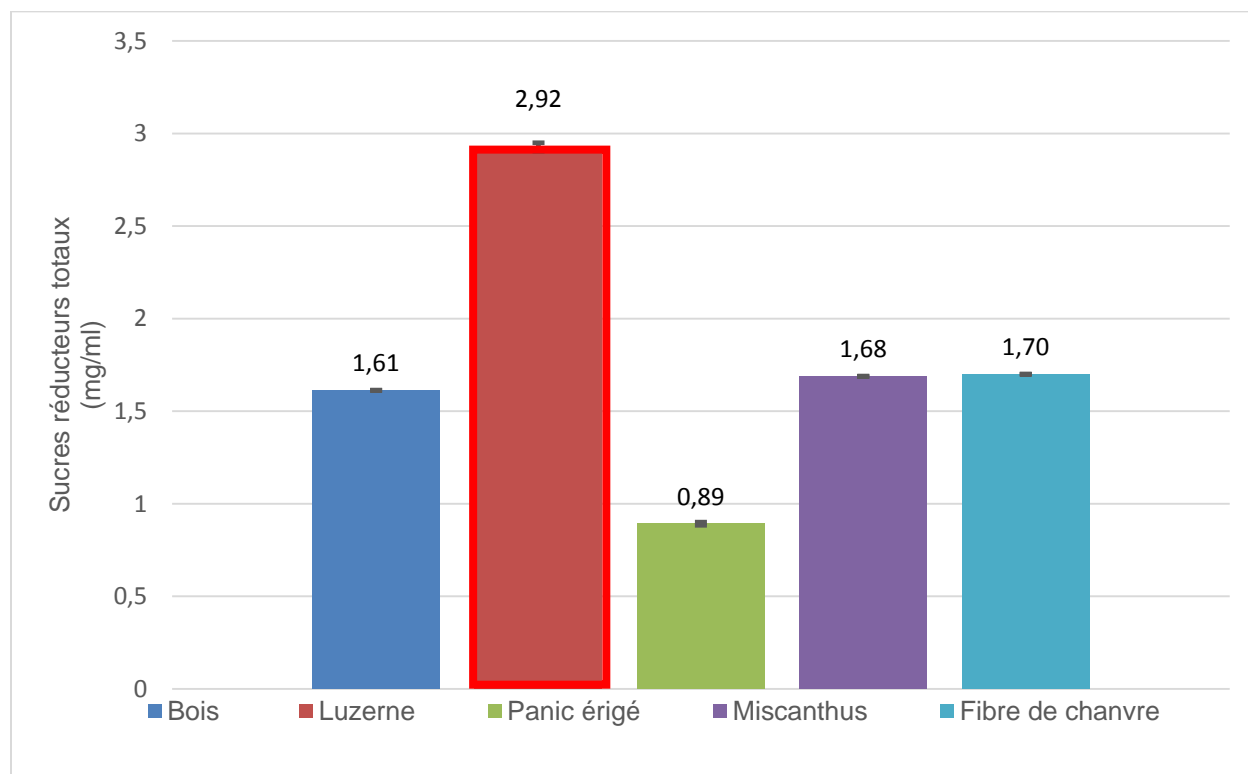
**Figure 13:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse combinée (en mg/ml).

**Tableau 9:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse combinée (en mg/ml).

Substrats	[TRS] mg/ml
Bois	12,31
Luzerne	13,53
Panic érigé	13,29
Miscanthus	12,00
Fibre de chanvre	12,18

La figure 13 ci-dessus présente la quantité de sucres réducteurs obtenus par l'hydrolyse combinée. Les échantillons ont été traités par le l'acide sulfurique et la cellulase. Il est possible de s'attendre à des résultats plus élevés par rapport à ceux obtenus en utilisant respectivement le traitement acide et le traitement enzymatique. En revanche, les résultats ne sont pas ceux attendus : Luzerne (13,53mg/ml), panic érigé (13,29 mg/ml), miscanthus (12 ,00 mg/ml), fibre de chanvre (12,18 mg/ml) et bois (12,31 mg/ml). Les résultats obtenus sont assez identiques de ceux obtenus pour l'hydrolyse acide, cela s'explique que le traitement combiné pourrait augmenter le rendement des sucres réducteurs tout en détruisant la totalité de la cellulose,

#### 4.1.4 *Traitement avec l'eau distillée (contrôle)*



**Figure 14:** Quantité de sucres réducteurs obtenus par le traitement avec l'eau distillée (en mg/ml).

**Tableau10 :** Quantité de sucres réducteurs obtenus par le traitement avec l'eau (en mg/ml).

<b>Substrats</b>	<b>[TRS] mg/ml</b>
Bois	1,61
Luzerne	2,92
Panic érigé	0,89
Miscanthus	1,68
Fibre de chanvre	1,700

La quantité de sucres réducteurs dans le traitement avec l'eau distillée a été estimée dans le graphe ci-dessus. Les résultats sont plutôt différents de ceux enregistrés lorsque des traitements acides, enzymatiques ou combinés sont utilisés. Nous remarquons que le rendement en sucres réducteurs par les substrats est plus faible. D'après le tableau nous avons la quantité du sucre réducteur libéré par la luzerne est estimée à 2,92 mg/ml. En revanche, la fibre de chanvre est de 1,70 mg/ml, 1,68 mg/ml pour le miscanthus et 1,61 mg/ml pour le bois. En revanche, en utilisant le panic érigé, une très faible concentration a été enregistrée (0,89 mg/ml). Les résultats obtenus sont différents des autres traitements. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'hydrolyse avec l'eau distillée n'a pas pu détruire les chaînes de cellulose.

#### 4.1.5 **Conclusion**

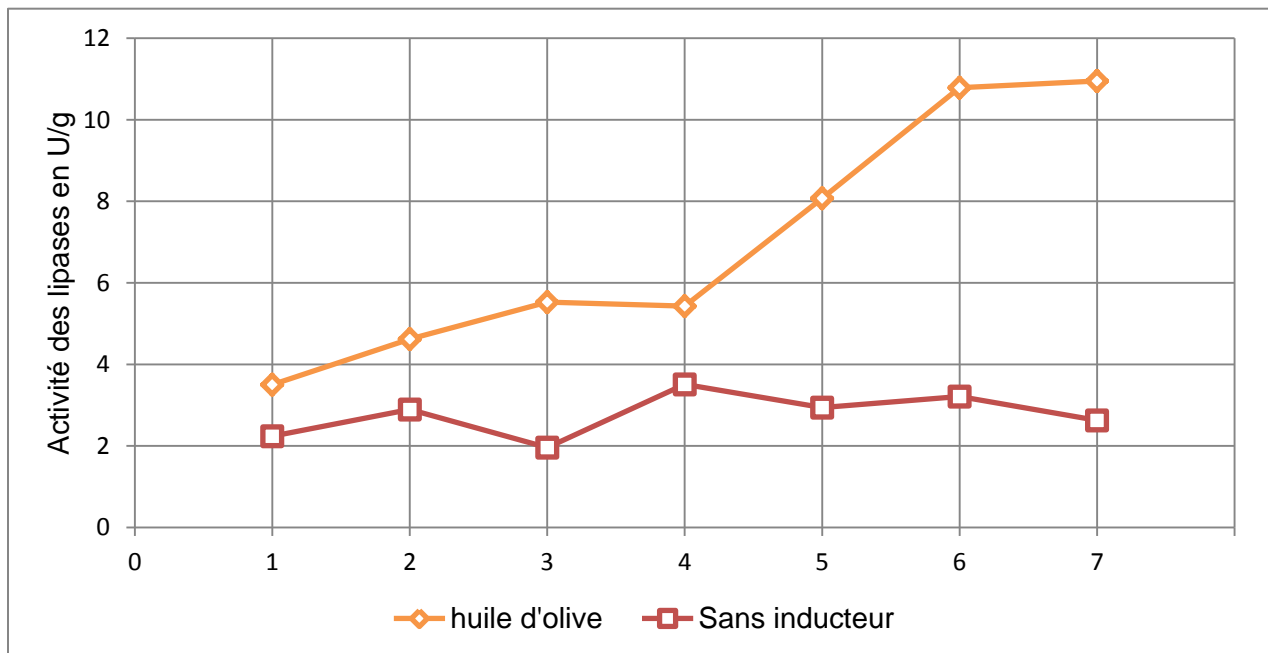
D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que la biomasse la plus riche en sucre est la luzerne avec un taux estimé de 19,38 mg/ml obtenus dans le milieu contenant une concentration optimale de 1% d'acide sulfurique. Selon (J.-C. Ogier, 1999; N. Eloutassi 2012), l'hydrolyse biochimique (enzymatique) est une technique beaucoup plus récente qui permet d'avoir du meilleur rendement de récupération des sucres cependant l'inconvénient majeur repose sur le coût des enzymes utilisées, mais nous avons constaté que la production était moins satisfaisante et cela s'explique que les substrats utilisés n'ont pas pu détruire la chaîne de cellulose assez suffisamment lors de leurs interactions avec l'enzyme (cellulases) qui demeure élevée. Tandis que l'hydrolyse chimique ancienne technique fortement exploitée permet des rendements maximums de l'ordre de 95 % de récupération pour les sucres issus à la fois des fractions cellulosiques et hémicellulosiques.

## 4.2 Fermentation en milieu submergé

Pour la fermentation à l'état liquide, la luzerne (30 ml) a été utilisée comme substrat organique dans un milieu de culture contenant des inducteurs (Tween 80, huile d'olive, huile de tournesol et glycérol), comme source de carbone supplémentaire pour production améliorée de lipases à l'aide *Rhizopus oryzae* NRRL 1526. Également, un milieu de culture témoin a été préparé, sans inducteur. Les conditions de fermentation ont été fixées comme il a été décrit précédemment  $30 \pm 1$  °C pendant sept jours.

### 4.2.1 Production des lipases avec huile d'olive

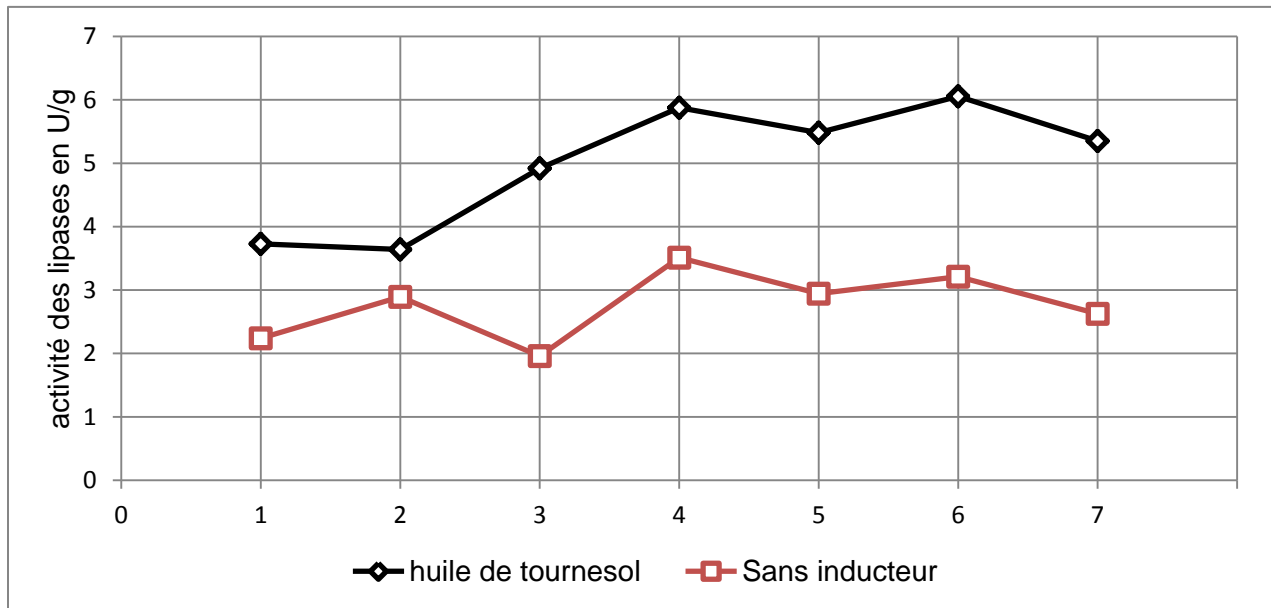
La figure (15) présente la production des lipases en fermentation liquide en utilisant huile d'olive comme inducteur. La production maximale des enzymes (11 U/g) a été observée au bout de 168 h de fermentation. Pour la production des enzymes sans inducteur, nous avons réalisé une étude du profil de la production pendant 7 jours de fermentation (voir figures 15 ,16 ,17 et18). Des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures. La production maximale est obtenue durant les 4 jours avec un taux de 4 U/g, ce qui est faible par rapport aux inducteurs utilisés.



**Figure 15:** Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur.(temps d'incubation 168h; inducteur : huile d'olive).

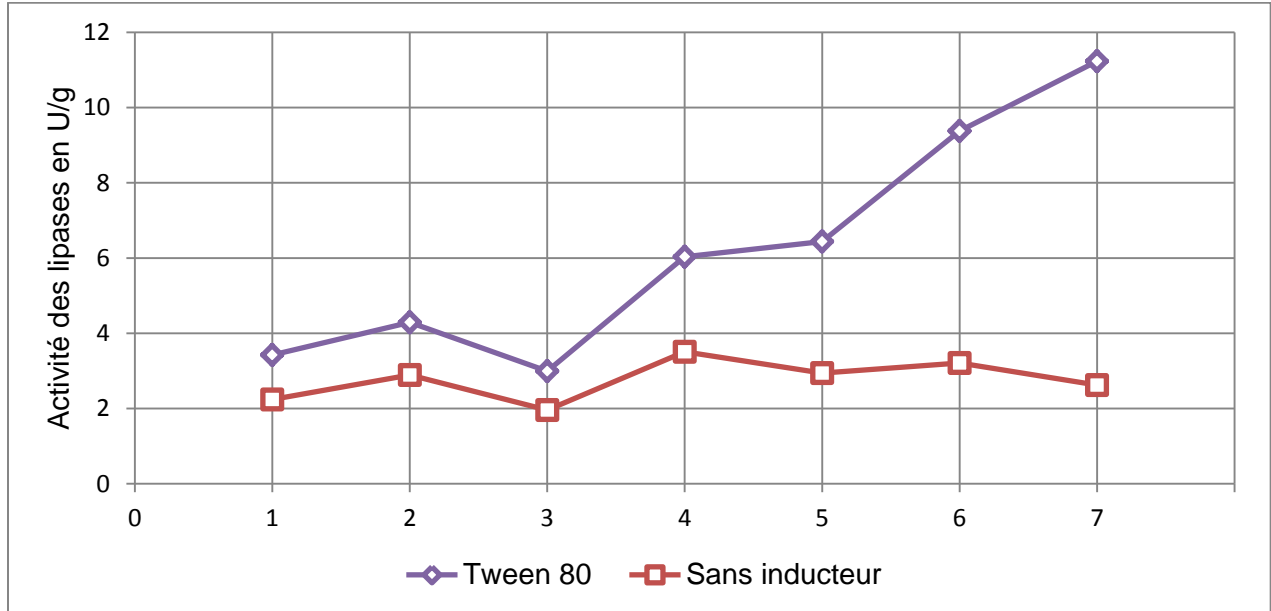
#### 4.2.2 Production des lipases avec huile de tournesol

Dans cette expérience, huile de tournesol a été utilisé comme inducteur de croissance pour la production des lipases. L'activité des lipases la plus élevée été observé après 120 h de fermentation avec un taux de 6 U/g. Durant le troisième jour, la production de l'activité lipolytique diminue. Ceci est probablement dû à l'influence de différents facteurs physicochimiques qui deviennent défavorables à leur croissance et par conséquent à la production de lipase et de son activité ,telle que l'épuisement du substrat, la diminution du pH, (Aggoune wissem 2017; Ghosh, 1996).



**Figure 16:** Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 420h; inducteur : huile de tournesol).

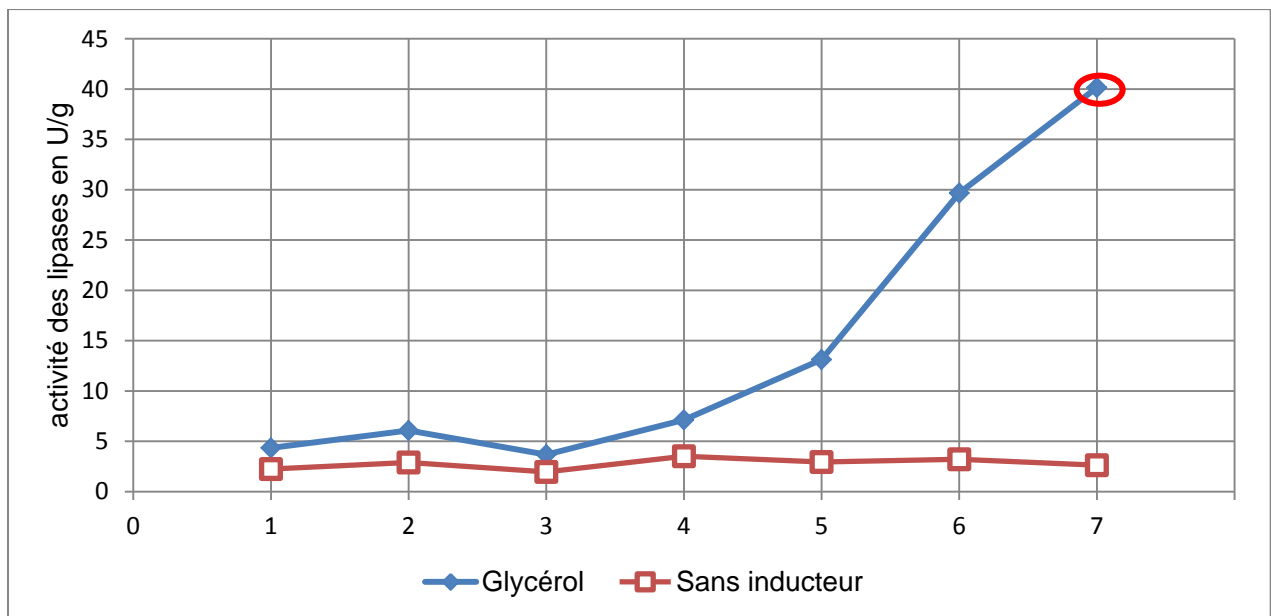
#### 4.2.3 Production des lipases avec Tween 80



**Figure 17:** Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 168h; inducteur : Tween 80).

Les productions maximales (11 U/g) de lipases pour la fermentation submergée en présence du Tween 80, ont été obtenues entre 96 h et 168 h, ce qui présente une augmentation de la production de lipases presque deux fois plus qu'en présence de l'huile de tournesol.

#### 4.2.4 Production des lipases avec glycérol



**Figure 18:** Production des lipases en fonction du temps d'incubation et d'inducteur. (Temps d'incubation 168h; inducteur : Glycérol).

En ce qui concerne la fermentation liquide en présence du glycérol (inducteur) utilisé comme source de carbone, les productions maximales de lipases sont obtenues après 96 h jusqu'à 168 h de fermentation. L'activité de lipases est estimée à 40 U/g. Le glucose est totalement consommé par le champignon.

#### 4.2.5 **Conclusion**

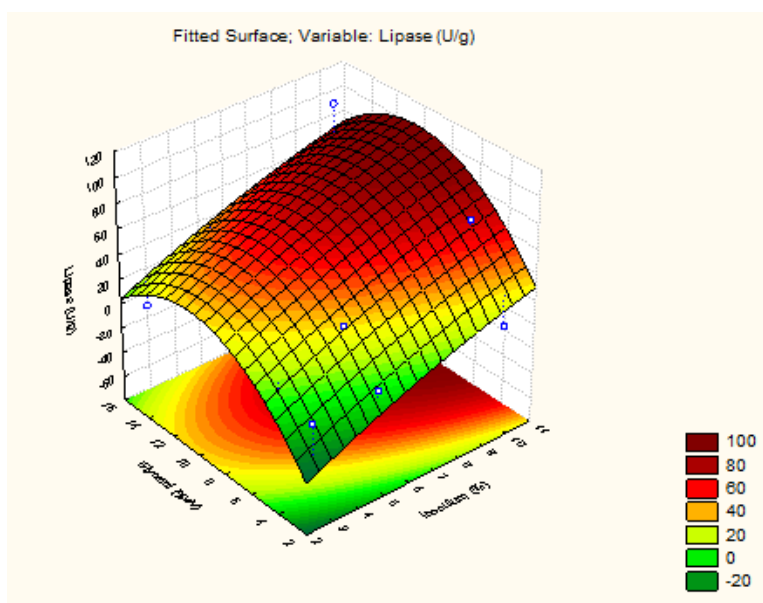
D'après les résultats obtenus dans les graphes ci-dessus, on remarque que parmi les quatre inducteurs testés (huile d'olive, huile de tournesol, le Tween 80 et le glycérol), seulement le glycérol est capable d'induire la synthèse des lipases. Ce qui signifie que l'inducteur a inhibé la croissance du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526, selon (Bailey, 2009; Salleh *et al.*, 1993), le glycérol est largement utilisé que les autres sources de carbone testées comme substrat ou inducteur pour la production des lipases dans différentes souches. Un autre avantage utile de la production des lipases avec le glycérol est que l'activité de lipases est atteinte beaucoup plus tôt et reste stable à des concentrations convenables pour une période de temps considérable.

#### 4.3 **Optimisation de la concentration du meilleur inducteur**

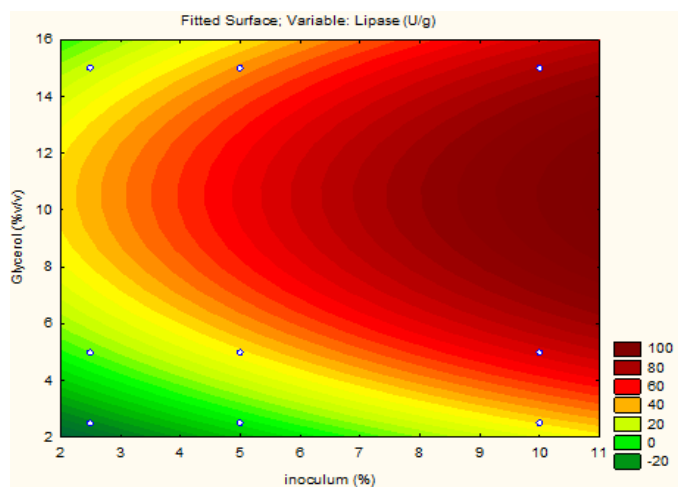
L'optimisation de la production de lipases dans la fermentation liquide a été rendue possible grâce à l'utilisation d'un plan expérimental de surface de réponse. La production a été comparée avec différentes concentrations de glycérol et d'inoculum (tableau 6) dans des conditions de culture similaire. La comparaison a été faite, pour établir les meilleures conditions pour une production élevée de lipases par le champignon. Afin de réaliser ces comparaisons, une concentration de (2,5%, 5%, 10%) de glycérol et (2,5%, 5%, 15%) du *Rhizopus oryzae* NRRL1526 ont été inoculés au milieu de culture contenant 30 ml de la luzerne utilisés comme substrat organique. Les productions de lipases obtenues dans un milieu de fermentation liquide ont été exprimées en unités par gramme de milieu de culture (U/g). Les résultats obtenus lors de la culture ont été rassemblés dans un modèle statistique. Les analyses statistiques ont été effectuées pour une réponse (activité de lipases U/g).

**Tableau 11:** Coefficients statistiques des variables dépendantes (Glycérol, inoculum).

Coefficients de régression		
	Régression	p
Mean/Interc.	-97,5277	0,194319
(1)inoculum (%) (L)	11,2050	0,580613
inoculum (%) (Q)	-0,2786	0,855689
(2)Glycerol (%v/v) (L)	20,8307	0,202610
Glycerol (%v/v) (Q)	-0,9888	0,255945



**Figure 19:** Model statistique des différentes variables utilisées (glycérol, inoculum).



**Figure 20:** Model statistique des différentes variables utilisées (glycérol, inoculum).

L'analyse statistique (Tableau 11 et Figure 19 et 20) a montré que le glycérol a des effets négatifs linéaires statistiquement significatifs sur les rendements des lipases ( $a = -0,98$ ) et quadratiques ( $b = 1.80$ ) ( $p=0,25$  et  $p = 0,20$  ; respectivement). Cependant pour l'inoculum a des effets linéaires négatifs ( $a = -0.27$ ) et quadratiques ( $b = 11.20$ ) statistiquement positifs ( $p = 0.855689$  et  $0.580613$ , respectivement), l'analyse statistique des coefficients de régression a montré un coefficient acceptable.

**Tableau 12:** Valeurs critiques d'inoculum (%) et de glycérol (%v/v) selon le modèle statistique.

<b>Valeurs critiques; Variable: Lipase (U/g) Solution: maximum Valeur prédite à la solution: 124.8455</b>			
	<b>Observed</b>	<b>Critical</b>	<b>Observed</b>
<b>Inoculum (%)</b>	2.50	20.10	10.00
<b>Glycerol (%v/v)</b>	2.50	10.53	15.00

Selon le modèle statistique utilisée, la valeur maximale prédite à la solution: (124.8U /g) obtenues en inoculant une valeur critique de (20.1 %) et de (10.5 %) glycérol, l'augmentation de la production de lipases, pourrait être expliquée non seulement par l'addition de l'inducteur dans le milieu de culture, mais grâce à l'incorporation du substrat également complémentaire (Colla et al., 2016). Le glycérol pourrait aider *R. oryzae* à obtenir un rendement positif. Apparemment, *R. oryzae* aurait pu se nourrir des sucres présents dans l'hydrolysate, puis passer au glycérol pour augmenter le rendement en lipase (Bailey, 2009).



## 5 CONCLUSION

Ce travail de recherche avait pour ambition la production de lipases en utilisant la biomasse lignocellulosique à l'aide du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

Un prétraitement physique et des procédés d'hydrolyses chimique et enzymatique ont été utilisés. Selon les résultats obtenus, la luzerne (19,37 mg/ml) a été sélectionnée comme étant le meilleur substrat comparé aux (Bois dur, miscanthus, panic érigé et la fibre de chanvre.

La production des lipases a été réalisée par fermentation à l'état liquide ayant comme substrat la luzerne, et en utilisant les champignons *Rhizopus oryzae* NRRL 1526. Le substrat de fermentation est un déchet lignocellulosique. Nous avons obtenu la plus grande activité des lipases (4 U/g substrat sec) après 7 jours d'incubation à 30°C.

Pour améliorer la production des lipases, des inducteurs comme le Tween 80, l'huile d'olive, l'huile de tournesol et glycérol ont été utilisés. Les résultats montrent que l'ajout de glycérol induit à une activité maximale (40 U/g) après 7 jours d'incubation à 30°C.

En se basant sur le plan factoriel, différentes concentrations de glycérol et d'inoculum ont été ajoutées pour l'optimisation de la production des lipases a des concentrations convenables. La plus grande activité de lipases obtenues (110 U/g) après 7 jours d'incubation à 30°C.

## 6 PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

Un travail complémentaire doit être effectué à la suite de la présente étude :

- Caractérisation des résidus lignocellulosiques après le processus de l'hydrolyse dans le but de déterminer leur taux en cellulose, hémicellulose et la lignine;
- Tester les différentes concentrations de  $H_2SO_4$  (v/v) : 0.25%,0.50%,1.5%,2% et la mise en échelle du procédé de fermentation: production des lipases dans un fermenteur en milieu liquide.
- Incubation pendant une longue durée pour évaluer l'activité de lipases et;
- Utilisation de différentes sources d'azote comme inducteur pour l'amélioration de la production de lipases.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- F.e et al. 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. in: *Centre Wallon de Biologie Industrielle* ,Université de Liège.
- Alloue, W.D., J; Ongena, M; Blecker, C; and Thonart, P. 2008. Effects of monopropylene glycol and gamma irradiation on *Yarrowia lipolytica* lipase stabilization. . *Prep Biochem. Biotechnol* 217-228.
- Bailey, M.J.H.a.D.G. 2009. Glycerol as a carbon source for lipase production by the fungus *rhizopus delemar*. *Food Biotechnology*, 26.
- Campbell C.K., J.E.M., Philpot C.M., Warnock D.W. 1996. Identification of pathogenic fungi. *Public Health Laboratory Service*, 298.
- Colla, L.M., Primaz, A.L., Benedetti, S., Loss, R.A., de Lima, M., Reinehr, C.O., Bertolin, T.E., Costa, J.A.V. 2016. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 461-467.
- 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.
- Deb P., T.S.A., Mohsina K., Sarker P.K., Abu Sayem S.M. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, 154–163.
- Dix N.J., W.J., 1995. Fungal Ecology. Chapman & Hall, London, UK., 549 p. 1995. Fungal Ecology. *Chapman & Hall*, 549.
- Domsch KH, G.W., Anderson TH 1980. Compendium of Soil Fungi. . *Academic Press, London*, 703–709.
- Durand G, M.P. 1982. Les Enzymes. *Production et Utilisation Industrielles*, 23–24.
- El-okki, A.A.K.é.E.-H. 2017. L'α-Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification. in: *Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire*, Université Frères Mentouri – Constantine 1, pp. 196.
- Freitas A., E.B., Carvalho A., Lima V., Oliva-Neto P. 2014) Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microspores* var. *oligosporus* from industrial wastein acquisition of glucose. *Chem. Pap*, 442–450
- G.F, C. 1999. Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. *Biotechnologie. Ed. Lavoisier.*, 401–425.
- Gassara, F. 2012. production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation a l'etat solide des dechets agroindustrielles et leur applications in: *Centre Eau Terre Environnement*, Vol. Ph.D., Université du Québec Institut national de la recherche scientifique, pp. 317.

- Ghosh B., R.R.R. 2011. Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review *Journal of Applied Sciences* 2011, 2470-2486.
- Ghosh B., R.R.R. 2013. Isolation of a hyperamylolytic mutant strain of *Rhizopus oryzae* PR7 by classical mutagenesis. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 4(3):, 36–41.
- Ghosh, P.K.S., R.K; Gupta, R; Yadav, R.P; Davidson, S. . 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci. Progr.*, 119-157.
- Gilhan, D.L., R. . 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methodes*, 139-147.
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipides. . *Journal of the science of food and agriculture* . 1535-1549.
- Herrington, B.L. 1954. Lipase: A Review. *Journal of Dairy Science*, **37**(7), 775-789.
- Huguette Martel, a., MAPAQ-Estrie ,Olivier Lalonde, agr., M.Sc., CÉROM. 2018. PANIC ÉRIGÉ, (Ed.) C.d.r.s.l.g.i.-. CÉROM, pp. 38.
- J.-C. Ogier, D.B., J.-P. Leygue<sup>1</sup>, L. Rigal et J. Pourquoié. 1999. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology*, 28.
- Jeager, K.E.D., B.W ; etreetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: Moléculaire biology three dimensional structure and biotechnological applications of lipases annu. *Microbiol* 315-351.
- Kirk O., V.B.T., Fuglsang C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 345–351.
- Lecellier, A. 2013. Caractérisation et identification des champignonsfilamenteux par spectroscopie vibrationnelle, Vol. , Université de Reims Champagne -Ardenne. , pp. 196.
- Meyer, A.D., J ; & Bernard, A. 2004. in: *Cour de microbiologie générale*. J.Appl.Microbiol. 66 (4),, pp. 1523-1526.
- Mohamed Amine Laadila a, K.H.a., Tarek Rouissi a,Satinder Kaur Brar a, \*, Rosa Galvez b, Luca Sorelli b, Ridha Ben Cheikh c, Maria Paiva d,Kofi Abokitse e. 2017. Green synthesis of novel biocomposites from treated cellulosic fibers and recycled bio-plastic polylactic acid. *Journal of Cleaner Production*, 12.
- N. Eloutassi , B.L., L. Boudine et A. Remmal 2012. Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue des Energies Renouvelables*, 10.
- Prevot, V. 2013a. Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide.
- Prevot, V. 2013b. Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. in: *U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles*, Vol. PhD, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, pp. 159.
- Ravichandran, S., R, V. 2012. *Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study*.
- Ravichandran, S.a.V.R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study.

- Rihani, A. 2012. Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. in: *Magister : Microbiologie. Annaba*, Université Badji mokhtar, pp. 55.
- Ross, R. 2010. How does *Ganderma applana* reproduce.
- Salleh, A.B., Musani, R., Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A. 1993. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Canadian Journal of Microbiology*, **39**(10), 978-981.
- Sauvageon, T. 2012. Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol., Université de lorraine, pp. 56.
- Surribas, A., Stahn, R., Montesinos, J.L., Enfors, S.-O., Valero, F., Jahic, M. 2007. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *Journal of Biotechnology*, **130**(3), 291-299.
- Wilfried, R.M., M; Brunschwig, Ch; Villeneuve, P; Blin, J. . 2011. Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV). 6.