



Applications et propriétés enzymatiques et antimicrobiennes de souches isolées de coproduits oléicoles : Cas d'une lipase de *Penicillium crustosum* et de peptides antimicrobiens de *Lactobacillus*.

Ismail Hasnaoui

► To cite this version:

Ismail Hasnaoui. Applications et propriétés enzymatiques et antimicrobiennes de souches isolées de coproduits oléicoles : Cas d'une lipase de *Penicillium crustosum* et de peptides antimicrobiens de *Lactobacillus*.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I; Université Mohammed Premier Oujda, 2023. Français. NNT : 2023LYO10141 . tel-04542164

HAL Id: tel-04542164

<https://theses.hal.science/tel-04542164>

Submitted on 11 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



جامعة محمد الأول بوجدة
UNIVERSITE MOHAMMED PREMIER OUJDA
ⵜⴰⵎⴰⵎⴰⵔⵜ ⵜⴰⵎⴰⵏⴰⵢⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵏⴰⵢⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ

**THESE EN COTUTELLE INTERNATIONALE
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
&
UNIVERSITE MOHAMMED PREMIER**

**Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé
&
Centre d'Etudes Doctorales Sciences et Techniques**

Discipline : Microbiologie, Biochimie et Biotechnologie

Soutenue publiquement le 15/09/2023, par :
HASNAOUI Ismail

**Applications et propriétés enzymatiques
et antimicrobiennes de souches isolées
de coproduits oléicoles: cas d'une lipase
de *Penicillium crustosum* et de peptides
antimicrobiens de *Lactobacillus*.**

Devant le jury composé de :

ZINEDINE, Abdellah	Professeur, Université Chouaib Doukkali	Examineur
BERTI, Liliane	Professeure, Université de Corse Pasquale Paoli	Rapporteur
FIRDAOUS, Loubna	Maître de Conférences, Université de Lille	Rapporteur
ZAHIR, Hafida	Professeure, Université Sultan Moulay Slimane	Rapporteur
SAALAOUI, Ennouamane	Professeur, Université Mohammed Premier	Président
ABOUSALHAM, Abdelkarim	Professeur, Université Lyon 1	Directeur de thèse
ASEHRAOU, Abdeslam	Professeur, Université Mohammed Premier	Co-Directeur de thèse
NOIRIEL, Alexandre	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-Encadrant de thèse
JAOUADI, Bassem	Professeur, CBS Université de Sfax	Invité

AVANT PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle internationale entre l'Université Claude Bernard Lyon 1 et l'Université Mohamed Premier (Oujda, Maroc) dans le cadre du projet de Recherche du Partenariat Hubert Curien (PHC)-Maghreb (FranMaghZYM 2020-2023), code Campus France : 43791TM & code PHC : 01MAG20, intitulé: « Biodiversité des microorganismes d'intérêts biotechnologiques, isolés de biotopes extrêmes : Procédés enzymatiques et leur impact sur l'environnement ». Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Génie enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS) de l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS, UMR5246 CNRS-Université Lyon 1) sous la direction du **Pr. ABOUSALHAM Abdelkarim** et le co-encadrement du **Dr. NOIRIEL Alexandre**, et au Laboratoire de Bioressources, Biotechnologies, Ethnopharmacologie et Santé (LBBES) à la Faculté des Sciences de Oujda, Université Mohammed Premier, Oujda, Maroc, sous la direction du **Pr. ASEHRAOU Abdeslam**.

Production scientifique réalisée durant mon travail de thèse

A - Liste des publications dans des revues internationales à comité de lecture :

1. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Reda Bellaouchi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdelkarim Abousalham, Kamal Essifi, Abdesselam Tahani, Bassem Jaouadi & Abdeslam Asehrou. Antimicrobial activity of *Lactiplantibacillus* and *Levilactobacillus* strains isolated from fermented olive and their application in milk and pastilla leaf biopreservation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, (2023) e6021. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.6021> (IF 2021 = 0,614)
2. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Sondes Mechri, Houssam Abouloifa, Ennouamane Saalaoui, Bassem Jaouadi, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Purification, biochemical and kinetic characterization of a novel alkaline *sn*-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Penicillium crustosum* Thom strain P22 isolated from Moroccan olive mill wastewater. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19) (2022) 11920. <https://doi.org/10.3390/ijms231911920> (IF 2021 = 6,208)

B - Liste des communications lors de séminaires et congrès nationaux et internationaux :

Communications orales :

1. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Screening of lipase-producing microorganisms isolated from by-products of the olive industry. The 22nd Scientific Day of IMBL, lipids-pathological markers and therapy targets, 4 July 2022, **Lyon, France**
2. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle lipase alcaline de la souche P22 de *Penicillium crustosum* Thom isolée des eaux usées des moulins à huile marocains. Séminaire Franco-Maghrébin (SFM 2022) sur la thématique « Enzymes microbiennes d'intérêt industriel, environnemental et thérapeutique ». Le 28/06/22, ICBMS-UCBL1, **Lyon, France**
3. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Purification et caractérisation biochimique de la lipase PCrL de *Penicillium crustosum* Thom P22 isolée des margines. La 2^{ème} Rencontre Franco-Maghrébine (2ème RFM) sur le thème : « les enzymes microbiennes d'intérêts industriels et environnementaux ». Le 17/05/2022, FSO-UMP, **Oujda, Maroc**
4. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Production, purification, and biochemical characterization of an alkaline lipase from *Penicillium Crustosum* Thom P22 isolated from moroccan olive mill wastes. The 31st International Congress of Biological Sciences and Biotechnology of the ATSB. March 21-24, 2022. **Hammamet, Tunisie**
5. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Screening of lipase-producing microorganisms isolated from by-products of the olive industry, The 21st Scientific Day of IMBL, lipids- pathological markers and therapy targets, 8 July 2021, **Lyon, France**
6. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Sara Gaamouche, Nabil Ghabbour, Reda Bellaouchi, Ennouamane Saalaoui, and Abdeslam Asehrou. Antimicrobial and enzymatic activity of antifungal *Lactobacillus* strains isolates from fermenting natural green olive. The 1st International Conference, Bioresources, Biotechnology and Sustainable Development, December 18-20, 2019, FSO-UMP, **Oujda, Maroc**
7. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Screening of lipase-producing microorganisms isolated from by-products of the olive industry, 21st scientific day of IMBL, lipids- pathological markers and therapy targets, 8 July 2021, **Lyon, France**

Communications affichées :

1. **Ismail Hasnaoui**, Ahlem Dab, Houssam Abouloifa, Sondes Mechri, Yahya Rokni, Bassem Jaouadi, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Identification of a novel lipase purified from the ascomycete fungus *Penicillium crustosum* Thom P22 with biotechnological
- Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehrou & Abdelkarim Abousalham. Isolation of lipase-producing microorganisms from

olive by-products. The 19th International Days of Biotechnology (IDB2021) of the ATBiotech, December 19-22, 2021. **Sousse, Tunisia. *En ligne***

2. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Ennouamane Saalaoui, Alexandre Noiriél, Abdeslam Asehraou & Abdelkarim Abousalham. Screening of lipase-producing microorganisms isolated from by-products of the olive industry. The 18th Euro Fed Lipid Congress, October 19-21, 2021. **Leipzig, Allemagne. *En ligne***
3. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Reda Bellaouichi, Ennouamane Saalaoui & Abdeslam Asehraou. Antimicrobial and enzymatic properties of antifungal lactic acid bacteria strains isolates from fermenting natural green olive. The 1st International Conference, Bioresources, Biotechnology and Sustainable Development, December 18-20, 2019, FSO-UMP, **Oujda, Maroc**
4. **Ismail Hasnaoui**, Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Reda Bellaouichi, Ennouamane Saalaoui & Abdeslam Asehraou. Enzymatic and Antibacterial properties of lactic acid bacteria isolates from natural fermenting green olive. The 4th International Congress “Microbial Biotechnology for Development” (MICROBIOD 4) 24-26 April 2019, **Agadir, Maroc**.

REMERCIEMENTS

Je tenais à remercier, en premier lieu, Dieu le Tout Puissant et Miséricordieux, de m'avoir donné courage et santé pour achever ce travail.

Ce manuscrit est le fruit d'un travail de doctorat impliquant l'intervention, de près ou de loin, de plusieurs personnes sans qui je n'aurais jamais pu l'achever. La moindre des choses que je puisse faire pour eux, c'est de les remercier.

Mes premiers mots de reconnaissance et ma profonde gratitude vont vers mes chers professeurs **Abdelkarim ABOUSALHAM** et **Abdeslam ASEHRAOU**. Je les remercie de m'avoir accueilli dans le laboratoire, de me donner la chance de faire partie du monde de la recherche et de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Leur disponibilité, leurs remarques pertinentes et leur soutien tout au long de cette thèse m'ont permis d'acquérir la rigueur scientifique indispensable à la réalisation de ce travail. Leur bienveillance ainsi que leur patience à mon égard, m'ont permis de mener à bien mon projet dans de bonnes conditions.

Je tenais à exprimer toute ma gratitude au Dr. **Alexandre NOIRIEL**, mon co-encadrant. En effet, ce dernier a montré de grandes disponibilités, patience et tolérance à mes débuts, ce qui m'a permis d'acquérir une solide expérience et de m'avoir fait aimer la biologie moléculaire.

Par ailleurs, je remercie tout particulièrement le Pr. **Bassem JAOUADI** qui m'a accueilli au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) au Centre de Biotechnologie de Sfax, Université de Sfax. Son aide m'a été précieuse dans mes travaux de recherche. Je lui suis reconnaissant de la confiance qu'il m'a accordée, de son encouragement et des conseils, plus que pertinents, qu'il a pu m'apporter.

J'adresse un grand remerciement aux Pr. **Yahya ROKNI**, Pr. **Houssam ABOULOIFA**, Pr. **Reda BELLAOUCHI** et Pr **Nabil GHABBOUR** pour toute l'attention et le suivi continu qu'ils ont accordés à mes travaux. Je leur exprime ainsi toute ma reconnaissance et mon profond respect.

L'aboutissement de ma thèse a pu avoir lieu grâce à la présence indispensable de mes compagnons de paillasse, avec qui nous avons pu longuement partager nos réussites et nos échecs. Ce fut un réel plaisir de partager avec Dr. **Sondes**, sa passion pour les enzymes microbiennes. Votre contribution, votre gentillesse et votre générosité ont été précieux pour la réalisation de ce projet. **Ahlem** et **Zongze** pour nos longs échanges passionnés, scientifiques ou non, et toujours prêts à rendre service. **Numa** et **Nicolas** pour leur gentillesse. Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements à tous mes collègues d'équipe de GEMBAS et MEM². Je remercie aussi l'ensemble du personnel de l'ICBMS, dont la liste serait longue, et qui ont toujours été présents pour répondre à mes questions. Un grand Merci à tous mes collègues du laboratoire LBBES, particulièrement : **Meryem**, **Noureddine**, **Sara**, **Meryem**, **Hafida** et **Imane** pour l'ambiance agréable qu'ils ont entretenue lors de nos années de travail ensemble, en leur souhaitant succès et bonheur.

Mes remerciements vont au-delà du laboratoire, j'adresse ma plus grande gratitude à mes amis **Sara**, **Hind**, **Oussama**, **Youssef**, **Bachir**, **Anwar**, **Yassine**, **Issam**, **Rachid** et **Reda** pour leurs encouragements tout au long de mon cursus doctoral. Un grand remerciement aux membres de ma famille au Maroc, en France, en particulier mon oncle, mes tantes et mes cousins pour leur soutien, leur confiance et leur encouragement.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui, de par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques constructives ont su guider ma réflexion et mon apprentissage.

Dédicaces

A mes parents et mes frères qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu

A ceux à qui je dois tant

Les MIENS : Mes CHERS

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ARN	: Acide ribonucléique
BET	: Bromure d'éthidium
AS	: Activité spécifique
BHT	: ButylHydroxyToluène
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	: Albumine de sérum bovin
β-CD	: β-cyclodextrine
β-ME	: β-mercaptoéthanol
CALA	: Lipase de <i>Candida antarctica</i> de type A
CALB	: Lipase de <i>Candida antarctica</i> de type B
CFS	: <i>Cell-free supernatant</i>
CMC	: Concentration micellaire critique
CNRST	: Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique
COI	: Conseil Oléicole International
DBO	: Demande biochimique en oxygène
DCO	: Demande chimique en oxygène
DFP	: Diiodopropyl fluorophosphate
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
dNTP	: Désoxyribonucléoside triphosphate
DRX	: Diffraction des rayons X
DTNB	: Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
DL-DTT	: DL-Dithiothréitol
EDTA	: Acide éthylène-diamine tétraacétique
EGTA	: Acide éthylèneglycol bis-(amino-2-éthyléther) N,N,N',N'-tétraacétique
EOO	: 1-α-éléostéaroyl-2, 3-octadécyl- <i>sn</i> -glycérol
FAO	: <i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FF	: <i>Fast Flow</i>
FMAT	: Flore mésophile aérobie totale
GA	: Gomme arabique
GRAS	: <i>Generally Recognized as Safe</i>
GUV	: Vésicule unilamellaire géante
IOOC	: <i>International Olive Oil Council</i>
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ZI	: Zone d'inhibition
kDa	: <i>kiloDalton</i>
LAB	: <i>Lactic acid bacteria</i>
Lb	: <i>Lactiplantibacillus sp.</i>
LB	: Luria Bertani
LUV	: <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MIC	: <i>Minimum inhibitory concentration</i>
MLV	: Vésicule multilamellaire

MG	: Monoacylglycérol
MH	: Mueller-Hinton
MRS	: Man, Rogosa and Sharpe
NaTDC	: Acide taurodésoxycholique sodique
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCFS	: <i>Neutralized CFS</i>
NEM	: N-éthylmaléimide
m/v	: Masse par volume
OOE	: 1,2-octadécyl-3- α -éléostéaroyl- <i>sn</i> -glycérol
PAO	: Oxyde de phénylarsine
pb	: Paire de base
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
PCrL	: Lipase de <i>Penicillium crustosum</i> Thom P22
PDA	: <i>Potato dextrose agar</i>
PMSF	: Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PVDF	: Difluorure de polyvinylidène
Ri	: Rendement d'immobilisation
rpm	: Rotation par minute
SD	: <i>Standard deviation</i>
SDS	: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sn	: <i>Stereospecific numbering</i>
STPP	: Tripolyphosphate de sodium
SUV	: Petite vésicule unilamellaire
TAE	: Tris-acétate-EDTA
TAED	: Tétracétyléthylènediamine
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TC2	: Triacétate de glycérol
TC4	: Tributyrat de glycérol
TC6	: Trihexanoate de glycérol
TC8	: Trioctanoate de glycéryle
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane
TG	: Triglycéride
THL	: Tétrahydrolipstatine
TLL	: Lipolase® ou lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
Tm	: Température de fusion (<i>Melting temperature</i>)
UFC	: Unité formant colonie
UI	: Unité internationale
UNESCO	: <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
UV	: Ultraviolet
v/v	: Volume par volume
WHO	: <i>World Health Organization</i>
YEG	: <i>Yeast extract glucose</i>
3D	: Tridimensionnelle

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des margines d'olives.	8
Tableau 2 : Composition physico-chimiques des grignons d'olives.	9
Tableau 3 : LAB probiotiques isolées à partir d'olives fermentées.	11
Tableau 4 : Souches microbiennes productrices de lipases, leurs biotopes d'origine et leurs applications biotechnologiques.	29
Tableau 5 : Propriétés biochimiques générales de la lipase du genre <i>Penicillium</i>	31
Tableau 6 : Bilan des étapes de purification de différentes lipases du genre <i>Penicillium</i>	33
Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage (Visagie et al., 2014).	35
Tableau 8 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des enzymes immobilisées dans l'industrie (Basso and Serban, 2019).	42
Tableau 9 : Séquences et températures de fusion (T_m) des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant la lipase endothéliale de la souche P22. Orientation « For », sens, et « Rev », antisens.	59
Tableau 10 : Séquences et températures de fusion (T_m) des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant la lipase chez les LAB. Les sites de restriction sont en Gras soulignés. Orientation « For », sens, et « Rev », antisens.	59
Tableau 11 : Charge microbienne de la FMAT, levure et moisissures et de <i>Bacillus</i> obtenue dans les dix échantillons.	74
Tableau 12 : Etapes de purification de la PCrL.	83
Tableau 13 : Alignement de la séquence d'acides aminés terminaux NH_2 de la PCrL avec celle d'autres lipases de <i>Penicillium</i> sp.	85
Tableau 14 : Effets de divers inhibiteurs, réactifs chimiques et ions métalliques sur la PCrL. L'activité enzymatique a été mesurée après la pré-incubation de l'enzyme avec chaque inhibiteur ou agent réducteur, ou chaque ion métallique, pendant 1 h à 37°C. L'activité lipase mesurée en l'absence de tout inhibiteur ou agent réducteur a été prise comme témoin (100%). L'enzyme non traitée et dialysée a été considérée comme étant à 100% pour la mesure de l'activité en présence des ions métalliques. L'activité résiduelle a été mesurée à 37°C et pH 9.	90
Tableau 15 : Stabilité des lipases alcalines PCrL, Palatase® 20000L et Lipolase® avec plusieurs additifs détergents.	96
Tableau 16 : Stabilité des lipases alcalines PCrL, Palatase® 20000L et Lipolase® avec plusieurs additifs détergents commercialisés.	97
Tableau 17 : Effet de PCrL, Palatase® 20000 L et Lipolase® sur l'élimination de l'huile d'olive du tissu en coton avec divers détergents à lessive liquides et solides commercialisés.	100
Tableau 18 : Immobilisation de la PCrL avec les différents supports organiques et hybrides.	102
Tableau 19 : Les paramètres cinétiques et thermodynamiques des PCrL libre et immobilisée.	112
Tableau 20 : Valeurs de la zone d'inhibition (en mm) des souches LAB obtenues contre <i>R. glutinis</i> , <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i> avec la méthode de superposition.	123

Tableau 21 : Valeurs de la zone d'inhibition (mm) des surnageants (CFS, NCFS, NCFS traité à la catalase et NCFS traité à la protéinase-K) des souches LAB obtenues contre <i>R. glutinis</i> , <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i>	124
Tableau 22 : Valeurs de la zone d'inhibition des protéines précipitées des souches LAB obtenues contre <i>L. innocua</i> et <i>R. glutinis</i>	124
Tableau 23 : Zone de croissance de <i>R. glutinis</i> sur feuille de Pastilla traditionnelle en présence de différents surnageants de <i>Lb. plantarum</i> S62.....	129

Liste de Figures

<i>Figure 1 : Procédés d'extraction de l'huile d'olive (d'après (Gullón et al., 2020) avec modifications).</i>	6
Figure 2 : Mécanismes d'action des composés antimicrobiens dérivés des LAB (D'après (Abouloifa et al., 2022) avec modifications).	12
Figure 3 : Représentation schématisée du comportement des lipides en présence d'eau et l'interface air/eau. Classification selon (Small, 1968).	15
Figure 4 : Structures représentatives des 8 différentes catégories de lipides suivant LIPID MAPS (http://www.lipidmaps.org) (adapté de (Fahy et al., 2005)).	16
Figure 5 : Formation du film monomoléculaire à l'interface air-eau (d'après (Cadenhead, 1969) avec modifications).	17
Figure 6 : Représentation schématisée des différents types de liposomes en fonction de la taille et de la lamellarité (d'après (Lorin et al., 2004) avec modification).	18
Figure 7 : Représentation schématisée des différents types de micelles (d'après (El Alaoui, 2015)).	18
Figure 8 : Liaisons esters carboxyliques de TG hydrolysables par les lipases (sn : numérotation stéréospécifique).	19
Figure 9 : A. Modèle de cinétique interfaciale d'après (Verger et al., 1973). B. Modèle de cinétique interfaciale proposé par (Panaiotov et al., 1997). Les formes enzymatiques présentes à l'interface sont notées avec un astérisque (E^*, E^*S, P^*) afin de les différencier des formes enzymatiques solubles dans la phase aqueuse.	21
Figure 10 : Hydrolyse de la TC3 par l'estérase hépatique équine (A) ou par la lipase pancréatique porcine (B) illustrant le phénomène d'activation interfaciale. La ligne pointillée désigne la limite de séparation entre la forme monomérique et la forme agrégée de la TC3. La concentration du substrat S est exprimée en multiple de saturation. V, vitesse de la réaction en unités arbitraires (Sarda et al., 1958).	22
Figure 11 : Représentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases. Les brins β (1-8) sont représentés par des flèches et les hélices α (A-E) par des spirales. La position topologique des 3 résidus du site actif est représentée par un cercle (Jaeger, et al., 1999).	23
Figure 12 : Structure 3D de la HPL complexée avec son cofacteur, la colipase en conformation fermée (E) et en conformation ouverte (E^*). Ce diagramme montre le changement conformationnel du volet, des boucles $\beta 5$ et $\beta 9$, ainsi que la colipase durant l'interaction de la lipase avec l'interface lipidique. D'après (Jaeger et al., 1999; Miled et al., 2000).	25
Figure 13 : Mécanisme d'action catalytique des lipases. (A) Conformation initiale de l'enzyme. (B) Premier intermédiaire tétraédrique après attaque nucléophile de la sérine. (C) Libération du groupement partant (alcool) et formation de l'acyl-enzyme. (D) Attaque nucléophile par une molécule d'eau du carbone de l'acyl-enzyme. (E) Formation du second intermédiaire tétraédrique. (F) Libération de l'acide carboxylique qui régénère l'enzyme libre (Casas-Godoy et al., 2018).	26
Figure 14 : Diverses applications industrielles des lipases (Yao et al., 2021).	36
Figure 15 : Différentes méthodes d'immobilisation (Modifiée d'après (https://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/3CoursdeBiochSTRUCT/4BiochimieIndustrielle/1BiochIndust.htm)).	43

Figure 16 : Structures chimiques de sn-EOO et sn-OOE. L'acide α -éléostéarique est marqué en jaune, relié par une fonction ester hydrolysable par les lipases. La chaîne alkyle, liée par une liaison éther non hydrolysable, est représentée en noir.....	46
Figure 17 : Carte de restriction du vecteur de clonage pGEM-T Easy.....	48
Figure 18 : Carte du vecteur pET28a(+).	49
Figure 19 : Répartition des microorganismes producteurs de lipase selon leur biotope d'origine.....	74
Figure 20 : Halos fluorescents des huit isolats, producteurs de lipase, sur gélose à base de la rhodamine-B et d'huile d'olive.	75
Figure 21 : Observations macroscopique et microscopique ($\times 40$ pour les champignons et $\times 100$ pour les bactéries) de chaque genre des isolats isolés.....	75
Figure 22 : Cinétique de production de la lipase par les isolats sélectionnés. (A) Isolats du genre <i>Penicillium</i> sp. P22 et P74. (B) Isolats du genre <i>Geotrichum</i> sp (G110, G58 et G40), <i>Staphylococcus</i> sp. et <i>Bacillus</i> sp.....	77
Figure 23 : Cinétique de croissance cellulaire et de production de lipase de l'isolat P22, après culture en milieu liquide (M.lipase). La culture a été réalisée dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL, comme décrit à la section Matériel & Méthodes (section 1.3). L'activité lipase a été mesurée en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point de données (écart-type moyen) est le résultat d'expériences en triplicats.	77
Figure 24 : Arbre phylogénétique basé sur une phylogénie combinée pour les séquences de gènes ITS1-5.8S-ITS2, benA et CaM montrant la position de la souche <i>Penicillium crustosum</i> Thom P22 dans la grappe qui comprend les espèces <i>Penicillium</i> . Les séquences de la souche <i>Trichocoma paradoxa</i> CBS 788.83 (GenBank accession no. : JN899398) ont été choisies comme hors groupe. Barre, 0,02 substitutions par position de nucléotide. Les nombres aux noeuds ($> 50\%$) indiquent le support des branches internes dans l'arbre obtenu par l'analyse bootstrap (pourcentages de 100 bootstraps). Les numéros d'accension GeneBank sont présentés entre parenthèses. T, souche ex-type; HT, souche holotype; NT, souche néotype.	79
Figure 25 : Purification de la PCrL. (A) Chromatogramme de purification de la PCrL sur la colonne HiTrap MC Q-Sepharose FF. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient de NaCl linéaire de 0 à 200 mM NaCl dans le tampon A. L'activité de la PCrL a été mesurée, comme décrit à la section Matériel et Méthodes (§ 2), en utilisant le TC8 comme substrat. (B) Analyse par SDS-PAGE (12% acrylamide) des protéines éluées. Piste 1, marqueur de masse moléculaire; Piste 2, fraction protéique après précipitation au sulfate d'ammonium (70%); Piste 3, fraction protéique non retenue sur la colonne; Piste 4, fractions actives regroupées éluées de la colonne Q-Sepharose FF de HiTrap.....	84
Figure 26 : Effets de la température et du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL purifiée. (A) Le profil de température (courbe bleue) a été déterminé en mesurant l'activité enzymatique à différentes températures et à pH 9. L'activité de l'enzyme à 37°C a été prise comme 100%. La stabilité de la PCrL à différentes température (courbe rouge) a été déterminée par incubation de l'enzyme à différentes températures pendant 1 h à 37°C. L'activité enzymatique résiduelle a été mesurée à 37°C et pH 9 en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes. (B) Le profil de pH (courbe bleue) a été déterminé dans différents tampons en variant les valeurs de pH de 5 à 11. L'activité maximale obtenue à pH 9 a été considérée comme 100%. La stabilité au pH (courbe rouge) de la PCrL a été déterminée en incubant	

l'enzyme à différentes valeurs de pH, allant de 5 à 11, pendant 1 h à 4°C et l'activité résiduelle a été mesurée à pH de 9 et 37°C en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes..... 86

Figure 27 : Effet de l'orlistat sur l'activité PCrL. Après l'injection de la PCrL, le DMSO (ligne bleue) ou Orlistat dans le DMSO (concentration finale de 53 µM, ligne rouge) a été injecté dans le milieu réactionnel pendant la lipolyse 3 min après le début de la réaction. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes..... 87

Figure 28 : Influence des ions calcium et du NaTDC sur l'activité de la PCrL. (A) Effet de la concentration de Ca²⁺ sur l'activité de la PCrL. L'activité enzymatique a été mesurée à des concentrations croissantes de Ca²⁺ en utilisant le TC8 comme substrat, à 37°C et à pH 9. Le triangle indique l'activité lipase mesurée en l'absence de Ca²⁺ et en présence d'EDTA (10 mM). (B) Effet de concentration croissante de NaTDC sur l'activité de la PCrL en présence de 2 mM de Ca²⁺ en utilisant le TC8 comme substrat, à 37°C et à pH 9..... 89

Figure 29 : Spécificité du substrat de la PCrL. L'activité des lipases a été mesurée en utilisant des émulsions de TC2, TC4, TC6, TC8 ou huile d'olive comme substrat, comme décrit dans la section matériel et méthodes (§ 1.3.1.). ^{a-c}, les moyennes avec des lettres minuscules différentes pour chaque substrat diffèrent significativement (p < 0,05)..... 91

Figure 30 : Régiosélectivité de PCrL envers les TG synthétiques. (A) Cinétique de l'hydrolyse sn-EOO ou sn-OOE par la PCrL. La variation d'absorbance à 272 nm a été enregistrée pendant 10 min pour obtenir la ligne de base, puis pendant 50 min après l'injection de PCrL (0,65 µg par puits). Les enregistrements cinétiques montrés ici sont typiques de ceux obtenus dans trois expériences indépendantes. (B) RI% de PCrL en utilisant sn-EOO ou sn-OOE par rapport à ceux de SML, FSC, TLL, Lecitase, CALA et CALB rapportés dans nos études précédentes (El Alaoui et al., 2017; Eddehech et al., 2021)..... 92

Figure 31 : Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de la PCrL, la Palatase® 20000L et la Lipolase®. L'effet des solvants organiques a été déterminé en incubant chaque enzyme avec le solvant (concentration finale, 25% (v/v)) pendant 24 h. Les activités résiduelles des lipases ont été déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant le TC8 comme substrat à 37°C et pH9, comme décrit dans la section matériel et méthodes, puis exprimé en pourcentage du niveau d'activité en l'absence de solvants organiques. L'activité de l'enzyme sans solvant organique a été prise comme 100%. Chaque mesure représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n=3). ^{a-d} Les moyennes avec des lettres minuscules pour chaque solvant tester différaient considérablement (p < 0,05)..... 95

Figure 32 : Stabilité et compatibilité des lipases testées en présence de détergents à lessive commerciaux (7 mg/mL) et incubées pendant 60 minutes à température ambiante. L'activité enzymatique de l'échantillon témoin, sans additif et incubé dans des conditions similaires, a été prise à 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n=3). ^{a-b} Les moyennes avec différentes lettres minuscules différaient significativement (P < 0,05)..... 98

Figure 33 : Test de performance de lavage des taches de graisses avec un détergent commercial en présence de la PCrL, la Palatase® 20000 L ou la Lipolase®. Le test d'analyse des performances de lavage de la lipase a

été réalisé avec le détergent commercial Ariel (7 mg/mL) en utilisant un chiffon en coton taché avec du jaune d'œuf ou de la sauce tomate. Le tissu taché d'huile a été rincé à l'eau du robinet, lavé avec Ariel (7 mg/mL), lavé avec Ariel additionné de Palatase® 20000 L (500 U/mL), lavé avec Ariel additionné de Lipolase® (500 U/mL), ou lavé avec Ariel additionné de PCrL (500 U/mL).	99
Figure 34 : Spectrogrammes infrarouges des billes de PCrL libre (A), PCrL-SA (B), PCrL-SA-CH (C) et PCrL-SA-ZE (D). Le profil de potentiel FTIR-ATR a été généré à l'aide du logiciel OriginLab OriginPro 2021b v9.8.5.204 (SR1).	104
Figure 35 : Profil DRX des billes SA, SA-CH et SA-ZE seuls et complexés au PCrL. Les modèles DRX ont été générés à l'aide de Match! logiciel (version 3.10.2.173).	105
Figure 36 : Observation microscopiques par MEB des billes (SA, SA-CH et SA-ZE) seuls et complexés à la PCrL.	105
Figure 37 : Cinétique d'adsorption de la PCrL sur le CaCO ₃ et le Celite 545.	106
Figure 38 : Effet de la température sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la PCrL libre et de la PCrL immobilisée. Les enzymes ont été incubées pendant 1 h à différentes températures pour l'étude de la stabilité. Les activités ont été mesurées en utilisant le TC8 comme substrat.	107
Figure 39 : Effet du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la PCrL libre et de la PCrL immobilisée. Les enzymes ont été incubées 1 h, dans différents tampons, à 4°C pour l'étude de la stabilité. Les activités ont été mesurées en utilisant le TC8 comme substrat.	108
Figure 40 : Effet des différents solvants organiques à une concentration de 25% (v/v) sur la stabilité de la PCrL immobilisée. Les activités résiduelles ont été mesurées tout au long des 24 h d'incubation à 40°C.	109
Figure 41 : Cinétique d'estérification de l'acide oléique par la PCrL et PCrL immobilisée. La réaction a été conduite à 40°C sous agitation pendant 24 h en utilisant 500 UI d'enzyme dans l'hexane et un rapport molaire de 3:1 méthanol / acide oléique.	110
Figure 42 : Paramètres thermodynamiques de PCrL libre et immobilisée. Diagramme d'Arrhenius de Ln (K _a) vs 1/Température, pour calculer l'énergie d'activation (E _a).	111
Figure 43 : Analyses par l'électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) des amplifications par PCR réalisées avec la Taq polymérase sur (A) l'ADNc de la PCrL (piste 2) et (B) sur l'ADN de la Lip1 (piste1) et Lip2 (piste2) de l'activité lipase chez S62 et S42, respectivement MM :marqueur de taille moléculaire.	114
Figure 44 : Analyse sur gel d'agarose (0,8%) des produits PCR obtenus par la Taq polymérase sur des clones recombinants. MM : marqueur de taille moléculaire. Pistes 1 à 5 : clones recombinants pour la construction Lip1 et Pistes 6 à 10 : clones recombinants pour la construction Lip2.	115
Figure 45 : Alignement de Lip 1 (LpLip1_T7) par rapport à la séquence du clone obtenu (LpLIP_SP6). Le motif de lipase GX SXG (cadre vert).	115
Figure 46 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) du criblage par PCR effectué avec la Taq polymérase des clones recombinants. MM : marqueur de taille moléculaire ; Piste 1: contrôle négatif d'amplification (bactéries transformées avec pET28b) ; Pistes 2 à 4 : clones recombinants pour la construction Lip1.	116

<i>Figure 47 :Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante obtenue à partir de la construction pET28b-Lip1, pour différentes températures d'induction (30° et 4°C). Protéine Lip1 est matérialisée par un cadre jaune, Pistes 1 et 2 : clone BL21(DE3) transformé par la construction pET28b-Lip1; (-) : clone transformé par le plasmide pET28b-vide.</i>	116
<i>Figure 48 : Alignement multiple de séquences de la PCrL avec la lipase de <i>Penicillium expansum</i> (PDB : 37GN) et <i>Penicillium expansum</i> SM3. Les résidus identiques dans toutes les séquences sont surlignés en rouge, la triade catalytique composée de Ser, Asp et His est indiquée par un astérisque. Les acides aminés encadrés en noir indiquent le couvercle de 8 acides aminés, les premiers 27 acides aminés représentent le peptide signal de l'enzyme.</i>	117
Figure 49 : La structure globale de la lipase de <i>Penicillium crustosum</i> (PCrL). Les hélices α sont étiquetées $\alpha 1$ à $\alpha 5$. Les résidus catalytiques S159, D215 et H268 sont représentés sous forme de bâtonnets CPK tandis que le couvercle (hélice $\alpha 2/95-102$) dans sa conformation ouverte est coloré en rouge. En médaillon : conformation fermée de la lipase PCrL. Le couvercle (hélice $\alpha 2/95-102$) dans sa conformation ouverte est coloré en rouge.	118
Figure 50 : Analyse SDS-PAGE du précipité de protéines obtenu à partir de souches LAB. Piste 1 : marqueurs de masse moléculaire ; Pistes 2, 3 et 4 : les protéines précipitent à partir de <i>Lb. brevis</i> S27, <i>Lb. pentosus</i> S42 et <i>Lb. plantarum</i> S62, respectivement ; Piste 5 : protéines précipitées à partir de bouillon MRS stérile.	125
Figure 51 : Dosage quantitatif de l'activité antimicrobienne des souches LAB.	127
Figure 52 : Croissance de la biomasse (UFC/mL) de <i>L. innocua</i> (a) et <i>E. coli</i> (b) dans le lait pendant 48 h d'incubation à 37°C en l'absence et en présence de 10xCFS de <i>Lb. Plantarum</i> S62.	128
Figure 53 : Biopréservation de la feuille de Pastilla contre <i>R. glutinis</i> en utilisant CFS, NCFS, 10xCFS et 10xNCFS de <i>Lb. plantarum</i> S62.	129

Table des matières

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	4
I. Généralités sur la filière oléicole	4
II. Coproduits de l'industrie oléicole	7
1. Margines.....	7
1.1. Définition.....	7
1.2. Production	7
1.3. Composition physico-chimique	7
1.4. Caractéristiques microbiologiques	8
2. Grignons d'olives.....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Production	9
2.1. Composition physico-chimique	9
2.2. Caractéristiques microbiologiques	10
3. Saumure d'olives.....	10
III. LAB associées aux olives fermentées	11
1. Espèces de LAB probiotiques isolés à partir des olives fermentées.....	11
2. Propriétés antimicrobiennes des bactéries la	12
IV. Généralités sur les lipides	14
1. Introduction.....	14
2. Classification.....	14
3. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse.....	16
3.1. Films monomoléculaires	16
3.2. Émulsions.....	17
3.3. Liposomes.....	17
3.4. Micelles.....	18
V. Généralités sur les lipases.....	19
1. Définition	19
2. Spécificité des lipases	19
3. Propriétés cinétiques :	20
3.1. Cinétique interfaciale	20
3.2. Activation interfaciale : différence entre lipase et estérase	21
4. Aspects structuraux des lipases.....	23
4.1. Repliement α/β hydrolase.....	23
4.2. Triade catalytique.....	24
4.3. Volet amphiphile	24
4.4. Mécanisme d'action des lipases.....	25

5. Lipases microbiennes	27
5.1. Généralités	27
5.1.1. Lipases bactériennes	27
5.1.2. Lipases fongiques	27
5.2. Cas particulier de la lipase de <i>Penicillium</i> sp.	30
5.2.1. Propriétés biochimiques	30
5.2.2. Purification de différentes lipases du genre <i>Penicillium</i>	33
5.2.3. Moisissure de <i>Penicillium</i>	34
6. Applications biotechnologiques des lipases	36
6.1. Détergence	36
6.2. Oléochimie	37
6.3. Industrie alimentaire	38
6.4. Production des monoglycérides	38
6.5. Médecine	39
6.6. Traitement des eaux usées	40
6.7. Biodiesel	40
7. Immobilisation	42
7.1. Immobilisation physique	43
7.1.1. Adsorption	43
7.1.2. Piégeage dans une matrice de polymère	44
7.2. Immobilisation chimique	45
Matériel et méthodes	46
I. Matériel	46
1. Produits chimiques	46
2. Lipides	46
3. Protéines	47
4. Souches microbiennes	47
5. Vecteurs de clonage et d'expression	48
6. Milieux de culture	49
7. Appareillages	50
II. Méthodes	50
1. Isolement, criblage et identification des microorganismes producteurs des lipases à partir des coproduits oléicoles	50
1.1. Biotopes et prélèvement des échantillons	50
1.2. Criblage des souches productrices des lipases	50
1.2.1. Préparation des dilutions et des milieux de culture	50
1.2.2. Numérations par comptage de colonies	51
1.2.3. Purification	51
1.2.4. Identification des isolats	51
1.2.5. Conservations des isolats	52
1.3. Suivi de production d'activité lipase	52
1.3.1. Mesure de l'activité lipase	53
1.3.2. Analyse par la chromatographie sur couche mince	Erreur ! Signet non défini.
1.4. Test d'estérification pour la lipase	54
1.5. Identification moléculaire de la souche P22	54
2. Procédure de purification	56
2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	56
2.2. Chromatographie d'échange d'anions	56

2.3.	Analyse des protéines.....	56
2.3.1.	Dosage des protéines.....	56
2.3.2.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes.....	56
3.	Séquençage des résidus de l'extrémité NH₂-terminale de la PCrL.....	57
4.	Expression de la PCrL et des lipases LAB dans <i>E. coli</i> BL21.....	57
4.1.	Extraction d'ARN totaux de la souche P22 et extraction d'ADN de LAB.....	57
4.2.	Purification des plasmides par midi préparation.....	58
4.3.	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	58
4.4.	Réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse (RT-PCR).....	58
4.5.	Réaction en chaîne par polymérase.....	59
4.6.	Digestion des inserts et du vecteur et la ligation.....	59
4.7.	Transformation de la souche Top10 d' <i>E. coli</i>	60
4.8.	Criblage des clones recombinants, culture et purification.....	60
4.9.	Expression de protéines recombinantes dans <i>E. coli</i> BL21(DE3) avec le plasmide pET28(+).....	60
5.	Modélisation moléculaire et analyse de la structure de la PCrL.....	61
6.	Caractérisation biochimique de la PCrL.....	61
6.1.	Spécificité du substrat.....	61
6.2.	Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la PCrL.....	62
6.3.	Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL.....	62
6.4.	Effet des sels biliaires sur la PCrL.....	62
6.5.	Étude de la dépendance aux ions Ca ²⁺ de la PCrL.....	62
6.6.	Effets de divers ions métalliques sur la stabilité de la PCrL.....	62
6.7.	Effets des inhibiteurs, des agents réducteurs, des réactifs chélateurs sur l'activité PCrL.....	63
6.8.	Performance enzymatique de la PCrL.....	63
6.8.1.	Effet des solvants organiques sur la stabilité de la PCrL.....	63
6.8.2.	Effet de certains additifs détergents sur la stabilité de la PCrL.....	63
6.8.3.	Compatibilité de la PCrL avec les lessives.....	64
6.8.4.	Analyse des performances de lavage de la PCrL.....	64
6.9.	Immobilisation.....	65
6.9.1.	Protocole d'immobilisation par adsorption.....	65
6.9.2.	Protocole d'immobilisation par encapsulation et adsorption-encapsulation.....	65
6.10.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	66
6.11.	Diffraction des rayons X.....	67
6.12.	Microscopie électronique à balayage.....	67
6.13.	Paramètres thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PCrL.....	67
7.	Étude de l'activité antimicrobienne des LAB envers des micro-organismes cibles.....	68
7.1.	Préparation de surnageants acellulaires de souches LAB.....	68
7.2.	Effet de la catalase et de la protéinase-K sur l'activité antimicrobienne des souches LAB.....	68
7.3.	Activité antimicrobienne des souches LAB en utilisant la méthode de superposition.....	69
7.3.1.	Activité antimicrobienne des souches LAB en utilisant la méthode de diffusion en puits.....	69
7.3.2.	Concentration minimale inhibitrice de CFS concentré de souches LAB.....	69
7.3.3.	Etude quantitatif de l'activité antimicrobienne des souches LAB.....	70
7.4.	Analyse SDS-PAGE de peptides antimicrobiens obtenus des souches de LAB.....	70
7.5.	Application des souches LAB antimicrobiennes dans la conservation des aliments.....	70
7.5.1.	Bioconservation du lait.....	70
7.5.2.	Bioconservation de la feuille de Pastilla.....	71
	Résultats et discussion.....	72
	<i>Chapitre I : Isolement, criblage et identification des souches microbiennes à partir des coproduits oléicoles surproductrices de TG lipases d'intérêt industriel et biotechnologique.....</i>	
		72
1.	Introduction.....	73
2.	Analyse microbiologique et le criblage des microorganismes producteurs des lipases (test qualitatif).....	73

3. Suivi de la production d'activité lipasique par les souches sélectionnées	76
4. Identification moléculaire et construction de l'arbre phylogénétique de la souche P22	78
5. Conclusion	80

Chapitre II : Purification, caractérisation biochimique et immobilisation de la lipase de *Penicillium crustosum* Thom P22 : Évaluation des performances en tant que bioadditifs dans les formulations des détergents et biocatalyseurs en synthèse organique..... 81

1. Introduction.....	82
2. Purification de la lipase de <i>Penicillium crustosum</i> Thom souche P22	83
2.1. Purification à homogénéité de la PCrL	83
2.2. Estimation du degré de pureté de PCrL par SDS-PAGE.....	84
2.3. Séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale.....	85
3. Caractérisation biochimique de la PCrL.....	85
3.1. Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la PCrL.....	85
3.2. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL	86
3.3. Effet des inhibiteurs, des ions métalliques et des sels biliaires sur l'activité de la PCrL.....	87
3.4. Spécificité du substrat	90
3.5. Performance enzymatique de la PCrL	93
3.5.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité enzymatique.....	93
3.5.2. Influence de constituants des détergents à lessive sur la stabilité de la PCrL.....	95
3.5.3. Compatibilité de la PCrL avec les détergents à lessive.....	97
3.5.4. Test de performance de lavage des taches de graisses avec la PCrL.....	98
4. Immobilisation de la PCrL et caractérisation de différentes formes de PCrL immobilisées .101	
4.1. Immobilisation par encapsulation et adsorption-encapsulation.....	102
4.1.1. Spectroscopie FTIR-ATR	103
4.1.2. Modèle DRX.....	104
4.1.3. Microscopie électronique à balayage.....	105
4.2. Immobilisation par adsorption.....	105
4.3. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de PCrL immobilisée.....	107
4.4. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL immobilisée.....	107
5. Evaluation de la performance de la PCrL libre et PCrL immobilisée (CaCO ₃) dans la synthèse organique.....	108
5.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité de la PCrL immobilisée	108
5.2. Réaction d'estérification catalysée par la lipase	110
5.3. Paramètres thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PCrL	111
6. Conclusion	112

Chapitre III : Expressions hétérologues et caractérisation de lipases microbiennes..... 113

1. Introduction.....	114
2. Amplification par PCR des gènes codant Lip1, Lip2 et PCrL.....	114
3. Clonage des gènes codant Lip1 et Lip2	114
4. Analyse de la séquence nucléotidique <i>Lip1</i>	115
5. Transformation dans <i>E. coli</i> et expression :	116
6. Modélisation moléculaire et analyse de la structure de la PCrL.....	117
6.1. Alignement de séquences.....	117
6.2. Étude structurale de la PCrL	117
7. Conclusion	119

Chapitre VI : Étude de l'activité antimicrobienne des LAB contre les micro-organismes cibles
..... 120

1. Intoduction.....	121
2. Activité antimicrobienne activity de souches LAB	122
3. Activité antimicrobienne des surnageants de souches LAB.....	123
4. Activité antimicrobienne des protéines précipitées des souches LAB.....	124
5. Analyse par SDS-PAGE du précipité de protéines LAB	125
6. CMI du CFS concentré	126
7. Activité antimicrobienne des souches LAB en milieu liquide.....	126
8. Bioconservation du lait.....	127
9. Bioconservation de la feuille de Pastilla	128
10. Conclusion	129
 Conclusion générale.....	 131
 Perspectives.....	 135
 Références bibliographiques	 136
 Annexe 1.....	 160
 Annexe 2.....	 161

Introduction générale

Une diversité microbienne inattendue existe dans des environnements où on ne soupçonnait pas jusqu'à leurs l'existence de la vie, et qui sont restés de ce fait longtemps négligés. Il s'agit des environnements extrêmes, où règnent des conditions inhospitalières à la plupart des formes de vie (Singh *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). Les coproduits oléicoles (margines, grignons et saumures d'olives) en sont de bons exemples, et représentent un champ d'investigation passionnant. Ces environnements sont connus par leur richesse en cellulose, hémicellulose, lignines, polyphénols, pectines, lipides et protéines (Dermeche *et al.*, 2013), qui pourraient être des substrats de croissance pour les microorganismes (Karam *et al.*, 2017).

L'intérêt porté à ces microorganismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe de producteurs d'enzymes, pouvant présenter des caractéristiques innovantes complètement inattendues. En effet, les enzymes ordinaires ou classiques présentent, des performances relativement peu satisfaisantes au regard des contraintes liées aux procédés industriels, en effet, elles ne sont actives que dans des gammes de températures ou de pH très réduites. Elles sont par exemple inactivées en présence de solvants, ou de concentrations salines élevées (Jorquera *et al.*, 2019; Gullón *et al.*, 2020).

Les conditions défavorables dans les margines et les grignons permettent surtout le développement de moisissures et levures plus que de bactéries. En effet, ces moisissures et levures sont plus adaptées à l'acidité et à la salinité des margines et grignons, et ont une capacité à résister à la toxicité des substances phénoliques (Zaier *et al.*, 2017).

En revanche, les saumures d'olives contiennent plus de bactéries lactiques (*Lactic acid bacteria* ou LAB) (Bonatsou *et al.*, 2017). Ces dernières sont des probiotiques. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (FAO/WHO, 2006), les probiotiques sont des micro-organismes vivants ayant des effets bénéfiques sur la santé du consommateur lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, les LAB sont ainsi utilisées comme probiotiques (Abouloifa *et al.*, 2022). Elles sont non pathogènes et comptées, pour la majorité, parmi les microorganismes à statut QPS (présomption d'innocuité reconnue ou *Qualified Presumption of Safety*) ou GRAS (généralement reconnu comme sans danger ou *Generally Recognized As Safe*) par l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux ou la FDA (*Food and Drug Administration*).

D'autre part, la recherche d'enzymes issues de microorganismes extrêmophiles peut apporter une solution à ces divers problèmes. Les caractéristiques physico-chimiques de ces « extrêmo-enzymes » ou « extrêmozymes » en font des outils particulièrement intéressants pour de nombreuses applications (Arora *et al.*, 2019; Chettri *et al.*, 2021). Ces extrêmozymes peuvent remplacer les enzymes ordinaires ou classiques qui présentent des performances relativement médiocres au regard des contraintes liées aux procédés industriels. De nombreuses applications basées sur les extrêmozymes ont vu le jour et ont été menées avec succès mais d'autres exploitations potentielles restent à découvrir. La biotechnologie industrielle permet d'accéder à cette diversité et la convertir en outils innovants, pour la recherche scientifique et la production industrielle en utilisant plusieurs approches telles que les plans d'expériences, la purification, la caractérisation biochimique, l'expression et la modélisation moléculaire afin de découvrir, optimiser, voire créer des enzymes adaptées à l'usage industriel.

Les lipases sont des enzymes très polyvalentes. Le marché des lipases microbiennes a été estimé à 4,425 milliards USD en 2018 et devraient atteindre 5,59 milliards USD d'ici la fin 2023, avec un taux de croissance annuel de 6,8% (Remonato *et al.*, 2022). Ces enzymes ont une grande importance économique compte tenu de leurs multiples applications industrielles. Ce type d'enzymes est souvent optimisé, purifié et caractérisé pour être utilisé essentiellement dans l'industrie alimentaire comme biocatalyseurs polyvalents, dotés d'un potentiel industriel intéressant comme la synthèse d'arômes, de beurre allégé, d'antioxydants, de biocarburants et de bioplastiques. Elles contribuent aussi au traitement des eaux usées riches en lipides et sont incorporées dans les formulations détergentes pour accélérer l'élimination des résidus gras (Bharathi and Rajalakshmi, 2019). L'emploi des lipases dans les détergents est l'application la plus répandue (Gurkok *et al.*, 2021). Au début, il s'agissait exclusivement de protéases qui éliminaient les taches protéiques (sang, œufs...). Depuis 1988, des lipases apportent une aide précieuse, supplémentaire elles sont capables de fragmenter les taches grasses, dans des conditions douces, en petites particules qui seront facilement évacuées. En outre, elles aident à économiser de l'eau et de l'énergie et à réduire la quantité nécessaire en produits auxiliaires de lavage (Hasan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2019). Cependant, les lipases détergentes commerciales telles que la Lipolase® de *Thermomyces lanuginosus* (anciennement *Humicola lanuginosa*) ou TLL) souffrent encore de certaines limitations, telles qu'une résistance restreinte envers les agents oxydants et les agents de blanchiments, et une compatibilité limitée avec quelques détergents commerciaux solides et liquides (Cherif *et al.*, 2011; Ben Bacha *et al.*, 2018). De ce fait, le criblage de nouveaux microorganismes lipolytiques pourrait faciliter la découverte de

nouvelles lipases détergentes plus performantes. Nous avons donc supposé que les microorganismes indigènes des déchets oléicoles riches en lipides seraient équipés d'un système enzymatique approprié, susceptible d'être composé principalement d'hydrolases ayant des propriétés singulières leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail spécifiquement aux microorganismes producteurs de lipases isolés à partir des coproduits oléicoles, à savoir les grignons et margines issus d'une unité de trituration de l'huile d'olive et de la saumure d'olives provenant d'une conserverie d'olives de table de la région orientale du Maroc. A partir de ces organismes, nous avons pour but de réaliser le criblage de leurs activités lipolytiques et tester par la suite la performance des lipases purifiées dans les domaines de la détergence et de la synthèse organique. Dans ce sens, un champignon, *Penicillium crustosum* Thom P22 producteur de lipases extracellulaires a été sélectionné à la suite d'un criblage en milieu liquide. Puis, une caractérisation biochimique de la lipase purifiée a été investiguée, afin de prédire son efficacité potentielle dans la détergence et la synthèse organique. Cependant, l'utilisation de cette lipase sous forme libre n'ayant pas abouti à des résultats satisfaisants, nous avons eu alors recours à son immobilisation pour améliorer ses caractéristiques fonctionnelles. De plus, l'application de composés naturels des trois souches de LAB : *Levilactobacillus brevis* S27, *Lactiplantibacillus pentosus* S42, et *Lactiplantibacillus plantarum* S62 isolées de la saumure d'olive vertes fermentées (LAB et/ou leurs composés antimicrobiens) en tant qu'agents bio-conservateurs a été réalisée pour limiter l'utilisation des composés chimiques, et le développement d'un nouvel aliment fonctionnel.

Ainsi, les objectifs que nous nous sommes fixés dans ce travail sont :

- L'isolement, le criblage et l'identification de souches microbiennes surproductrices de lipases d'intérêt industriel et biotechnologique.
- L'identification et l'optimisation de la production de l'activité lipase par la souche *Penicillium crustosum* Thom P22
- La purification et la caractérisation biochimique de la lipase de la souche *Penicillium crustosum* Thom P22
- L'immobilisation de la lipase native de la souche *Penicillium crustosum* Thom P22
- Le clonage et l'expression hétérologue des gènes *lipPCr* de *Penicillium crustosum* P22, les gènes *lip1* de *Lactiplantibacillus plantarum* S62 et *lip2* de *Lactiplantibacillus pentosus* S42 dans *E. coli*.
- L'application des souches LAB et de leurs composés antimicrobiens comme agents bio-conservateurs dans les produits alimentaires

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la filière oléicole

L'olivier est une plante agricole de nombreux pays à climat méditerranéen, il occupe une superficie mondiale d'environ 11 193 000 hectares. Au Maroc, l'olivier est la principale espèce fruitière cultivée. Il s'adapte très bien aux conditions climatiques marocaines. Il occupe une superficie d'environ 1 073 000 hectares (Filière oléicole | Ministère de l'agriculture, Maroc), répartis entre les terres non irriguées entièrement dépendantes des précipitations et les terres irriguées, avec une production totale d'olives de 3 099 500 tonnes et une production d'huile d'olive de 2 729 500 tonnes/an (IOOC, 2022/2023).

La production d'huile d'olive revêt une importance vitale pour l'économie et la vie sociale dans la plupart des pays méditerranéens tels que l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Tunisie et le Maroc. Le Conseil oléicole international estime que le rendement total de l'huile d'olive pour la saison 2019/2020 a atteint 3,67 millions de tonnes, dont 96% proviennent des pays méditerranéens, notamment du côté européen (Italie, Grèce, Espagne...) (El Gnaoui *et al.*, 2020). Sur le marché international de l'huile d'olive, le Maroc représentait 2,6% du total des exportations.

Actuellement, le Maroc est le 6^{ème} producteur mondial d'huile d'olive derrière l'Espagne, l'Italie et la Grèce, la Tunisie et la Turquie (El Qarnifa *et al.*, 2019). Le gouvernement marocain a fourni des efforts importants pour améliorer le secteur oléicole en introduisant de nouvelles variétés plus productives et mieux adaptées au climat des différentes régions marocaines. Aussi, depuis l'adoption de la stratégie du "Plan Maroc Vert", de nouvelles plantations d'oliviers, ainsi que l'intensification et la réhabilitation des vergers nationaux d'oliviers ont eu lieu, entraînant ainsi une augmentation progressive de la superficie couverte par les oliviers. Cependant, cette activité est souvent associée à la production de quantités importantes de coproduits liquides (margine) ou solides (grignons), ce qui représente un grave problème environnemental, avec une charge organique élevée et une composition chimique qui les rend résistants à la dégradation (Calvano *et al.*, 2022). Au Maroc, la production annuelle des margines dépasse 250 000 m³. De plus, l'extraction de l'huile d'olive peut générer jusqu'à 30 à 40% de déchets solides, en fonction de son humidité et de la teneur en fractions d'olives dans le fruit, ainsi que du processus d'extraction (Bouknana *et al.*, 2021).

Il existe essentiellement trois types de procédés d'extraction d'huile d'olive : (i) les procédés traditionnels discontinus (pressoirs), (ii) les procédés continus biphasés et (iii) les procédés continus triphasés (Matos *et al.*, 2010) qui sont décrits dans la figure 1.

- i Le système traditionnel est utilisé depuis des siècles et les opérations sont exécutées de façon discontinue. La pâte est située entre les tapis de pressage et la pression est appliquée pour obtenir d'une part une fraction solide (grignon), et d'autre part, le mélange d'huile et d'eau, qui est déversé dans un réservoir, et avec suffisamment de temps, l'huile et l'eau se séparent (Figure 1).
- ii Le système continu à trois phases, où la première étape se déroule dans un décanteur trois phases (solides insolubles, phase huileuse et phase aqueuse) qui sont séparés en fonction de leurs densités. La phase insoluble (grignon) est libérée et la phase huileuse, qui reste avec 2 à 5% de gouttelettes d'eau et de solides, nécessite une centrifugation finale. Dans ce processus, certaines quantités d'eau sont ajoutées (pour séparer et nettoyer l'huile) pour obtenir une huile clarifiée d'une part, et des impuretés solides et de l'eau résiduelle, d'autre part (Figure 1) (Baccioni *et al.*, 2014). En raison du problème des eaux usées générées, ce système à trois phases est remplacé par le système à deux phases parce qu'il est plus respectueux de l'environnement (Nunes *et al.*, 2016), bien qu'il existe une nouvelle génération de décanteurs à trois phases (appelés décanteurs à faible consommation d'eau) où seulement 15 à 30% d'eau sont nécessaires (Baccioni *et al.*, 2014).
- iii Le système de deux phases dans lequel une phase semi-liquide (eau de végétation et solides insolubles) et une phase huileuse sont obtenues (Figure 1). La phase semi-liquide est un polluant important en raison de la grande quantité de substances organiques telles que les polyphénols ou les protéines (Gullón *et al.*, 2020).

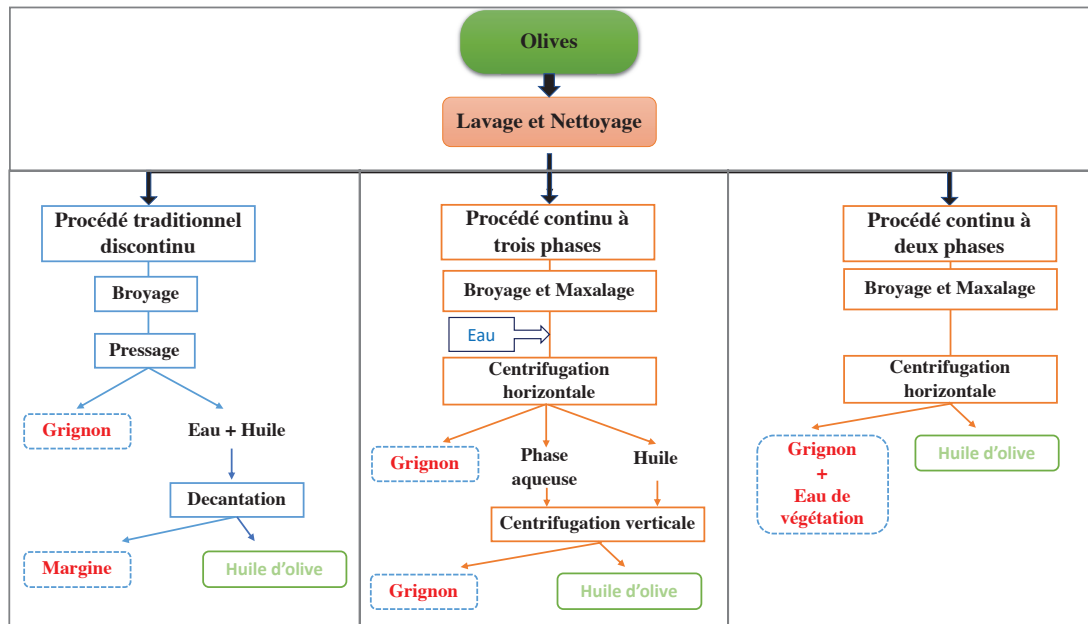


Figure 1 : Procédés d'extraction de l'huile d'olive (d'après (Gullón *et al.*, 2020) avec modifications).

II. Coproduits de l'industrie oléicole

1. Margines

1.1. Définition

Les margines sont considérées comme les déchets les plus critiques produits par l'oléiculture, tant en quantité qu'en qualité. Ces eaux usées liquides sont composées d'eau de végétation des olives, d'eau de lavage et de traitement, d'une partie de la pulpe d'olive et de petites quantités d'huile. La couleur brunâtre foncée de la marge a été attribuée à la polymérisation des tanins et des composés phénoliques polymériques de structure semblable à la lignine (Foti *et al.*, 2021).

1.2. Production

La gestion des margines est un enjeu très important dans les pays méditerranéens. D'énormes quantités de margines sont rejetées dans l'environnement chaque année sur une courte période (de novembre à début janvier) et leur évacuation incontrôlée crée un problème environnemental important : environ 30 millions de m³ de margines sont rejetés chaque année. Les quantités de margines générées au Maroc sont estimées à plus de 250 000 m³ par an (El Yamani *et al.*, 2020).

1.3. Composition physico-chimique

En général, la principale caractéristique des margines est la présence de composés organiques comme les acides organiques, les lipides, les alcools et les polyphénols qui transforment la marge en matière phytotoxique, ce qui représente un grand danger pour l'environnement lorsqu'il n'est pas correctement géré. Sur la base de ces propriétés résumées dans le tableau 1, les margines sont considérées comme des environnements extrêmes.

Les valeurs de la demande chimique en oxygène (DCO) varient normalement de 30 à 320 kg/m³; la demande biochimique en oxygène (DBO) n'est pas couramment déterminée, mais elle varie de 35 à 130 kg/m³. Les margines contiennent également des matières intéressantes telles qu'une forte concentration de matière organique et un certain nombre de nutriments, en particulier le potassium qui pourrait être recyclé comme engrais potentiel. Les margines contiennent également des quantités variables de sucres selon le cultivar d'olivier, les conditions climatiques pendant la croissance, et les méthodes d'extraction utilisées. Les niveaux de sucre sont généralement de 1,6 à 4,0% (*m/v*), mais peuvent être plus élevés dans de rares cas. Les sucres constituent jusqu'à 60% de la substance sèche et, par ordre décroissant, ils sont composés de fructose, mannose, glucose, saccharose et de traces de pentose (Kiritsakis and Sakellaropoulos, 2017).

Les composés phénoliques sont présents dans les margines avec plus de 30 composés phénoliques identifiés. Les flavonoïdes correspondent à environ 45 à 65% de la teneur en phénols des margines. Les principaux sous-groupes de flavonoïdes des margines sont les flavanols et les proanthocyanidines (Kiritsakis and Sakellaropoulos, 2017).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des margines d'olives.

Caractéristiques	Valeur	Références
pH	2,2-5,9	(Lee <i>et al.</i> , 2019)
Carbone total (%)	2,0-3,3	(Solomakou <i>et al.</i> , 2021)
Composés organiques (%)	4-18	(Solomakou <i>et al.</i> , 2021)
Azote total (%)	0,5-2,0	(El Yamani <i>et al.</i> , 2020)
Cendres (%)	1,0	(Dermeche <i>et al.</i> , 2013 ; Foti <i>et al.</i> , 2021)
Lipides (%)	1,6-9,8	(Rocha <i>et al.</i> , 2022)
Sucres totaux (%)	5,0-12,0	(Foti <i>et al.</i> , 2021)
Phénols totaux (%)	0,03-18,90	(Ntougias <i>et al.</i> , 2013)

(% *m/m*) de la matière organique totale

1.4. Caractéristiques microbiologiques

Plusieurs travaux publiés révèlent que certains microorganismes sont capables de se développer dans les margines (Ntougias *et al.*, 2013; El Yamani *et al.*, 2020; Magdich *et al.*, 2020). Ils ont rapporté que le microbiote des margines d'olives semble provenir du sol et de l'eau de végétation, tandis que les pratiques de culture et de récolte ont fortement influencé la communauté microbienne constituée d'espèces d'*Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalara*, *Fusarium*, *Lecytophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phycomyces*, *Rhinochadiella* et *Scopulariopsis* (Kiritsakis and Sakellaropoulos, 2017; Misbah *et al.*, 2019). La densité microbienne dans les margines varie de 10^5 à 10^6 unités formant des colonies (UFC)/mL, comprenant plusieurs types de bactéries, de levures et de moisissures (Foti *et al.*, 2021). Les espèces de champignons les plus rencontrées dans les margines sont *Penicillium cyclopium* (40 à 80%) et *Geotrichum candidum* (0 à 45%). Les moisissures et les levures sont capables de se développer plus que les bactéries dans les margines, puisqu'elles sont plus adaptées à l'acidité et à la salinité des margines et elles résistent à la toxicité des substances phénoliques (Zaier *et al.*, 2017).

2. Grignons d'olives

2.1. Définition

Les grignons d'olives sont les résidus solides obtenus après la trituration de l'huile d'olive. Ils sont composés de la peau et des résidus de la pulpe et des fragments de noyaux. Ils peuvent également contenir des résidus d'huile et une grande quantité d'eau selon la variété d'olives, et selon surtout le procédé d'extraction utilisé (Difonzo *et al.*, 2021).

2.2. Production

La production de grignons d'olives au Maroc est estimée entre 600 000 à 700 000 tonnes/an, selon le tonnage d'olives destinées à la trituration et de la technologie d'extraction de l'huile (Doughmi *et al.*, 2022). En moyenne, 1000 kg d'olives produisent 200 kg d'huile avec une quantité de grignons qui varie selon le système d'extraction utilisé (Cf. figure 1). En effet, 400 et 550 kg de grignons d'olive sont générés dans le système traditionnel et dans le système continu à trois phases, respectivement. La quantité de grignons évacuée par les huileries utilisant le système d'extraction continu à deux phases est beaucoup plus importante 800 kg (Medouni-Haroune *et al.*, 2018).

2.1. Composition physico-chimique

La composition physico-chimique des grignons d'olives varie dans de très larges gammes (Tableau 2). Elle dépend principalement des facteurs intrinsèques du fruit (variété, stade de maturation) et du processus d'extraction de l'huile (Ferhat *et al.*, 2014). Les principaux constituants sont la cellulose, les protéines, et les grignons renferment une teneur en humidité assez élevée. Le grignon d'olive contient également des polyphénols. Une quantité importante d'acides phénoliques est retenue dans le grignon d'olive, comme l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide caféique et l'acide férulique (Kiritsakis and Sakellarpoulos 2017).

Tableau 2 : Composition physico-chimiques des grignons d'olives.

Paramètres	(Mamkagh <i>et al.</i> , 2022)	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2020)	(Morillo-Pérez <i>et al.</i> , 2009)
pH	5,4	5,6	4,9-6,8
Humidité (%)	-	-	49,6-71,4
Cellulose (%)	40,77	8,60-10,90	17,3-33,7
Hémicellulose (%)	33,63	10,28-12,40	15,3-38,7
Lignine (%)	19,5	42,48-45,72	19,8-47,5
Protéine (%)	2,48	3,80-8,82	6,7-7,2
Lipide (%)	2,33	2,68-21,34	3,76-18
Phénol (%)	-	1,5	0,5-2,4

(% m/m) de la matière organique totale

2.2.Caractéristiques microbiologiques

Les grignons d'olives renferment une charge microbienne importante, qui a été décrite comme étant très similaire à celles d'autres sous-produits de l'olive tels que les margines et l'eau de rinçage. Elle comprend des bactéries et des champignons, notamment des espèces des genres *Agrococcus*, *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Streptococcus*, *Sinorhizobium*, *Olivibacter*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Pleomorphomonas*, *Azoarcus*, *Starkeya* et d'autres bactéries, tandis que les champignons sont principalement affiliés aux genres *Penicillium*, *Phellodon*, *Lachancea*, *Saccharomyces* et *Candida* (Kiritsakis and Sakellaropoulos, 2017; Jmeii *et al.*, 2019). Le fait que ces microorganismes soient bien adaptés aux conditions extrêmes (acidité, salinité, polyphénols...), les rend attractifs pour la biodégradation des déchets oléicoles. Ces microorganismes peuvent être utilisés pour d'autres applications *in vitro*, grâce à leurs propriétés biotechnologiques telles que la capacité à produire des enzymes à intérêt industriel (Chandra *et al.*, 2020; Okpara, 2022).

3. Saumure d'olives

Les saumures utilisées pour la fermentation et la conservation des olives de table doivent être constituées exclusivement de solutions de sel alimentaire. Les sucres et les additifs alimentaires peuvent être utilisés pour contrôler la qualité du produit fini. Les olives fermentées sont considérées comme la pierre angulaire de la pyramide du régime méditerranéen, et le Conseil Oléicole International (COI) estime la production mondiale d'olives de table à environ 3 099 500 tonnes pour la saison 2022/2023 (IOC, 2022/2023). Les olives fermentées sont essentiellement transformées selon des procédés traditionnels et industriels (Rokni *et al.*, 2015). Le procédé industriel (style espagnol) est basé sur le traitement alcalin des olives, dans une solution de NaOH à 2-2,5% (*m/v*), suivi d'un lavage avec de l'eau du robinet et de saumurage à 10-12% (*m/v*) de NaCl, tandis que dans le procédé traditionnel, les olives (entières ou concassées) sont directement saumurées à environ 5% de NaCl.

Dans les deux cas, les olives sont soumises à un processus de fermentation naturelle, assuré par le microbiote contaminant les olives, et présent dans les contenants et l'environnement. Le processus naturel de fermentation des olives se déroule dans un environnement extrême, caractérisé par une faible teneur en nutriments et une teneur élevée en polyphénols et NaCl. Ces conditions permettent au microbiote survivant dans cet environnement extrême, principalement composé de LAB et de levures (Bonatsou *et al.*, 2017), de devenir une source importante de probiotiques.

III. LAB associées aux olives fermentées

1. Espèces de LAB probiotiques isolés à partir des olives fermentées

En raison des bienfaits des olives fermentées et de l'huile d'olive pour la santé du consommateur, la diète méditerranéenne est inscrite depuis 2013 sur la liste UNESCO du patrimoine culturel immatériel de l'humanité dans certains pays méditerranéens (Chypre, Croatie, Espagne, Grèce, Italie et Maroc) (*UNESCO - Mediterranean diet*, 2013). Ceci est lié aux effets positifs de la diète méditerranéenne dans la réduction du risque de maladies chroniques majeures, à savoir les maladies cardiaques, les cancers, la maladie d'Alzheimer et le diabète (Singh *et al.*, 2014; Gotsis *et al.*, 2015).

Selon la FAO/OMS (FAO/WHO, 2006) les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui confèrent des bienfaits pour la santé à l'hôte, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, notamment en inhibant les agents pathogènes, en stimulant la réponse immunitaire protectrice (Lavermicocca *et al.*, 2010), et ils sont considérés comme un outil très prometteur pour le traitement de maladies immunitaires (Hill *et al.*, 2014).

Les principales espèces isolées à partir d'olives fermentées, et précédemment citées pour leurs propriétés probiotiques sont rapportées dans le tableau 3.

Tableau 3 : LAB probiotiques isolées à partir d'olives fermentées.

Espèce	Source (variété d'olive)	Pays	Références
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> LPG1	Gordal	Espagne	(Benítez-Cabello <i>et al.</i> , 2020)
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Picholine marocaine	Maroc	(Abouloifa <i>et al.</i> , 2020)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Manzanilla	Espagne	(Benítez-Cabello <i>et al.</i> , 2020)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Picholine marocaine	Maroc	(Abouloifa <i>et al.</i> , 2022)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Manzanilla	Espagne	(Portilha-Cunha, Macedo and Malcata, 2020)
<i>Enterococcus faecium</i>	-	Turquie	(Yalçinkaya and Kılıç, 2019)
<i>Enterococcus faecium</i>	Tonda di Cagliari	Italie	(Comunian <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lactococcus formosensis/garviae</i>	Manzanilla	Espagne	(Portilha-Cunha, Macedo and Malcata, 2020)
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	Kalamata	Grèce	(Papadelli <i>et al.</i> , 2015)

2. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les LAB sont connues pour leur capacité de produire une grande variété de composés antimicrobiens (Figure 2), dont les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique, acide propionique, acide butyrique, acides hydroxy-phényllactique et phényllactique), le peroxyde d'hydrogène, les acides gras, le diacétyle, des composés protéiques (peptides cycliques et bactériocines), la reutéline et les biosurfactants (Mun *et al.*, 2019; Abouloifa *et al.*, 2022).

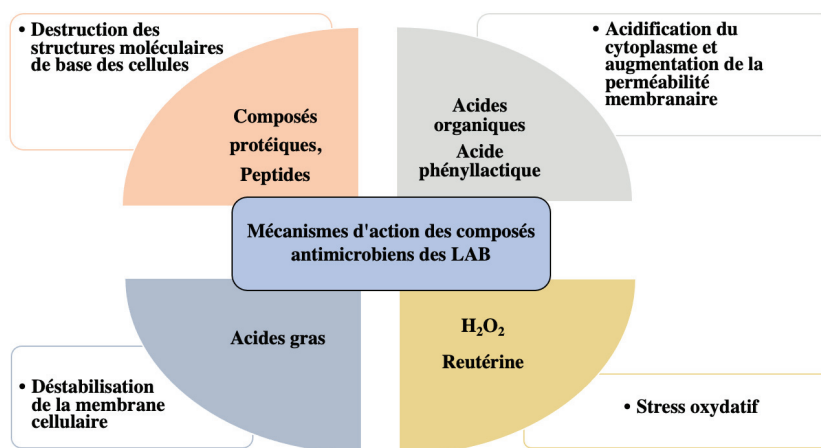


Figure 2 : Mécanismes d'action des composés antimicrobiens dérivés des LAB (D'après (Abouloifa *et al.*, 2022) avec modifications).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mettre en évidence cette activité contre les micro-organismes. La détermination de l'activité antimicrobienne par la cellule LAB viable est effectuée par des méthodes de superposition et de confrontation (Magnusson and Schnürer, 2001; Eddine *et al.*, 2021). La méthode de superposition, se base sur l'apparition de zones d'inhibition (zone claire) autour des stries de LAB. Cette zone met en évidence l'efficacité de l'inhibition. La méthode de confrontation permet d'évaluer l'inhibition de la sporulation des champignons. De plus, les méthodes de diffusion de puits et de disque sont d'autres approches pour déterminer l'activité antimicrobienne du surnageant acellulaire (*cell-free supernatant* ou CFS) de LAB. L'efficacité de l'activité antimicrobienne est enregistrée en mesurant les diamètres d'inhibition (zones claires) autour des puits ou du disque (Magnusson and Schnürer, 2001; Arrioja-Bretón *et al.*, 2020).

Les autres méthodes consistent à évaluer la croissance des microorganismes en utilisant le surnageant acellulaire (CFS) de LAB. La méthode de microdilution consiste à évaluer le pourcentage d'inhibition de la croissance des microorganismes après incubation dans des conditions optimales en mesurant la densité optique (DO) (Lavermicocca *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2023). L'inhibition de la croissance du mycélium a été déterminée en milieu solide, en

mesurant le mycélium des champignons en présence et en absence de CFS. Par ailleurs, l'inhibition de la croissance de la biomasse des champignons par le CFS a été évaluée en milieu liquide, en mesurant la biomasse des champignons traités par rapport au témoin qui ne contient que les champignons (Muhialdin and hassan, 2011; Abouloifa *et al.*, 2022).

IV. Généralités sur les lipides

1. Introduction

Les lipides constituent l'une des quatre grandes classes de composés biologiques (avec les glucides, les protéines et les acides nucléiques) présents dans tous les organismes vivants. Ils se distinguent des autres composants de la matière vivante par leur insolubilité dans l'eau, ils n'ont pas d'homogénéité de structure mais ils sont souvent constitués par un squelette carboné aliphatique, cyclique ou polycyclique, constituant la partie hydrophobe, sur laquelle peuvent être fixés des groupements polaires, constituant la partie hydrophile. Cette catégorie de biomolécules était réduite à un mélange de graisses solides et d'huiles fluides (concept de H. Braconnot, 1815) (Chevreul, 1815), c'est M.E. Chevreul qui proposa en 1823 la structure générale des triglycérides (TG) et une classification en deux divisions et six genres, basée sur une propriété physique (distillation) et une propriété chimique (saponification) (Chevreul, 1889). A la lumière de ces découvertes, les connaissances sur les structures et les fonctions des lipides va évoluer. Quelques années plus tard, en 1847, vint la découverte des lipides phosphorés par Gobley dans le cerveau et l'œuf de poule. Puis les chimistes américains ont rapidement intégré la découverte de nombreux phospholipides et glycolipides.

Les lipides regroupent les graisses, les huiles, les cires et certaines substances qui leur sont apparentées (stérols, stéroïdes, terpènes, etc...). Parce qu'ils ne sont pas chargés électriquement, les glycérides (acylglycérols) ainsi que le cholestérol et ses esters sont appelés lipides neutres. Chez les êtres vivants, les lipides assurent quatre fonctions principales :

- Les glycérides et les cires constituent des réserves énergétiques.
- Les phospholipides constituent les éléments structuraux universels des biomembranes.
- Certains lipides agissent comme seconds messagers intra et inter cellulaires tels que les facteurs d'activation des plaquettes (PAF), les hormones etc...
- Certains lipides sont doués d'une activité biologique essentielle comme certaines vitamines liposolubles (A, D, E, K).

2. Classification

Selon Bloor, (1920), les lipides peuvent être classés en trois classes : Lipoïdes simples, Lipoïdes complexes et Lipoïdes dérivés. Cette classification sera reprise et légèrement complétée par de nombreux auteurs modernes (Hilditch, 1949; Christie, 1973; Kates, 1986). Dans la suite logique de cette définition mais compte tenu de leur propriété amphiphile, les lipides ont aussi très souvent été classés en lipides « non polaires » incluant le carotène, le

limonène, le géraniol ou encore le squalène et en lipide « polaire » subdivisé en trois classes (Small, 1968) (Figure 3). Les lipides polaires de la classe I sont insolubles dans l'eau et peuvent former des films monomoléculaires stables à l'interface air/eau, ce sont les TG, diglycérides et cholestérol. Les lipides polaires de la classe II peuvent former des monocouches lipidiques stable, mais ils ont la propriété de s'hydrater (gonflement) pour des liposomes. On trouve dans cette catégorie les phospholipides, les monoglycérides et les acides gras ionisés. Les lipides polaires de la classe III sont partiellement solubles dans l'eau et la surface de l'eau, ils forment des films monomoléculaires instables. En fonction de leur concentration, ils peuvent s'organiser soit en monomère soit en micelle, c'est le cas des lysophospholipides et les sels biliaires (Figure 3).

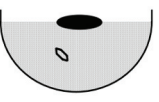
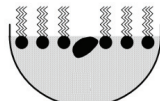
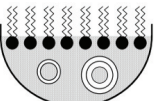
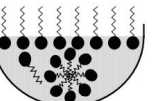
Lipides non polaires	Totalement insolubles dans l'eau Ne forment pas de films monomoléculaires  Hydrocarbures paraffiniques et aromatiques, carotène, cholestane, etc...		
	Classe I Forment des films monomoléculaires stables: • Triglycérides • Diglycérides • Cholestérol Ne présentent pas le phénomène de gonflement 	Classe II Forment des films monomoléculaires stables: • Phospholipides • Monoglycérides • Acides gras ionisés Présentent le phénomène de gonflement 	Classe III Forment des films monomoléculaires instables: • Sels biliaires • Lysophospholipides Présent sous forme de micelles et de monomères 

Figure 3 : Représentation schématique du comportement des lipides en présence d'eau et l'interface air/eau. Classification selon (Small, 1968).

Plus récemment et afin de constituer une base de données globale des lipides, une nouvelle classification des lipides basée sur leur nature chimique a été proposée (Fahy *et al.*, 2005; Liebisch *et al.*, 2020). Les auteurs ont choisi de classer les lipides en huit familles qui sont : acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, prénols, saccharolipides et polycétides. Tous les lipides et leurs métabolites sont disponibles sur la banque de données LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>). Un exemple de structure de chaque catégorie est présenté en figure 4.

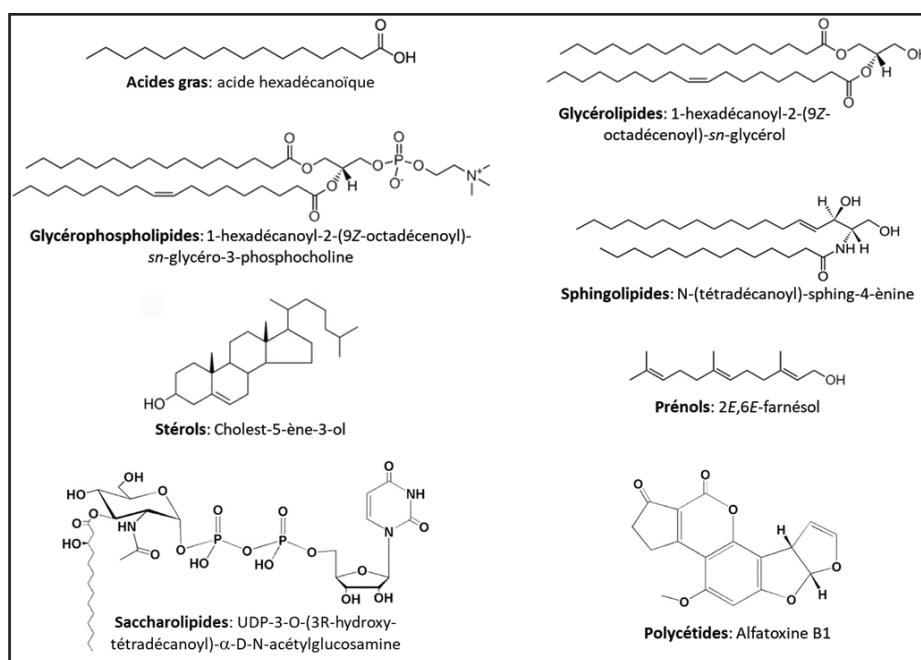


Figure 4 : Structures représentatives des 8 différentes catégories de lipides suivant LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) (adapté de (Fahy et al., 2005)).

3. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse

Le caractère amphiphile des lipides leur confère la possibilité de s'auto-organiser en milieu aqueux. Ils forment spontanément des films monomoléculaires, des émulsions, des liposomes ou des micelles.

3.1. Films monomoléculaires

Au contact avec l'eau et après évaporation du solvant contenant les lipides, ces derniers sont amphiphiles et vont obtenir une orientation spécifique à l'interface air/eau. La région polaire hydrophile (contenant les groupements carboxyles ou hydroxyles ayant une forte affinité pour l'eau) pointent vers l'eau et la région hydrophobe apolaire qui n'établit pas de relation avec l'eau pointent vers l'air (Figure 5). Durant la compression isothermique d'un tel film, différentes phases lipidiques peuvent être observées (Figure 5) (Nepal and Stine, 2018). On distingue ainsi les films gazeux dans lesquels les molécules sont largement séparées et la pression de surface est très faible, les liquides expansés (LE) dans lesquels les molécules sont plus proches les unes des autres et ordonnées comme un liquide bidimensionnel, et les liquides condensés (LC) dans lesquels les molécules sont bien ordonnées comme dans un cristal liquide bidimensionnel. A des pressions de surface très élevées, des phases bidimensionnelles de type solide peuvent être observées pour certains composés. La compression de la monocouche au-delà de sa limite de stabilité entraîne un effondrement en structures tridimensionnelles (Figure 5). Les monocouches de phospholipides, également appelées monocouches de Langmuir, sont

également utiles pour certaines études, en raison de leur homogénéité, de leur stabilité et de leur géométrie plane. Les interactions des protéines avec les phospholipides à l'interface air-eau des monocouches lipidiques fournissent un modèle unique, par exemple, pour étudier la séparation des phases membranaires et les mécanismes par lesquels les protéines s'insèrent dans les membranes. La déformation membranaire par les protéines a également été étudiée à l'aide d'une monocouche lipidique combinée à la microscopie électronique. La densité lipidique bidimensionnelle peut être contrôlée en comprimant la monocouche, ce qui offre des avantages pour des tests biochimiques spécifiques (Zhao *et al.*, 2012).

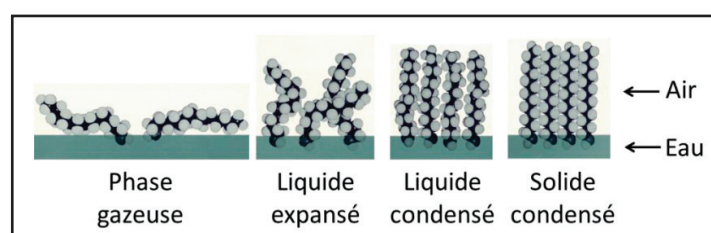


Figure 5 : Formation du film monomoléculaire à l'interface air-eau (d'après (Cadenhead, 1969) avec modifications).

3.2.Émulsions

L'émulsification en milieu aqueux d'un lipide de la classe I (Cf. Figure 3) est un processus physicochimique qui provoque une augmentation considérable de la surface de contact lipide/eau. Ainsi, la surface d'une goutte d'huile initiale de 1 cm de diamètre est augmentée d'un facteur 10^4 au cours de l'émulsification en particules de 1 μm de diamètre. La vitesse d'hydrolyse des TG par les lipases dépend entre autres de leur degré d'émulsification. *In vivo*, cette émulsion est stabilisée grâce principalement à la présence de phospholipides.

3.3.Liposomes

Lorsqu'ils sont mélangés à de l'eau, les lipides de la classe II (Cf. Figure 3) qui présentent un phénomène de gonflement en phase aqueuse, peuvent former de petites sphères microscopiques appelées liposomes (Figure 6). Ces derniers sont des bicouches sphériques de lipides en milieu aqueux, qui ressemblent étroitement à la structure d'une membrane cellulaire naturelle, ce qui en fait l'une des principales approches pour étudier les interactions protéines-lipides. En général, les liposomes sont regroupés en plusieurs types en fonction de leur taille et de leur morphologie, comme que la vésicule multilamellaire (MLV), la vésicule unilamellaire géante (GUV), la grande vésicule unilamellaire (LUV) et la petite vésicule unilamellaire (SUV) (Herianto *et al.*, 2022).

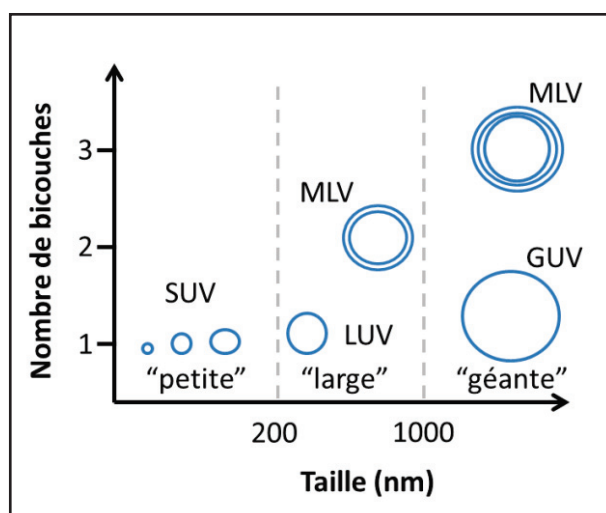


Figure 6 : Représentation schématique des différents types de liposomes en fonction de la taille et de la lamellarité (d'après (Lorin et al., 2004) avec modification).

3.4.Micelles

Au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), les lipides polaires de la classe III (Cf. figure 3) s'auto-assemblent en micelles sphériques. Les micelles sont des monocouches de polymères auto-assemblés d'une taille moyenne de 5-10 nm, tandis que les liposomes sont des bicouches de polymères auto-assemblés. Les micelles sont des sphères creuses délimitées par une couche de lipides dont les groupements polaires restent en contact avec l'eau et dont les queues pointent vers le centre comme décrit dans la Figure 7A. Ce noyau hydrophobe peut accueillir des médicaments hydrophobes via des interactions hydrophobes. L'enveloppe micellaire, qui possède des unités hydrophiles, va interagir avec les molécules d'eau entourant la micelle. Cela aide à la stabilisation des micelles préparées dans une solution aqueuse (Perumal *et al.*, 2022). Il existe d'autres types de micelles, notamment la micelle mixte formée de molécules hétérogènes. Ces dernières se retrouvent *in vivo* lors de la digestion, où un sel biliaire est complexé avec les produits d'hydrolyse des TG (acide gras libre, monoglycéride) ou des phospholipides (lysophospholipides) (Figure 7B). Des micelles inverses se forment lorsque les lipides polaires sont mis en suspension avec un excès de solvant organique (Figure 7C).

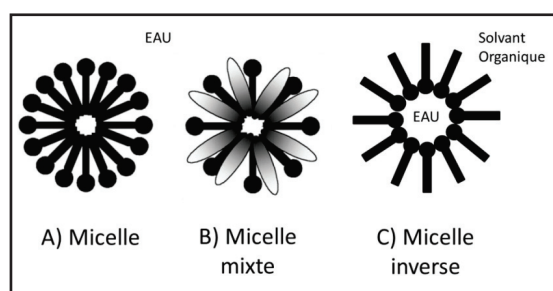


Figure 7 : Représentation schématique des différents types de micelles (d'après (El Alaoui, 2015)).

V. Généralités sur les lipases

1. Définition

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) sont des carboxylester hydrolases lipolytiques qui catalysent l'hydrolyse des TG à longue chaînes (Figure 8). Cette réaction d'hydrolyse se déroule à l'interface lipide-eau (Ben Ali, *et al.*, 2012). Ces enzymes sont aussi des catalyseurs utilisés dans de nombreux procédés biotechnologiques basés sur la synthèse d'esters en milieu organique peu hydraté à travers les réactions de transestérification (alcoololyse) et d'interestérification (acidolyse). Les lipases ont des origines variées : microorganismes (bactéries, champignons), végétaux (graines oléagineuses) et monde animal (tissu adipeux, organes digestifs...) (Nimkande *et al.*, 2022).

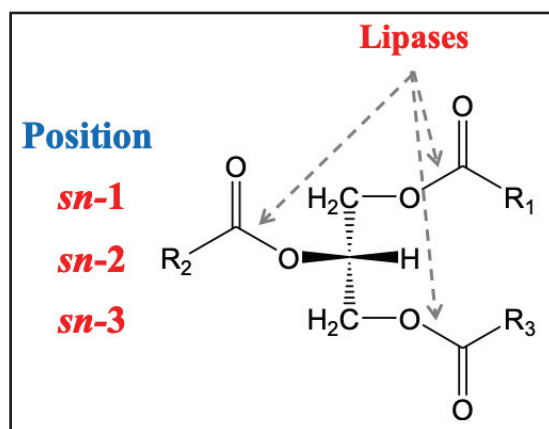


Figure 8 : Liaisons esters carboxyliques de TG hydrolysables par les lipases (*sn* : numérotation stéréospécifique).

2. Spécificité des lipases

Même si les lipases acceptent une large gamme de substrats, leur intérêt réside essentiellement dans leur sélectivité. Ainsi, on distingue différents types de sélectivité des lipases vis-à-vis des acylglycérols:

- La **régiosélectivité**, qui désigne le pouvoir de l'enzyme à hydrolyser préférentiellement les liaisons esters carboxyliques en positions externes *sn*-1 et *sn*-3 (esters d'alcool primaire) par rapport à la position interne *sn*-2 (ester d'alcool secondaire). C'est le cas par exemple des lipases de *Rhizopus oryzae* (Canet *et al.*, 2017), *Thermomyces lanuginosus* (He *et al.*, 2017), *Janibacter* sp. (Cui *et al.*, 2022) et *Penicillium expansum* (Cai *et al.*, 2022).

- La **typosélectivité**, qui désigne la spécificité des lipases par rapport à un type d'acide gras (longueur de la chaîne carbonée, le nombre et la position des doubles liaisons...). A titre d'exemple, la lipase de *Geotrichum candidum* hydrolyse avec une très grande sélectivité les

liaisons esters contenant un acide gras avec une insaturation $Z-\Delta^9$, quelle que soit sa position sur le glycérol (Mase *et al.*, 1995; Jadhav and Annapure, 2022).

• **L'énantiosélectivité** traduit la capacité de discrimination entre deux énantiomères dans le cas d'un mélange racémique de 1,2- et 2,3-*sn*-diacylglycérol et dans le cas d'un TG chiral. Dans le cas d'un TG chiral, la **stéréosélectivité** désigne la capacité de discrimination entre deux groupements stéréohétérotopiques (position *sn*-1 contre *sn*-3). Cette propriété a été utilisée pour la résolution des mélanges racémiques dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques. A titre d'exemple, la lipase de *Candida rugosa* s'est avérée efficace dans la résolution de l'aténolol racémique (Sikora *et al.*, 2017) et la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est utilisée pour la résolution biocatalytique des racémiques afin de produire des α -hydroxyphosphonates énantio-purs (Hu *et al.*, 2022).

3. Propriétés cinétiques :

Les lipases sont des enzymes parfaitement solubles dans l'eau et sont capables d'agir sur des substrats lipidiques non hydrosolubles, d'où la notion de «catalyse hétérogène» (Verger *et al.*, 1973). Dans ce cas, le modèle de Michaelis-Menten conçu pour l'enzymologie en milieu homogène, ne peut s'appliquer, car on passe d'un système tridimensionnel ou volumique à un système bidimensionnel ou surfacique. Pour rendre compte de cette particularité des lipases, un modèle de «cinétique interfaciale» a été proposé (Verger, 1997; Reis *et al.*, 2009).

3.1. Cinétique interfaciale

Les lipases agissent à l'interface eau / lipide. Ainsi, deux étapes élémentaires décrivent leur réaction enzymatique : la première étape consiste en l'adsorption de l'enzyme (E) à l'interface (E*). Cette étape est régie par deux constantes de vitesse k_p et k_d représentant respectivement l'adsorption de l'enzyme à l'interface et sa désorption. La deuxième étape catalytique proprement dite, correspond à la formation du complexe enzyme adsorbée à l'interface / substrat (E*S), suivie de la libération des produits (P*) d'hydrolyse. Dans le cas le plus simple de l'hydrolyse de lipides synthétiques à chaîne courte et moyenne, les produits P* sont solubles dans la phase aqueuse et diffusent instantanément (Figure 9A). Cette étape traduit une cinétique pseudo-Michaelienne, se déroulant à l'interface et non pas en solution (Verger *et al.*, 1973). Dans le cas de l'hydrolyse de lipides à chaîne longue, les produits P* sont insolubles dans la phase aqueuse et peuvent s'accumuler à l'interface (P**) et inhiber la réaction enzymatique. Un modèle plus avancé a ensuite été proposé (Panaiotov *et al.*, 1997) (Figure 9B), par l'utilisation de molécules-cages, telles que la cyclodextrine (CD) permettant la séquestration et

la solubilisation des produits de lipolyse (CD.P*) dans la phase aqueuse (CD.P) ce qui permet d'éviter l'accumulation des produits de lipolyse à l'interface. Ce dernier modèle prend en compte la présence d'inhibiteurs compétitifs à l'interface (I) interagissant soit directement avec l'enzyme (E*I), soit indirectement en affectant la « qualité interfaciale » du substrat.

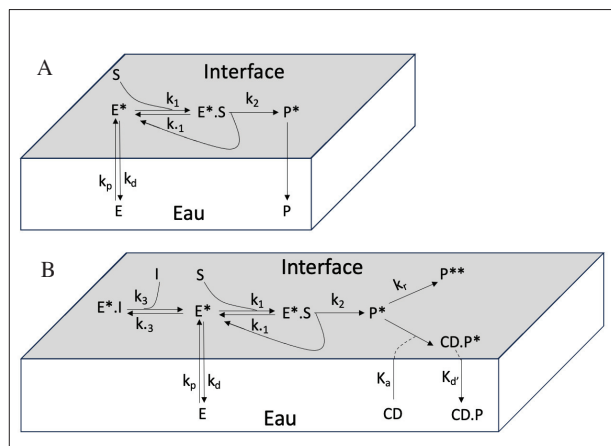


Figure 9 : A. Modèle de cinétique interfaciale d'après (Verger *et al.*, 1973). B. Modèle de cinétique interfaciale proposé par (Panaïotov *et al.*, 1997). Les formes enzymatiques présentes à l'interface sont notées avec un astérisque (E*, E*.S, P*) afin de les différencier des formes enzymatiques solubles dans la phase aqueuse.

3.2.Activation interfaciale : différence entre lipase et estérase

La propriété d'activation interfaciale a longtemps servi de critère pour distinguer les lipases des estérases (Sarda *et al.*, 1958). En effet, ce phénomène a été mis en évidence en utilisant la triacétine (TC3) comme substrat à plusieurs concentrations. En dessous de la CMC, la vitesse d'hydrolyse par la lipase pancréatique de porc était inférieure à celle de l'estérase hépatique de cheval. En revanche, au-dessus de la CMC, la vitesse de lipolyse augmente brutalement (Figure 10). Ceci s'explique par le fait que les lipases sont beaucoup plus actives lorsque le substrat est émulsifié (concentrations au-dessus de la CMC), entraînant à la formation d'une interface eau/lipide. Cependant, leur vitesse d'hydrolyse diminue lorsque le substrat est sous sa forme monomérique (concentrations en dessous de la CMC). On en a donc déduit que l'estérase suit une cinétique Michaelienne, tandis que la lipase présente un phénomène d'activation interfaciale.

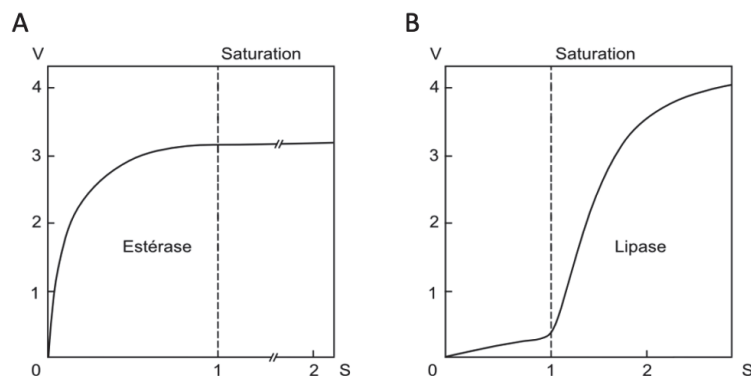


Figure 10 : Hydrolyse de la TC3 par l'estérase hépatique équine (A) ou par la lipase pancréatique porcine (B) illustrant le phénomène d'activation interfaciale. La ligne pointillée désigne la limite de séparation entre la forme monomérique et la forme agrégée de la TC3. La concentration du substrat S est exprimée en multiple de saturation. V, vitesse de la réaction en unités arbitraires (Sarda *et al.*, 1958).

Pour expliquer le phénomène d'activation interfaciale, l'hypothèse d'une modification conformationnelle de l'enzyme liée à son adsorption interfaciale a été proposée pour la lipase pancréatique de porc par Desnuelle *et al.*, (1960). En 1990, cette hypothèse a reçu une première démonstration au niveau moléculaire grâce à la résolution des structures tridimensionnelles (3D) de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990) et de la lipase fongique de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990). Des études structurales ont montré que les lipases ne présentent pas toutes le phénomène d'activation interfaciale. Les cas les plus représentatifs sont ceux des lipases de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1993) et *Candida antarctica* B (Uppenberg *et al.*, 1994). Pour cette raison, le critère expérimental le plus fiable pour s'assurer qu'il s'agit d'une vraie lipase, est la capacité de l'enzyme à hydrolyser les TG à chaînes longues, totalement insolubles dans l'eau (huile d'olive) (Ferrato *et al.*, 1997). Sayari *et al* (2001) ont montré que la lipase de *Staphylococcus aureus* NCTC 8530 (SAL1) est classée comme étant une vraie lipase malgré sa spécificité apparente en milieu émulsifié vis-à-vis des TG à chaînes courtes. Contrairement aux estérases qui ne s'adsorbent pas aux interfaces lipide/eau (Cherif *et al.*, 2006), SAL1 possède un pouvoir pénétrant lui permettant de s'adsorber et de dégrader la dicaprine déposée sous forme de films monomoléculaires à 35 mN.m^{-1} , ce qui a conduit à la conclusion que les films monomoléculaires peuvent être utilisés comme critère pour différencier les lipases incapables d'hydrolyser les TG à chaînes longues, des estérases.

4. Aspects structuraux des lipases

Les structures de plusieurs lipases ont été déterminées par cristallogénèse et diffraction des rayons X au début des années 1990, comme celle de la lipase de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) et la lipase pancréatique humaine (HPL) (Winkler *et al.*, 1990). Bien que ces protéines présentent une faible similarité de séquences, elles conservent deux acides aminés (Ser et His) de la triade catalytique (Ser, Asp/Glu et His). Leurs structures 3D révèlent une topologie très similaire, connue sous le nom de « repliement α/β hydrolase » (Ollis *et al.*, 1992), présentant un feuillet β -central. La plupart des lipases contiennent un segment hélicoïdal appelé « volet » qui couvre le site actif en solution, lorsque l'enzyme est dans la conformation dite « fermée ». Cela permet de maintenir la triade catalytique dans un environnement hydrophobe isolé du milieu aqueux. Le volet s'ouvre automatiquement en présence d'un substrat lipidique (interface), donnant accès à la poche catalytique. On parle alors de la conformation dite « ouverte ».

4.1. Repliement α/β hydrolase

Les lipases appartiennent à la famille des « α/β hydrolases » définie par Ollis *et al.*, (1992). Elles ont en commun un domaine structural typique composé d'un feuillet β central formé d'une succession de 8 brins β hydrophobes, reliés entre eux par des hélices α (Figure 11). La courbure du feuillet β peut différer significativement parmi les diverses enzymes, les positions spatiales des hélices topologiquement équivalentes peuvent aussi varier considérablement. Le domaine catalytique de la HPL (domaine N-terminal: résidus 1-335) possède une structure du type α/β hydrolase comprenant 11 brins β et 7 hélices α (Winkler *et al.*, 1990).

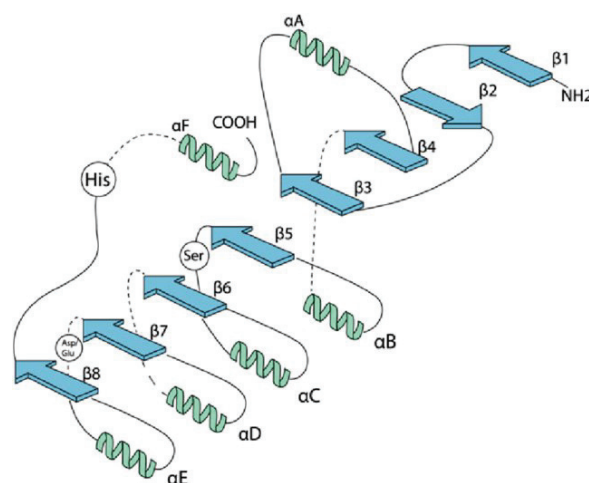


Figure 11 : Représentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases. Les brins β (1-8) sont représentés par des flèches et les hélices α (A-E) par des spirales. La position topologique des 3 résidus du site actif est représentée par un cercle (Jaeger, *et al.*, 1999).

4.2. Triade catalytique

L'étude cristallographique de la structure 3D des lipases montre que le site catalytique de ces enzymes à serine, est en général constitué de trois acides aminés ou triade catalytique Ser/His/Asp, d'autres sont dites non classiques avec une composition de la triade catalytique variable (Ser/His/Glu, Ser/His/His et Ser/Glu/Asp), et certaines peuvent même avoir une diade catalytique (Ser/Lys et Ser/His) (Ekici *et al.*, 2008), (Figure 11): Le résidu nucléophile (seryl), précède les deux autres résidus et se positionne après le brin $\beta 5$. Le résidu acide (aspartyl / glutamyl) apparaît souvent dans un coude nucléophile (nommé γ turn) après le brin $\beta 7$ et le résidu histidyl se place dans la boucle entre le dernier brin ($\beta 8$) et αF (Cygler *et al.*, 1992).

La sérine catalytique a un groupement hydroxyle dans sa chaîne latérale qui agit comme nucléophile. La séquence consensus du coude nucléophile montre un motif de type Gly-X-Ser-X-Gly, où X représente un résidu d'acide aminé variable (Derewenda *et al.*, 1992).

4.3. Volet amphiphile

Le site actif de certaines lipases n'est pas accessible au solvant : il est recouvert par une boucle amphiphile en l'absence du substrat appelée volet ou encore «*lid*», qui le rend inaccessible au solvant, et de ce fait, à tout substrat potentiel. Cette conformation est appelée forme «fermée» de l'enzyme, et est par conséquent supposée inactive. Dans le cas d'un certain nombre de lipases, la structure 3D a pu être déterminée en présence d'un inhibiteur, d'un analogue de substrat et/ou de détergent. Ceci a permis de mettre en évidence l'existence d'une forme dite «ouverte» de l'enzyme : les résidus de la triade catalytique deviennent accessibles au solvant suite au mouvement du volet qui recouvrait auparavant le site actif. La face hydrophobe de ce volet, orientée auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose alors au solvant, créant une surface hydrophobe, dont on suppose qu'elle interagit avec l'interface lipide/eau. On parle alors de forme «ouverte» de l'enzyme. Cette nouvelle conformation de l'enzyme est aussi appelée forme active, par opposition à la forme dite inactive de l'enzyme. Les changements de conformation majeurs qui différencient les formes fermées et ouvertes concernent principalement ce volet amphiphile mais aussi parfois des boucles voisines et quelques résidus particuliers (Figure 12). La structure 3D du complexe HPL-colipase illustre comment la colipase pourrait ancrer la lipase à l'interface en présence de sels biliaires : la colipase se lie au domaine C-terminal de la HPL et expose ses extrémités hydrophobes à l'opposé site de son domaine de liaison à la lipase (Figure 12). Cette partie hydrophobe aide à mettre le domaine N-terminal en conformation étroite avec l'interface où l'ouverture du volet

se produit probablement. Ces changements conformationnels ont comme conséquence la formation d'un impressionnant plateau hydrophobe continu, s'étendant sur plus de 50 Å. Cette surface pourrait interagir fortement avec une interface lipide-eau (Figure 12) (Miled *et al.*, 2000).

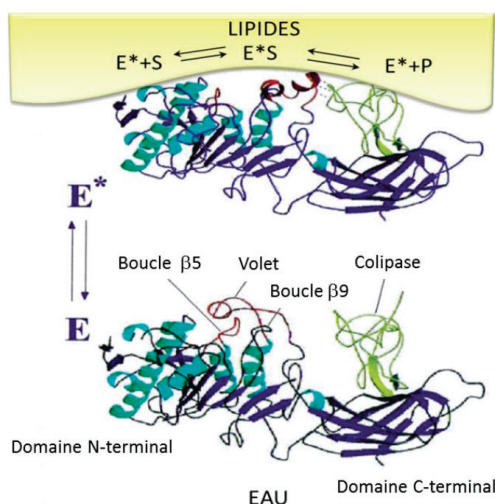


Figure 12 : Structure 3D de la HPL complexée avec son cofacteur, la colipase en conformation fermée (E) et en conformation ouverte (E*). Ce diagramme montre le changement conformationnel du volet, des boucles β5 et β9, ainsi que la colipase durant l'interaction de la lipase avec l'interface lipidique. D'après (Jaeger *et al.*, 1999; Miled *et al.*, 2000).

4.4.Mécanisme d'action des lipases

Le mécanisme catalytique moléculaire des lipases est décrit comme un mécanisme à deux substrats de type substitué ou « ping-pong » et a été extrapolé de celui proposé pour la chymotrypsine (Blow *et al.*, 1969). Ce mécanisme réactionnel implique les étapes d'acylation et de désacylation de l'enzyme (Figure 13). L'acylation provient de l'attaque nucléophile (Figure 13A) d'une des fonctions ester carboxylique du substrat par la sérine de la triade catalytique. La fonction hydroxyle de la sérine, activée par le réseau de relais de charge Ser-His-Asp, attaque le carbone de la fonction ester carboxylique du substrat pour former un premier intermédiaire tétraédrique (Figure 13B). Les liaisons hydrogènes, entre l'oxygène chargé négativement (oxyanion) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes peptidiques N-H, stabilisent la charge négative de l'oxyanion (Whiting *et al.*, 1994). Cet environnement atomique et électronique est appelé « trou de l'oxyanion ». Ce trou stabilise la structure tétraédrique et abaisse donc l'énergie d'activation de la réaction. Lors de cette catalyse acido-basique, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupement alcool partant (R_2-OH) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme

(Figure 13C). La déacylation provient de l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau (Figure 13D) pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique (Figure 13E). Ce dernier se dissocie en libérant le groupement acyl partant (R_1 -COOH) et l'enzyme libre (Figure 13F). Tout comme dans l'étape d'acylation, le deuxième intermédiaire tétraédrique est stabilisé par le trou de l'oxyanion (Beer *et al.*, 1996).

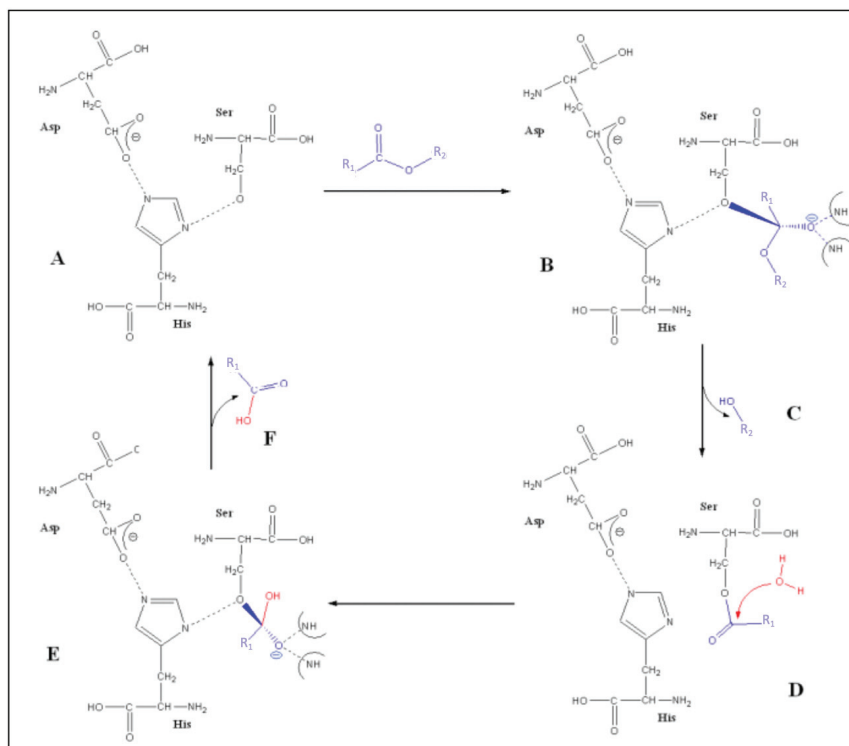


Figure 13 : Mécanisme d'action catalytique des lipases. (A) Conformation initiale de l'enzyme. (B) Premier intermédiaire tétraédrique après attaque nucléophile de la sérine. (C) Libération du groupement partant (alcool) et formation de l'acyl-enzyme. (D) Attaque nucléophile par une molécule d'eau du carbone de l'acyl-enzyme. (E) Formation du second intermédiaire tétraédrique. (F) Libération de l'acide carboxylique qui régénère l'enzyme libre (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

5. Lipases microbiennes

5.1. Généralités

Les lipases pancréatiques de mammifères sont certainement les enzymes lipolytiques les mieux étudiées (Verger *et al.*, 1984). Cependant, les potentialités que présentent les lipases de microorganismes (production, purification à grande échelle, capacité d'hydrolyser une large gamme de substrats lipidiques, propriétés catalytiques et structurales intéressantes...) ont suscité l'intérêt sur ces enzymes. Les lipases microbiennes sont les plus importantes sur le plan commercial, principalement en raison de leur facilité de culture et de manipulation génétique pour un rendement plus élevé. En effet, de nombreuses lipases bactériennes et fongiques ont été purifiées et caractérisées (Sajid *et al.*, 2023).

5.1.1. Lipases bactériennes

Les souches bactériennes productrices de lipase ont été trouvées dans différents habitats tels que les déchets industriels pétroliers, les usines de traitement d'huiles végétales, les laiteries, les industries du papier et les sols contaminés par des huiles. La production de lipase a été rapportée pour certains souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives, *Bacillus spp.* (Mabizela-Mokoena *et al.*, 2017; Suci, Arbianti *et al.*, 2018), *Pseudomonas spp.* (Hermansyah *et al.*, 2018; Priyanka *et al.*, 2019), *Lactobacillus sp.* (Uppada *et al.*, 2017), *Staphylococcus sp.* (Behera *et al.*, 2019), *Micrococcus sp.* (Sumarsih *et al.*, 2020) et *Burkholderia sp.* (Lee *et al.*, 2017). Les espèces des genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Burkholderia* sont les plus largement utilisées pour la production de lipases bactériennes, principalement en raison de leur activité enzymatique élevée dans une large gamme de températures et de pH ainsi que d'une énantiosélectivité élevée (Melani *et al.*, 2020). Selon des rapports antérieurs de la littérature, les sites contaminés par l'huile sont préférables pour l'isolement des souches bactériennes productrices de lipase. De plus, étant non toxique et respectueuse de l'environnement, la lipase est considérée comme plus appropriée par rapport à d'autres catalyseurs chimiques ou synthétiques (Javed *et al.*, 2018). Les souches bactériennes potentielles les plus récentes pour la production de lipase et leur zone d'isolement ont été rapportées dans le tableau 4.

5.1.2. Lipases fongiques

Les souches fongiques sont connues pour être des productrices potentielles de lipase avec des propriétés catalytiques uniques remarquables, qui sont très importantes pour diverses applications commerciales (Pandey *et al.*, 2016). La plupart des champignons producteurs de lipase importants sur le plan commercial et industriel appartient aux genres *Rhizopus sp.*,

Aspergillus sp., *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Yarrowia sp.* et *Pichia sp.* (Ülker et Karaoğlu., 2012; Oliveira *et al.*, 2016 ; Pandey *et al.*, 2016; Maldonado *et al.*, 2016 ; Riyadi *et al.*, 2017). La production de lipase par le champignon varie en fonction de la souche et de la composition du milieu de croissance, comme les sources de carbone et d'azote (Pandey *et al.*, 2016). Selon les rapports de la littérature, la lipase LIP2 de *Yarrowia lipolytica* (YLLIP2) est une candidate idéale pour l'enzymothérapie substitutive en raison de ses propriétés biochimiques uniques avec une résistance aux sels biliaires et une activité maximale à faible pH. *Candida sp.* est la productrice la plus potentielle de lipase parmi les levures. Les travaux antérieurs rapportant la production de lipase par les champignons ainsi que leur milieu d'isolement sont illustrés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Souches microbiennes productrices de lipases, leurs biotopes d'origine et leurs applications biotechnologiques.

Souche	Biotope	Application biotechnologique	Référence
Bactéries			
<i>Bacillus licheniformis</i> NCU CS-5	Détérioration de l'amande des graines de <i>Cinnamomum camphora</i>	Détergence	(Zhao <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus aerius</i> strain 24 K	Échantillon de sol	Industrie textile	(El-Fiky <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus halodurans</i>	Mer Méditerranée	Détergence et bioremédiation	(Hassan <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	Sol de l'environnement (Egypte)	Industrie textile	(Abou Taleb <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> lipase 2 (BTL2)	-	Production de biodiesel	(Zhang <i>et al.</i> , 2022)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	-	Synthèse d'esters	(Uppada <i>et al.</i> , 2017)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lait de dromadaire	Détergence	(Ben Bacha <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZS04	Sol pollué par l'huile	Détergence	(Qin <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ES3	Eaux usées de cuisine	Détergence	(Sarac <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas moraviensis</i> M9	Sol de l'environnement (Chine)	Hydrolyse partielle de l'huile d'algue	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Staphylococcus warneri</i>	Sol pollué par l'huile	-	(Yele and Desai, 2015)
<i>Burkholderia ubonensis</i> SL-4	Sol de l'environnement (Chine)	Production de biodiesel	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Sol de l'environnement (Chine)	-	(Mo <i>et al.</i> , 2016)
<i>Streptomyces violascens</i> OC125-8	-	Traitement des eaux usées riches en lipides	(Boran <i>et al.</i> , 2019)
<i>Serratia marcescens</i> SM3	Sol contaminé par du pétrole	Détergence et production de biodiesel	(García-Silvera <i>et al.</i> , 2018)
Champignons			
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	Pharmaceutique et Industries alimentaires	(K. de S. Lira <i>et al.</i> , 2021)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	Production de biodiesel	(Qu <i>et al.</i> , 2022)
<i>Geotrichum candidum</i>	Margine d'olives	Traitement des margines d'olives	(Asses <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rhizopus oryzae</i> R1	Échantillon de sol prélevé dans une station-service	Production de biodiesel	(Helal <i>et al.</i> , 2021)
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	Synthèse des esters méthyliques d'acides gras.	(Ayinla <i>et al.</i> , 2022)
<i>Penicillium citrinum</i> PKB20	Échantillon de sol riche en débris (Assam, Inde)	Production de biodiesel	(Bardhan <i>et al.</i> , 2019)
<i>Aspergillus niger</i>	Sol de l'environnement (Égypte)	Production de biodiesel	(El-Ghonemy <i>et al.</i> , 2021)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sol contaminé par l'huile	Détergence	(Mehta <i>et al.</i> , 2021)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Graines de buriti	Traitement des eaux usées	(Facchini <i>et al.</i> , 2015)
<i>Candida antarctica</i> lipase B	-	Industrie chimique	(Tanasković <i>et al.</i> , 2017)
<i>Candida guilliermondii</i>	Feuilles de ricin	Production d'oléate de méthyle	(Oliveira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aliments réfrigérés	Traitement des margines d'olives	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2005)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wt-11	Sol riche en lipides (Chine)	Synthèse du palmitate de L-ascorbyle	(Ping <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhodotorula glutinis</i> HL25	Sol collecté (Erzurum, Turquie)	Traitement des déchets oléicoles	(Taskin <i>et al.</i> , 2016)

5.2. Cas particulier de la lipase de *Penicillium* sp.

Un certain nombre de *Penicillia* sont de bons producteurs de lipases ; certains d'entre eux sont déjà sur le marché. Malgré la grande homologie de séquences entre les différentes lipases de *Penicillium*, ces enzymes présentent des différences significatives en termes des propriétés biochimiques et catalytiques à savoir le pH optimum, la stabilité en température, le phénomène d'activation interfaciale, la spécificité de substrats, les effets des ions métalliques, des tensioactifs et des inhibiteurs, l'activité et stabilité dans les solvants organiques. Les principales caractéristiques de certaines lipases de *Penicillium* les plus étudiées sont résumées dans les tableaux 5 et 6.

5.2.1. Propriétés biochimiques

Les lipases de *Penicillium* ont été largement caractérisées. Leurs propriétés biochimiques générales, y compris la masse moléculaire, le pH optimal, la température optimale et la stabilité, ont été résumées dans le tableau 5.

pH :

Il a été rapporté que les lipases produites par le genre *Penicillium* ont une activité optimale à des valeurs de pH neutres ou basiques (allant de 7 à 9) (Krieger *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010), à quelques exceptions près, comme la lipase de *Penicillium* sp. section *Gracilenta* CBMAI 1583 qui a montré une activité optimale à un pH de 4 (Turati *et al.*, 2019). En ce qui concerne la stabilité, les lipases de *Penicillium* sont stables dans un large intervalle de pH allant de 4 à 10 (Rigo *et al.*, 2012).

Température °C :

Les températures optimales des lipases *Penicillium* rapportées dans la littérature sont comprises entre 25 et 45°C. Cependant, il existe des lipases *Penicillium* extrêmement thermophiles, comme le cas de celle produite par *Penicillium* sp. section *Gracilenta* CBMAI 1583., qui a une activité maximale à une température de 70°C (Turati *et al.*, 2019).

Tableau 5 : Propriétés biochimiques générales de la lipase du genre *Penicillium*.

Source	Masse Moléculaire (kDa)	pH/Temperature (°C) optimal	Stabilité	Référence
<i>Penicillium chrysogenum</i>	40	8.0/40	- Stable à pH alcalin (7-9) - Activité résiduelle de 40% à 60°C.	(Kumar <i>et al.</i> , 2012)
<i>Penicillium sp.</i> section <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583	53	4.0/70	- Pas d'activité à pH 8,5 - A 50°C, l'enzyme montre 80% de son activité, tandis qu'au-dessus de 70°C, l'activité diminue fortement.	(Turati <i>et al.</i> , 2019)
<i>Penicillium notatum</i>	46	9.5/40	- Stable entre (pH 8,0-11) - Stable entre (25 à 40 °C) et l'activité diminue progressivement à des températures supérieures à 40 °C	(Rehman <i>et al.</i> , 2017)
<i>Penicillium cyclopium</i> PG37	39	7,5/35	Stable entre pH 6,5-9,5	(Tan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium candidum</i>	29	9.0/35	100% et 70% d'activité résiduelle après 10 min à 25 et 35°C, respectivement	(Ruiz <i>et al.</i> , 2001)
<i>Penicillium abeanum</i>	28	7-8/25-30	Maintien de l'activité initiale après 16 h à pH 7,0-8,5 et à 25°C	(Sugihara <i>et al.</i> , 1996)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	40	7,9–8,1/45	-	(Ferrer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Penicillium cyclopium</i> lipase II	40–43	7.0/40	- Stable entre 25 - 40°C à pH 7,0 - Stable entre pH 4,5 -7,0	(Chahinian <i>et al.</i> , 2000)
<i>Penicillium cyclopium</i> PG37	29	10.0/25	100% et 30% d'activité résiduelle après 20 min à 30 et 40°C, respectivement	(Li and Zong, 2010)
<i>Penicillium expansum</i> PED-03	28	9,5/35	Stable entre pH 7,0-10,0	(Lianghua <i>et al.</i> , 2007)
<i>Penicillium expansum</i> DSM 1994	25	9,0/45	Stable entre pH 6,0-10,0	(Stöcklein <i>et al.</i> , 1993)
<i>Penicillium roqueforti</i> IAM 7268	25	6.0–7.0/35	Stable pendant 15 min de pH 6,0-8,0 à 30°C	(Mase <i>et al.</i> , 1995)

Spécificité de substrat:

Les lipases de *Penicillium* hydrolysent préférentiellement les esters d'acides gras à chaîne moyenne, comme indiqué pour la plupart des lipases de *Penicillium*, telles que celles de *Penicillium camembertii* Thom PG-3 (Tan *et al.*, 2004), *Penicillium aurantiogriseum* (Griebeler *et al.*, 2011), *Penicillium cyclopium* (Chahinian *et al.*, 2000), et *Penicillium simplicissimum* (Gutarra *et al.*, 2009).

La lipase de *Penicillium* est spécifique des TAG à chaîne courte, en particulier la tributyrine (C4) dans le cas des lipases de *Penicillium chrysogenum* 9' (Bancerz *et al.*, 2005), *Penicillium chrysogenum* (Ferrer *et al.*, 2000), et *Penicillium citrinum* (Song *et al.*, 2008). Bien que la lipase de *Penicillium candidum* ait également montré l'activité la plus élevée envers la tributyrine et de l'huile d'olive parmi les divers TG testés (Rigo *et al.*, 2012), les lipases de *Penicillium sp.* DS-39 (Dheeman *et al.*, 2011) et *Penicillium sp.* section *Gracilenta* CBMAI 1583 (Turati *et al.*,

2019) ont montré une grande spécificité envers les esters d'acides gras à chaîne longue tels que l'acide oléique (C18:1Δ9) et l'acide stéarique (C18:0), respectivement.

Effets des ions métalliques, des tensioactifs et des inhibiteurs

Les effets stimulants ou inhibiteurs des ions métalliques sur l'activité lipase ont été bien établis, bien que les cofacteurs, en général, ne soient pas nécessaires à l'activité catalytique. L'influence des ions métalliques variait selon les sources de lipases. L'activité des lipases de *penicillium* augmente avec le Ca^{2+} et le Mn^{2+} (Bancerz *et al.*, 2005; Dheeman *et al.*, 2011; Rehman *et al.*, 2017). Dans ce groupe d'enzymes, les ions jouent souvent un rôle structurel plutôt que catalytique. Il a été suggéré que les ions métalliques induisent un changement conformationnel, favorisant ainsi une plus grande stabilité et, par conséquent, une plus grande activité (Rahman *et al.*, 2005), tandis que les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} et Ni^{2+} provoquaient une inactivation des lipases de *Penicillium* (Dheeman *et al.*, 2011; Chinaglia *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2017; Pranav *et al.*, 2019). Ces lipases ont été complètement inhibées par le Hg^{2+} (Chahinian *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2014). L'inhibition de nombreuses lipases par les ions métalliques a le plus souvent été attribuée à la réaction des ions métalliques avec les groupes thiol des résidus cystéine près du site actif de l'enzyme (Gurkok and Ozdal, 2021).

Les tensioactifs sont généralement utilisés pour la préparation d'émulsion dans la mesure de l'activité lipase et également dans la purification. Ils pourraient détruire les structures tertiaires des enzymes, entraînant une dénaturation. En revanche, l'agrégation des enzymes serait considérablement atténuée par l'utilisation de ces composés, améliorant ainsi l'activité enzymatique (Delorme *et al.*, 2011). L'influence de divers tensioactifs sur l'activité lipasique était très variable (Ruiz *et al.*, 2001; Bancerz *et al.*, 2005; Hasnaoui *et al.*, 2022). De plus, les lipases de *Penicillium* ont été fortement inhibées par l'ajout de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) (Dheeman *et al.*, 2011; Chinaglia *et al.*, 2014; Turati *et al.*, 2019; Pranav *et al.*, 2019) de diiodopropyl fluorophosphate (DFP) et l'Orlistat. Ce dernier, un puissant inhibiteur connu des lipases digestives, se lie de manière covalente à la sérine catalytique de l'enzyme par la formation d'un complexe covalent entre le cycle β -lactone de l'Orlistat et l'hydroxyle du résidu séryl catalytique de la lipase. Il a été montré précédemment que l'Orlistat inhibe aussi bien l'activité des lipases de *Penicillium* (Gupta *et al.*, 2015; Gulyamova *et al.*, 2022) que celle des lipases digestives.

5.2.2. Purification de différentes lipases du genre *Penicillium*.

La plupart des applications industrielles ne requièrent pas toujours une enzyme pure. Cependant, un certain degré de pureté permet une utilisation réussie dans les industries. De plus, la purification des enzymes est indispensable pour la détermination de leur structure 3D et comprendre les relations structure-fonction (Saxena *et al.*, 2003; Bharathi and Rajalakshmi, 2019; Enespa *et al.*, 2022). Le tableau 6 présente les différentes étapes de purification, les facteurs de purification et les rendements obtenus pour des lipases du genre *Penicillium* rapportées dans la littérature.

Tableau 6 : Bilan des étapes de purification de différentes lipases du genre *Penicillium*.

Souche	Etape de purification	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)	Références
<i>Penicillium crustosum</i> P22	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF	10 000	62	34	(Hasnaoui <i>et al.</i> , 2022)
<i>Penicillium notatum</i>	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne de Q-Sepharose) - Colonne de phényl Superose - Colonne Mono-Q	5344	28	13	(Rehman <i>et al.</i> , 2017)
<i>Penicillium cyclopium</i>	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne Sephadex G-75	-	-	-	(Tan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium solitum</i>	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne HiTrap DEAE FF - Colonne Superdex 75	42	-	-	(Chinaglia <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium expansum</i> PED-03	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - DEAE Q-Sépharose - Colonne Sephacryl S-200	28	81	19	(Lianghua <i>et al.</i> , 2007)
<i>Penicillium citrinum</i>	- Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne Superose 6 - Colonne Phenyl Superose	607	379	15	(Krieger <i>et al.</i> , 1999)
<i>Penicillium camembertii</i> Thom PG-3	- Précipitation à l'éthanol, précipitation (NH ₄) ₂ SO ₄ - Colonne DEAE-cellulose	886	22	8	(Tan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	- Ultrafiltration - Colonne Phenyl-Sepharose - Colonne Mono-Q HR 5/5 - Colonne PD-10	4	30	44	(Ferrer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Penicillium</i> sp. DS-39	- Colonne DEAE-cellulose - Colonne Sephacryl® 100-HR - Colonne Q-Sepharose® HP	308	129	8	(Dheeman <i>et al.</i> , 2011)
<i>Penicillium candidum</i>	- Colonne Octyl-Sepharose CL-4B - Colonne DEAE-Sephadex A-50c	13	36	1	(Ruiz <i>et al.</i> , 2001)

5.2.3. Moisissure de *Penicillium*

Les espèces de *Penicillium* ont un grand potentiel biotechnologique pour la production de lipases et d'autres enzymes. Ce sont des champignons omniprésents en raison de leurs besoins nutritionnels peu exigeants et de leur capacité à se développer dans un large éventail de conditions et d'environnements (Toghueo and Boyom, 2020). Ils se reproduisent dans le sol, sur la végétation en décomposition et le compost, sur les aliments séchés, les épices, les céréales, dans les fruits et légumes frais, ainsi que dans l'air et la poussière. Ils peuvent également se développer sur les murs des bâtiments, en particulier lorsque l'humidité des matériaux de construction est élevée (Demjanová *et al.*, 2021). De nombreuses espèces de *Penicillium* ont la capacité de produire des métabolites, notamment des antibiotiques, des agents antiviraux et des mycotoxines (Yang *et al.*, 2021). Il a été rapporté que ce mode de vie endophyte confère aux espèces de *Penicillium* la capacité de protéger les espèces végétales contre les stress biotiques et de favoriser la croissance des plantes (Hassan *et al.*, 2017). En effet, *Penicillium* est devenu l'un des genres de champignons les plus connus pour la découverte de composés bioactifs (Nicoletti *et al.*, 2016). L'industrie agroalimentaire exploite certaines espèces de *Penicillium* pour la production de fromages (camembert, roquefort) et de saucisses fermentées.

L'identification et la nomenclature du genre *Penicillium* sont étudiées depuis 1809 (Link 1809; Visagie *et al.*, 2014). *Penicillium* spp. est l'un des plus grands groupes de champignons, composé de plus de 200 espèces reconnues (Pitt *et al.*, 2000). A cette époque, un concept d'espèce morphologique était utilisé pour la classification et l'identification des espèces de *Penicillium* spp. Ce genre représente une brosse Terverticillé (terme utilisé pour décrire les parties de conidiophores): phialides sur metules transportés par des brindilles sur les conidiospores transportant des conidies. Cette souche a montré des hyphes bien développés, ainsi qu'une grande quantité de spores sphériques de dispersion.

Taxonomie :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomycota

Classe : Euascomycetes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichomaceae

Genre : *Penicillium*

Espèce : spp.

Au cours des années 1990, le séquençage de l'ADN est devenu l'un des outils les plus puissants pour les taxonomistes, car il a créé la possibilité de déduire des relations entre les espèces sans avoir besoin de normaliser les régimes de culture. Il a également permis d'éliminer les problèmes liés aux cultures détériorées. Visagie *et al.*, (2014) ont utilisé des séquences de gènes combinées *ITS*, *benA* et *CaM* dans l'établissement de la phylogénie de *Penicillium*. L'*ITS* (*Internal Transcribed Spacer* ou espaceur transcrit interne) est le code-barre ADN recommandé pour les champignons, y compris les gènes hautement conservés 18S, 5.8S, 28S, malheureusement, pour *Penicillium* et de nombreux autres genres d'ascomycètes, l'*ITS* n'est pas suffisamment variable pour distinguer toutes les espèces étroitement apparentées. Pour cette raison, un marqueur d'identification secondaire tel que la β -tubuline est un meilleur marqueur discriminant qui permet l'identification de *Penicillium* au niveau de l'espèce. D'autres options de marqueurs secondaires possibles incluent la calmoduline (*CaM*) ou les gènes de la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*). Le tableau 7 résume l'amplification par PCR de l'ADN microbien avec les fragments contenant les régions de l'espaceur transcrit interne de l'*ITS* 1 et 2, le gène partiel de la β -tubuline (*benA*) et les fragments contenant un gène partiel de la calmoduline (*CaM*).

Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage (Visagie *et al.*, 2014).

Gène	Nom de l'amorce	Direction	Séquence (5'-3')
<i>ITS</i>	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
	V9G	Forward	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA
	LS266	Reverse	GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C
<i>BenA</i>	Bt2a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
	Bt2b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC
<i>CaM</i>	CMD5	Forward	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC
	CMD6	Reverse	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG
	CF1	Forward	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR
	CF4	Reverse	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC
<i>RPB2</i>	5F	Forward	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG
	7CR	Reverse	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT
	5Feur	Forward	GAY GAY CGK GAY CAY TTC GG
	7CReur	Reverse	CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT

6. Applications biotechnologiques des lipases

Les lipases sont capables non seulement de catalyser l'hydrolyse, mais aussi la synthèse de glycérides à longue chaîne en milieu peu hydraté. D'autre part, elles peuvent accommoder un grand nombre de substrats, ce qui leur associe d'importantes applications en biocatalyse (Figure 14).



Figure 14 : Diverses applications industrielles des lipases (Yao *et al.*, 2021).

6.1. Détergence

Les lipases utilisées dans les lessives ont pour rôle d'éliminer les corps gras provenant des fritures, beurres, sauces, huiles végétales, afin de se substituer aux produits chimiques et de développer des détergents respectueux de l'environnement. De ce fait, plusieurs travaux se sont intéressés à la recherche des lipases performantes et efficaces en tant que bio-additifs dans la formulation détergente (Phukon *et al.*, 2020; Gurkok *et al.*, 2021; Enespa *et al.*, 2022). En effet, l'enzyme détergente doit relever des défis difficiles tels que : (1) le pouvoir d'agir à des températures élevées (40°C-80°C), bien que la tendance soit aujourd'hui en faveur de températures plus basses, (2) une activité optimale à pH alcalin et (3) la compatibilité avec les composés du détergent (tensioactifs, agents de blanchiment, agents oxydants...) (Gurkok *et al.*, 2021). L'intérêt de l'utilisation des lipases a été favorisé par deux critères fondamentaux: la baisse du taux de phosphate dans les détergents, pour lutter contre la pollution de l'environnement, et la tendance, ces dernières années, à laver à basse température dans un souci d'économie d'énergie.

La plus grande révolution dans l'application des lipases est survenue en 1988, lorsque Novozyme a introduit la lipase provenant de *Humicola lanuginosa* (aujourd'hui *Thermomyces lanuginosus*) dans les produits de lessive domestique pour une meilleure élimination des graisses sur les vêtements (Boel *et al.*, 1988). Il s'agit de la première lipase recombinante produite et utilisée dans les détergents pour le dégraissage, et qui est commercialisée sous le nom de Lipolase®. Par la suite, le nombre de brevets et de publications scientifiques sur les lipases détergentes n'a cessé d'augmenter au cours des années 1990. Par exemple, en 1994, certaines formulations détergentes, telles que Lumafast® (Genencor Int.) et Lipomax® (Gist-Brocades) comprenaient des lipases du genre *Pseudomonas* et qui sont toutes deux commercialisées par Genencor International. Les recherches intensives sont toujours élaborées pour obtenir des lipases qui peuvent remplacer partiellement ou complètement les ingrédients détergents toxiques. Quelques travaux ont montré l'efficacité des lipases thermoalcalines : une lipase de *Haloferax mediterranei* stable dans les détergents commerciaux (Akmoussi-Toumi *et al.*, 2018), la lipase de *Pseudomonas helmanticensis* HS6 (Phukon *et al.*, 2020) et la lipase de *Bacillus licheniformis* (Zhao *et al.*, 2021).

6.2. Oléochimie

En plus de leur rôle naturel d'hydrolyse des liaisons ester carboxyliques, les lipases peuvent catalyser les réactions de synthèse d'esters par le processus d'estérification, d'interestérification et de transestérification dans des conditions non aqueuses (Filho *et al.*, 2019). La tendance actuelle dans l'industrie oléochimique implique l'utilisation de la lipase immobilisée pour initier diverses réactions, telles que l'hydrolyse, l'alcoolyse et la glycérolyse à l'aide de substrats mixtes. En conséquence, la séparation et l'altération des graisses peuvent être réalisées sans investissement majeur dans des équipements coûteux ni dépense d'énormes quantités d'énergie thermique (Choudhury *et al.*, 2015). Il a été rapporté que l'utilisation de la lipase de *Streptomyces thermocarboxydus* ME168 crée des esters de sucre à partir de divers substrats, notamment le glucose, le fructose et différents esters vinyliques (Siebenhaller *et al.*, 2018). La production du caprylate d'éthyle, un arôme alimentaire doux fruité-fleuri, a été produite par utilisation de la lipase immobilisée de la souche *Bacillus subtilis* EH37 (Enespa *et al.*, 2022).

6.3. Industrie alimentaire

Les graisses et les huiles sont des constituants importants des aliments. La valeur nutritionnelle et sensorielle et les propriétés physiques d'un TG sont fortement influencées par des facteurs tels que les positions *sn* de l'acide gras sur le squelette du glycérol, la longueur de la chaîne de l'acide gras et son degré d'insaturations (Ghazani *et al.*, 2018). Les lipases microbiennes, grâce à leur régiosélectivité sont capables de modifier les propriétés des lipides en modifiant la localisation des chaînes d'acides gras dans les glycérides et en remplaçant un ou plusieurs acides gras par de nouveaux acides gras (Zorn *et al.*, 2016). Le beurre de cacao a une teneur élevée en matières grasses, car il contient des acides palmitique et stéarique et un point de fusion d'environ 37°C. Des TG analogues à ceux du beurre de cacao ont été synthétisés par transestérification catalysée par la lipase de *Rhizomucor mihei* (Lipozyme®) (Huang *et al.*, 2021). Wang *et al.*, (2019) ont rapporté la synthèse du 1,3-dioléoyl-2-palmitoylglycérol, un TG structuré qui pourrait remplacer la graisse du lait humain dans les préparations alimentaires pour nourrissons, par l'utilisation d'une lipase commerciale nommée Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*). Ce TG riche en acide palmitique en position *sn*-2 et en acide oléique en positions *sn*-1,3 a été également synthétisé par acidolyse catalysée par une lipase commerciale de *Rhizopus oryzae* (Jiménez *et al.*, 2010). Les lipases de *Candida rugosa* ont de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et aromatique et dans la production de crème glacée (Ray, 2015). Dans les industries de l'alimentation animale et des produits laitiers, il existe une demande croissante de lipases pour améliorer la valeur de la viande et des produits laitiers traités (Guerrand, 2017). Dans l'industrie laitière, la lipase hydrolyse la matière grasse du lait ; cela pourrait grandement améliorer la saveur et le goût des produits laitiers et augmenter leur valeur nutritionnelle. Une lipase purifiée à partir de *Lactobacillus plantarum* a été utilisée dans la synthèse d'aliments à base de fromage fermenté. La lipase peut également être utilisée pour améliorer la qualité des produits de boulangerie ; elle peut blanchir les pains plus foncés, améliorer le goût et la qualité des aliments cuits au four et prolonger leur durée de conservation (Yao *et al.*, 2021).

6.4. Production des monoglycérides

Divers domaines industriels tels que l'agroalimentaire, la cosmétique ou la pharmaceutique, utilisent les monoglycérides (MG) comme émulsifiants. La synthèse de MG par un procédé enzymatique est une approche respectueuse de l'environnement. Les lipases hautement stables dans un solvant organique offrent la possibilité d'employer diverses approches de la synthèse enzymatique de MG, telles que l'hydrolyse sélective ou l'alcoololyse à l'aide de lipases 1,3-

régiospécifiques, comme la lipase B de *Candida antarctica* (Kavadia, 2017; Mustafa *et al.*, 2022). Les avantages de la synthèse enzymatique sont des rendements plus élevés et des conditions de réaction douces, ce qui se traduit par des produits de meilleure qualité et une consommation d'énergie réduite (Collaço *et al.*, 2021).

La méthode chimique conventionnelle pour produire du MG implique la glycérolyse des graisses et des huiles à des températures plus élevées (220-260°C) et à haute pression sous une atmosphère d'azote tout en utilisant des catalyseurs alcalins inorganiques. Les principaux inconvénients de ce processus comprennent une consommation d'énergie élevée, un faible rendement et une mauvaise qualité du produit formé (Collaço *et al.*, 2021; Mustafa *et al.*, 2022).

6.5.Médecine

Des études et des investigations intensives ont conduit les biotechnologistes à explorer les lipases dans la thérapie de substitution, ou la déficience enzymatique (en cas de maladie). Dans le corps humain, les lipases servent à la digestion des lipides alimentaires, facilitant ainsi leur absorption dans l'intestin. Ainsi, un déficit en lipases entraîne une malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles (Loli *et al.*, 2015; Tsikis *et al.*, 2022). Pour remédier à ce problème, la thérapie de substitution des lipases pancréatiques par voie orale a été suggérée (Fieker *et al.*, 2011; Antonini *et al.*, 2018). A titre d'exemple, la lipase de *Yarrowia lipolytica* active à des pH acides de 4 à 7 et stable à la pepsine, a montré son efficacité dans la digestion *in vitro* des TG dans un repas test et a permis de réduire *in vivo* les graisses fécales d'un animal (mini-porc) atteint d'insuffisance pancréatique exocrine (Aloulou *et al.*, 2015). D'autre part, les lipases microbiennes sont utilisées dans la synthèse de produits pharmaceutiques présents dans les médicaments cardiovasculaires, antibiotiques et anticancéreux (Yadav *et al.*, 2000; Thapa *et al.*, 2019). La lipase peut également contribuer au processus de résolution chirale des médicaments; l'estérification sélective facilite la séparation du mélange racémique et l'isolement d'un seul énantiomère actif (Kumar *et al.*, 2017). La séparation des isomères de l'ibuprofène présente les avantages de cette technologie. L'ester d'ibuprofène dégradé par la lipase de *Rhodothermus marinus* DSM 4252 sous forme immobilisée pour produire de l'ibuprofène (S)-énantiopur (Memarpoor-Yazdi *et al.*, 2018). En effet, plusieurs substances actives de médicaments, synthétisés chimiquement, tels que, le kétoprofène et l'aténolol se trouvent sous forme de mélanges racémiques et la lipase de *Candida rugosa* a montré également une efficacité dans la résolution de l'aténolol racémique (Sikora *et al.*, 2017). De plus, la lipase de *Serratia marcescens* a été utilisée pour la résolution du kétoprofène (Long *et al.*, 2007; Contesini *et al.*, 2020).

6.6. Traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées est un énorme défi en raison de la forte production d'eaux usées de différentes industries, telles que l'industrie laitière, les abattoirs et les huileries, eaux qui sont très riches en matières grasses peu dégradables. Un traitement adéquat des eaux usées dépend de divers facteurs, tels que la source de rejet des déchets (par exemple, industriels, domestiques), la composition chimique (par exemple, les métaux lourds, la teneur en matières inorganiques et organiques), les constituants en suspension et dissous dans les eaux usées (par exemple, la force ionique élevée, présence d'agents inhibiteurs). Ces dernières sont reconnues comme inhibiteurs lors du traitement en formant un film mince à la surface et en se solidifiant à basse température. Par conséquent, l'hydrolyse de ces matériaux à l'aide de lipases peut améliorer l'efficacité du traitement des eaux usées. En effet, la lipase d'*Aeribacillus pallidus* a montré une stabilité à 65°C, à pH 10, au solvant (50% de stabilité pendant 2 h). Cette lipase a été recommandée pour l'élimination de l'huile des eaux usées (Ktata *et al.*, 2020). La lipase de *Streptomyces violascens* a montré une efficacité hydrolytique envers les huiles d'olive, de tournesol et de maïs, et elle pourrait de ce fait être utilisée pour le traitement des eaux usées huileuses (Boran *et al.*, 2019). La lipase de *Penicillium restrictum* a montré une efficacité dans le prétraitement des eaux usées de l'industrie de la viande (Rigo *et al.*, 2008). La diminution de la teneur en lipides et en matières organiques dans les eaux usées laitières a été étudiée à l'aide de la lipase de *Penicillium citrinum* (Alves *et al.*, 2019). D'autres lipases fongiques, appartenant au genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizomucor*, ont montré un potentiel d'utilisation dans le traitement des eaux usées (Rodrigues *et al.*, 2016; Nimkande and Bafana, 2022).

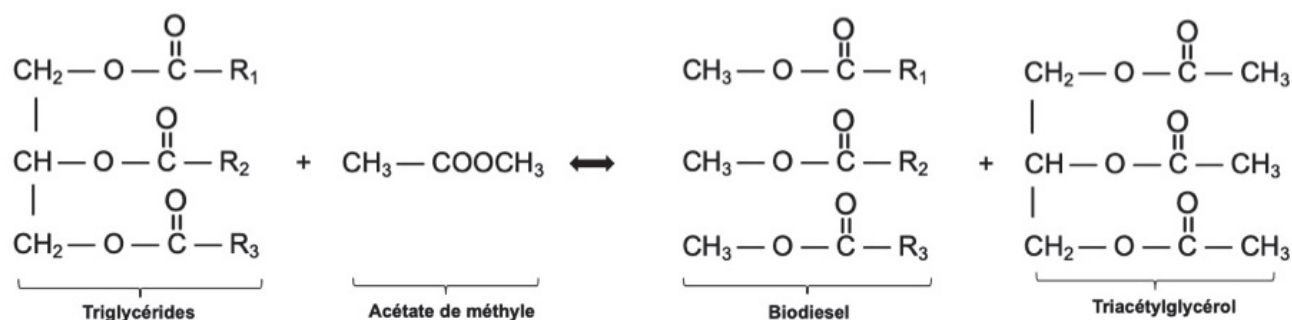
6.7. Biodiesel

Il est généralement produit par une réaction de transestérification ou d'interestérification (les réactions en-dessous) catalysée chimiquement ou par voie enzymatique, à partir des huiles végétales et graisses animales, comestibles ou bon marché. Il peut également être produit par réaction d'estérification des acides gras avec un alcool à chaîne carbonée courte comme le méthanol ou l'éthanol. Ces réactions aboutissent à la formation d'un ester d'acides gras nommé biodiesel, qui représente une alternative renouvelable et moins toxique au diesel issu du pétrole (Thangaraj *et al.*, 2019).

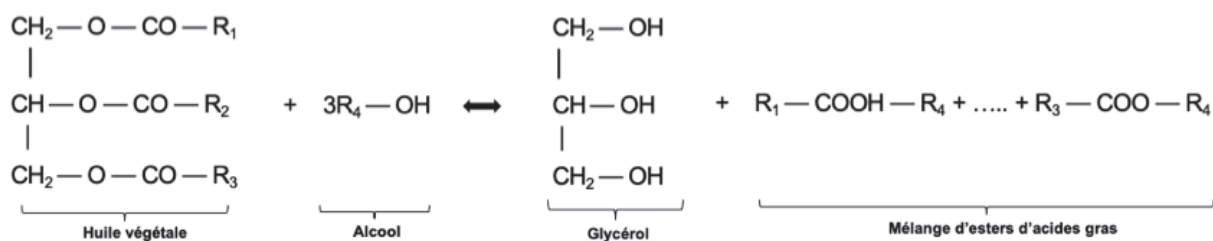
- Estérification



- Interestérification



- Transestérification



La voie enzymatique est plus attrayante, en raison de la haute qualité du produit, de la réutilisation de l'enzyme, des conditions douces et surtout de l'impact environnemental. La lipase microbienne la plus couramment utilisée pour la synthèse de biodiesel provient de *Pseudomonas cepacia*. La lipase de *Proteus mirabilis* est un catalyseur particulièrement prometteur pour la synthèse de biodiesel car elle produit des rendements élevés d'esters méthyliques même en présence de grandes quantités d'eau et s'exprime très bien dans *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2021). La lipase des espèces de *Pseudomonas aeruginosa* a été utilisée dans la production de biodiesel avec différents types d'huiles (huile de jatropha, huile d'olive, huile de soja et huile de Karanja). Les huiles de jatropha, d'olive, de soja et de Karanja ont été converties en ester méthylique à 57,4%, 64,2%, 57,9% et 59,7% respectivement, en utilisant la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* après 48 h de réaction (Bhan and Singh, 2020). Les lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas fluorescens* ont été aussi utilisées pour la production de biodiesel (Wang *et al.*, 2021).

7. Immobilisation

Au cours des années 1950 et 1960, différentes méthodes d'immobilisation covalentes d'enzymes ont été développées, à titre d'exemple la pénicilline G, l'acylase, l'invertase, les lipases, les protéases (Homaei *et al.*, 2013), et c'est au début des années 1970 que le terme "enzyme immobilisée" a été défini (Goldman *et al.*, 1968; Weetall and Pitcher, 1986). Aujourd'hui, dans de nombreux cas, les enzymes immobilisées se sont révélées très efficaces pour des utilisations commerciales (Homaei *et al.*, 2013). Les caractéristiques souhaitables des enzymes et leurs applications industrielles répandues sont souvent entravées par leur manque de stabilité opérationnelle à long terme et de durée de conservation et par leur récupération et leur réutilisation encombrantes (Pereira *et al.*, 2017). Généralement, la stabilité des enzymes à leur état libre (soluble) est limitée. De plus, étant solubles leur réutilisation serait difficile, ce qui rend leur application à l'échelle industrielle limitée et coûteuse (Chapman *et al.*, 2018). L'immobilisation des enzymes est devenue un procédé nécessaire dans plusieurs applications industrielles en améliorant la récupération et la purification de ces biocatalyseurs pour leur réutilisation. Elle favorise une meilleure stabilité à pH et températures élevés. L'immobilisation maintient aussi l'activité catalytique au cours du stockage (Chapman, 2018; Ben Bacha *et al.*, 2022)). Le procédé d'immobilisation des enzymes dans le secteur industriel présente des avantages et des inconvénients (Tableau 8).

Tableau 8 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des enzymes immobilisées dans l'industrie (Basso and Serban, 2019).

AVANTAGES	INCONVENIENTS
- Séparation facile des enzymes. - Réutilisation des enzymes. - Stabilité aux solvants organiques et aux températures élevées. - Utilisation dans des réacteurs en batch ou en lits fixes sans nécessité de l'utilisation des membranes pour séparer les enzymes du produit. - Co-immobilisation possible avec d'autres enzymes. - Réduction des coûts de traitement.	- Coûts supplémentaires pour l'immobilisation et pour le support. - Rendement faible par rapport à celui pour l'enzyme libre

Les différentes techniques d'immobilisation des enzymes se basent sur des principes chimiques ou physiques (Figure 15). Les polymères inertes et les matériaux inorganiques sont généralement utilisés comme matrices de support.

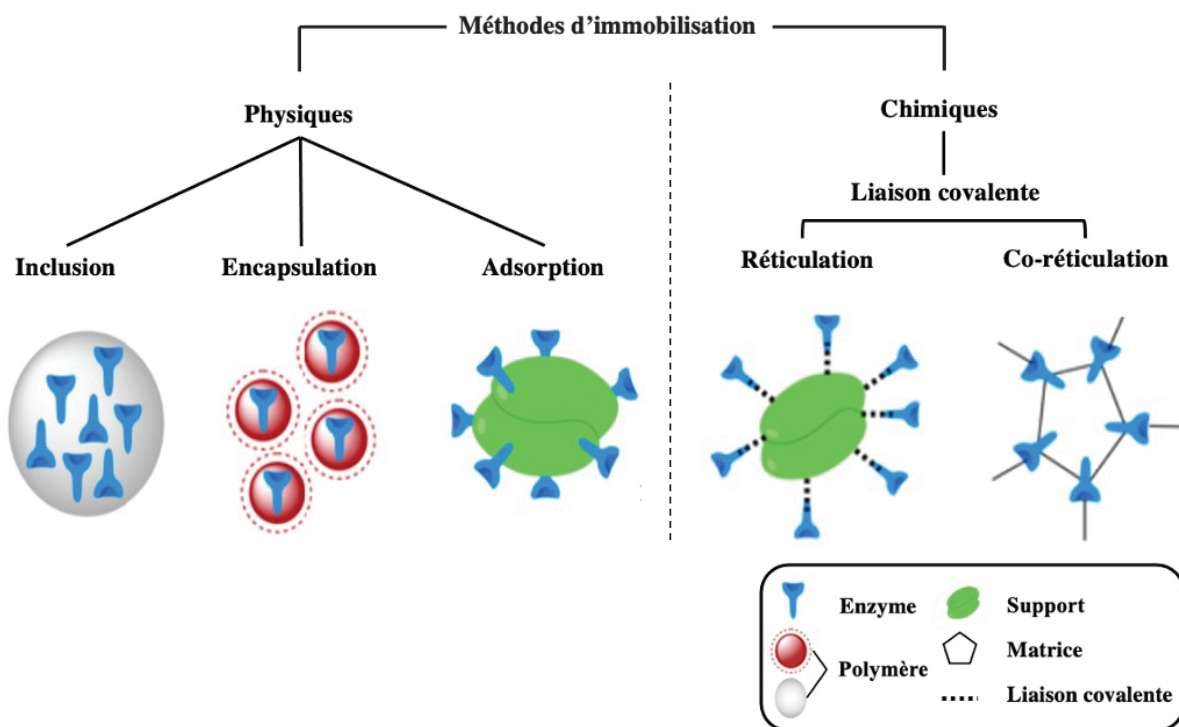


Figure 15 : Différentes méthodes d'immobilisation (Modifiée d'après (<https://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/3CoursdeBiochSTRUCT/4BiochimieIndustrielle/1BiochIndust.htm>)).

7.1. Immobilisation physique

Les méthodes d'immobilisation physique comprennent le piégeage de l'enzyme dans des polymères tels que l'alginate et le polyacrylamide, l'adsorption sur un support organique ou inorganique, et la micro-encapsulation où l'enzyme se trouve à l'intérieur d'une capsule sphérique (Zucca and Sanjust, 2014) (Figure 15). Dans ce cas, l'enzyme est fixée par des liaisons réversibles de faible énergie (Van Der Waals, électrostatiques ou hydrogènes), et elle peut être détacher lors du processus de lavage (Cen *et al.*, 2019; Mechri *et al.*, 2022).

7.1.1. Adsorption

C'est la méthode la plus simple, rapide et rentable, qui consiste en la fixation réversible de l'enzyme sur un support. Les enzymes sont fortement attachées ou adhérentes à la surface d'un support par la combinaison d'interactions hydrophobes et des ponts salins. Les matrices utilisées sont hydrophobes comme les dérivés des polysaccharides, le verre et les polymères synthétiques (Thangaraj and Solomon, 2019). Cette technique nécessite généralement le trempage du support dans une solution d'enzyme et l'incubation pour laisser le temps à

l'adsorption de se produire. En conséquence, une optimisation de certains paramètres, comme le pH, la température, le temps de contact, l'agitation, la concentration en enzyme et la surface spécifique du support, est essentielle pour empêcher les phénomènes de désorption et de dénaturation. Ensuite, les résidus d'enzymes non liées sont éliminés par lavage (Nur Royhaila *et al.*, 2015). L'immobilisation d'une lipase de *Yarrowia lipolytica* par adsorption sur octyl-agarose et sur les billes de l'octadecyl-sepabeads a permis une grande stabilité de l'enzyme avec un rendement élevé par rapport à la lipase libre (Cunha *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude réalisée sur la lipase de *Candida rugosa* immobilisée par adsorption sur un support poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) montre que celle-ci donne une activité résiduelle de 94% après incubation pendant 4 h à 50°C avec réutilisation de 12 cycles (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012). Une étude de l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* par adsorption sur l'hydroxyapatite a montré une conservation de l'activité après 3 h à 60°C (Trbojević Ivić *et al.*, 2016).

7.1.2. Piégeage dans une matrice de polymère

C'est une méthode d'immobilisation dans laquelle l'enzyme est piégée à l'intérieur d'un polymère (gel ou film), notamment de l'agar, du tri-acétate de cellulose, du chitosan, du polyacrylamide, de l'alginate de calcium et du collagène (Guo, 2019)(Figure 15). Ces supports possèdent le pouvoir de gélification, ils sont non toxiques et n'interagissent pas chimiquement avec l'enzyme (Soleimani *et al.*, 2012). Toutefois, le passage difficile à travers le réseau du substrat reste l'inconvénient de cette méthode. Dans cette méthode, le paramètre critique dans la sélection d'une matrice est la taille des pores. En effet, si les pores sont très larges, il y a un risque de fuite de protéines. Cependant, l'espace doit être assez suffisant pour assurer la circulation du substrat et son transfert vers le site actif de l'enzyme. L'inclusion améliore la stabilité mécanique de l'enzyme et dans certains cas la thermostabilité et la tolérance aux solvants organiques (Nur Royhaila *et al.*, 2015).

L'immobilisation d'une protéase d'*Aspergillus niger* par inclusion dans un gel agar-agar, a permis l'augmentation de la température optimale de l'enzyme de 50°C (protéase libre) à 55°C (protéase immobilisée), et un maintien de l'activité résiduelle de l'enzyme à 50% après 8 cycles de réutilisation (Sattar *et al.*, 2018). En outre, l'immobilisation d'une pectinase œnologique par encapsulation dans l'alginate de calcium a amélioré la stabilité de l'enzyme jusqu'à 6 cycles avec une activité résiduelle de 37%, sans changement de l'optimum de pH ni celui de la température (Martín *et al.*, 2019).

7.2.Immobilisation chimique

L'immobilisation chimique consiste à créer des liaisons covalentes entre le support et des groupements fonctionnels de l'enzyme (Figure 15). Les résidus qui sont impliqués dans cette méthode peuvent être soit l'histidine, l'arginine ou l'acide aspartique. La liaison covalente empêche la dissociation de l'enzyme et donne une meilleure stabilité. En revanche, l'enzyme peut perdre une partie de son activité par interaction du site actif avec le support (Torres *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2019). La co-réticulation est parmi les méthodes d'immobilisation chimiques. Elle consiste en la formation de liaisons covalentes intermoléculaires entre l'enzyme et la matrice par l'utilisation des réactifs bi-fonctionnels comme le di-isocyanate et le glutaraldéhyde ou par la création d'une liaison ionique entre l'enzyme et une matrice chargée et fixation de l'enzyme à une matrice par affinité (Martins *et al.*, 2019). Cette technique est très utile, mais son inconvénient est qu'elle nécessite un pH alcalin (environ 10) pour améliorer de la réactivité des groupements nucléophiles présents à la surface des protéines. Certaines enzymes perdent une partie de leur activité avec ce type d'immobilisation comme la lipase de *Candida rugosa* (Rivero and Palomo, 2016).

Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Produits chimiques

La rhodamine B, l'acide taurodésoxycholique sodique (NaTDC), le diméthylsulfoxyde (DMSO), la β -cyclodextrine (β -CD), la gomme arabique (GA), la membrane de transfert de difluorure de polyvinylidène (PVDF), le fluorure de phénylméthanésulfonyle (PMSF), le fluorophosphate de diiodopropyle (DFP), l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), le N-éthylmaléimide (NEM), l'iodoacétamide, l'oxyde de phénylarsine (PAO), le cycloheximide et la gentamicine ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'Orlistat (tétrahydrolipstatine), inhibiteur connu des lipases digestives, a été obtenu auprès de Hoffmann-La-Roche Ltd (Bâle, Suisse).

2. Lipides

Le glyceryl triacétate (TC2), le glyceryl tributyrat (TC4), le glyceryl trihexanoate (TC6), le glyceryl trioctanoate (TC8) et l'huile d'olive ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). Les TG synthétiques ont été estérifiés avec de l'acide α éléostéarique (acide 9Z, 11E, 13E-octadécatriénoïque) soit en position *sn*-1 [1 α -éléostéaroyl-2, 3-octadécyl-*sn*-glycérol (*sn*-EOO)] soit en position *sn*-3 [1,2-octadécyl-3- α -éléostéaroyl-*sn*-glycérol (*sn*-OOE)] et sont décrits figure 16. L'acide α -éléostéarique, avec son triène conjugué, constitue un chromophore intrinsèque et confère des propriétés d'absorption dans l'ultraviolet à cet acide gras libre, ainsi qu'aux TG estérifiés par cet acide gras. Une liaison éther non hydrolysable, liée à une chaîne alkyle saturée n'ayant aucune propriété absorbante dans l'UV, a été introduite aux autres positions *sn* du TG pour empêcher la migration de la chaîne acyle lors de la lipolyse (El Alaoui *et al.*, 2017).

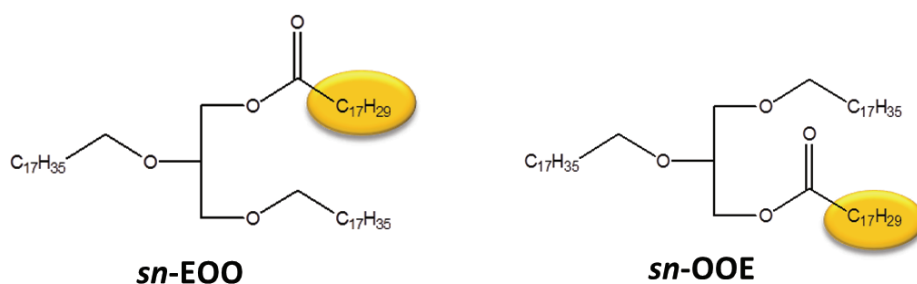


Figure 16 : Structures chimiques de *sn*-EOO et *sn*-OOE. L'acide α -éléostéarique est marqué en jaune, relié par une fonction ester hydrolysable par les lipases. La chaîne alkyle, liée par une liaison éther non hydrolysable, est représentée en noir.

3. Protéines

Les lipases *sn*-1,3 régiosélective de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase®), de *Rhizomucor miehei* (Palatase® 20000 L), de *Candida antarctica* A (CALA) et de *Candida antarctica* B (CALB) ont été fournies par Novozymes Biopharma DK A/S (Bagsvaerd, Danemark). La catalase (4000 U/mg), la protéinase-K P-5056, la Nisine, l'albumine de sérum bovin (BSA) et Lecitase® ont été obtenues auprès de Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France). La cutinase de *Fusarium solani* (FSC) et la lipase de *Serratia* sp. W3 (SML) ont été exprimées dans *E. coli* et purifiée comme décrit précédemment respectivement, (Petersen *et al.*, 1998 ; Eddehech *et al.*, 2021).

4. Souches microbiennes

- ➔ ***Penicillium crustosum* Thom P22** : Cette souche a été nouvellement isolée à partir de margines d'olives issues d'une unité de trituration de l'huile d'olive de la région orientale du Maroc. Les séquences nucléotidiques des gènes ARNr 5.8S, *benA* et *CaM* rapportées dans cette étude ont été soumises respectivement dans les bases de données GenBank/ENA/DDBJ sous les numéros d'accès ON854673, ON854674 et ON854675.
- ➔ ***Levilactobacillus brevis* S27, *Lactiplantibacillus pentosus* S42, et *Lactiplantibacillus plantarum* S62** sont des souches de LAB qui ont été isolées à partir de saumures d'olive en fermentation traditionnelle. Les numéros d'accès de leurs séquences de gènes d'ARNr 16S sont respectivement NR_044704.2, NR_029133.1 et NR_104573.1.
- ➔ ***Rhodotorula glutinis* UMP22** : Cette souche a été isolée à partir de saumures d'olive en fermentation traditionnelle provenant d'une conserverie d'olives de table de la région orientale du Maroc. La séquence nucléotidique du gène de l'ARNr 5.8S a été déposée dans les banques de données GenBank/ENA/DDBJ sous le numéro d'accès ON209167.1
- ➔ ***Listeria innocua* CCUG 35613** : une bactérie mésophile aérobie isolée sur un chou.
- ➔ ***E. coli* ATCC® 10536™** : Cette souche MacLeod d'*E. coli* est une souche bactérienne séquencée qui a des applications dans les tests bactéricides, les tests de stérilité et le contrôle de la qualité.
- ➔ ***E. coli* TOP10** : [*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr*- *hsdRMS*- *mcrBC*) ϕ 80 *lacZAM15* Δ *lacX74* *rACE1* *araD139*]. Cette souche porte le gène *lacZAM15* qui permet l' α -complémentation, permettant ainsi la sélection des colonies recombinante par criblage phénotypique bleu/blanc, sur milieu contenant du 5 bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal) et d'isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG).

- ➔ **BL21(DE3)** : [F^- *ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) [lacI lacUV5-T7 gène 1 ind1 sam7 nin5]*. Cette souche *E. coli* BL21 (DE3), est une dérivée lysogène de la souche classique *E. coli*, c'est-à-dire qu'elle contient le prophage λDE3 dont l'un des gènes code l'ARN polymérase du bactériophage T7 (sous le contrôle du promoteur lacUV5 inducible par l'IPTG). Ainsi, quand cette souche est transformée par un vecteur d'expression (comme ceux de la famille pET) qui contient un promoteur fort (celui du bactériophage T7), cette souche exprime la polymérase du bactériophage T7 qui est sous le contrôle du promoteur *lacI*. La résistance au chloramphénicol est conférée par un gène porté par le plasmide pRIPL qui code des tRNA rares chez *E. coli* mais fréquents chez d'autres bactéries (ce sont des codons GC riches qui sont codés).

5. Vecteurs de clonage et d'expression

- ➔ **pGEM-T Easy** (3015 pb) : Ce vecteur porte aussi le gène *lacZ* et un gène de résistance à l'ampicilline. Il possède une base T à chaque extrémité 3' permettant le clonage des fragments PCR ayant une base A à l'extrémité 3'. Enfin, il permet l'utilisation des amorces SP6 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée (Figure 17).

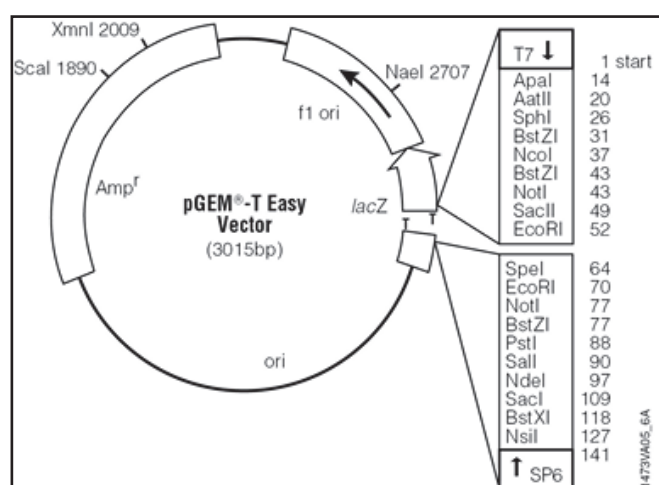


Figure 17 : Carte de restriction du vecteur de clonage pGEM-T Easy.

- ➔ **pET28b(+)** de 5368 pb de Novagen (Figure 18) permet l'expression de protéines recombinantes dans le système procaryotique *E. coli* par induction à l'IPTG. Il contient le promoteur T7, les inserts clonés dans ce plasmide pET28b(+) sont donc sous la dépendance de la T7 RNA polymérase. Le plasmide est présent de 15 à 20 copies par cellule et ce plasmide confère la résistance à la Kanamycine (Kan).

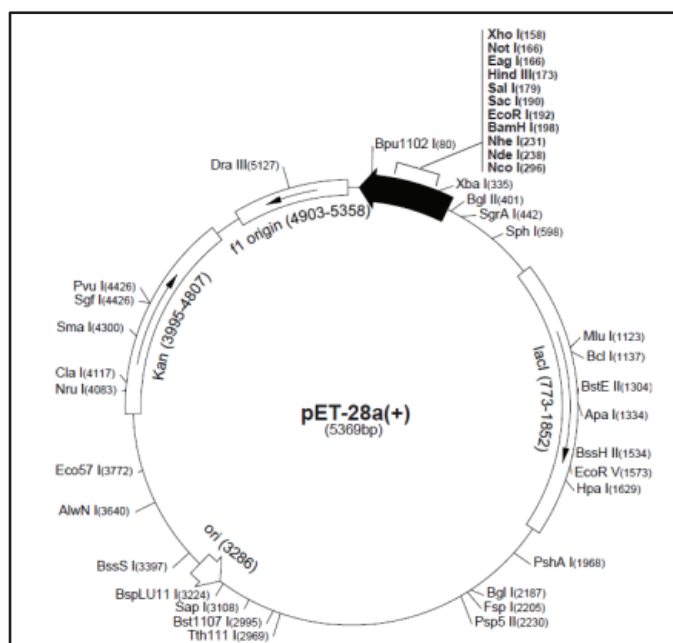


Figure 18 : Carte du vecteur pET28a(+).

6. Milieux de culture

- ✚ Luria-Bertani (LB) contient pour 1 L: 10 g de tryptone, 5 g d'extraits de levure, 10 g de NaCl et 15 g d'agar. Ce milieu est utilisé pour l'isolement des bactéries.
- ✚ La gélose Dextrosée de pomme de terre (PDA) composée pour 1 L: 20 g de dextrose, 4 g d'extraits de pomme de terre et 15 g d'agar, avec un pH ajusté à 5,6. Ce milieu est utilisé pour l'isolement des levures.
- ✚ Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Annexe A) est additionné de cycloheximide à une quantité de 0,01 g/100 mL, pour inhiber le développement des levures et des moisissures.
- ✚ La gélose Mueller-Hinton (MH) est composée pour 1 L : 17,5 g d'hydrolysate acide de caséine, 2 g d'extrait de viande, 1,5 g d'amidon soluble, 15 g d'agar et additionné avec le cycloheximide à une quantité de 0,01 g/100 mL, pour inhiber le développement des levures et des moisissures.
- ✚ Le Milieu (M.LIPASE) est utilisé pour, le suivi de production d'activité lipase et est composé pour 1 L: 15 g de caséine peptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 2,5 g de glucose, 3 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , avec un pH de 7,4.
- ✚ Le Milieu SOC est composé pour 1 L de tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM et glucose 20 mM.

Les boîtes de Petriensemencées contenant le milieu MRS, LB et MH sont incubées à 37°C pendant 24 h, tandis que les boîtes contenant le milieu PDA sont incubées à 30°C pendant 2 à 5 jours.

7. Appareillages

Les purifications de protéines ont été effectuées sur un appareil de chromatographie ÄKTA prime FPLC équipé d'une colonne HiTrap™ Q-Sepharose Fast Flow (FF) (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède) d'un volume de 5 mL. Les mesures des activités lipolytiques ont été effectuées en utilisant l'appareil pH-STAT (Metrohm 702 SM Titrino, Herisau, Suisse). Les cinétiques enzymatiques sur des TG adsorbés sur des puits de microtitration ont été suivies en utilisant un lecteur de microplaques Tecan Infinite M200 Pro (UV-visible-fluorescence).

II. Méthodes

1. Isolement, criblage et identification des microorganismes producteurs des lipases à partir des coproduits oléicoles

1.1. Biotopes et prélèvement des échantillons

Le choix du biotope (coproduits oléicoles) a été décidé en se basant sur les hypothèses mentionnées dans la section "introduction générale" (Cf. page 3). Ainsi, nous avons sélectionné trois types de déchets (deux liquides et un solide) sur lesquels nos échantillons ont été prélevés:

- ✚ Saumures d'olives.
- ✚ Margine d'olives.
- ✚ Grignons d'olives.

Dix échantillons ont été prélevés, 2 de grignons d'olives (G_1 et G_2), 4 de margines d'olives (M_1 , M_2 , M_3 et M_4) apportés de la région orientale du Maroc et 4 de saumure (S_{01} , S_{07} , S_{24} et S_{B1}) d'une conserverie d'olives de table située dans la zone industrielle d'Oujda. Les échantillons de grignons d'olive et de margines ont été collectés de différentes unités de trituration des olives. Les échantillons collectés ont été immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C.

1.2. Criblage des souches productrices des lipases

1.2.1. Préparation des dilutions et des milieux de culture

Afin d'isoler les micro-organismes présents dans les échantillons prélevés, dès la réception, des quantités de 100 g ou 100 mL de chaque échantillon sont mises en suspension dans du milieu LB (milieu d'enrichissement) pendant 48 h à 30°C, afin de permettre la revivification des souches endogènes de chaque biotope. Par la suite 1 mL de chaque échantillon est mis en suspension dans 9 mL d'eau distillée stérile et homogénéisé pendant 5 min par vortex. Des séries de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-9}) ont été réalisées à partir de ces solutions mères. Des volumes de 100 μ L de chaque dilution sont ensuiteensemencés par étalement de surface sur quatre milieux de culture

gélifiés (LB, PDA , MRS et MH) additionnés après autoclavage de 1% (v/v) d'huile d'olive et 0,001% (m/v) de rhodamine-B. Après incubation à 37°C pour les bactéries et 30°C pour les levures et les champignons, l'activité lipase est détectée en irradiant les plaques avec une lumière UV à 350 nm. L'activité lipolytique est indiquée par l'apparition des halos fluorescents oranges autour des colonies.

1.2.2. Numérations par comptage de colonies

Le dénombrement des colonies apparues n'est effectué que pour les boîtes révélant entre 30 et 300 colonies et pour les colonies montrant une activité lipolytique. Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) selon la formule suivante :

$$N \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = (Y \times F) / V$$

Avec :

N (UFC/mL) : Nombre d'Unité Formant Colonie par mL.

Y : Nombre de colonies comptées.

F : Facteur de dilution.

V : Volume étalé sur la boîte (mL).

1.2.3. Purification

Après croissance, les colonies montrant une activité lipolytique ont été prélevées et ensemencées à épuisement dans des boîtes différentes sur milieu PDA et MH, et les boîtes ont ensuite été incubées à 30°C pendant 48 h pour les bactéries et 25°C pendant 72 h pour les champignons. Les 88 isolats qui ont montré une activité lipolytique ont été revérifiés pour leur activité sur les mêmes milieux de culture mentionnés précédemment.

1.2.4. Identification des isolats

L'examen macroscopique a porté sur l'observation de l'aspect des colonies (forme, taille, pigmentation, contour, viscosité...). Le genre microbien (bactérie, champignon) de chaque isolat est déterminé au microscope optique, à l'état frais, selon les étapes suivantes :

- Dépôt entre lame et lamelle propres d'une suspension d'isolat microbien vivant.
- Mise au point à l'objectif $\times 40$ pour les champignons, et pour les bactéries une mise au point à l'objectif $\times 100$.

Les bactéries isolées sont classées selon leur forme (cocci ou bacille) et selon la composition de leur paroi cellulaire (Gram négatif ou Gram positif) en utilisant la méthode de coloration de Gram, comme décrit (Gram, 1884) :

- Préparation d'un frottis bactérien fixé sur une lame.
- Coloration par le violet de gentiane pendant une minute.

- Fixation par solution d'iode (lugol) pendant une minute.
- Décoloration par l'alcool 95% pendant 20 secondes.
- Recoloration à la fuchsine pendant une minute, puis rinçage et séchage.
- Observation microscopique à l'aide de l'objectif $\times 100$ (huile à immersion).

Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries et les colore ainsi en violet et le lugol permet sa fixation. L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites «Gram négatives». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes (plus fine) qui va laisser passer l'alcool (molécule hydrophile), ce qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool, car elle est composée d'une couche de peptidoglycanes plus épaisse et donc ces bactéries préserveront leur couleur violette. Ensuite, l'étape de la contre-coloration à la fuchsine ayant pour but de donner aux bactéries à Gram négatif précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Par contre, les bactéries à Gram positif conservant la couleur violette, seront évidemment insensibles à cette contre-coloration. La coloration de Gram permet donc de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grands groupes (Gram positive ou Gram négative). Ces différences de coloration et les différences de forme (bacille ou cocci) sont à l'origine de la classification des bactéries.

1.2.5. Conservations des isolats

Les isolats, sélectionnés pour leur activité lipolytique, ont été conservés à -20°C dans les milieux MH (bactéries) et PDA (champignons) avec 30% de glycérol. Cette méthode permet de conserver les souches sur le long terme.

1.3. Suivi de production d'activité lipase

Les isolats sélectionnés présentant une activité lipolytique sur gélose contenant de l'huile d'olive et la rhodamine-B sont passés au crible quantitatif. Ainsi, les isolats sélectionnés sont d'abord pré-cultivés dans des Erlenmeyers de 50 mL contenant chacun 10 mL de bouillon nutritif, puis incubé à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons, sous une agitation de 100 rpm. Ensuite, ces pré-cultures sont utilisées comme inoculum et sont cultivées dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant chacun 50 mL d'un milieu liquide (M.LIPASE) comme décrit par Dheeman *et al.*, avec des modifications mineures, les cultures sont incubées sous agitation (120 rpm/min à 25°C pour les champignons et 30°C pour les bactéries). Ce milieu a été sélectionné après avoir testé différents milieux liquides conçus pour la production d'enzymes lipolytiques. Des prélèvements destinés à l'extraction des lipases produites, la mesure

quantitative de leur activité lipolytique et la quantification de la biomasse ont été effectués chaque 12 h. Les isolats sont centrifugés à $9400 \times g$ pendant 20 min à 4°C. Les surnageants limpides obtenus contenant l'extrait brut d'enzymes sont utilisés pour la mesure de l'activité lipolytique à l'aide d'un pH-STAT.

1.3.1. Mesure de l'activité lipase

L'activité lipase est mesurée en utilisant la technique du pH-STAT. Il s'agit d'une méthode potentiométrique basée sur la titration automatique et en continu des acides gras libérés par l'action de lipase sur une émulsion de TG. La titration s'effectue par une solution de NaOH à 0,1M afin de maintenir le milieu réactionnel à un pH de consigne constant. Le volume de soude versé est proportionnel à la quantité des acides gras libérés. Des TG à chaîne courte (TC2 et TC4), moyennes (TC8) ou longues (huile d'olive) ont été utilisés. Chaque essai enzymatique a été effectué dans un récipient thermostaté (37°C) contenant 0,5 mL de substrat TG et 14,5 mL du tampon Tris-HCl 0,3 mM (pH 9), 150 mM de NaCl et 2 mM de CaCl_2 . Lorsque l'huile d'olive est utilisée comme substrat, elle est d'abord émulsifiée avec la gomme arabique en mélangeant 10 mL d'huile d'olive avec 90 mL d'une solution de gomme arabique à 10% (*m/v*) préparé comme décrit par (Tiss *et al.*, 2001). L'activité enzymatique a été exprimée en unités internationales (1 UI correspondant à 1 μmol d'acides gras libérés par min).

Un test spectrophotométrique en continu a été utilisé pour déterminer la régiosélectivité de la PCrL envers les TG en utilisant des TG chimiquement définis contenant l'acide α -éléostéarique en position *sn*-1 (*sn*-EOO) ou en position *sn*-3 (*sn*-OOE) (voir Cf. I.2 lipides section matériel et méthodes). Ce test est basé sur l'augmentation de l'absorbance UV de l'acide α -éléostéarique libéré du fait du passage de l'état adsorbé à l'état soluble dans le milieu lors de la lipolyse des TG.

Les puits des plaques de microtitration ont été recouverts de TG synthétiques comme décrit précédemment (El Alaoui *et al.*, 2017). Les TG (*sn*-EOO et *sn*-OOE) en solution dans l'hexane sont déposés (dépôt de 100 μL à 0,5 mg/mL avec 0,001% de BHT) dans des puits de microplaques. L'hexane est ensuite évaporé sous une hotte pendant 30 à 45 min afin d'obtenir un film homogène de TG adsorbés au fond du puits. Les puits de microtitration sont d'abord rincés trois fois avec le tampon réactionnel contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 6 mM de CaCl_2 , 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 2,5 mM de β -CD pour éliminer les composés non adsorbés et laissés s'équilibrer avec le tampon de réaction (200 μL) pendant 10 min à 37°C. La lipase (0,65 μg) a ensuite été injectée dans les puits de la plaque de microtitration et l'absorbance à 272 nm a été enregistrée à intervalles réguliers de 1 min via un spectrophotomètre de microplaque (Tecan Infinite M200 Pro),

avec 5 s d'agitation de la plaque de microtitration avant chaque lecture. Les valeurs d'absorbance enregistrées à 272 nm ont été comparées à un échantillon sans enzyme ne contenant que le tampon seul, comme témoin. La vitesse enzymatique calculée en variation de l'absorbance par minute a été convertie en activité spécifique (UI/mg) en utilisant le coefficient d'extinction molaire apparent de l'acide α -éléostéarique ($5320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (El Alaoui *et al.*, 2017). L'index de régiosélectivité (RI%) envers les TG est calculé en utilisant l'équation suivante:

$$RI = \frac{(A_{sn-EOO} - A_{sn-OOE})}{(A_{sn-EOO} + A_{sn-OOE})} \times 100$$

où A_{sn-EOO} et A_{sn-OOE} représentent les activités spécifiques de la lipase utilisant respectivement *sn*-EOO et *sn*-OOE comme substrats.

1.4. Test d'estérification pour la lipase

L'estérification des acides gras par le méthanol, catalysée par une lipase, est un procédé prometteur pour la production de biodiesel. Par conséquent, un test d'estérification de l'acide oléique par du méthanol, catalysée par la PCrL a été effectué. La réaction est réalisée dans un flacon en verre hermétique, à 37°C sous une agitation à 150 rpm, pendant 24 h. Le mélange réactionnel est composé de 500 U de lipase, 6 mL d'hexane et un rapport molaire de 3:1 méthanol / acide oléique. Un contrôle de même composition mais sans enzyme est réalisé dans les mêmes conditions. Des aliquotes sont prélevés toutes les 4 h pour déterminer le taux de conversion de la réaction. Pour se faire, tout d'abord l'enzyme (immobilisée) est récupérée par centrifugation à 13 000 x g pendant 5 min à 4°C, puis les acides gras résiduels dans le surnageant (dans la phase huileuse) sont dosés par une solution de KOH (0,1 M), en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur coloré. Les échantillons sont solubilisés dans l'éthanol avant la titration acido-basique. Le taux de conversion est calculé comme suit (Nguyen and Kim, 2017):

$$\text{Degré de conversion (\%)} = \frac{IA1 - IA2}{IA1} \times 100$$

Avec:

- IA1 : Indice d'acide du contrôle
- IA2 : Indice d'acide de l'échantillon après estérification

1.5. Identification moléculaire de la souche P22

L'isolat P22 a été identifié sur la base de caractérisations morphologiques macroscopiques et microscopiques, comme décrit par Visagie *et al* (2014). Il a également été identifié au niveau moléculaire au Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS, Utrecht, Pays-Bas) avec : l'ADN extrait à l'aide d'un kit d'isolement d'ADN microbien (Qiagen DNeasy Ultraclean™). Les

fragments contenant les régions 1 et 2 de l'*ITS* y compris l'ADNr 5.8S, un gène partiel de la β -tubuline (*benA*) et des fragments contenant un gène partiel de la calmoduline (*CaM*) ont été amplifiés et séquencés. L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant la Taq polymérase. L'amplification par PCR consistait en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 35 cycles, chacun consistant en une dénaturation à 94°C durant 45 s, une hybridation à 55°C durant 45 s et une extension à 72°C pendant 1 min. La dernière étape d'extension a été réalisée à 72°C pendant 7 min. Les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose à 1% et révélés sous éclairage UV grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les fragments d'ADN. Les amorces utilisées sont mentionnées dans le Tableau 7.

Les fragments de PCR ont été séquencés dans les deux sens avec les amorces utilisées pour l'amplification par PCR à l'aide d'un kit de séquençage ABI Prism® Big Dye™ Terminator v. 3.0 Ready Reaction Cycle. Les échantillons ont été analysés sur un analyseur génétique ABI PRISM 3700, et les fragments ont été reconstitués utilisant les séquences directes et inverses avec le programme SeqMan du package LaserGene. Les séquences ont été comparées sur GenBank à l'aide du programme BLAST, et dans la base de données de séquences interne du Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. Des analyses phylogénétiques et moléculaires ont été effectuées à l'aide du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v. 4.1. Les distances et le regroupement ont été calculés à l'aide de la méthode de jonction des voisins. La topologie arborescente des données de jonction voisine a été évaluée par analyse Bootstrap avec 100 rééchantillonnages.

2. Procédure de purification

La production de la lipase de *Penicillium crustosum* Thom P22 (PCrL) est assurée sur le milieu précédemment décrit (Cf. §1.3) Après 6 jours d'incubation à 25°C et 120 rpm, lorsque l'activité lipasique était maximale, le mycélium a été filtré sur papier filtre Whatman grade n°1, taille 110 mm à 4°C. La purification de la PCrL est réalisée selon les étapes suivantes :

2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Les protéines dans l'extrait brut ont été précipitées avec du sulfate d'ammonium à une concentration de 70% de saturation, sous agitation douce assurée par un agitateur magnétique, à 4°C pendant 1 h. Les protéines ont été recueillies par centrifugation à $12\,000 \times g$ pendant 20 min et 4°C, remises en suspension dans un volume approprié de Tris-HCl 50 mM à pH 8, additionnées de NaCl 200 mM et de benzamidine 2 mM, et dialysées pendant une nuit contre du Tris-HCl 50 mM à pH 8 benzamidine 2 mM (tampon A) à 4°C.

2.2. Chromatographie d'échange d'anions

La chromatographie d'échange d'anions a été réalisée sur un système ÄKTA prime FPLC équipé d'une colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF (5 mL), pré-équilibrée avec du tampon A. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM) dans le tampon A à un débit de 1 mL/min et des fractions de 1 mL ont été récupérées. La concentration des protéines a été estimée par mesure de l'absorbance à 280 nm et l'activité lipase a été mesurée sur TC8 par la technique du pH-STAT dans les conditions optimales. Les fractions contenant l'activité lipase sont collectées et concentrées en utilisant un concentrateur centrifuge de 10 kDa (Merck Amicon®, Beverly Hills, CA, USA).

2.3. Analyse des protéines

2.3.1. Dosage des protéines

Méthode de Bradford :

La concentration des protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant un kit de réactifs de Bio-Rad Dye, USA et en utilisant de la BSA (Sigma Aldrich) comme standard.

2.3.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes

Les fractions actives de lipase ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970) décrite pour visualiser les protéines séparées en fonction de leur

masse moléculaire. Les protéines sont dénaturées à l'aide d'un tampon composé de 40 mM de Tris/HCl (pH 6,8), 2% (m/v) de SDS, 20% (m/v) de glycérol, 1,7% (v/v) de β -mercaptoéthanol (β -ME) et 0,002% (m/v) de bleu de bromophénol et incubées à 95°C pendant 5 min. Le tampon de migration est composé de 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1% (m/v) de SDS (pH 8,3). Le gel est coloré par une solution contenant le bleu de Coomassie R250 à 0,1% (m/v), dans 50% (v/v) d'éthanol et 7% (v/v) d'acide acétique. Le gel est décoloré par une solution composée de 10% (v/v) d'éthanol et 7% (v/v) d'acide acétique.

3. Séquençage des résidus de l'extrémité NH₂-terminale de la PCrL

Les fractions protéiques sont d'abord séparées par SDS-PAGE, puis électrotransférées sur une membrane PVDF à l'aide de la cellule de transfert électrophorétique Mini Trans-Blot Bio-Rad selon les instructions du fabricant. Le transfert s'effectue sous l'effet d'un champ électrique à 100 V pendant 1 h, dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, 50 mM borate (pH 8,3) et 20% (v/v) d'éthanol. Par la suite, la membrane PVDF est rincée à l'eau distillée, colorée au rouge Ponceau et les bandes protéiques sont excisées puis conservées à -20°C, avant d'être analysées. La séquence des résidus de l'extrémité NH₂-terminale de la bande portant la protéine a été déterminée par dégradation d'Edman automatisée à l'aide d'un séquenceur de protéines PPSQ-31B Shimadzu (Kyoto, Japon) situé au sein de la plateforme protéomique de l'IMM, MaP IBiSA (Marseille, France).

4. Expression de la PCrL et des lipases LAB dans *E. coli* BL21

4.1.Extraction d'ARN totaux de la souche P22 et extraction d'ADN de LAB

La souche *Penicillium crustosum* Thom P22 a été cultivée pendant 72 h à 25°C et les ARN ont été extraits avec le Kit Monarch® Total RNA Miniprep (Biolabs) tel que décrit par le fabricant. Les ARN isolés ont été quantifiés et stockés à -20°C. La quantification de l'ARN a été réalisée par spectrophotométrie en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop 8000.

A partir de cultures microbiennes incubées pendant 24 h à 30°C des 3 LAB (*Levilactobacillus brevis* S27, *Lactiplantibacillus pentosus* S42, et *Lactiplantibacillus plantarum* S62), nous avons procédé à l'extraction d'ADN par le Kit Isolate II genomic DNA kit (A Meridian Life Science company, Germany) tel que décrit par le fabricant. L'ADN isolé a été quantifié et stocké à -20°C. La quantification de l'ADN a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 8000.

4.2. Purification des plasmides par midi préparation

Le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) permet la purification de plasmides par midipréparation. Il est composé d'une colonne contenant des billes de silice fonctionnalisées avec du méthyl-amino-éthanol. Au pH utilisé, ces groupements sont chargés positivement, ce qui permet la fixation de l'ADN chargé négativement à ce pH. Le culot bactérien est resuspendu en présence de ribonucléase A, puis les bactéries sont lysées avec du dodécyl sulfate de sodium (SDS) en conditions alcalines (pH 13), ce qui dénature l'ADN. Le lysat bactérien est ensuite rapidement neutralisé par l'ajout d'acide acétique, précipitant l'ADN génomique tandis que l'ADN plasmidique reste soluble. Le mélange hétérogène est filtré puis chargé sur une colonne échangeuse d'anions. Après lavage de la colonne, l'ADN plasmidique est élué et précipité à l'isopropanol. Afin de concentrer le plasmide, l'ADN précipité est retenu sur un filtre de 0,22 µm et lavé avec de l'éthanol à 70%. La membrane du filtre est ensuite séchée et le plasmide est finalement élué avec de l'eau.

4.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour vérifier la taille des acides nucléiques extraits ou amplifiés par PCR. Le gel composé d'agarose est dissout dans du tampon Tris, Acétate, EDTA (TAE) et dont la concentration est choisie en fonction de la taille des fragments à analyser. Du bromure d'éthidium (BET) est ajouté dans le gel en fusion à raison de 0,5 µg/ml afin de visualiser les acides nucléiques par une fluorescence sous UV.

Avant le chargement des puits, les échantillons sont mélangés avec le tampon 6X DNA Loading Dye de Fermentas™. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TAE 1X sous une tension de 100 V. Au terme de la migration, les bandes d'intérêt sont visualisées sous lumière UV sur un appareil GelDoc™ de BioRad® et la taille des fragments est évaluée par comparaison avec un marqueur de taille GeneRuler 1 kb DNA Ladder de la société Fermentas™.

4.4. Réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse (RT-PCR)

Les ADNc de la souche P22 ont été obtenus grâce au kit RT-PCR (LunaScript® RT SuperMix Kit (E3010)). La transcription inverse, réaction qui consiste à obtenir une molécule d'ADNc depuis une matrice constituée d'ARN a été réalisée par la "reverse transcriptase". Les fragments d'ADN complémentaires (ADNc) et ont été à leur tour utilisés comme matrice afin d'effectuer une amplification spécifique d'un ADNc précis.

Le tube contenant le mélange réactionnel a été placé dans un thermocycleur PCR. Afin de réaliser la réaction d'amplification (RT-PCR) selon le programme suivant :

- Une étape d'hybridation d'amorce : 2 min à 25°C
- Une étape de synthèse de l'ADNc : 10 min à 55°C
- Une étape d'inactivation thermique de la transcriptase : 1 min à 95°C

4.5. Réaction en chaîne par polymérase

Pour effectuer les amplifications, 1 ng d'ADN matrice est mélangé avec 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl₂, 0,4 µM de chaque amorce (voir Tableaux 9 et 10) et 0,5 unité de Taq polymérase pour un volume final de 12,5 µL. La première étape de PCR consiste à dénaturer l'ADN à 95°C pendant 5 min, puis trente cycles composés d'une première étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, puis d'une étape d'hybridation des amorces à 40°C pendant 30 s et d'une étape de polymérisation des dNTP à 72°C pendant 1 min 30 s. Les acides nucléiques extraits ou amplifiés par PCR ont été évalués par l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau 9 : Séquences et températures de fusion (T_m) des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant la lipase de la souche P22. Orientation « For », sens, et « Rev », antisens.

N°	Séquences	Orientation	T _m
554	5'GCAGACGCCGCTGCCTT3'	For	51°C
555	5'ATGTTGTTCAACTACCA3'	Rev	47°C
556	5'TCAGCTCAGATAGCCACAACC3'	For	48°C
557	5'NSWNARRTANCCRCANCC3'	Rev	49°C

Tableau 10 : Séquences et températures de fusion (T_m) des amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant d'une lipase chez les LAB . Les sites de restriction sont en Gras soulignés. Orientation « For », sens, et « Rev », antisens.

N°	Séquences	Orientation	Site de restriction	T _m
542	5' AGTC <u>CCATGG</u> AGATACGCACACTAGCT3'	For	<i>NcoI</i>	52°C
543	5' AGCAAGAATAGTACTGAAATC <u>CTCGAG</u> AGTC3'	Rev	<i>XhoI</i>	47°C
544	5' AGTC <u>CCATGG</u> AATATGAGCAATTGAGATTAATGAC3'	For	<i>NcoI</i>	49°C
545	5' TTTGACGCAAGTGGACTTTAAAC <u>CTCGAG</u> AGTC3'	Rev	<i>XhoI</i>	49°C

4.6. Digestion des inserts et du vecteur et la ligation

Les inserts obtenus par PCR sont purifiés (Kit QIAquick de QIAGEN) par adsorption sur membrane de silice, afin d'éliminer tous les sels indésirables restants de la réaction de PCR, ainsi que les amorces restantes et les nucléotides libres (dNTP). L'ADN purifié est quantifié en mesurant l'absorbance à 260 nm par un spectrophotomètre (Nanodrop).

Les produits de PCR et le vecteur pET28b sont digérés par les enzymes adéquates (Tableau 10) pendant 2 h à 37°C puis purifiés de la même façon que précédemment avec le kit « PCR purification » QIAquick Spin, puis ils sont concentrés sous vide partiel pendant 2 h puis l'ADN est quantifié. La ligation a été effectuée par la T4 DNA ligase, dans son tampon, pendant une heure à température ambiante avec ~100 ng de vecteur et 5 U de ligase dans un volume final de 10 µL. Les différentes ligations sont faites pour un rapport molaire vecteur : insert 1 :1 ou 1 :3, et avec un contrôle négatif 1 :0 permettant de quantifier la re-circularisation du vecteur sur lui-même.

4.7. Transformation de la souche Top10 d'*E. coli*

La transformation se fait par électroporation : 1 µL du milieu de ligation est mélangé avec les bactéries Top10 électrocompétentes préalablement préparées par lavages extensifs à l'eau et les cellules sont transformées par électroporation (2,5 kV pendant 5,9 ms) à l'aide d'un MicroPulser (BioRad). Un volume de 300 µL du milieu SOC y est ensuite ajouté, et les cellules sont incubées pendant 30 min à 37°C sous agitation. Les cellules transformées (100 µL) ont été étalées sur du milieu LB-agar contenant l'antibiotique Kanamycine à 100 mg/L final et incubées une nuit à 37°C.

4.8. Criblage des clones recombinants, culture et purification

Les clones sélectionnés sur boîtes de Petri ont été mis en culture dans 3 mL de LB avec l'antibiotique pour 5 h à 37°C sous agitation. La vérification des transformants positifs a été faite ensuite par PCR en utilisant la Taq polymérase directement sur 1 µL de culture.

Un clone contenant le plasmide recombinant a été cultivé pendant une nuit avec les antibiotiques appropriés dans 200 mL de milieu LB et l'ADN plasmidique a été purifié par le kit « Plasmid DNA purification » de Macherey-Nagel.

4.9. Expression de protéines recombinantes dans *E. coli* BL21(DE3) avec le plasmide pET28b(+)

Une préculture pendant la nuit à 37°C est réalisée du clone transformé, sous agitation dans un milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (kanamycine (100 mg/L), chloramphénicol (20 mg/L)). Ensuite, la préculture est diluée au 20^{ème} pour être inoculée dans un milieu LB dépourvu d'antibiotique et les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique (DO) de 0,6 à 0,8 mesurée à 600 nm. L'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM final) et les bactéries sont cultivées durant 3 h à 37°C ou 15 h à 4°C, sous agitation. Après induction de l'expression des protéines, les cellules d'une culture de 100 mL induite ont été récupérées par centrifugation. Le culot a été ensuite incubé avec 1 mg/mL de lysozyme pendant 30 min à 4°C dans un tampon contenant 50 mM de NaH₂PO₄ et 300 mM de NaCl à pH 7,4. Les cellules sont

ensuite cassées par ultrasonication à l'aide d'un sonicateur (cycle 0,5, amplitude 70% pour 3 fois 3 min), et la fraction soluble a été récupérée par centrifugation à $10\,000 \times g$ pour 20 min.

L'expression et la pureté des protéines sont analysées par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Un aliquot de chaque culture, équivalent à 100 μL d'une DO de 1, est centrifugé à $2000 \times g$ et les cellules sédimentées sont analysées par SDS-PAGE. Les culots sont resuspendus dans 15 μL de tampon de Laemmli contenant 40 mM de Tris/HCl (pH 6,8), 2% de SDS, 20% de glycérol, 1,7% de β -mercaptoéthanol et 0,002% de bleu de bromophénol puis les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE.

5. Modélisation moléculaire et analyse de la structure de la PCrL

La modélisation moléculaire de la PCrL a été réalisée avec le logiciel Alphafold, ce logiciel construit un modèle homologue en plusieurs étapes successives. Il identifie les protéines homologues avec une structure 3D connue en utilisant le logiciel d'alignement Psi-Blast. Il propose à l'utilisateur tous les modèles possibles à travers une interface qui classe les structures trouvées par degré d'homologie décroissant en donnant les scores pour le choix de la meilleure cible. Il réalise l'alignement entre la séquence proposée et celle de la structure 3D choisie. Il extrait les contraintes géométriques (angles diédraux et distances) pour les atomes correspondants entre la séquence modèle et la séquence cible. Il construit un modèle 3D de la protéine en utilisant une approche géométrique. Finalement il envoie les résultats à l'utilisateur. On peut obtenir plusieurs modèles avec une échelle de contraintes. Générer plusieurs structures permet d'avoir une estimation de la précision des modèles obtenus, et ceci en particulier au niveau des boucles et des insertions-délétions.

6. Caractérisation biochimique de la PCrL

Les tests enzymatiques ont été effectués en utilisant la technique pH-STAT. La PCrL a été injectée dans le récipient de réaction contenant le substrat TG émulsifié sous agitation vigoureuse.

6.1. Spécificité du substrat

La spécificité de substrat de la PCrL a été étudiée en utilisant des TG avec différentes longueurs de chaîne : TC2, TC4, TC6, TC8 et huile d'olive. Nous avons utilisé la Palatase® 20000L et la Lipolase®, qui sont deux lipases commercialisées pour la comparaison.

6.2.Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la PCrL

La température optimale d'activité de la PCrL et PCrL immobilisée a été déterminée à pH 9 et dans une plage de températures variant de 10 à 80°C en utilisant le TC8 comme substrat. Les activités relatives sont calculées (en%) par rapport à l'activité maximale obtenue (100%).

Les tests de stabilité thermique ont été effectués par incubation de la PCrL pendant 1 h à des températures allant de 20 à 80°C, et l'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée dans des conditions de test standard (pH 9 et 37°C).

6.3.Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL

Le pH optimal de la PCrL et PCrL immobilisée a été déterminé à un pH allant de 5 à 11 à 37°C en utilisant le TC8 comme substrat. La valeur maximale obtenue représente 100% d'activité. L'effet du pH sur la stabilité de la PCrL a été déterminé en incubant l'enzyme à différentes valeurs de pH, allant de 5 à 11, pendant 1 h à 4°C en utilisant différents tampons à 50 mM : citrate (pH 5-6), phosphate de potassium (pH 6-7), Tris-HCl (pH 7-9) et glycine-NaOH (pH 9-11). L'activité enzymatique résiduelle a été mesurée dans des conditions de test standard (pH 9 et 37°C).

6.4.Effet des sels biliaires sur la PCrL

Afin d'étudier l'effet des sels biliaires sur l'activité PCrL, l'activité enzymatique a été mesurée dans des conditions de dosage standard en présence de concentrations croissantes de NaTDC (de 0 à 10 mM) en présence de 2 mM de Ca^{2+} et en utilisant le TC8 comme substrat.

6.5.Étude de la dépendance aux ions Ca^{2+} de la PCrL

L'activité lipase est mesurée dans les conditions optimales (37°C, pH 9) en présence de concentrations croissantes en Ca^{2+} (de 0 à 10 mM) en utilisant le TC8 comme substrat. Un essai de l'activité lipase est effectué en absence de Ca^{2+} et en présence de 10 mM EDTA qui possède un fort pouvoir chélatant. Les activités obtenues sont exprimées en U/mg.

6.6.Effets de divers ions métalliques sur la stabilité de la PCrL

Ainsi les effets de divers ions métalliques sur la stabilité de la PCrL sont étudiés en incubant la lipase dans le tampon approprié en présence de l'un des ions métalliques avec (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+}) sous forme de sels à une concentration finale de 5 mM, pendant 1 h à 37°C. L'activité enzymatique est alors mesurée dans les conditions standards avec le TC8 comme substrat. Les activités résiduelles sont converties en (%) par rapport à l'activité lipase du contrôle (PCrL incubée dans les mêmes conditions sans ajout d'aucun ion métallique).

6.7. Effets des inhibiteurs, des agents réducteurs, des réactifs chélateurs sur l'activité PCrL

Les effets de l'Orlistat, du PMSF, du DFP, du chlorhydrate de benzamidine, du DTNB, du NEM, de l'iodoacétamide, du PAO, de l'EDTA, de l'EGTA, du β -ME et du DL-DTT, sur la stabilité de la PCrL ont tous été étudiés en pré-incubant la PCrL purifiée pendant 1 h à 37°C avec chaque réactif. L'Orlistat (53 μ M dilué dans du DMSO) a été injecté quelques minutes après l'ajout de la lipase et l'activité PCrL a ensuite été enregistrée en continu. Un contrôle contenant l'enzyme sans ajout de l'Orlistat est incubé sous les mêmes conditions. Les activités obtenues sont exprimées en Unité enzymatique par mg de protéines (U/mg) et sont converties en (%) par rapport à l'activité lipase du contrôle.

6.8. Performance enzymatique de la PCrL

6.8.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité de la PCrL

La stabilité aux solvants organiques de la PCrL par rapport aux deux lipases commercialisées la Palatase® 20000L et la Lipolase® a été étudiée en incubant la préparation enzymatique avec divers solvants organiques, ayant différents coefficients de partage ($\log P$), à 25% (v/v) pendant 24 h à 37°C avec une agitation constante de 200 tr/min (Salwoom *et al.*, 2019). $\log P$ est une mesure quantitative de la polarité du solvant qui peut être utile pour déterminer la stabilité des enzymes dans les solvants organiques (Laane *et al.*, 1987). Des aliquots ont été prélevés aux intervalles de temps requis pour tester l'activité restante. Le mélange réactionnel sans aucun additif a été pris comme témoin (100%). Les solvants organiques utilisés ont été classés selon leurs valeurs de $\log P$: *n*-hexadécane (8,8), *n*-décane (5,6), iso-octane (4,5), *n*-hexane (3,5), cyclohexane (3,3), toluène (2,5), chloroforme (1,97), *n*-hexanol (1,8), *n*-butanol (0,88), acétate d'éthyle (0,73), isopropanol (0,28), acétonitrile (-0,15), éthanol (-0,24), méthanol (-0,76), diméthylformamide (DMF, -1,03) et DMSO (-1,35). Enfin, les activités mesurées sont converties en (%) par rapport à l'activité lipase du contrôle (enzyme incubée dans les mêmes conditions sans ajout de solvants organiques).

6.8.2. Effet de certains additifs détergents sur la stabilité de la PCrL

La stabilité de la PCrL en présence de plusieurs additifs détergents disponibles au laboratoire et dans des détergents commerciaux connus a été déterminée après incubation de PCrL pendant 1 h à 37°C. Les additifs détergents utilisés dans ce travail étaient tels que décrits récemment (Mechri *et al.*, 2022) : zéolithe, STPP (*Sodium tripolyphosphate*), SDS, Na₂CMC, Na₂CO₃, Tween (20, 40, 60 et 80), Triton X100, TAED (Tétraacétyléthylènediamine), NaBO₃, H₂O₂, SAFOL 23^{E7},

Dehydol[®] LT 7, SURFAC[®] LM 30, NEODOL[®] 25-7, Galaxy (LAS, LES 70, 110 et CAPB Plus), TERGITOLTM NP-9, SURFACTANT, FINDET[®] AR/52, anti-mousse, formol, Tinopal[®] CBS-X, Sulfacid K, Marlipal[®] 31/90, EDTA, Parfums de classe I et II, Propylbétaine et NaOH 50%.

6.8.3. Compatibilité de la PCrL avec les lessives

Pour étudier la compatibilité de la PCrL avec certains détergents à lessive solides ou liquides disponibles dans le commerce, les effets de ces détergents sur la stabilité de la PCrL ont été évalués et comparés à ceux de la Palatase[®] 20000L et de la Lipolase[®]. Nous avons utilisé différentes marques de détergents : Ariel[®] (Procter et Gamble, Suisse), OMO[®] (Unilever), Pro-Clean, New Dex, Class, Nadhif, EcoVax, Maison Det, New Det, Dixan, Skip, Dipex, X-Clean, Fino. La compatibilité a été déterminée comme détaillé précédemment (Mechri *et al.*, 2022). En bref, chaque détergent à lessive commercial a été dissout dans de l'eau du robinet pour atteindre une concentration de 7 mg/mL et traité pendant 1 h à 65°C pour désactiver les lipases endogènes. La PCrL (500 U/mL) a été ajoutée par la suite et la solution est incubée sous agitation pendant 1 h à 37°C avec chaque détergent commercial. L'activité PCrL résiduelle a été mesurée dans des conditions de test standard. Enfin, les activités mesurées sont converties en (%) par rapport à l'activité lipase du contrôle (PCrL incubée dans les mêmes conditions sans ajout d'aucun détergent commercial).

6.8.4. Analyse des performances de lavage de la PCrL

Les performances de lavage de la PCrL en tant que bio-additif dans la formulation de détergents à lessive ont été évaluées sur des morceaux de tissu de coton blanc (6 × 6 cm) tachés de jaune d'œuf ou de sauce tomate. Chaque morceau de tissu taché est placé dans l'un des cinq flacons Erlenmeyer de 250 mL (A, B, C, D et E), contenant un volume de 100 mL de :

- (A) Eau du robinet (contrôle négatif).
- (B) Eau du robinet + 7 mg/mL du détergent Ariel[®].
- (C) Eau du robinet + 7 mg/mL du détergent Ariel[®].+ 500 U de la Palatase[®] 20000 L
- (D) Eau du robinet + 7 mg/mL du détergent Ariel[®].+ 500 U de la Lipolase[®]
- (E) Eau du robinet + 7 mg/mL du détergent Ariel[®] + 500 U de la PCrL.

Les enzymes potentielles endogènes dans le détergent Ariel sont inactivées par la chaleur. Les cinq flacons sont ensuite incubés à 37°C, sous une agitation de 200 tr/min pendant 30 min. Après lavage, les morceaux de tissu sont retirés, rincés à l'eau distillée, séchés et soumis à une observation visuelle pour examiner les effets des lipases sur l'élimination des taches de jaune d'œuf ou de sauce tomate (Akmoussi-Toumi *et al.*, 2018).

L'huile d'olive a été extraite avec de l'éther de pétrole pendant 6 h à l'aide d'un extracteur Soxhlet après l'évaporation complète de l'éther de pétrole de l'extrait. Le pourcentage d'huile d'olive éliminée a été calculé à l'aide de l'équation suivante (Saraswat *et al.*, 2017):

$$\text{Élimination d'huile d'olive}(\%) = \frac{(\text{masse de l'huile d'olive totale avant lavage (mg)} - \text{masse de l'huile d'olive totale après lavage (mg)})}{\text{masse de l'huile d'olive totale après lavage (mg)}} \times 100$$

6.9. Immobilisation

6.9.1. Protocole d'immobilisation par adsorption

La lipase pure a été immobilisée par adsorption sur le CaCO₃ et Celite 545 selon le protocole décrit par Ben Bacha *et al.*, (2022). Tout d'abord, un volume de 1 mL d'enzyme pure (5000 U/mg mesurées dans les conditions optimales en utilisant la TC8) est mis en contact avec 1 g de CaCO₃ ou Celite 545, sous agitation à 4°C. Le temps d'incubation a été optimisé en réalisant quatre essais d'immobilisation, chacun incubé pendant une durée déterminée (30 min, 1 h, 2 h ou 3 h). Ensuite, le mélange est filtré sur papier Wattman et lavé deux fois avec 10 mL d'acétone à froid (-20°C). Enfin, l'enzyme immobilisée est séchée dans un dessiccateur sous vide à température ambiante pendant 6 h et stockée à 4°C jusqu'à utilisation. Le rendement de l'activité lipase immobilisée (Ri) a été défini comme le rapport de l'activité (exprimée en unité totale, UT) adsorbée récupérée à la fin de la période d'immobilisation divisée par l'activité lipase soluble totale initialement ajoutée à 1 g de support :

$$Ri = \frac{L'activité lipase de l'enzyme immobilisée en (UT)}{L'activité lipase de la solution enzymatique initiale en (UT)} \times 100$$

6.9.2. Protocole d'immobilisation par encapsulation et adsorption-encapsulation

L'immobilisation de la PCrL a été effectuée moyennant deux méthodes (encapsulation et adsorption-encapsulation). Nous avons procédé dans ce travail soit à l'utilisation de sodium alginate seul, comme support organique ou à l'utilisation de sodium alginate combiné à d'autres supports soit inorganiques (zéolite) (dans ce cas on parle du support hybride) soit organiques et naturels (chitosane).

Préparation du mélange enzyme-support : L'alginate de sodium a été dissout dans l'eau dé-ionisée chaude stérilise sur un filtre de 0,45 µm. Le mélange obtenu est placé pendant 1 h à 4°C pour refroidissement et dégazage. La PCrL purifiée (300 µL, à 0,11 mg/mL) est ajoutée à 700 µL du tampon approprié (Tris-HCl 0,3 mM (pH 9) contenant 150 mM de NaCl et 2 mM de CaCl₂). Par la suite, l'alginate sodium (3 mL à 2%, *m/v*) est ajouté à la solution enzymatique. Si on va

utiliser le sodium alginate combiné à un autre support, 300 µL d'enzyme purifiée sont incubés avec 700 µL du l'un des supports (kaolin (1%), zéolite (1,2%) et chitosane (0,8%)), pendant 2 h à 4°C et ajoutés par la suite à la solution d'alginate de sodium (3 mL). Dans les deux cas, les mélanges obtenus sont homogénéisés pendant 1 h à froid sous agitation douce.

Préparation des billes

Après homogénéisation, la préparation des billes se fait manuellement à l'aide d'une seringue de 10 mL. Elle consiste à pomper le mélange (enzyme-support) goutte à goutte dans une solution de CaCl₂ 200 mM. Les billes sont immédiatement gélifiées par la réticulation entre les ions Ca²⁺ et l'alginate de sodium. Les billes obtenues sont rincées 3 fois à l'eau déminéralisée puis laissées sur un papier Wattman et exposées à l'air libre pour sécher. Après séchage et pesée, les billes sont placées dans un tampon approprié et stockées à 4°C pour un usage ultérieur.

Calcul des rendements

a) Détermination de l'activité retenue dans les billes

L'activité enzymatique retenue dans les billes (RA ou *Recovery activity*) définit le pourcentage de l'activité de l'enzyme immobilisée par rapport à l'activité enzymatique initiale. Ce rendement est déterminé selon l'équation suivante :

$$RA (\%) = \frac{I}{(A - B)} \times 100$$

A: Charge enzymatique initiale (U/mL dans 1 g de bille)

B: PCrL non liée (U/mL dans 1 g de bille)

I: PCrL liée (U/mL dans 1 g de bille)

b) Détermination du rendement d'immobilisation

Le rendement de l'immobilisation ou l'efficacité d'immobilisation, IY désigne l'activité de l'enzyme récupérée dans les billes après immobilisation.

$$IY (\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: Charge enzymatique initiale (U/mL dans 1g de bille)

B: PCrL non liée (U/mL dans 1 g de bille)

6.10.Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption de la lumière par la plupart des molécules dans la région de l'IR du spectre électromagnétique et en convertissant cette absorption en vibration moléculaire, cette absorption du rayonnement IR par le matériau de l'échantillon est mesurée en fonction de la longueur d'onde (sous la forme de nombres d'onde, typiquement de 4000 à 600 cm⁻¹). La spectroscopie IR à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR) fournit des informations chimiques sur l'échantillon. L'avantage du

FTIR en mode ATR est la possibilité de mesurer des échantillons opaques qui absorberaient fortement ou présenteraient d'autres problèmes en mode transmission ou réflectance.

La FTIR-ATR a été utilisée pour déterminer et analyser la composition chimique de la PCrL soluble et immobilisée. L'expérience a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco 4700-ATR dans le domaine spectral compris entre 4000 et 500 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} . Cette technique a permis de collecter simultanément des données spectrales suite à l'immobilisation de la PCrL en comparant le profil de l'enzyme libre par rapport à celle sous forme immobilisée différents supports.

6.11. Diffraction des rayons X

La technique de diffraction des rayons X (DRX) a été utilisée pour l'identification de phase des deux formes (encapsulation et adsorption-encapsulation) PCrL. L'expérience a été menée à l'aide d'un XRD-6000 (SHIMADZU, Kyoto, Japon) dans la plage de 2θ , un angle de 10° - 65° en utilisant le rayonnement $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$) et une vitesse de balayage de $4^\circ/\text{s}$. En utilisant la formule de Scherrer, la taille des cristallites du plan a été évaluée comme suit :

$$D = K \lambda / \beta \cos \theta$$

où, D signifie la taille des cristallites (nm); K est la constante de Scherrer ($K = 0,89$) ; β est la hauteur à mi-largeur du pic de diffraction ; et θ est l'angle de diffraction des indices de Miller associés (hkl).

6.12. Microscopie électronique à balayage

La microstructure des billes préparées de l'enzyme (PCrL) immobilisée a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) à l'aide d'un appareil JEOL-JSM7001F. La distance de travail a été atteinte à 6 mm (la distance entre l'échantillon et l'objectif) et le filament MEB a été exécuté à des courants variables, suivant une tension de 5 kV lors de l'utilisation de divers grossissements. La composition élémentaire a été déterminée par spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X.

6.13. Paramètres thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PCrL

L'énergie de désactivation (E_d) est dérivée du diagramme d'Arrhenius en traçant $\ln(k_d)$ par rapport à temps de demi-vie ($t_{1/2}$) en degrés Kelvin. $\ln(k_d) = f(1/T)$. Les paramètres de désactivation de PCrL libre et immobilisée [constante de désactivation (k_d), temps de demi-vie ($t_{1/2}$), l'énergie d'activation impliquée dans la dénaturation thermique (E_d) et le temps de réduction

décimale (D)] ont été calculés à partir des données de stabilité thermique (Gomes *et al.*, 2020; Mechri *et al.*, 2022). D a été défini comme le temps nécessaire pour une réduction de 90% de l'activité ou 1-log10 d'activité initiale de la lipase PCrL à une température donnée. La dénaturation enzymatique thermodynamique a été déterminée par réarrangement de l'équation du taux absolu d'Eyring dérivée de la théorie de l'état de transition, comme suit :

$$k_d = \frac{(k_b \times T)}{h} \times e^{\frac{-\Delta H_d}{R \times T}} \times e^{\frac{\Delta S_d}{R}}$$

où k_b correspond à la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K), T est équivalent à la température absolue en Kelvin (K), h est la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ Js), R est la constante universelle des gaz parfaits ($8,314$ J/K/mol), ΔH_d est l'enthalpie de dénaturation et ΔS_d l'entropie de dénaturation. Pour les calculs de l' ΔH_d , de l' ΔS_d et de l'énergie libre de Gibbs de dénaturation (ΔG_d) du système de réaction enzymatique, les équations suivantes ont été utilisées :

$$\begin{aligned}\Delta H_d &= E_a - RT \\ \Delta G_d &= \frac{-RT \ln(k_d \times h)}{k_b \times T} \\ \Delta S_d &= \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T}\end{aligned}$$

7. Étude de l'activité antimicrobienne des LAB envers des micro-organismes cibles

7.1. Préparation de surnageants acellulaires de souches LAB

Le surnageant acellulaire (CFS) des souches LAB a été préparé à partir de leur culture obtenue après 48 h d'incubation à 37°C en bouillon MRS. Après une centrifugation des cultures, $4000 \times g$ pendant 10 min à 4°C, le CFS a été ajusté à un pH 7 avec une solution de NaOH (4M) pour obtenir un surnageant neutralisé (NCFS). Le CFS et le NCFS obtenus ont été stérilisés par filtration à l'aide d'un filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne) et stockés à 4°C pour des futures utilisations.

7.2. Effet de la catalase et de la protéinase-K sur l'activité antimicrobienne des souches LAB

Le NCFS des souches LAB a été traité avec de la catalase et de la protéinase-K. La catalase (4000 U/mg, Sigma-Aldrich) a été stérilisée par un filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne), puis ajoutée au NCFS à une concentration finale de 1 mg/mL, puis incubée pendant 2 h à 37°C, pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène. Afin de vérifier la nature protéique des molécules bioactives du SCF, le NCFS a été traité avec la protéinase-K P-5056 (Sigma-Aldrich), diluée dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) à une concentration finale de 2,5 µg/mL. Le NCFS traité à la protéinase-K a été stérilisé par un filtre de 0,2 µm, puis incubé pendant 2 h à 37°C. La protéinase-K a été inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 min.

7.3. Activité antimicrobienne des souches LAB en utilisant la méthode de superposition

L'activité antimicrobienne des souches LAB (*Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) a été déterminée par la méthode de superposition d'agar d'Aween et al. (2012). En bref, des cultures d'une nuit de souches LAB ont été inoculées sur des boîtes de gélose MRS, puis incubées à 37°C pendant 48 h. Par la suite, les boîtes ont été recouvertes de 15 mL de gélose MH (gélose à 0,75%) ou de 15 mL de gélose YEG (gélose à 0,75%), préalablement inoculées avec 10⁶ UFC/mL de *L. innocua* et *E. coli* ou *R. glutinis*, respectivement. Après incubation à 37°C pour les bactéries et 25°C pour *R. glutinis* pendant 24 h, la zone d'inhibition (ZI) a été mesurée (mm). Tous les tests ont été réalisés en triple exemplaire.

7.3.1. Activité antimicrobienne des souches LAB en utilisant la méthode de diffusion en puits

L'activité antimicrobienne des surnageants et des protéines précipitées des souches LAB contre les agents pathogènes a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en puits de Barefoot and Klaenhammer (1983). Les cibles (*L. innocua*, *E. coli* et *R. glutinis*) ont étéensemencées avec une concentration de 10⁶ UFC/mL sur gélose MH pour les bactéries et gélose YEG pour la levure. Les puits réalisés sur le milieu ont été chargés avec 65 µL de surnageants (CFS, NCFS, NCFS traité à la catalase ou NCFS traité à la protéinase K) et les protéines précipitées des souches LAB. La nisine (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) et le cycloheximide (0,01 mg/mL) ont été utilisés comme témoins positifs pour *L. innocua* et *R. glutinis*, respectivement, dans le cas du test de précipitation de protéines. Ensuite, les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries, et à 25°C pendant 24 h pour *R. glutinis*. Les ZI des cibles obtenues autour des puits ont été mesurées (mm). Tous les tests ont été réalisés en triple exemplaire.

7.3.2. Concentration minimale inhibitrice de CFS concentré de souches LAB

La concentration minimale inhibitrice (MIC) de CFS concentré 10 fois (10xCFS), a été déterminée dans un bouillon MH. Le CFS obtenu, à partir d'une culture des LAB de 48 heures d'incubation à 37°C après une centrifugation à 4000 × g pendant 10 min à 4°C et concentré 10 fois à 30°C en utilisant un concentrateur SpeedVac (Eppendorf™ Concentrator Plus, avec pompe à vide à membrane). Les concentrations du 10xCFS obtenu (2, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 8 et 10% (v/v)), par dilution dans de l'eau distillée, ont été stérilisées sur filtre 0,2 µm et ajoutées au bouillon MH (2 mL), puis inoculé avec une concentration de 10⁶ UFC/mL de la cible (*L. innocua*, *E. coli* ou *R. glutinis*). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 48 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour *R. glutinis*, et la plus faible concentration de 10xCFS ne montrant aucune croissance

microbienne visible de la cible a été enregistrée comme valeur MIC. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

7.3.3. Etude quantitatif de l'activité antimicrobienne des souches LAB

L'étude quantitatif de l'activité antimicrobienne de *Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42, et *Lb. plantarum* S62 a été réalisée en microplaque 96 puits, selon la méthode de Barman *et al.*, (2018). En bref, chaque puits a été chargé avec 175 μ L de bouillon MH et 5 μ L de culture d'une nuit (10^6 UFC/mL) de la cible (*L. innocua*, *E. coli* ou *R. glutinis*). Les cultures ont été incubées à 37°C pour les bactéries et 25°C pour *R. glutinis*. Après 7 h d'incubation, un volume de 20 μ L de valeur CMI (4,5%, v/v) de chaque type de surnageant de *Lb. plantarum* S62 (10×CFS, 10×NCFS) et un précipité de protéines ont été ajoutés aseptiquement à la culture, et la gentamicine (0,1 mg/mL) et le cycloheximide (0,01 mg/mL) ont été utilisés comme témoins positifs contre les bactéries et la levure, respectivement. Au cours de l'incubation, la croissance des souches cibles a été déterminée en mesurant sa DO à 600 nm, après 3 h d'ajout de l'agent antimicrobien, à l'aide d'un lecteur de microplaques (Thermo Multiskan EX Microplate Photometer) contrôlé par un ordinateur à l'aide de l'Ascent Logiciel. Le contrôle négatif contenait la culture de cibles sans ajout d'antimicrobien. La réduction de la croissance de la biomasse des souches cibles a été calculée par la différence entre les valeurs de DO₆₀₀ obtenues, après 10 h de culture, en l'absence (témoin négatif) et en présence de surnageant LAB.

7.4. Analyse SDS-PAGE de peptides antimicrobiens obtenus des souches de LAB

Le CFS (50 mL) de chaque souche LAB, obtenu par centrifugation à $4000 \times g$ pendant 10 min à 4°C de souches LAB cultivées en bouillon MRS à 37°C pendant 48 h, a été additionné de sulfate d'ammonium à 80% de saturation sous agitation et maintenu pendant une nuit à 4°C pour précipiter les protéines. Le précipité a été recueilli par centrifugation ($9400 \times g$ pendant 20 min à 4°C) et dissous dans 5 mL de solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,4). Le précipité de protéines obtenu a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%), comme précédemment (section 2.3.2).

7.5. Application des souches LAB antimicrobiennes dans la conservation des aliments

7.5.1. Bioconservation du lait

Le 10×CFS de *Lb. plantarum* S62 a été testé pour son effet bioconservateur contre les agents pathogènes (*L. innocua* et *E. coli*) du lait de vache UHT, acheté sur le marché local (Oujda, Maroc). par la méthode de Bajpai *et al.*, (2016). En bref, 8,9 mL de lait ont été inoculés avec 10^6 UFC/mL de souches cibles (*L. innocua* ou *E. coli*) puis 1 mL de valeur MIC (0,45% pour *L. innocua* et de

0,5% pour *E. coli*) de 10×CFS de *Lb. plantarum* S62 a été ajouté dans le lait et un test sans 10×CFS a également été utilisé comme témoin. Au cours de l'incubation, à 37°C pendant 48 h, la concentration cellulaire des souches cibles a été déterminée par la méthode des unités formant colonies (UFC/mL). Tous les tests ont été réalisés en triple exemplaire.

7.5.2. Bioconservation de la feuille de Pastilla

L'effet bioconservateur de *Lb. plantarum* S62, contre *R. glutinis*, a été évalué sur des feuilles de Pastilla, achetées sur le marché local (Oujda, Maroc). Pour cela, des morceaux de feuille de Pastilla (5 cm de diamètre) ont été découpés aseptiquement et introduits dans des boîtes de Petri stériles, puis stérilisés par lumière UV pendant 30 min dans une enceinte de sécurité microbiologique (PSM-II). Après stérilisation, 0,5 mL de CFS, 10×CFS, NCFS ou 10×NCFS ont été pulvérisés sur chaque échantillon de feuille de Pastilla. Des échantillons de feuilles de pastilla additionnés de 0,5 mL de cycloheximide (0,01%, *m/v*) ou d'eau distillée (0,5 mL) ont été utilisés comme témoins. Par la suite, les échantillons de feuilles de Pastilla ont été inoculés au centre avec 10⁶ UFC/mL de *R. glutinis*, puis incubés à 25°C pendant 72 h, et le diamètre de la zone de croissance de *R. glutinis* sur la feuille de Pastilla a été mesuré (mm). Tous les dosages ont été réalisés en triple exemplaires.

Résultats et discussion

Chapitre I : Isolement, criblage et identification de souches microbiennes à partir des coproduits oléicoles surproductrices de TG lipases d'intérêt industriel et biotechnologique

1. Introduction

Les coproduits oléicoles contiennent des microorganismes peuvent être utilisés dans plusieurs applications, grâce à leurs propriétés biotechnologiques telles que leur capacité à produire des enzymes (Nimkande and Bafana, 2022). Certains auteurs ont décrit la biodiversité microbienne des écosystèmes oléiques et ont examiné ses activités enzymatiques à des fins industriels (Misbah *et al.*, 2019). Dans ce sens, le défi consiste, actuellement, à découvrir des enzymes qui répondent convenablement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industrielle moderne à savoir des lipases robustes, résistantes et actives. Les enzymes sont des catalyseurs naturels, de plus en plus nécessaires dans divers domaines industriels et bioprocédés (Salgado *et al.*, 2022). L'optimisation de production des biocatalyseurs est généralement faite par la méthodologie de plan d'expérience. Ce sont des plans d'organisation des essais expérimentaux dans le but de connaître le comportement du résultat (réponse) à partir de la variation des facteurs choisis.

Dans ce chapitre, nous avons sélectionné des isolats lipolytiques intéressants et nous avons essayé par la méthodologie de plan d'expérience de les optimiser. La production des lipases par les souches lipolytiques est influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et l'aération et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture (Aachapa *et al.*, 2021). En fait, un milieu de culture doit contenir une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux nécessaires pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme (Ku *et al.*, 2009). Il doit également contenir des substances inductrices de la production d'enzymes et des facteurs de croissance, susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés.

2. Analyse microbiologique et criblage des microorganismes producteurs des lipases (test qualitatif)

Les analyses microbiologiques des coproduits oléicoles ont porté sur le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), des levures et des moisissures, et des *Bacillus*. Les résultats concernant le dénombrement des colonies montrant l'activité lipolytique ou non apparues sur les géloses LB, PDA, MRS et MH après ensemencement et incubation, sont présentés sur le tableau 11. Il est à noter que les échantillons de margines (M_1 , M_2 , M_3 et M_4) contiennent plus de microorganismes producteurs de l'activité lipolytique (9×10^5 , 14×10^5 , 9×10^5 et 16×10^5 UFC/mL, respectivement), ils sont suivis des saumures (S_{B1} , S_{24} , S_{07} et S_{01}) avec une charge microbienne de microorganismes producteurs de l'activité lipolytique respectivement (6×10^5 , 7×10^5 , 0 et 5×10^5 UFC/mL). Les grignons (G_1 et G_2) contiennent une charge microbienne de 4×10^5 et 5×10^5 UFC/mL,

respectivement. La différence entre la charge microbienne des 3 biotopes, sur les quatre milieux gélosés, est statistiquement significative ($P < 0,0001$).

Tableau 11 : Charge microbienne de la FMAT, levure et moisissures et de *Bacillus* obtenue dans les dix échantillons testés.

		FMAT (UFC/g)/(UFC/mL)		<i>Bacillus</i> (UFC/g)/(UFC/mL)		Levures et moisissures (UFC/g)/(UFC/mL)	
		Nombre Total	Nombre montrant l'activité lipolytique	Nombre Total	Nombre montrant l'activité lipolytique	Nombre Total	Nombre montrant l'activité lipolytique
Échantillons	M ₁	1,57 10 ⁶	2 10 ⁵	2 10 ⁶	2 10 ⁵	0,9 10 ⁷	5 10 ⁵
	M ₂	2,4 10 ⁶	3 10 ⁵	1,5 10 ⁶	2 10 ⁵	1,75 10 ⁷	9 10 ⁵
	M ₃	1,25 10 ⁶	2 10 ⁵	1,1 10 ⁶	3 10 ⁵	0,85 10 ⁷	4 10 ⁵
	M ₄	2,7 10 ⁶	4 10 ⁵	1,9 10 ⁶	3 10 ⁵	1,25 10 ⁷	9 10 ⁵
	S _{B1}	1,68 10 ⁶	-	1,6 10 ⁶	2 10 ⁵	1,3 10 ⁶	4 10 ⁵
	S ₂₄	2,28 10 ⁷	-	0,6 10 ⁶	3 10 ⁵	0,64 10 ⁶	4 10 ⁵
	S ₀₇	1,55 10 ⁶	-	0,6 10 ⁶	-	0,64 10 ⁶	-
	S ₀₁	2,5 10 ⁶	-	1,2 10 ⁶	2 10 ⁵	1,6 10 ⁶	2 10 ⁵
	G ₁	4,5 10 ⁶	-	1,5 10 ⁶	3 10 ⁵	0,78 10 ⁶	1 10 ⁵
	G ₂	3,6 10 ⁶	-	1,2 10 ⁶	4 10 ⁵	0,87 10 ⁶	1 10 ⁵

FMAT: Flore mésophile aérobie totale

Les échantillons de margines sont nommés (M₁, M₂, M₃ et M₄) ; Les échantillons de saumures sont nommés (S_{B1}, S₂₄, S₀₇, S₀₁) ; Les échantillons de grignons sont nommés (G₁, G₂).

A partir des 10 échantillons prélevés, nous avons purifié un total de 88 isolats qui ont montré une activité lipolytique après exposition des boîtes de Petri (milieu de révélation) à la lumière UV, Parmi eux, 48 isolats proviennent de margines (54.6%), 30 isolats sont issus de grignons (34,1%) et 10 isolats dérivent des saumures d'olives (11.4%) (Figure 19).

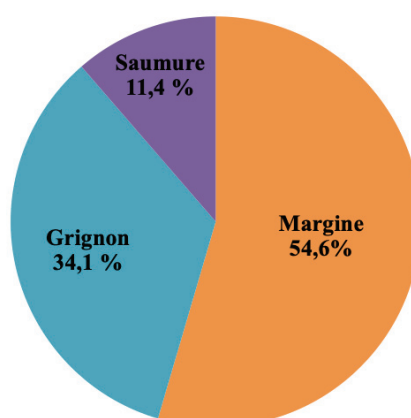


Figure 19 : Répartition des microorganismes producteurs de lipase selon leur biotope d'origine.

Les 88 isolats ont montré une activité lipolytique, et ont des aspects macroscopiques différents. Les huit isolats qui ont montré des halos fluorescents les plus intenses autour de leurs colonies, ont été sélectionnés pour la suite du travail.

Ces 8 isolats sélectionnés ont montré des halos fluorescents les plus intenses sur le milieu gélosé à base de l’huile d’olive et de la rhodamine-B (Figure 20). Parmi eux, 3 isolats proviennent de margines (P22, P74 et G40) et 3 sont isolés à partir de grignons (B37, B38 et B53) et 2 isolats proviennent de saumures (G58 et G110).

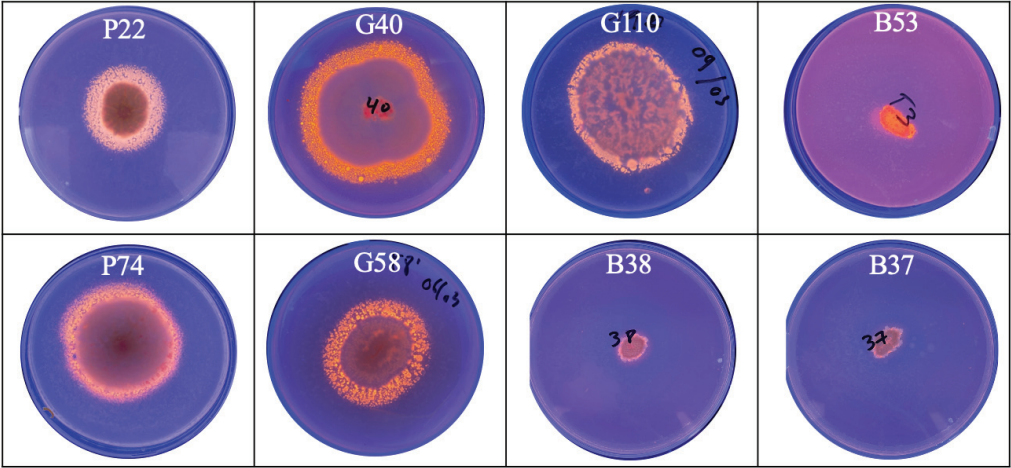


Figure 20 : Halos fluorescents des huit isolats, producteurs de lipase, sur gélose à base de la rhodamine-B et d’huile d’olive.

Ces isolats ont fait l’objet d’une identification phénotypiques basée sur des études macroscopiques et microscopiques, les résultats montrent qu’il s’agit de deux *Penicillium* sp. (P22 et P74), de trois *Geotrichum* sp. (G40, G58 et G110), deux *Bacillus* sp. (B36 et B37) et d’un *Staphylococcus* sp. (B53) (Figure 21).

	Champignons		Bactéries	
	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
Étude macroscopique				
Étude microscopique				

Figure 21 : Observations macroscopique et microscopique (×40 pour les champignons et ×100 pour les bactéries) de chaque genre des isolats isolés.

Les 8 isolats sélectionnés sont mis en culture liquide dans le milieu (M.LIPASE) à 37°C pour les bactéries et 25°C pour les champignons sous agitation à 120 rpm, puis l'activité enzymatique est mesurée toutes les 12 h.

D'autres auteurs (Mouncif et al., 1993) ont déjà isolé des microorganismes lipolytiques à partir de coproduits oléicoles marocains. De même, Ertuğrul *et al.*, (2007) ont isolé 13 bactéries lipolytiques à partir de margines (Turquie). De plus, Salgado *et al.*, (2020) ont isolé la levure productrice de lipase *Magnusiomyces capitatus* à partir de margines (Portugal). Baffi *et al.*, (2012) ont également isolé 19 champignons producteurs de lipase à partir de grignons et de fruits d'olives (Espagne), appartenant principalement aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Aspergillus*. Misbah *et al.*, (2019) ont isolés 22 isolats (12 sont des levures, 8 sont des bactéries et 2 sont des moisissures) à partir de coproduits oléicoles (margine, grignons et eau de lavage), les isolats ont montré des halos fluorescents autour de leurs colonies. En fait, les coproduits oléicoles vu leur composition riche en lipides, constituent un environnement favorable pour les microorganismes lipolytiques.

3. Suivi de la production d'activité lipasique par les souches sélectionnées

La cinétique de production d'activité lipase des 8 isolats sélectionnés est présentée sur la figure 22. Les résultats montrent que les 8 isolats sont capables de produire une activité lipase sur le milieu de culture liquide utilisé, les niveaux de production de l'activité lipase vont de 1,5 à 60 U/mL, en utilisant le TC8 comme substrat à l'aide de la technique pH-STAT dans des conditions d'essai standard. Le taux le plus élevé est obtenu par les isolats du genre *Penicillium* sp. P22 et P74 (60 et 55 U/mL, respectivement) après 6 jours de culture (Figure 22A), suivis des isolats du genre *Geotrichum* sp (G110, G58 et G40) ont montré une activité lipasique maximale après 7 jours de culture de 7, 5,5 et 3,2 U/mL, respectivement (Figure 22B). L'isolat du genre de *Staphylococcus* sp. (B53) a montré une activité lipase de 2,5 U/mL après 3 jours de culture, enfin les isolats du genre *Bacillus* sp. (B37 et B38) ont montré l'activité lipasique la plus faible de 2 et 1,5 U/mL, respectivement après 3 jours de culture (Figure 22B).

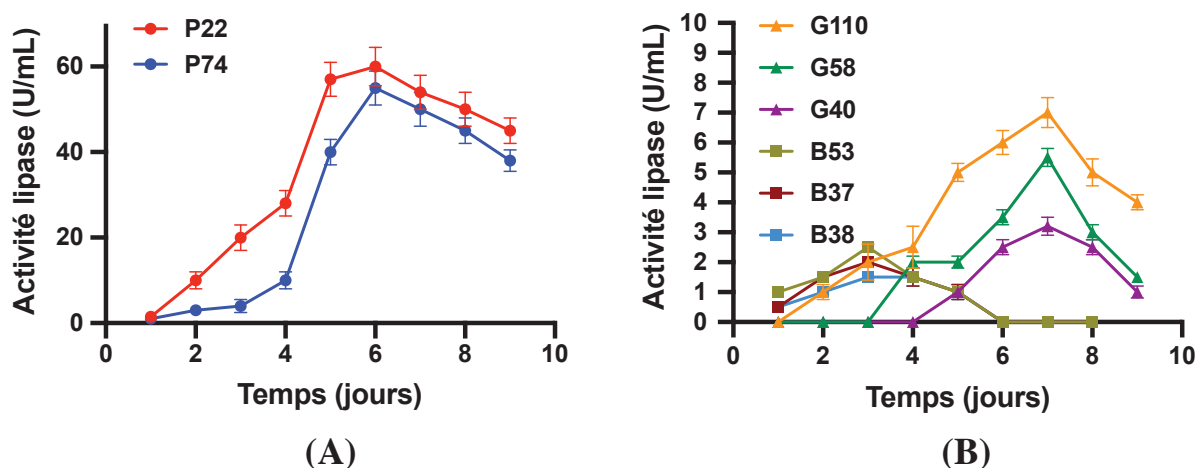


Figure 22 : Cinétique de production de la lipase par les isolats sélectionnés. (A) Isolats du genre *Penicillium* sp. P22 et P74. (B) Isolats du genre *Geotrichum* sp (G110, G58 et G40), *Staphylococcus* sp. et *Bacillus* sp.

Parmi les isolats de *Penicillium* qui ont montré l'activité lipase la plus élevée, la souche P22 a été choisie pour une étude biochimique et moléculaire plus approfondie. *Penicillium* sp P22 a fait l'objet d'un suivi de cinétique de croissance et de production de lipase (Figure 23). Les résultats montrent que l'isolat P22 est capable de se développer sur le milieu de culture liquide utilisé. En effet, le taux le plus élevé est obtenue par l'isolat P22 est de 60 U/mL après 6 jours de culture (correspond à 5,6 g/L du poids sec de la biomasse). Les profils cinétiques montrent également que la production de lipase augmente avec l'augmentation de la croissance cellulaire, atteignant son maximum au début de la phase stationnaire et commençant à diminuer par la suite (Figure 23).

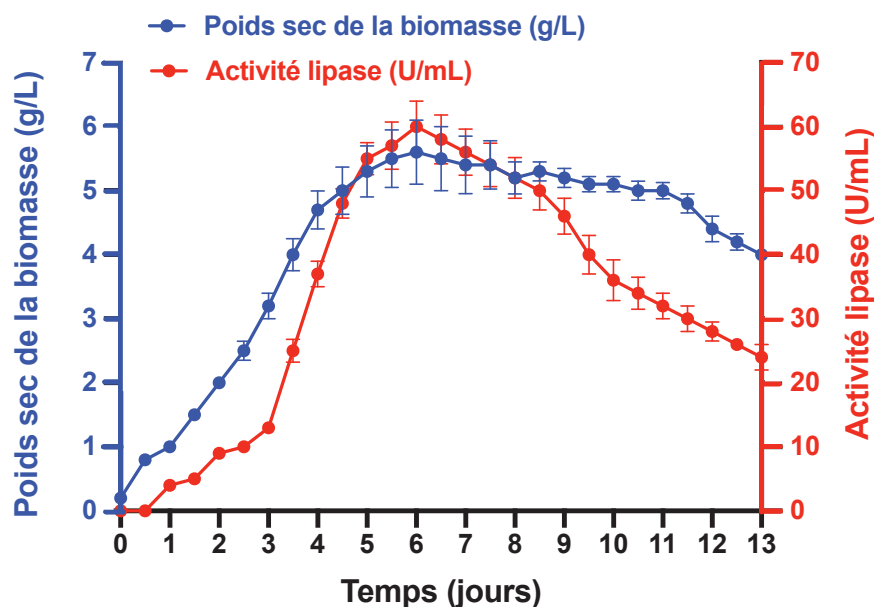


Figure 23 : Cinétique de croissance cellulaire et de production de lipase de l'isolat P22, après culture en milieu liquide (M.lipase). La culture a été réalisée dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL, comme décrit à la section Matériel & Méthodes (section 1.3). L'activité lipase a été mesurée en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point de données (écart-type moyen) est le résultat d'expériences en triplicats.

Les résultats trouvés montrent d'une part, que le taux de production d'enzymes diffère d'une souche à l'autre et selon la période d'incubation. D'autre part, la production de la lipase par la souche P22 dépend de sa croissance cellulaire dans le milieu. En effet, Turati *et al.*, 2022 ont montré que la production de lipase à partir de *Penicillium* sp. section *Gracilentia* CBMAI 1583 augmente rapidement pendant la phase logarithmique de la courbe de croissance et atteint le maximum (0,8 U/mL) après 3 jours d'incubation avec une biomasse correspondante de 2 g/L ; après 3 jours d'incubation l'activité lipase diminue progressivement. En revanche, une période d'incubation de 3 jours a été suffisante pour que *Penicillium citrinum* PKB20 produise l'activité lipase maximale (8 U/mL), après 3 jours d'incubation l'activité enzymatique diminue graduellement (Bardhan *et al.*, 2019). Par ailleurs, la souche d'*Aspergillus terreus* a montré la production maximale de lipase extracellulaire (12 U/mL) après 6 jours de culture, ce qui correspond au début de la phase stationnaire (2 g/L). Après cette période, l'activité lipase commence à diminuer (Mahmoud *et al.*, 2015).

Les profils cinétiques obtenus dans cette étude peuvent varier si la composition du milieu et les conditions de culture varient. En fait, divers facteurs influencent la production d'enzymes et la croissance microbienne, notamment les sources de carbone et d'azote, le pH initial du milieu, la température d'incubation, la taille de l'inoculum, l'agitation, les ions métalliques et les inducteurs (Abbas *et al.*, 2017; Misbah *et al.*, 2019).

4. Identification moléculaire et construction de l'arbre phylogénétique de la souche P22

L'identification de la souche P22 isolée était fondée sur des méthodes morphologiques et moléculaires. L'observation morphologique de l'isolat P22 montre qu'il s'agit d'un champignon filamenteux, caractérisé par des hyphes septiques, des conidiophores et des structures conidiennes présentant des vésicules et des stérigmates. Ces caractéristiques sont semblables à celles des espèces de *Penicillium* sp. Afin d'obtenir plus de détails pour l'identification de l'isolat P22, une approche moléculaire a été adoptée. Un séquençage de 3 gènes (*ITS*, *benA* et *CaM*) (les séquences des 3 gènes sont indiquées dans l'Annexe 1) a été réalisé. Les résultats de BLAST ont montré qu'il s'agissait de *Penicillium crustosum* (identité de séquence à 99%) avec l'alignement le plus proche indiquant une connexion possible avec *Penicillium* section *Fasciculata*. Pour confirmer son placement phylogénétique dans *Penicillium*, les séquences combinées (*ITS*, *benA*, et *CaM*) ont été alignées avec celles des souches types appartenant à la section *Fasciculata* et aux sections étroitement liées *Penicillium*, *Ramosa*, et *Brevicompacta*. Dans l'arbre phylogénétique qui en résulte (Figure 26), l'isolat non identifié P22 est placé dans un clade monophylétique composé exclusivement de souches de *Fasciculata* de section et soutenu par 71% des échantillons bootstrap.

Par conséquent, l'isolat P22 est classé en grappes de *Penicillium* section *Fasciculata* avec la souche *Penicillium crustosum* CBS 115503NT et la souche *Penicillium solitum* CBS 424.89NT (appuyé par 92% des échantillons bootstrap). Les analyses de séquence de la région *ITS1-5.8S-ITS2* (879 bp), ainsi que des gènes *benA* (480 bp) et *CaM* (329 bp), indiquent la présence de trois gènes isogènes (ON854673, ON854674 et ON854675, respectivement). L'isolat appartenant à l'espèce *crustosum* du genre *Penicillium* section *Fasciculata* est nommé *Penicillium crustosum* souche P22.

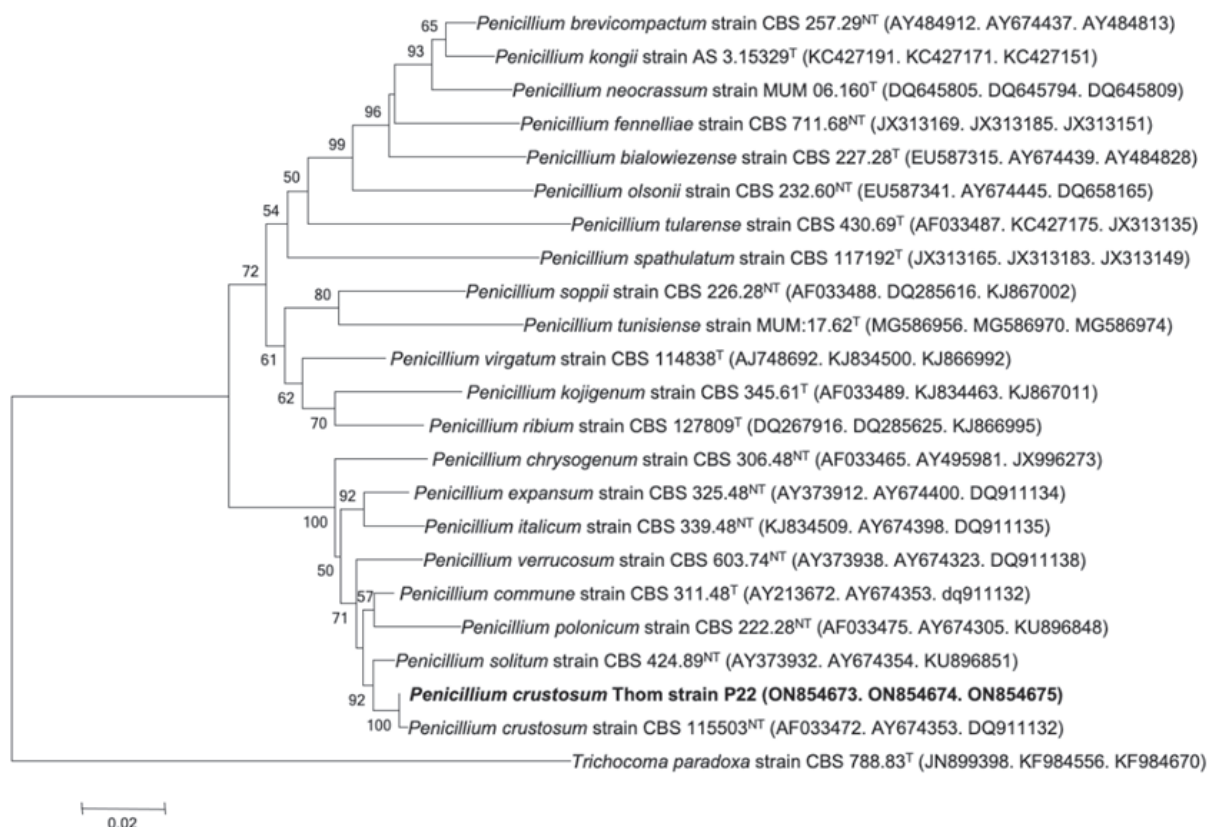


Figure 24 : Arbre phylogénétique basé sur une phylogénie combinée pour les séquences de gènes *ITS1-5.8S-ITS2*, *benA* et *CaM* montrant la position de la souche *Penicillium crustosum* Thom P22 dans la grappe qui comprend les espèces *Penicillium*. Les séquences de la souche *Trichocoma paradoxa* CBS 788.83 (GenBank accession no. : JN899398) ont été choisies comme hors groupe. Barre, 0,02 substitutions par position de nucléotide. Les nombres aux noeuds (> 50%) indiquent le support des branches internes dans l'arbre obtenu par l'analyse bootstrap (pourcentages de 100 bootstraps). Les numéros d'accèsion GeneBank sont présentés entre parenthèses. T, souche ex-type; HT, souche holotype; NT, souche néotype.

La culture du champignon *Actinomyces* de l'isolat P22 a été déposée dans les Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes (CCMM) conformément aux Règles du Code Bactériologique (révision 1990) telles que révisées par l'ICSP lors des sessions plénières à Sydney et à Paris, au « Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) », Rabat (Maroc), et au Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (WFDI), Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW), Uppsala, Utrecht (Pays-Bas) sous les authentiques numéros de

culture : CCMM M185 et CBS : 21.150/Det, respectivement. Les séquences nucléotidiques des gènes ARNr 5.8S, *benA* et *CaM* rapportées dans cette étude ont été soumises dans les bases de données GenBank/ENA/DDBJ sous les numéros d'accès ON854673, ON854674 et ON854675.

L'observation morphologique de la souche P22, ainsi que l'approche moléculaire, ont indiqué qu'il s'agissait de *Penicillium crustosum*. L'*ITS* est le code barre d'ADN recommandé pour les champignons (Visagie *et al.*, 2014); cependant, ce marqueur n'est pas suffisamment variable pour distinguer toutes les espèces étroitement apparentées de *Penicillium* (Seifert *et al.*, 2007; Ouhibi *et al.*, 2018). Pour cette raison, la β -tubuline est un meilleur marqueur discriminant qui permet d'identifier *Penicillium* au niveau de l'espèce (Visagie *et al.*, 2014; Ouhibi *et al.*, 2018). L'analyse de Bootstrap a révélé que les valeurs de nœud variaient de 50 à 99% dans tous les groupes, démontrant leur robustesse, comme indiqué ailleurs (Houbraken *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2014; Rong *et al.*, 2015).

5. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre, montrent la richesse microbienne des coproduits oléicoles collectés à partir de l'unité de trituration d'olives et conserverie d'olives de tables. Une communauté microbienne hétérogène de 88 isolats a pu être identifiée comme composée principalement de 48 isolats provenant de margines (54.6%), 30 isolats sont issus du grignon (34,1%) et 10 isolats dérivent des saumures d'olives (11.4%).

De plus, parmi les 8 isolats montrant les halos les plus intenses sélectionnés, un isolat est identifié comme *Penicillium crustosum* Thom P22 montrant la production de lipase la plus élevée en milieu liquide (60 U/mL). La caractérisation biochimique de la lipase produite par cette souche sera étudiée dans le chapitre suivant, afin de prédire ses performances dans diverses applications biotechnologiques, notamment la détergence et la synthèse organique.

***Chapitre II : Purification, caractérisation biochimique et
immobilisation de la lipase de *Penicillium crustosum*
Thom P22 : Évaluation des performances en tant que
bioadditifs dans les formulations des détergents et
biocatalyseurs en synthèse organique***

1. Introduction

Des protéines purifiées sont nécessaires pour de nombreuses études fondamentales, notamment les études structurales et les dosages biochimiques *in vitro*. Les protéines peuvent être obtenues à partir de tissus ou, plus souvent, par leur surexpression dans un organisme modèle, comme des bactéries, des champignons ou des cellules de mammifères en culture. La purification des protéines consiste à isoler des protéines, sur la base de différences dans leurs propriétés physiques. L'objectif d'un système de purification des protéines est de conserver autant de protéines fonctionnelles que possible avec le moins de contaminants possible. Le système de purification des protéines doit être optimisé pour achever ce processus en un minimum d'étapes.

Les lipases sont l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles. Elles représentent environ 30% du marché total des enzymes. La recherche de lipases utiles avec une activité et une spécificité distincte reste un défi permanent pour diverses applications industrielles telles que la détergence et l'agro-alimentaire (Bharathi and Rajalakshmi, 2019). L'utilisation d'enzymes dans les formulations de détergents est désormais courante dans les pays développés, avec plus de la moitié des détergents disponibles contenant des enzymes (Hasan *et al.*, 2010).

Les lipases microbiennes sont dotées de propriétés biochimiques et fonctionnelles intéressantes, leur conférant la capacité de catalyser des réactions d'hydrolyse et de synthèse dans divers domaines industriels (Melani *et al.*, 2020). L'estérification est l'une des réactions de synthèse qui peuvent être catalysées par les lipases microbiennes. Cependant, les lipases présentent quelques inconvénients, tels que leur coût élevé et leur dénaturation dans les systèmes réactionnels, ce qui conduit à des taux de conversion plus faibles. Pour pallier ces problèmes et rendre les lipases plus stables et efficaces à l'échelle industrielle, l'immobilisation est un moyen efficace pour rendre l'enzyme plus robuste, stable et réutilisable pour des cycles successifs (Coelho and Orlandelli, 2021; Enespa *et al.*, 2022).

Dans ce contexte la lipase de *Penicillium crustosum* Thom P22 est d'abord purifiée, en utilisant une succession de méthodes chromatographiques, puis appliquée comme bioadditif dans la formulation de détergents, ainsi immobilisée par l'encapsulation, l'encapsulation-adsorption et l'adsorption. Finalement, l'enzyme immobilisée est caractérisée et testée pour sa capacité à catalyser une réaction d'estérification.

2. Purification de la lipase de *Penicillium crustosum* Thom souche P22

2.1. Purification à homogénéité de la PCrL

La PCrL a été purifiée à homogénéité à partir du surnageant de culture comme décrit dans section Matériel et Méthodes (§ 2). Après une précipitation au sulfate d'ammonium (70%), la purification a été effectuée en une étape chromatographique à l'aide de la colonne HiTrap Q-Sepharose FF en appliquant un gradient linéaire de NaCl de 0 à 200 mM dans le tampon. Le profil d'élution a montré un seul pic majeur d'activité de la PCrL à environ 50 mM de NaCl (Figure 25A). Les résultats de la procédure de purification sont résumés dans le tableau 12. La pureté enzymatique a été estimée à 62,5 fois supérieure à celle de l'extrait brut avec un rendement global d'environ 34%. À partir de 160 mL de milieu de culture de 6 jours, environ 0,26 mg de PCrL pure a été obtenu avec une activité spécifique de 10 000 U/mg, en utilisant le TC8 comme substrat. Cette activité spécifique est supérieure à celle trouvée chez la souche *Penicillium notatum* qui est de 5344 U/mg (Rehman *et al.*, 2017) et à celle trouvée pour la lipase de la souche *Penicillium* sp. DS-39 qui est de 308 U/mg (Dheeman *et al.*, 2011). Le rendement de la procédure de purification PCrL en deux étapes seulement s'est avéré relativement élevé par rapport à celui obtenu dans les études précédentes (Ruiz *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2014), qui impliquait de multiples étapes de purification de lipase d'autres espèces de *Penicillium*.

Tableau 12 : Etapes de purification de la PCrL.

Étapes de purification ^a	Activité totale (U)	protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	7680 ± 21	48,0 ± 1	160 ± 2,5	1	100
Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ (70%)	3900 ± 10	15,3 ± 0,5	254 ± 4,0	1,6	51
Colonne HiTrap Q-Sepharose FF	2600 ± 6	0,2 ± 0	10000 ± 5	62,5	34

^a Les expériences ont été réalisées, à partir de 160 mL de milieu de culture de 6 jours, avec 3 mesures indépendantes.

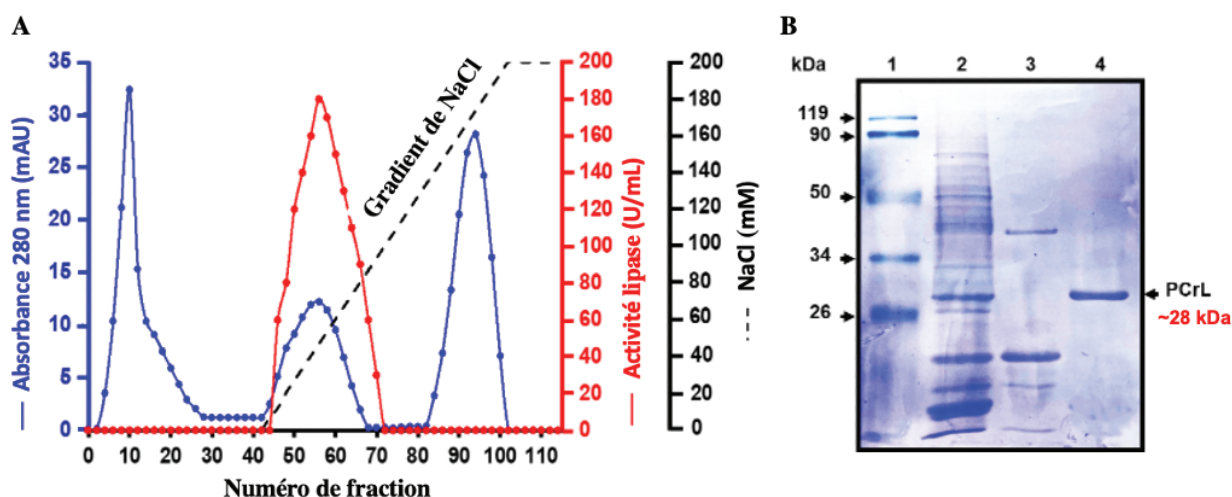


Figure 25 : Purification de la PCrL. (A) Chromatogramme de purification de la PCrL sur la colonne HiTrap MC Q-Sepharose FF. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient de NaCl linéaire de 0 à 200 mM NaCl dans le tampon A. L'activité de la PCrL a été mesurée, comme décrit à la section Matériel et Méthodes (§ 2), en utilisant le TC8 comme substrat. (B) Analyse par SDS-PAGE (12% acrylamide) des protéines éluées. Piste 1, marqueur de masse moléculaire; Piste 2, fraction protéique après précipitation au sulfate d'ammonium (70%); Piste 3, fraction protéique non retenue sur la colonne; Piste 4, fractions actives regroupées éluées de la colonne Q-Sepharose FF de HiTrap.

2.1. Estimation du degré de purté de PCrL par SDS-PAGE

Pour analyser l'homogénéité et la masse moléculaire de la PCrL purifiée, une analyse par SDS-PAGE a été réalisée. La PCrL purifiée, dépourvue de tout contaminant détectable, migre sous forme d'une seule bande protéique à une position correspondant à une masse moléculaire de 28 kDa, telle qu'évaluée par SDS-PAGE (Figure 25B, piste 4).

Les résultats de l'analyse par SDS-PAGE suggèrent fortement que la PCrL est une protéine monomérique comparable à celles rapportées précédemment pour d'autres lipases de souches de *Penicillium*. La masse moléculaire de la PCrL (28 kDa) est similaire à celle des souches *Penicillium abeanum* et *Penicillium expansum* PED-03 (Sugihara *et al.*, 1996; Lianghua *et al.*, 2007). La plupart des lipases connues du genre *Penicillium* ont une masse moléculaire comprise entre 25 et 46 kDa (Stöcklein *et al.*, 1993; Chahinian *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2017).

2.2. Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale

Le séquençage des acides aminés du côté NH₂-terminal de la PCrL a permis l'identification de 20 résidus (Tableau 13). Cette séquence NH₂-terminale présentait un haut degré d'homologie (70 à 90%) avec les lipases du même genre précédemment caractérisées (Tableau 13).

Tableau 13 : Alignement de la séquence d'acides aminés terminaux NH₂ de la PCrL avec celle d'autres lipases de *Penicillium* sp.

Origine	Séquence NH ₂ -terminale	Identité (%)
Souche de <i>Penicillium crustosum</i> P22 (cette étude)	ATADAAAF ^a LDLHMAAKLSSA ^a	-
Souche de <i>Penicillium cyclopium</i> PG37 (AF274320)	ATADAAAF ^a PD ^a LHRAAKLSSA	90
Souche de <i>Penicillium camemberti</i> FM013 (CRL22273)	ATAATAAF ^a PD ^a LHRAAKLSSA	80
Souche de <i>Penicillium solitum</i> IBT 29525 (XP_040813639)	ATAATAAF ^a PD ^a LNXAAKLSSA	75
Souche de <i>Penicillium expansum</i> DSM 1994 (AAB27002)	AVAASAAAF ^a PD ^a LXRAAKLSSA	70

^a Les séquences d'acides aminés pour la comparaison ont été obtenues en utilisant les bases de données BLASTP (NCBI, NIH, USA). X : acide aminé quelconque. Les résidus non identiques à la PCrL sont ombrés. Le numéro d'entrée GenBank est entre parenthèses.

3. Caractérisation biochimique de la PCrL

3.1. Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la PCrL

L'activité catalytique de la lipase a été évaluée entre 20 et 50°C (Figure 26A). La PCrL a montré une activité maximale à 37°C. Au-delà de 37°C, l'activité enzymatique diminue progressivement montrant 60, 50 et 25% de son activité maximale à 40, 45 et 50°C, respectivement (Figure 26A). La PCrL est complètement inactivée à 60°C (Figure 26A). Après 1 h d'incubation de la PCrL à différentes températures, l'enzyme s'est avérée stable entre 20 et 37°C, mais la stabilité thermique de l'enzyme a diminué à 40°C, conservant environ 60% de son activité (Figure 26B). La température optimale trouvée pour la PCrL (37°C) concorde avec les résultats obtenus pour les lipases d'autres espèces de *Penicillium*, comme la lipase de la souche *Penicillium crustosum* 74 F (Rigo *et al.*, 2012) et d'autres lipases du genre *Penicillium*, pour lesquels les activités les plus élevées se situaient entre 25 et 45°C (Lima *et al.*, 2004). Par exemple, une température de 40°C pour l'activité maximale a été rapportée pour la lipase de *Penicillium cyclopium*. Dans la littérature, la température optimale est généralement située entre 25 et 60°C pour la plupart des lipases obtenues de l'espèce *Penicillium* (Li and Zong, 2010), à l'exception de la lipase extrêmement thermophile produite par *Penicillium* sp. section *Gracilenta* CBMAI 1583., qui a une activité maximale à une température de 70°C (Turati *et al.*, 2019).

Les résultats de l'effet de la température sur la stabilité de la PCrL sont semblables à ceux rapportés pour la lipase de *Penicillium cyclopium* PG37, qui est stable entre 20 et 35°C (Tan *et al.*, 2014). Des résultats de stabilité thermique ont été rapportés pour la lipase de *Penicillium expansum* (Stöcklein *et al.*, 1993) et *Penicillium aurantiogriseum* (Paluzar *et al.*, 2021), qui présentaient une

sensibilité à la température relativement élevée et étaient instables lorsqu'elles étaient incubées pendant 1 h à des températures supérieures à 30 et 40°C, respectivement.

3.2.Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL

La PCrL purifiée s'est révélée très active entre pH 8 et pH 10 avec un pH optimal à 9 et peut donc être considéré comme une enzyme alcaline (Figure 26B). De plus, l'activité observée entre pH 6 et pH 8 représente environ 60 à 80% de celle observée au pH optimal (figure 26B).

La stabilité du pH de la PCrL a été évaluée par préincubation de l'enzyme à des pH de 5 à 11 pendant 1 h, à 37°C. Comme le montre la figure 26B, la PCrL a montré une stabilité exceptionnelle à des valeurs de pH de 6 à 10, alors qu'elle pouvait même conserver environ 70% d'activité résiduelle à pH 5 et pH 11. Il a été rapporté que les lipases produites par le genre *Penicillium* avaient une activité optimale à des valeurs de pH neutres ou basiques (allant de 7 à 9) (Krieger *et al.*, 1999; Paluzar *et al.*, 2021). Un pH optimal d'activité de 9 a été aussi rapporté pour les lipases de la souche *Penicillium crustosum* 74 F (Rigo *et al.*, 2012) et de *Penicillium notatum* (Rehman *et al.*, 2017). Les résultats de la stabilité élevée de la PCrL à des pH variant de 6 à 10 étaient semblables à ceux rapportés pour la lipase de la souche de *Penicillium crustosum* 74 F, avec une stabilité entre pH 4 et 10 (Rigo *et al.*, 2012). L'activité élevée et la stabilité à pH alcalin (voir la Figure 26B) font de la PCrL un biocatalyseur approprié pour une application dans l'industrie des détergents. De telles enzymes qui sont actives et stables à un pH de 8 à 10 ont été incorporées dans des détergents à lessive et à lave-vaisselle (Niyonzima and More, 2015).

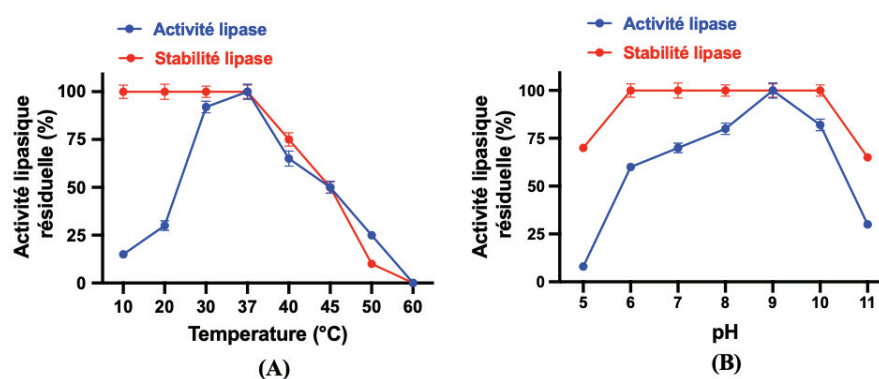


Figure 26 : Effets de la température et du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL purifiée. (A) Le profil de température (courbe bleue) a été déterminé en mesurant l'activité enzymatique à différentes températures et à pH 9. L'activité de l'enzyme à 37°C a été prise comme 100%. La stabilité de la PCrL à différentes températures (courbe rouge) a été déterminée par incubation de l'enzyme à différentes températures pendant 1 h à 37°C. L'activité enzymatique résiduelle a été mesurée à 37°C et pH 9 en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes. (B) Le profil de pH (courbe bleue) a été déterminé dans différents tampons en variant les valeurs de pH de 5 à 11. L'activité maximale obtenue à pH 9 a été considérée comme 100%. La stabilité au pH (courbe rouge) de la PCrL a été déterminée en incubant l'enzyme à différentes valeurs de pH, allant de 5 à 11, pendant 1 h à 4°C et l'activité résiduelle a été mesurée à pH de 9 et 37°C en utilisant le TC8 comme substrat. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes.

3.3.Effet des inhibiteurs, des ions métalliques et des sels biliaires sur l'activité de la PCrL

Pour vérifier si la PCrL est une lipase à sérine, nous avons testé l'effet de l'Orlistat[®], un composé dérivé par hydrogénation de la lipstatine produite par *Streptomyces toxytricini*, sur son activité. L'Orlistat[®] est un puissant inhibiteur connu des lipases digestives qui se lie de manière covalente à la sérine du site actif (Tiss et al., 2004). L'effet de l'Orlistat[®] sur l'activité de la PCrL est évaluée pendant la lipolyse après 2 min environ en injectant du DMSO seul (Figure 27, courbe bleue) ou de l'Orlistat (53 μ M, concentration finale, figure 27, courbe rouge). Comme le montre la figure 27, la PCrL a été complètement inhibée par l'Orlistat, suggérant la formation d'un complexe covalent entre le cycle β -lactone de l'Orlistat et l'hydroxyle du résidu séryl catalytique de la PCrL, comme cela a été démontré pour d'autres lipases digestives (Tiss et al., 2004). De plus, le PMSF (5 mM) et le DFP (2 mM), autres réactifs interagissant avec le résidu séryl, inhibent complètement l'activité de la PCrL (Tableau 14). Ces résultats fournissent une preuve supplémentaire que l'activité de la PCrL est associée à la triade catalytique Ser-His-Asp/Glu au site actif de l'enzyme.

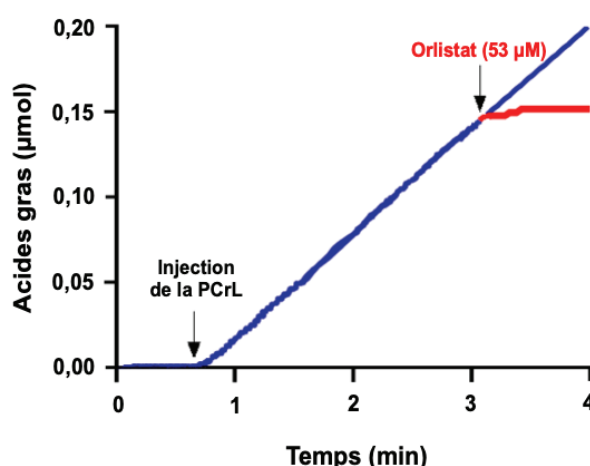


Figure 27 : Effet de l'orlistat sur l'activité PCrL. Après l'injection de la PCrL, le DMSO (ligne bleue) ou Orlistat dans le DMSO (concentration finale de 53 μ M, ligne rouge) a été injecté dans le milieu réactionnel pendant la lipolyse 3 min après le début de la réaction. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes.

En outre, il a été démontré que l'activité de la PCrL n'était pas significativement affectée par le traitement avec des réactifs à thiol (DTNB, NEM, iodoacétamide et PAO) (Tableau 14), suggérant que les résidus cystéyls au niveau ou à proximité de son site actif n'étaient pas essentiels pour la fonction de la PCrL. De plus, l'activité de la PCrL a été légèrement inhibée par des réactifs chélatants, comme l'EDTA et l'EGTA (Tableau 14), ce qui semble confirmer que les cofacteurs métalliques ne sont peut-être pas essentiels à l'activité. La stabilité relative de la PCrL en présence d'agents chélateurs est un avantage considérable pour l'utilisation de cette enzyme comme additif dans les détergents. En effet, les détergents commerciaux contiennent de grandes quantités

d'agents chélateurs, qui agissent comme adoucissants et aident également à éliminer les taches (Haddar et al., 2009).

Un effet marginal sur l'activité de la PCrL a été détecté avec des agents réducteurs, tels que β -ME ou DL-DTT, ce qui laisse penser que les liaisons disulfures ne sont pas cruciales pour préserver la conformation active de la PCrL. L'effet de certains ions divalents sur l'activité de la PCrL a également été testé. Les ions métalliques pourraient jouer un rôle importants dans le maintien de la structure 3D et de la fonction des enzymes en se liant à des sites spécifiques. Une augmentation de l'activité de la PCrL a été observée après incubation avec le Ca^{2+} ou le Mn^{2+} (147 ou 146%, respectivement), par rapport au témoin (Tableau 14). Aucun effet significatif sur l'activité de la PCrL n'a été observé avec le Ba^{2+} et le Mg^{2+} . Cependant, Fe^{2+} et Co^{2+} ont diminué l'activité de la PCrL de plus de 30% et de 60%, respectivement (Tableau 14). De plus, les ions métaux lourds Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} ont inhibé l'activité enzymatique de 77, 84 et 91%, respectivement (Tableau 14).

En ce qui concerne l'effet du Ca^{2+} , la figure 28A montre que le Ca^{2+} ne semblait pas nécessaire pour l'activité de la PCrL, qui pouvait être détectée (8700 U/mg) même en l'absence de Ca^{2+} et en présence d'EDTA (10 mM) comme chélateur. L'activité spécifique de la PCrL a atteint son maximum (10 000 U/mg) à 2 mM de CaCl_2 et sans chélateurs, suggérant que la PCrL est partiellement dépendante des ions calcium. L'activité de la PCrL augmentée avec Ca^{2+} et Mn^{2+} a été rapportée pour d'autres lipases de *Penicillium* (Bancerz et al., 2005; Dheeman et al., 2011). Dans ce groupe d'enzymes, les ions jouent souvent un rôle structural plus que catalytique. Il a été suggéré que les ions métalliques induisent un changement conformationnel, favorisant ainsi une plus grande stabilité et, par conséquent, une plus grande activité (Rahman et al., 2005). L'inhibition de l'activité de la PCrL par Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} et Ni^{2+} a été rapportée pour d'autres lipases de *Penicillium* (Dheeman et al., 2011; Chinaglia et al., 2014; Pranav et al., 2019). L'activité de la PCrL a été complètement inhibée par Hg^{2+} et Cd^{2+} , comme déjà rapporté pour la lipase d'*Haloferax mediterranei* (Akmoussi-Toumi et al., 2018).

L'inhibition de nombreuses lipases par les ions métalliques a le plus souvent été attribuée à la réaction des ions métalliques avec les groupes thiols des résidus cystéyls près du site actif de l'enzyme (Gurkok and Ozdal, 2021). En effet, diverses données cristallographiques de lipases microbiennes montrent un site de liaison Ca^{2+} conservé proche des résidus du site catalytique, qui jouerait un rôle dans la stabilisation de la structure globale de la protéine et contribuerait au positionnement correct des résidus du site catalytique (Invernizzi et al., 2009).

Afin de vérifier si la PCrL purifiée est capable d'hydrolyser les TG en présence d'agents tensioactifs, tels que les sels biliaries, le taux d'hydrolyse de TC8 a été mesuré en présence de concentrations croissantes de NaTDC. Comme le montre la figure 28B, la PCrL atteint son activité spécifique maximale (10 000 U/mg) en l'absence de détergent et cette activité persiste jusqu'à 1 mM de NaTDC. Toutefois, au-delà de 1 mM de NaTDC, l'activité de l'enzyme diminue rapidement pour se stabiliser à 20% d'activité résiduelle des concentrations de NaTDC supérieures ou égales à 3 mM (Figure 28B). Les résultats de l'effet du NaTDC sur la capacité de la PCrL à hydrolyser les TG sont similaires à ceux obtenus avec la Lipolase®; il semble que la PCrL soit résistante à la dénaturation interfaciale, puisque son activité sur TC8 ne nécessite aucun détergent. Il a été montré que la Lipolase® était capable de se lier aux émulsions de TC8 en l'absence de sels biliaries, mais qu'elle est fortement désorbée de l'interface en présence de 4 mM de NaTDC (Aloulou et al., 2007). L'inhibition exercée sur la PCrL par le NaTDC à des concentrations supérieures à 3 mM peut être due au fait que le NaTDC, à sa concentration micellaire critique, empêche la liaison de l'enzyme à l'interface lipide-substrat.

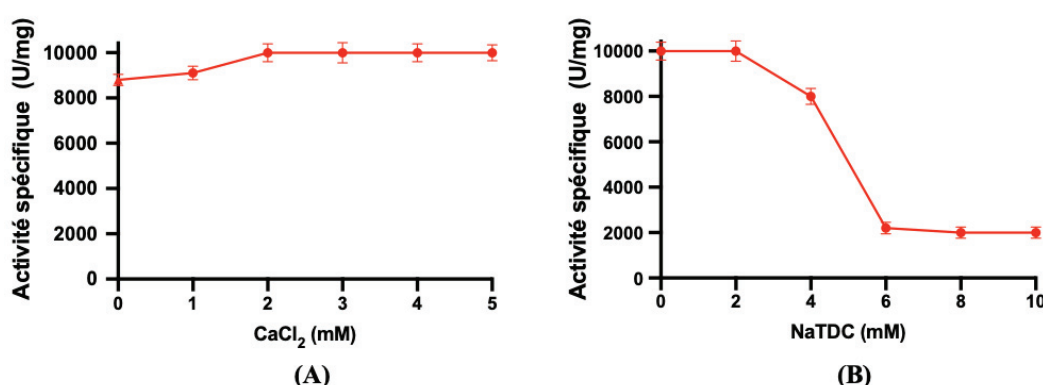


Figure 28 : Influence des ions calcium et du NaTDC sur l'activité de la PCrL. (A) Effet de la concentration de Ca²⁺ sur l'activité de la PCrL. L'activité enzymatique a été mesurée à des concentrations croissantes de Ca²⁺ en utilisant le TC8 comme substrat, à 37°C et à pH 9. Le triangle indique l'activité lipase mesurée en l'absence de Ca²⁺ et en présence d'EDTA (10 mM). (B) Effet de concentration croissante de NaTDC sur l'activité de la PCrL en présence de 2 mM de Ca²⁺ en utilisant le TC8 comme substrat, à 37°C et à pH 9.

Tableau 14 : Effets de divers inhibiteurs, réactifs chimiques et ions métalliques sur la PCrL. L'activité enzymatique a été mesurée après la pré-incubation de l'enzyme avec chaque inhibiteur ou agent réducteur, ou chaque ion métallique, pendant 1 h à 37°C. L'activité lipase mesurée en l'absence de tout inhibiteur ou agent réducteur a été prise comme témoin (100%). L'enzyme non traitée et dialysée a été considérée comme étant à 100% pour la mesure de l'activité en présence des ions métalliques. L'activité résiduelle a été mesurée à 37°C et pH 9.

Inhibiteurs/ réactifs chimiques / ions métalliques ^a	Concentration ^a	Activité résiduelle (%) ^b
Aucun	—	100 ^b ± 3
PMSF	5 mM	0
DFP	2 mM	0
Benzamidine	2 mM	110 ^b ± 3
DTNB	10 mM	73 ^{bc} ± 2
NEM	2 mM	95 ^b ± 2
Iodoacétamide	5 mM	106 ^b ± 3
PAO	10 mM	94 ^b ± 2
β-ME	10 mM	96 ^b ± 2
DL-DTT	10 mM	98 ^b ± 2
EDTA	10 mM	92 ^b ± 2
EGTA	1 mM	96 ^b ± 2
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2 mM	147 ^a ± 4
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	2 mM	146 ^a ± 4
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	2 mM	92 ^b ± 2
Fe ²⁺ (FeSO ₄)	2 mM	70 ^{bc} ± 2
Co ²⁺ (CoCl ₂)	2 mM	41 ^{cd} ± 1
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	2 mM	96 ^b ± 2
Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	2 mM	9 ^d ± 0
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	2 mM	23 ^d ± 1
Ni ²⁺ (NiCl ₂)	2 mM	16 ^d ± 0
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	2 mM	0
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	2 mM	0

^{a-d} Les moyennes dans la même colonne de chaque paramètre avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$).

Incubation avec l'enzyme purifiée à 37°C pendant 1 h. Les valeurs représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes, et ± SE sont indiqués.

3.4. Spécificité du substrat

La spécificité du substrat de la PCrL a été déterminée à l'aide de TG de différentes longueurs de chaîne acyle et comparée à celle de la Palatase[®] 20000 L et de la Lipolase[®] (Figure 29). La PCrL était capable d'hydrolyser les TG avec des chaînes acyles de 2 à 18 carbones de long, avec une activité maximale (10 000 U/mg) pour le TC8 suivi du TC6 (environ 80% de l'activité maximale) puis du TC4 (environ 30% de l'activité maximale) (Figure 29). Par contre, la PCrL a montré une très faible activité envers les TG avec des acides gras à chaîne courte (TC2, environ 25% de l'activité maximale). Il est à noter que l'activité sur l'huile d'olive est à environ 70 à 80% de l'activité maximale (Figure 29). À titre de, la Palatase[®] 20000 L et la Lipolase[®] ont présenté presque le même profil de spécificité de substrat que la PCrL dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 29). La PCrL hydrolyse préférentiellement les esters d'acides gras à chaîne moyenne, comme indiqué pour la plupart des lipases de *Penicillium*, comme celles de *Penicillium camembertii* Thom PG-3 (Tan *et al.*, 2004), *Penicillium aurantiogriseum* (Griebeler *et al.*, 2011), *Penicillium cyclopium* (Chahinian *et al.*, 2000) et *Penicillium simplicissimum* (Gutarra *et al.*, 2009).

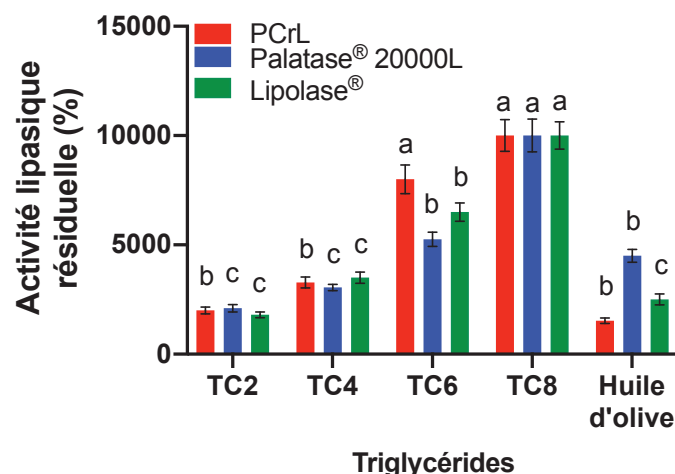


Figure 29 : Spécificité du substrat de la PCrL. L'activité des lipases a été mesurée en utilisant des émulsions de TC2, TC4, TC6, TC8 ou huile d'olive comme substrat, comme décrit dans la section matériel et méthodes (§ 1.3.1.). ^{a-c}, les moyennes avec des lettres minuscules différentes pour chaque substrat diffèrent significativement ($p < 0,05$).

Pour étudier la régiosélectivité de la PCrL pour les positions *sn*-1 ou *sn*-3 du substrat TG, le taux d'hydrolyse du *sn*-EOO ou *sn*-OOE a été déterminé (Figure 30). Une augmentation de l'absorbance à 272 nm a été observée après l'injection de la PCrL. Cette augmentation était due à la libération de l'acide α -éléostéarique qui passe de l'état adsorbé à son état soluble complexé à la β -CD suite à l'action de la PCrL sur *sn*-EOO (Figure 30A, courbe bleue) ou *sn*-OOE (Figure 30A, courbe rouge). Il convient de noter que la pente mesurée avec *sn*-EOO était plus élevée que celle mesurée avec *sn*-OOE, indiquant une régiosélectivité élevée de la PCrL pour la position *sn*-1 du substrat TG. Les activités spécifiques ont été calculées comme étant de 74 ± 2 et $45 \pm 1,5$ U/mg en utilisant respectivement *sn*-EOO et *sn*-OOE.

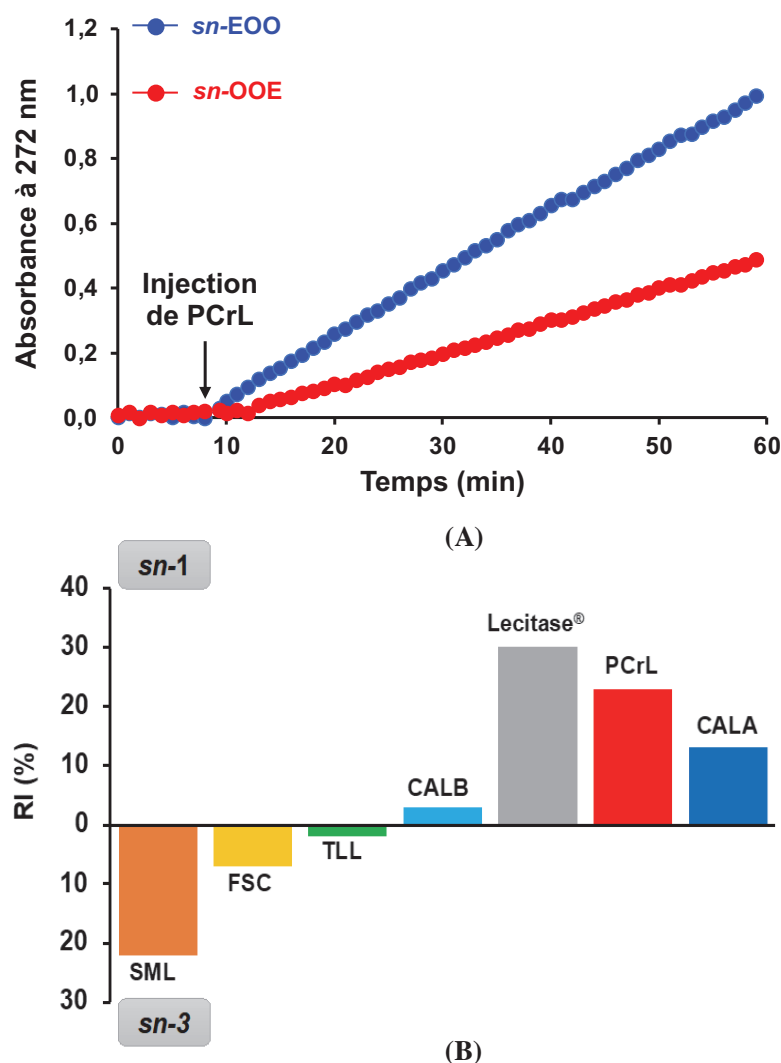


Figure 30 : Régiosélectivité de PCrL envers les TG synthétiques. (A) Cinétique de l'hydrolyse *sn*-EOO ou *sn*-OOE par la PCrL. La variation d'absorbance à 272 nm a été enregistrée pendant 10 min pour obtenir la ligne de base, puis pendant 50 min après l'injection de PCrL (0,65 µg par puits). Les enregistrements cinétiques montrés ici sont typiques de ceux obtenus dans trois expériences indépendantes. (B) RI% de PCrL en utilisant *sn*-EOO ou *sn*-OOE par rapport à ceux de SML, FSC, TLL, Lecitase, CALA et CALB rapportés dans nos études précédentes (El Alaoui *et al.*, 2017; Eddehech *et al.*, 2021).

Pour évaluer quantitativement la régiosélectivité de la PCrL envers un substrat TG donné, l'indice de régiosélectivité (RI) a été calculé. La PCrL hydrolyse la liaison ester au niveau des deux positions (*sn*-1 et *sn*-3) du TG, montrant une régiosélectivité claire envers la position *sn*-1 avec un RI de 23% (Figure 30B). La valeur de RI de la PCrL a été comparée à la valeur précédemment déterminée pour d'autres lipases microbiennes (El Alaoui *et al.*, 2017) (Figure 30B). Sur la base du RI, les lipases 1,3-régiosélectives pourraient être classées dans l'un des trois groupes principaux. Le premier groupe, sans régiosélectivité significative, comprenait la TLL et la CALB, avec respectivement un RI de 2 et 3% (El Alaoui *et al.*, 2017) (Figure 30B); le deuxième groupe, montrant une régiosélectivité significative pour la position *sn*-3, comme la SML

(Eddehech *et al.*, 2021) et la FSC, avec un RI de 22 et 7%, respectivement (El Alaoui *et al.*, 2017) (Figure 30B) ; et le troisième groupe de lipases montrant une régiosélectivité nette pour la position *sn*-1 des TG, dont la CALA et la Lecitase[®], avec respectivement un RI de 13 et 30% (El Alaoui *et al.*, 2017). La PCrL montre une régiosélectivité claire pour la position *sn*-1, avec une valeur RI de 23% (Figure 30B) ; ainsi, elle serait classée dans le troisième groupe avec CALA et la Lecitase[®]. Ces caractéristiques rendent la PCrL très attrayante pour une application dans des réactions de transestérification impliquant la position *sn*-1.

Les lipases microbiennes, de par leur régiosélectivité, sont d'une importance majeure et pourraient être utilisées pour la modification des corps gras et la production de lipides alimentaires structurés, comme la production de substituts du beurre de cacao ou l'enrichissement des huiles en acides gras insaturés par les réactions d'interestérification et de transestérification catalysées par les lipases (Gupta *et al.*, 2003). Par exemple, la TLL a été utilisée pour la synthèse du 1,3-dioléoyl-2-palmitoylglycérol, un TG structuré qui pourrait remplacer la matière grasse du lait humain dans les préparations pour nourrissons (Wang *et al.*, 2019). Cette TG, riche en acide palmitique en position *sn*-2 et en acide oléique en positions *sn*-1,3, a également été synthétisée par acidolyse et catalysée par une lipase commerciale de *Rhizopus oryzae* (Esteban *et al.*, 2011).

3.5. Performance enzymatique de la PCrL

3.5.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité enzymatique

L'effet des solvants organiques sur la stabilité de la PCrL a été déterminé en comparaison, avec la Palatase[®] 20000L et la Lipolase[®] disponibles dans le commerce (Figure 31). Après 24 h d'incubation, à une concentration finale de 25% (v/v) de solvants organiques non miscibles à l'eau (Log $P > 1,8$), la PCrL a montré une grande stabilité avec une activité résiduelle de 114, 98, 110, 138, 150, 125, 94 et 97% en présence de *n*-hexadécane, *n*-décane, iso-octane, *n*-hexane, cyclohexane, toluène, chloroforme et *n*-hexanol, respectivement, comparée à celle du témoin sans solvant (100%) (Figure 31). Le profil de stabilité de la PCrL dans ces solvants organiques était presque le même avec celui de la Palatase[®] 20000L, tandis que la Lipolase[®] s'est avérée moins stable avec ces solvants organiques non miscibles à l'eau, bien qu'avec une activité résiduelle supérieure à 60% (Figure 31).

En revanche, l'exposition de la PCrL à des solvants organiques miscibles à l'eau (polaires) a montré une faible stabilité enzymatique (Figure 31). En présence de DMF, de DMSO ou de méthanol, la PCrL a conservé 66, 57 ou 55% de son activité, alors qu'elle a perdu environ 70 ou 76% de son activité lorsqu'elle a été incubée avec de l'éthanol ou de l'acétonitrile, respectivement

(Figure 31). La Palatase® 20000L, dans les mêmes conditions expérimentales, a conservé respectivement 68, 55, 71, 59 et 21% de son activité initiale en présence de DMSO, DMF, éthanol et acétonitrile, (Figure 31). Il convient de noter qu'à l'exception de l'acétonitrile, les autres solvants organiques miscibles à l'eau tels que l'éthanol, le méthanol, le DMF et le DMSO, ont tous montré un effet positif sur la stabilité de Lipolase®, avec des activités résiduelles de 120, 155, 120 et 88%, respectivement (Figure 31).

Les solvants organiques sont largement utilisés dans les réactions enzymatiques avec les lipases parce qu'ils facilitent la manipulation de substrats hydrophobes, tel que les lipides et ils peuvent également moduler et/ou augmenter l'activité et la sélectivité de certaines lipases (Doukyu and Ogino, 2010). En outre, les lipases sont largement exploitées pour leur capacité à catalyser la synthèse de nouveaux esters dans des mélanges de solvants aqueux-organiques ou dans des solvants organiques purs (Lima *et al.*, 2004; Jiao *et al.*, 2018). Dans ce contexte, la PCrL purifié a montré une grande stabilité dans les solvants organiques non miscibles à l'eau, avec des activités résiduelles de 94 à 150% après 24 h d'incubation. Des activités résiduelles de 70 à 120% ont été rapportées pour la lipase de *Bjerkandera adusta* R59 après 24 h d'incubation à température ambiante dans le cyclohexane, n-hexane et n-heptane (Bancerz and Ginalska, 2007). La stabilité des lipases dans les solvants organiques non miscibles à l'eau a généralement été attribuée au fait que ces solvants n'enlèvent pas la couche d'hydratation de la surface de l'enzyme, qui est nécessaire à l'activité catalytique (Ogino and Ishikawa, 2001). En revanche, les solvants hydrophiles miscibles à l'eau sont incompatibles avec l'activité de la PCrL. De même, d'autres lipases de *Penicillium* sp. ont montré une instabilité significative dans les solvants polaires (Lima *et al.*, 2004; Turati *et al.*, 2019). L'inactivation significative des enzymes dans les solvants polaires peut être due à l'élimination de la monocouche essentielle d'eau liée de la molécule d'enzyme (Ogino and Ishikawa, 2001). L'inactivation enzymatique dans les milieux contenant des solvants organiques est probablement aussi causée par la perturbation du noyau hydrophobe de la molécule de protéine en raison du changement de l'hydrophobie du milieu (Careri, 1998). En particulier, les solvants polaires (tels que l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle), qui peuvent pénétrer dans la protéine, sont capables d'induire davantage de changements structuraux pour l'interaction entre le site actif et le substrat que les solvants non polaires, comme précédemment rapporté par Serdakowski and Dordick, (2008).

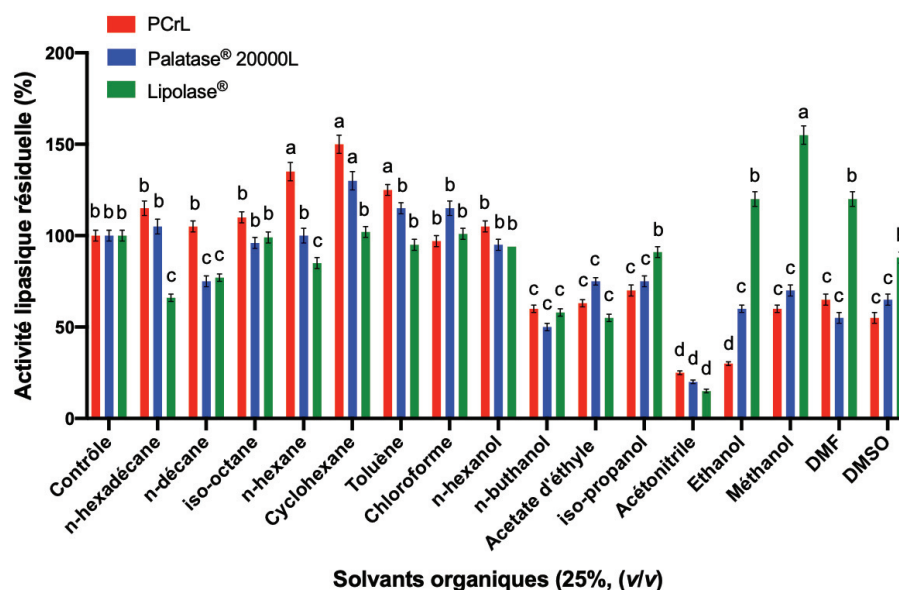


Figure 31 : Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité de la PCrL, la Palatase® 20000L et la Lipolase®. L'effet des solvants organiques a été déterminé en incubant chaque enzyme avec le solvant (concentration finale, 25% (v/v)) pendant 24 h. Les activités résiduelles des lipases ont été déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant le TC8 comme substrat à 37°C et pH9, comme décrit dans la section matériel et méthodes, puis exprimé en pourcentage du niveau d'activité en l'absence de solvants organiques. L'activité de l'enzyme sans solvant organique a été prise comme 100%. Chaque mesure représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n=3). ^{a-d} Les moyennes avec des lettres minuscules pour chaque solvant tester différaient considérablement (p < 0,05).

3.5.2. Influence de constituants des détergents à lessive sur la stabilité de la PCrL

L'activité de la PCrL, ainsi que celle des lipases commerciales Palatase® 20000 L et Lipolase® à des fins de comparaison, a été testée après 1 h d'incubation avec certains additifs détergents disponibles au laboratoire (Tableau 15) ou commercialisés (Tableau 16). Une activité PCrL résiduelle de 152, 154 et 182% a été observée en présence de SAFOL 23E7, de Dehydol® LT 7 et de SURFAC® LM 30, en tant que surfactants non ioniques, à 0,5% (v/v), respectivement (Tableau 16). De plus, la PCrL présentait une stabilité considérable par rapport à certains tensioactifs anioniques puissants. Sa stabilité en présence de Galaxy 110 à 2% (v/v), Galaxy CAPB plus à 1% (v/v) et SDS à 2% (m/v) a augmenté de 149, 152% (Tableau 16) et 185% (Tableau 15), respectivement.

En présence de 0,5% (v/v) de SAFOL 23E7, de 2% (v/v) de Galaxy 110 et de 2% (m/v) de SDS, la Palatase® 20000L a conservé 145, 150 (Tableau 16) et 90% (Tableau 15) de son activité initiale, respectivement, tandis que la Lipolase® a conservé 142, 125 (Tableau 16) et 85% (Tableau 15) de son activité initiale. Pour les agents oxydants, l'activité résiduelle de la PCrL en présence de H₂O₂ à 5 et 10% (v/v) a augmenté de 145 et 104%, respectivement (Tableau 15). De plus, l'activité enzymatique en présence d'agents anti-redéposition est également très intéressante. La PCrL présentait 141, 142, 146 et 149% de son activité initiale avec 0,5% (m/v) de TAED, 1% (m/v) de

Na₂ CMC, 100 mM de Na₂CO₃ et 0,2% (m/v) de STPP, respectivement (Tableau 15). L'activité PCrL est stable, avec une activité résiduelle de 108 à 170% avec d'autres additifs de détergent commercialisés, en particulier (v/v) 0,5% Formol, 0,5% Tinopal® CBS-X, 0,2% EDTA, 0,5% Perfume I Class et 1% Perfume II Class (Tableau 16). En revanche, en présence de 5% (v/v) de H₂O₂, de 0,5% (m/v) de TAED et de 0,5% de Formol, la Palatase® 20000L a conservé 61, 125 (Tableau 15) et 152% (Tableau 16) de son activité initiale, respectivement, et la Lipolase® a conservé 80, 115 (Tableau 15) et 135% (Tableau 16) de son activité initiale, respectivement. Ces résultats indiquent clairement que la PCrL présentait au moins la même stabilité, voire une meilleure stabilité, que la Palatase® 20000 L et la Lipolase® avec la plupart des ingrédients détergents, ce qui prouve que la PCrL peut remplacer la technologie actuelle des surfactants en ciblant les taches graisseuses.

Tableau 15 : Stabilité des lipases alcalines PCrL, Palatase® 20000L et Lipolase® avec plusieurs additifs détergents.

Additifs détergents	Concentration finale	Activité lipasique résiduelle (%) ^{a,b}		
		PCrL	Palatase® 20000L	Lipolase®
Contrôle	0	100 ^{cd} ± 3	100 ^{cd} ± 3	100 ^{cd} ± 3
Zéolite	1% (m/v)	95 ^{cd} ± 2	91 ^{cd} ± 2	86 ^{cd} ± 2
STPP	0,2% (m/v)	150 ^{ab} ± 4	146 ^{ab} ± 4	15 ^f ± 4
	0,5% (m/v)	98 ^{cd} ± 2	87 ^{cd} ± 2	97 ^{cd} ± 2
SDS	1% (m/v)	185 ^a ± 4	90 ^{cd} ± 2	96 ^{cd} ± 2
	2% (m/v)	150 ^{ab} ± 4	66 ^{de} ± 2	75 ^d ± 2
Na ₂ CO ₃	50 mM	171 ^a ± 4	165 ^a ± 4	154 ^{ab} ± 4
	100 mM	147 ^{ab} ± 4	141 ^{ab} ± 4	126 ^{bc} ± 3
Tween 20	1% (v/v)	96 ^{cd} ± 2	87 ^{cd} ± 2	73 ^d ± 2
	5% (v/v)	49 ^{de} ± 1	76 ^d ± 2	54 ^{de} ± 1
Tween 40	1% (v/v)	108 ^{bc} ± 3	98 ^{cd} ± 2	87 ^{cd} ± 2
	5% (v/v)	45 ^e ± 1	43 ^e ± 1	36 ^{ef} ± 1
Tween 60	1% (v/v)	84 ^{cd} ± 2	95 ^{cd} ± 2	98 ^{cd} ± 2
	5% (v/v)	31 ^{ef} ± 1	67 ^{de} ± 2	60 ^{de} ± 2
Tween 80	1% (v/v)	83 ^{cd} ± 2	93 ^{cd} ± 2	90 ^{cd} ± 2
	5% (v/v)	29 ^{ef} ± 1	52 ^{de} ± 1	50 ^{de} ± 1
Na ₂ CMC	1% (m/v)	143 ^{ab} ± 4	96 ^{cd} ± 2	92 ^{cd} ± 2
	10% (m/v)	105 ^c ± 3	64 ^{de} ± 2	52 ^{de} ± 1
Triton X-100	1% (v/v)	140 ^{ab} ± 4	80 ^{cd} ± 2	85 ^{cd} ± 2
	5% (v/v)	103 ^{cd} ± 3	66 ^{de} ± 2	68 ^{de} ± 2
TAED	0,5% (m/v)	142 ^{ab} ± 4	126 ^{bc} ± 3	116 ^{bc} ± 3
	5% (m/v)	103 ^{cd} ± 3	92 ^{cd} ± 2	75 ^d ± 2
Perborate de sodium	1% (v/v)	139 ^{ab} ± 3	80 ^b ± 2	113 ^{bc} ± 3
	5% (v/v)	99 ^{cd} ± 3	51 ^{de} ± 1	88 ^{cd} ± 2
H ₂ O ₂	5% (v/v)	146 ^{abA} ± 4	61 ^{deA} ± 2	80 ^{cdA} ± 2
	10% (v/v)	104 ^{cdA} ± 3	45 ^{eA} ± 1	66 ^{deA} ± 2

^{a-f} Les moyennes dans la même colonne de chaque paramètre avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$). La lipase a été incubée pendant 1 h avec un additif détergent à 37 ° C, et l'activité résiduelle de la lipase a été déterminée dans des conditions de dosage optimales pour chaque enzyme. Les données présentées sont la moyenne d'au moins 3 séries de tests, ±SE. ^A Données recueillies en présence de tampon borate-NaOH 100 mM.

Tableau 16 : Stabilité des lipases alcalines PCrL, Palatase® 20000L et Lipolase® avec plusieurs additifs détergents commercialisés.

Additifs détergents commercialisés	Concentration (% v/v)	Activité lipasique résiduelle (%) ^{a,b}		
		PCrL	Palatase® 20000L	Lipolase®
Contrôle	0	100 ^{cd} ± 3	100 ^{cd} ± 3	100 ^{cd} ± 3
SAFOL 23E7	0,5	152 ^{ab} ± 4	145 ^{ab} ± 4	142 ^{ab} ± 4
	1	95 ^{cd} ± 2,4	93 ^{cd} ± 2	90 ^{cd} ± 2
Dehydol® LT 7	0,5	154 ^{ab} ± 4	142 ^{ab} ± 4	164 ^a ± 4
	1	99 ^{cd} ± 2	95 ^{cd} ± 2	108 ^{bc} ± 3
SURFAC® LM 30	0,5	183 ^a ± 5	142 ^{ab} ± 4	120 ^{bc} ± 3
	1	150 ^{ab} ± 4	102 ^{cd} ± 3	94 ^{cd} ± 2
NEODOL® 25-7	0,5	75 ^d ± 2	96 ^{cd} ± 2	87 ^{cd} ± 2
	1	25 ^{ef} ± 1	57 ^{de} ± 1	45 ^c ± 1
Galaxy LAS	2	82 ^{cd} ± 2	99 ^{cd} ± 2	95 ^{cd} ± 2
	5	30 ^{ef} ± 1	60 ^{de} ± 2	59 ^{de} ± 1
Galaxy LES 70	2	110 ^{bc} ± 3	103 ^{cd} ± 3	94 ^{cd} ± 2
	5	55 ^{de} ± 1	53 ^{de} ± 1	50 ^{de} ± 1
Galaxy 110	2	149 ^{ab} ± 4	150 ^{ab} ± 4	125 ^{cb} ± 3
	5	93 ^{cd} ± 2	98 ^{cd} ± 2	83 ^{cd} ± 2
Galaxy CAPB Plus	1	153 ^{ab} ± 4	162 ^a ± 4	14 ^f ± 4
	5	105 ^c ± 3	106 ^b ± 3	105 ^c ± 4
TERGITOL™ NP-9	2	86 ^{cd} ± 2	76 ^d ± 2	89 ^{cd} ± 2
SURFACTANT	5	30 ^{ef} ± 1	46 ^c ± 1	50 ^{de} ± 1
FINDET® AR/52	0,5	78 ^d ± 2	82 ^{cd} ± 2	75 ^d ± 2
	1	26 ^{ef} ± 1	35 ^{ef} ± 1	28 ^{ef} ± 1
Anti-mousse	0,5	85 ^{cd} ± 2	98 ^{cd} ± 2	88 ^{cd} ± 2
	1	46 ^c ± 1	56 ^{de} ± 1	50 ^{cd} ± 1
Formol	0,2	160 ^{ab} ± 4	153 ^{ab} ± 4	135 ^a ± 3
	0,5	108 ^{bc} ± 3	96 ^{cd} ± 2	84 ^{cd} ± 2
Tinopal® CBS-X	0,5	152 ^{ab} ± 4	164 ^a ± 4	122 ^{bc} ± 3
	1	95 ^{cd} ± 2	111 ^{bc} ± 3	86 ^{cd} ± 2
Sulfacid K	10	77 ^d ± 2	84 ^{cd} ± 2	83 ^{cd} ± 2
	15	15 ^f ± 1	32 ^{ef} ± 1	25 ^{ef} ± 1
Marlipal® 31/90	0,5	79 ^{cd} ± 2	66 ^{de} ± 2	83 ^{cd} ± 2
	1	30 ^{ef} ± 1	42 ^{ef} ± 1	35 ^{ef} ± 1
EDTA	0,2	130 ^b ± 3	111 ^{bc} ± 3	125 ^{bc} ± 3
	0,5	76 ^d ± 2	71 ^{de} ± 2	62 ^{de} ± 2
Perfume I Class	0,5	165 ^{ab} ± 4	152 ^{ab} ± 4	146 ^{ab} ± 4
	1	109 ^{bc} ± 3	101 ^b ± 3	99 ^{cd} ± 2
Perfume II Class	0,5	170 ^a ± 4	162 ^a ± 4	155 ^{ab} ± 4
	1	110 ^{bc} ± 3	105 ^c ± 3	96 ^{cd} ± 2
Propyl betaïne	1	95 ^{cd} ± 2	85 ^{cd} ± 2	81 ^{cd} ± 2
NaOH 50%	1	113 ^{bc} ± 3	122 ^{bc} ± 3	119 ^{bc} ± 3

^{a-f} Les moyennes dans la même colonne de chaque paramètre avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$). La lipase a été incubée pendant 1 h avec des additifs détergents à 37°C, et l'activité résiduelle a été déterminée dans des conditions de dosage optimales pour chaque enzyme. Les données présentées sont les moyennes d'au moins 3 séries de tests, $\pm$ SE.

3.5.3. Compatibilité de la PCrL avec les détergents à lessive

Pour étudier l'utilisation potentielle de la PCrL en combinaison avec des détergents liquides et solides disponibles dans le commerce, les effets de ces détergents sur la stabilité de PCrL ont été évalués et comparés à ceux de la Palatase® 20000 L et de la Lipolase®. La lipase a été pré-incubée en présence de divers détergents à lessive commerciaux pendant 60 min à température ambiante et l'activité résiduelle a été déterminée dans des conditions de test standard, avec le TC8 comme

substrat. Comme le montre la figure 32, la PCrL a été remarquablement stable et compatible avec tous les détergents commerciaux testés, conservant 75 à 100% de son activité initiale contre 70 à 100% et 72 à 100% pour la Palatase® 20000 L et la Lipolase®, respectivement. La PCrL a notamment montré une excellente compatibilité et stabilité avec Ariel, Pro-Clean, New Dex, Class, Nadhif et EcoVax, conservant 100% de son activité. De plus, la Palatase® 20000 L et la Lipolase® se sont révélés moins stables que la PCrL en présence de Nadhif, EcoVax et New Det (Figure 32). Tous ces résultats confirment également le fait que la PCrL possède un certain nombre de propriétés encourageantes qui pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour les préparations détergentes à lessive.

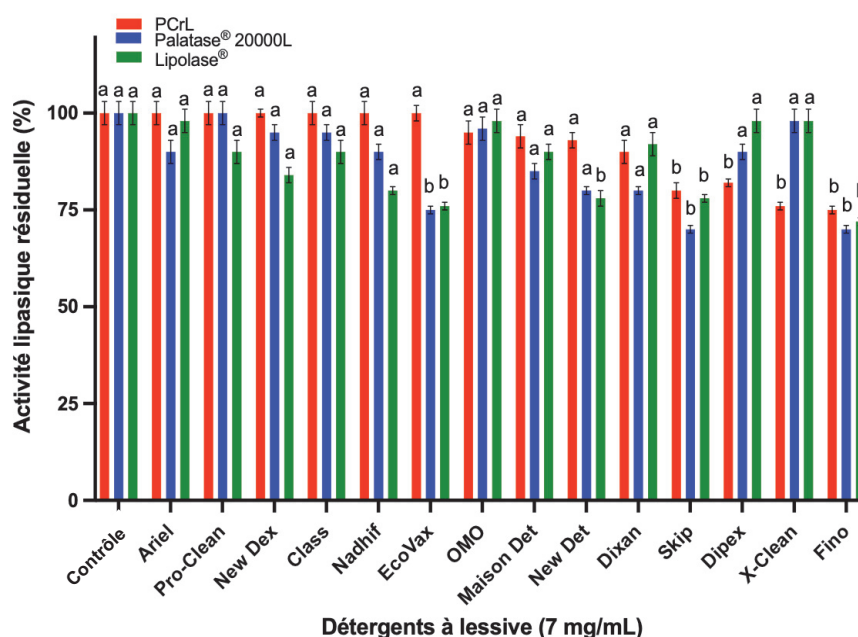


Figure 32 : Stabilité et compatibilité des lipases testées en présence de détergents à lessive commerciaux (7 mg/mL) et incubées pendant 60 minutes à température ambiante. L'activité enzymatique de l'échantillon témoin, sans additif et incubé dans des conditions similaires, a été prise à 100%. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent l'erreur standard de la moyenne (n=3). ^{a-b} Les moyennes avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$).

3.5.4. Test de performance de lavage des taches de graisses avec la PCrL

L'effet de différents détergents commerciaux sur l'élimination des taches de graisses est indiqué dans le tableau 17. Quel que soit le détergent utilisé, le pourcentage d'élimination de graisses avec un détergent additionné d'une solution de lipase s'est avéré supérieur à celui obtenu avec une solution détergente seule, ce qui montre l'avantage d'inclure une lipase dans la formulation détergente. Parmi tous les détergents (7 mg/mL) testés, le niveau d'élimination de graisse le plus élevé a été observé avec le détergent Ariel, comme indiqué dans le tableau 17. L'ajout de la PCrL au détergent a amélioré son efficacité de 46 à 100%, contre respectivement 41 à 100% et 39 à 100% pour la Palatase® 20000 L et la Lipolase® (Tableau 17). L'application du détergent sans

lipase a entraîné une moindre élimination de la graisse, avec une diminution comprise entre 21 et 54% (Tableau 17). Ces résultats ont été confirmés par l'examen visuel des taches huileuses sur un tissu de coton taché de jaune d'œuf ou de sauce tomate (Figure 33). Compléter le détergent avec PCrL, Palatase® 20000 L ou Lipolase® a considérablement amélioré le nettoyage de l'huile. De plus, la PCrL a facilité la libération des acides gras de manière beaucoup plus efficace que la Lipolase® actuellement utilisée. Ces résultats obtenus lors de cette étude de performances de lavage pour l'élimination des taches grasses des tissus en coton ont confirmé le potentiel de cette lipase comme additif détergent.

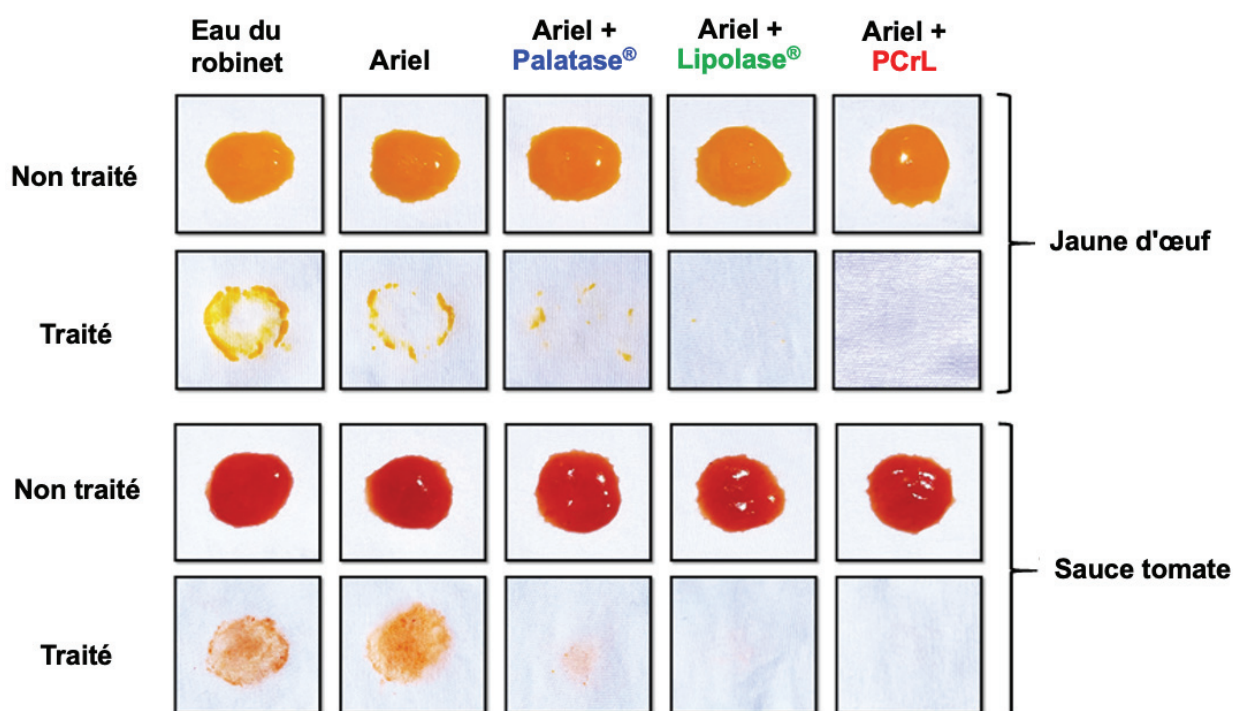


Figure 33 : Test de performance de lavage des taches de graisses avec un détergent commercial en présence de la PCrL, la Palatase® 20000 L ou la Lipolase®. Le test d'analyse des performances de lavage de la lipase a été réalisé avec le détergent commercial Ariel (7 mg/mL) en utilisant un chiffon en coton taché avec du jaune d'œuf ou de la sauce tomate. Le tissu taché d'huile a été rincé à l'eau du robinet, lavé avec Ariel (7 mg/mL), lavé avec Ariel additionné de Palatase® 20000 L (500 U/mL), lavé avec Ariel additionné de Lipolase® (500 U/mL), ou lavé avec Ariel additionné de PCrL (500 U/mL).

Tableau 17 : Effet de PCrL, Palatase® 20000 L et Lipolase® sur l'élimination de l'huile d'olive du tissu en coton avec divers détergents à lessive liquides et solides commercialisés.

Détergent à lessive (7 mg/mL)	Élimination de l'huile (%)			
	Détergent	Détergent + PCrL	Détergent + Palatase® 20000L	Détergent + Lipolase®
Ariel	54 ^{bc} ± 2	100 ^a ± 3	93 ^a ± 2	98 ^a ± 3
OMO	40 ^c ± 1	81 ^a ± 2	88 ^a ± 2	100 ^a ± 3
Nadhif	34 ^c ± 1	51 ^{bc} ± 2	45 ^{bc} ± 1	42 ^c ± 1
EcoVax	35 ^c ± 1	72 ^b ± 1	53 ^{bc} ± 2	61 ^b ± 1
Dipex	27 ^{cd} ± 1	54 ^{bc} ± 1	59 ^b ± 2	68 ^b ± 1
Maison Det	44 ^c ± 1	91 ^a ± 2	76 ^{ab} ± 1	82 ^a ± 2
Pro-Clean	55 ^{bc} ± 1	100 ^a ± 3	100 ^a ± 3	87 ^a ± 2
New Det	29 ^c ± 1	61 ^b ± 1	41 ^c ± 1	39 ^c ± 1
New Dex	39 ^c ± 1	98 ^a ± 3	91 ^a ± 2	86 ^a ± 2
Class	49 ^{bc} ± 2	96 ^a ± 2	89 ^a ± 2	86 ^a ± 2
Fino	21 ^d ± 2	46 ^{bc} ± 1	50 ^{cb} ± 2	39 ^c ± 1
X-Clean	46 ^{bc} ± 1	90 ^a ± 2	100 ^a ± 3	98 ^a ± 3
Dixan	21 ^d ± 1	54 ^{bc} ± 1	45 ^{cb} ± 1	59 ^b ± 2
Skip	25 ^{cd} ± 1	65 ^b ± 1	57 ^b ± 1	62 ^b ± 1

^{a-d} Les moyennes de toutes les colonnes de chaque paramètre avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$). Les valeurs représentent les moyennes de 3 répétitions indépendantes et le $\pm$ SE est indiqué.

En fait, la PCrL a facilité la libération de substances lipidiques beaucoup plus facilement que la Lipolase® actuellement utilisée. De plus, la combinaison de la PCrL avec le détergent Ariel a permis l'élimination complète des taches de graisses. Ces résultats confirment l'utilité de la PCrL dans les applications industrielles futures en tant que bio additif de nettoyage dans les formulations détergentes. Les lipases détergentes ont la capacité de catalyser l'hydrolyse de lipides insolubles. C'est une propriété importante des enzymes détergentes car elles doivent agir sur les substrats lipidiques fixés aux surfaces solides, ce qui en fait des additifs attractifs pour les nettoyeurs pour surfaces dures. Ils pourraient également aider à éliminer les taches de graisses souvent rencontrées dans le linge. Plusieurs travaux ont rapporté l'utilité des lipases alcalines pour faciliter l'élimination des taches de sauce tomate sur les tissus en coton (Bredai *et al.*, 2021).

Actuellement, différents types de lipases étaient utilisés dans de nombreux types modernes de détergents puissants en poudre et pour lave-vaisselle automatiques afin d'augmenter la détergence et de prévenir l'entartrage (Bora and Bora, 2012). En outre, ces enzymes ont une faible toxicité par rapport aux produits chimiques utilisés dans les détergents conventionnels et ne laissent aucun résidu nocif (Bharathi and Rajalakshmi, 2019). En fait, plusieurs études ont rapporté l'utilité des lipases alcalines thermostables de *Bacillus sonorensis* (Nerurkar *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Grbavčić *et al.*, 2011) et *Bacillus licheniformis* (Bredai *et al.*, 2021) pour l'élimination des taches grasses du tissu en coton lorsqu'elles sont mélangées avec du détergent.

Les détergents à lessive sont un mélange de composants volumineux, tels que des agents de blanchiment, des tensioactifs et des enzymes, empêchant le dépôt de saleté sur les tissus,

empêchant la corrosion, ajoutant de l'alcalinité et conservant la capacité tampon (Mechri *et al.*, 2022). Les agents de blanchiment assurent l'action de blanchiment par oxydation, tandis que les tensioactifs diminuent la tension superficielle aux interfaces, améliorant ainsi la force répulsive et favorisant le processus de nettoyage. Le rôle des enzymes est de rendre la procédure de nettoyage plus efficace. C'est pourquoi les biocatalyseurs alcalins, comme la PCrL, doivent être compatibles avec tous les constituants usuels des détergents. En effet, les taches sont éliminées par action mécanique assistée par l'action catalytique des enzymes. L'utilisation de biocatalyseurs dans les détergents à lessive constitue le segment le plus grand segment du marché mondial des enzymes industrielles. Les principales enzymes des détergents à lessive biologiques sont les protéases, mais il est devenu plus courant récemment d'incorporer un mélange d'enzymes, notamment des lipases, des amylases et des peroxydases.

4. Immobilisation de la PCrL et caractérisation de différentes formes de PCrL immobilisées

La plupart des études relatives à un usage spécifique des enzymes ont été réalisées à l'échelle de laboratoire ou, tout au plus, en essais pilotes, dans des conditions idéalisées avec de nombreuses simplifications. La mise à l'échelle industrielle de l'approche enzymatique se heurte encore à quelques obstacles. L'optimisation des conditions spécifiques de production d'enzymes de différentes souches, les coûts de production des enzymes, leur stabilité vis-à-vis des conditions de stockage ou d'utilisation, la présence d'inhibiteurs, etc. sont autant de contraintes qui freinent l'émergence de cette technologie. Le contournement de ces obstacles nécessite la production de catalyseurs robustes, c'est-à-dire aux propriétés intrinsèques améliorées. L'immobilisation enzymatique est l'une des stratégies appliquées pour y parvenir. En effet, l'immobilisation confère aux enzymes des caractéristiques améliorées les rendant plus stables face aux températures élevées, au pH, aux solvants organiques, aux inhibiteurs et aux changements des conditions environnementales. En conséquence, les enzymes immobilisées peuvent globalement présenter une meilleure stabilité et une meilleure rentabilité par rapport à leurs homologues sous formes libres et solubles (Pereira *et al.*, 2017; Chapman *et al.*, 2018; Basso and Serban, 2019). Cependant, la stabilité de l'enzyme immobilisée dépend de la nature intrinsèque de l'enzyme, des conditions d'immobilisation, de la nature du support utilisé et des conditions de réaction. Dans ce contexte, nous avons procédé à l'étude de l'immobilisation de la PCrL de la souche P22 en utilisant trois méthodes et six supports.

4.1. Immobilisation par encapsulation et adsorption-encapsulation

Afin d'améliorer l'efficacité de l'immobilisation de la PCrL, deux approches sont adoptées : l'encapsulation moyennant des supports organiques et l'encapsulation-adsorption moyennant des supports hybrides (organiques-inorganiques). Pour l'immobilisation de la PCrL, nous avons procédé à l'utilisation de sodium alginate seul comme support organique, ou à l'utilisation de sodium alginate à une concentration optimisée de 2% combiné à d'autres supports soit inorganiques (zéolite), ou organiques naturels (chitosane). Afin de maximiser le rendement de l'immobilisation et l'activité retenue et minimiser au maximum le relargage de la PCrL, nous avons optimisé les concentrations utilisées de différents supports, le temps d'incubation et la concentration du CaCl_2 .

Des rendements d'immobilisation de 94 et 96% ont été trouvés en utilisant de l'alginate de sodium seul et de l'alginate de sodium combiné avec du chitosane avec des activités de récupération de 19,9 et 27,2% respectivement (Tableau 18). Lorsque l'alginate de sodium est couplé à la zéolite, le rendement d'immobilisation atteint 100% avec une amélioration marginale de la récupération d'activité qui est de l'ordre de 47% (Tableau 18). Ceci peut s'expliquer par le fait que les supports inorganiques sont poreux et présentent une grande stabilité mécanique avec des groupements fonctionnels permettant une meilleure adsorption ce qui réduit la libération de l'enzyme du support. La perte d'activité de l'échantillon immobilisé provient du fait que lorsque la molécule d'enzyme est attachée à un support, son site actif peut être stériquement bloqué et par conséquent, l'enzyme perd le bon positionnement face au substrat (Hamidi *et al.*, 2012). La modification chimique de l'enzyme lors de l'immobilisation conduit souvent à une modification mineure de la conformation de PCrL, ce qui peut également réduire l'efficacité catalytique.

Tableau 18 : Immobilisation de la PCrL avec les différents supports organiques et hybrides.

Méthodes	Supports	Charge enzymatique initiale (U/g de bille)	Enzyme non liée (U/g de bille)	Enzyme liée (U/g de bille)	Rendement d'immobilisation (%) ^a	Activité récupérée (%) ^b
Encapsulation	PCrL-SA (2%)	40	2,35	7,5	94	19,9
	Alginate (2%)-Chitosane (0,8%)	45	1,85	11,7	95	27,2
Encapsulation-adsorption	Alginate (2%)-Zéolite (1,2%)	37	0	17,5	100	47,3

PCrL-SA: PCrL immobilisée avec alginate de sodium. PCrL-SA-CH: PCrL immobilisée avec alginate de sodium et chitosane. PCrL-SA-ZE: PCrL immobilisée avec alginate de sodium et zéolite.

^a Rendement d'immobilisation (%) = (Charge enzymatique initiale – Enzyme non liée / Charge enzymatique initiale) × 100. ^b Activité récupérée (%) = Enzyme liée / (Charge enzymatique initiale – Enzyme non liée) × 100.

4.1.1. Spectroscopie FTIR-ATR

L'analyse des billes de la PCrL immobilisée et de la PCrL à l'état libre est effectuée, moyennant la spectroscopie FTIR-ATR afin de collecter simultanément des données spectrales suite à l'immobilisation de la PCrL en comparant le profil de l'enzyme libre (Figure 34A) par rapport à celle sous forme immobilisée sur différents supports (Figure 34 B, C et D). Le spectre FTIR-ATR obtenu pour la PCrL libre, a montré des pics caractéristiques au voisinage de 1620 cm^{-1} et 3280 cm^{-1} qui correspondent respectivement à la vibration d'étirement de C=O dans le groupement amide et au pic d'étirement du groupement NH_2 (Figure 34 A). Le spectre de l'alginate de sodium (SA) montre un pic majoritaire à 3260 cm^{-1} qui correspond à la présence de groupements hydroxyle (OH) (Figure 34B). Un pic intense à 1593 cm^{-1} et un pic moins intense autour de 1405 cm^{-1} , sont dus aux vibrations de déformation axiale asymétrique et symétrique de la fonction carboxylique (COO^-) (Figure 34B). Ce spectre montre également un signal autour de 1024 cm^{-1} qui est associé à la vibration du groupe C-O-C caractéristique de la boucle de l'alginate de sodium (Figure 34B). L'interaction entre l'activité PCrL et l'alginate de sodium a été mise en évidence par le déplacement des pics associés au groupe COO^- de 1593 et 1405 cm^{-1} à 1606 et 1429 cm^{-1} (Figure 34B). De plus, on observe un déplacement du pic caractéristique de l'OH des billes vides de 3260 cm^{-1} à 3342 cm^{-1} avec disparition des pics correspondant à la PCrL libre (Figure 34B).

L'analyse FTIR-ATR des billes vides de l'alginate de sodium-chitosane (SA-CH) montre la présence des pics caractéristiques d'une molécule de chitosane aux alentours de 4000 cm^{-1} et 500 cm^{-1} (Figure 43C). En effet, les pics trouvés à 3278 cm^{-1} , 1603 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} et 1024 cm^{-1} sont les signatures du chitosane qui correspondent à la vibration d'allongement OH. Le pic de 3278 cm^{-1} correspondent à la vibration des groupements OH et NH. Le pic 1603 cm^{-1} correspond au groupement amide (C=O dans le groupement NH-COCH_3) (Figure 43C). Lors de l'immobilisation de la PCrL avec de l'alginate de sodium-chitosane (SA-CH), l'analyse FTIR-ATR révèle le déplacement des pics caractéristiques des groupes C=O , OH et NH du chitosane, suggérant que ces groupes interagissent avec la PCrL et l'alginate de sodium, confirmant la création de nouvelles liaisons hydrogène et électrostatiques (Figure 34C).

Pour les billes témoin de zéolite-alginate de sodium (SA-ZE), le diagramme FTIR-ATR montre la présence de pics caractéristiques de zéolite minérale à 3246 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} (Figure 43D). Suite à l'immobilisation de la PCrL les pics correspondants à la PCrL libre ont été déplacés. Cette transition montre que les groupes fonctionnels de la zéolite ont interagi avec la PCrL et l'alginate pendant l'encapsulation-adsorption. Ainsi, le pic du groupement COO^- de l'alginate de sodium passe de 1598 cm^{-1} et 1425 cm^{-1} à 1603 cm^{-1} et 1427 cm^{-1} (Figure 43D) pour les billes immobilisées,

ce qui montre que les charges positives de la zéolite ont un effet d'interaction de type électrostatique avec les charges négatives de l'alginate. De plus, le nombre de pics du groupe OH passe de 3246 cm^{-1} à 3358 cm^{-1} . Ces déplacements sont dus aux fortes complexations de la PCrL avec l'alginate de sodium et la zéolite (Figure 34D).

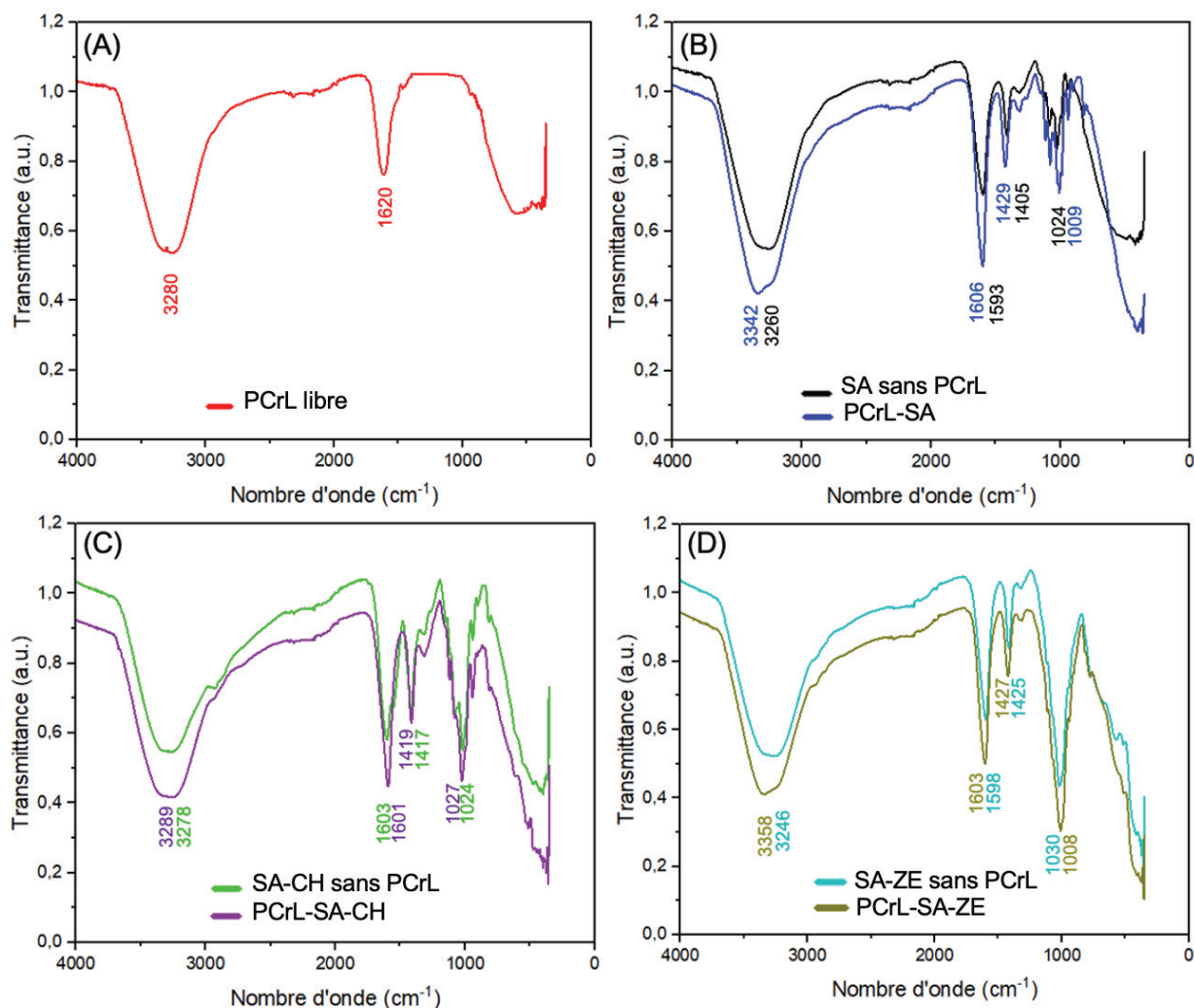


Figure 34 : Spectrogrammes infrarouges des billes de PCrL libre (A), PCrL-SA (B), PCrL-SA-CH (C) et PCrL-SA-ZE (D). Le profil de potentiel FTIR-ATR a été généré à l'aide du logiciel OriginLab OriginPro 2021b v9.8.5.204 (SR1).

4.1.2. Modèle DRX

Les spectres DRX montrent que tous les pics étaient plus intenses suite à l'immobilisation de la PCrL et que la structure cristalline est toujours maintenue après les processus d'immobilisation enzymatique, ce qui coïncide avec les résultats FTIR-ATR. Cela indique que la structure rigide du chitosane, de la zéolite et de l'alginate de sodium peut être adoptée comme d'excellents supports pour l'immobilisation de la PCrL (Figure 35). De ces résultats, nous avons pu déduire que la PCrL immobilisée a bien conservé ses caractéristiques spectrales, permettant ainsi la séparation efficace et facile du biocatalyseur après la réaction.

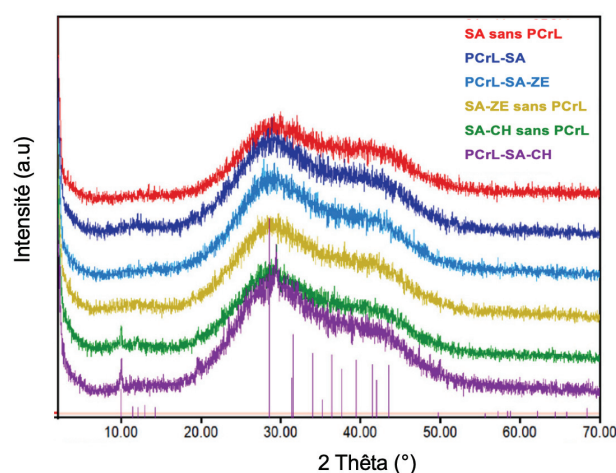


Figure 35 : Profil DRX des billes SA, SA-CH et SA-ZE seuls et complexés au PCrL. Les modèles DRX ont été générés à l'aide de Match! logiciel (version 3.10.2.173).

4.1.3. Microscopie électronique à balayage

Les micrographies MEB des supports (SA, SA-CH et SA-ZE) seuls et complexés à la PCrL (PCrL-SA-, PCrL-SA-CH et PCrL-SA-ZE) illustrent clairement les différences des morphologies de surface après immobilisation (Figure 36). La surface des billes avec ou sans PCrL ressemble à des structures de mailles rugueuses et serrées. Il a été noté que les billes sans PCrL ont des pores plus larges, alors que les pores des billes avec PCrL semblent être occupés.

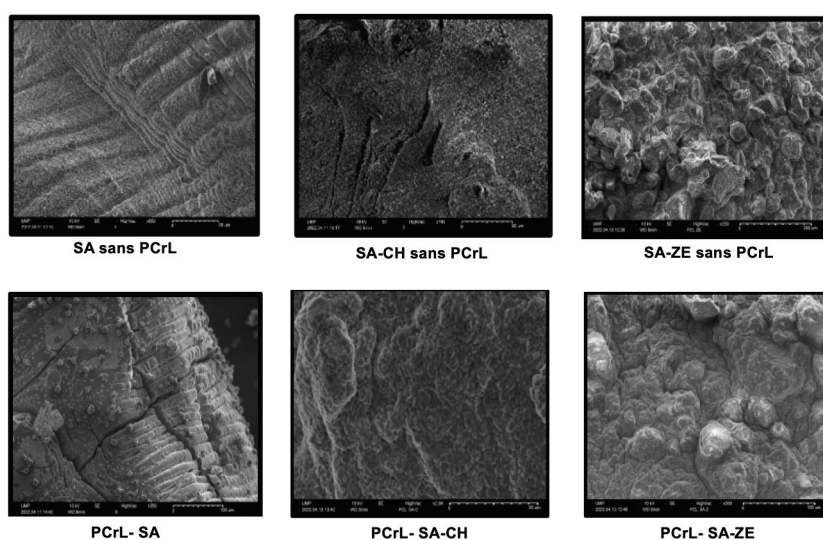


Figure 36 : Observation microscopiques par MEB des billes (SA, SA-CH et SA-ZE) seuls et complexés à la PCrL.

4.2. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation de la PCrL a été effectuée en incubant 1 mL de la lipase PCrL (5000 U/mg) avec 1 g de support (CaCO_3 ou Celite 545) à 4°C, sous une agitation douce. Les pourcentages de rendement de l'activité lipase immobilisée sont présentés sur la figure 37. Nos résultats montrent que CaCO_3 entraîne un bon rendement de $90 \pm 2\%$ après 30 min d'incubation (4500 U/mg) à 4°C. Néanmoins, la PCrL adsorbée sur Celite 545 a montré un très faible pourcentage d'immobilisation

qui ne dépassait pas $15 \pm 1,2\%$ après 30 min d'incubation (750 U/mg) à 4°C. La meilleure liaison de la PCrL avec le CaCO_3 pourrait expliquer cette augmentation du rendement d'immobilisation de l'activité lipase. En effet, ce support est un adsorbant qui conduit à une forte dispersion de la PCrL dans le support et préserve l'activité catalytique. Nous avons donc retenu le CaCO_3 comme support pour l'immobilisation de notre lipase. En effet, ce support est non toxique et dépourvu de toute réactivité chimique.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Ghamgui *et al.*, (2007), qui ont trouvé un rendement d'immobilisation de 95%, après 30 min d'incubation de la lipase de *Rhizopus oryzae* avec du CaCO_3 . De même, la lipase de *Bacillus stearothermophilus* immobilisée par adsorption physique sur CaCO_3 , a montré un rendement supérieur à 89% pendant 30 min (Ben Bacha *et al.*, 2022). De plus, l'adsorption de la lipase *Proteus vulgaris* OR34 sur CaCO_3 , a montré un rendement supérieur à 89% pendant 60 min. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que le carbonate de calcium est une poudre blanche avec de petites particules cristallines capables de produire une grande surface d'adsorption (Ghamgui *et al.*, 2007; Khmaissa *et al.*, 2022). L'utilisation du CaCO_3 comme matrice d'immobilisation est due à son faible coût, son caractère non toxique et son absence de réactivité chimique avec les protéines (Ghamgui *et al.*, 2007; Ben Bacha *et al.*, 2022). Il a été rapporté que l'immobilisation par adsorption physique est la technique la plus simple et la moins coûteuse. De plus, les faibles interactions (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes et force de van der Waals) établies entre l'enzyme et le support n'ont pas d'effets néfastes sur l'activité catalytique (Lee *et al.*, 2021). Ces liaisons étant si faibles, l'enzyme peut facilement se désorber du support dans des conditions industrielles. Malgré cela, cette technique est très utile si l'enzyme est destinée au domaine de la synthèse organique, où la désorption est négligée en raison de la faible solubilité des lipases dans les solvants organiques (Sharma and Kanwar, 2014).

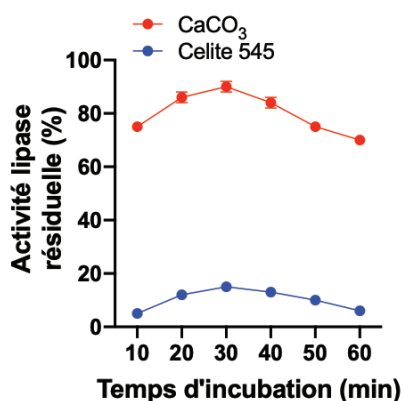


Figure 37 : Cinétique d'adsorption de la PCrL sur le CaCO_3 et le Celite 545.

4.3. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de PCrL immobilisée

Les profils d'activité de la PCrL libre et PCrL immobilisée à différentes températures sont présentés sur la figure 38A. En effet, la PCrL immobilisée sur CaCO_3 et alginate de sodium a été plus active que la PCrL libre dans une gamme de température de 10 à 80°C avec un optimum à 45°C sur CaCO_3 et alginate de sodium, alors que la température optimale pour la PCrL est de 37°C.

Concernant la thermostabilité, comme le montre la figure 38B, la PCrL immobilisée sur CaCO_3 et l'alginate de sodium est stable sur une large plage de température, conservant 100% de son activité initiale à 45 et 60°C, tandis que l'activité résiduelle de la PCrL libre conservait environ 50% de son activité initiale à 45°C, elle était totalement inhibée à 60°C. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Misbah *et al.*, (2020), Ben Bacha *et al.*, (2022), qui ont trouvé que la lipase immobilisée sur CaCO_3 est plus active que la lipase libre à haute température. Il est souvent montré que l'enzyme immobilisée a une stabilité thermique plus élevée que l'enzyme libre, du fait de la restriction de sa flexibilité conformationnelle due à ses multiples points de fixation sur le support, ce qui limite le déploiement de la protéine à des températures extrêmes (Ghamgui *et al.*, 2007; Kharrat *et al.*, 2011).

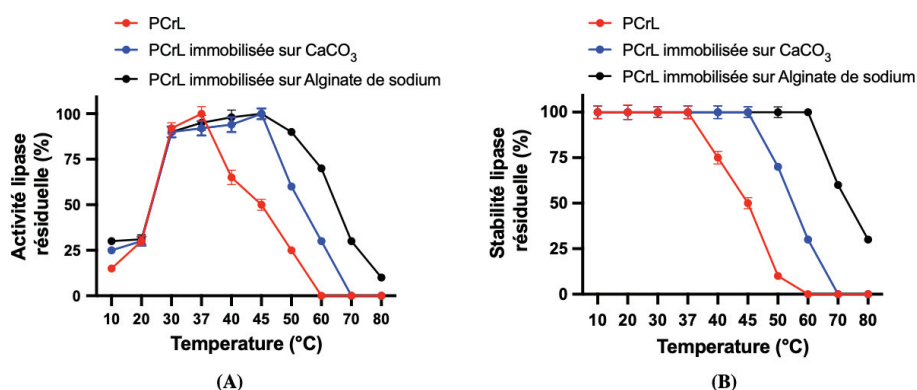


Figure 38 : Effet de la température sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la PCrL libre et de la PCrL immobilisée. Les enzymes ont été incubées pendant 1 h à différentes températures pour l'étude de la stabilité. Les activités ont été mesurées en utilisant le TC8 comme substrat.

4.4. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la PCrL immobilisée

Les résultats illustrés sur la figure 39A montrent que l'immobilisation n'a aucun effet sur l'optimum du pH qui est de 9 pour PCrL libre et immobilisée. De plus, à pH 11, la PCrL immobilisée conserve 70% de son activité initiale, alors que la PCrL libre ne conserve que 30% de son activité initiale.

En ce qui concerne la stabilité au pH, la figure 39B montre que la PCrL immobilisée présente le même comportement de la PCrL libre qui a montré une stabilité remarquable à un pH allant de

6 à 9. Cette fixation confère à la lipase une rigidité de sa structure tridimensionnelle, qui se maintient même à des valeurs de pH extrêmes (Dong *et al.*, 2012; Khmaissa *et al.*, 2022).

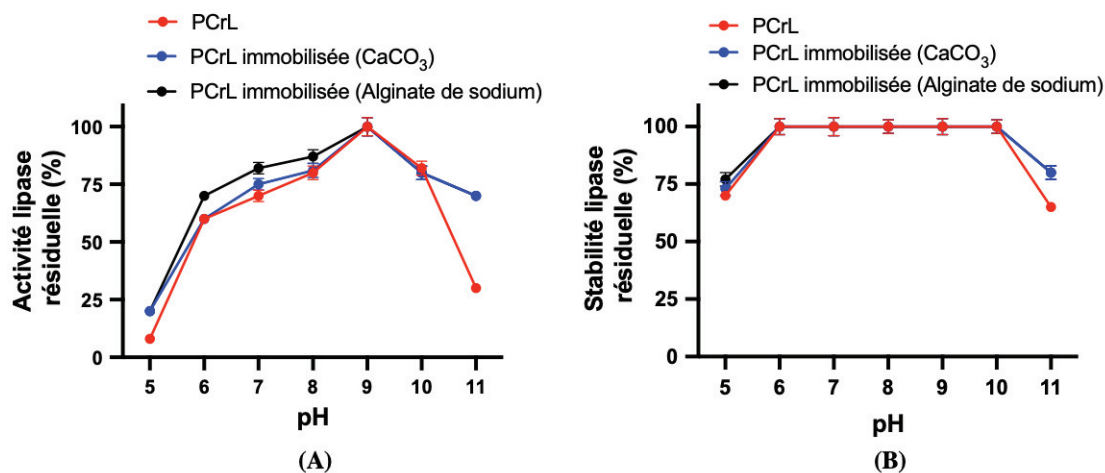


Figure 39 : Effet du pH sur l'activité (A) et la stabilité (B) de la PCrL libre et de la PCrL immobilisée. Les enzymes ont été incubées 1 h, dans différents tampons, à 4°C pour l'étude de la stabilité. Les activités ont été mesurées en utilisant le TC8 comme substrat.

5. Evaluation de la performance de la PCrL libre et PCrL immobilisée (CaCO₃) dans la synthèse organique

5.1. Effet des solvants organiques sur la stabilité de la PCrL immobilisée

L'amélioration des propriétés biochimiques (activité, stabilité au pH, thermostabilité) de la PCrL, suite à son immobilisation sur le CaCO₃, ouvre des applications potentielles dans divers domaines, comme la production du biodiesel. En effet, les lipases immobilisées ont suscité beaucoup d'attention, en tant que biocatalyseurs de réactions de synthèse. Néanmoins, la réaction de synthèse enzymatique peut être réalisée en présence d'un solvant organique afin d'augmenter la solubilité des substrats, réduire la viscosité du mélange réactionnel et augmenter la vitesse de la réaction (Sankaran *et al.*, 2016). Les enzymes sont de plus en plus utilisées en présence de solvants organiques. De ce fait, l'addition de ces derniers permet de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de certaines enzymes, de transformer des réactions d'hydrolyse en réactions de synthèse et de réaliser, dans certains cas, plus efficacement des réactions enzymatiques. Les lipases, enzymes susceptibles d'hydrolyser les liaisons ester-carboxylique, sont également capables de catalyser la synthèse des esters. En effet, ces réactions d'inversion d'hydrolyse se déroulent en présence de solvants organiques qui diminuent l'activité de l'eau, favorisant ainsi la synthèse par rapport à l'hydrolyse. Le choix du solvant qui inactive le moins l'enzyme est d'une grande importance pour la réalisation des réactions de synthèse. Pour cela, nous avons étudié l'influence de l'addition de plusieurs solvants organiques (polaires et non polaires), sur l'activité de la PCrL libre et PCrL immobilisée (Figure 40). La PCrL immobilisée montre une stabilité

primordiale vis-à-vis les solvants organiques par rapport à la PCrL non immobilisée. Après 24 h d'incubation, à une concentration finale de 25% (v/v) de solvants organiques non miscibles à l'eau ($\text{Log } P > 1,8$), la PCrL immobilisée a montré une bonne stabilité similaire à celle obtenu avec la PCrL libre (Figure 40).

En revanche, l'exposition de la PCrL immobilisée aux solvants organiques miscibles à l'eau (polaires) a montré une stabilité enzymatique améliorée par rapport aux résultats obtenus avec la PCrL libre (Figure 40). En présence de DMF, de DMSO ou de méthanol, la PCrL immobilisée a conservé respectivement 80, 70 ou 80% de son activité initiale, alors qu'elle a perdu environ 40 ou 50% de son activité lorsqu'elle a été incubée respectivement avec de l'éthanol ou de l'acétonitrile (Figure 40). La PCrL immobilisée sur CaCO_3 s'est avérée très stable (plus de 50% d'activité) en présence de différents solvants organiques hydrophobes et hydrophiles, à une concentration de 25% (v/v) jusqu'à 24 h d'incubation. Cette propriété essentielle pour la catalyse des réactions de synthèse organique, telles que la synthèse du biodiesel.

Généralement, il a été constaté que le taux production de biodiesel augmente avec l'augmentation de l'hydrophobicité du solvant utilisé (Laane *et al.*, 1987). L'utilisation de solvants hydrophiles, en revanche, entraîne des taux plus faibles, en raison de leur tendance à éliminer l'eau liée à la surface de l'enzyme, ce qui provoque sa dénaturation et par conséquent une diminution du taux de conversion (Gorman and Dordick, 1992). Il a été rapporté que l'élimination de l'eau d'hydratation de l'enzyme se produit lorsque la valeur de $\text{Log } P$ du solvant organique est inférieure à 2, alors que ce phénomène n'est pas observé à des valeurs de $\text{Log } P$ comprises entre 2 et 4 (Taher and Al-Zuhair, 2017). C'est pourquoi le n-hexane, dont le $\text{Log } P = 3,5$ est couramment utilisé dans le milieu réactionnel et dont l'effet positif a été prouvé dans la plupart des études portant sur la production du biodiesel (Kaur *et al.*, 2019).

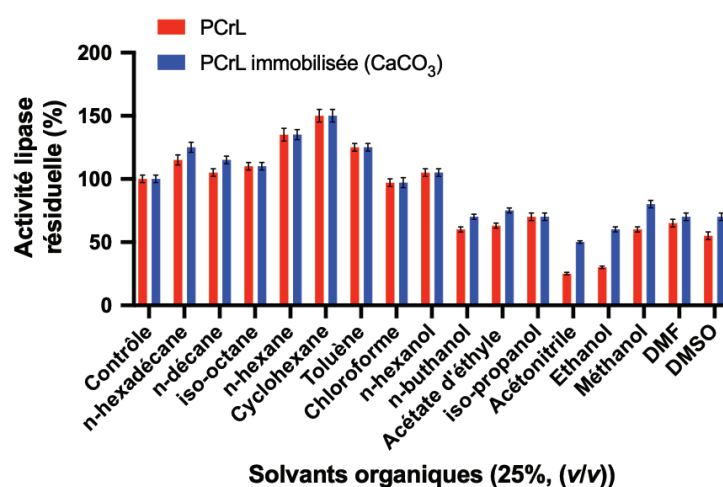


Figure 40 : Effet des différents solvants organiques à une concentration de 25% (v/v) sur la stabilité de la PCrL immobilisée. Les activités résiduelles ont été mesurées tout au long des 24 h d'incubation à 40°C.

5.2. Réaction d'estérification catalysée par la lipase

Après immobilisation de la PCrL sur CaCO_3 et après confirmation de sa stabilité en présence de divers solvants organiques, sa capacité à catalyser la synthèse d'esters méthyliques d'acides oléique via une réaction d'estérification, en présence d'hexane, a été testée. Le résultat illustré sur la figure 41 montre que le rendement de conversion le plus élevé est de l'ordre de 65%. Ce rendement a été obtenu avec la lipase immobilisée après 12 h d'incubation à 40°C, alors que la PCrL libre n'a engendré que 30% de conversion dans les mêmes conditions.

La lipase de *Penicillium expansum* a également été utilisée pour catalyser une réaction de transestérification de l'huile de maïs avec du méthanol. Le degré de conversion obtenu (en biodiesel) était de 86% (Zhang *et al.*, 2011). Singh and Mukhopadhyay, (2012) ont rapporté l'utilisation de lipases de *Rhizomucor miehei* et *Candida antarctica* dans la transestérification de diverses huiles en utilisant l'hexane comme solvant et ont constaté que la lipase de *Rhizomucor miehei* est plus efficace pour convertir les alcools primaires (méthanol, éthanol, propanol et 1-butanol) avec des rendements compris entre 95 et 98%, tandis que la lipase de *Candida antarctica* est plus adaptée à la conversion des alcools secondaires (isopropanol et 2-butanol) avec des rendements compris entre 61 et 84%. De plus la lipase de *Geotrichum candidum* montre un rendement de conversion de 37% (Ramos *et al.*, 2021). La lipase de *Proteus sp.* W1 exprimée dans *E. coli* a également été utilisée pour catalyser une réaction de transestérification de l'huile de palme avec de l'éthanol. Le degré de conversion obtenu en biodiesel était de 43% (Whangsuk *et al.*, 2013). Cependant, la transestérification de l'huile de colza avec du méthanol, catalysée par la lipase de *Proteus sp.* K107 (exprimée dans *E. coli*) a montré un rendement de conversion de 97% (Gao *et al.*, 2009).

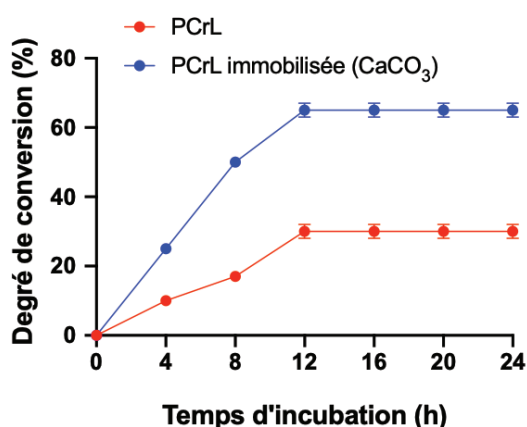


Figure 41 : Cinétique d'estérification de l'acide oléique par la PCrL et PCrL immobilisée. La réaction a été conduite à 40°C sous agitation pendant 24 h en utilisant 500 UI d'enzyme dans l'hexane et un rapport molaire de 3:1 méthanol / acide oléique.

5.3. Paramètres thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PCrL

Les valeurs $t_{1/2}$ et le temps de réduction décimale (D) ont augmenté dans la PCrL immobilisée par rapport à l'enzyme libre (Tableau 19). Les billes PCrL-SA et PCrL-CaCO₃ ont révélé une stabilité thermique supérieure à celle de la PCrL soluble. L'énergie d'activation E_d élevée observée de la PCrL immobilisée peut être due au fait que le temps nécessaire pour le contact de PCrL et du substrat s'est prolongé en raison de l'immobilisation, ce qui a entraîné une diminution de l'activité catalytique. Un comportement similaire a été rapporté pour une protéase immobilisée sur des supports organiques et des supports hybrides (Mechri et al., 2022).

L' E_a de PCrL, PCrL-SA et PCrL-CaCO₃ indique que l'immobilisation a diminué l'énergie d'activation nécessaire à la formation du complexe enzyme-substrat (Figure 42). Les valeurs de ΔH_d , ΔG_d et ΔS_d étaient plus élevées pour la PCrL immobilisée que celles de la forme libre. Pour chaque support une légère diminution de ΔH_d accompagne l'augmentation de la température. Par conséquent, les valeurs de ΔH_d ont été réduites suite à une augmentation de la température, démontrant qu'une énergie minimale est nécessaire pour dénaturer la PCrL à haute température. Les grandes valeurs de ΔH_d prouvent la meilleure stabilité de la PCrL immobilisée. En conséquence, à température élevée, la PCrL libre et immobilisée ont subi des changements conformationnels conduisant à la réduction du changement d'enthalpie qui est plus importante pour chaque PCrL immobilisée par rapport à celui de la forme libre. Par conséquent, les résultats ont confirmé que les valeurs de ΔG_d pour la PCrL immobilisée étaient légèrement supérieures à celles de la PCrL libre. La stabilité de la protéine est directement corrélée aux valeurs ΔG , où des valeurs ΔG élevées et positives prouvent la non-spontanéité de la réaction de dénaturation thermique du biocatalyseur. Ainsi, la modification de la structure 3D de la PCrL est également complétée par une augmentation de la perturbation, du caractère aléatoire ou de l'entropie d'activation.

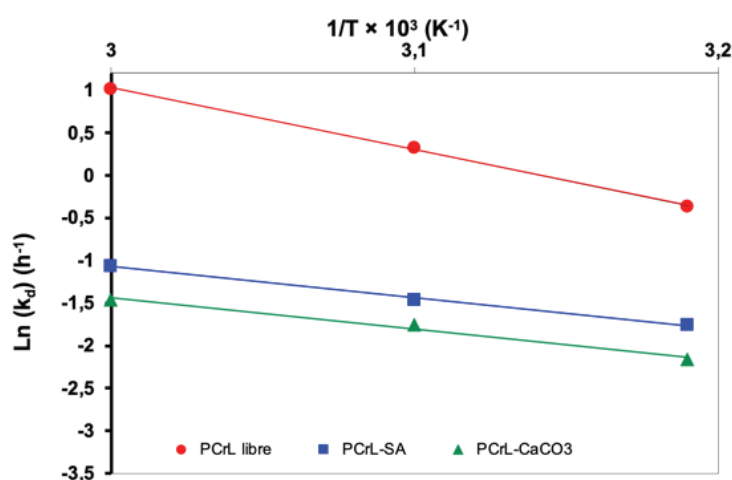


Figure 42 : Paramètres thermodynamiques de PCrL libre et immobilisée. Diagramme d'Arrhenius de $\ln(K_d)$ vs $1/\text{Température}$, pour calculer l'énergie d'activation (E_a).

Tableau 19 : Les paramètres cinétiques et thermodynamiques des PCrL libre et immobilisée.

Enzyme	Temp. (K)	$t_{1/2}$ (h)	k_d (h^{-1})	D (h)	ΔH_d ($kJ.mol^{-1}$)	ΔG_d ($J.mol^{-1}$)	ΔS ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)	E_d ($kJ.mol^{-1}$)	E_a ($kJ.mol^{-1}$)
PCrL libre	313	1	0.346	6.656	-16.80	2	-53.68	-7.28	-0.60
	323	0.5	0.693	3.323	-17.10	-1.12	-52.93		
	333	0.25	0.326	7.064	-17.41	-1.16	-52.27		
PCrL-SA	313	4	0.173	13.312	-13.16	-1.08	-42.04	-3.64	-0.03
	323	3	0.231	10.013	-13.46	2.85	-41.68		
	333	2	0.346	6.656	-13.77	1.16	-41.35		
PCrL-CaCO ₃	313	6	0.115	13.312	-13.18	-1.15	-42.10	-3.66	-0.033
	323	4	0.173	13.312	-13.48	-1.16	-41.73		
	333	3	0.231	10.013	-13.77	-1.16	-41.34		

6. Conclusion

La PCrL a été purifiée à homogénéité en deux étapes: précipitation au sulfate d'ammonium (70%) suivie d'une chromatographie d'échange d'anions sur colonne HiTrap™ Q-Sepharose FF. La PCrL a été purifiée 63 fois, avec un rendement d'environ 34% et une activité spécifique de 5 000 et 10 000 U/mg sur des émulsions d'huile d'olive et de TC8, respectivement. La lipase purifiée avait une masse moléculaire de 28 kDa estimée par sur SDS-PAGE. Son activité maximale a été détectée à 37°C et à pH 9 en présence de 2 mM CaCl₂. La PCrL présentait une régiosélectivité nette de la position *sn*-1 du substrat TG. Il s'agit vrai semblablement d'une lipase à sérine puisqu'elle est inhibée par l'Orlistat et les autres réactifs à sérine tel que le PMSF et le DFP.

La PCrL a montré une activité et une stabilité élevées en présence de solvants organiques non miscibles à l'eau, de tensioactifs et d'agents oxydants, et a montré une compatibilité considérable avec les détergents à lessive commerciaux. L'analyse des performances de lavage a révélé qu'elle pouvait éliminer efficacement les taches d'huile à partir des tissus. Ces propriétés intéressantes font de la PCrL un candidat potentiel prometteur pour les formulations détergentes.

L'immobilisation de la PCrL par adsorption physique sur CaCO₃ a amélioré sa thermostabilité. De plus, grâce à sa grande tolérance aux solvants organiques, la PCrL immobilisée a été utilisée comme biocatalyseur dans une réaction d'estérification pour la synthèse d'esters méthyliques en présence d'hexane. Un rendement de conversion de 65% a été obtenu après 12 h d'incubation à 40°C. L'immobilisation de la PCrL par encapsulation et encapsulation-adsorption a été réalisée moyennant trois supports, et ce en utilisant le Ca²⁺ comme agent gélifiant. Une thermostabilité remarquable a été obtenue pour la PCrL immobilisée sur alginate de sodium avec un rendement d'immobilisation de 94 à 100%. L'efficacité et la qualité de l'immobilisation ont été validées par la spectroscopie FTIR-ATR, la microscopie électronique à balayage (MEB) et la diffraction des rayons X (XRD).

***Chapitre III : Expressions hétérologues et caractérisation
de lipases microbiennes***

1. Introduction

L'objectif de ce chapitre fut donc le clonage et l'expression hétérologue du gène *lipCrL* codant la lipase PCrL de *Penicillium crustosum* Thom P22 et des gènes codant les activités lipases de *Lactiplantibacillus pentosus* S42 (Lip2) et de *Lactiplantibacillus plantarum* S62 (Lip1). Des travaux antérieures ont rapporté une expression de la lipase de *Lactobacillus rhamnosus* GG de 27 kDa lorsque l'enzyme est exprimée chez *E. coli* BL21(DE3) (Manasian *et al.*, 2020).

2. Amplification par PCR des gènes codant *Lip1*, *Lip2* et *PCrL*

Nous avons amplifié par PCR le gène codant *PCrL* et les gènes codant des activités lipases putatives chez LAB (*Lactiplantibacillus pentosus* S42 et *Lactiplantibacillus plantarum* S62), les résultats de la PCR illustrent l'amplification de gène codant la PCrL (*lipCrL*) de P22 (Figure 43A) avec une taille attendue de 800 pb, et également l'amplification des gènes codants (*Lip1* et *Lip2*) des activités lipases chez LAB S62 et S42 d'après les pistes 1, 2, respectivement, (Figure 43B) avec une taille attendue de 800 pb.

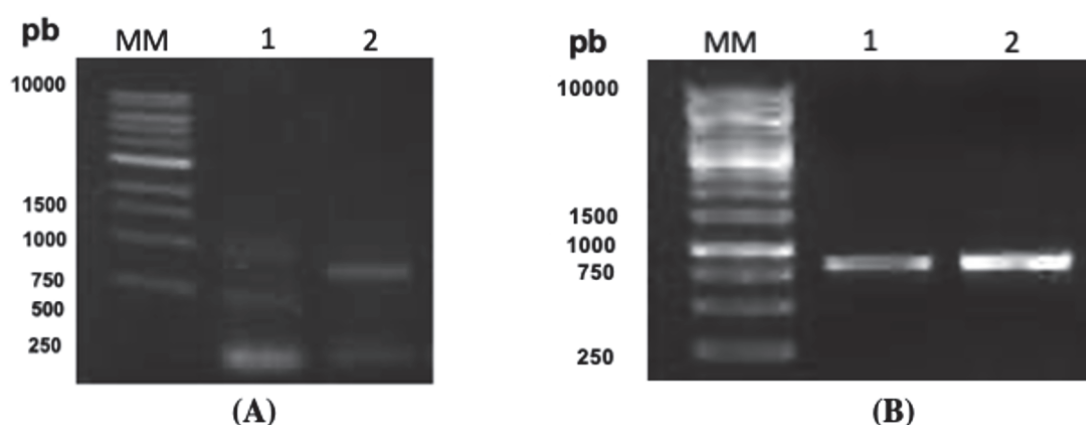


Figure 43 : Analyses par l'électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) des amplifications par PCR réalisées avec la Taq polymérase sur (A) l'ADNc de la PCrL (piste 2) et (B) sur l'ADN de la Lip1 (piste1) et Lip2 (piste2) de l'activité lipase chez S62 et S42, respectivement MM :marqueur de taille moléculaire.

3. Clonage des gènes codant *Lip1* et *Lip2*

Le clonage des produits PCR (*Lip1* et *Lip2*) est réalisé dans le vecteur pGEM-T Easy, puis les clones recombinants après transformation sont sélectionnés sur boîte de Petri sur un milieu LB contenant de l'ampicilline, et la présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonie à l'aide d'amorces situées de part et d'autre du site de clonage (021 Fwd et 369 Rev). Le criblage par PCR confirme l'insertion des inserts dans le vecteur en piste 3 (Figure 44) pour la construction *Lip1* (taille attendue 800 pb), en pistes 6, 7, 8, 9 et 10 pour *Lip2* (taille attendue 800 pb).

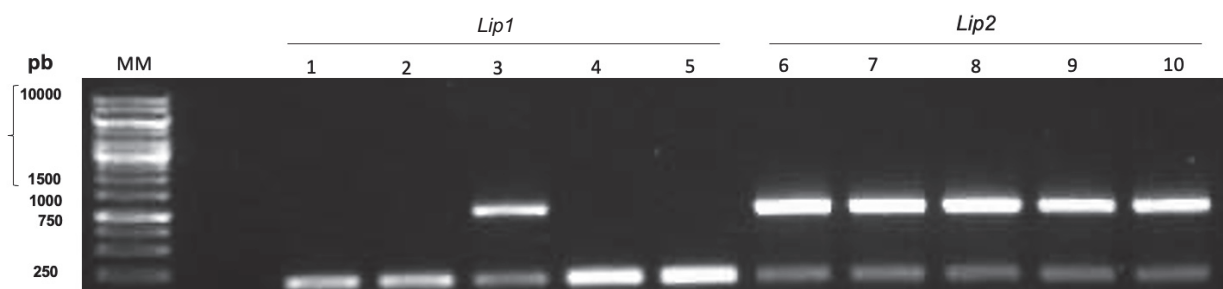


Figure 44 : Analyse sur gel d'agarose (0,8%) des produits PCR obtenus par la Taq polymérase sur des clones recombinants. MM : marqueur de taille moléculaire. Pistes 1 à 5 : clones recombinants pour la construction *Lip1* et Pistes 6 à 10 : clones recombinants pour la construction *Lip2*.

Un clone positif de chaque construction a été sélectionné et a été mis en culture. Les plasmides ont été purifiés par Midi-préparation et quantifiés. Le plasmide de la construction *Lip1* a été obtenu à une concentration de 264 ng/μL, celui de *Lip2* à 272 ng/μL. Le séquençage des constructions a montré que les clones obtenus correspondaient en tous points aux séquences désirées (Figure 45).

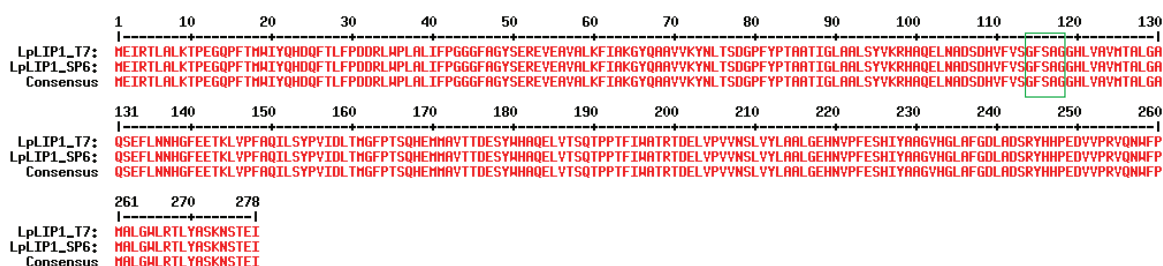


Figure 45 : Alignement de Lip 1 (LpLip1_T7) par rapport à la séquence du clone obtenu (LpLIP_SP6). Le motif de lipase GXSXG (cadre vert).

Le vecteur (pET28b) et l'insert *Lip1* ont été digérés par les enzymes de restriction adéquates *NcoI* et *SalI*, ligués puis utilisés pour la transformation de bactéries TOP10. La ligation a été effectuée dans un rapport (vecteur : insert) 1:1 avec un contrôle négatif 1:0 pendant une nuit.

Les clones recombinants après transformation sont sélectionnés sur boîte de Petri sur milieu LB contenant de la kanamycine (résistance conférée par le pET28b), et la présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonie. Les amorces utilisées sont situées sur le promoteur T7 (en amont du codon initiateur du pET28b) et sur *Lip1*. Le criblage par PCR confirme l'insertion d'insert dans le vecteur d'après la pistes 4 (Figure 46) pour la construction *Lip1* (taille attendue 800 pb).

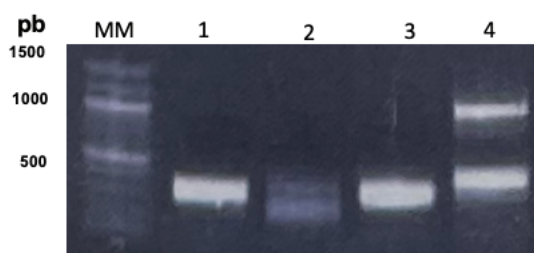


Figure 46 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) du criblage par PCR effectué avec la Taq polymérase des clones recombinants. MM : marqueur de taille moléculaire ; Piste 1: contrôle négatif d'amplification (bactéries transformées avec pET28b) ; Pistes 2 à 4 : clones recombinants pour la construction *Lip1*.

4. Transformation dans *E. coli* et expression :

L'expression, du gène *Lip1* codant la lipase Lip1, a été entreprise chez *E. coli* également pour produire cette lipase à grande échelle par transformation dans *E. coli* BL21(DE3). Ces bactéries ont été transformées par un vecteur vide comme contrôle négatif d'expression. Plusieurs conditions ont d'abord été optimisées afin de maximiser l'expression de la protéine. Tout d'abord à 30°C pour obtenir une quantité de protéine importante en limitant les risques de présence de la protéine d'intérêt dans les corps d'inclusion. L'induction à 4°C également a été réalisée pour ralentir le métabolisme et favoriser la solubilisation de la protéine et limiter la toxicité de la protéine d'intérêt pour la bactérie. L'expression de la protéine dans ces différentes conditions a été analysée sur culot bactérien par SDS-PAGE. La masse théorique attendue de l'enzyme est d'environ 34 kDa. Dans l'ensemble des conditions testées, nous avons obtenu une expression de la protéine Lip1, avec une plus forte expression à 30°C (Figure 47).

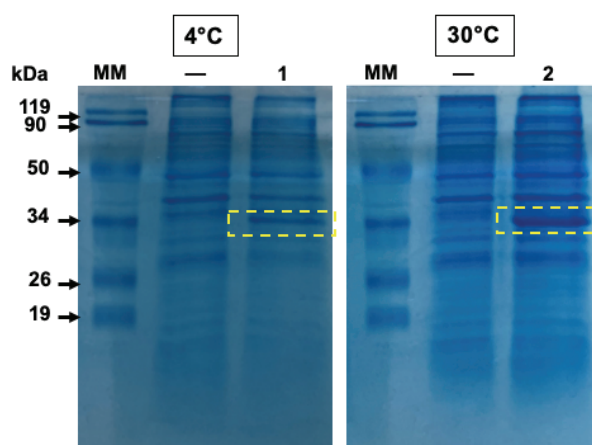


Figure 47 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante obtenue à partir de la construction pET28b-*Lip1*, pour différentes températures d'induction (30° et 4°C). Protéine Lip1 est matérialisée par un cadre jaune, Pistes 1 et 2 : clone BL21(DE3) transformé par la construction pET28b-*Lip1*; (-) : clone transformé par le plasmide pET28b-vide.

5. Modélisation moléculaire et analyse de la structure de la PCrL

5.1. Alignement de séquences

Nous avons analysé la séquence de la PCrL extraite de la séquence génomique de la souche *Penicillium crustosum* Thom P22 (Annexe 2) avec diverses lipases de *Penicillium* (3G7N lipase de *Penicillium expansum* (Bian *et al.*, 2010) et la lipase de *Penicillium expansum* SM3 (AG044976.1) (Suja *et al.*)), en utilisant le logiciel Psi-Blast (Figure 48).

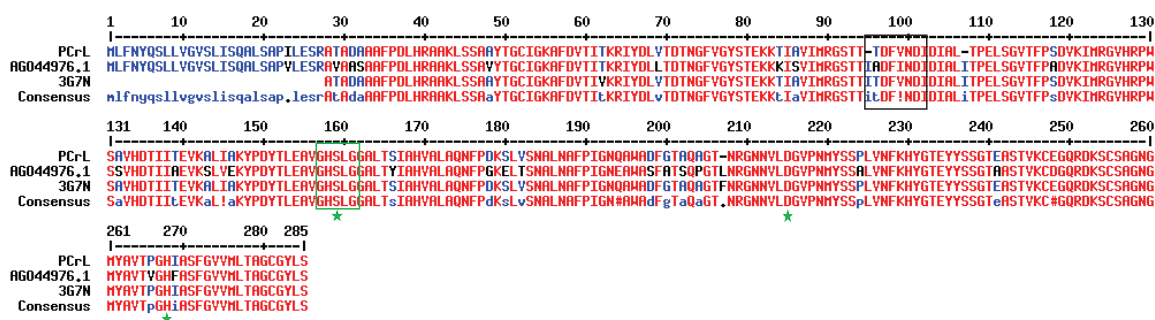


Figure 48 : Alignement multiple de séquences de la PCrL avec la lipase de *Penicillium expansum* (PDB : 3G7N) et *Penicillium expansum* SM3. Les résidus identiques dans toutes les séquences sont surlignés en rouge, la triade catalytique composée de Ser, Asp et His est indiquée par un astérisque. Les acides aminés encadrés en noir indiquent le couvercle de 8 acides aminés, les premiers 27 acides aminés représentent le peptide signal de l'enzyme.

La comparaison de cette séquence protéique de la PCrL montre des identités significatives avec les autres lipases décrites auparavant. En effet, la PCrL présente des % d'identité évalués à :

- 98% avec la lipase de *Penicillium expansum* (PDB : 3G7N) avec 3 acides aminés différents.
- 90% avec la lipase de *Penicillium expansum* SM3 (no. d'accension AG044976.1) avec 27 acides aminés de différents.

5.2. Etude structurale de la PCrL

La modélisation moléculaire de la PCrL a été réalisée avec le logiciel Alphafold (Figure 49). Le site actif de PCrL a été identifié comme étant S159, D215 et H268, en adoptant la numérotation à partir de la Met terminale (Figure 48). L'arrangement spatial de cette triade catalytique se superpose assez bien aux enzymes les plus proches, la lipase de *Penicillium expansum* (code PDB : 3G7N). S159 est le nucléophile qui doit être activé par les résidus d'histidine et d'acide aspartique dans un mécanisme commun à toutes les sérine hydrolases, et attaque le substrat pour former un intermédiaire acyl-enzyme covalent. Toutes les sérine hydrolases contiennent un trou oxyanion, généralement composé de deux atomes d'hydrogène amide de la chaîne principale, qui stabilise les intermédiaires tétraédriques qui se produisent à la fois pendant les étapes d'acylation et de désacylation comme décrit auparavant (Figure 13). Dans la structure PCrL actuelle, deux groupes amide dans les résidus 213 et 214 ont été identifiés comme étant le trou d'oxyanion sur la base de

la comparaison structurale avec la lipase de *Penicillium expansum* cristallisée en présence d'inhibiteur.

Les lipases sont caractérisées par leur activité considérablement accrue lorsqu'elles agissent à l'interface lipide-eau de la micelle, un phénomène appelé activation interfaciale. Cette propriété est le résultat de la présence d'un domaine couvercle qui couvre le site actif. Le domaine du couvercle est un court segment hélicoïdal ou une boucle de surface, et est souvent de nature chimique amphipathique. En s'exposant à la phase lipidique de l'interface lipide-eau, cette paupière amphipathique subit un changement conformationnel, s'éloigne de la sérine du site actif, transformant ainsi la forme « fermée » de l'enzyme en une forme « ouverte », avec le site actif maintenant accessible au solvant. Dans le même temps, une grande surface hydrophobe de la lipase est exposée, facilitant la liaison de la lipase aux substrats. Dans la structure actuelle de la PCrL, le domaine couvercle a été identifié comme les résidus d'hélice $\alpha 2/95-102$ coloré en rouge dans la figure 49.

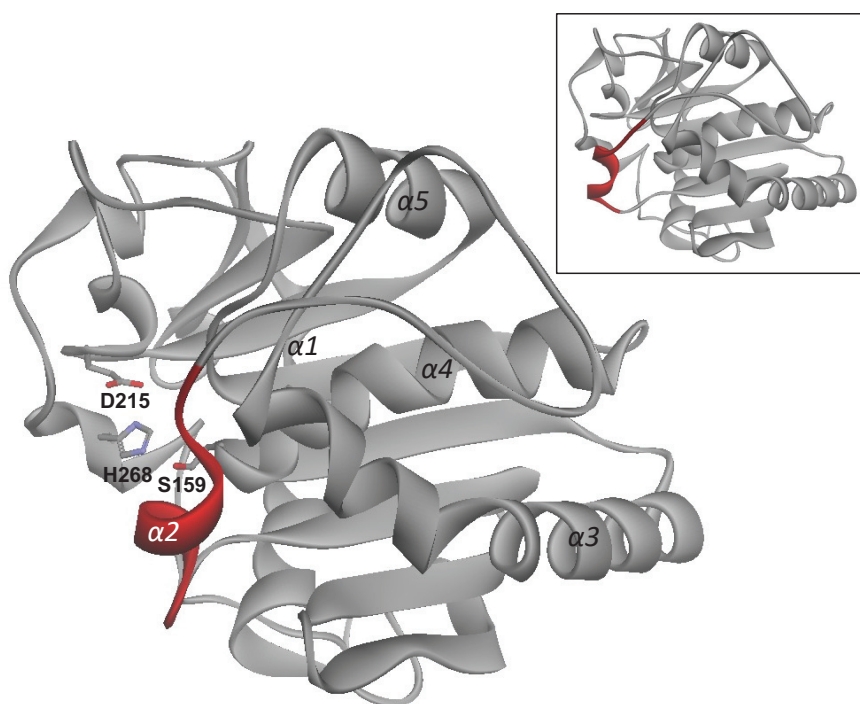


Figure 49 : La structure globale de la lipase de *Penicillium crustosum* (PCrL). Les hélices α sont étiquetées $\alpha 1$ à $\alpha 5$. Les résidus catalytiques S159, D215 et H268 sont représentés sous forme de bâtonnets CPK tandis que le couvercle (hélice $\alpha 2/95-102$) dans sa conformation ouverte est coloré en rouge. En médaillon : conformation fermée de la lipase PCrL. Le couvercle (hélice $\alpha 2/95-102$) dans sa conformation ouverte est coloré en rouge.

6. Conclusion

Lactiplantibacillus pentosus S42 et *Lactiplantibacillus plantarum* S62 font partie des souches probiotiques humaines les plus étudiées. Malgré cela, les bases moléculaires de nombreux mécanismes impliqués dans les interactions probiotique – hôte ne sont pas encore claires. Les protéines probiotiques excrétées dans le milieu extracellulaire pourraient avoir un effet sur l'interaction avec l'hôte.

D'après l'analyse de la séquence d'acides aminés, Lip1 appartient aux familles d'enzymes lipolytiques avec le motif (GX SXG) typique, où S est la sérine catalytique.

Cependant, l'étude des lipases originaires des bactéries lactiques à l'échelle moléculaire n'est pas bien décortiquée. Dans ce sens, nous avons voulu isoler par PCR les gènes codant les lipases de nos souches S42 et S62 afin de déterminer leurs séquences protéiques et de les exprimer chez *E. coli* pour les produire en grande quantité.

***Chapitre VI : Étude de l'activité antimicrobienne des
LAB contre les micro-organismes cibles***

1. Introduction

La détérioration des produits alimentaires par des bactéries et des champignons (*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* sérovars *Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Penicillium* sp.) est un problème mondial. Ils peuvent causer des dommages importants aux aliments (c'est-à-dire une odeur, un goût ou une apparence désagréable), ainsi que la formation de substances nocives pour la santé des consommateurs. Ils sont considérés comme un problème de santé grave, en particulier pour les patients jeunes, âgés et immunodéprimés (Chakchouk-Mtibaa *et al.*, 2014).

Les cas de listériose humaine sont principalement liés à des produits laitiers contaminés (Matto *et al.*, 2018), en raison de la tolérance de *L. monocytogenes* à leurs conditions de transformation et de stockage (Bucur *et al.*, 2018). Quinto *et al.*, (2020) ont démontré la capacité de survie d'*E. coli* dans le lait et les produits laitiers pendant plusieurs semaines. La farine de blé, provenant de différents pays, a été signalée comme étant contaminée par divers micro-organismes pathogènes et altérée, y compris par des bactéries (*E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) et des levures et des moisissures (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) (Magallanes López and Simsek, 2021), ce qui peut entraîner une perte de qualité et de sécurité des produits transformés à base de blé (Myoda *et al.*, 2019).

La feuille de pastilla, produit alimentaire traditionnel d'Afrique du Nord à base de farine de blé, est largement utilisée dans les préparations culinaires et pâtisseries. De plus, il y a une augmentation de la consommation de produits à base de blé mi-cuits (i.e. Feuille de Pastilla, Pizza, Tacos, Burger...), qui sont généralement emballés et conservés au réfrigérateur avant consommation. Pendant le stockage, ces produits alimentaires sont sujets au développement de micro-organismes pathogènes et d'altération (par exemple, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *E. coli*, *Salmonella* et *Staphylococcus aureus*), ce qui peut entraîner de graves maladies d'origine alimentaire pour le consommateur (Sabillón and Bianchini, 2016). Ces agents pathogènes sont principalement contrôlés avec des conservateurs chimiques (Militello *et al.*, 2011). Cependant, les conservateurs naturels sont de plus en plus demandés par les consommateurs comme alternative aux produits chimiques, en raison de leurs effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement (Carocho *et al.*, 2015).

Les bactéries lactiques (LAB) suscitent l'intérêt des industriels pour la bioconservation des aliments, en raison de leur statut GRAS et de leur activité antimicrobienne (Djadouni and Kihal, 2012). Ils sont capables de produire divers métabolites antimicrobiens, notamment des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyle, de la reutérine, du dioxyde de carbone et des bactériocines (Dortu and Thonart, 2009). Ils se sont avérés efficaces pour conserver les aliments

et améliorer la qualité nutritionnelle d'une variété de produits alimentaires fermentés (Sameh *et al.*, 2016; Dinev *et al.*, 2018). L'utilisation de souches de LAB probiotiques sélectionnées et/ou de leurs métabolites peut assurer l'inhibition des micro-organismes pathogènes et d'altération, et également améliorer les propriétés fonctionnelles des produits alimentaires.

L'objectif principal de ce travail est de caractériser l'activité antimicrobienne de certaines souches de LAB (*Levilactobacillus brevis* S27, *Lactiplantibacillus pentosus* S42 et *Lactiplantibacillus plantarum* S62) isolées à partir d'olive fermentée traditionnelle et d'évaluer leur effet bioconservateur sur le lait et la feuille de Pastilla contre certains microorganismes à l'origine d'altérations des aliments.

2. Activité antimicrobienne de souches LAB

Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches LAB (*Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) contre les bactéries (*L. innocua* et *E. coli*) et la levure (*R. glutinis*) sont rapportés dans le tableau 20. Les valeurs de la zone d'inhibition (ZI) variaient de 27,33 à 29,83 mm, de 18,33 à 19,83 mm et de 14,33 à 15,66 mm contre *R. glutinis*, *L. innocua* et *E. coli*, respectivement. Les valeurs de ZI obtenues contre *R. glutinis* ont été supérieures à celles obtenues contre *L. innocua* et *E. coli*. Parmi les souches LAB, *Lb. pentosus* S42, a montré la valeur significativement la plus basse ($P < 0,05$) contre *R. glutinis*, tandis que les autres souches de LAB (*Lb. brevis* S27 et *Lb. plantarum* S62) ont présenté des valeurs ZI plus élevées. De plus, aucune différence significative ($P < 0,05$) n'a été observée entre les trois souches de LAB contre chaque souches cibles.

Les trois souches de LAB présentent une activité antifongique supérieure à l'activité antibactérienne. Cet activité antifongique élevée obtenue dans ces souches LAB peut être due à leur isolement initial en tant que souches antifongiques potentielles contre *Candida pelliculosa* (Abouloifa *et al.*, 2020), et elles ont démontré une activité antifongique importante contre les levures pathogènes et d'altération (*Candida pelliculosa* et *R. glutinis*) et des moisissures (*Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus sp.*) (Abouloifa *et al.*, 2022). Les activités antibactériennes et antifongiques importantes, obtenues avec les trois souches probiotiques LAB indiquent leur utilisation possible dans la transformation des aliments en tant que bioconservateur alimentaire.

Tableau 20 : Valeurs de la zone d'inhibition (en mm) des souches LAB obtenues contre *R. glutinis*, *E. coli* et *L. innocua* avec la méthode de superposition.

Souches LAB	zone d'inhibition (mm)		
	<i>R. glutinis</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
<i>Lb. brevis</i> S27	29,16 ^a ±0.57	14,33 ^a ±1.04	18,66 ^a ±2.56
<i>Lb. pentosus</i> S42	27,33 ^b ±1.25	15,66 ^a ±0.28	18,33 ^a ±1.89
<i>Lb. plantarum</i> S62	29,83 ^a ±2.25	15,16 ^a ±0.57	19,83 ^a ±2.25

Les valeurs sont la moyenne ± l'erreur standard des triplicats

^{a-b} Les moyennes dans la même colonne de chaque souche cible avec différentes lettres minuscules différaient significativement ($P < 0,05$).

3. Activité antimicrobienne des surnageants de souches LAB

Les valeurs ZI des surnageants des souches LAB, obtenues contre les souches cibles, sont rapportées dans le tableau 21. Le CFS brut (pH 4,2) a montré la même tendance des valeurs ZI contre les cibles que celle obtenue avec les cultures de souches LAB (Tableau 20), mais avec des valeurs plus faibles. Par conséquent, le CFS de toutes les souches de LAB a montré des valeurs ZI de 26,33 à 28,83 mm, 14,16 à 16,33 mm et 10 à 12,16 mm contre *R. glutinis*, *L. innocua* et *E. coli*, respectivement. Tous les CFS des trois souches LAB ont démontré une activité antifongique supérieure à leur activité antibactérienne

Les valeurs ZI obtenues avec NCFS (SFC neutralisé à pH 7) contre *L. innocua* et *R. glutinis* étaient respectivement de 13,16-14,50 mm et 17,83-20,50 mm, alors qu'aucune inhibition n'a été obtenue contre *E. coli*. Les mêmes résultats ont été observée dans des NCFS des souches LAB traitées avec la catalase. De plus, aucune inhibition n'a été détectée dans le CFS des trois souches de LAB traitées avec la protéinase-K. Cependant, des molécules bioactives impliquées dans l'inhibition de *L. innocua* et *R. glutinis* sont des natures protéiques

La souche *Lb. plantarum* S62 a montré des valeurs ZI significativement plus élevées ($P < 0,05$) avec son NCFS (pH7) contre *R. glutinis* et son CFS (pH4,2) contre *L. innocua*, alors qu'aucune différence significative ($P < 0,05$) n'a été observée entre les trois souches de LAB en termes de valeurs ZI obtenues avec les autres surnageants (NCFS traité à la catalase et NCFS traité à la protéinase-K).

La souche *Lb. plantarum* S62 a montré l'effet inhibiteur le plus élevé contre *R. glutinis* et *L. innocua*, et les valeurs ZI les plus élevées ont été obtenues avec son CFS brut, suivi de celui obtenu avec le CFS neutralisé (NCFS), et enfin de celui obtenu avec le NCFS traité à la catalase. Il convient de noter qu'aucune activité antibactérienne ou antifongique n'a été obtenue avec le NCFS traité à la protéinase-K. Ces résultats indiquent la diversité des biomolécules impliquées dans l'activité antimicrobienne de *Lb. plantarum* S62, qui comprennent des acides organiques, du

peroxyde d'hydrogène et des composés protéiniques. Ces résultats sont concordants et confirment ceux obtenus par Abouloifa *et al.*, (2021).

Tableau 21 : Valeurs de la zone d'inhibition (mm) des surnageants (CFS, NCFS, NCFS traité à la catalase et NCFS traité à la protéinase-K) des souches LAB obtenues contre *R. glutinis*, *E. coli* et *L. innocua*.

Souches LAB	Zone d'inhibition (mm)											
	<i>R. glutinis</i>				<i>E. coli</i>				<i>L. innocua</i>			
	pH4.2	pH7	Cat.	Prot-K	pH4.2	pH7	Cat.	Prot-K	pH4.2	pH7	Cat.	Prot-K
<i>Lb. brevis</i> S27	26,33 ^{a±} 1,04	17,83 ^{b±} 2,25	18,33 ^{a±} 0,76	ND	10,00 ^{a±} 2,50	ND	ND	ND	14,16 ^{c±} 1,25	13,16 ^{a±} 2,25	13,00 ^{a±} 1,00	ND
<i>Lb. pentosus</i> S42	26,66 ^{a±} 1,75	18,16 ^{b±} 1,75	18,83 ^{a±} 0,57	ND	12,16 ^{a±} 2,08	ND	ND	ND	15,33 ^{b±} 1,25	13,66 ^{a±} 1,15	13,66 ^{a±} 1,04	ND
<i>Lb. plantarum</i> S62	28,83 ^{a±} 1,52	20,50 ^{a±} 2,78	20,50 ^{a±} 2,00	ND	11,83 ^{a±} 1,60	ND	ND	ND	16,33 ^{a±} 0,76	14,50 ^{a±} 1,50	14,50 ^{a±} 0,50	ND

Les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'erreur standard des triplicats

^{a-c} Les moyennes dans la même colonne de chaque paramètre avec différentes lettres minuscules diffèrent significativement ($P < 0,05$).

pH 4,2, surnageant acellulaire (CFS) ; pH7, CFS neutralisé (NCFS); Cat., NCFS traité avec de la catalase; Prot-K, NCFS traité avec la catalase et la protéinase K ; ND : non détecté.

4. Activité antimicrobienne des protéines précipitées des souches LAB

Le précipité de protéines des trois souches LAB a montré des plages de valeurs ZI de 11,83-13,16 mm et 18,33-20,66 mm contre *L. innocua* et *R. glutinis*, respectivement ; Alors que les valeurs ZI obtenues avec les témoins positifs a été de 12 mm avec la nisine contre *L. innocua* et de 22,3 mm avec le cycloheximide contre *R. glutinis* (Tableau 22). Aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs ZI obtenues avec les trois souches LAB contre *L. innocua*. Cependant, *Lb. plantarum* S62 a montré la valeur ZI significativement ($P < 0,05$) la plus élevée contre *R. glutinis*, qui n'est pas significativement ($P < 0,05$) différente de celle obtenue avec le cycloheximide (0,01 mg/mL), utilisé comme contrôle positif.

Tableau 22 : Valeurs de la zone d'inhibition des protéines précipitées des souches LAB obtenues contre *L. innocua* et *R. glutinis*.

Souches de LAB	Zone d'inhibition (mm)	
	<i>L. innocua</i>	<i>R. glutinis</i>
<i>Lb. brevis</i> S27	13,16 ^{a±} 1,25	18,50 ^{b±} 1,00
<i>Lb. pentosus</i> S42	11,83 ^{a±} 1,25	18,33 ^{b±} 1,25
<i>Lb. plantarum</i> S62	12,33 ^{a±} 1,04	20,66 ^{ab±} 1,25
Nisin (1 mg/mL)	12,00 ^{a±} 0,86	NT
Cycloheximide (0.01 mg/mL)	NT	22,33 ^{a±} 0,28

Les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'erreur standard des triplicats

^{a-b} Les moyennes dans la même colonne de chaque souche cible avec différentes lettres minuscules diffèrent significativement ($P < 0,05$).

NT : non testé.

5. Analyse par SDS-PAGE du précipité de protéines LAB

Le SDS-PAGE des protéines précipitées du CFS de cultures de souches LAB (*Lb. brevis*, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) est reporté dans la figure 50. Les résultats ont montré que parmi les quatre bandes peptidiques obtenues, deux bandes d'environ 42 et 56 kDa sont communes aux trois souches LAB (S27, S42 et S62) et deux bandes supplémentaires de 46 et 89 kDa sont observées en S42 et S27, respectivement.

Les composés protéiques obtenus à partir des trois souches LAB ont été analysés par SDS-PAGE et les résultats ont montré la présence de quatre bandes peptidiques de 42, 46, 56 et 89 kDa, qui pourraient être impliquées dans l'inhibition de *L. innocua* et *R. glutinis*. Leurs poids moléculaires relativement élevés (>30 kDa) indiquent que ces peptides peuvent être comparés aux bactériocines des classes III et IV (Zacharof and Lovitt, 2012). Des peptides de poids moléculaire de 45 kDa, 55 kDa et 122 kDa obtenus à partir de souches LAB, qui sont proches de celui obtenu dans ce travail, ont été actifs contre *L. monocytogenes* et *L. innocua* (Lash *et al.*, 2005; Zafarullah *et al.*, 2019; Heidari *et al.*, 2021). L'activité antibactérienne a été démontrée par ces peptides (protéase extracellulaire) de 89 kDa, obtenus à partir d'un champignon *Xylaria psidii* KT30 (Indarmawan *et al.*, 2016), alors que l'activité antifongique a été obtenue avec des peptides de poids moléculaire de 45 kDa et 56 kDa (Atanassova *et al.*, 2003; Di Biase *et al.*, 2014) et avec un peptide de 42 kDa identifié comme chitinase de *Tricothema atroviride* (Harighi *et al.*, 2007).

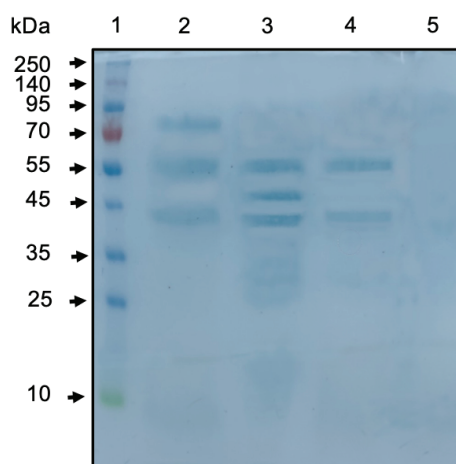


Figure 50 : Analyse SDS-PAGE du précipité de protéines obtenu à partir de souches LAB. Piste 1 : marqueurs de masse moléculaire ; Pistes 2, 3 et 4 : les protéines précipitent à partir de *Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62, respectivement ; Piste 5 : protéines précipitées à partir de bouillon MRS stérile.

6. CMI du CFS concentré

Les valeurs de CMI du 10×CFS obtenues pour les trois souches LAB (*Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42, *Lb. plantarum* S62) se sont révélées être de 4,5% (v/v) contre *L. innocua* et *R. glutinis*, et 5% (v/v) contre *E. coli*. Les valeurs de CMI obtenues avec le 10×CFS indiquent l'effet inhibiteur élevé des trois LAB contre *R. glutinis* (levure) et *L. innocua* (bactéries Gram-positives) que *E. coli* (bactéries Gram-négatives).

7. Activité antimicrobienne des souches LAB en milieu liquide

L'effet des surnageants (10×CFS et 10×NCFS) et du précipité protéique des trois souches LAB sur la croissance des micro-organismes cibles (*L. innocua*, *E. coli* et *R. glutinis*) a été évalué dans une microplaque à 96 puits pendant 10 h, et les résultats sont rapportés sur la figure 51.

Les concentrations des surnageants (10×CFS, 10×NCFS) et du précipité de protéines testés ont été de 0,45% (v/v) contre *R. glutinis* et *L. innocua*, et de 0,5% (v/v) contre *E. coli*. La gentamicine (0,1 mg/mL) et le cycloheximide (0,01 mg/mL) ont été utilisés comme témoins positifs contre les bactéries (*L. innocua* et *E. coli*) et *R. glutinis*, respectivement. Les surnageants (10×CFS, 10×NCFS) et les protéines précipitées et les témoins positifs (gentamicine et cycloheximide) ont été ajoutés aux cultures de cibles après 7 h d'incubation et la croissance de la biomasse a été mesurée après 3 h d'ajout des agents antimicrobiens. Le contrôle négatif a contenu la culture de cibles sans ajout d'antimicrobien.

Les résultats ont montré que les 10×CFS à 0,45% des trois souches LAB ont permis une réduction d'environ 50% de la croissance de la biomasse de *L. innocua*, ce qui est presque similaire à celle obtenue avec le témoin positif (gentamicine, 0,1 mg/mL), en comparaison avec le témoin négatif, tandis qu'une réduction d'environ 40% de l'inhibition de la croissance de la biomasse a été observée avec 10×NCFS et les protéines précipitées (Figure 51 : a1, a2 et a3). Puis les 10×CFS à 0,5% des trois LAB ont réduit la croissance de la biomasse d'environ 50%, Cependant, aucune inhibition significative n'a été observée avec 0,5% de 10×NCFS et les protéines précipitées, par rapport au contrôle négatif (Figure 51 : b1, b2 et b3). Contre *R. glutinis*, 0,45% du 10x CFS a entraîné une réduction de 50% de la croissance de la biomasse par rapport au témoin négatif. Cependant, en présence de 0,45% de 10×NCFS et de protéines précipitées, *R. glutinis* a montré une croissance continue de la biomasse, mais à un niveau inférieur à celui observé dans le contrôle négatif (Figure 51 : c1, c2 et c3).

La plus forte inhibition de la croissance de la biomasse de ces agents pathogènes a été obtenue avec 10×CFS, suivie de celle obtenue avec 10×NCFS, et enfin de celle obtenue avec NCFS traité à la protéinase K. La forte inhibition obtenue avec 10×CFS peut être due à l'augmentation de la

concentration des composés antimicrobiens produits par les souches LAB. La capacité des surnageants (10×CFS, 10×NCFS et NCFS traités à la protéinase-K) de *Lb. plantarum* S62 dans la réduction de la croissance de la biomasse de *L. innocua* et *R. glutinis*, cette capacité représente à un intérêt dans la transformation des aliments, car ils peuvent être utilisés comme agent protecteur et curatif naturel contre ces agents pathogènes.

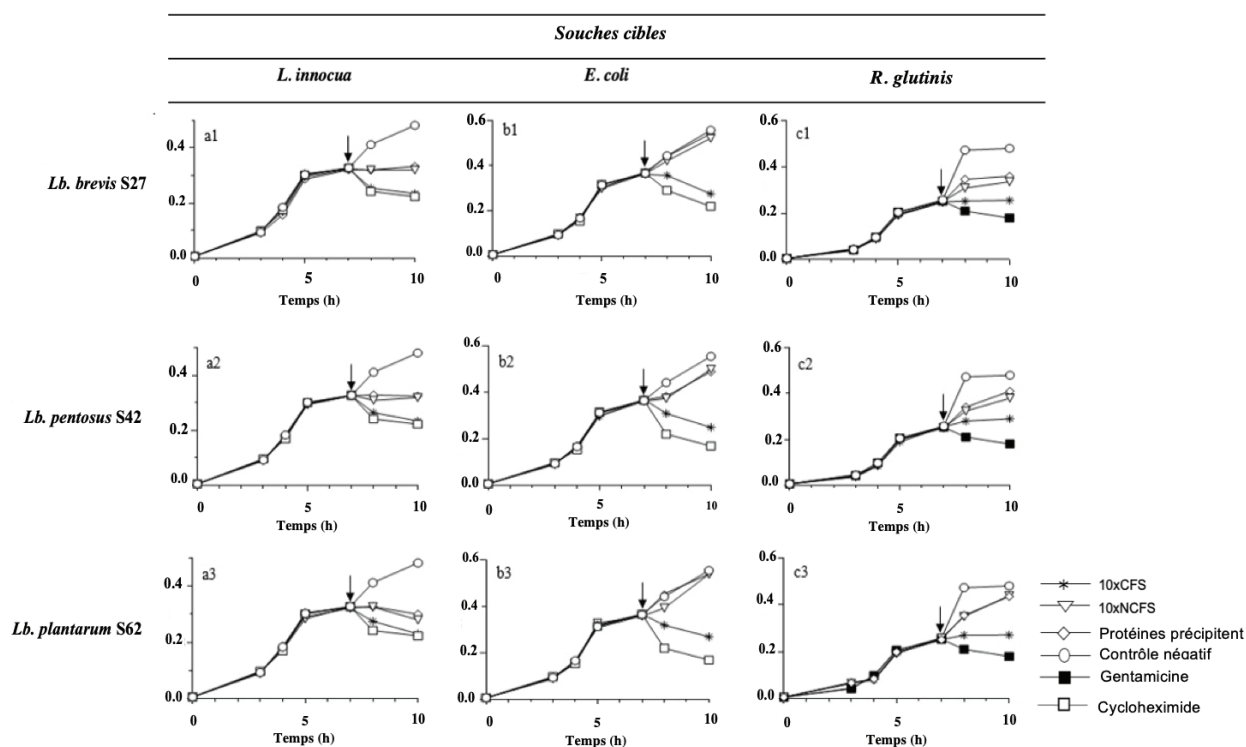


Figure 51 : Dosage quantitatif de l'activité antimicrobienne des souches LAB.

a1 : *Lb. brevis* S27 contre *L. innocua*. a2 : *Lb. pentosus* 42 contre *L. innocua*. a3 *Lb. plantarum* S62 contre *L. innocua*.

b1 : *Lb. brevis* S27 contre *E. coli*. b2 : *Lb. pentosus* 42 contre *E. coli*. b3 : *Lb. plantarum* S62 contre *E. coli*.

c1 : *Lb. brevis* S27 contre *R. glutinis*. c2 : *Lb. pentosus* 42 contre *R. glutinis*. c3 : *Lb. plantarum* S62 contre *R. glutinis*.

↓ La flèche indique l'ajout de CMI

8. Bioconservation du lait

L'effet inhibiteur de MIC (0,45% et 0,5%) de 10×CFS de *Lb. plantarum* S62 sur la croissance de *L. innocua* et *E. coli*, respectivement, a été évaluée dans le lait UHT et les résultats sont rapportés dans la figure 52. Les résultats ont montré une réduction importante de la croissance de *L. innocua* et *E. coli* dans le lait avec des valeurs de réduction finale de 4 Log UFC/mL et 3 Log UFC/mL, respectivement, par rapport aux témoins.

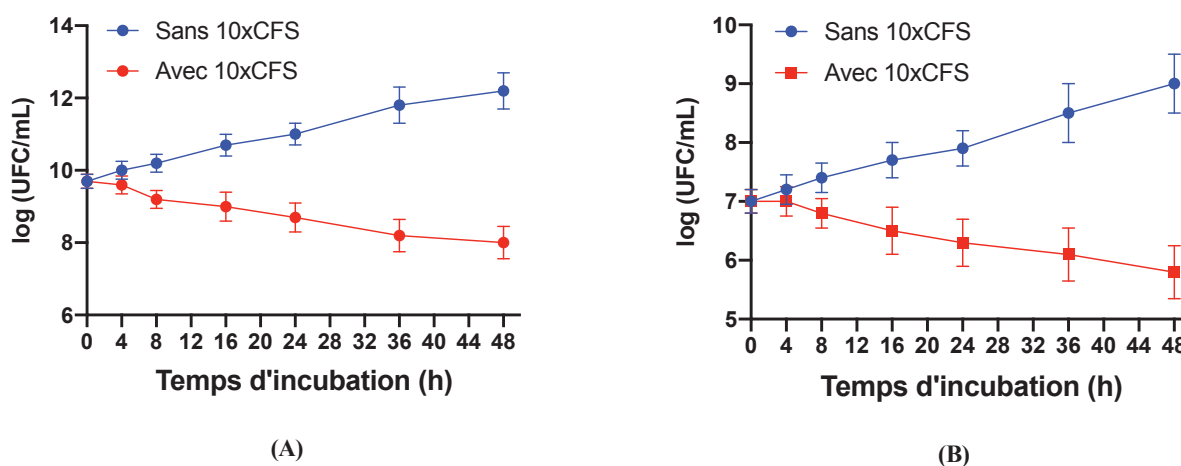


Figure 52 : Croissance de la biomasse (UFC/mL) de *L. innocua* (a) et *E. coli* (b) dans le lait pendant 48 h d'incubation à 37°C en l'absence et en présence de 10xCFS de *Lb. Plantarum* S62.

9. Bioconservation de la feuille de Pastilla

L'effet antifongique des surnageants (CFS, 10×CFS, NCFS et 10×NCFS) de *Lb. plantarum* S62 a été évalué sur des feuilles de Pastilla contaminées par *R. glutinis* et maintenues à température ambiante et les résultats sont rapportés dans le tableau 23 et la figure 53. Les résultats ont montré une inhibition totale (100%) de *R. glutinis* dans des feuilles de Pastilla traitées avec le CFS, 10×CFS, 10×NCFS et cycloheximide (témoin positif). Cependant, en présence de NCFS, une croissance de la biomasse de *R. glutinis* a été observée dans avec un diamètre de zone de croissance de 7,5 mm, en revanche 10 mm obtenus avec de l'eau distillée (témoin négatif) après 3 jours d'incubation. Cependant, les surnageants concentrés (10×CFS et 10×NCFS) ont conduit au brunissement des échantillons de feuilles de Pastilla (Figure 53). Le CFS, 10×CFS et 10×NCFS de *Lb. plantarum* S62, sont efficaces pour protéger la feuille de Pastilla de la croissance de *R. glutinis*. Des travaux antérieurs ont rapporté les effets inhibiteurs des LAB contre les levures pathogènes (Afzali *et al.*, 2020). *Lb. plantarum* S62 a démontré son efficacité comme agent bio-protecteur contre *R. glutinis* qui est considéré comme pathogène opportuniste émergent (Wirth and Goldani, 2012).

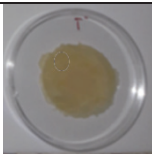
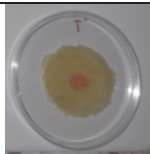
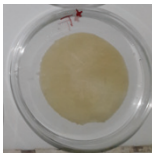
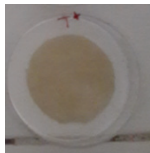
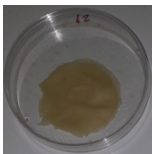
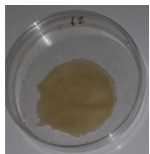
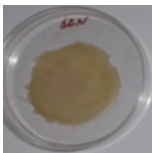
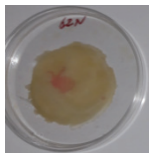
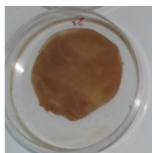
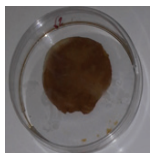
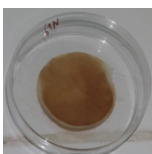
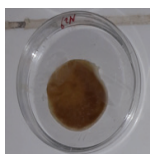
Treatment	Observation	
	Day 0	Day 3
Ensemencement avec <i>R. glutinis</i> et ajout d'eau distillée		
Inoculation avec <i>R. glutinis</i> et addition de cycloheximide		
Inoculation avec <i>R. glutinis</i> et ajout de CFS		
Inoculation avec <i>R. glutinis</i> et ajout de NCFS		
Inoculation avec <i>R. glutinis</i> et ajout de 10×CFS		
Inoculation avec <i>R. glutinis</i> et addition de 10×NCFS		

Figure 53 : Biopréservation de la feuille de Pastilla contre *R. glutinis* en utilisant CFS, NCFS, 10×CFS et 10×NCFS de *Lb. plantarum* S62.

Tableau 23 : Zone de croissance de *R. glutinis* sur feuille de Pastilla traditionnelle en présence de différents surnageants de *Lb. plantarum* S62.

	CFS	10×CFS	NCFS	10×NCFS	H ₂ O	Cycloheximide
Diamètre de la zone de croissance (mm)	ND	ND	7,50±0,00	ND	10±0,50	ND

Les valeurs sont la moyenne ± l'erreur standard des triples exemplaires.

ND : aucune croissance détectée, CFS : surnageant acellulaire, 10×CFS : CFS concentré 10 fois, NCFS : CFS neutralisé, 10×NCFS : CFS neutralisé concentré 10 fois, H₂O : eau distillée.

10. Conclusion

Dans ce chapitre, trois souches de LAB (*Lb. plantarum* S62, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. brevis* S27), obtenues à partir d'olives vertes marocaines fermentées traditionnelles, ont été étudiées pour leurs activités antimicrobiennes dans les produits alimentaires (lait et feuille de Pastilla). Les souches LAB ont démontré une activité antifongique contre *R. glutinis* et un effet antibactérien contre *L. innocua* et *E. coli*. Parmi les souches de LAB étudiées, *Lb. plantarum* S62 et son 10×CFS

ont présenté l'activité antibactérienne et antifongique la plus élevée et ont démontré des effets protecteurs importants contre les agents pathogènes et les micro-organismes de détérioration dans le lait et la feuille de Pastilla, respectivement. Ces résultats indiquent la possibilité d'utiliser *Lb. plantarum* S62, pour développer un bioconservateur alimentaire.

Conclusion générale

La biotechnologie est l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants et à leurs composants pour la production de connaissances, de biens et de services. Les enzymes ou biocatalyseurs tirent parti de l'essor de la biotechnologie. Grâce aux progrès importants qui ont jalonné les quarante dernières années, l'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a augmenté depuis les années 1980. L'exploitation de ces enzymes a permis l'élaboration des produits à haute valeur ajoutée qui ont également révolutionné la biotechnologie par leur exploitation dans différentes applications en cultivant un microorganisme formant l'enzyme souhaitée dans le cadre de son propre métabolisme, en lui offrant des conditions de développement optimales afin qu'il en produise de grandes quantités. Des enzymes d'origine classique et ordinaire sont fragiles, peu résistantes et donc peu adaptées, d'où la recherche d'enzymes de substitution plus robustes (température, pH et pression), comme celles issues des microorganismes extrêmophiles que l'on retrouve dans des environnements extrêmes, tels que les coproduits oléicoles qui vivent dans des milieux proches de ceux des procédés industriels.

Les coproduits oléicoles (margines, grignons et saumures d'olives) d'une unité de trituration d'olives et d'une conserverie d'olives de table de la région orientale du Maroc ont suscité notre intérêt afin d'isoler des microorganismes indigènes, susceptibles de produire des hydrolases, en particulier des lipases, utilisables dans divers domaines biotechnologiques. Ainsi, nous avons isolé 88 isolats qui ont montré une activité lipolytique à partir des trois échantillons prélevés. Parmi eux, 48 isolats proviennent de margines (54.6%), 30 isolats sont issus du grignon (34,1%) et 10 isolats dérivent des saumures d'olives (11.4%). Parmi les isolats lipolytiques, huit isolats sélectionnés ont montré des halos fluorescents les plus intenses, 3 isolats proviennent de margines (P22, P74 et G40), 3 sont isolés à partir de grignons (B37, B38 et B53) et 2 isolats proviennent de saumures (G58 et G110). Ces isolats ont fait l'objet d'une identification phénotypiques basée sur une étude macroscopique et des études microscopiques. D'après le suivi de production lipase pour les souches retenues, la souche *Penicillium sp* P22 montre le taux le plus élevé avec 60 U/mL après 6 jours d'incubation, puis la souche P22 a été identifiée comme *Penicillium crustosum* Thom P22. Ces résultats obtenus consolident l'hypothèse du travail et mettent en évidence:

- ✚ La richesse des coproduits oléicoles en microorganismes producteurs d'enzymes lipases à intérêt biotechnologique.

- ✚ La capacité des microorganismes indigènes à produire des lipases performantes, douées de caractéristiques biochimiques et fonctionnelles appropriées aux applications industrielles, notamment dans la détergence et la synthèse organique.

La lipase de la souche P22 de *Penicillium crustosum* Thom a été purifiée 63 fois jusqu'à homogénéité en utilisant une précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie sur une colonne Q-Sepharose Fast Flow, avec un rendement total de 34% et une activité spécifique de 10000 U/mg en utilisant TC8 comme substrat à pH9 et 37°C et sa masse moléculaire a été estimée à environ 28 kDa par SDS-PAGE. Les 20 résidus d'acides aminés NH₂-terminaux ont montré un haut degré d'homologie avec ceux d'autres lipases de *Penicillium*. La PCrL a présenté une régiosélectivité claire envers la position *sn*-1 des triglycérides estérifiés avec de l'acide α -éléostéarique à la position *sn*-1/3. La PCrL a montré une large spécificité aux substrats naturels, avec une préférence aux TG à chaînes moyennes

Ensuite, l'étude des effets de la température, du pH, des ions métalliques, des solvants organiques et des sels biliaires sur la PCrL purifiée a été réalisée en utilisant des conditions de dosage standard. Le pH optimal pour l'activité a été de 9,0 et l'enzyme a été stable entre pH 6 et pH 10. La température optimale s'est avérée être de 37°C et l'enzyme était stable entre 20°C et 37°C. Les ions métalliques tels que Ca²⁺ et Mn²⁺ augmentent l'activité PCrL, tandis qu'une inhibition significative a été observée avec Cu²⁺, Fe²⁺ et Zn²⁺. De plus, cette lipase est inhibée en présence de faibles concentrations de sel biliaire (NaTDC) et les ions calcium ne semblent pas nécessaires à son activité. Cette lipase a été inhibée par l'Orlistat, un inhibiteur connu de la lipase digestive, ce qui a confirmé qu'il s'agit d'une enzyme à sérine. En conséquence, les résultats obtenus indiquent que la PCrL possède des caractéristiques biochimiques adaptées aux applications industrielles, en particulier un pH alcalin et une stabilité à la température. Par rapport à Palatase® et Lipolase®, PCrL a montré une efficacité catalytique considérable, une tolérance élevée aux solvants organiques, ainsi qu'une stabilité et une compatibilité exceptionnelles avec une large gamme de détergents à lessive commercialisés. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que la PCrL possède des propriétés prometteuses qui pourraient conduire à son utilisation dans les formulations de détergents à lessive. De plus, elle est complètement compatible avec le détergent solide commercial Ariel®. En effet, des taches grasses n'ont été complètement enlevées, à partir d'un tissu en coton, que lorsque la PCrL a été additionnée au milieu de lavage. En se basant sur ces propriétés nous constatons que PCrL pourrait être incorporée efficacement dans les formulations détergentes commerciales, en tant que bio-additif.

Dans un autre volet, la stabilité aux solvants organiques est la caractéristique clé pour une lipase destinée au domaine de la synthèse organique, telle que la synthèse du biodiesel. En effet, nous

avons montré dans ce travail que la PCrL a conservé des activités résiduelles de différents niveaux, après leur incubation avec quelques solvants organiques polaires et apolaires, à de concentration de 25% (v/v). En se basant sur ces propriétés nous avons testé le pouvoir de la PCrL à convertir les acides oléiques et le méthanol en esters, via une réaction d'estérification en présence de l'hexane. Mais avant de procéder aux réactions de synthèse, il est préférable que l'enzyme soit immobilisée sur un support lui conférant une rigidité lorsqu'elle sera exposée aux conditions défavorables des milieux conventionnels. Outre cette rigidité qui protège l'enzyme contre la dénaturation, l'immobilisation permet la récupération de l'enzyme et sa réutilisabilité dans des cycles successives.

La technique d'immobilisation pour laquelle nous avons opté dans ce travail est la technique d'adsorption physique sur le CaCO_3 et Celite 545, les résultats de rendement d'immobilisation sont de 90% avec CaCO_3 , en revanche un faible rendement de 15% avec Celite 545 est obtenu puis nous avons utilisé la technique d'encapsulation et adsorption -encapsulation. Deux méthodes d'immobilisation sont adoptées, l'encapsulation moyennant les supports organiques (alginate de sodium) et l'encapsulation-adsorption moyennant les supports hybrides (organiques-inorganiques : le chitosane et zéolite), nous avons obtenu un rendement de 100% lorsque l'alginate de sodium était couplé avec du zéolite et un rendement d'immobilisation de 94 et 96% a été observé avec les support organiques d'alginate de sodium et d'alginate de sodium avec chitosane. L'efficacité de l'immobilisation a été validée par la spectroscopie infrarouge, la diffraction des rayons X et la microscopie électronique à balayage.

Fait intéressant, la PCrL immobilisée a montré plus d'activité et de stabilité que la PCrL libre dans un large spectre de pH et de températures, avec une température optimale de 45°C sur les deux supports CaCO_3 et alginate de sodium, puis la PCrL montre une amélioration importante dans la thermostabilité puisqu'elle a conservé 100% de son activité initiale à 45 et 60°C avec CaCO_3 et alginate de sodium, respectivement. En revanche l'immobilisation n'a aucun effet sur la valeur du pH optimal de l'activité.

En outre, lorsque les deux formes PCrL libre et PCrL immobilisée sur CaCO_3 ont été testées pour catalyser la réaction d'estérification, le rendement de conversion le plus élevé (65%) a été détectée pour la forme immobilisée après 12 h d'incubation. La PCrL libre n'a permis que 30% de conversion dans les mêmes conditions. Ces résultats mettent en évidence le pouvoir de la PCrL à catalyser les réactions de synthèse en milieux organiques, faisant d'elle une candidate potentielle pour la production du biodiesel.

A la lumière de tous ces résultats nous constatons que la PCrL est privilégiée, pour assurer à la fois des réactions d'hydrolyse et de synthèse ayant lieu dans divers secteurs industriels, notamment celui de la détergence et de la bioénergie.

Dans un autre volet, les trois LAB (*Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) ont été isolées de la saumure d'olives vertes marocaines en fermentation traditionnelle. Ces souches ont démontré leur capacité à inhiber les micro-organismes d'altération (*L. innocua*, *E. coli* et *R. glutinis*) ce qui indique leur capacité à produire des composés antimicrobiens. Les trois LAB (*Lb. brevis* S27, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) ont montré que des valeurs de la zone d'inhibition (ZI) variaient de 27,33 à 29,83 mm, de 18,33 à 19,83 mm et de 14,33 à 15,66 mm contre *R. glutinis*, *L. innocua* et *E. coli*, respectivement.

L'étude de l'activité antimicrobienne de CFS et NCFS de trois LAB et contre les micro-organismes d'altération a démontré la capacité d'inhiber la croissance des bactéries (*L. innocua*, *E. coli*) et de la levure (*R. glutinis*). Le CFS de toutes les souches de LAB a montré des plages de valeurs ZI de 26,33 à 28,83 mm, 14,16 à 16,33 mm et 10 à 12,16 mm contre *R. glutinis*, *L. innocua* et *E. coli*, respectivement et avec NCFS contre *L. innocua* et *R. glutinis* étaient respectivement de 13,16-14,50 mm et 17,83-20,50 mm, alors qu'aucune inhibition n'a été obtenue contre *E. coli* ; le même résultats a été obtenu avec les NCFS traités avec la catalase. Cependant, aucune inhibition n'a été observée dans le NCFS des trois souches traitées avec la protéinase-K, indiquant la nature protéique des molécules bioactives impliquées dans l'inhibition de *L. innocua* et *R. glutinis*. Le précipité de protéines des trois souches LAB a démontré de valeurs ZI de 11,83-13,16 mm et 18,33-20,66 mm contre *L. innocua* et *R. glutinis*, respectivement. Le SDS-PAGE des protéines précipitées du CFS de cultures de trois LAB (*Lb. brevis*, *Lb. pentosus* S42 et *Lb. plantarum* S62) a montré que parmi les quatre bandes peptidiques obtenues, deux bandes d'environ 42 et 56 kDa sont communes aux trois souches LAB (S27, S42 et S62). Deux bandes supplémentaires de 46 et 89 kDa sont observées en S42 et S27, respectivement. La concentration minimale inhibitrice de CFS concentré 10×CFS obtenue a été de 5% contre *E. coli* et de 4,5% contre *L. innocua* et *R. glutinis*. Le 10×CFS de *Lb. plantarum* S62, sélectionnée comme la souche la plus efficace contre les pathogènes, a démontré son efficacité dans la décontamination du lait à des concentrations de 0,45% (v/v) et 0,5% (v/v) contre *L. innocua* et *E. coli*. Le CFS a permis, à raison de 0,5 mL/pièce de 5 cm de diamètre, une inhibition totale de *R. glutinis*, sans affecter la couleur de la feuille de Pastilla. Le CFS de *Lb. plantarum* S62 peut être utilisé comme bio-conservateur contre les bactéries pathogènes (*L. innocua* et *E. coli*) dans le lait, et contre *R. glutinis* dans la feuille de Pastilla.

Perspectives

Des études supplémentaires sont nécessaires pour révéler la structure moléculaire du gène codant la PCrL (*lipCrL*) à partir de l'ADNc de la *Penicillium crustosum* P22, la cloner dans un vecteur recombinant et la séquencer. L'expression du gène dans un système hétérologue, tel qu'*E.coli*, sera donc nécessaire afin de surproduire la lipase d'intérêt dans un temps plus court, et pour examiner sa relation structure-fonctions par la mutagenèse dirigée.

D'autre part, une étude plus approfondie de l'application de la PCrL dans la détergence sera intéressante, telle que l'optimisation des conditions de lavage par les plans d'expérience, afin de déterminer les variables dépendantes et indépendantes (concentration de l'enzyme, le temps de lavage, la température, le pH...) et d'étudier l'effet de leurs interactions.

Ensuite, la qualité des fibres du tissu pourra être vérifiée après lavage par différentes techniques (MEB, IR, spectrophotomètre...) afin de s'assurer que l'ajout de la PCrL aux formulations détergentes ne détériore pas la qualité chimique et physique du tissu.

Dans un autre volet, l'optimisation des conditions de la production du biodiesel sera également intéressante. Dans ce sens, différents paramètres doivent être vérifiés tels que le type du solvant organique, le ratio molaire méthanol / acide oléique, la température d'incubation et la concentration de l'enzyme, afin d'augmenter le taux de conversion.

Références bibliographiques

A

- Aachapa, S., Hombalimath, V. S., Kamaraddi, J. R., Desai, S. V., Shet, A. R., Patil, L. R., & Patil, J. R. (2021). Statistical optimization of lipase production from *Bacillus* species by submerged fermentation. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.*, 14(1), 264269.
- Abbas, N., Javed, J., Abbas, Z., Choudry, S., & Ali, S. (2017). Lipase Production from *Bacillus subtilis* using various Agricultural waste. *Inter. J. Adv. Eng. Manage. Science.*, 3(5), 239830.
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., Ben Salah, R., Chihib, N., Saalaoui, E. & Asehraou, A. (2020). Characterization of probiotic properties of antifungal *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermenting green olives. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 12, 683-696.
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, I., Bellaouchi, R., Gaamouche, S., Ghabbour, N., Karboune, S., Ben Salah, R., Brasca, M., D'hallewin, G., Saalaoui, E. & Asehraou, A. (2022). Characterization of antimicrobial compounds obtained from the potential probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 and their application as a biopreservative agent. *Braz. J. Microbiol.*, 53(3), 1501-1513.
- Abouloifa, H., Hasnaouia, I., Roknia, Y., Bellaouchia, R., Ghabboura, N., Karbounee, S., Brasca, M., Abousalham, A., Jaouadi, B., Saalaoui, E. & Asehraoua, A. (2022). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation. *Ad. Appl. Microbiol.*, 120, 33-77.
- Abou Taleb, M., Gomaa, S. K., Wahba, M. I., Zaki, R. A., El-Fiky, A. F., El-Refai, H. A., & El-Sayed, H. (2017). The use of alternative solvents in enzymatic biodiesel production: a review. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 11(1), 168-194.
- Afzali, S., Edalatian Dovom, M. R., Habibi Najafi, M. B., & Mazaheri Tehrani, M. (2020). Determination of the anti-yeast activity of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional Iranian cheeses in vitro and in yogurt drink (Doogh). *Sci. Rep.*, 10(1), 1-11.
- Akmoussi-Toumi, S., Khemili-Talbi, S., Ferioun, I., & Kebbouche-Gana, S. (2018). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Haloferax mediterranei* CNCMM 50101. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 116, 817-830.
- Aloulou, A., Schué, M., Puccinelli, D., Milano, S., Delchambre, C., Leblond, Y., Laugier, R. & Carrière, F. (2015). *Yarrowia lipolytica* Lipase 2 Is stable and highly active in test meals and increases fat absorption in an animal model of pancreatic exocrine insufficiency. *Gastroenterology*, 149(7), 1910-1919.e5.
- Alves, A.M., de Moura, R. B., Carvalho, A. K., de Castro, H. F., & Andrade, G. S. (2019). *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 120, 433-438.
- Antonini, F., Crippa, S., Falconi, M., Macarri, G., & Pezzilli, R. (2018). Pancreatic enzyme replacement therapy after gastric resection: an update. *Digestive Liver Dis.*, 50(1), 1-5.
- Arora, N.K. and Panosyan, H. (2019). Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environ. Sustainability*, 2(3), 217-218.
- Arrijoa-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity

and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 115, 107286.

Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Rejeb, I. B., Gargouri, M., & Hamdi, M. (2009). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresour. Technol.*, 100(7), 2182-2188.

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Dousset, X., Ivanova, I., & Haertlé, T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* strain M3. *Inter. J. Food Microbiol.*, 87(1-2), 63-73.

Ayinla, Z.A., Ademakinwa, A.N. and Agboola, F.K. (2022). Comparative modelling, molecular docking and immobilization studies on *Rhizopus oryzae* lipase: evaluation of potentials for fatty acid methyl esters synthesis. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-13.

B

Baccioni, L. and Peri, C. (2014). Centrifugal separation. in *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. John Wiley & Sons, Ltd, 139-154.

Baffi, M.A., Romo-Sánchez, S., Úbeda-Iranzo, J., & Briones-Pérez, A. I. (2012). Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *New Biotechnol.*, 29(3), 451-456.

Bajpai, V. K., Han, J. H., Rather, I. A., Park, C., Lim, J., Paek, W. K., Lee, J.S., Youn, J.I. & Park, Y. H. (2016). Characterization and antibacterial potential of lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 isolated from freshwater fish *Zacco koreanus*. *Front. Microbiol.*, 7, 2037.

Bancerz, R., Ginalska, G., Fiedurek, J., & Gromada, A. (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32(6), 253-260.

Bancerz, R. and Ginalska, G. (2007). A novel thermostable lipase from *Basidiomycete Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34(8), 553-560.

Bardhan, P., Gohain, M., Daimary, N., Kishor, S., Chattopadhyay, P., Gupta, K., Chaliha, C., Kalita, E., Deka, D. & Mandal, M. (2019). Microbial lipids from cellulolytic oleaginous fungus *Penicillium citrinum* PKB20 as a potential feedstock for biodiesel production. *Ann. Microbiol.*, 69(11), 1135-1146.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. microbiol.*, 45(6), 1808-1815.

Barman, S., Ghosh, R. and Mandal, N.C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Sci.*, 16(3), 286-296.

Basso, A. and Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes-A review. *Mol. Catal.*, 479, 110607.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., Schomburg, D., & Schmid, R. D. (1996). Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Eng. Des. Sel.*, 9(6), 507-517.

- Behera, A.R., Veluppai, A. and Dutta, K. (2019). Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26(33), 34277-34284.
- Ben Ali, Y., Verger, R. and Abousalham, A. (2012). Lipases or Esterases: Does It Really Matter? Toward a New Bio-Physico-Chemical Classification', in G. Sandoval (ed.) *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), 31-51.
- Bacha, A. B., Al-Assaf, A., Moubayed, N. M., & Abid, I. (2018). Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations. *Saudi J. Biol. Sci.*, 25(3), 409-417.
- Ben Bacha, A., Alonazi, M., Alanazi, H., Alharbi, M. G., Jallouli, R., & Karray, A. (2022). Biochemical study of *Bacillus stearothermophilus* immobilized lipase for oily wastewater treatment. *Processes*, 10(11), 2220.
- Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L., Langella, P., Martín, R., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2020). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from table olive biofilms. *Probiotics antimicrob. proteins*, 12, 1071-1082.
- Bhan, C., & Singh, J. (2020). Role of microbial lipases in transesterification process for biodiesel production. *Environ. Sustainability*, 3, 257-266.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: an overview of screening, production, and purification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 22, 101368.
- Bian, C., Yuan, C., Chen, L., Meehan, E. J., Jiang, L., Huang, Z. & Huang, M. (2010). Crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Penicillium expansum* at 1.3 Å determined by sulfur SAD. *Proteins*, 78(6);12, 2009.
- Bloor, W.R. (1920). Outline of a classification of the lipoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 17(6), 138-140.
- Blow, D.M., Birktoft, J.J. and Hartley, B.S. (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, 221(5178), 337-340.
- Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L., & Fiil, N. P. (1988). *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids*, 23(7), 701-706.
- Bonatsou, S., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2017). Table olive fermentation using starter cultures with multifunctional potential. *Microorganisms*, 5(2), 30.
- Bora, L. and Bora, M. (2012). Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp isolated from hot spring of Arunachal Pradesh, India. *Braz. J. Microbiol.*, 43, 30-42.
- Boran, R., Ugur, A., Sarac, N., & Ceylan, O. (2019). Characterization of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. *3 Biotech*, 9, 1-7.
- Bouknana, D., Caid, H. S., Hammouti, B., Rmili, R., & Hamdani, I. (2021). Diagnostic study of the olive oil industry in the Eastern region of Morocco. *Materials Today: Proceedings*, 45, 7782-7788.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. & Ulrich Menge & Menge, U.

(1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343(6260), 767-770.

Bredai, R., Belhaj Ben Romdhane, I., Bouchaala, I., Srih Belghith, K., & Belghith, H. (2021). Purification of *Bacillus licheniformis* lipase and its application as an additive in detergent for destaining. *J. Surfactants Deterg.*, 24(5), 835-853.

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Front. microbiol.*, 9, 2700.

C

Cabrera-Padilla, R. Y., Lisboa, M. C., Fricks, A. T., Franceschi, E., Lima, A. S., Silva, D. P., & Soares, C. M. (2012). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39(2), 289-298.

Cadenhead, D.A. (1969). Monomolecular films at the air-water interface: some practical applications. *Ind. Eng. Chem.*, 61(4), 22-28.

Cai, Y., Bai, Q., Yang, L., Tang, L., & Su, M. (2022). Substitution and mutation of the C-terminal loop domain of *Penicillium expansum* lipase significantly changed its regioselectivity and activity. *Biochem. Eng. J.*, 179, 108313.

Calvano, C.D. and Tamborrino, A. (2022). Valorization of olive by-products: innovative strategies for their production, treatment, and characterization. *Foods*, 11(6), 768.

Canet, A., Benaiges, M. D., Valero, F., & Adlercreutz, P. (2017). Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis. *New Biotechnol.*, 39, 59-67.

Careri, G. (1998). Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 70(3), 223-249.

Carocho, M., Morales, P. and Ferreira, I.C.F.R. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends Food Sci. Technol.*, 45(2), 284-295.

Casa-Godoy, L., Gasteazoro, F., & Bordes, F. (2018). Lipases: An Overview: Methods and protocols. *Methods Mol. Biol.*, 1835, 3-38.

Cen, Y. K., Liu, Y. X., Xue, Y. P., & Zheng, Y. G. (2019). Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Adv. Synth. Catal.*, 361(24), 5500-5515.

Chahinian, H., Vanot, G., Ibrik, A., Rugani, N., Sarda, L., & Comeau, L. C. (2000). Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 64(2), 215-222.

Chakchouk-Mtibaa, A., Elleuch, L., Smaoui, S., Najah, S., Sellem, I., Mejdoub, H., Abdelkafi, S. & Mellouli, L. (2014). Characterization of the bacteriocin BacJ1 and its effectiveness for the inactivation of *Salmonella typhimurium* during turkey escalope storage. *Food Chem.*, 152, 566-572.

Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb. Cell Fact.*, 19(1), 169.

Chapman, J., Ismail, A.E. and Dinu, C.Z. (2018). Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.

- Cherif, S., Miled, N., Kammoun, M., Mejdoub, H., & Gargouri, Y. (2006). Purification and biochemical characterization of a turkey preduodenal esterase. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 145(3-4), 358-364.
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., & Sayadi, S. (2011). A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids Health Dis.*, 10, 1-8.
- Chettri, D., Verma, A. K., Sarkar, L., & Verma, A. K. (2021). Role of extremophiles and their extremozymes in biorefinery process of lignocellulose degradation. *Extremophiles*, 25, 203-219.
- Chevreul, M.E. (1889). Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale. *Impr. nationale*.
- Chinaglia, S., Chiarelli, L. R., Maggi, M., Rodolfi, M., Valentini, G., & Picco, A. M. (2014). Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78(2), 245-254.
- Choudhury, P., & Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: a review. *Biopharm. J.*, 1(2), 41-47.
- Christie, W. W. (1973). The isolation of lipids from tissues. Recommended procedures. chloroform-methanol (2: 1, v/v) extraction and "Folch" wash. W: Isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. *Lipid analysis*, Oxford, New York: Pergamon Press.
- Coelho, A.L.S. and Orlandelli, R.C. (2021). Immobilized microbial lipases in the food industry: a systematic literature review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 61(10), 1689-1703.
- Collaço, A. C. A., Aguiéiras, E. C., Cavalcanti, E. D., & Freire, D. M. (2021). Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. *LWT*, 135, 110039.
- Comunian, R., Ferrocino, I., Paba, A., Daga, E., Campus, M., Di Salvo, R., Cauli, E., Piras, F., Zurru, R. & Cocolin, L. (2017). Evolution of microbiota during spontaneous and inoculated *Tonda di Cagliari* table olives fermentation and impact on sensory characteristics. *LWT*, 84, 64-72.
- Contesini, F. J., Davanço, M. G., Borin, G. P., Vanegas, K. G., Cirino, J. P. G., Melo, R. R. D., Mortensen, U.H., Hildén, K., Campos, D.R. & Carvalho, P. D. O. (2020). Advances in recombinant lipases: production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry. *Catalysts*, 10(9), 1032.
- Cui, R., Che, X., Li, L., Sun-Waterhouse, D., Wang, J., & Wang, Y. (2022). Engineered lipase from *Janibacter* sp. with high thermal stability to efficiently produce long-medium-long triacylglycerols. *LWT- Food Sci. Technol.* 165, 113675.
- Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G., Bevilaqua, J. V., Destain, J., Paiva, L. M., Freire, D. M., Fernande. & Guisán, J. M. (2008). Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase-a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-Ninth Symposium* (169-176). Humana Press.
- Cygler, M., Schrag, J.D. and Ergun, F. (1992). Advances in structural understanding of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10(1), 143-184.

D

- Delorme, V., Dhouib, R., Canaan, S., Fotiadu, F., Carrière, F., & Cavalier, J. F. (2011). Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharm. Res.*, 28(8), 1831-1842.
- Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., & Regecová, I. (2020). Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* isolated from chicken eggs. *Processes*, 9(1), 53.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., & Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochem.*, 31(5), 1532-1541.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Mouliti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.*, 48(10), 1532-1552.
- Desnuelle, P., Sarda, L. and Ailhaud, G. (1960). Inhibition of pancreatic lipase by diethyl-p-nitrophenyl phosphate in emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 570-571.
- Dheeman, D. S., Antony-Babu, S., Frías, J. M., & Henahan, G. T. (2011). Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). *J. Mol. Catal. B: Enzy.*, 72(3-4), 256-262.
- Di Biase, M., Lavermicocca, P., Lonigro, S. L., & Valerio, F. (2014). *Lactobacillus brevis*-based bioingredient inhibits *Aspergillus niger* growth on pan bread. *Ital. J. Agron.*, 9(4), 146-151.
- Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2021). Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods-a review. *J. Sci. Food Agric.*, 101(1), 15-26.
- Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. (2018). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulg. J. Vet. Med.*, 21(3), 253-268.
- Djadouni, F. and Kihal, M. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55, 435-444.
- Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L., & Luo, D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chem. Eng. J.*, 181, 590-596.
- Dortu, C. and Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1), 143-154.
- Doughmi, A., Benradi, F., Cherkaoui, E., Khamar, M., Nounah, A., & Zouahri, A. (2022). Fertilizing power evaluation of different mixtures of organic household waste and olive pomace. *Agron. Res.*, 20 (1), 913-937.
- Doukyu, N. and Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.*, 48(3), 270-282.

E

- Eddehech, A., Rahier, R., Smichi, N., Arhab, Y., Noiriél, A., Abousalham, A., Sayari, A. & Zarai, Z. (2021). Heterologous expression, kinetic characterization, and molecular modeling of a new *sn*-1, 3-regioselective triacylglycerol lipase from *Serratia* sp. W3. *Process Biochem.*, 103, 87-97.
- Eddine, S. D., Yasmine, S., Fatima, G., Amina, Z., Battache, G., & Mebrouk, K. (2021). Antifungal and antibacterial activity of some lactobacilli isolated from camel's milk biotope in the

south of Algeria. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 2021, 871-877.

Ekici, Ö. D., Paetzel, M., & Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci.*, 17(12), 2023-2037.

El Alaoui, M. (2015) Développement de tests enzymatiques applicables au criblage des activités et/ou inhibiteurs de (phospho)lipases. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. <https://theses.hal.science/tel-01229038>.

El Alaoui, M., Soulère, L., Noiriél, A., Queneau, Y., & Abousalham, A. (2017). α -Eleostearic acid-containing triglycerides for a continuous assay to determine lipase *sn*-1 and *sn*-3 regio-preference. *Chem. Phys. Lipids*, 206, 43-52.

El Gnaoui, Y., Sounni, F., Bakraoui, M., Karouach, F., Benlemlih, M., Barz, M., & El Bari, H. (2020). Anaerobic co-digestion assessment of olive mill wastewater and food waste: Effect of mixture ratio on methane production and process stability. *J. Environ. Chem. Eng.*, 8(4), 103874.

El Qarnifa, S., El Antari, A. and Hafidi, A. (2019). Effect of maturity and environmental conditions on chemical composition of olive oils of introduced cultivars in Morocco. *J. Food Qual.*, 2019, 1-14.

El Yamani, M., Sakar, E. H., Boussakouran, A., Ghabbour, N., & Rharrabti, Y. (2020). Physicochemical and microbiological characterization of olive mill wastewater (OMW) from different regions of northern Morocco. *Environ. Technol.*, 41(23), 3081-3093.

El-Fiky, A. F., Khalil, E. M., Mowafi, S., Zaki, R. A., & El-Sayed, H. (2022). A novel approach towards removal of lipid barrier from wool fibers' surface using thermophilic lipase. *J. Nat. Fibers*, 19(14), 9471-9485.

El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., Hassanein, N. M., Abdellah, E. M., Fadel, M., Awad, G. E., & Abdou, D. A. (2021). Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization, and its application in biodiesel production. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 51(3), 225-240.

Enespa, Chandra, P. and Singh, D.P. (2022). Sources, purification, immobilization, and industrial applications of microbial lipases: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-34.

Ertuğrul, S., Dönmez, G. and Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.*, 149(3), 720-724.

Esteban, L., Jiménez, M. J., Hita, E., González, P. A., Martín, L., & Robles, A. (2011). Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at *sn*-2 position and oleic acid at *sn*-1, 3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Biochem. Eng. J.*, 54(1), 62-69.

F

Facchini, F. D. A., Vici, A. C., Pereira, M. G., Jorge, J. A., & de Moraes, M. D. L. T. (2016). Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. *J. Biochem. Technol.*, 6(3), 996-1002.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R.H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum J. L. & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids1. *J. Lipid Res.*, 46(5), 839-861.

FAO/WHO.2002 *Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of*

probiotics in food [Online]. London, Ontario, Canada: April 30 and May 1. Available: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf [Accessed April 5 2023].

Ferhat, R., Laroui, S., Zitouni, B., Lekbir, A., Abdeddaim, M., Smaili, N., & Mohammedi, Y. Experimental study of solid waste olive's mill: Extraction modes optimization and physicochemical characterization. *Inter. J. Nat. Prod. Sci.*, 4, 16-23.

Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L. & Verger, R. A (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol.*, Academic Press (Lipases Part B: Enzyme Characterization and Utilization), 327-347.

Ferrer, M., Plou, F. J., Nuero, O. M., Reyes, F., & Ballesteros, A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol. Inter. Res. Process Environ. Clean Technol.*, 75(7), 569-576.

Fieker, A., Philpott, J. and Armand, M. (2011). Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Clin. Exp. Gastroenterol.*, 4, 55-73.

Filho, D.G., Silva, A.G. and Guidini, C.Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103(18), 7399-7423.

Foti, P., Romeo, F. V., Russo, N., Pino, A., Vaccalluzzo, A., Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2021). Olive mill wastewater as renewable raw materials to generate high added-value ingredients for agro-food industries. *Appl. Sci.*, 11(16), 7511.

G

Gao, B., Su, E., Lin, J., Jiang, Z., Ma, Y., & Wei, D. (2009). Development of recombinant *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *J. Biotechnol.*, 139(2), 169-175.

García-Silvera, EE., Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Morales-Guzmán, D., Rosas-Galván, NS., León-Rodríguez, R. & Trejo-Hernández MR. (2018). Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 65(2), 156-172.

Ghamgui, H., Miled, N., Karra-chaâbouni, M., & Gargouri, Y. (2007). Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. *Biochem. Eng. J.*, 37(1), 34-41.

Ghazani, S.M. and Marangoni, A.G. (2018). Facile lipase-catalyzed synthesis of a chocolate fat mimetic. *Sci. Rep.*, 8(1), 1-18.

Goldman, Rachel., Kedem, Ora. and Katchalski, Ephraim. (1968). Papain-collodion membranes. II. Analysis of the kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes. *Biochem.*, 7(12), 4518-4532.

Gomes, J. E. G., Rosa, I. Z., da Silva Nascimento, T. C. E., de Souza-Motta, C. M., Gomes, E., Boscolo, M., Moreira, K.A., Pintado, M. M. E. & da Silva, R. (2020). Biochemical and thermodynamic characteristics of a new serine protease from *Mucor subtilissimus* URM 4133. *Biotechnol. Rep.*, 28, e00552.

Gorman, L.A.S. and Dordick, J.S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 39(4), 392-397.

- Gotsis, E., Anagnostis, P., Mariolis, A., Vlachou, A., Katsiki, N., & Karagiannis, A. (2015). Health benefits of the mediterranean diet: an update of research over the last 5 years. *Angiology*, 66(4), 304-318.
- Gram, C. (1884). Ueber die isolirte farbung der schizomyceten in schnitt-und trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., & Knežević-Jugović, Z. (2011). Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresour. Technol.*, 102(24), 11226-11233.
- Griebeler, N., Polloni, A. E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Di Luccio, M., de Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R.L., Rigo, E. & Ninow, J. L. (2011). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioprocess Technol.*, 4, 578-586.
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 24(4), D403.
- Gullón, P., Gullon, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Res. Inter.*, 137, 109683.
- Gulyamova, T. G., Ruzieva, D. M., Yoldosheva, M., Rasulova, G. A., & Kondrasheva, K. V. (2022). Screening of Pancreatic Lipase Inhibitors of Endophytic Fungi of Medicinal Plants in Uzbekistan.19(4). *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*,1037-1044.
- Guo, K.W. (2019). Immobilization Methods of Enzymes: Part I, *Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases*. Cham: Springer International Publishing (Fungal Biology), 127-136.
- Gupta, R., Rathi, P., & Bradoo, S. (2003). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43(6), 635-644.
- Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S. (2020). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2003, 43, 635-644.
- Gupta, M., Saxena, S. and Goyal, D. (2015). Potential pancreatic lipase inhibitory activity of an endophytic *Penicillium* species. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 30(1), 15-21.
- Gupta, P. Dutt, K., Saran, S., & Saxena, R. K. (2019). Binary immobilization: a newer approach for immobilizing lipase from a thermophilic sp. of *Thermomyces lanuginosus*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 56(5), 358-362.
- Gurkok, S. and Ozdal, M. (2021). Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein Expression Purif.*, 180, 105819.
- Gutarra, M. L., Godoy, M. G., Maugeri, F., Rodrigues, M. I., Freire, D. M., & Castilho, L. R. (2009). Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.*, 100(21), 5249-5254.

H

- Haddar, A. Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two

- detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization, and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour. Technol.*, 100(13), 3366-3373.
- Hamidi, A., Rashidi, M. R., Asgari, D., Aghanejad, A., & Davaran, S. (2012). Covalent immobilization of trypsin on a novel aldehyde terminated PAMAM dendrimer. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 33(7), 2181-2186.
- Harighi, M., Zamani, M. and Motallebi, M. (2007). Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnol.*, 6(1), 28-33.
- Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., & Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: lipases. *Afri. J. Biotechnol.*, 9(31), 4836-4844.
- Hasnaoui, I., Dab, A., Mechri, S., Abouloifa, H., Saalaoui, E., Jaouadi, B., Noiriél, A., Asehraou, A. & Abousalham, A. (2022). Purification, biochemical and kinetic characterization of a novel alkaline *sn*-1, 3-regioselective triacylglycerol lipase from *Penicillium crustosum* Thom Strain P22 isolated from Moroccan olive mill wastewater. *Inter. J. Mol. Sci.*, 23(19), 11920.
- Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *J. Adv. Res.*, 8(6), 687-695.
- Hassan, S.W., Abd El Latif, H.H. and Beltagy, E.A. (2022). Purification, characterization and application of a cold active lipase from marine *Bacillus cereus* HSS. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 50(1), 71-80.
- He, Y., Li, J., Kodali, S., Balle, T., Chen, B., & Guo, Z. (2017). Liquid lipases for enzymatic concentration of *n*-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: catalytic specificity and parameterization. *Bioresour. Technol.*, 224, 445-456.
- Heidari, Z., Ghasemi, M.F. and Modiri, L. (2021). Antimicrobial activity of bacteriocin produced by a new *Latilactobacillus curvatus* sp. LAB-3H isolated from traditional yogurt. *Arch. Microbiol.*, 204(1), 101.
- Helal, S. E., Abdelhady, H. M., Abou-Taleb, K. A., Hassan, M. G., & Amer, M. M. (2021). Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 19(1), 1-13.
- Herianto, S., Subramani, B., Chen, B. R., & Chen, C. S. (2022). Recent advances in liposome development for studying protein-lipid interactions. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1-14.
- Hermansyah, H., Maresya, A., Putri, D. N., Sahlan, M., & Meyer, M. (2018). Production of dry extract lipase from *Pseudomonas aeruginosa* by the submerged fermentation method in palm oil mill effluent. *Inter. J. Technol.*, 9(2), 325-334.
- Hilditch, T.P. (1949). The chemical constitution of natural fats. *Br. J. Nutr.* 3(4), 347-354.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., R. Gibson, G., J. Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., J. Flint, H., Salminen, S., C. Calder, P. & Mary Ellen Sanders (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11(8), 506-514.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.*, 6, 185-205.
- Houbraken, J., de Vries, R.P. and Samson, R.A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. in S. Sariaslani and G.M. Gadd (eds) *Adv. Appl. Microbiol.*, 86, 199-249.

Hu, H. J., Gao, R. L., Yang, Q. F., Huang, Y. P., Wang, H. M., & Pei, C. X. (2022). Enantioselective biocatalytic resolution for the synthesis of enantiopure α -hydroxyphosphonates using *Candida antarctica* lipase B. *New J. Chem.*, 46(17), 7987-7991.

Huang, Z., Guo, Z., Xie, D., Cao, Z., Chen, L., Wang, H., Jiang, L. & Shen, Q. (2021). *Rhizomucor miehei* lipase-catalysed synthesis of cocoa butter equivalent from palm mid-fraction and stearic acid: Characteristics and feasibility as cocoa butter alternative. *Food Chem.*, 343, 128407.

I

Indarmawan, T., Mustopa, A. Z., Budiarto, B. R., & Tarman, K. (2016). Antibacterial activity of extracellular protease isolated from an algicolous fungus *Xylaria psidii* KT30 against gram-positive bacteria. *HAYATI J. Biosci.*, 23(2), 73-78.

Invernizzi, G., Papaleo, E., Grandori, R., De Gioia, L., & Lotti, M. (2009). Relevance of metal ions for lipase stability: structural rearrangements induced in the *Burkholderia glumae* lipase by calcium depletion. *J. Struct. Biol.*, 168(3), 562-570.

J

Jadhav, H.B. and Annapure, U.S. (2022). Triglycerides of medium-chain fatty acids: a concise review. *J. Food Sci. Technol.*, 60, 2143-2152.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F., & Dijkstra, B. W. (1993). Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.*, 332(1-2), 143-149.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 315-351.

Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kousser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 132, 23-34.

Jiao, L., Zhou, Q., Su, Z., & Yan, Y. (2018). Efficient heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase via optimization of multiple expression-related helper proteins. *Inter. J. Mol. Sci.*, 19(11), 3372.

Jiménez, M. J., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., González, P. A., Muñío, M. M., & Molina, E. (2010). Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at position 2 as intermediates for the synthesis of human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Process Biochem.*, 45, 407-414.

Jmeii, L., Soufi, L., Abid, N., Mahjoubi, M., Roussos, S., Ouzari, H. I., Cherif, A., & Garna, H. (2019). Assessment of biotechnological potentials of strains isolated from repasso olive pomace in Tunisia. *Ann. Microbiol.*, 69, 1177-1190.

Jorquera, M.A., Graether, S.P. and Maruyama, F. (2019). Bioprospecting and biotechnology of extremophiles. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7, 204.

K

- K. de S. Lira, R., T. Zardini, R., CC de Carvalho, M., Wojcieszak, R., GF Leite, S., & Itabaiana Jr, I. (2021). Agroindustrial wastes as a support for the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Synthesis of hexyl laurate. *Biomol.*, 11(3), 445.
- Karam, E. A., Wahab, W. A. A., Saleh, S. A., Hassan, M. E., Kansoh, A. L., & Esawy, M. A. (2017). Production, immobilization, and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 102, 694-703.
- Kates, M. (1986). Techniques of lipidology. isolation, analysis, and identification of lipids. 2. Rev. Ed, 484.
- Kaur, M., Mehta, A. and Gupta, R. (2019). Synthesis of methyl butyrate catalyzed by lipase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Oleo Sci.*, 68(10), 989-993.
- Kavadia, M. R., Yadav, M. G., Odaneth, A. A., & Lali, A. M. (2017). Production of glyceryl monostearate by immobilized *Candida Antarctica* B lipase in organic media. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, 2, 1-7.
- Kharrat, N., Ali, Y. B., Marzouk, S., Gargouri, Y. T., & Karra-Châabouni, M. (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme. *Process Biochem.*, 46(5), 1083-1089.
- Khmaissa, M., Hadrich, B., Ktata, A., Chamkha, M., Sayari, A., & Fendri, A. (2022). The response surface methodology for optimization of *Halomonas* sp. C2SS100 lipase immobilization onto CaCO₃ for treatment of tuna wash processing wastewater. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 1-13.
- Kiritsakis, A. and Sakellaropoulos, N. (2017). Olive fruit harvest and processing and their effects on oil functional compounds. in *olives and olive oil as functional foods*. John Wiley & Sons, Ltd, 127-146.
- Krieger, N., Taipa, M. A., Melo, E. H. M., Lima-Filho, J. L., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (1999). Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioprocess Eng.*, 20(1), 59-65.
- Ktata, A., Krayem, N., Aloulou, A., Bezzine, S., Sayari, A., Chamkha, M., & Karray, A. (2020). Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly *thermoalkaliphilic Aeribacillus pallidus* for oily wastewater treatment. *J. Biochem.*, 167(1), 89-99.
- Ku, T.W., Tsai, R.L. and Pan, T.M. (2009). A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto. *J. Agric. Food. Chem.*, 57(1), 292-296.
- Kumar, R., Banoth, L., Banerjee, U. C., & Kaur, J. (2017). Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a Metagenomic lipase and optimization of its large-scale production. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 95, 995-1003.
- Kumar, S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S. K., & Negi, S. (2012). Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresour. Technol.*, 120, 300-304.

L

- Laane, C. Boeren, S., Vos, K., & Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30(1), 81-87.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D., & Guerzoni, M. E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, 96(3), 317-322.

Lash, B.W., Mysliwiec, T.H. and Gourama, H. (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiol.*, 22(2), 199-204.

Lavermicocca, P., Rossi, M., Russo, F., & Srirajaskanthan, R. (2010). Table olives: a carrier for delivering probiotic bacteria to humans. In *olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 735-743). Academic Press.

Lavermicocca, P., Valerio, F. and Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 634-640.

Lee, C. H., Lee, H. S., Lee, J. W., Kim, J., Lee, J. H., Jin, E. S., & Hwang, E. T. (2021). Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: comparing in situ and crosslinking mediated immobilization. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 175, 341-350.

Lee, S. Y., Khoiroh, I., Ling, T. C., & Show, P. L. (2017). Enhanced recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* from fermentation broth using recyclable ionic liquid/polymer-based aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.*, 179, 152-160.

Lee, Z. S., Chin, S. Y., Lim, J. W., Witton, T., & Cheng, C. K. (2019). Treatment technologies of palm oil mill effluent (POME) and olive mill wastewater (OMW): a brief review. *Environ. Technol. Innovation*, 15, 100377.

Li, N. and Zong, M.H. (2010). Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization, and applications. *J. Mol. Catal. B: Enzy.*, 66(1), 43-54.

Lianghua, T., Liming, X., Min, S., & Huaying, G. (2007). Purification and application of a lipase from *Penicillium expansum* PED-03. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142, 194-199.

Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., J. Griffiths, W., Köfeler, H., H. Jr, M. A., C. Murphy, R., B. O'Donnell, V., Oskolkova, O., Subramaniam, S., J.O. Wakelam, M. & Spener, F. (2020). Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J. Lipid Res.*, 61(12), 1539-1555.

Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., & Fontana, J. D. (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Engin. J.*, 18(1), 65-71.

Link, H. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. *Mag Ges Naturf Freunde Berlin*, 3, 3-42.

Loli, H., Kumar Narwal, S., Kumar Saun, N., & Gupta, R. (2015). Lipases in medicine: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.*, 15(14), 1209-1216.

Long, Z. D., Xu, J. H., Zhao, L. L., Pan, J., Yang, S., & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *E. coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *J. Mol. Catal. B: Enzy.*, 47(3), 105-110.

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., & Brasseur, R. (2004). Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 8 (3), 163-176.

M

- Mabizela-Mokoena, N. B., Limani, S. W., Ncube, I., Piater, L. A., Litthauer, D., & Nthangeni, M. B. (2017). Genetic determinant of *Bacillus pumilus* lipase lethality and its application as positive selection cloning vector in *E. coli*. *Protein Expression Purif.*, 137, 43-51.
- Magallanes López, A.M. and Simsek, S. (2021). Pathogens control on wheat and wheat flour: a review. *Cereal Chem.*, 98(1), 17-30.
- Magnusson, J. and Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1), 1-5.
- Mahmoud, G. A., Koutb, M. M., Morsy, F. M., & Bagy, M. M. (2015). Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *Euro. J. Biol. Res.*, 5(3), 70-77.
- Maldonado, R.R., E.L., Pozza and E. Aguiar-Oliveira. (2016). Characterization of crude and partially purified lipase from *Geotrichum candidum* obtained with different nitrogen sources. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 1355-1364.
- Mamkagh, A., AL-Zyoud, F., & Al-Atiyat, R. (2022). Olive mill pomace compost as soil amendment, and sources of biopesticides and animal feed: a review. *Int. J. Agric. Biol.*, 28, 257-268.
- Manasian, P., Bustos, A. S., Pålsson, B., Håkansson, A., Peñarrieta, J. M., Nilsson, L., & Linares-Pastén, J. A. (2020). First evidence of acyl-hydrolase/lipase activity from human probiotic bacteria: *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium longum* NCC 2705. *Front. Microbiol.*, 11, 1534.
- Martín, M. C., López, O. V., Ciolino, A. E., Morata, V. I., Villar, M. A., & Ninago, M. D. (2019). Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 18, 101091.
- Martins, M., Silva, C. and Cavaco-Paulo, A. (2019). Enzyme stabilization for biotechnological applications. in A. Cavaco-Paulo, V.A. Nierstrasz, and Q. Wang (eds), *Adv. Textile Biotechnol. (Second Edition)*. Woodhead Publishing (The Textile Institute Book Series), 107-131.
- Mase, T., Matsumiya, Y. and Matsuura, A. (1995). Purification and Characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 Lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(2),329-330.
- Matos, M., Barreiro, M.F. and Gandini, A. (2010). Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind. Crops Prod.*, 32(1), 7-12.
- Matto, C., Varela, G., Braga, V., Vico, V., Giannechini, R. E., & Rivero, R. (2018). Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture-based dairy farms. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 1736-1741.
- Mechri, S., Bouacem, K., Chalbi, T. B., Khaled, M., Allala, F., Bouanane-Darenfed, A., Hacene, H. & Jaouadi, B. (2022). A Taguchi design approach for the enhancement of a detergent-biocompatible alkaline thermostable protease production by *Streptomyces mutabilis* strain TN-X30. *J. Surfactants Deterg.*, 25(4), 487-504.
- Mechri, S., Bouacem, K., Hasnaoui, I., Gwaithan, H., Chalbi, T. B., Saalaoui, E., Asehraou, A., Noiriél, A., Abousalham, A., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A., Le Roes-Hill, M., & Jaouadi, B. (2022). Preparation, characterization, immobilization, and molecular docking analysis of a novel detergent-stable subtilisin-like serine protease from *Streptomyces mutabilis* strain TN-X30.

Inter. J. Biol. Macromol., 222, 1326-1342.

Medouni-Haroune, L., Zaidi, F., Medouni-Adrar, S., & Kecha, M. (2018). Olive pomace: From an olive mill waste to a resource, an overview of the new treatments. *J. Crit. Rev.*, 5(6), 1-6.

Mehta, A., Gupta, A., Bhardwaj, K. K., & Gupta, R. (2021). A purified alkaline and detergent-tolerant lipase from *Aspergillus fumigatus* with potential application in removal of mustard oil stains from cotton fabric. *Tenside, Surfactants, Deterg.*, 58(6), 442-451.

Melani, N.B., Tambourgi, E.B. and Silveira, E. (2020). Lipases: from production to applications. *Sep. Purif. Rev.* 49(2), 143-158.

Memarpoor-Yazdi, M., Karbalaee-Heidari, H.R. and Doroodmand, M.M. (2018). Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*. *Biochem. Eng. J.*, 130, 55-65.

Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Rivière, M., Carrière, F., de Caro, A., Cambillau, C., & Verger, R. (2000). Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochim.*, 82(11), 973-986.

Militello, M., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Giammanco, G. M., Ampro, M. & Carrubba, A. (2011). Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. *Curr. microbiol.*, 62, 1274-1281.

Misbah, A., Aouine, M., Er Raouan, S., Lekbach, Y., Ettadili, H., Ibnsouda Koraichi, S., & Tahri Jouti, M. A., (2019). Microorganisms isolated from Moroccan olive-mill wastes: screening of their enzymatic activities for biotechnological use. *Eur. Sci. J.*, 15, 464-494.

Misbah, A., Koraichi, S.I. and Jouti, M.A.T. (2020). Purification, characterization, and immobilization of lipase from *Proteus vulgaris* OR34 for synthesis of methyl oleate. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 48(4), 491-505.

Mo, Q., Liu, A., Guo, H., Zhang, Y., & Li, M. (2016). A novel thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YB103: screening, purification, and characterization. *Extremophiles*, 20(2), 157-165.

Mouncif, M., Tamoh, S., Faïd, M., & Achkari-Begdouri, A. (1993). A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill wastewater in Morocco. *Grasas y Aceites*, 44(6), 335-338.

Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., & Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 25-39.

Muhialdin, B. j and Hassan, Z. (2011). Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against *Aspergillus oryzae*. *Am. J. Appl. Sci.*, 8 (5), 447-451.

Mun, S. Y., Kim, S. K., Woo, E. R., & Chang, H. C. (2019). Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities. *Lwt, Food Sci. Technol.* 114, 108403.

Mustafa, A., Niikura, F., Pastore, C., Allam, H. A., Hassan, O. B., Mustafa, M., Inayat, A., Sameh A. Salah, Ahmed Abdel Salam. & Mohsen, R. (2022). Selective synthesis of alpha monoglycerides by a clean method: Techno-economic and environmental assessment. *Sustainable Chem. Pharm.*, 27, 100690.

Myoda, S. P., Gilbreth, S., Akins-Lewenthal, D., Davidson, S. K., & Samadpour, M. (2019). Occurrence and levels of *Salmonella*, enterohemorrhagic *E. coli*, and *Listeria* in raw wheat. *J. Food Prot.*, 82(6), 1022-1027.

N

- Nepal, B. and Stine, K.J. (2018). Monolayers of carbohydrate-containing lipids at the water-air interface. *Cell Culture*, 213-241.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S., & Adivarekar, R. (2013). Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *J. Surfactants Deterg.*, 16(3), 435-443.
- Nguyen, H.H. and Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Appl. Sci. Convergence Technol.*, 26(6), 157-163.
- Nicoletti, R. and Trincone, A. (2016). Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Mar. Drugs*, 14(2), 37.
- Nimkande, V.D. and Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *J. Water Process Eng.*, 46, 102591.
- Niyonzima, F. and More, S. (2015). Microbial detergent compatible lipases. *J. Sci. Ind. Res.*, 74, 105-113.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R., & Frenken, L. G. J. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.*, 331(1), 123-128.
- Ntougias, S., Bourtzis, K. and Tsiamis, G. (2013). The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Res. Inter.*, 2013, e784591.
- Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, 35, 139-148.
- Nur Royhaila, M., Nur Haziqah Che, M., Nor Aziah, Buang., Fahrul, H., Roswanira, A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29(2), 205-220.

O

- Ogino, H. and Ishikawa, H. (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.*, 91(2), 109-116.
- Okpara, M.O. (2022). Microbial enzymes and their applications in food industry: a mini-review. *Adv. Enzy. Res.*, 10(1), 23-47.
- Oliveira, A.C.D., Fernandes, M.L. and Mariano, A.B. (2014). Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. *Braz. J. Microbiol.*, 45, 1503-1511.
- Oliveira, F., Souza, C. E., Peclat, V. R., Salgado, J. M., Ribeiro, B. D., Coelho, M. A., Venâncio, A. & Belo, I. (2017). Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food Bioprod. Process.*, 102, 268-277.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., M. Franken, S., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., L. Sussman, J., Verschueren, K. H. G. & Goldman, A. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng. Des. Sel.*, 5(3), 197-211.
- Ouhibi, S., Santos, C., Ghali, R., Soares, C., Hedhili, A., Paterson, R., & Lima, N. *Penicillium*

tunisiense sp. nov., a novel species of *Penicillium* section *Ramosa* discovered from tunisian orchard apples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68(10), 3217-3225.

P

Paluzar, H., Tuncay, D. and Aydogdu, H. (2021). Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower pulp. *Biocatal. Biotransform.*, 39(4), 333-342.

Panaiotov, I., Ivanova, M. and Verger, R. (1997). Interfacial and temporal organization of enzymatic lipolysis. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2(5), 517-525.

Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., & Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533-1545.

Papadelli, M., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou, E., Lytra, I., Papadimitriou, K & Tsakalidou, E. (2015). Evaluation of two lactic acid bacteria starter cultures for the fermentation of natural black table olives (*Olea europaea* L cv Kalamon). *Pol. J. Microbiol.*, 64(3), 265-271.

Pereira, M. G., Velasco-Lozano, S., Moreno-Perez, S., Polizeli, A. M., Heinen, P. R., Facchini, F. D., C. Vici, A., Cereia, M., C. Pessela, B., Fernandez-Lorente, G., M. Guisan., J., A. Jorge, J. & Polizeli, M. L. T. M. (2017). Different covalent immobilizations modulate lipase activities of *Hypocrea pseudokoningii*. *Molecules*, 22(9), 1448.

Perumal, S., Atchudan, R., & Lee, W. (2022). A review of polymeric micelles and their applications. *Polymers*, 14(12), 2510.

Petersen, S. B., Jonson, P. H., Fojan, P., Petersen, E. I., Petersen, M. T. N., Hansen, S., J. Ishak. & Hough, E. (1998). Protein engineering the surface of enzymes. *J. Biotechnol.*, 66(1), 11-26.

Phukon, L. C., Chourasia, R., Kumari, M., Godan, T. K., Sahoo, D., Parameswaran, B., & Rai, A. K. (2020). Production and characterization of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresour. Technol.*, 309, 123352.

Ping, L., Yuan, X., Zhang, M., Chai, Y., & Shan, S. (2018). Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 106, 302-311.

Pitt, J.I., Samson, R.A. and Frisvad, J.C. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Edited by R.A. Samson and J.I. Pitt, 9-46.

Portilha-Cunha, M.F., Macedo, A.C. and Malcata, F.X. (2020). A Review on adventitious lactic acid bacteria from table olives. *Foods*, 9(7), 948.

Pranav, K., Nidhi, H., Preeti, N., & Savita, K. Screening of lipase producing fungi and its application. 6(2), 649i-655i.

Priyanka, P., Kinsella, G., Henahan, G. T., & Ryan, B. J. (2019). Isolation, purification, and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expression Purif.*, 153, 121-130.

Q

Qin, S., Zhao, Y., Wu, B., & He, B. (2016). A Calcium-ion-stabilized lipase from *Pseudomonas stutzeri* ZS04 and its application in resolution of chiral aryl alcohols. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 180(7), 1456-1466.

Qu, P., Li, D., Lazim, R., Xu, R., Xiao, D., Wang, F & Li, X. (2022). Improved thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase by molecular dynamics simulation and in silico mutation prediction and its application in biodiesel production. *Fuel*, 327, 125039.

Quinto, E. J., Marín, J. M., Caro, I., Mateo, J., & Schaffner, D. W. (2020). Modelling growth and decline in a two-species model system: pathogenic *E. coli* O157:H7 and psychrotrophic spoilage bacteria in milk. *Foods*, 9(3), 331.

R

Rahman, R. N. Z. R., Baharum, S. N., Basri, M., & Salleh, A. B. (2005). High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. *Anal. Biochem.*, 341(2), 267-274.

Ramos, P. R., Kamimura, E. S., Pires, N. A. M., Maldonado, R. R., & de Oliveira, A. L. (2021). Esterification reaction in SC-CO₂ catalyzed by lipase produced with corn steep liquor and Minas Frescal cheese whey. *Bioresour. Technol. Rep.*, 14, 100670.

Ray, S. (2015). Applications of extracellular microbial lipases—a review. *Int J Res Biotechnol Biochem*, 5(1), 6-12.

Rehman, S., Bhatti, H. N., Bilal, M., Asgher, M., & Wang, P. (2017). Catalytic, kinetic and thermodynamic characteristics of an extracellular lipase from *Penicillium notatum*. *Catal. Lett.*, 147(1), 281-291.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 147, 237-250.

Remonatto, D., Miotti Jr, R. H., Monti, R., Bassan, J. C., & de Paula, A. V. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochem.*, 114, 1-20.

Ribeiro, T. B., Oliveira, A. L., Costa, C., Nunes, J., Vicente, A. A., & Pintado, M. (2020). Total and sustainable valorisation of olive pomace using a fractionation approach. *Appl. Sci.*, 10(19), 6785.

Rigo, E., Rigoni, R. E., Lodea, P., De Oliveira, D., Freire, D. M., Treichel, H., & Di Luccio, M. (2008). Comparison of two lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47(6), 1760-1765.

Rigo, E., Ninow, J. L., Tsai, S. M., Durrer, A., Foltran, L. L., Remonatto, D., Sychoski, M., Vardanega, R., de Oliveira, D., Treichel, H. & Di Luccio, M. (2012). Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. *Food Bioprocess Technol.*, 5(5), 1592-1600.

Riyadi, F. A., Alam, M. Z., Salleh, M. N., & Salleh, H. M. (2017). Thermostable and organic solvent tolerant lipase producing fungi in solid state bioconversion of palm kernel cake. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 25, 98-105.

Rivero, C.W. and Palomo, J.M. (2016). Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase at alkaline pH and their application in the regioselective deprotection of per-o-acetylated thymidine. *Catal.*, 6(8), 115.

Rocha, C., Soria, M. A. and Madeira, L.M. (2022). Olive mill wastewater valorization through steam reforming using multifunctional reactors: challenges of the process intensification. *Energies*, 15(3), 920.

Rodrigues, C., Cassini, S. T. A., s Antunes, P. W. P., Pinotti, L. M., de Pinho Keller, R., & Gonçalves, R. F. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *Afr. J. Biotechnol.*, 15(18), 759-767.

Rokni, Y., Ghabbour, N., Chihib, N. E., Thonart, P., & Asehraou, A. (2015). Caractérisation physico-chimique et microbiologique du processus de fermentation naturelle des olives vertes de la variété picholine marocaine. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6, 1740-1751.

Rong, C., Ma, Y., Wang, S., Liu, Y., Wang, L., Ma, K., Dou, S., Yang, Y. & Xu, F. (2015). *Penicillium chroogomphum*, a new species in *Penicillium* section *Ramosa* isolated from fruiting bodies of *chroogomphus rutilus* in China. *Mycosci.*, 57(1), 79-84.

Ruiz, B., Farrés, A., Langley, E., Masso, F., & Sánchez, S. (2001). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. *Lipids*, 36(3), 283.

S

Sabillón, L. and Bianchini, A. (2016). From field to table: a review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. *Cereal Chem.*, 93(2), 105-115.

Sajid, A., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: a review. *Microorganisms*, 11(2), 510.

Salgado, C.A., dos Santos, C.I.A. and Vanetti, M.C.D. (2022). Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry. *Food Biosci.*, 45, 101509.

Salgado, V., Fonseca, C., Lopes da Silva, T., Roseiro, J. C., & Eusébio, A. (2020). Isolation and identification of *Magnusiomyces capitatus* as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater. *Waste and biomass valorization*, 11, 3207-3221.

Salwoom, L., Raja Abd. Rahman, R. N. Z., Salleh, A. B., Mohd. Shariff, F., Convey, P., & Mohamad Ali, M. S. (2019). New recombinant cold-adapted and organic solvent tolerant lipase from psychrophilic *Pseudomonas* sp. LSK25, isolated from Signy Island Antarctica. *Inter. J. M. Sci.*, 20(6), 1264.

Sameh, A. G., Rehab, M. A. E. B., Abo, B. F. A., & Gamal, F. M. G. (2016). In vitro evaluation of probiotic potential of five lactic acid bacteria and their antimicrobial activity against some enteric and food-borne pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 10(12), 400-409.

Sankaran, R., Show, P.L. and Chang, J. (2016). Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 10(6), 896-916.

Sarac, N., Ugur, A., Boran, R., & Elgin, E. S. (2015). The use of boron compounds for stabilization of lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ES3 for the detergent industry. *J. Surfactants Deterg.*, 18(2), 275-285.

Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., & Bhushan, I. (2017). Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electron. J. Biotechnol.*, 30, 33-38.

Sarda, L. and Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, 30(3), 513-521.

- Sattar, H., Aman, A. and Qader, S.A.U. (2018). Agar-agar immobilization: an alternative approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 111, 917-922.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods*, 52(1), 1-18.
- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S., & Gargouri, Y. (2001). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. *Biochim.*, 83(9), 863-871.
- Seifert, K. A., Samson, R. A., Dewaard, J. R., Houbraken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J. M., Loui-Seize, G. & Hebert, P. D. (2007). Prospects for fungus identification using *COI* DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(10), 3901-3906.
- Serdakowski, A.L. and Dordick, J.S. (2008). Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol.*, 26(1), 48-54.
- Sharma, S. and Kanwar, S.S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci. World J.*, 2014.
- Siebenhaller, S., Gentes, J., Infantes, A., Muhle-Goll, C., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Ochsenreither, K. & Syltatk, C. (2018). Lipase-catalyzed synthesis of sugar esters in honey and agave syrup. *Front. Chem.*, 6, 24.
- Sikora, A., Chełminiak-Dudkiewicz, D., Ziegler-Borowska, M., & Marszał, M. P. (2017). Enantioseparation of (RS)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry*, 28(2), 374-380.
- Simões, L., Fernandes, N., Teixeira, J., Abrunhosa, L., & Dias, D. R. (2023). Brazilian table olives: a source of lactic acid bacteria with antimycotoxigenic and antifungal activity. *Toxins*, 15(1), 71.
- Singh, A.K. and Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166(2), 48-520.
- Singh, B., Parsaik, A. K., Mielke, M. M., Erwin, P. J., Knopman, D. S., Petersen, R. C., & Roberts, R. O. (2014). Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimer's Disease*, 39(2), 271-282.
- Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, (2019). Chapter 18 - Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment', in S. Das and H.R. Dash (eds) *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press, 323-332.
- Small, D.M. (1968). A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45(3), 108-119.
- Soleimani, M. A., Naghizadeh, R., Mirhabibi, A. R., & Golestanifard, F. (2012). Effect of calcination temperature of the kaolin and molar Na₂O/SiO₂ activator ratio on physical and microstructural properties of metakaolin based geopolymers. *Iran. J. Mater. Sci. Eng.*, 9(4), 43-51.
- Solomakou, N. and Goula, A.M. (2021). Treatment of olive mill wastewater by adsorption of phenolic compounds. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.*, 20(3), 839-863.
- Song, X., Qi, X., Hao, B., & Qu, Y. (2008). Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110(12), 1095-1101.
- Stöcklein, W., Sztajer, H., Menge, U., & Schmid, R. D. (1993). Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metabol.*, 1168(2), 181-189.

Suci, M., Arbianti, R. and Hermansyah, H. (2018). Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci* , 105(1), 012126.

Sugihara, A., Shimada, Y., Takada, N., Nagao, T., & Tominaga, Y. (1996). *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *J. Ferment. Bioeng.*, 82(5), 498-501.

Sumarsih, S., Hadi, S., Adhiningsih, R. T., & Prasetyo, F. E. (2020). Characterization and lipase production of *Micrococcus* sp. L69 isolated from palm oil-contaminated soil. *Asian J. Water Environ. Pollut.*, 17(3), 77-80.

T

Taher, H., & Al-Zuhair, S. (2017). The use of alternative solvents in enzymatic biodiesel production: a review. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 11(1), 168-194.

Tan, T., Zhang, M., Xu, J., & Zhang, J. (2004). Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochem.*, 39(11), 1495-1502.

Tan, Z. B., Li, J. F., Li, X. T., Gu, Y., Wu, M. C., Wu, J., & Wang, J. Q. (2014). A unique mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*: heterologous expression, biochemical characterization and molecular basis for its substrate selectivity. *PLoS One*, 9(7), e102040.

Tanasković, S. J., Jokić, B., Grbavčić, S., Drvenica, I., Prlainović, N., Luković, N., & Knežević-Jugović, Z. (2017). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. *Appl. Clay Sci.*, 135, 103-111.

Taskin, M., Ucar, M. H., Unver, Y., Kara, A. A., Ozdemir, M., & Ortucu, S. (2016). Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 8, 97-103.

Thangaraj, B., Solomon, P. R., Muniyandi, B., Ranganathan, S., & Lin, L. (2019). Catalysis in biodiesel production-a review. *Clean Energy*, 3(1), 2-23.

Thangaraj, B. and Solomon, P.R. (2019). Immobilization of lipases - a review. Part I: enzyme immobilization. *Chem. Bio. Eng. Reviews*, 6(5), 157-166.

Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., Johnson, T. & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Mol. Biotechnol.*, 61(8), 579-601.

Tiss, A., Miled, N., Verger, R., Gargouri, Y., & Abousalham, A. (2004). Digestive lipases inhibition: an in vitro study', in *Lipases and Phospholipases in Drug Development*. John Wiley & Sons, Ltd, 155-193.

Tiss, A., Carrière, F. and Verger, R. (2001). Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Anal. Biochem.*, 294(1), 36-43.

Toghueo, R.M.K. and Boyom, F.F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10(3), 107.

Torres, J. A., Silva, M. C., Lopes, J. H., Nogueira, A. E., Nogueira, F. G. E., & Corrêa, A. D. (2018). Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 114, 1279-1287.

Trbojević Ivić, J., Veličković, D., Dimitrijević, A., Bezbradica, D., Dragačević, V., Gavrović

Jankulović, M., & Milosavić, N. (2016). Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry. *J. Sci. Food Agric.*, 96(12), 4281-4287.

Tsikis, S. T., Fligor, S. C., Secor, J. D., Yu, L. J., Pan, A., Mitchell, P. D. & Puder, M. (2022). An in-line digestive cartridge increases enteral fat and vitamin absorption in a porcine model of short bowel syndrome. *Clin. Nutr.*, 41(5), 1093-1101.

Turati, D. F. M., Almeida, A. F., Terrone, C. C., Nascimento, J. M., Terrasan, C. R., Fernandez-Lorente, G. & Carmona, E. C. (2019). Thermotolerant lipase from *Penicillium* sp. section *Gracilenta* CBMAI 1583: Effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 17, 15-24.

U

UNESCO - Mediterranean diet (2013). Available at: <https://ich.unesco.org/en/RL/mediterranean-diet-00884> (Accessed: 23 March 2023).

UNITÉ D'ÉCONOMIE ET DE PROMOTION (2023) *International Olive Council*. Available at: <https://www.internationaloliveoil.org/nos-missions/economic-affairs-promotion-unit/?lang=fr/> (Accessed: 23 March 2023).

Uppada, S. R., Akula, M., Bhattacharya, A., & Dutta, J. R. (2017). Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 15(2), 331-334.

Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., & Jones, T. A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2(4), 293-308.

Ülker, S., & Karaoğlu, Ş. A. (2012). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.*, 114(4), 385-390.

V

Verger, R., Pattus, F., Pieroni, G., Riviere, C., Ferrato, F., Leonardi, J., & Dargent, B. (1984). Regulation by the “interfacial quality” of some biological activities. *Colloids Surf.*, 10, 163-180.

Verger, R. (1997). Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, 15(1), 32-38.

Verger, R. and de Haas, G.H. (1973). Enzyme reactions in a membrane model 1: A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chemi. Physic. Lipids*, 10(2), 127-136.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G. & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, 78, 343-371.

W

Wang, H., Peng, X., Zhang, H., Yang, S., & Li, H. (2021). Microorganisms-promoted biodiesel production from biomass: a review. *Energy Convers. Manage.t: X*, 12, 100137.

- Wang, J., Zhao, Y., Li, D., Qi, P., Gao, X., Guo, N., Meng, R., E.Tucker, M., Yan, H. & Han, Z. (2022). Extreme halophilic bacteria promote the surface dolomitization of calcite crystals in solutions with various magnesium concentrations. *Chemi. Geol.*, 606, 120998.
- Wang, Z., Liu, L., Liu, L., Liu, T., Li, C., & Sun, L. (2019). 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol characterization by three processing methods. *Inter. J. Food Prop.*, 22(1), 1156-1171.
- Weetall, H.H. and Pitcher, W.H. (1986). Scaling up an immobilized enzyme system. *Sci.*, 232(4756), 1396-1403.
- Whangsuk, W., Sungkeeree, P., Thiengmag, S., Kerdwong, J., Sallabhan, R., Mongkolsuk, S., & Loprasert, S. (2013). Gene cloning and characterization of a novel highly organic solvent tolerant lipase from *Proteus* sp. SW1 and its application for biodiesel production. *Mol. Biotechnol.*, 53, 55-62.
- Whiting, A.K. and Peticolas, W.L. (1994). Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. *Biochem.*, 33(2), 552-561.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A. and Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343(6260), 771-774.
- Wirth, F. and Goldani, L.Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2012, e465717.

Y

- Yadav, R.P., Agarwal, P. and Upadhyay, S.N. (2000). Microbial lipases: tool for drug discovery', *JSIR Vol.59(12) [December 2000]* [Preprint].
- Yalçinkaya, S. and Kılıç, G.B. (2019). Isolation, identification, and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. *J. Food Sci. Technol.*, 56(4), 2027-2037.
- Yang, W., Cao, H., Xu, L., Zhang, H., & Yan, Y. (2015). A novel eurythermic and thermostable lipase LipM from *Pseudomonas moraviensis* M9 and its application in the partial hydrolysis of algal oil. *BMC Biotechnol.*, 15(1), 94.
- Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., & Yan, Y. (2016). A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization, and application for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 126, 76-89.
- Yang, X., Liu, J., Mei, J., Jiang, R., Tu, S., Deng, H., Liu, J., Yang, S. & Li, J. (2021). Origins, structures, and bioactivities of secondary metabolites from marine-derived *Penicillium* fungi. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 21(15), 2000-2019.
- Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. *Front. Microbiol.*, 12, 743377.
- Yele, V.U. and Desai, K. (2015). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175(2), 855-869.
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud. Mycol.*, 78, 175-341.

Z

- Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zafarullah, M., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., & Pan, S. (2019). Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner mongolian fermented cheese against foodborne pathogens. *Pathogens*, 8(2), 71.
- Zaier, H., Chmingui, W., Rajhi, H., Bouzidi, D., Roussos, S., & Rhouma, A. (2017). Physico-chemical and microbiological characterization of olive mill wastewater (OMW) of different regions of Tunisia (North, Sahel, South). *J. New Sci. Agric. Biotechnol.*, 48(2), 2897-2906.
- Zhang, J., Chen, H., Wang, Z., Xu, H., Luo, W., Xu, J., & Lv, P. (2022). Heat - induced overexpression of the thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* in *E. coli* by fermentation and its application in preparation biodiesel using rapeseed oil. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 69(5), 1812-1820.
- Zhang, K. P., Lai, J. Q., Huang, Z. L., & Yang, Z. (2011). *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresourc. Technol.*, 102(3), 2767-2772.
- Zhao, H. and Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol. Biol. Cell*, 23(15), 2823-2830.
- Zhao, J., Liu, S., Gao, Y., Ma, M., Yan, X., Cheng, D., Wan, D., Zeng, Z., Yu, P. & Gong, D. (2021). Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2, 4-D butyl ester. *Int. J. Biol. Macromol.*, 176, 126-136.
- Zorn, K., Oroz-Guinea, I., Brundiek, H., & Bornscheuer, U. T. (2016). Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update. *Prog. Lipid Res.*, 63, 153-164.
- Zucca, P. and Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139-14194.

Annexe 1

Résultat du séquençage des 3 gènes (*ITS*, *benA* et *CaM*):

> ITS1-5.8S-ITS2 region (879 bp)

ATGGCTCAGTGAGGCCTTGGGATTGGCTTAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCCAGAGCCGAAAAC
TTGGTCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTT
GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGC
CGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG
TGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCC
CGATCTCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTTCGAGCGTATGGG
GCTTTGTCAACCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAA
CCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTC
CTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTG
GAACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTTCC

> β -Tubulin (*benA*) gene (480 bp)

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAA
TTGACAGGTTCCCTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATG
GACAGTAAGTTTTAACAGTGATAGGGGTTTCCGGTGGATTACACATCTGATATCTTCCTAGGTA
CAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTCCAACG
ACAGGAAACCGAATAATAGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTGATAATCTAGGCCAGCGG
TGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGC
TCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTA
ACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

> Calmodulin (*cmd*) gene (454 bp)

CCGAGTACAAGGAGGCCTTCTCCCTGTTTGTGAGTGATTCCACCTATAAATCGAAGACGTGAAG
GTCGAAAATGCTGACCGGAAGTTTGTGTTTGTGCGGAATAGGACAAGGATGGCGATGGTACGTG
ATGGTCGCCCCCCCCGACAGCTCAGTCGAGCCCACGACAGTGTCTCTGCGATCGAATTTCAAGA
GAAACGTATTCTAACATACAATTCTCCCAATAGGACAAATCACCACCAAGGAGCTTGGCACCGT
CATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGTTGCAGGATATGATCAACGAGGTTGAC
GCCGACAACAACGGCACCATTGACTTCCCTGGTACTTAACCATAACCCACTGATATAAACGAGA
GACGGCTATTGACGTGCGATAGAATTCTCACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGACACCGATT
CCGAGGAGGAGATCCGCGAGGCATTCAAGGTTTTCGATCGCGATAACAACGGTTTCATTTCCGC
CGCCGAGCTGCGCCACGTCATGACCTCCATCGG

Annexe 2

Une partie du génome entier de la souche *Penicillium crustosum* Thom P22 contient la séquence codante pour PCrL

DNA: cgttcttgttccatattttgaattcataatgcttaaatcacgtatgggtataagtcctatgctcaattctctaaatgatattcttctgtatttttatagcttattatatttaaattagatattgacacagctattgaatcgtcttgcaac
ggagcgggttaacgggtgagccacggccgtcgaaatttaattgggaaatctctcgtactacggccccattctctgctgcttcaagacataaacactcgccaaagtgggttcacgggttagttatttagcaatttttagttagtgcagatgcttctggcacc
+1fr: R·S·C·S·C·S·I·F·*·I·H·N·A·*·I·T·Y·G·I·S·L·C·S·S·I·L·*·M·I·S·L·L·I·L·*·L·I·I·F·K·L·D·I·E·Q·L·L·N·R·L·A·R·S
·G·L·T·V·S·Q·A·V·E·I·*·Y·G·K·I·L·R·T·T·A·P·F·L·C·F·K·T·*·T·S·P·K·W·F·T·G·S·Y·*·Q·F·*·L·V·H·D·G·F·R·H·
+2fr: ·V·L·V·P·Y·F·E·F·I·M·L·K·S·R·M·V·*·V·Y·A·Q·F·S·K·*·Y·L·C·L·F·Y·S·L·L·Y·L·N·*·I·L·N·S·Y·*·I·V·L·H·G·
A·G·*·R·*·A·R·P·S·K·F·N·M·G·K·S·S·V·L·R·P·H·F·C·A·S·R·H·K·H·R·Q·S·G·S·R·V·V·I·S·N·F·D·*·F·T·M·A·F·G·T·
+3fr: ·F·L·F·H·I·L·N·S·*·C·L·N·H·V·W·Y·K·S·M·L·N·S·L·N·D·I·F·A·Y·F·I·A·Y·Y·I·*·I·R·Y·*·T·A·I·E·S·S·C·T·E·
R·V·N·G·E·P·G·R·R·N·L·I·W·E·N·P·P·Y·Y·G·P·I·S·V·L·Q·D·I·N·I·A·K·V·V·H·G·*·L·L·A·I·L·I·S·S·R·W·L·S·A·H·

DNA: atatgtctcagcggcctgggtcccatcaggtgtgaagatcaaatgaggctttgaagcctataggttagtacttgcaactcgctgggctgttatcgccatactggtaaacggagaaatccacggagattccccgaatggttcatttgtaaat
tacctgtgatggcttctgactctataactatgcattacgttttgggatgtcatcccgacgcagctccaattggcgccacattggccacacttccctgcaatttagtgtgcaaatatagcgacaacagtagtcagtgaggacgtttgagggg
+1fr: ·I·C·L·S·S·G·L·L·V·P·G·V·K·I·K·*·G·F·E·A·Y·R·*·Y·L·H·S·L·G·L·L·S·P·Y·W·*·T·E·K·S·T·E·I·P·R·M·V·H·L·*·I·
·T·L·H·D·G·F·L·T·L·Y·Y·A·L·P·V·W·D·V·I·P·D·A·V·H·I·A·P·H·S·A·T·F·P·A·F·S·V·Q·I·*·R·Q·R·V·R·W·D·F·E·G·
+2fr: ·Y·V·S·A·A·W·S·H·T·V·*·R·S·N·E·A·L·K·P·I·G·S·T·C·T·R·W·G·C·Y·R·H·T·G·K·P·R·N·P·R·R·F·P·E·W·F·I·C·K·
L·P·C·M·M·A·S·*·L·Y·T·M·H·Y·L·F·G·M·S·S·P·T·Q·S·T·W·R·H·I·R·P·P·S·L·H·L·V·C·K·Y·S·D·N·E·Y·D·G·T·L·R·G·
+3fr: ·M·S·Q·R·P·G·P·I·R·C·E·D·Q·M·R·L·*·S·L·*·V·V·L·A·L·A·G·A·V·I·A·I·L·V·N·R·E·I·H·G·D·S·P·N·G·S·F·V·N·
Y·L·A·*·W·L·P·D·S·I·L·C·I·T·C·L·G·C·H·P·R·R·S·P·L·G·A·T·F·G·H·L·P·C·I·*·C·A·N·I·A·T·T·S·T·M·G·L·*·G·V·

DNA: tacctgaagaattatttaaagacgaagataacccccacacaattttctgttggcatccaaagacaacgggtccagcagccttctcgaagtagttctataacacccctcatacattgtttcgatattgttggttcaactaccaatctttact
cgtgggagctctctgatctctcgaagccctgtctgcacctattttggagtcgagggcaactgctggtatgtcatattatcagccagctccattcgactaggcagctctaacattttctcaagacgcgcgcttccctgatctgcacgg
+1fr: ·Y·L·K·N·Y·L·K·S·K·I·T·P·H·N·F·L·F·V·H·P·K·T·T·V·Q·Q·P·P·S·S·R·V·F·Y·N·T·L·I·H·C·F·D·**M·L·F·N·Y·Q·S·I·I**
V·G·V·S·L·I·S·Q·A·L·S·A·P·I·L·E·S·R·A·T··G·M·S·I·Y·Q·P·S·S·T·R·L·G·S·S·N·I·F·S·R·R·R·C·L·P·*·S·A·P·
+2fr: ·T·*·R·I·I·*·R·A·R·*·P·H·T·I·F·C·L·C·I·Q·R·Q·R·S·S·L·P·Q·E·Y·S·I·T·P·S·Y·I·V·I·S·I·C·C·S·T·T·N·L·Y·
S·W·E·S·L·*·S·L·K·P·C·L·H·L·F·W·S·R·G·Q·L·L·V·C·Q·F·P·S·S·P·A·P·F·D·*·A·A·L·T·T·P·F·D·**·A·A·A·F·P·D·L·H·S**
+3fr: ·P·E·E·L·F·K·E·Q·D·N·P·T·Q·P·S·V·C·A·S·K·D·N·G·P·A·A·F·L·K·S·I·L·*·H·P·H·T·L·F·R·Y·V·V·Q·L·P·I·F·T·
R·G·S·L·S·D·L·S·S·P·V·C·T·Y·F·G·V·E·G·N·C·W·Y·V·N·L·S·A·Q·L·H·S·T·R·Q·L·*·H·F·L·K·T·P·L·P·S·L·I·C·T·V·

DNA: tgcagcaagcttttctccgctgcctacacaggttgatcggaaggccttcgatgtcactataccaagaggatttatgacctgtagccacaccaatgatgagcgtgggtattttgacctatacgttggcaataactaatttcaatag
ggattcgtcggaatactccacggagagaagaagaccatcgcggtcatcatgaggggctgcactaccagtagtggaacaaatcacttcttaataactagctcaacatgctaattaatccagtcacccgacttctgtaacgacattgacattgctctcat
S·W·E·S·L·*·S·L·K·P·C·L·H·L·F·W·S·R·G·Q·L·L·V·C·Q·F·P·S·S·P·A·P·F·D·*·A·A·L·T·T·P·F·D·**·A·A·A·F·P·D·L·H·S**
+1fr: ·Q·Q·S·F·L·P·L·P·T·Q·V·A·S·E·R·P·S·M·S·L·S·P·R·G·F·M·T·S·*·P·T·P·M·*·A·W·Y·L·P·Y·T·L·A·N·N·*·F·Q·*·
G·F·V·G·Y·S·T·E·K·K·T·I·A·V·I·M·R·G·S·T·T·S·M·A·K·S·L·L·N·T·S·S·T·C·*·L·I·Q·S·P·T·S·*·T·T·L·T·L·L·S·S·
+2fr: **A·A·F·L·S·S·A·**·**Y·T·G·C·I·G·H·A·P·D·V·T·I·T·K·R·I·Y·D·L·V·T·D·T·N·V·S·V·V·F·A·L·Y·V·G·F·**·L·I·S·I·
G·I·R·R·I·L·S·H·R·E·E·D·H·R·G·H·H·E·G·L·D·Y·Q·Y·G·K·I·T·S·*·Y·*·**·N·M·L·I·H·E·V·T·D·F·V·N·D·I·D·I·A·L·**
+3fr: ·Q·Q·S·F·L·P·L·P·T·Q·V·A·S·E·R·P·S·M·S·L·S·P·R·G·F·M·T·S·*·P·T·P·M·*·A·W·Y·L·P·Y·T·L·A·N·N·*·F·Q·*·
G·F·V·G·Y·S·T·E·K·K·T·I·A·V·I·M·R·G·S·T·T·S·M·A·K·S·L·L·N·T·S·S·T·C·*·L·I·Q·S·P·T·S·*·T·T·L·T·L·L·S·S·

DNA: cactcctgagctctcggcggtgactttccctctgatgtgaagatcatgagaggtgttcacagaccttggctcgctgtacacgacaccatactactgaagtcaaggctctcattggaagtaccctgattacactctggaggcagtcg
gacattccctcgtggtgctccctcaacatccattggcccaactgtccctgcccagcaactcccgacaaagcttccctcgaagcagcgtggcgctgacttggtagtcgcaagcagcgtggcgtgacttggtagtcgcaagcagcgtggcgtgactt
+1fr: ·H·S·*·A·L·G·R·D·F·P·L·L·*·C·E·D·H·E·R·C·S·Q·T·L·V·R·C·T·T·R·H·H·Y·*·S·Q·G·S·H·C·E·V·P·*·L·H·S·G·G·S·R·
·T·F·P·R·W·C·P·H·I·H·C·P·R·C·P·G·P·E·L·P·G·Q·V·T·C·Q·Q·C·P·*·R·L·P·H·R·Q·P·S·V·G·R·L·W·Y·C·A·G·R·Y·L·
+2fr: **·P·E·E·L·S·G·V·T·F·P·S·D·V·K·I·M·R·G·V·H·R·P·W·S·A·V·H·D·T·I·I·T·E·V·K·A·L·I·A·K·Y·P·D·Y·T·L·E·A·V·**
·E·S·L·G·G·A·L·T·S·A·B·V·A·L·A·Q·N·F·E·D·K·S·L·V·S·N·A·L·B·A·F·P·I·G·B·Q·A·W·A·D·F·G·T·A·Q·A·G·T·F
+3fr: ·L·L·S·S·R·A·*·L·S·P·L·M·*·R·S·*·R·Y·F·T·D·L·G·P·L·Y·T·P·L·P·S·L·L·K·S·R·L·S·L·R·P·S·T·L·I·T·L·L·W·R·Q·S·
D·I·P·S·V·V·P·S·H·P·L·P·T·L·P·W·P·R·T·S·R·T·S·H·L·S·A·M·P·L·T·P·S·P·S·A·T·K·R·G·P·T·L·V·L·R·R·P·V·P·S·

DNA: caaccgcggaataacgtttcttgacgggtgtccctgtaagccatggttgaactgacatgctatataaagttagctaacacatacacacagaaacatgtaactcgagcccgcttgtaacttcaagcactatggaacccgtgagttatctac
cgattcccccttttagatatacattgttcaatcgcttatcaaccataaacctgcacaggaaatactacagctcgtggtaccgaggtgacacccgtgaagtgcgaaggccagcgtgacaagcttctgctctgccggcaatggcattgacgctgtaact
+1fr: ·Q·P·R·K·*·R·S·*·R·C·P·C·K·P·W·L·K·L·T·C·Y·I·K·V·A·N·H·T·T·Q·**·M·Y·S·S·P·L·V·N·F·K·H·Y·G·T·**·V·S·P·T·
·D·S·P·L·D·I·N·V·Q·S·L·I·N·H·N·H·A·Q·**·E·Y·Y·S·S·Q·T·E·A·S·T·V·K·C·S·G·Q·R·D·F·S·C·S·A·G·H·G·H·Y·A·V·T**
+2fr: **·N·R·G·N·N·V·L·D·G·V·F·V·S·H·G·***·N·*·H·A·I·L·K·*·L·T·I·Q·H·R·T·C·T·R·A·R·L·L·R·T·S·S·T·M·E·P·*·V·I·L·
P·I·P·L·*·I·S·M·F·N·R·L·S·T·I·T·M·H·R·N·T·T·A·L·V·P·R·L·A·P·*·S·A·K·A·S·V·T·S·L·A·L·P·A·M·A·C·T·L·S·L·
+3fr: ·T·A·E·I·T·P·L·T·V·S·L·*·A·M·V·E·T·D·M·L·Y·*·S·S·*·P·Y·N·T·E·H·V·L·E·P·A·C·*·L·Q·A·L·W·N·R·E·L·S·Y·
R·F·P·P·R·Y·Q·C·S·I·A·Y·Q·P·*·P·C·T·G·I·L·Q·L·W·Y·R·G·*·H·R·E·V·R·R·P·A·*·Q·V·L·L·C·R·Q·W·H·V·R·C·H·S·

DNA: cccggtcacatcgcaagctttggcgctgctgactgctggttggctatctgagctgagtagaccagaagcgaatatgacagcaatgttcgacacagatcacttattctgaggacagagcgacctcggataactaatatattatct
actgttctaatagttagtttataactatttggtagatattggatgggtggtcatccaaagcgatcagcgtgaataaaaaacactctgatttgaatcaattctactacatcatgacctattaagaatatagataagtcacatcaggtttcttttg
+1fr: **·P·G·E·I·A·S·F·G·V·H·L·T·A·G·C·G·Y·L·**·*·*·V·P·E·A·N·M·T·A·M·F·D·T·D·H·L·F·*·G·Q·S·D·L·G·*·L·I·Y·Y·L·
·L·L·F·*·*·L·V·Y·T·Y·L·C·I·L·D·G·W·S·S·K·A·I·S·V·I·K·I·H·L·I·*·N·Q·F·Y·Y·I·M·T·Y·*·E·Y·R·*·V·I·T·P·L·Y·L·
+2fr: ·P·V·T·S·Q·A·L·A·S·*·C·L·L·L·V·V·A·I·*·A·E·Y·Q·K·R·I·*·Q·Q·C·S·T·Q·I·T·Y·S·E·D·R·A·T·S·D·N·*·Y·I·I·
Y·C·S·N·S·*·F·I·L·I·C·V·Y·W·M·V·G·H·P·K·R·S·A·*·*·K·Y·I·*·F·E·I·N·S·T·T·S·*·P·I·K·N·I·D·K·S·S·R·F·F·C·
+3fr: ·R·S·H·R·K·L·W·R·R·D·A·Y·C·W·L·W·L·S·E·L·S·T·R·S·E·Y·D·S·N·V·R·H·R·S·L·L·L·R·T·E·R·P·R·I·T·N·I·L·S·
T·V·L·I·V·S·L·Y·L·P·V·Y·I·G·W·L·V·I·Q·S·D·Q·R·N·K·N·T·S·D·L·K·S·I·L·L·H·H·D·L·L·R·I·*·I·S·H·H·V·S·F·A·

Résumé

Une nouvelle lipase extracellulaire d'une souche de champignon filamenteux Ascomycète, a été isolée de margines d'olives et identifiée comme étant *Penicillium crustosum* Thom. La lipase de *P. crustosum* (PCrL) a été purifiée 63 fois à homogénéité en utilisant une précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie sur une colonne Q-Sepharose Fast Flow, avec un rendement total de 34%. La PCrL purifiée avait une masse moléculaire de 28 kDa, estimée par SDS-PAGE. Les 20 résidus d'acides aminés NH₂-terminaux ont montré un haut degré d'homologie avec ceux d'autres lipases de *Penicillium*. L'activité spécifique de la PCrL à pH 9 et 37°C s'est avérée être de 5 000 et 10 000 U/mg sur des émulsions d'huile d'olive et de trioctanoïne, respectivement. La PCrL présentait une régiosélectivité nette envers la position *sn*-1 des triglycérides et a montré une activité et une stabilité élevées en présence de solvants organiques non miscibles à l'eau, de tensioactifs et d'agents oxydants, et une compatibilité considérable avec les détergents de lessives commerciaux. L'immobilisation de la PCrL par encapsulation-adsorption augmente considérablement sa thermostabilité. L'enzyme immobilisée a été utilisée comme biocatalyseur dans une réaction d'estérification pour la synthèse d'ester méthylique en présence d'hexane. Par conséquent, la PCrL possède plusieurs propriétés intéressantes qui en font un candidat potentiel prometteur pour les formulations détergentes. Dans un autre volet, trois souches de bactéries lactiques isolées à partir de la saumure d'olives fermentées, ont été étudiées pour leur activité antimicrobienne contre les bactéries et levures pathogènes impliquées dans des maladies d'origine alimentaire. *Lb. plantarum* S62, sélectionnée comme la souche la plus efficace contre les pathogènes, a démontré son efficacité comme bio-conservateur contre les microorganismes pathogènes dans le lait et dans la feuille de Pastilla.

Mots clés : Margines d'olive, huile d'olive, lipase, *Penicillium*, régiosélectivité, immobilisation, formulation détergente, bactéries lactiques, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, activité antimicrobienne, biopréservation.

Abstract

A novel extracellular lipase from a filamentous fungus Ascomycote was isolated from olive mill wastewater and identified as *Penicillium crustosum* Thom. *Penicillium crustosum* lipase (PCrL) was purified 63-fold to homogeneity using ammonium sulfate precipitation and chromatography on a Q-Sepharose Fast Flow column, with a total yield of 34%. The purified PCrL had a molecular mass of 28 kDa, estimated by SDS-PAGE. The 20 NH₂-terminal amino-acid residues showed a high degree of homology with those of other *Penicillium* lipases. The specific activity of PCrL at pH 9 and 37°C was found to be 5000 and 10,000 U/mg on olive oil and trioctanoin emulsions, respectively. PCrL exhibited a clear regioselectivity toward the *sn*-1 position of triglycerides and showed high activity and stability in the presence of water-immiscible organic solvents, surfactant, and oxidizing agents, and considerable compatibility with commercial laundry detergents. Immobilization of PCrL by encapsulation-adsorption considerably increases its thermostability. The immobilized enzyme was used as a biocatalyst in an esterification reaction for the synthesis of methyl ester in the presence of hexane. Therefore, PCrL has several attractive properties that make it a promising potential candidate for detergent formulations. In another section, three strains of lactic acid bacteria isolated from fermented olive brine, were studied for their antimicrobial activity against pathogenic bacteria and yeast involved in foodborne diseases. *Lb. plantarum* S62, selected as the most efficient strain against pathogens, has demonstrated its effectiveness as a bio-preservative against pathogenic microorganisms in milk and in Pastilla leaf.

Keywords: Olive mill wastewater, olive oil, lipase, *Penicillium*, regioselectivity, immobilization, detergent formulation, lactic acid bacteria, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, antimicrobial activity, biopreservation.