



institut français de recherche scientifique  
pour le développement en coopération

**Centre  
de  
Montpellier**

ISOLEMENT, IDENTIFICATION  
ET PHYSIOLOGIE  
DES CHAMPIGNONS THERMOPHILES  
EN VUE DE LA PRODUCTION  
DE LIPASES PAR FERMENTATION  
EN MILIEU SOLIDE

Jesus Antonio  
CORDOVA LOPEZ

Jesus Antonio CORDOVA LOPEZ

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET PHYSIOLOGIE  
DES CHAMPIGNONS THERMOPHILES  
EN VUE DE LA PRODUCTION  
DE LIPASES PAR FERMENTATION  
EN MILIEU SOLIDE

Les opinions exprimées dans ce document  
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

Ce travail a fait l'objet d'une thèse présentée à l'université des Sciences et Techniques du Languedoc-Montpellier-II, dans la spécialité : biochimie et biologie moléculaire, le 16 juin 1998.

© Orstom, 1998, centre de Montpellier

**N° d'Identification:**

ACADEMIE DE MONTPELLIER

**UNIVERSITE MONTPELLIER II**

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

**THESE**

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés. Agronomie. Environnement

**ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET PHYSIOLOGIE DES  
CHAMPIGNONS THERMOPHILES EN VUE DE LA PRODUCTION  
DE LIPASES PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE**

par

**CORDOVA LOPEZ Jesus Antonio**

Maestro en Biotecnologia, UAM-I, Mexique

(boursier Conacyt-Sfère)

**Date de soutenance le 16 Juin 1998 devant le Jury composé de :**

MM. BARATTI Jacques, Professeur, Université Aix-Marseille II	Rapporteur
BENSOUSSAN Maurice, Maître de Conférences, ENSBANA, Dijon	Rapporteur
NAVARRO Jean-Marie, Professeur, Université de Montpellier II	Président
RAIMBAULT Maurice, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Examineur
ROUSSOS Sévastianos, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse



A ceux qui atteignent leur but  
par leurs propres mérites.

Avec tout mon cœur pour mes parents  
Hortencia et Nabor, ma très chère tante  
Rosa, mes frères et toute ma grande  
famille qui, malgré la distance, m'ont  
beaucoup soutenu moralement. De ce  
côté de la terre, merci infiniment à mes  
amis E. Brasselet et L. Valles pour leur  
appui constant, leur amitié et leur  
amour. Parce que finalement, le contenu  
de cette thèse est un reflet de l'amour...



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) à Montpellier, sous la direction scientifique de Monsieur **Sébastianos ROUSSOS**, Directeur de Recherche à l'ORSTOM. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour m'avoir offert son soutien quotidien et pour m'avoir assuré la direction scientifique de ce travail. Sa grande expérience scientifique, ses avis éclairés et son respect des initiatives personnelles ont constitué un appui constant.

Je remercie les membres du jury pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail :

C'est avec plaisir que je remercie Monsieur **Jacques BARATTI** Professeur à l'Université Aix-Marseille II. D'une part, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant un petit stage d'un mois et demi, que j'ai beaucoup apprécié, même si les résultats de ce travail ne sont pas contenus dans ce mémoire. D'autre part, pour l'honneur qu'une personne de sa qualité scientifique, ait accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

Que Monsieur **Maurice BENSOUSSAN**, Maître de Conférences à l'ENSBANA, qui me fait le grand honneur d'évaluer ce travail, reçoive ici toute ma profonde reconnaissance.

Toute ma reconnaissance est également adressée à Monsieur **Jean-Marie NAVARRO**, Professeur à l'Université de Montpellier II, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Finalement, je remercie vivement la participation de Monsieur **Maurice RAIMBAULT** comme membre du jury, ainsi que, pour ses commentaires sur la valorisation de mes résultats, ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

D'ailleurs, toute ma profonde gratitude et reconnaissance sont adressées pour mes professeurs mexicains qui ont participé activement à ma formation scientifique. Parce que, finalement, sont eux, qui ont édifié les bases de cette formation. Je ne pourrais jamais assez les remercier pour le temps et la confiance déposée sur moi. Cependant, je voudrais les citer dans un ordre chronologique, ma profonde gratitude aux MM. **Carlos LEYVA**, **Jorge GOMEZ**, **Ernesto FAVELA**, **Mariano GUTIERREZ**, **Gustavo VINIEGRA** et **Gerardo SAUCEDO**.

Un grand merci à F. AMPE et à J. PINTADO pour leurs corrections et leurs judicieuses remarques. Une attention toute particulière pour Mme. N. PUJET, pour sa grande disponibilité et gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail et plus particulièrement aux stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer, J.P. DIMBOUR, F. FRAGNE et M. NEMMAOUI. Je remercie vivement tous mes collègues et



amis de laboratoire : Angeles, Wafâa, Alvaro, Loubna, Nadra, Sylvain, Eric, Fathi, John, Valérie, Laure, Romina, Nabil, Juliette, Jean-Pierre, Jean-Luc, Florencio, Marlene et Pierre.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux gouvernements Mexicain (CONACYT) et Français (SFERE) pour le financement de mes études. Particulièrement à **CONACYT** pour m'avoir attribué une bourse ce qui m'a grandement facilité la vie.

Enfin, je n'oublierai pas de citer tous mes amis avec qui j'ai partagé des agréables moments pendant mon séjour en France : Chuy, Patrick, Octavio, Hector E., Pascal, Bruno, Thierry, Hector, Maricruz, Angel, Roxana, Roc, Sylvian, Alain, Xavier, Sabine, Line, et tous les autres...Je vous garde dans mon cœur.

## Résumé

La question initiale de ce travail a été la suivante: existe-t-il dans la nature des champignons filamenteux capables de se développer à des températures élevées et de produire des enzymes thermostables ayant des caractéristiques spécifiques? Pour répondre à cette question, notre travail s'est déroulé en trois étapes:

1. l'isolement et l'identification de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles à partir de biotopes tropicaux;
2. la description de leurs besoins nutritionnels et de leurs potentialités métaboliques en vue de sélectionner une souche capable de produire des lipases thermostables par Fermentation en Milieu Solide (FMS).
3. la production de lipases dans différentes conditions de cultures en milieux liquides ou en milieux solides, en présence d'inducteurs de lipases, et en utilisant des sous-produits agricoles comme la bagasse de canne à sucre, les grignons d'olive ou le tourteau de coprah.

A partir de différents biotopes, essentiellement de sols tropicaux mexicains, 44 souches de champignons filamenteux ont été isolées à une température d'incubation de 50°C et identifiées comme *Rhizomucor pusillus* (19), *Rhizopus microsporus* (6), et *Aspergillus fumigatus* (19). Parmi les souches de *Rhizopus microsporus*, deux appartiennent à une nouvelle variété. Toutes les souches se cultivent très bien à 50°C sur des milieux gélosés contenant de l'amidon, des protéines ou des lipides comme unique source de carbone et d'énergie. L'étude physiologique des souches a montré qu'elles sont soit thermophiles, soit thermotolérantes et qu'elles se développent à des températures très élevées (60°C) pour des champignons. Ces souches sporulent abondamment en surface (10<sup>8</sup> spores/cm<sup>2</sup>) et par ailleurs, elles produisent différentes enzymes en particulier des estérases et des lipases actives à pH et températures élevés.

La production la plus élevée de lipases (6 U/ml) a été obtenue pour la souche *Rh. microsporus* 13a après 26 heures de culture en milieu liquide et la majorité de ces lipases (90%) sont intracellulaires. Cependant, les lipases produites présentent de nouvelles caractéristiques catalytiques, notamment une activité à des pH alcalins et à des températures élevées (>80°C).

La culture des champignons thermophiles en FMS sur de la bagasse de canne à sucre imbibée d'un milieu nutritif a montré un métabolisme fongique extrêmement rapide. La croissance du mycélium, suivie par respirométrie, et la biosynthèse de lipases démarrent respectivement à 4 et à 6 heures de culture, avec une production maximale de lipases après seulement 12 heures. Cependant, cette activité enzymatique disparaît rapidement. L'activité lipase la plus importante (62 U/gSupport Solide) a été obtenue pour *Rhizomucor miehei*. La présence dans le milieu de culture de différents composés rapportés comme des inducteurs, inhibe la production de lipases de *Rh. pusillus* (16a). Par contre, l'huile d'olive et l'acide oléique incorporés dans le milieu solide induisent cette production qui augmente de 6 et 8 fois respectivement.

L'incorporation de sous-produits solides, de l'industrie de l'huile, à la bagasse de canne à sucre, utilisée comme support pour les FMS, augmente sensiblement la production et la stabilité des lipases. Notamment pour *Rh. microsporus* (souche 13a) et *Rh. miehei*, l'addition de grignons d'olive ou de tourteau de coprah a permis d'augmenter sensiblement la production de lipases (140 U/gSS). Ces productions très élevées de lipases thermostables par des champignons thermophiles confirme notre hypothèse initiale et ouvre de nouvelles utilisations des FMS pour produire des enzymes fongiques et valoriser ainsi les sous-produits agricoles solides.

**Mots clés:** Champignons thermophiles, taxonomie, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus miehei*, *Aspergillus fumigatus*, lipases, respirométrie, indice de sporulation, fermentation en milieu solide, bagasse de canne à sucre, tourteau de coprah, grignons d'olive, inducteurs.

## Abstract

### Title: Isolation, identification and physiology of thermophilic fungi for lipases production by Solid State Fermentation

The initial question of this thesis was the following: Are there filamentous fungi capable to develop at high temperatures and to produce thermostable enzymes with specific characteristics? This question was addressed in three points:

1. Isolation and identification of new strains of thermophilic fungi from tropical biotopes.
2. Description of their nutritional and metabolic potentialities in order to select a strain capable of producing a thermostable lipases by Solid State Fermentation (SSF).
3. Lipases production in different culture conditions: in liquid or on solid culture media, in the presence of lipases inducers, using solid agricultural wastes as sugarcane bagasse, copra cake and "grignon" which is an olive solid waste.

Forty-four strains of filamentous fungi were isolated at 50°C from different biotopes (essentially from Mexican tropical soils) and identified as *Rhizomucor pusillus* (19), *Rhizopus microsporus* (6) and *Aspergillus fumigatus* (19). Two of the isolated strains of *Rhizopus microsporus*, belong to a new variety. All strains grew rapidly at 50°C on agar culture media containing starch, proteins or lipids as unique carbon and energy source. The physiological study of these strains showed that they are thermophilic or thermotolerant and can develop at very high temperatures for fungi (60°C). These strains sporulate abundantly in surface ( $10^8$  spores/cm<sup>2</sup>) and furthermore, they produced esterases and lipases of potentially high interest.

The higher production of lipases (6 U/ ml) was obtained for the strain *Rh. microsporus* 13a after 26 hours of culture in liquid medium and the majority of the enzymes produced (90%) was intracellular. These lipases exhibited new catalytic characteristics: in particular they were active at high pH (9.0) and high temperatures (>80°C).

The culture of thermophilic fungi in Solid State Fermentation (SSF) on sugarcane bagasse impregnated with a nutritional medium demonstrated an extremely rapid metabolism of these micro-organisms. The growth of the mycelium, followed by respirometry, and the biosynthesis of lipases started after 4 and to 6 hours of culture respectively. The maximum lipases production was obtained after 12 hours. However, this activity rapidly disappeared afterwards. The higher lipases production (62 U/g Dry Support) was obtained with *Rhizomucor miehei* strains. Also, the presence in the culture medium of different compounds reported as lipase inducers, inhibited the lipases production of *Rh. pusillus* (16a). On the other hand, olive oil and oleic acid incorporated in the solid culture medium induced this production (6 and 8 times respectively).

The solid by-product of oil industry incorporated to the sugarcane bagasse, used as a support for SSF, increased appreciably both the production and the stability of the lipases. Notably, for *Rh. microsporus* 13a and *Rh. miehei*, the addition of "olive grignon" or copra cake into the culture medium, strongly induced the production of lipases (140 U/gDS). This very high production of thermostable lipases by thermophilic fungi confirms our initial question and opens new area of SSF to produce fungal enzymes and to valorize thus solid agricultural by-products.

**Key words:** Thermophilic fungi, taxonomy, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus miehei*, *Aspergillus fumigatus*, lipases, respirometry, solid state fermentation, sugarcane bagasse, copra cake, olive solid wastes.

# Isolement, Identification et Physiologie des champignons thermophiles en vue de la Production de lipases par FMS

## TABLE DES MATIERES

	page
REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	16
LISTE DES ABREVIATIONS	17
<b>1. INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>18</b>
<b>2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Généralités sur les champignons</b>	<b>21</b>
2.1.1 L'ordre des Mucorales	22
2.1.2 Croissance des champignons dans les milieux naturels	25
2.1.2.1 Facteurs environnementaux	26
2.1.2.2 Méthodes mesure de la croissance fongique	27
2.1.2.3 Croissance de champignons sur des milieux gélosés	28
<b>2.2 Ecologie fongique</b>	<b>30</b>
2.2.1 Isolement des champignons	30
2.2.2 Identification de champignons	31
2.2.2.1 Les genres <i>Rhizomucor</i> et <i>Rhizopus</i>	33
2.2.2.2 Le genre <i>Aspergillus</i>	37
2.2.2.3 Classification de quelques champignons thermophiles	38
<b>2.3 Les champignons thermophiles et thermotolérants</b>	<b>38</b>
2.3.1 La température	38
2.3.2 Définition de champignons thermophiles et thermotolérants	40
2.3.3 Adaptation physiologique des champignons aux températures élevées	41
2.3.4 Habitats des champignons thermophiles	44
2.3.5 Enzymes produites par les champignons thermophiles	46
2.3.6 Pathogénicité de certains champignons	46

<b>2.4 Les lipases</b>	48
2.4.1 Définition des lipases	48
2.4.2 L'activation interfaciale	49
2.4.3 Les cinétiques des lipases	51
2.4.4 Le site actif des lipases fongiques	52
2.4.5 Mécanisme de la réaction lipolytique	52
2.4.6 Spécificité des lipases	53
2.4.7 Méthodes d'analyse des lipases	54
2.4.8 Production des lipases fongiques	55
2.4.9 Hydrolyse des lipides et synthèse des esters	56
2.4.10 Biotechnologie des lipases	57
2.4.11 Applications industrielles des lipases	59
<b>2.5. Les Fermentation en Milieu Solide (FMS)</b>	61
2.5.1. Définition des FMS	61
2.5.2. Utilisations des FMS	62
2.5.3. Avantages et inconvénients des FMS	63
2.5.4. Les micro-organismes utilisés en FMS	63
2.5.5. Les substrats et les supports	64
2.5.6. Activité de l'eau et humidité	64
2.5.7. Aération et échanges gazeux	65
2.5.8. Contrôle de la température	67
2.5.9. Contrôle du pH	67
2.5.10. Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des FMS	68
2.5.10.1. Au laboratoire	68
2.5.10.2. Niveau Pilote ou Usine	68
2.5.11. Respiration et respirométrie	69
<b>2.6 Conclusion sur l'analyse bibliographique</b>	71
<b>3. MATERIELS ET METHODES</b>	72
<b>3.1 Champignons filamenteux thermophiles</b>	72
3.1.1 Liste des souches	72
3.1.2 Conservation des souches	72
<b>3.2 Milieux de culture</b>	72
3.2.1 Milieu d'isolement	73
3.2.2 Milieu d'identification	73
3.2.3 Milieu de sporulation	73
3.2.4 Milieu minéral pour les études nutritionnelles	73
3.2.5 Milieu pour la caractérisation de la thermophilie des souches	73

3.2.6 Milieux de culture pour la Production de lipases	74
3.2.6.1 En culture superficielle	74
3.2.6.2 En culture liquide	74
3.2.6.3 En culture solide	74
<b>3.3 Techniques microbiologiques</b>	74
3.3.1 Isolement des champignons thermophiles	74
3.3.2 Identification des champignons thermophiles	74
3.3.3 Vitesse de croissance apicale	74
3.3.4 Production de spores	75
<b>3.4 La culture liquide</b>	75
3.4.1 Mise en œuvre	75
3.4.2 Prélèvement et traitement des échantillons	77
<b>3.5 La Fermentation en Milieu Solide (FMS)</b>	77
3.5.1 Description du dispositif (FMS)	77
3.5.2 Mise en œuvre des FMS	78
3.5.2.1 Préparation des supports pour les FMS	78
3.5.2.2 Préparation des colonnes de fermentation	79
3.5.2.3 Conditions de culture	79
3.5.2.4 Installation de la fermentation	80
3.5.3 Analyse de gaz en FMS (respirométrie)	80
3.5.4 Prélèvements et traitement des échantillons	81
<b>3.6 Méthodes analytiques</b>	82
3.6.1 Méthodes physico-chimiques	82
3.6.1.1 Matière sèche	82
3.6.1.2 Mesure du pH	83
3.6.2 Sucres réducteurs (DNS)	83
3.6.3 Protéines (BRADFORD)	83
3.6.3.1 Analyse des protéines	83
3.6.3.2 Analyse des protéines intracellulaires	84
3.6.4 Acides gras	84
3.6.5 Biomasse	85
<b>3.7 Mesure de l'activité lipasique</b>	85
3.7.1 En culture superficielle	85
3.7.2 Techniques analytiques complémentaires	86
3.7.2.1 Emulsion	86
3.7.2.2 Extraction des acides gras	86
3.7.3 En culture liquide	87
3.7.3.1 Réaction enzymatique	87

3.7.3.2 Rupture de la biomasse pour mesurer les lipases intracellulaires	87
3.7.4 En culture solide	88
3.7.5 Expression des résultats en Unités de Lipases	88
<b>3.8 Méthodes chromatographiques</b>	88
3.8.1 Chromatographie en Couche Mince (CCM)	88
3.8.2 CPG (Analyse de l'O <sub>2</sub> et du CO <sub>2</sub> )	89
3.8.3 HPLC (Analyse des substrats et des produits de fermentation)	90

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **4. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE CHAMPIGNONS THERMOPHILES**

<b>4.1 Isolement et purification de nouveaux champignons thermophiles</b>	91
<b>4.2 Identification des souches sauvages</b>	94
4.2.1 Caractères culturaux	95
4.2.2 Caractères morphologiques	97
4.2.2.1 Groupe I	97
4.2.2.2 Souches de référence de <i>Rh. pusillus</i> et de <i>Rh. miehei</i>	99
4.2.2.3 Groupe II	104
4.2.2.4 Souches de référence de <i>Rh. microsporus</i> var <i>rhizopodiformis</i>	108
4.2.2.5 Groupe III	109
<b>4.3 Composition de la microflore fongique isolée</b>	110
<b>4.4 Aspects pathologiques de certaines souches isolées</b>	111
<b>4.5 Conclusion</b>	114

### **5. PHYSIOLOGIE DES CHAMPIGNONS THERMOPHILES**

<b>5.1 Caractérisation nutritionnelle des souches</b>	115
5.1.1 Croissance des souches sur différentes sources de carbone	115
5.1.2 Croissance des souches sur milieux gélosés contenant des lipides	118
<b>5.2 Caractérisation de la thermophilie des souches</b>	119
5.2.1 Températures cardinales de <i>Rhizomucor pusillus</i>	120
5.2.2 Températures cardinales de <i>Rhizopus microsporus</i>	122
5.2.3 Températures cardinales d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	124
5.2.4 Thermophilie et thermotolérance des champignons	126
5.2.5 Influence de la température sur la croissance des champignons	131
5.2.5.1 Energie d'activation	131
5.2.5.2 Energie d'inactivation	133

<b>5.3 Indices de sporulation</b>	135
5.3.1 Souches de <i>Rhizomucor pusillus</i>	136
5.3.2 Souches de <i>Rhizomucor microsporus</i>	137
<b>5.4 Conclusion</b>	139
<b>6. DETECTION D'ESTERASES EN CULTURE SUPERFICIELLE</b>	141
6.1 Effet de la température sur la synthèse d'estérases	143
6.2 <i>Rhizomucor pusillus</i>	143
6.3 <i>Rhizopus microsporus</i>	145
6.4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	148
6.5 Comparaison des productions des estérases	149
6.6 Conclusion	151
<b>7. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE LIPASE DES EXTRAITS BRUTS</b>	
<b>7.1 Mise en oeuvre des essais lipasiques</b>	154
7.1.1 Méthode du pHstat	154
7.1.2 Adaptation et mise au point de la méthodologie d'analyse des lipases	155
7.1.2.1 Préparation de l'émulsion	155
7.1.2.2 Analyse des acides gras	157
<b>7.2 Précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium</b>	158
<b>7.3 Effet du pH et de la température sur les lipases de trois extraits bruts</b>	
7.3.1 Extraits enzymatiques bruts des souches 7a et 8a	159
7.3.1.1 Effet du pH	159
7.3.1.2 Effet de la température	161
7.3.2 Extraits enzymatiques bruts de la souche 13a	164
7.3.2.1 Effet combiné du pH et de la température	164
<b>7.4 Spécificité des lipases des souches thermophiles et thermotolérantes</b>	170
<b>7.5 Conclusion</b>	174
<b>8. PRODUCTION DE LIPASES EN CULTURE LIQUIDE</b>	176
<b>8.1 Cinétiques de la production de lipases des souches 8a et Rp183.67</b>	176
8.1.1 Cinétiques de <i>Rhizomucor pusillus</i> 8a	177
8.1.2 Cinétiques de la souche <i>Rhizomucor pusillus</i> 183.67	179
<b>8.2 Productions globales des lipases pour la totalité des souches</b>	180
<b>8.3 Effet de la taille de l'inoculum sur la production de lipases</b>	183
8.3.1 <i>Rhizopus microsporus</i> Souche 13a	183
8.3.2 <i>Rhizomucor pusillus</i> Souche 16a	184
<b>8.4 Cinétique de la biosynthèse des lipases intra et extracellulaires</b>	185



<b>8.5 Production de lipases par les souches provenant du CBS</b>	187
<b>8.6 Conclusion</b>	188
<b>9. PRODUCTION DE LIPASES EN FMS SUR SUPPORT</b>	190
9.1 Adaptation des FMS pour la culture des champignons thermophiles	190
9.2 Cinétiques de la consommation des substrats et de la synthèse des produits	192
9.2.1 Cinétiques détaillées des souches 13a et 16a	193
9.3 Etudes respirométriques	195
9.4 Production globale des lipases en FMS pour toutes les souches	199
9.5 Effet des inducteurs sur la biosynthèse de lipases	202
9.6 Conclusion	207
<b>10. PRODUCTION DE LIPASES EN FMS SUR DIVERS SUBSTRATS</b>	
<b>10.1 Utilisation des grignons d'olive pour la production de lipases</b>	211
10.1.1 Production des lipases par <i>Rh. pusillus</i> sur grignons d'olive	211
10.1.2 Production des lipases par <i>Rh. microsporus</i> sur grignons d'olive	215
10.1.3 Production des lipases par <i>Rh. miehei</i> sur grignons d'olive	217
<b>10.2 Utilisation du tourteau de coprah pour la production de lipases</b>	219
<b>10.3 Conclusion</b>	221
<b>11. PRODUCTION COMPAREE DE LIPASES</b>	222
<b>12. CONCLUSIONS GENERALES</b>	227
<b>13. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	232
<b>14. ANNEXES</b>	244

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 2.1 Résumé des caractères principaux du genre *Rhizopus*.
- Tableau 2.2 Classification des espèces *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus* et *Aspergillus fumigatus* dans le groupe des champignons.
- Tableau 2.3 Classification des micro-organismes en fonction de leurs températures cardinales.
- Tableau 2.4 Limites supérieures de températures pour la croissance des différents groupes d'organismes.
- Tableau 2.5 Production d'enzymes par des champignons thermophiles et thermotolérants.
- Tableau 3.1 Quantité de matière humide prélevée (g) pour les différentes analyses au cours des FMS.
- Tableau 4.1 Nature et origine des échantillons prélevés dans les zones tropicales mexicaines, ainsi que le numéro assigné aux 44 souches isolées.
- Tableau 4.2 Vitesses de croissance apicale ( $V_a$ ) des champignons thermophiles des groupes I et II cultivées sur MEA à deux températures d'incubation (30°C et 37°C).
- Tableau 4.3 Dimensions ( $\mu\text{m}$ ) des structures microscopiques des champignons du Groupe I cultivés pendant une semaine sur MEA à 30 °C.
- Tableau 4.4 Dimensions ( $\mu\text{m}$ ) des structures microscopiques des souches de référence cultivées pendant une semaine sur MEA à 30 °C.
- Tableau 4.5 Dimensions ( $\mu\text{m}$ ) des structures microscopiques des champignons du Groupe II cultivés pendant une semaine sur MEA à 30 °C.
- Tableau 5.1 Energies d'activation des réactions biochimiques qui limitent la croissance des champignons thermophiles et thermotolérants.
- Tableau 5.2 Energies d'inactivation des enzymes qui limitent la croissance des champignons.
- Tableau 6.1 Températures cardinales de la synthèse d'estérases des souches *Rh. microsporus*.
- Tableau 7.1 Précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium de 100 ml d'extrait lipasique de la souche 8a.
- Tableau 7.2 Energies d'activation calculées pour les différents pH d'incubation de l'extrait lipasique brut de la souche 13a.
- Tableau 7.3 Energies d'inactivation de l'extrait lipasique brut de la souche 13a à des différents pH du tampon.
- Tableau 8.1 Production des lipases (intracellulaires et extracellulaires) par l'ensemble de souches cultivées dans un milieu liquide pendant cinq jours à 47°C.
- Tableau 8.2 Concentrations du glucose, des protéines et valeurs du pH après 5 jours de culture en milieu liquide de l'ensemble de souches.
- Tableau 8.3 Paramètres principaux des cinétiques de la culture des souches de référence.
- Tableau 9.1 Productions globales en lipases des souches de *Rh. pusillus* après 12 et 24h de culture en FMS.
- Tableau 9.2 Productions globales en lipases des souches de *Rh. microsporus* après 12 et 24h de culture en FMS.
- Tableau 9.3 Productions globales en lipases des souches de *Rh. miehei* après 12 et 24h de culture en FMS.
- Tableau 11.1 Comparaison entre les productions maximales (U/ml) de lipases et les temps de culture (h) nécessaires pour les obtenir, en culture liquide (CL) et en FMS. Pour quatre souches de champignons.

## LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1 Structures typiques des Mucorales. a) Organisation générale. b) Reproduction sexuée. c) Structures type *Rhizopus*.
- Figure 2.2 Cycles de reproduction sexué et asexué de *Rhizopus stolonifer*.
- Figure 2.3 Schéma d'une colonie fongique présentant les différentes zones de différenciation sur une surface gélosée.
- Figure 2.4 Caractères morphologiques de *Rhizomucor pusillus*. a) Sporangiophores. b) Columelle. c) Sporangiospores. d) Zygosporé entre deux suspenseurs. e) Rhizoïdes.
- Figure 2.5 Structure de l'appareil conidien des *Aspergillus*. a) Organisation générale. b) Disposition en colonne.
- Figure 2.6 Hydrolyse d'un triglycéride catalysée par la lipase.
- Figure 2.7 Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et par la lipase pancréatique du porc. Vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat, exprimée en multiples de saturation. cette figure est reprise de VERGER et coll. (1990).
- Figure 2.8 Mécanisme de l'hydrolyse d'une liaison ester par une lipase.
- Figure 2.9 Biotransformations des lipides (graisses et huiles) Rn et R'n sont des acides gras ; ROH est essentiellement du méthanol.
- Figure 3.1 - Schéma de traitement des échantillons de la culture liquide.
- Figure 3.2 Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz. 1) Entrée d'air, 2) Bain-marie thermostaté, 3) Colonnes de fermentation, 4) Colonne en silicagel, 5) Echantillonneur, 6) Boîtier de commande de l'injection automatique, 7) CPG et 8) Ordinateur.
- Figure 5.1 Développement des souches sur différentes sources de carbone, évalué comme un pourcentage de la colonisation totale de la surface d'une boîte de Pétri.
- Figure 5.2 Vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ), exprimée en mm/h sur des milieux gélosés contenant différents lipides comme source de carbone pour les souches de champignons thermophiles cultivées à 50°C.
- Figure 5.3 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des souches de *Rh. pusillus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.
- Figure 5.4 Evolution du temps de germination (Phase de latence) des souches de *Rh. pusillus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.
- Figure 5.5 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.
- Figure 5.6 Evolution du temps de germination (phase de latence) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.
- Figure 5.7 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des souches d'*A. fumigatus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.
- Figure 5.8 Evolution du temps de germination (Phase de latence) des souches de *A. fumigatus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.
- Figure 5.9 Courbes de croissance (a) et de temps de germination (b) pour la moyenne de chaque groupe de souches thermophiles et thermotolérantes sauvages en fonction de la température sur un milieu gélosé.  $V_a$  est la vitesse de la croissance apicale.
- Figure 5.10 Courbes de croissance (a) et de temps de germination (b) des souches thermophiles et thermotolérantes de la collection du CBS en fonction de la température sur un milieu gélosé.
- Figure 5.11 Production de spores par différentes souches de *Rhizopus pusillus* sur milieu gélosé.
- Figure 5.12 Production de spores par les différentes souches de *Rhizopus microsporus* sur milieu gélosé.

- Figure 6.1 Effet de la température d'incubation sur le précipité formé comme conséquence de la présence d'estérases. Souches de *Rh. pusillus* cultivées sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ .
- Figure 6.2 Evolution de la vitesse de formation du précipité ( $V_p$ ) dûe à la présence de estérases en fonction de la température d'incubation. Souches de *Rh. microsporus* cultivées sur un milieu gélosé contenant du tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ , entre autres.
- Figure 6.3 Evolution du temps d'initiation de formation du précipité (Tip) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé contenant du tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ , entre autres.
- Figure 6.4 Effet de la température d'incubation sur le précipité formé grâce à de la présence d'estérases. Souches de *A. fumigatus* cultivées sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ .
- Figure 6.5 Evolution de la vitesse de formation du précipité ( $V_p$ ) dûe à la présence d'estérases en fonction de la température d'incubation. a) Souches sauvages . b) Souches de référence.
- Figure 6.6 Evolution des temps d'initiation de formation du précipité en fonction de la température d'incubation. a) Souches sauvages . b) Souches de référence.
- Figure 7.1 Influence de la relation huile d'olive-phase aqueuse sur l'activité lipolytique de la souche 8a.
- Figure 7.2 Effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité lipolytique de l'extrait enzymatique de la souche 8a, mesurée avec la méthode du pHstat.
- Figure 7.3 Effet de la température sur l'activité lipase. a: souche 7a. b: souche 8a. Filtrats concentrés 10 fois avec 70% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  d'une culture de 4 jours, à 47°C d'incubation, en utilisant le milieu cité dans le texte.
- Figure 7.4 Effet combiné du pH et de la température du milieu réactionnel sur l'activité lipolytique de l'extrait enzymatique de la souche 13a, obtenu par filtration et concentration d'une culture de 4 jours, à 47°C.
- Figure 7.5 Logarithme naturel de la vitesse d'hydrolyse des triglycérides en fonction de l'inverse de la température ( $\text{K}^{-1}$ ).
- Figure 8.1 Culture de la souche 8a (*Rh. pusillus*) en milieu liquide à 47°C. Cinétiques de la croissance, de la consommation du glucose, du pH et de la biosynthèse de protéines et de lipases.
- Figure 8.2 Culture de la souche Rp183.67 (*Rh. pusillus*) en milieu liquide à 47°C. Cinétiques de la consommation du glucose et de la biosynthèse de protéines et de lipases.
- Figure 8.3 Effet de la taille de l'inoculum sur les cinétiques de la consommation de glucose, de la synthèse de protéines et de la production de lipases pour la souche 13a. Taux d'inoculations :  $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu.
- Figure 8.4 Effet de la taille de l'inoculum sur les cinétiques de la consommation de glucose, de la synthèse de protéines et de la production de lipases pour la souche 16a. Taux d'inoculation :  $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu.
- Figure 8.5 Cinétiques de la biosynthèse des lipases intracellulaires et extracellulaires de la souche 13a.
- Figure 9.1 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 13a et 16a en FMS sur bagasse imprégnée.
- Figure 9.2 Respirométrie des souches *Rh. microsporus* 13a (a) et *Rh. pusillus* 16a (b) au cours de la culture solide sur bagasse imprégnée.  $\text{CO}_2$  produit (%) et  $\text{O}_2$  consommé (%).
- Figure 9.3 Respirométrie des souches *Rh. microsporus* 13a (a) et *Rh. pusillus* 16a (b) au cours de la culture solide sur bagasse imprégnée.  $\text{CO}_2$  produit (ml/gSSi),  $\text{O}_2$  consommé (ml/gSSi) et  $Q_R$  ( $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{O}_2$ ).
- Figure 9.4 Effet des inducteurs de lipases sur l'activité respiratoire (% de  $\text{CO}_2$ ) de *Rh. Pusillus* 16a en FMS.

- Figure 9.5 Effet des inducteurs de lipases sur les différents paramètres au cours de la croissance de *Rh. pusillus* 16a en FMS sur bagasse imprégnée.
- Figure 10.1 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 8a et 16a en FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif.
- Figure 10.2 Respirométrie des souches 8a et 16a au cours de la culture solide sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif.
- Figure 10.3 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de la souche 13a en FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif.
- Figure 10.4 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de la souche Rm370.65 (*Rh. miehei*) FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif.
- Figure 10.5 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 8a et Rm370.65 en FMS sur bagasse additionnée de la coprah de coco imprégnés d'un milieu nutritif.

## LISTE DES PHOTOGRAPHIES :

- Photo 1 Sporangiophores typiques du Groupe I (*Rh. pusillus*) cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine.
- Photo 2 Groupe II (souche 27a de *Rh. microsporus*) cultivée sur des milieux gélosés contenant uniquement du glucose ou de la saccharose comme source de carbone.
- Photo 3 Mycélium aérien typique du Groupe II (*Rh. microsporus*) observé à la loupe et cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine.
- Photo 4 Sporangiophores typiques du Groupe II (*Rh. microsporus*) observés à la loupe et au microscope cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine.
- Photo 5 Caractère homothallique des souches 11a et 13a (*Rh. microsporus*) cultivées sur MEA à 30°C pendant une semaine.
- Photo 6 Zygosporés typiques pour les souches 11a et 13a comparées avec les zygosporés de *Rh. miehei*.
- Photo 7 Colonie fongique et précipité (lauréate de calcium) formé grâce à la présence d'estérases. Souche de *Rh. miehei* cultivée sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et CaCl<sub>2</sub>.
- Photo 8 Produits de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive catalysée (à 47°C et pH 8,5) par les lipase des souches 36a, 17a, 24a, 27a, 29a, 32a et 33a et analysés par CCM.
- Photo 9 Produits de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive catalysée par la lipase de la souche 13a à des différentes températures d'incubation analysée par CCM.
- Photo 10 Comparaison de la croissance des souches 13a et 16a après deux jours culture dans les colonnes obtenues à partir des différents procédés de FMS.
- Photo 11 Témoin : Bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu au temps zéro de culture.
- Photo 12 FMS contenant la bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu après deux jours culture (Souche 13a).
- Photo 13 FMS contenant un mélange bagasse de canne à sucre/grignon d'olive après deux jours de culture (Souche 13a).

## LISTE DES ABREVIATIONS

MEA : Malt Extrait Agar

PDA : Potato Dextrose Agar.

CBS : CentraalBureau voor Schimmelcultures (Baarn, Pays-Bas).

Va : Vitesse de la croissance apicale: Mesure du rayon d'une colonie fongique en fonction du temps (mm/h). Vitesse avec laquelle la marge de la colonie avance sur un milieu gélosé.

Vp : Vitesse de formation du précipité : vitesse radiale avec laquelle, la périphérie circulaire d'un précipitât avance (mm/h), grâce à la sécrétion continue d'estérases et de la diffusion de ces enzymes à travers du milieu gélosé.

U : Unité lipasique, un  $\mu$ mole d'acide gras libéré par minute.

w : Longueur de la zone périphérique de croissance.

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance.

Rh : *Rhizopus* ou *Rhizomucor*.

SS = Support sec.

Q<sub>R</sub> : Quotient respiratoire.

CCM : Chromatographie en Couche Mince.

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

Note : Afin d'améliorer la signification du numéro de référence pour les souches de la collection internationale, le préfixe CBS a été remplacé par les initiales de la souche, par exemple, la souche *Rhizomucor pusillus* CBS 183.67 est appelée dans ce travail Rp183.67.

# **INTRODUCTION GENERALE**

## I - INTRODUCTION GENERALE

La première et principale étape, pour la production d'une enzyme ou d'un métabolite microbien par un procédé fermentatif, consiste à sélectionner un micro-organisme adéquat qui soit capable de les produire, le plus rapidement possible, à des concentrations convenables. Pour atteindre ce but, il est nécessaire d'isoler et de sélectionner des micro-organismes possédant la caractéristique souhaitée. De ce fait, la sélection d'un micro-organisme constitue une des étapes importantes en Biotechnologie (STANBURY et coll., 1995).

Les recherches sur les micro-organismes thermophiles sont en train d'acquérir un intérêt considérable, principalement pour la production d'enzymes thermostables utilisées dans des procédés industriels (BARBIER; 1994). En ce qui concerne les champignons thermophiles, vue la vitesse de croissance très élevée à 50°C, on pourrait supposer que la biosynthèse de produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide (COONEY et EMERSON, 1964). Par ailleurs, il y a des nombreuses évidences qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre la thermophilie des champignons et la thermostabilité des leurs protéines, en particulier de leurs enzymes (CRISAN, 1973; SORENSEN et CRISAN, 1974; OMAR et coll., 1987; SUGIYAMA et coll., 1993; DA SILVA et coll., 1994, CAMPOS et FELIX, 1995, FISHER et coll., 1995).

Les enzymes, des micro-organismes thermophiles cultivés à des températures élevées, sont capables de catalyser des réactions biochimiques à des températures élevées et elles sont, généralement, plus thermostables que les enzymes des micro-organismes mésophiles. De plus, cette thermostabilité prolonge la vie de stockage des enzymes (DIX et WEBSTER, 1995b ; JAY, 1996). La stabilité des biocatalyseurs est d'une importance capitale pour leur utilisation dans des applications industrielles (PRENOSIL et coll., 1987).

Les lipases sont perçues comme étant les enzymes les plus importantes en industrie. Pour leur versatilité, cette perception est probablement justifiée. Cependant, les ventes annuelles de lipases ont été estimées à 20 millions de dollars, ce qui correspond à moins de 4% du marché mondial des enzymes (VULFSON, 1994). Il existe deux principales raisons pour lesquelles, le marché des lipases pourrait substantiellement augmenter :



- a - Les lipases ont été largement étudiées comme une alternative pour de nouvelles transformations. Des centaines d'applications en bioconversions, ont été décrites ces dernières années en utilisant ces enzymes.
- b - La diversité des applications industrielles actuelles et potentielles excèdent largement celles des protéases et des carbohydrolases.

Cependant, le principal obstacle qui freine les applications potentielles des lipases repose dans le coût de ces enzymes. Pour cette raison, il est impératif de chercher de nouvelles voies afin de diminuer les coûts de production des lipases.

Bien que les études concernant la production de lipases ont commencé il y a presque 150 ans, le premier rapport sur la production des lipases en culture liquide par un champignon thermophile (*Humicola lanuginosa*) a été publié il y a 26 ans par ARIMA et coll. (1972). Les recherches dans ce domaine ont avancé très peu depuis.

Les Fermentation en Milieu Solide (FMS) offrent des alternatives pour l'utilisation des divers substrats agro-industriels solides, en utilisant, pour les champignons des conditions de culture proches à celles de leur milieu naturel (RAIMBAULT, 1980). Les champignons cultivés en FMS, ont été utilisés essentiellement pour la production d'aliments fermentés (HESELTEINE, 1987), d'acides organiques (MOO-YOUNG et coll., 1983), de protéines et de probiotiques pour l'alimentation animale (MOO-YOUNG et coll., 1992) et d'enzymes (MUDGETT, 1986). Un des principaux avantages de ces procédés concerne l'obtention des rendements de produits plus élevés que ceux obtenus avec les cultures liquides (HESELTEINE, 1972). Cependant, il faut souligner qu'une élévation excessive de la température, pendant la culture, représente le principal obstacle pour les applications industrielles des FMS (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Afin d'éviter l'accumulation de la chaleur métabolique en FMS, il est nécessaire d'utiliser de bioréacteurs sophistiqués, ce qui augmente les coûts de production des enzymes. Une autre alternative serait d'utiliser de nouvelles souches de champignons dont la croissance ne soit pas arrêtée par l'élévation excessive de la température. Par conséquent, ces nouvelles souches de champignons devraient être thermophiles ou thermotolérantes.

Pour ces raisons, il nous a paru intéressant d'isoler des nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles afin d'étudier la production de lipases en FMS. On considère comme hypothèse de ce travail, qu'à des températures élevées, ces souches présenteraient des vitesses métaboliques élevées et produiraient des lipases thermostables.

Dans le cadre de ce travail, nous avons abordé l'étude comparée de la production de lipases en culture liquide et en fermentation en milieu solide (FMS) en utilisant des champignons thermophiles que nous avons isolés à partir des sols tropicaux dans le but de :

- Mettre en évidence leurs caractéristiques thermophiles ou thermotolérantes et les comparer avec des espèces de référence,
- Produire des lipases en milieu liquide suivant des techniques bien connues.
- Mettre au point un système simple de culture des champignons thermophiles en FMS sur support solide imprégné d'une solution nutritive pour la production des lipases.
- Apprécier la production de lipases sur différents substrats agro-industriels (grignon d'olive, tourteau de coprah).

Une analyse bibliographique exhaustive nous a aidé à faire le point sur l'avance scientifique et les différentes méthodes analytiques mises en oeuvre pour suivre la croissance des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants sur milieu solide et pour estimer la production de lipases.

# **ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Afin de diagnostiquer l'état d'avance scientifique concernant le sujet abordé dans ce travail, instaurer les hypothèses, présenter et discuter les résultats, il est essentiel de faire une recherche bibliographique. La première partie de ce chapitre introduit l'écologie et la physiologie des champignons, en particulier les champignons thermophiles, en donnant des éléments sur leur thermophilie. On insistera sur les champignons de l'ordre des Mucorales, étant donné que l'essentiel de cette thèse porte sur ce groupe des champignons filamenteux. La deuxième partie est consacrée à l'étude des lipases fongiques, en présentant, la définition et en décrivant leur mécanisme d'action, leur production et les applications de ces enzymes. Enfin, la troisième partie développe les procédés de FMS en insistant sur les principaux paramètres qui agissent sur la croissance des champignons.

### 2.1 Généralités sur les champignons

Les champignons sont des micro-organismes eukaryotes qui sont classés en trois groupes par rapport à leurs importances industrielles : les champignons filamenteux, les levures et les champignons supérieurs (BROCK et coll., 1994c).

Les champignons filamenteux sont caractérisés par une structure mycélienne. Leur appareil végétatif (thalle) est constitué par des filaments ramifiés, les hyphes. Leur organisation est coenocytique, à l'intérieur de la structure filamenteuse, entourée d'une paroi rigide, se trouve une masse cytoplasmique multi-nuclée mobile, sans cloisonnement en unités cellulaires. Chez de nombreux champignons, il existe des cloisons transversales à intervalles réguliers dans les hyphes, mais, en fait, ces cloisons sont percées d'un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Néanmoins, on dit qu'ils ont un mycélium « cloisonné » (BOCQUET, 1993).

Les champignons se reproduisent par germination des spores. Les spores mûres sont libérées des appareils sporifères et disséminées dans la nature, essentiellement par le vent. Une spore germe et émet un filament (hyphe) qui croît, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pour donner un nouveau mycélium. Les champignons ont aussi la possibilité de se propager par

bouturage. Un simple fragment de mycélium est capable de se développer et de former une colonie.

Il peut exister deux types de reproduction, asexuée et sexuée (ALEXOPOULOS et coll., 1996a). Les spores asexuées naissent des corps fructifères et elles peuvent être endogènes (à l'intérieur d'un sporange) ou exogènes (conidies). Les spores sexuées naissent de la division méiotique d'un zygote, suivie d'une ou plusieurs divisions mitotiques (Figure 2.2).

### 2.1.1 L'ordre des Mucorales

La majorité des Mucorales sont des champignons saprophytes. Il existe environ 700 espèces de Mucorales distribués dans la biosphère et constituent l'ordre qui regroupe le plus grand nombre d'espèces de la classe de *Zygomycetes* (CARLILE et WATKINSON, 1996a). Les Mucorales peuvent être séparés des autres *Zygomycetes*, grâce à la présence simultanée des structures de reproduction sexuée et asexuée, ainsi que par leurs relatives associations non spécialisées.

Les Mucorales ont un mycélium non cloisonné. Toutefois, les rares cloisons que l'on peut observer se trouvent à la base des organes de fructification ou servent à isoler les parties sénescents du thalle.

Les Mucorales sont caractérisés par les structures suivantes :

- Un mycélium non ou peu cloisonné (mycélium coenocytique ou siphonné) bien développé contenant des nombreux noyaux (Fig. 2.1.c).
- Des spores d'origine asexuée qui sont contenues dans un sac ou sporange (sporocyste), porté par un filament appelé sporangiophore (sporocystophore), lequel présente, à l'extrême, un renflement (columelle). La base de la columelle peut être renflée en formant une apophyse (Fig. 2.1.a).
- Des zygosporées formées par la fusion de deux hyphes (gamétanges). Elles sont portées par des suspenseurs, restes des gamétanges après la fusion. La formation des zygosporées peut nécessiter la fusion de deux thalles complémentaires de deux espèces distinctes (hétérothallique) ou se produire dans une même espèce (homothallique) (Fig. 2.1.b).

- Quelques genres sont caractérisés par la présence de rhizoïdes, prolongements mycéliens différenciés en structures de fixation sur une surface solide d'un substrat (Fig. 2.1.c).
- Certaines espèces peuvent produire des chlamydozoospores, formées dans les thalles.

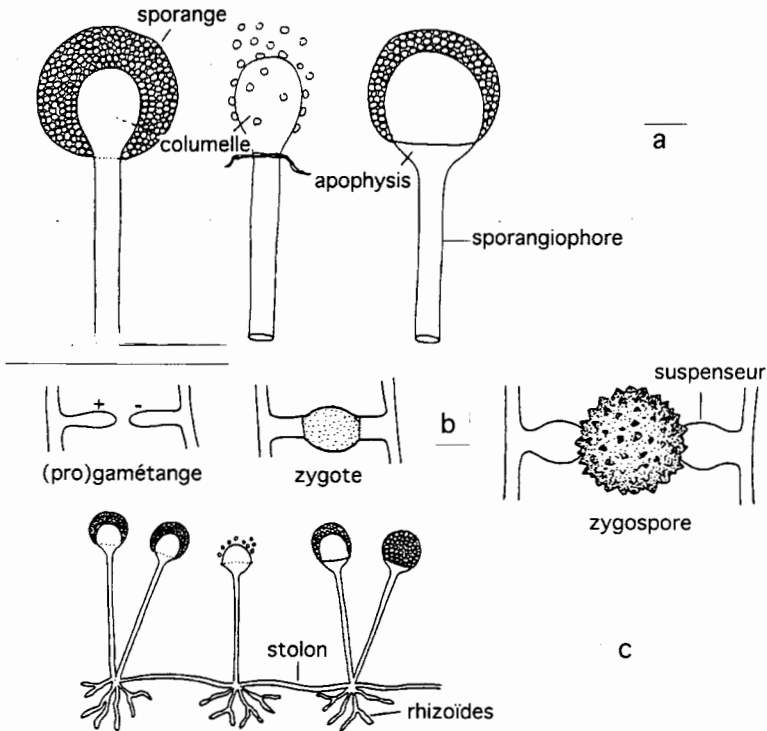


Figure 2.1 Structures typiques des Mucorales. a) Organisation générale. b) Reproduction sexuée. c) Structures type *Rhizopus* (ALEXOPOULOS et coll., 1996a).

Pour illustrer le cycle de vie d'une Mucorale typique (*Rhizopus stolonifer*), nous avons repris le schéma (Figure 2.2) publié par ALEXOPOULOS et coll. (1996a).

**Reproduction asexuée:** Quand les sporanges sont mûres, les sporangiospores de *Rhizopus stolonifer* sont libérées (C). Ces spores, sous des conditions favorables, germent et donnent naissance à un tube germinatif (D), lequel se développe pour former un mycélium aérien blanc et ramifié (A). Postérieurement, le mycélium émet des stolons aériens qui développent des rhizoïdes à certains points. Directement, sur ces rhizoïdes, un ou plusieurs sporangiophores sont formés (B). Ensuite, l'extrémité de chaque sporangiophore commence à

se gonfler et à donner origine à un sporange. Pendant ce développement, beaucoup de noyaux du cytoplasme émigrent vers le sporange et se concentrent, principalement, sur la périphérie. Dans la portion centrale du sporange (columelle), il existe des vacuoles qui donnent naissance aux sporangiospores, lesquelles plus tard, seront contenues dans un sporange. Une fois que le sporange arrive à maturité, il se casse en libérant ses spores dans l'air et le cycle asexué de *Rhizopus stolonifer* est ainsi achevé.

**Reproduction sexuée:** La reproduction sexuée de *Rhizopus stolonifer* requiert la présence de deux hyphes compatibles, physiologiquement distinctes, un mycélium (+) et un mycélium (-) car, ce champignon est hétérothallique. Quand deux hyphes compatibles se touchent (progamétange, **E**), elles se fondent (gamétange, **F**) et donnent naissance à un zygosporangium (**G**) par la plasmogamie (fusion) de deux noyaux, un noyau (+) et un noyau (-) et forment ainsi, un noyau diploïde (2n). Ce zygosporangium jeune commence à s'agrandir pour former le zygosporangium mûr (**H**) qui contient une seule zygospore. Dans des conditions expérimentales au laboratoire, à 21°C, la zygospore germe après un à trois mois d'incubation, grâce à la rupture du zygosporangium. Le sporange du sporangiophore qui vient d'être formé, peut contenir, soit que des spores (-), soit que des spores (+) ou le mélange des deux types de spores (+ et -).

Quelques espèces, appartenant aux Mucorales, ont une grande importance industrielle pour la production de métabolites utilisés comme additifs dans l'alimentation. Par exemple, beaucoup d'espèces sont capables de biosynthétiser des importants produits industriels, tels que, les enzymes (amylases, rénnines), les acides organiques (fumarique, lactique, citrique, succinique et oxalique) et plusieurs métabolites secondaires (cortisone, saveurs artificiels) (HESELTEINE et ELLIS, 1973 ; ALEXOPOULOS et coll., 1996b). De plus, quelques espèces de *Rhizopus* et de *Mucor* sont utilisées pour la production d'alcool à partir du riz, des aliments fermentés asiatiques à partir de soja, tels que le sufu, le tempeh, etc (HESELTEINE et ELLIS, 1973 ; HESSELTEINE, 1987).

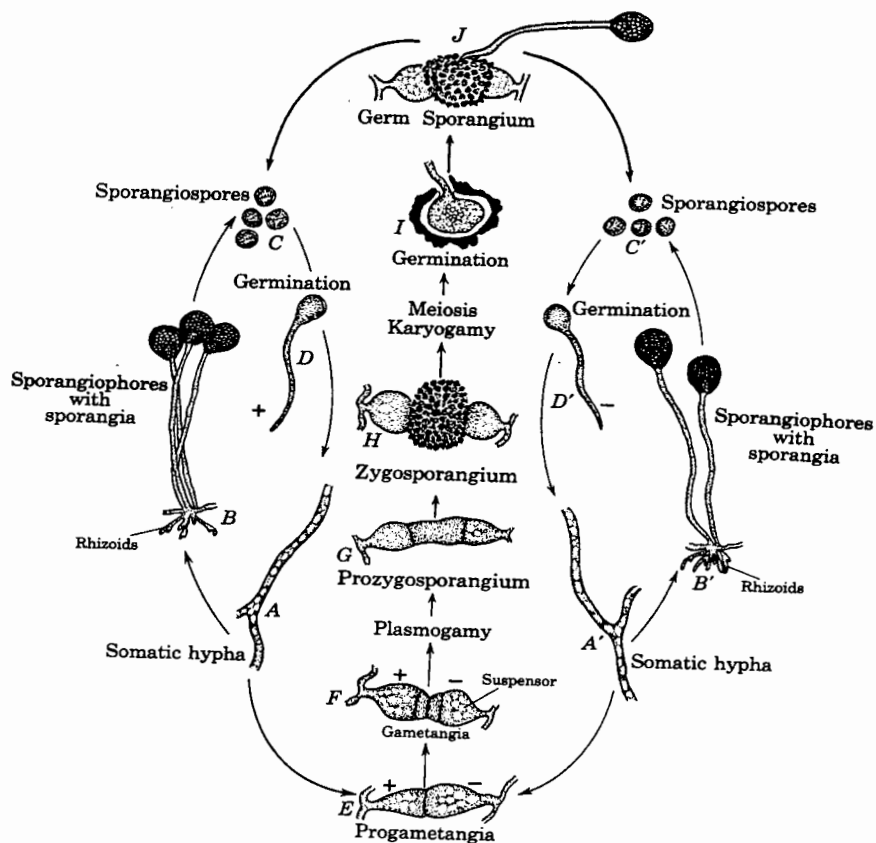


Figure 2.2 Cycles de reproduction sexué et asexué de *Rhizopus stolonifer* (ALEXOPOULOS et coll.1996a)

### 2.1.2 Croissance des champignons dans les milieux naturels

La croissance fongique dans un environnement naturel, est beaucoup plus lente que dans les conditions *in vitro* du laboratoire, car les conditions physico-chimiques dans la nature ne sont pas toutes optimales en même temps. Normalement, les micro-organismes se développent dans la nature à moins de 1% du maximum de croissance réussie dans le laboratoire. Cette faible croissance est due, principalement, à plusieurs facteurs tels que : (i) les substrats sont faiblement approvisionnés, (ii) la distribution de nutriments dans l'habitat microbien est hétérogène, (iii) les



micro-organismes ne se développent pas en culture pure. En fait, dans une même niche écologique, les champignons doivent faire face aux autres micro-organismes, et se développer en harmonie et en bonne intelligence avec leurs voisins directs.

Les communautés fongiques ne restent pas fixées dans un état stationnaire indéfiniment. Certaines perturbations, telles que, les invasions des animaux, les stress provoqués par l'épuisement des nutriments, les interactions antagonistes d'autres espèces qui concourent par le même substrat, les changements de température, du pH, etc., imposent un renouvellement continu des communautés fongiques. De ce fait, on assiste le plus souvent à des successions des populations fongiques.

La compétition microbienne pour consommer les substrats disponibles dépendra de la vitesse de leur assimilation, étroitement liée aux vitesses métaboliques et aussi, à l'inhibition conférée par un micro-organisme voisin qui produit un métabolite toxique (mycotoxines, acides organiques, etc...). Parfois, au lieu de concourir pour un même substrat, les micro-organismes préfèrent collaborer (syntrophie) pour effectuer une transformation particulière qu'un micro-organisme ne pourrait pas faire par lui-même, car, le produit du métabolisme de l'un sert comme substrat pour le métabolisme de l'autre (BROCK et coll. 1994a).

### 2.1.2.1 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux, tels que, l'aération, le pH, la disponibilité d'eau, les nutriments et la température influencent la croissance des micro-organismes et jouent un rôle déterminant sur la biodiversité microbienne dans un habitat particulier (BROCK et coll., 1994b; DIX et WEBSTER, 1995a).

- Aération: Sauf de rares exceptions, les champignons sont aérobies (ALEXOPOULOS et coll. 1996b). Quelques espèces sont plus tolérantes que d'autres aux faibles concentrations d'oxygène et quelques unes sont anaérobies facultatives.
- pH: La majorité des champignons ont une préférence pour les milieux à pH acides. En général, leur pH optimum de croissance est compris entre 5 et 6 (DIX et WEBSTER, 1995b).

- **La disponibilité de l'eau:** L'activité de l'eau ( $A_w$ ) est une mesure de l'eau disponible pour la croissance des micro-organismes. L' $A_w$  représente le rapport entre la pression de la vapeur d'eau d'une substance ou d'une solution en équilibre dans l'air et la pression de la vapeur d'eau pure à la même température. En général, le développement des champignons requiert une  $A_w$  inférieure à celle des bactéries. La limite inférieure de  $A_w$  pour la croissance de *Penicillium martensii* et *Aspergillus nidulans* est de 0,8 ; celle de *Aspergillus candidus* est de 0,75 et celle de *Saccharomyces rouxii* est de 0,6 (CARLILE et WATKINSON, 1994b).
- **Les nutriments:** Les champignons ne sont pas très exigeants dans leurs besoins nutritionnels et puisent, dans le milieu environnant, les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires. Les sels minéraux et certaines vitamines peuvent stimuler ou orienter leur développement. Ces éléments nutritifs sont présents en relative abondance dans la nature et donc accessibles aux champignons (ROQUEBERT, 1985).
- **Le facteur température** sera discuté plus en détail dans la section 2.3.1.

### 2.1.2.2 Méthodes de mesure de la croissance fongique

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la croissance des champignons filamenteux. Selon MANDELS (1965), essentiellement, ces méthodes sont : La croissance apicale, le poids sec, l'activité métabolique et l'analyse de composants de la biomasse.

#### Croissance apicale

Cette méthode est la plus simple d'utilisation et consiste à mesurer l'extension apicale du mycélium sur la surface d'un milieu de culture gélosé en fonction du temps d'incubation. Cette méthode est non destructive. Par contre, son principal inconvénient est qu'elle n'est pas nécessairement corrélée à la quantité de biomasse produite.

#### Poids sec de la biomasse

Le poids sec de la biomasse est la méthode la plus utilisée pour analyser la croissance fongique. Cette méthode représente la manière la plus directe de connaître la quantité de biomasse produite. Toutes les autres méthodes devraient se rapporter à la méthode du poids sec pour interpréter correctement la signification physiologique du paramètre équivalent obtenu avec une autre méthode. Le principal inconvénient de cette méthode est sa nature destructive.

### Activité métabolique

La croissance fongique peut être indirectement mesurée avec l'analyse de l'activité métabolique : L'activité respiratoire ( $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$ ) (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991), la formation des produits (acide, pigments, etc.), la consommation des substrats ou l'activité enzymatique. L'utilisation d'une de ces techniques doit être validée avec la méthode du poids sec. Les avantages de la méthode de l'activité métabolique, sont dus au fait que les analyses sont réalisés de manière simple, non destructive et continue.

### Analyse de composants de la biomasse

L'analyse des composants de la biomasse offrent des indicateurs indirects de la croissance fongique. Les composants de la biomasse analysés sont : l'azote, les protéines, le DNA, la glucosamine et l'ergostérol (MITCHELL, 1992). Cependant, la composition d'un constituant de la biomasse peut changer pendant la croissance, ce qui représente un désavantage pour cette méthode (MANDELS, 1965).

#### **2.1.2.3 Croissance de champignons sur des milieux gélosés**

L'étude de la croissance de champignons filamenteux sur des milieux gélosés permet de mettre en évidence les différentes étapes de leur développement.

Lorsqu'une spore est placée sur un milieu gélosé convenable pour sa croissance et sous des conditions d'incubation favorables, un tube germinatif (hyphe) émerge de la spore en l'espace de quelques heures (phase de germination). D'abord, l'hyphe augmente sa longueur, commence à se ramifier et forme la première branche de ramification, perpendiculairement à l'hyphe mère, qui grandit à son tour. Puis le tube germinatif produit une autre branche, et ces branches produisent d'autres branches par elles mêmes. Pendant tout ce temps, le mycélium se développe exponentiellement, grâce à l'extension exponentielle des extrémités de différentes hyphes (TRINCI, 1971).

L'inoculation avec une ou plusieurs spores, ou avec un fragment du mycélium sur un point précis de la surface d'un milieu nutritif gélosé, donne naissance à une colonie, matérialisée par une aire de croissance approximativement circulaire de mycélium non différencié. La croissance, sur cette aire, provoque l'épuisement des nutriments de la surface du milieu gélosé

en contact avec le mycélium. Dans ce cas, les substrats situés à proximité diffusent vers la zone d'épuisement et en même temps, les métabolites produits par le mycélium sont libérés à l'extérieur et diffusent dans le milieu gélosé. Par conséquent, le développement du mycélium établit un gradient de concentrations de substrats et de métabolites dans le milieu de culture.

Au cours de l'incubation et tant que le front de la colonie avance, la croissance du mycélium est radiale. Le mycélium continue à avancer jusqu'à l'encontre d'un obstacle (par exemple, la paroi d'une boîte de Pétri), ou jusqu'à l'épuisement des nutriments. De plus, la croissance peut être ralentie ou arrêtée, à cause de la sécrétion de produits toxiques provenant du métabolisme du champignon.

Le développement radial de la colonie provoque une différenciation des structures mycéliennes qui évoluent du centre jusqu'à la périphérie de la colonie (CARLILE et WATKINSON, 1994a). Pour une colonie donnée, différentes zones de différenciation sont formées, à savoir (Figure 2.3) :

- a) La zone d'extension, partie de l'hyphes qui avance vers le milieu inexploré.
- b) La zone productive, où il y a la plus importante production de biomasse.
- c) La zone de fructification où il n'y a plus d'augmentation en biomasse et les formes de reproduction sexué et asexué commencent à être formées.
- d) La zone de vieillissement, où les hyphes sont très vacuolées ou vides, à cause d'une mobilisation du cytoplasme vers les spores ou vers les parties les plus jeunes de la colonie.

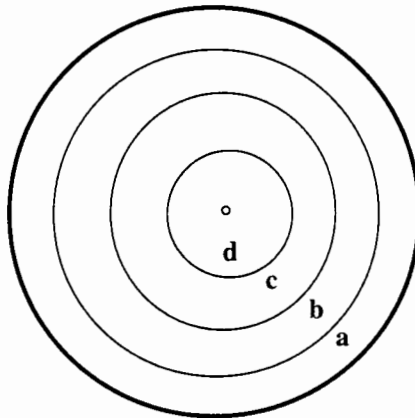


Figure 2.3 Schème d'une colonie fongique présentant les différentes zones de différenciation sur une surface gélosée.

## 2.2 Ecologie fongique

Dans la nature, les champignons se développent le plus souvent comme des micro-organismes saprophytes. Ils participent à la dégradation et au recyclage de la matière organique et minérale. Ces caractéristiques confèrent aux champignons, la possibilité de coloniser et d'explorer de nouveaux habitats et ainsi, d'occuper tous les environnements possibles, terrestres et aquatiques, régions tropicales et polaires (DIX et WEBSTER, 1995a).

L'écologie microbienne étudie le comportement des micro-organismes dans leur environnement naturel. Le terme environnement fait allusion à tout ce qui entoure les micro-organismes: Les facteurs chimiques, biologiques et les forces physiques qui agissent sur eux. L'écologie microbienne centralise ses études dans deux points principaux :

- L'isolement, l'identification et la quantification des micro-organismes dans leurs habitats.
- L'activité des micro-organismes avec leur environnement.

Dans le cadre de ce travail, nous allons nous consacrer, essentiellement, au premier point qui portera sur les champignons thermophiles isolés des milieux tropicaux.

### 2.2.1 Isolement des champignons

Rarement, un environnement naturel contient uniquement un seul type de micro-organisme. Dans la plupart des cas, une énorme variété de micro-organismes est simultanément présente et c'est aux microbiologistes de concevoir la stratégie, les méthodes et les procédures qui permettront d'isoler, de cultiver et de sélectionner un micro-organisme particulier. Pour cet isolement, des échantillons appropriés, contenant une importante microflore naturelle, doivent être choisis très attentivement. En particulier, il faut aller chercher le micro-organisme dans son habitat.

Pendant l'isolement d'un micro-organisme, la technique d'enrichissement est généralement utilisée. Cette technique est réalisée, en ajoutant un échantillon dans un milieu de culture sélectif et en fixant diverses conditions d'incubation. L'objectif d'une culture d'enrichissement est l'obtention d'une population microbienne spécifique en culture pure.

La mise en œuvre d'une culture d'enrichissement fait appel à la technique de l'étalement en surface (technique des stries) ou à la technique de dilutions successives en milieu liquide jusqu'à l'épuisement de la microflore.

La première et principale étape pour la production d'un métabolite microbien par un procédé fermentatif, consiste à sélectionner un micro-organisme adéquat qui soit capable de produire, le plus rapidement possible, le métabolite d'intérêt à des concentrations convenables. Pour atteindre ce but, il est nécessaire d'isoler et de sélectionner des nouveaux micro-organismes possédant la caractéristique souhaitée. La sélection d'un micro-organisme constitue une étape très importante en Biotechnologie et elle est un des paramètres essentiels de la réussite ou de l'échec du développement d'un nouveau procédé microbien.

De plus, on devrait considérer, dès le départ, comme un des critères pour la sélection d'un micro-organisme, sa capacité de se développer sur un milieu simple et bon marché. En règle générale, ce micro-organisme devrait être pur et doté d'une viabilité et d'une stabilité génétique remarquables (SCRIBAN, 1993).

Par ailleurs, si la préparation enzymatique obtenue par un procédé de fermentation est destinée à entrer en contact avec des aliments, la souche qui l'a produite doit avoir reçu le label « alimentaire », c'est-à-dire de faire partie des souches G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe).

### 2.2.2 Identification de champignons

Pour des questions pratiques, nous allons consacrer cette section d'identification des champignons, uniquement pour deux ordres de champignons: Les Mucorales et les Hyphomycétales. Plus particulièrement, la description des espèces thermophiles ou thermotolérantes de *Rhizomucor*, de *Rhizopus* et d'*Aspergillus* sera développée, étant donné que ces trois genres seront étudiés tout au long de ce travail.

L'identification des champignons selon BOTTON et coll. (1985a) fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques tels que:

- Caractères culturaux : vitesse de la croissance apicale ; texture, marge, épaisseur et couleur de la colonie ; pigmentation de l'agar, production d'exsudat et odeur des colonies.
- Caractères morphologiques :
  - a - Du mycélium : absence ou présence de cloisons, couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores.
  - b - Des organes différenciés et de leur contenu : forme, couleur, dimensions, texture des parois et ornements.

Les observations culturales et microscopiques des structures fongiques réalisées pour identifier la classe, l'ordre, le genre et l'espèce des nouvelles souches isolées répondent aux descriptions évoquées par BOTTON et coll. (1985), SAMSON et coll. (1996) et DOMSCH et GAMS (1993). En règle générale, ces observations sont faites à partir des cultures réalisées sur Malt Extrait Agar (MEA) à 30°C.

Des clés d'identification des champignons sont établies par différents groupes de chercheurs afin de classer les nouvelles souches. On donnera par la suite uniquement les clés nécessaires pour identifier les souches que nous avons isolés.

### **Clés de détermination des classes des Zygomycètes et Hyphomycètes:**

- 1a) Mycélium sans cloisons (**coenocytique** ou **shiphonné**) ou à cloisons seulement présentes au niveau des appareils reproducteurs (2)
- 1b) Mycélium avec cloisons régulières (3)
- 2) Spores asexuées endogènes (sporangiospores) contenues dans un sac (sporange) porté par un sporangiophore → **Zygomycètes (Mucorales)** (Figure 2.1).
- 3) Les conidies ne sont pas formées dans des sporanges ou dans des asques. Pas de reproduction sexuée connue → **Hyphomycètes (Deutéromycètes-champignons imparfaits-)**.

### 2.2.2.1 Les genres *Rhizomucor* et *Rhizopus*

Les clés pour la détermination des genres *Rhizopus* et *Rhizomucor* à partir des Mucorales sont présentées à continuation:

- 1) Reproduction asexuée par des spores endogènes dans des sporanges multispores. Spores sans appendices. **a** : sporanges avec une apophyse (2) et **b** : sporanges sans apophyse (3)
- 2) Sporangies et sporangiophores fortement pigmentés. Sporangiophores non ramifiés souvent en groupes de 2 à 5 avec des rhizoïdes à la base. Sporangiospores souvent striées. Croissance apicale extrêmement rapide, mycélium luxuriant, avec des hyphes aériennes et des stolons.

→ *Rhizopus* (Figure 2.1c).

- 3) Sporangiophores ramifiés vers le haut en monopodes ou en sympodes. Stolons et rhizoïdes parfois présents. Thermophiles. → *Rhizomucor*.

#### a) *Rhizomucor pusillus*

Les critères à considérer pour identifier un *Rhizomucor* comme *Rhizomucor pusillus* selon SCHIPPER (1978), BOTTON et coll. (1985) et DOMSCH et GAMS (1993) sont les suivants (Figure 2.4) :

- Hauteur des colonies de 2 à 3 mm.
- La colonie est blanche au début de la culture, après, elle devient grise-neutre ou sépia.
- Sporangiophores sans couleur d'environ 10  $\mu\text{m}$  de large, et ramifiés vers le haut en monopodes ou en sympodes.
- Sporange de 50 à 80  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Columelles sans apophyse sous-globuleuses ou bien légèrement allongées, souvent de 60 $\mu\text{m}$  de haut et de 15 à 35  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Sporangiospores globuleuses à sous-globuleuses, lisses et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Généralement hétérothalliques.
- Zygosporangies globuleuses ornementées brunes-rouges à noires de 43 à 63 (70)  $\mu\text{m}$  de diamètre avec suspenseurs identiques.
- Chlamydospores absentes.



- Saccharose utilisé comme unique source de carbone/
- Croissance faible à 20°C et moyenne à 22°C .

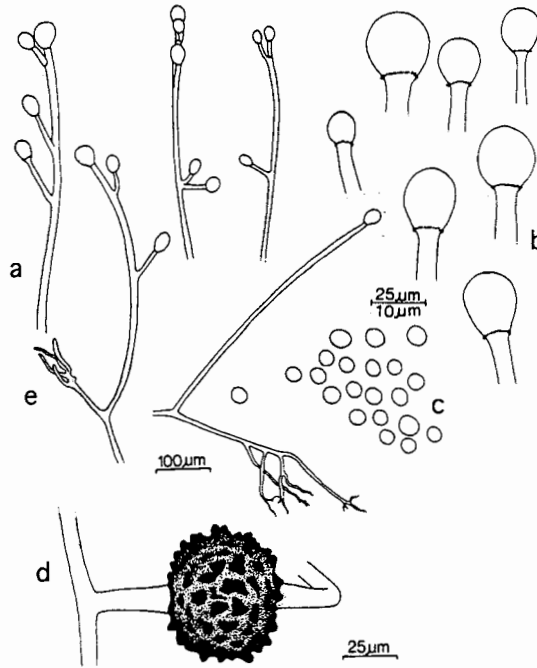


Figure 2.4 Caractères morphologiques de *Rhizomucor pusillus*. a) Sporangiophores. b) Columelle. c) Sporangiospores. d) Zygospore entre deux suspenseurs. e) Rhizoïdes.

### **b) *Rhizopus microsporus***

Dans le Tableau 2.1, les principales caractéristiques attribuées au genre *Rhizopus* sont représentées (SCHIPPER, 1984).

Tableau 2.1 Résumé des principaux caractères du genre *Rhizopus*.

Caractéristiques	<i>Rh. stolonifer</i>	<i>Rh. oryzae</i>	<i>Rh. microsporus</i>
Rhizoïde (aspect)	complexe, bien développé	développé	simple
Sporangiophore (mm)	1 - 3	1 - 2,5	entre 0,5 et 1
Sporange ( $\mu\text{m}$ )	250-275	160-240	>100
Zygosporé (couleur)	Noir	Marron	Rouge-Brune
Zygosporé ( $\mu\text{m}$ )	>225	>140	>100
Suspenseurs	égaux	inégaux	inégaux
Température maximale de croissance	36 °C	45°C	>45°C
Localisation	sur les fruits	aliments	
Pathogénicité		agents de mucormycoses	agents de mucormycoses

Cependant, pour identifier plus spécifiquement la variété de *Rhizopus microsporus*, on doit considérer les clés suivantes (SCHIPPER et STALPERS, 1984) :

**1a** Zygosporés présentes dans une souche isolée → *Rh. homothallicus*

**1b** Zygosporés absentes dans une souche isolée (2) → *Rh. microsporus*

**2a** Sporangiosporés ellipsoïdales et striés → *Rh. microsporus var. microsporus*

**2b** Sporangiosporés sous-globuleuses et non striés (3)

**3a** Bonne croissance à 50°C (colonie de diamètre supérieur à 35 mm après 120h d'incubation), sporangiosporés rarement plus grandes que 5 $\mu\text{m}$  de diamètre → *Rh. microsporus var. rhizopodiformis*

**3b** Faible croissance apicale à 50°C (colonie de diamètre inférieure à 10 mm après 120h d'incubation), sporangiosporés plus grandes que 6 $\mu\text{m}$  de diamètre (4)

**4a** Sporangiosporés globuleuses hétérogènes de diamètre supérieur à 9  $\mu\text{m}$  → *Rh. microsporus var. oligosporus*

**4b** Sporangiosporés subglobuleuses de diamètre supérieur à 7,5  $\mu\text{m}$  → *Rh. microsporus var. chinensis*

De plus, pour l'identification de *Rh. homothallicus* et de *Rh. microsporus var rhizopodiformis*, d'autres caractéristiques doivent être prises en considération:

*Rh. homothallicus*:

- Colonie marron-grise obscure.
- Rhizoïde simple.
- Sporangiophores de plus de 850  $\mu\text{m}$  de longueur et 15  $\mu\text{m}$  de largeur, en bouquet de 1 à 3.
- Sporange de plus de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Columelle allongée et conique de plus de 50  $\mu\text{m}$  de hauteur.
- Sporangiospores angulaire-globuleuses de plus de 7,5 (-8)  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Zygosporangium homothallicum rouge-brun de plus de 125  $\mu\text{m}$ .
- Suspenseurs inégaux.
- Bonne croissance à 46°C et nulle à 50°C.

*Rh. microsporus var rhizopodiformis* :

- Colonie marron-grise obscure, d'apparence poudreuse.
- Rhizoïde simple.
- Sporangiophores (sur stolons) de plus de 500  $\mu\text{m}$  de longueur et de 8  $\mu\text{m}$  de largeur, en bouquet de 1 à 4.
- Sporange de plus de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- Columelle pyriforme.
- Sporangiospores sous-globuleuses de plus de 5(-6)  $\mu\text{m}$  de diamètre, ornementées avec des pics aigus.
- Bonne croissance à 50°C.

### 2.2.2.2 Le genre *Aspergillus*

Les clés d'identification du genre *Aspergillus* sont les suivantes (Figure 2.5a) :

- Coniophores dressés et renflés en vésicule.
- Vésicules portant des phialides (cellules conidiogènes).
- Spores unicellulaires (conidies) groupées en chaînes formées à partir des phialides.

Si les phialides sont directement insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* unisériés. Mais, si les phialides sont portées par des cellules intercalaires (métules) insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* bisériés.

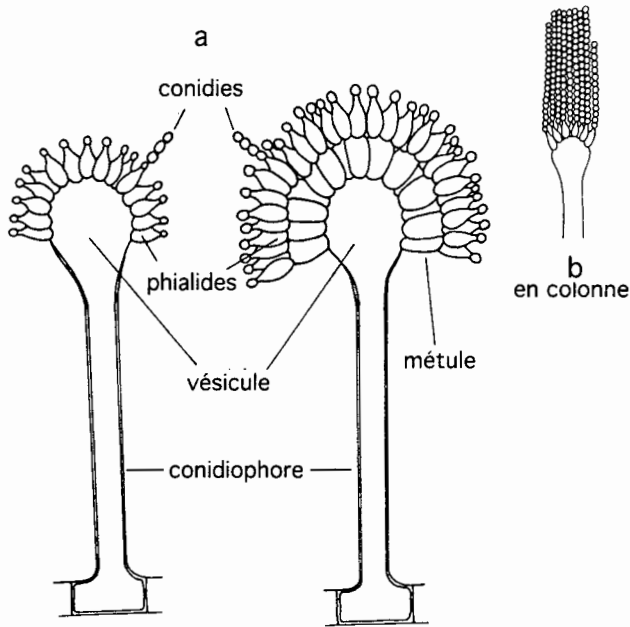


Figure 2.5 Structure de l'appareil conidien des *Aspergillus*. a) Organisation générale. b) Disposition en colonne.

#### *Aspergillus fumigatus*

Critères à considérer pour identifier un *Aspergillus* comme étant un *A. fumigatus* (Figure 2.5b) :

- Têtes conidiales (conidiophores) vertes obscures en colonne compacte et souvent de diamètre uniforme.

- Métules absentes, les phialides sont formées directement sur des vésicules piriformes ou spatulées (*Aspergillus uniséries*).
- Phialides distribuées uniquement sur la partie supérieure de la surface de la vésicule.
- Champignons non osmophiles et croissance rapide à 37°C (thermotolérant).
- Conidies sous-globuleuses et de surface rugueuse.

### 2.2.2.3 Classification de quelques champignons thermophiles

Les places occupées par l'espèce thermophile *Rhizomucor pusillus* et par les espèces thermotolérantes *Rhizopus microsporus* et *Aspergillus fumigatus* dans la classification des champignons sont indiquées dans le Tableau 2.2. (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979; FLORENT, 1993 ; CARLILE et WATKINSON, 1996a).

Tableau 2.2 Classification des espèces *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus* et *Aspergillus fumigatus* dans le groupe des champignons.

Division	EUMYCOTA	EUMYCOTA	EUMYCOTA
Sousdivision	ZYGOMYCOTINA	ZYGOMYCOTINA	DEUTEROMYCOTINA
Classe	Zygomycètes	Zygomycètes	Hyphomycètes
Sousclasse	Zygomycétidae	Zygomycétidae	Hyphomycétidae
Ordre	Mucorales	Mucorales	Moniliales
Famille	Mucoracea	Mucoracea	Hyphomycétaceae
Genre	<i>Rhizomucor</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>pusillus</i>	<i>microsporus</i>	<i>fumigatus</i>

## 2.3 Les champignons thermophiles et thermotolérants

### 2.3.1 La température

La température d'incubation est un facteur primordial pour la croissance et le métabolisme des cellules. Au fur et à mesure que la température augmente, les réactions biochimiques s'accroissent à l'intérieur de la cellule. Néanmoins, au-dessus d'une certaine température, les protéines et les acides nucléiques, principalement, peuvent être irréversiblement dénaturés. En conséquence, tous les organismes se caractérisent par :

- Une température minimale, au-dessous de laquelle, il n'y a pas de croissance.
- Une température optimale, pour laquelle, la croissance est la plus rapide.
- Une température maximale, au-dessus de laquelle, la croissance n'est plus possible.

Ces trois températures sont appelées températures cardinales.

La température joue un rôle très important et souvent décisif pour la distribution des organismes sur la surface de la terre. Les champignons, comme tous les autres groupes de micro-organismes, ont évolué pour s'adapter aux variations de températures environnementales et occuper un vaste domaine dans les écosystèmes, essentiellement terrestres. A des températures inférieures à 0°C, les cellules fongiques peuvent survivre, mais, elles se développent rarement. Au-dessus de 40°C, la plupart de champignons arrêtent leur croissance et sont détruits (DEVERALL, 1965). De ce fait, la majorité de moisissures sont des micro-organismes mésophiles et se développent normalement à une température comprise entre 5°C et 35°C, avec un optimum situé entre 25° et 30°C. Exceptionnellement quelques champignons peuvent se développer à des températures supérieures à 50°C et ils sont appelés thermophiles ou thermotolérants. Egalement, quelques autres champignons peuvent montrer une préférence pour les basses températures et sont considérés comme psychrophiles ou psychrotolérants (DIX et WEBSTER, 1995b). Le Tableau 2.3 présente les cinq groupes de champignons classés par rapport à la température. Cependant, il faut signaler que ces distinctions sont données seulement à titre indicatif.

Tableau 2.3 Classification des micro-organismes en fonction de leurs températures cardinales.

Micro-organisme	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophile	≤ 0	≤ 15	≤ 20
Psychrotolérant	≤ 0	25 - 30	35
Mésophile	5	25 - 30	35
Thermotolérant	5	25 - 30	≥ 40
Thermophile	20	≥ 45	> 50

### 2.3.2 Définition des champignons thermophiles et thermotolérants

Il est important de préciser que la classification des micro-organismes par rapport à la température a été faite essentiellement par des bactériologistes. Par conséquent, cette classification concerne surtout les bactéries. Par ailleurs, les organismes ayant une température cardinale maximale différente du groupe phylogénétique auquel ils appartiennent, la thermophilie peut prendre différentes connotations (EMERSON, 1968). Dans le Tableau 2.4, on peut distinguer les limites supérieures de température inhérentes à chaque groupe d'organisme. Ici, on remarque que les organismes eukaryotes ont une tolérance plus faible aux températures élevées que celle manifestée pour les prokaryotes, dont la thermophilie extrême du groupe d'archéas est notable (113°C). De plus, chez les eukaryotes, les micro-organismes ont une thermophilie plus prononcée (60°C) que les organismes supérieurs (50°C). Enfin, parmi les eukaryotes, uniquement les champignons filamenteux ont la capacité de croître aux températures les plus élevées (COONEY et EMERSON, 1964).

Tableau 2.4 Limites supérieures de températures pour la croissance des différents groupes d'organismes (BROOK et coll., 1994b).

Groupe	Limite supérieure de température (°C)
<b>Animaux</b>	
Poissons et autres vertébrés aquatiques	38
Insectes	45-50
Crustacés	49-50
<b>Plantes</b>	
Plantes vasculaires	45
Mousses	50
<b>Micro-organismes eukaryotes</b>	
Protozoa	56
Algues	55-60
Champignons	60-62
<b>Prokaryotes</b>	
Bactéries	
Cyanobactéries	70-74
Bactéries phototrophes anaérobies	70-73
Bactéries chemo-organotrophes	90
Archaea	
Methanogènes hyperthermophiles	110
Hyperthermophiles sulfure dépendantes	113

Malgré les efforts des microbiologistes pour découvrir des nouveaux champignons dans les environnements extrêmement chauds (sources d'eaux thermales, effluents chauds, geysers et sources marines profondes), la température maximale de croissance des champignons est toujours située aux environs de 60°C (CARLILE et WATKINSON, 1996 ; DIX et WEBSTER, 1995b). Par conséquent, les concepts énoncés par COONEY et EMERSON (1964), sont toujours en vigueur et correspondent bien pour décrire la thermophilie ou la thermotolérance des champignons.

#### Définition d'un champignon thermophile :

Un champignon est considéré thermophile lorsque les températures limites de sa croissance sont situées entre 20°C et plus de 50°C. Un champignon est considéré thermotolérant lorsque sa température maximale de croissance se situe aux environs de 50°C et qu'il se développe également à des températures inférieures à 20°C (COONEY et EMERSON, 1964).

Le premier champignon thermophile (*Mucor pusillus*) a été décrit en 1886 par LINDT (en COONEY et EMERSON, 1964). En 1899, *Humicola lanuginosa* a été répertorié par TSIKLINSKAYA (En EMERSON, 1968). Jusqu'aux années 1950, uniquement cinq souches avaient été décrites. En 1964, grâce aux études réalisées par COONEY et EMERSON, une quinzaine de souches thermophiles ont été parfaitement bien identifiées. Plus tard, CRISAN (1973) a décrit une trentaine de souches thermophiles et thermotolérantes. A nos jours, la découverte de nouveaux champignons thermophiles n'a pas avancé et il existe seulement trente champignons thermophiles décrits (INGOLD et HUDSON, 1993).

### **2.3.3 Adaptation physiologique des champignons aux températures élevées**

Pour expliquer comment les champignons filamenteux s'adaptent et survivent à des températures élevées, CRISAN (1973) a présenté quatre hypothèses concernant la thermophilie:

1. Les macromolécules essentielles sont synthétisées par un turn-over important.
2. La thermostabilité macromoléculaire (protéines thermostables) est établie.
3. L'intégrité cellulaire est maintenue grâce à la présence de lipides saturés dans la membrane.
4. Les organelles thermostables assurent une thermostabilité ultrastructurelle.



A l'heure actuelle, ces quatre hypothèses restent encore valables. Par contre, on peut regretter le manque d'information concernant la physiologie des champignons pour l'adaptation thermique (DIX et WEBSTER, 1995b).

Des théories modernes sur la thermophilie proposent que la tolérance des micro-organismes aux températures élevées soit expliquée par les propriétés physico-chimiques spécifiques des polymères cellulaires, des membranes et des organelles, qui leur permettent une stabilité et une survie à des températures élevées. Cependant, les évidences expérimentales collectées pour appuyer ces théories sont rares (DIX et WEBSTER, 1995b).

Néanmoins, les études sur la stabilité des polymères des micro-organismes qui se développent à des températures élevées, indiquent que beaucoup des leurs protéines sont thermostables (JAY, 1996). Cependant, toutes les enzymes présentes dans les micro-organismes thermophiles ne sont pas nécessairement thermostables. Ce fait, suggère que pour ces micro-organismes, les macromolécules sont rapidement remplacées, au fur et à mesure qu'elles perdent leur fonction (DIX et WEBSTER, 1995b).

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer la thermostabilité enzymatique des micro-organismes thermophiles, et selon JAY (1996), il y en aurait essentiellement trois:

1. La proportion des acides aminés hydrophobes constituant les protéines est plus élevée que celle des enzymes similaires des micro-organismes mésophiles, en sachant qu'une protéine plus hydrophobique serait plus thermostable aux températures élevées.
2. La présence de liaisons entre l'enzyme et les ions métalliques, tels que Mg, Zn, Ca ou Co.
3. La présence de protéines de stress.

Peu de travaux ont été faits sur la thermostabilité des protéines fongiques, et la plupart d'entre eux, ne sont pas actuels. CRISAN (1973) a montré que la proportion des protéines thermostables intracellulaires augmente quand la température d'incubation augmente.

Une autre propriété spécifique des micro-organismes pour l'adaptation aux températures élevées est la modification de la composition lipidique de leur membrane cellulaire. En effet, la perméabilité d'une membrane dépend de la conservation de sa structure dans un état liquide-cristallin. Cette structure rend possible la correcte fluidité des enzymes liées à la membrane, et le

transport des ions et des molécules vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule s'opère normalement.

Les lipides de la membrane ont une tendance à former des gels quand la température d'incubation est située au-dessous de leur température de transition et ces lipides sont trop fluides pour des températures supérieures à leur température de transition. La température de transition est influencée par la proportion d'acides gras saturés et insaturés qui constituent les lipides de la membrane. Un lipide, composé essentiellement d'acides gras saturés, présente une température de transition élevée. Au contraire, une grande proportion d'acides gras insaturés provoque une diminution de la température de transition d'un lipide.

Par conséquent, si une membrane cellulaire est composée des lipides contenant une grande proportion d'acides gras saturés, on pourrait prévoir qu'elle maintiendrait sa structure fonctionnelle à des températures plus élevées que celle composée des lipides contenant des acides gras insaturés. Au contraire, les membranes composées des lipides avec une grande proportion d'acides gras insaturés, seraient capables de fonctionner correctement à des basses températures que celles composées d'une forte proportion en acides gras saturés.

En conclusion, on pourrait prédire que la composition lipidique des membranes des micro-organismes se développant à des basses températures, serait essentiellement faite avec une proportion élevée en acides gras insaturés. Tandis que, ceux qui se développent dans des habitats chauds, contiendraient des lipides constitués d'une proportion plus élevée en acides gras saturés.

Dans le cas des champignons filamenteux, ces prédictions sont confirmées avec les évidences expérimentales de SUMNER et coll. (1969). Ces auteurs ont étudié et comparé la composition en acides gras des lipides par 15 souches des Mucorales thermophiles, thermotolérants, mésophiles et psychophiles. En particulier, ils ont mis en évidence les points suivants:

- Les acides gras lipidiques des membranes cellulaires des souches psychophiles présentent un degré d'insaturation similaire à ceux des souches mésophiles.
- A 28°C d'incubation, le degré d'insaturation des lipides des espèces thermotolérantes n'est pas significativement différent à ceux des souches psychophiles et des souches mésophiles.

Par contre, les espèces thermophiles ont des membranes constituées d'acides gras lipidiques significativement moins insaturées.

- Au fur et à mesure que la température d'incubation augmente, les champignons thermophiles et thermotolérants modifient la composition en acides gras de leurs lipides membranaires, en devenant de moins en moins insaturée.
- A 48°C d'incubation, les champignons thermophiles et thermotolérants contiennent des acides gras avec un degré de saturation similaire.

De plus, il est important de signaler que ce travail a mis en évidence qu'à toutes les températures d'incubation, les champignons thermophiles ont une tendance à produire des lipides avec une teneur plus élevée en acides gras saturés par rapport à ceux des mésophiles. Ce point, peut être crucial pour essayer d'expliquer pourquoi les champignons thermophiles ne sont pas capables de se développer à des températures au-dessous de 20°C. La réponse pourrait être aussi simple que leur incapacité de produire suffisamment des lipides insaturés à basse températures. Ce dernier point, peut être expliqué du fait que les champignons thermophiles n'ont pas de désaturases, ou bien, que ces enzymes ne sont pas actives à des basses températures (DIX et WEBSTER, 1995b).

Finalement, en ce qui concerne la thermostabilité des organelles, peu de travaux ont été réalisés. Chez les bactéries, une relation entre la température maximale de croissance et la thermostabilité des ribosomes a été mise en évidence. En effet, plus la limite supérieure de la température est grande, plus la thermostabilité des ribosomes est élevée (JAY, 1996).

### **2.3.4 Habitats des champignons thermophiles**

Il est bien connu que les champignons thermophiles se développent à des températures élevées, en habitats naturels ou chauffés par les activités humaines (ELLIS, 1980a, 1980b). Néanmoins, contrairement aux possibles suppositions, il n'y pas d'évidences indiquant que les champignons thermophiles soient plus communs sur les sols tropicaux chauds que les mésophiles (DIX et WEBSTER, 1995). De plus, les champignons thermophiles sont distribués sur toutes les latitudes, même sur les sols de l'antarctique où les températures sont inférieures à 0°C pendant presque toute l'année (ELLIS, 1980b).

Dans les climats tempérés, le compost des végétaux constitue une des plus riches sources des champignons thermophiles, et leur participation constante dans ce processus, suggère qu'ils sont activement liés à la décomposition de la matière organique (COONEY et EMERSON, 1964; TANSEY et coll., 1977; MOUBASHER et coll., 1982; RAJASEKARAN et MAHESHWARI, 1993; STRAATSMA et coll., 1994).

Une propriété fondamentale du compostage est la thermogénèse qui résulte spontanément de l'activité métabolique microbienne. Les températures qui surpassent les 60°C sont fréquentes et essentielles pour obtenir un produit stable et sain (KANE et MULLINS 1973; CHALAUX et coll., 1993). KANE et MULLINS (1973) ont confirmé le rôle important que les champignons thermophiles jouent au cours du compostage pour la thermogénèse, la décomposition de la cellulose et leur contribution à la destruction de micro-organismes pathogènes initialement présents.

D'ailleurs, TANSEY et JACK en 1976, ont étudié l'incidence des champignons thermophiles sur les échantillons des sols. Ils ont conclu que ces champignons sont isolés plus fréquemment sur des sols chauffés par le soleil, moins sur l'herbe à l'ombre et encore moins sur les sols à l'ombre des arbres.

De plus, les champignons thermophiles et thermotolérants ont été isolés de l'air (jusqu'à 14 spore/m<sup>3</sup>), dont le 69% d'incidence correspond à *A. fumigatus* (LACEY, 1981).

D'autres rapports sur les habitats des champignons thermophiles et thermotolérants indiquent qu'ils ont été isolés de la plante de guayule (*Parthenium argentatum*) (COONEY et EMERSON, 1967), du compostage de la paille du blé (CHANG; 1967, MOUBASTER et coll.; 1982), d'un système de compostage des déchets urbains (KANE et MULLINS, 1973; TANSEY et coll. 1977), du compostage (STRAATSMA et coll., 1994), des graines d'orge (FLANNIGAN et SELLARS; 1977), des graines de cacao (OGUNDERO, 1983), des graines (ABDEL-HAFEZ et coll., 1987) du sol (TANSEY et JACK, 1976 et 1977; JAIN et coll., 1979, ABDEL-HAFEZ et coll., 1983), de l'air (THAKUR, 1977), des algues accumulées (NONOMURA, 1978), des aliments de volailles (OGUNDERO, 1980) et de l'huile de palme (OGUNDERO, 1981), principalement.

Etant donné que ces champignons sont très souvent présents dans les produits agricoles stockés, ils sont responsables de nombreuses pertes économiques dans ce secteur. A cause de la thermogénèse consécutive à leur développement, il peut arriver une postérieure combustion spontanée des grains stockés (COONEY et EMERSON, 1964; DIX et WEBSTER, 1995b).

Finalement, la production d'un large spectre d'enzymes par les champignons joue un rôle primordial sur la distribution des espèces. Cette capacité de dégrader différentes sources de carbone leur permet de coloniser des écosystèmes variés.

### **2.3.5 Enzymes produites par des champignons thermophiles**

Le Tableau 2.5 montre les champignons thermophiles qui ont été utilisés pour la production de différentes enzymes : cellulase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase, xylanase, lipase, amylase, protéase, DNAase, RNAase, urease et  $\beta$ -galactosidase.

### **2.3.6 Pathogénicité des certains champignons**

Les champignons sont généralement des saprophytes qui se nourrissent de matière organique en décomposition. Cependant, un grand nombre des champignons sont parasites des plantes (phytopathogènes) et causent la majorité des maladies, économiquement importantes, des plantes cultivables. Par ailleurs, quelques maladies humaines sont provoquées par les champignons (il n'y a que 50 espèces des champignons capables d'infecter les humaines) ; mais dans tous les cas, ils sont considérés comme des micro-organismes opportunistes (LACEY, 1975; BROCK et coll., 1994d). En effet, le type et la nature de la faiblesse chez l'hôte déterminera l'agent de l'infection (COOKE, 1979). De plus, même, si les infections superficielles sont courantes, l'incidence globale des maladies sérieuses est négligeable.

La maladie la plus sévère, provoquée par un champignon est l'aspergillose bronchopulmonaire (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979). L'aspergillose est un ensemble de symptômes cliniques distincts qui ont en commun un *Aspergillus* sp. comme agent provoquant la maladie. Cette maladie inclut l'aspergillose bronchopulmonaire, l'aspergilloma (colonisation d'une cavité préformée sans l'envahissement des tissus), l'aspergillose envahissante, et la colonisation et l'invasion de tissus affaiblis (exemple, peau brûlée et yeux blessés). Presque

toutes les aspergillose rapportées des humains et des animaux ont été associées à *A. fumigatus* (RAPER et FENNELL, 1977; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979).

Tableau 2.5 Production d'enzymes par des champignons thermophiles et thermotolérants

Enzyme	Micro-organisme	Référence
<b>cellulase</b>	<i>Chaetomium thermophile</i> , <i>Humicola grisea</i> et <i>H. insolens</i> parmi autres	FERGUS, 1969; UPRETI et JOSHI, 1984
	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>A. fumigatus</i> et <i>Thermoascus</i> sp. <i>Ch. thermophile</i> et <i>H. insolens</i> <i>H. insolens</i> et <i>A. fumigatus</i> <i>A. fumigatus</i> , <i>Sporotrichum</i> sp., <i>Thermoascus aurantiacus</i> et <i>Torula thermophile</i> (1980), <i>H. grisea</i>	ROSENBERG, 1978 FLANNIGAN et SELLARS, 1977 OGUNDERO, 1979a JAIN et coll., 1979 TAKASHIMA et coll., 1996
<b><math>\beta</math>-glucosidase</b> <b><math>\beta</math>-xylosidase</b>	<i>A. fumigatus</i> , <i>Rh. microsporus</i> , <i>Rh. pusillus</i>	FLANNIGAN et SELLARS, 1977
<b>xylanase</b>	<i>Thielavia terrestris</i>	GILBERT et coll., 1992; KVESITADZE et coll. 1995
	<i>Humicola</i> sp. <i>H. lanuginosa</i>	DA SILVA et coll., 1994 ANAND et VITHAYATHIL, 1996
<b>lipase</b>	<i>Humicola lanuginosa</i> dix différentes souches	ARIMA et coll. 1972; LIU et coll., 1972 ADAMS et DEPLOEY, 1978
	<i>Rh. pusillus</i> , <i>H. grisea</i> , <i>Talaromyces thermophilus</i> , <i>Thermoascus crustaceus</i> <i>Rh. miehei</i> <i>A. fumigatus</i> , <i>Rh. microsporus</i> et <i>Rh. pusillus</i> parmi autres <i>Thermomyces lanuginosus</i>	OGUNDERO, 1980 DEPLOEY et coll., 1981 SATYANARAYANA et JOHRI, 1981
<b>amylase</b>	<i>A. fumigatus</i> , <i>Rh. microsporus</i> , <i>Rh. pusillus</i> <i>H. insolens</i> , <i>H. lanuginosa</i> et <i>Rh. pusillus</i> , parmi autres <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>H. grisea</i>	FRICH et coll., 1994 FLANNIGAN et SELLARS, 1977 OGUNDERO, 1979b FRICH et coll., 1994 CAMPOS et FELIX, 1995
	<b>protéase</b>	<i>H. lanuginosa</i> <i>Rh. miehei</i>
<b>DNAase, RNAase, uréase</b>	<i>H. lanuginosa</i>	ADAMS et DEPLOEY, 1978
<b><math>\beta</math>-galactosidase</b>	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SORENSEN et CRISAN, 1974
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	FISHER et coll., 1995; ANAND et VITHAYATHIL, 1996

## 2.4 Les lipases

Les lipides sont des constituants majeurs de la biomasse terrestre et marine. Les enzymes lipolytiques (lipases) jouent un rôle essentiel dans le « turn over » de ces composés. D'une part, les phospholipides et les glycolipides sont des éléments universels, que l'on trouve impliqués dans la structure et le fonctionnement des membranes biologiques. D'autre part, les triglycérides constituent le stock d'énergie principalement chez les organismes supérieurs. De ce fait, les lipases sont des enzymes indispensables pour le fonctionnement des cellules et le transfert des lipides d'un organisme à un autre (VERGER et coll., 1990).

Les lipases ont été isolées dans une grande variété de mammifères et de micro-organismes. Les lipases microbiennes ont des propriétés catalytiques très diverses et assez intéressantes pour les applications industrielles. De plus, la majorité des lipases microbiennes sont extracellulaires, ce qui facilite leur récupération (AIRES-BARROS et coll., 1994).

L'intérêt des chercheurs sur ces enzymes est reflété par le nombre important des publications, 1000 publications en moyenne par an (JAEGER et coll. 1994). De ce fait, l'étendue de cette révision bibliographique sera limitée aux lipases d'origine fongique.

### 2.4.1 Définition des lipases

La nomenclature des lipases est souvent une source des confusions, spécialement, en ce qui concerne la spécificité du substrat. Différents termes, définitions et manières de mesurer les lipases ont été rapportés dans la littérature. En considérant l'ensemble des derniers avancements de l'étude de ces enzymes, une définition générale peut être donnée, basée sur un consensus des enzymologistes.

Une lipase (EC 3.1.1.3) peut être définie comme une triacylglycérol hydrolase, l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons esters des triglycérides émulsionnés en diglycérides, monoglycérides, glycérol et acides gras (Figure 2.6). Cette enzyme est activée par la présence d'une interphase lipide-eau, où la phase lipidique est constituée par des triglycérides contenant des acides gras de chaîne longue. Ce phénomène est appelé activation interfaciale.

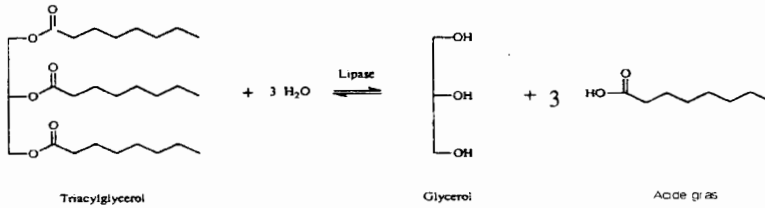


Figure 2.6 Hydrolyse d'un triglycéride catalysée par la lipase

### 2.4.2 L'activation interfaciale

Selon MARTINELLE et HULT (1994), il existe quatre hypothèses pour essayer de comprendre l'activation interfaciale des lipases. L'interface eau-lipide entraîne :

- a - Une forte concentration du substrat dans l'interface.
- b - Une augmentation de la disponibilité du substrat par déplacement de la cuirasse d'eau autour des molécules contenant des esters.
- c - Une meilleure orientation de la liaison ester à hydrolyser.
- d - Un changement tri-dimensionnel permettant une augmentation de l'activité lipolytique

La détermination de la structure cristalline de la lipase de *Rhizomucor miehei* complexée avec l'inhibiteur du site actif (n-hexylphosphonate ethyl ester) a permis la vérification de la quatrième hypothèse basée sur le changement conformationnel (BRZOZOWSKI et coll., 1991). Avant de donner les évidences expérimentales qui supportent cette hypothèse, il est convenable de définir une interface.

#### L'interface

Les triglycérides sont des lipides non chargés, constitués d'acides gras esterifiés à une molécule de glycérol. Si le triglycéride est constitué par des acides gras de chaîne courte, la molécule présente une nature légèrement hydrosoluble (hydrophile) ; mais en règle générale, les triglycérides de chaîne longue ont une nature hydrophobique. La concentration maximale de monomères dans une solution est appelée valeur de saturation et c'est le point juste avant que les triglycérides commencent à former une émulsion. Dans le cas de la tryacétine, la valeur de



saturation est située à 0,33M, et pour les triglycérides de longue chaîne, cette valeur est située à moins de 1  $\mu\text{M}$ . La lipase hydrolyse les lipides, juste à l'interface lipide-eau, ce qui implique que la concentration effective des molécules lipidiques dans l'interface (exprimée en  $\text{mol}/\text{cm}^2$ ) détermine la vitesse de la lipolyse.

#### Activation interfaciale

La capacité d'être activée par une interface est une différence fondamentale entre l'activité lipasique et l'activité estérasique. L'activité estérasique est une fonction de la concentration de substrat qui peut être décrite par l'équation de Michaelis-Menten, où la vitesse maximale de la réaction est atteinte avant d'arriver à la saturation du substrat dans une solution. Par conséquent, la formation d'une émulsion substrat-eau ne change pas la vitesse de la réaction d'une estérase. Par contre, quand la concentration du même substrat est inférieure à sa valeur de saturation, la lipase ne montre pas d'activité. Cependant, quand la limite de saturation du substrat est dépassée, la lipase est progressivement activée, au fur et à mesure, que le substrat forme une émulsion (SARDA et DESNUELLE, 1958 ; DESNUELLE, 1961 ; VERGER et coll., 1990). Ce phénomène est illustré dans la Figure 2.7b, où, la ligne verticale discontinue représente la saturation du substrat. A gauche de cette ligne, le substrat (triacétyne) est dissous dans l'eau. A droite, le substrat forme une émulsion et l'aire interfaciale est augmentée. Ces expériences montrent que l'activité lipasique dépend de la présence d'une interface.

La nécessité de cette interface pour que la réaction catalysée par la lipase soit achevée, a été élégamment mise en évidence avec la description de la structure tridimensionnelle des lipases. BRADY et coll. (1990) et WINKLER et coll. (1990) ont découvert que le site actif des lipases est recouvert par une chaîne polypeptidique en forme de couvercle, ce qui le rend inaccessible aux molécules de substrat et ce qui explique la raison pour laquelle, les molécules de substrat solubilisées dans l'eau ne sont pas attaquées par une lipase. Cependant, lorsque le substrat est sous une forme émulsionnée, la lipase s'attache à la surface de l'interface substrat-eau et un changement conformationnel a lieu. Dans ces conditions, le couvercle est déplacé et le site actif de l'enzyme devient accessible. La partie hydrophobe du couvercle de la lipase est exposée à la phase lipidique, en augmentant les interactions hydrophobes entre l'enzyme et la surface lipidique (BRZOZOWSKI et coll., 1991 ; VAN TILBEURGH et coll., 1993). Le

couvercle des lipases de *Rh. miehei* a une conformation de  $\alpha$ -hélice et lorsqu'il est mis en contact avec l'interface, il se met à bouger comme un corps rigide (BRADY et coll., 1990 ; BRZOZOWSKI et coll., 1991). La position fermée du couvercle est maintenue par des ponts d'hydrogène. Etant donné que la chaîne polypeptidique du site actif présente une surface non polaire, la position ouverte du couvercle, permet au site actif de s'attacher à l'interface hydrophobique. Ces observations expliquent le phénomène de l'activation interfaciale. Ainsi, si une enzyme est capable d'hydrolyser les triglycérides, ne présentant pas une activation interfaciale, cette enzyme peut être appelée estérase (Figure 2.7a).

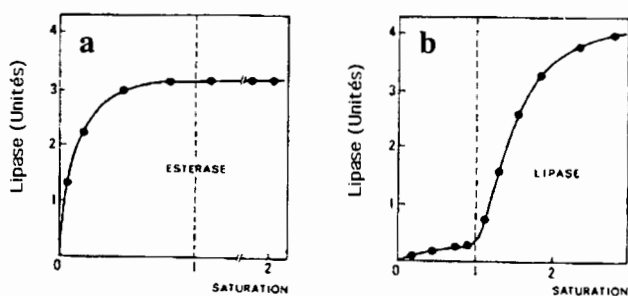


Figure 2.7 Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et par la lipase pancréatique du porc. Vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat, exprimée en multiples de saturation. Cette figure est reprise de VERGER et coll. (1990).

### 2.4.3 Les cinétiques des lipases

Les cinétiques des lipases ne peuvent pas être décrites avec le modèle de Michaelis-Menten, car ce modèle est valable uniquement dans le cas d'une phase homogène (enzyme et substrat soluble). Une relation entre la vitesse de la réaction lipasique et la concentration de substrat, exprimée comme une aire superficielle, a été proposée et présentée comme un modèle analogue à celui de la cinétique de Michaelis-Menten. Cependant, le problème avec le  $K_m$  interfacial est dû à la difficulté d'interprétation, étant donné que'un  $K_m$  de Michaelis-Menten contient des unités de concentration, exprimée comme moles de substrat par unité de volume. La mesure du  $K_m$  interfaciale, peut être plutôt une estimation de l'interaction relativement non spécifique protéine-lipide, qu'une mesure correcte de la spécificité du substrat. Un modèle

convenable décrivant la cinétique de la lipase, devrait distinguer d'une part, le phénomène d'adsorption de la lipase et d'autre part, la liaison de la lipase au substrat (MARTINELLE et HULT, 1994).

#### 2.4.4 Le site actif des lipases fongiques

Quatre structures de lipases fongiques ont été élucidées par diffraction de rayons X : Les lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY et coll., 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG et coll., 1991), *Fusarium solani* (MARTINEZ et coll., 1992) et *Candida rugosa* (GROCHULSKI et coll., 1993). Les lipases de *Candida rugosa* et *Geotrichum candidum* sont très similaires, présentant plusieurs portions de leurs structures avec une homologie élevée de la séquence des acides aminés. D'après ces études, il a été observé que le centre catalytique des lipases est constitué par les résidus de trois acides aminés : sérine, histidine et acide aspartique (ou acide glutamique dans le cas de *G. candidum*). Cette triade catalytique présente une architecture analogue à celle des protéases à sérine (BRADY et coll., 1990 ; WINKLER et coll., 1990).

#### 2.4.5 Mécanisme de la réaction lipolytique

Pendant la réaction lipolytique, un intermédiaire tétraédrique est formé provenant d'un complexe acyl-enzyme. Après, la lipase libre est régénérée par une réaction hydrolytique. Les détails du mécanisme de cette réaction sont donnés dans la Figure 2.8. D'abord, un intermédiaire tétraédrique est formé par l'attaque nucléophile de l'oxygène de la chaîne latérale de la sérine sur la liaison ester du carbone carbonyle du lipide (réaction 1). Ensuite un azote de l'anneau imidazole de l'histidine se protone avec l'hydrogène du résidu de la sérine, en augmentant la nucléophilie de l'oxygène de la sérine. En conséquence, l'anneau imidazole de l'histidine se charge positivement. Cette charge positive est stabilisée par la charge négative du résidu acide de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique (réaction 2). L'état de transition du substrat est stabilisé par deux ponts d'hydrogène formés avec des liaisons amides des résidus qui appartiennent au trou de l'oxygénation. Finalement, le groupe alcool de la sérine libère le carbone carbonyle de l'intermédiaire (réaction 3). Et par l'attaque nucléophile d'un ion

hydroxyle au carbone carbonyle, l'acide gras est libéré et l'enzyme régénérée, en consommant une molécule d'eau (réaction 4).

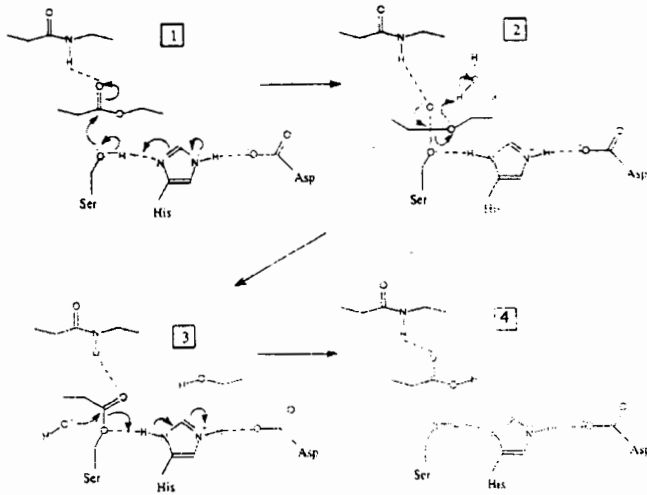


Figure 2.8 Mécanisme de l'hydrolyse d'une liaison ester par une lipase

#### 2.4.6 Spécificité des lipases

Les lipases peuvent être classées dans trois groupes selon leur spécificité d'hydrolyse des triglycérides (JAEGER et coll., 1994) :

- a - Ces lipases ne présentent pas de spécificité d'hydrolyse, ni au niveau de la position du triglycéride, ni par rapport à la structure chimique de l'acide gras.
- b - Ces lipases hydrolysent les liaisons esters primaires (C1 et C3 du triglycéride).
- c - Ces lipases présentent une préférence prononcée par l'acide gras à hydrolyser (présence de doubles liaisons ou de la longueur de la chaîne de l'acide gras).

### 2.4.7 Méthodes d'analyse des lipases

Les méthodes d'analyses des lipases sont très élaborées et demandent de l'expérience du manipulateur. De plus, les réactifs et/ou les équipements sont souvent chers (LINFIELD et coll., 1985).

L'analyse quantitative des lipases est obtenue, principalement, par des méthodes de titrimétrie et de spectrophotométrie. Les méthodes les plus couramment utilisées sont les suivantes :

#### Titrimétrie (Méthode du pH-stat):

Pendant une réaction lipolytique, les acides gras libérés et sont titrés par l'addition continue d'un volume de solution de NaOH, en maintenant le pH de la réaction constant. Le volume de NaOH ajouté est rapporté en fonction du temps. La pente obtenue de cette fonction représente la vitesse d'hydrolyse d'acides gras par minute .

#### Spectrophotométrie

Un grand nombre de méthodes basées sur des mesures spectrophotométriques sont disponibles pour l'analyse des lipases. Ces méthodes ont comme principe de la réaction que les produits de l'hydrolyse des substrats réagissent avec des autres composants chimiques ou bien, ils peuvent être utilisés comme le substrat pour d'autres enzymes. Les principes des méthodes spectrophotométriques sont les suivantes :

- Suite à la réaction lipasique, une série de réactions enzymatiques accouplées utilisent les acides gras libérés et forment du NADH, comme l'étape finale de la réaction.
- La rhodamine 6G se complexe avec les acides gras libérés pendant la lipolyse. Ce complexe donne une coloration rose qui est lue à 513 nm.
- Les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides sont extraits avec un solvant organique et sont transformés par la suite à des sels de Cu (II) qui sont mesurés à 715 nm (KWON et RHEE, 1986).
- L'hydrolyse du p-nitrophénol palmitate donne comme produit de la réaction le p-nitrophénol, dont la coloration jaune (en milieu alcalin) est lue à 410 nm (KORDEL et coll., 1991 ; PIMENTEL et coll., 1994).

- L'hydrolyse de la tributyrine provoque un changement de couleur du rouge de phénol utilisé comme un indicateur de pH. Des données quantitatives sont obtenues avec la mesure de la diminution de l'absorbance à 557 nm (ROBERTS et coll., 1985).
- L'hydrolyse de la tributyrine, dans une émulsion, provoque une clarification du milieu qui est lue à 450 nm (SMELZTER et coll., 1992).
- La safranine (colorant cationique) a été utilisée pour détecter le changement de la charge nette négative de l'interface lipide-eau.

JENSEN (1983) a rapporté que les méthodes, les plus utilisées, pour l'analyse de lipases sont le titrimétrique et le colorimétrique du sel du cuivre.

VORDERWÜLBECKE et coll. (1992) ont comparé quelques méthodes d'analyse des lipases en les appliquant sur soixante préparations commerciales des lipases. Le pHstat, en utilisant comme substrats, la trioléine et la tributyrine et d'autres méthodes colorimétriques, en utilisant, des substrats synthétiques, comme le pNitroPhenylPalmitate (pNPP), pNitroPhenylButyrate (pNPB), S.O.O'-tributyryl-1-thioglycérine (TBTG) et 1,2-o-dilauryl-rac-glycéro-3-acide glutarique-resofurine ester (DGGR).

Ces auteurs ont trouvé que certaines méthodes utilisant les substrats synthétiques sont plus convenables, faciles, rapides, reproductibles et sensibles que le pHstat. Egalement, ils ont montré que les lipases qui hydrolysent la trioléine, hydrolysent aussi, le pNPP, pNPB, DGGR et TBTG.

#### **2.4.8 Production des lipases fongiques**

La quantité des lipases produites par des champignons dépend de plusieurs facteurs environnementaux, tels que, la température d'incubation, le pH, les source de carbone, d'azote et de lipide, la concentration de sels inorganiques et la disponibilité d'oxygène (AIRES BARROS et coll., 1994).

La lipase est généralement considérée comme une enzyme constitutive. Cependant, elle peut être induite par différents composés du milieu de culture (POKORNY et coll., 1994). En général, l'addition de lipides dans le milieu de culture augmente la production d'exo-lipases

fongiques (WALLER et COMEAU, 1990; NOVOTNY et DOLEZALOVA, 1993 ; OBRADORS et coll., 1993 ; POKORNY et coll., 1994 ; RAPP, 1995 ; HATZINIKOLAU et coll., 1996).

Egalement, le choix des différentes sources de carbone, d'azote et d'autres nutriments détermine la concentration de lipases produites à la fin d'une culture. L'effet de la composition de milieux et des conditions de culture a été étudiés par CHANDER et coll. (1981), MARTINEZ-CRUZ et coll. (1993), OBRADORS et coll. (1993), OHNISHI et coll. (1994) et POKORNY et coll. (1994), entre autres.

Les études concernant les lipases ont commencé, il y a environ 150 ans, mais le premier rapport sur la production des lipases par un champignon thermophile (*Humicola lanuginosa*) a été publié par ARIMA et coll. (1972).

#### 2.4.9 Hydrolyse des lipides et synthèse des esters

L'hydrolyse des graisses et des huiles (triacylglycérols) est une réaction en équilibre et par conséquent, il est possible de changer la direction de la réaction vers la synthèse des esters par modification des conditions de la réaction (Figure 2.9). Cet équilibre est contrôlé par la teneur en eau dans le mélange de la réaction. Si la réaction est obtenue dans des conditions non aqueuses, les lipases catalysent des réactions de synthèse des esters. Différents types de synthèses peuvent être réalisées (KÖTTING et EIBL, 1994) :

- Transestérification: Le groupe acyle d'un triglycéride est transféré à une molécule de glycérol (glycérolyse) ou à un alcool (alcoolyse).
- Interestérification: Le groupe acyle d'un triglycéride est échangé par un acide gras (acidolyse) ou par un ester d'un acide gras.

Pendant, ces réactions, la quantité d'eau et de produits de synthèse doivent être attentivement contrôlés, afin d'orienter la réaction vers la synthèse.

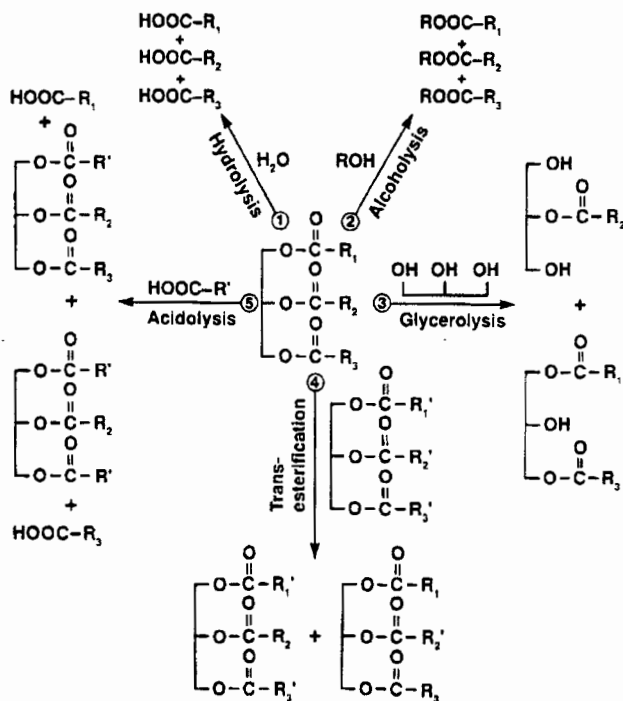


Figure 2.9 Biotransformations des lipides (graisses et huiles)  
 $\text{R}_n$  et  $\text{R}'_n$  sont des acides gras ;  $\text{ROH}$  est essentiellement du méthanol.

#### 2.4.10 Biotechnologie des lipases

Indépendamment de leur importance biologique, les lipases commencent à jouer un rôle important dans divers secteurs : médecine clinique, pharmacologie, nutrition, aliments et technologie des huiles (VERGER et coll., 1990). Notamment, la grande majorité des préparations commerciales des lipases concernent les lipases d'origine fongique, grâce à leurs statut GRAS (Generally Recognized As Safe), étant donné que les lipases bactériennes ont parfois montré une corrélation entre leur activité lipolytique et leur capacité pathogénique (*Staphylococcus aureus* (SMELTZER et coll., 1992) et *Propionibacterium acne* (JAEGER et coll., 1994)).

Les enzymes telles que les protéases et les carbohydrases ont été utilisées industriellement pendant des années et représentent le plus grand marché mondial des enzymes.



En 1995, ce marché a été estimé à 600 millions de dollars. Les lipases représentent moins de 4% de ce marché. Cependant, grâce aux récentes applications des lipases, le marché des ces enzymes va tendre à augmenter très sensiblement. Selon les prévisions, les lipases sont en train d'acquérir une des plus importantes places sur le marché de enzymes industrielles. Il existe au moins deux raisons principales pour expliquer cette tendance économique (VULFSON, 1994) :

- a - Les lipases ont été utilisées intensivement dans de nouveaux procédés de biotransformations et de biocatalyse. En conséquence, des centaines de synthèses organiques ont été décrites au cours des dernières années.
- b - La diversité des applications actuelles et potentielles des lipases dépassent largement celles des protéases et des carbohydrolases.

Le faible intérêt pour l'utilisation au niveau industriel des lipases est dû principalement à la disponibilité limitée et aux coûts élevés de ces enzymes, spécialement pour les larges applications potentielles, telles que les lessives et les détergents. Cependant, la production technologique des lipases a évolué énormément, grâce aux avances du génie génétique, de la biologie moléculaire et de la technologie du DNA recombinant qui permettent de construire des nouvelles souches microbiennes, en rendant la production industrielle de ces enzymes, moins chère. Notamment, pour la production industrielle de la lipase de *Rhizopus delemar*, une souche de *E. coli* a été manipulée génétiquement. Grâce à ce clonage, la production de la lipase a été augmentée de 100 fois et un dérivé de l'enzyme a été construit, présentant une plus grande thermorésistance que l'enzyme fongique originale (HASS et coll., 1991).

Comme conséquence du développement du génie génétique, une diversité de lipases de différents micro-organismes est disponible sur le marché. Actuellement, l'industrie des détergents absorbe une grande partie de cette production et concerne la plus importante application industrielle des lipases. Avant que l'industrie des détergents occupe cette place privilégiée, l'application principale des lipases était limitée au domaine de l'industrie alimentaire, comme le développement des saveurs dans les aliments et les fromages italiens (JAEGER et coll., 1994).

### 2.4.11 Applications industrielles des lipases

#### Industrie laitière

Les lipases sont amplement utilisées dans l'industrie laitière pour l'hydrolyse de la graisse du lait. Les applications courantes incluent, l'intensification des saveurs dans les fromages, l'accélération de la maturation des fromages lors de l'affinage et la lipolyse du beurre et de la crème.

#### Détergents

La vente des enzymes comme constituants des détergents représentent le plus grand marché des enzymes industrielles (FALCH, 1991). Jusqu'à présent, les lipases ne jouaient pas un rôle significatif dans la composition des détergents, dû principalement au manque d'enzymes suffisamment actives et stables dans des conditions alcalines. La plus grande application des lipases dans l'industrie des détergents est arrivée quand l'entreprise NOVO/Nordisk a lancé le produit « Lipolase ». Ce produit contient la lipase extracellulaire de *Humicola lanuginosa* produite dans une échelle industrielle par *Aspergillus niger*. Cette lipase est utilisée par, au moins, deux entreprises de détergents : Procter & Gamble et Unilever. Le deuxième produit commercialement disponible est le «Lumafast» contenant la lipase bactérienne de *Pseudomonas putida* (JAEGER et coll., 1994).

#### Industrie oleochimique

Les applications des lipases dans l'industrie oleochimique pourraient être énormes, car, 60 millions de tonnes/an des graisses et des huiles sont produites dans le monde entier. Une substantielle partie de cette production (2 millions de tons/an) est utilisée dans des procédés chimiques qui consomment beaucoup d'énergie, comme l'hydrolyse, la glycérolyse et l'alcoololyse (VULFSON, 1994). Ces procédés chimiques d'hydrolyse des graisses et de glycérolyse des huiles requièrent de conditions sévères de température (240-260°C) et de pression (60 bar). De plus, ces procédés produisent en même temps des effets collatéraux indésirables, comme la coloration des produits et la dégradation des quelques acides gras. De ce fait, une redistillation est nécessaire pour éliminer ces impuretés. Actuellement les applications des lipases ne sont économiquement compétitives que dans des cas très particuliers (ARBIGE et PITCHER, 1989; FALCH, 1991). L'introduction d'une nouvelle génération des lipases

thermostables et bon marché devrait changer la balance vers la technologie enzymatique. Néanmoins, la véritable raison de la faible exploitation des lipases dans ce secteur, est du à le mentalité conservatrice et aux grands investissements impliqués (VULFSON, 1994).

Il existe d'autres applications potentielles des lipases qui pourraient être commercialisées très prochainement (VULFSON, 1994) :

- La synthèse des triglycérides structurés. Les lipases peuvent catalyser des transestérifications capables de revaloriser les graisses, étant donné que les propriétés et par conséquent, la valeur commerciale des graisses dépend de leur composition en acides gras.
- La synthèse de surfactants. Principalement, pour la production des émulsifiants d'aliments.
- La synthèse des ingrédients pour l'industrie de produits de beauté. A titre d'exemple, la lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* a été utilisée pour la production d'isopropyl-myristate, isopropyl-palmitate et 2-ethyl-héxyl-palmitate.
- La synthèse de nouveaux médicaments et des nouvelles molécules. L'industrie pharmaceutique et l'industrie agrochimie préfèrent des produits optiquement purs que les lipases sont capables de catalyser, au lieu du mélange racémique produit par synthèse chimique.

## 2.5. Fermentation en Milieu Solide (FMS)

### 2.5.1. Définition des FMS

La fermentation en milieu solide (FMS), traduction de l'anglais "Solid State Cultivation", "Solid Substrate Fermentation" ou "Solid State Fermentation" est désignée par Hesseltine (1987) comme "une fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide". Par la suite, différents auteurs la décrivent comme étant la croissance et le métabolisme des organismes sur des matériaux solides avec une structure organisée en l'absence de tout liquide sous forme libre (RAIMBAULT, 1980 ; MOO-YOUNG et coll., 1983). Pour AIDOO et coll., (1982), la fermentation en milieu solide englobe toute fermentation qui a lieu sur un substrat solide ou sur un support inerte.

Selon certains auteurs (LONSANE et coll., 1985 ; ORIOL, 1987 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 et TREJO-HERNANDEZ, 1992), la FMS est une culture microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice et en absence de tout écoulement liquide. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent à l'état dissous dans une solution.

En fonction de la nature du support, on peut distinguer deux types de fermentations en milieu solide (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991):

1- Culture solide sur une phase substrat-support, la phase solide est constituée à partir d'un matériel assurant à la fois la fonction de support et de source de nutriments.

2- Culture solide avec une phase support imprégné d'un milieu liquide. Dans ce type de fermentation, la phase solide est considérée comme un support inerte, qui ne constitue pas une source de nutriments pour les micro-organismes, mais sert de réservoir d'une solution nutritive, celle-ci étant absorbée sur la matrice solide. Dans la FMS, la capacité d'absorption est un facteur important à contrôler. Les matériaux utilisés sont divers, et la plupart ont une forte capacité de rétention d'eau (exemples : bagasse de canne à sucre, écorce de bois, éponge, polyuréthane, vermiculite ...).

### 2.5.2. Utilisations des FMS

Les fermentations solides ont été pratiquées depuis très longtemps de façon artisanale en alimentation humaine traditionnelle, et concernent essentiellement les transformations de produits agricoles par les champignons inférieurs. En occident, elles sont utilisées pour la fabrication d'aliments fermentés tel que le fromage à partir des protéines animales du lait, et constituent alors une technique de conservation de ces protéines. Dans les pays asiatiques par contre, ces fermentations concernent essentiellement des produits à base de protéines végétales comme le soja. Le but de ces fermentations est de remanier ces protéines végétales peu digestes, en protéines fongiques ou de les hydrolyser en peptides ou acides aminés mieux assimilés par l'homme (RAIMBAULT, 1980).

Il existe aussi un grand nombre de procédés traditionnels qui ont été largement étudiés et répertoriés par HESSELTINE (1987). Le principe de base de ces différentes techniques consiste à cuire les graines de céréales comme le soja ou le riz, et à les inoculer avec une ou plusieurs moisissures du genre *Rhizopus*, à laisser reposer le produit quelques jours pour permettre au champignon de se développer et d'agir, puis à cuire le produit avant de le consommer (RUIZ-TERAN et OWENS, 1996).

Au Japon quelques procédés, dérivés de ces fermentations traditionnelles, ont été adaptés pour la fabrication industrielle de produits alimentaires (miso) ou d'enzymes telle que l'amylase par le procédé Koji. Par ailleurs, RAIMBAULT (1980) a mis au point un procédé de FMS permettant un enrichissement direct de produits amylacés en protéines en vue de leur utilisation en alimentation animale. Par la suite, d'autres applications ont pu être envisagées telle que la production d'alcool par des cultures de levure (SAUCEDO CASTAÑEDA, 1991) la production de pénicilline (BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1988), production d'acide giberillique (KUMAR et LONSANE, 1987), la production d'acide citrique par des cultures d'*Aspergillus niger* (GUTIERREZ-ROJAS et coll., 1995), la production d'alcaloïdes par les cultures de *Claviceps* (TREJO-HERNANDEZ, 1992) ou la détoxification de la pulpe de café (PERRAUD-GAIME, 1995), production d'arômes (CHRISTEN et coll., 1994 ; SARHY-BAGNON et coll., 1997 ; KABBAJ et coll., 1997).

### 2.5.3. Avantages et inconvénients de la FMS

La comparaison de la FMS et des fermentations submergées a été souvent évoquée (MUDGETT, 1986 ; HESSELTINE, 1987 ; LONSANE et coll., 1985).

#### Avantages de la FMS :

- Simplicité des milieux de culture
- Diminution des effluents liquides à traiter
- Diminution des contaminations résultant de la faible humidité du support
- Difficultés minimales pour une conduite des procédés en continu ou en semi continu
- Conditions de culture proches de celles des milieux naturels
- Pour les fermentations traditionnelles, la microflore du support sert d'inoculum
- Aération facile due à la porosité du matériel
- Utilisation directe des solides fermentés
- Volume du fermenteur plus petit que dans la culture liquide, à quantité égale de substrat.

#### Inconvénients de la FMS

- Risque d'une élévation excessive de la température
- Régulation difficile des paramètres de culture
- Pré-traitements des supports (humidification, homogénéisation, dispersion, traitement thermique, attaque enzymatique,...)
- Problèmes de perte d'humidité pour les fermentations de longue durée
- Inoculation très importante lorsqu'on n'utilise pas de microflore naturelle
- Estimation précise de la biomasse fongique

### 2.5.4. Les micro-organismes

Les champignons filamenteux, contrairement aux organismes unicellulaires, sont les mieux adaptés à la FMS en raison de leur capacité à coloniser les substrats solides. La

colonisation s'opère par allongement apical et ramification permettant une exploration rapide de leur environnement. A l'inverse, les levures et les bactéries ne peuvent se développer qu'à la surface et à l'intérieur des cavités de la matrice (RAIMBAULT, 1980 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

### **2.5.5. Les substrats et les supports**

Dans la nature, les champignons se développent sur des matériaux solides. Ils sont capables d'envahir la surface et de pénétrer dans les espaces intercellulaires et intracellulaires pour se procurer les nutriments nécessaires à leur développement. En FMS, les substrats utilisés peuvent être de type amylacé ou ligno-cellulosique. Dans le premier cas, il peut s'agir de graines de céréales, sources de sucres directement accessibles et facilement dégradables par les micro-organismes. Dans le cas des matériaux ligno-cellulosiques, les substrats sont plus complexes et plus difficiles à dégrader (ROUSSOS, 1985). Ils sont composés de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. La présence de la lignine limite l'action des enzymes microbiennes. Cependant, la cellulose et l'hémicellulose peuvent être dégradées par les micro-organismes lorsque la lignine est dépolymérisée, solubilisée ou éliminée par des traitements chimiques ou biologiques.

### **2.5.6. Activité de l'eau et humidité**

En FMS, la quantité de l'eau présente dans le milieu est fonction de la capacité de rétention de la phase solide. Toutefois cette quantité de liquide doit être nécessaire à la croissance des micro-organismes sans détruire la structure solide ou réduire la porosité du substrat ou du support (ORIOLE, 1987; GERVAIS et BENSOUSSAN, 1994).

De plus, la faculté de développement des champignons sur des matériaux solides dépend de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau est définie comme l'humidité relative de la phase gazeuse en équilibre avec le substrat et traduit la quantité d'eau disponible pour le développement des organismes. Ceci est généralement représenté par des courbes de sorption qui établissent une relation entre le pourcentage d'eau ou d'humidité et l'activité de l'eau. Ces courbes présentent une forme sigmoïdale où trois zones distinctes sont définies : a) Une zone

- où la disponibilité en eau est quasi nulle  $0,0 \leq A_w \leq 0,2$ . b) Une zone intermédiaire  $0,2 \leq A_w \leq 0,6$ .  
 c) Une zone où la proportion d'eau libre est importante  $0,6 \leq A_w \leq 0,9$ .

Généralement, les bactéries se développent à des activités de l'eau élevées ( $0,85 \leq A_w \leq 0,99$ ). Par contre, pour les levures, l'activité optimale se situe entre 0,75 et 0,9, et pour les champignons entre 0,6 et 0,9.

L'eau en FMS a différents rôles : elle intervient dans la constitution des micro-organismes, et sert à véhiculer enzymes, nutriments et métabolites. Elle intervient dans la solubilisation de l' $O_2$  gazeux (ORIOLE, 1987). Cependant, une humidité élevée dans le substrat entraîne une diminution de la porosité de la matrice solide, une faible diffusion de l' $O_2$ , une réduction du volume des échanges gazeux, ainsi que des risques de contaminations bactériennes. Par contre, une faible humidité aboutit à une croissance limitée et diminue l'accessibilité du substrat (MISRA, 1991). Par ailleurs, des changements s'opèrent au cours de la fermentation et sont dus à l'évaporation et à la libération d'eau issue du métabolisme des micro-organismes (LONSANE et coll., 1985).

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'importance de l'eau sur le métabolisme des micro-organismes (RAIMBAULT, 1980, GERVAIS et coll., 1988, ORIOLE et coll., 1988). Dans la plupart des cas, l'augmentation de l'humidité du substrat provoque une augmentation du taux spécifique de croissance, de la biomasse et de la synthèse d'enzymes (NISHIO et coll., 1979; NARAHARA et coll., 1982; SATO et coll., 1983). Par ailleurs, GERVAIS et coll. (1988) ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur la production de l'heptanone par *Penicillium roqueforti*, ils ont observé que la meilleure production était obtenue pour  $A_w = 0,98$ .

### 2.5.7. Aération et échanges gazeux

En FMS, l'aération est généralement forcée, son débit est fonction de la nature du micro-organisme étudié, de la quantité d' $O_2$  ou de  $CO_2$  nécessaire au procédé, de la quantité de chaleur métabolique, et de métabolites qui doivent être dissipés (LONSANE et coll., 1985).



En FMS, le contrôle de l'environnement gazeux est un facteur important pour le développement des micro-organismes. En effet, l'O<sub>2</sub> doit être suffisant pour ne pas limiter la croissance. Celle-ci dépend de la vitesse du flux gazeux dans la masse du produit, de la vitesse de transport de l'O<sub>2</sub> dans le milieu et de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> par les micro-organismes (RAIMBAULT, 1980). Pour MOO-YOUNG et coll. (1983), les transferts de gaz peuvent être effectués par différents mécanismes :

Le transfert interparticules qui concerne les échanges de masse par convection entre la phase gazeuse et l'interphase gaz-solide. La porosité interparticulaire est définie comme l'espace vide occupé par l'air au sein de la matrice solide. Cette porosité, est fonction aussi bien de la nature du matériel utilisé que de la quantité d'humidité présente et du débit d'air dans le fermenteur.

Le transfert intraparticulaire qui concerne la diffusion d'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> entre interphase solide-gaz et l'intérieur de la matrice solide.

En FMS, l'aération est un facteur très important qui assure différentes fonctions :

- a- l'approvisionnement en O<sub>2</sub> pour la croissance aérobie et le métabolisme
- b- la régulation de la température
- c- l'élimination de la vapeur d'eau, du CO<sub>2</sub> et de certains métabolites volatils.

Dans le cas des matériaux fibreux, il existe des espaces disponibles favorisant la diffusion de l'O<sub>2</sub>. Par contre, dans le cas des substrats amylacés, les espaces sont réduits, la diffusion de l'air est plus difficile et limite la croissance. Afin d'éviter ce type de problème, il est indispensable de réaliser des prétraitements qui permettent l'obtention de substrats ayant une granulométrie homogène (DESCHAMPS et coll. 1982; BALDENSPERGER et coll. 1985).

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'effet de la composition en CO<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> sur le métabolisme des micro-organismes cultivés en FMS. Ainsi, lors de la production d'enzymes par *Aspergillus oryzae*, sur le riz, des effets positifs de la pression partielle de l'O<sub>2</sub> ont été observés sur le rendement en amylases (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1980). De même NARAHARA et coll., (1982) ont obtenu des rendements supérieurs en amylases et en protéases, quand la pression partielle en CO<sub>2</sub> est comprise entre 2 et 5% au cours de la phase

exponentielle de croissance et en protéases pour une pression partielle de 5% durant la phase stationnaire.

Ainsi, il apparaît que le contrôle de l'environnement gazeux est nécessaire afin de contrôler le métabolisme des micro-organismes. En raison de l'importance du contrôle de l'environnement gazeux et de son effet sur le métabolisme, un système d'analyse automatique des gaz a été mis au point afin d'étudier leurs effets sur le déroulement de la FMS. Il permet de suivre en temps réel l'évolution des activités respiratoires au cours d'une fermentation (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

### **2.5.8. Contrôle de la température**

En FMS, le dégagement de la chaleur produite au cours des activités métaboliques des micro-organismes, provoque une élévation de la température au sein du fermenteur, ce qui pose un réel problème (HESSELTINE, 1987). D'une part, l'hétérogénéité du matériel solide entraîne la formation de gradients de température dus à la forte activité microbienne. D'autre part la faible activité de l'eau, l'absence d'agitation lors de l'utilisation de fermenteurs statiques, la faible conductivité thermique des matériaux biologiques nuisent au développement des micro-organismes (MOO-YOUNG et coll., 1983 ; BARSTOW et coll., 1988 ; GRAJEK, 1988 ; GONZALES -BLANCO et coll., 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990; 1992).

L'influence de la température sur le métabolisme des micro-organismes a été le sujet de nombreuses recherches (RAIMBAULT, 1980 ; RATHBUN et SHULER, 1983 ; HUERTA-OCHOA, 1984 ; LONSANE et coll., 1985 ; GONZALES -BLANCO et coll., 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990).

### **2.5.9. Contrôle du pH**

Le pH initial d'une culture est ajusté à l'optimum par la solution nutritive qui imprègne le support. Le maintien du pH, en cours de fermentation, est très délicat (DURAND et CHEREAU, 1988). Afin d'éviter de fortes variations de pH, RAIMBAULT (1980) a préconisé l'utilisation de sels minéraux qui confèrent au milieu de culture un pouvoir tampon. Ainsi, un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée en proportions adéquates a permis de maintenir le pH

à des valeurs favorables à la croissance d'*Aspergillus niger*. Cette technique a été empruntée par la suite par différents auteurs (HUERTA-OCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; ORIOL, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1992 ; TREJO-HERNANDEZ, 1992 ; PERRAUD-GAIME, 1995).

## **2.5.10. Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des FMS**

### **2.5.10.1. Au laboratoire**

Dispositifs statiques : La majorité des auteurs ont étudié les fermentations en milieu solide grâce à un dispositif statique (Erlenmeyers ou fioles de Roux) sans agitation. La méthode la plus simple, consiste à introduire le substrat brut ou additionné de nutriments, dans des flacons, et d'inoculer ceux ci après autoclavage. C'est la méthode la plus rudimentaire, mais elle est préliminaire à toute étude de fermentation en milieu solide (DUFOUR, 1990).

D'autres auteurs (RAIMBAULT, 1980 ; ROUSSOS, 1985 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; TREJO-HERNANDEZ, 1992) utilisent des colonnes de verre immergées dans un bain marie thermostaté. Le milieu est parcouru par un courant d'air humidifié limitant la déshydratation et favorisant l'élimination des calories et du dioxyde de carbone produit par la fermentation. Cette aération permet un apport en continu d'oxygène nécessaire à la croissance des micro-organismes. DURAND et coll., (1988) utilisent un dispositif identique mais pouvant contenir 2 Kg de matière sèche.

Dispositifs dynamiques : Des chercheurs ont travaillé sur des fermenteurs agités pour l'étude de l'effet de l'agitation en continu ou en discontinu sur la croissance et sur la production de métabolites (NISHIO et coll., 1979 ; RAIMBAULT, 1980).

### **2.5.10.2. Niveau Pilote ou Usine**

Procédés statiques : Le procédé Koji est le plus important en terme de production annuelle d'aliments fermentés. Traditionnellement, le substrat inoculé est disposé dans des paniers de bambou tressés disposés sur plusieurs étages espacés de 10 cm pour permettre l'aération.

Dans le domaine industriel, différents dispositifs ont été mis au point. Le substrat est disposé dans des plateaux perforés dans des chambres à humidité contrôlée sous aération

constante. Dans le cas du système à plateaux rotatifs, l'appareil est constitué de deux chambres de stockage. Chaque chambre contient un grand plateau tournant dans lequel est ajouté le son de blé inoculé. Lorsque les champignons se sont bien développés, le contenu du premier plateau est déversé dans le second plateau (DUFOUR, 1990).

Procédés dynamiques : Certains industriels ont développé des systèmes où l'agitation est discontinue. Les premiers dispositifs sont des tours de fermentation à plateaux. Le milieu est acheminé à travers la tour avec un temps de résidence égal au temps de fermentation désiré. L'homogénéisation est effectuée grâce au transfert du milieu d'un plateau à l'autre. Pour les micro-organismes les plus demandeurs en  $O_2$ , de l'air humidifié est insufflé à la base des tours.

L'ORSTOM, en coopération avec l'IRCHA, a mis au point un fermenteur de type pétrin de capacité 200 Kg de matière sèche. L'homogénéisation est assurée par le système d'agitation : la cuve tourne dans le sens horizontal, le bras du pétrin est fixe et tourne sur lui même. Un système de capteurs permet de réguler l'agitation, le pH et l'aspersion du milieu en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture (RAIMBAULT, 1980).

Un dispositif du même type, mais utilisant une agitation par vis sans fin au moyen d'un chariot se déplaçant latéralement, a été développé à l'INRA-Dijon (DURAND et coll., 1988).

### **2.5.11. Respiration et respirométrie**

L'évolution du  $CO_2$  libéré et de l' $O_2$  consommé retrace la dégradation oxydative des substrats dans les cellules tels que l'amidon, les sucres simples et les acides organiques, en molécules telles que le dioxyde de carbone avec la production simultanée d'énergie. La fonction principale de la respiration est de fournir, par l'intermédiaire de l'ATP, l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire et donc au développement et à la maturation de l'organisme vivant.

La respiration aérobie se déroule en trois voies métaboliques principales dans lesquelles interviennent des enzymes spécifiques :

1- La glycolyse qui permet la dégradation du glucose en acide pyruvique suivie du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) qui est la transformation de l'acide pyruvique en  $CO_2$ .

2- La lipolyse.

3- Le système de transport d'électrons, dans lequel l'énergie le NAD est réduit en NADH<sub>2</sub> à forte énergie.

De nombreux auteurs ont utilisé la respirométrie ou le suivi en continu des gaz (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>) pour l'évaluation de la croissance des différents micro-organismes sur support solide étant donné que l'estimation de la biomasse y est très délicate. Ceci en raison de la nature du matériel et de la capacité des micro-organismes à pénétrer dans les espaces intracellulaires et extracellulaires de la matrice solide.

Ce suivi de l'activité respiratoire des organismes a permis d'observer des corrélations étroites entre certaines activités métaboliques et la croissance. PERRAUD-GAIME (1995) a ainsi observé une relation forte entre la dégradation de la caféine et l'évolution du CO<sub>2</sub> produit par *Penicillium* cultivé sur la pulpe de café. Par l'utilisation de la respirométrie, il a été également possible d'établir des conditions de culture les plus favorables aux levures en FMS (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Le quotient respiratoire (QR) est défini comme étant le rapport entre le CO<sub>2</sub> produit et l'O<sub>2</sub> consommé (RAIMBAULT, 1980; ORIOL, 1987; TREJO-HERNANDEZ, 1992).

## 2.6. Conclusion sur l'analyse bibliographique

L'analyse bibliographique concernant les champignons filamenteux, la production de lipases fongiques et les fermentations en milieu solide nous a permis de constater les faits suivants:

- a) Les espèces de champignons thermophiles connues à nos jours, sont trente.
- b) Les recherches sur les micro-organismes thermophiles montrent une corrélation entre la thermophilie et la thermostabilité des leurs protéines.
- c) Les lipases ont des propriétés très diverses qui dépendent de leur origine (spécificité d'hydrolyse pour la position et la nature de l'acide gras, le pH optimum, la thermostabilité, etc.). Ce qui suggère qu'une lipase adéquate pour un procédé peut être cherchée chez un micro-organisme.
- d) L'application industrielle des FMS est limitée à cause de la difficulté pour dissiper la chaleur métabolique accumulée pendant la culture des micro-organismes.

En conséquence, nous avons entrepris de démontrer la production de lipases possédant des nouvelles caractéristiques catalytiques par fermentation en milieu solide, en utilisant des nouvelles souches de champignons thermophiles, grâce à la stratégie suivante :

- a) isolement et l'identification de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles à partir de biotopes tropicaux;
- b) description de leurs besoins nutritionnels et de leurs potentialités métaboliques en vue de sélectionner une souche capable de produire des lipases thermostables par Fermentation en Milieu Solide (FMS).
- c) production de lipases dans différentes conditions de cultures en milieux liquides ou en milieux solides, en présence d'inducteurs de lipases, et en utilisant des sous produits agricoles comme la bagasse de canne à sucre, les grignons d'olive ou le tourteau de coprah.

Les résultats seront présentés dans les chapitres 4 à 11 et le matériel et méthodes sera développé dans le chapitre 3.

## **MATERIELS ET METHODES**

### 3 MATERIELS ET METHODES

#### 3.1 Champignons filamenteux thermophiles

Au cours de ce travail, 44 souches de champignons thermophiles ont été isolées. Ces souches incluent 19 *Rhizopus pusillus*, 6 *Rhizopus microsporus* et 19 *Aspergillus fumigatus*. Actuellement, ces souches sont répertoriées dans la collection de l'ORSTOM.

Les souches sauvages ont été comparées, d'une part pour leur identification et d'autre part pour la production de lipases, à 6 souches de référence. Les souches de référence proviennent de la collection internationale du CentraalBureau voor Schimmelcultures (CBS), Pays-Bas et sont les suivantes : *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis* (CBS 607.73 et CBS 609.81), *Rh. pusillus* (CBS 183.67 et CBS 253.53) et *Rh. miehei* (CBS 182.67 et CBS 370.65)

##### 3.1.1 Liste des souches

*Rhizopus pusillus* : 2a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 10a, 12a, 16a, 17a, 19a, 22a, 24a, 29a, 32a, 33a, 33b, 34a et 35a. + CBS 183.67 et CBS 253.53

*Rhizopus microsporus* : 10b, 11a, 13a, 27a, 28a, 36a. + CBS 607.73 et CBS 609.81

*Aspergillus fumigatus* : 3a, 4b, 5b, 9a, 17b, 18a, 19b, 24b, 26a, 27b, 28b, 29b, 30a, 30b, 31a, 32b, 34b, 34c et 34d.

*Rhizopus miehei* : CBS 182.67 et CBS 370.65

##### 3.1.2 Conservation de souches

Les souches sont conservées au congélateur (-20°C) dans une suspension de spores en présence de glycérol (10%).

#### 3.2 Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture pour l'isolement et la production de lipases ont été utilisés. Tous ces milieux ont été autoclavés à 120°C pendant 20 min.



### 3.2.1 Milieu d'isolement

La composition du milieu d'isolement des souches a été la suivante (g/l) : Farine de tourteau de coprah de coco, 40 ; agar, 15 ; chloramphénicol, 0,25. La farine de tourteau de coprah, additionnée de 500 ml d'eau, a été portée à ébullition pendant 10 min et filtrée sur de la gaze. Le liquide recueilli a été filtré sur une maille synthétique de 200 µm de taille. L'agar et le chloramphénicol ont été ajoutés à cet extrait, le volume a été ajusté à 1 litre et le pH ajusté à 5.6.

### 3.2.2 Milieu d'identification

Le milieu de culture utilisé dans cette étude a été le Malt Extrait Agar (MEA) Difco. Après la stérilisation, le milieu a été coulé dans des boîtes de Pétri.

### 3.2.3 Milieu de sporulation

Le milieu de sporulation a été le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) Difco. Sa composition a été la suivante (g/l) : infusion de pomme de terre, 200 ; dextrose, 20 ; agar, 15. Ce milieu a été réparti dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml, à raison de 50 ml par fiole.

### 3.2.4 Milieu minéral pour les études nutritionnelles

Source de carbone (Sigma) (20g/l): Lipide (huile de tournesol), protéine (gélatine), carboxyméthyl cellulose (CMC) et amidon. Huiles : de coco, de soja et d'olive ; glucose et tween 80.

Sels minéraux (g/l) :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,47;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6,6;  $\text{CaCl}_2$ , 0,48;  $\text{MgSO}_4$ , 0,38;  $\text{NaCl}$ , 0,32. Agar, 20.

### 3.2.5 Milieu pour la caractérisation de la thermophilie des souches

Les études sur la thermophilie (croissance apicale) des champignons ont été réalisées en utilisant le milieu rapporté par HANKIN et ANAGNOSTAKIS (1975), dont la composition a été la suivante (g/l) : Peptone, 10;  $\text{NaCl}$ , 5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1; agar, 20; tween 20, 10 ml.

### **3.2.6 Milieux de culture pour la Production de lipases**

#### **3.2.6.1 En culture superficielle**

La détection des lipases des champignons thermophiles a été réalisée sur le même milieu utilisé pour la caractérisation de la thermophilie des souches (§3.2.5).

#### **3.2.6.2 En culture liquide**

Le milieu utilisé pour les cultures liquides a été celui rapporté par IWAI et TSUJISAKA (1974a) pour la production de lipases par *Rhizopus delemar*. Sa composition a été la suivante (g/l): Bactopeptone, 50 ; Glucose, 20 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 ;  $\text{NaNO}_3$ , 1 ;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 (pH 6,4).

#### **3.2.6.3 En culture solide**

Le même milieu utilisé pour les cultures liquides (§3.2.6.2) a été imprégné sur les supports solides. Afin d'empêcher les contaminations bactériennes, le chloramphénicol (50 mg/l) a été préalablement additionné à ce milieu.

### **3.3 Techniques microbiologiques**

#### **3.3.1 Isolement des champignons thermophiles**

Sur la surface du milieu d'isolement, des fragments des échantillons solides ont été déposés aseptiquement et incubés pendant cinq jours à 50°C.

#### **3.3.2 Identification des champignons thermophiles**

Les boîtes de Pétri contenant du MEA ont été inoculées, dans un point précis de la surface gélosée, avec des spores et incubées à 30°C pendant une semaine.

#### **3.3.3 Vitesse de croissance apicale**

La croissance apicale correspond à l'élongation du mycélium cultivé sur une surface solide. Cette élongation est mesurée régulièrement à l'aide d'une règle graduée. La vitesse de croissance apicale est exprimée en millimètres rapportés au temps de culture (h). Les boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé ont été inoculées, dans un point précis de la surface gélosée,

avec des spores et incubées sur un milieu gélosé. Pour les études de la thermophilie des champignons, des différentes températures d'incubation ont été utilisées (de 20°C jusqu'à 63°C).

### 3.3.4 Production de spores

Des fioles Erlenmeyer, contenant le milieu PDA ont été inoculées à partir d'une suspension de spores (conservées en congélation) et incubés à 30°C pendant une semaine.

#### A - Technique de récupération de spores

Les spores sont récupérées à la surface du milieu gélosé à l'aide d'agitateurs magnétiques pendant 30 minutes dans un volume de 50 ml de solution de tween 80 (0,01%). Après l'extraction, la suspension de spores est filtrée sur un tamis ayant une maille de 200 µm.

#### B - Comptage de spores

La numération des spores sur une dilution 1/100 de la suspension mère, est effectuée par comptage sur la cellule de Malassez en microscopie optique. Le microscope utilisé est un microscope photonique à contraste de phase (Olympus BH2). On considère qu'un comptage est valable, lorsque le nombre de spores est compris entre dix et trente par champ de comptage. Les résultats du comptage sont exprimés soit en nombre de spores par ml de la suspension initiale, soit en nombre de spores par cm<sup>2</sup> selon les calculs suivants :

$$N = n \cdot 10^5 \cdot F$$

N : nombre de spores par ml de la suspension initiale

n : nombre moyen de spores dans la cellule de comptage

F : facteur de la dilution (inverse de la dilution)

$$X = (N \cdot V) / S$$

X : nombre de spores par cm<sup>2</sup>

N : nombre de spores par ml de la suspension initiale

V : volume de solution de tween 80 ajouté (ml)

S : surface du milieu gélosé (cm<sup>2</sup>)

## 3.4 La culture liquide

### 3.4.1 Mise en œuvre

La culture liquide a été réalisée dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml. Le milieu de culture a été réparti dans les erlens à raison de 70 ml par erlen, puis stérilisé à 120°C pendant 15 minutes. L'inoculation des erlens a été réalisée à partir d'une suspension de spores de concentration connue, de façon à obtenir une concentration finale de  $5 \times 10^5$  spores par ml de milieu de culture. Ces erlens ont été incubés pendant plusieurs jours sous agitation (110 tours/min) à 47 °C.

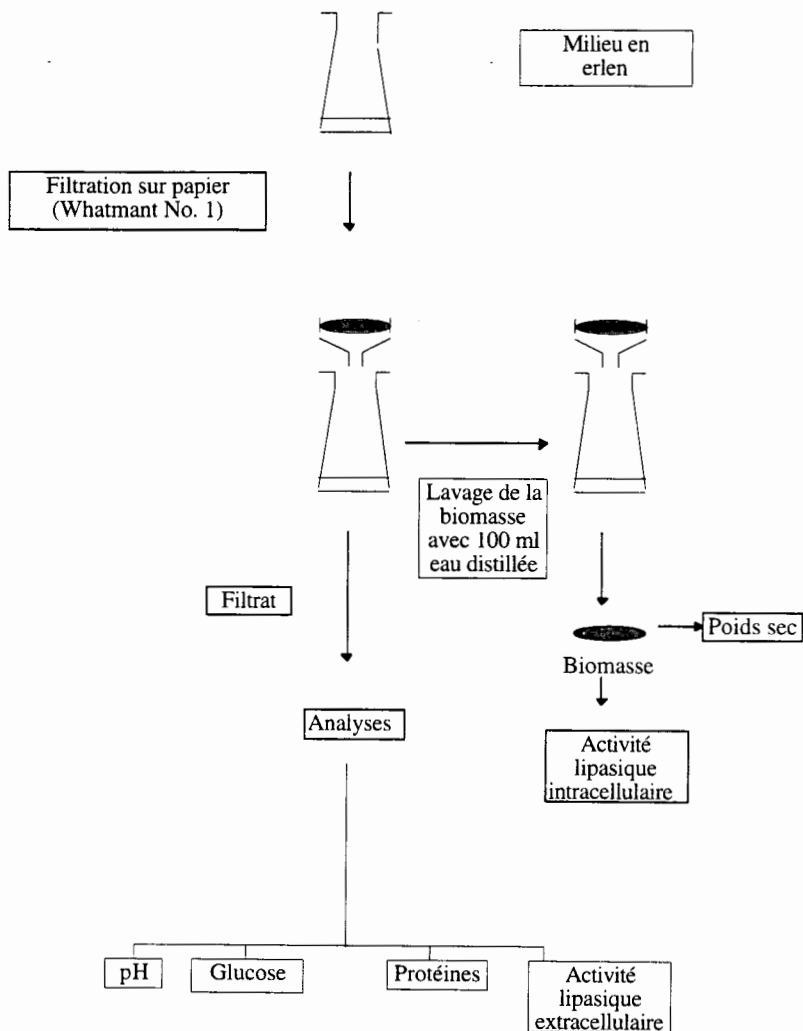


Figure 3.1 - Schéma de traitement des échantillons de la culture liquide.

Pour les cinétiques de la production de lipases, deux erlens ont été prélevés par point d'analyse (duplicata). Pour les productions globales de lipases, trois erlens par souche de champignon ont été cultivés pendant 5 jours (triplicata).

### **3.4.2 Prélèvement et traitement des échantillons**

Pour les différentes analyses, les échantillons prélevés à différents points d'incubation subissent le traitement décrit dans la Figure 3.1. et le contenu de chaque erlen est filtré sur un filtre papier (Whatman N°1). Le filtrat est destiné aux différentes analyses ultérieures : pH, sucres réducteurs (glucose), protéines solubles et mesure de l'activité lipasique. Pour une souche, la biomasse, de deux des trois erlens inoculés, sert à déterminer le poids sec du champignon. Pour le troisième échantillon de fermentation, la biomasse est récupérée après filtration et congelée. Elle servira ultérieurement à mesurer l'activité lipasique intracellulaire.

## **3.5 La Fermentation en Milieu Solide (FMS)**

Pour étudier la physiologie des champignons filamenteux thermophiles capables de se développer sur des substrats solides en vue de la production de lipases, nous avons utilisé le dispositif de fermentation solide aérobie déjà largement décrit par différents auteurs (RAIMBAULT, 1980 ; HUERTA-OCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; TREJO-HERNANDEZ, 1986 ; ORIOL, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; SOCCOL, 1992). Ce dispositif est présenté schématiquement sur la Figure 3.2. Cependant, vue les températures élevées de culture des souches thermophiles, deux modifications, dans le dispositif de FMS, ont été faites. D'abord nous avons installé un système de chauffage plus puissant et ensuite le débit d'air a été préalablement humidifié et réchauffé à la même température de la culture avant d'entrer dans le réacteur.

### **3.5.1 Description du dispositif (FMS)**

Les réacteurs sont constitués de colonnes de Raimbault en verre (5) de 4 cm de diamètre et 20 cm de longueur, leur volume utile est d'environ 250 ml (RAIMBAULT, 1980). Une fois

remplies avec le support, les colonnes sont montées sur un humidificateur (3) et introduites dans un bain thermostaté (2) à température contrôlée (4). Le contrôle du flux d'air saturé en eau s'effectue par l'intermédiaire de microvannes à pointeaux (6). Afin de s'assurer de la saturation et de la mise à température de l'air, un petit bulleur est disposé sous chaque colonne (3). Le débit d'air est réglé à la sortie de chaque colonne. L'analyse des effluents gazeux permet le contrôle et le suivi en ligne de la fermentation.

### **3.5.2 Mise en œuvre des FMS**

#### **3.5.2.1 Préparation des supports pour les FMS et inoculation**

Au cours de ce travail, nous avons utilisé trois résidus de l'industrie agro-alimentaire : La bagasse de canne à sucre, le grignon d'olive et le tourteau de coprah de coco, lesquels ont été utilisés soit comme support (pour la bagasse), soit comme substrat (pour les deux autres).

La bagasse de canne à sucre est le résidu lignocellulosique qui résulte de l'extraction du jus de la canne à sucre. Cette bagasse est broyée, lavée soigneusement, séchée à 60°C et tamisée, en retenant la partie comprise entre 0,8 et 2 mm.

Le grignon d'olive est le résidu solide qui résulte du traitement des olives après une première extraction aqueuse de l'huile de l'olive. Les grignons sont broyés et tamisés, en retenant la partie comprise entre 0,8 et 2 mm.

Le tourteau de coprah de coco est le résidu solide qui résulte du traitement du coprah après l'extraction de l'huile. Ce tourteau est broyé et tamisé, en retenant la partie comprise entre 0,8 et 2 mm.

Les trois matériaux solides ont été stérilisés à 120°C pendant 20 min, avant leur utilisation dans un procédé de FMS. La suspension de spores a été mélangée avec un milieu préparé, concentré (1.2 fois) et stérilisé. Par la suite, la solution nutritiveensemencée a été imprégnée sur le support.

### 3.5.2.2 Préparation des colonnes de fermentation

Les colonnes destinées à recevoir le substrat solide à fermenter, ainsi que tous les instruments nécessaires à la manipulation, ont été stérilisés par autoclavage. Un tampon de coton, ainsi qu'une rondelle de papier filtre, sont introduits au fond des colonnes pour filtrer et diffuser l'air entrant dans les substrats solides.

Le support solide, contenant le milieu nutritif inoculé, a été introduit dans les réacteurs de type colonne de RAIMBAULT (1980). Au fur et à mesure du remplissage, les solides doivent être légèrement tassés de manière à permettre la circulation des gaz. Une fois la colonne remplie, une nouvelle rondelle de papier filtre puis du coton sont placés sur le haut de la colonne, afin de limiter les contaminations. Les colonnes ainsi préparées ont été placées dans un bain marie (Fig. 3.2.).

### 3.5.2.3 Conditions de culture

Sauf indication spécifique, les conditions de culture suivantes ont été utilisées au départ pour réaliser les FMS :

- Quantité de milieu solide : 30g/colonne
- Débit d'air : 30 ml/ min/colonne
- Inoculum :  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu nutritif imprégné
- Température d'incubation : 47°C

Pour les FMS contenant uniquement de la bagasse de canne à sucre comme support, les valeurs initiales des autres paramètres ont été les suivantes : Humidité : 75%, pH : 5,4, Glucose 64 mg/g Support Sec et protéine : 2,6 mg/g SS.

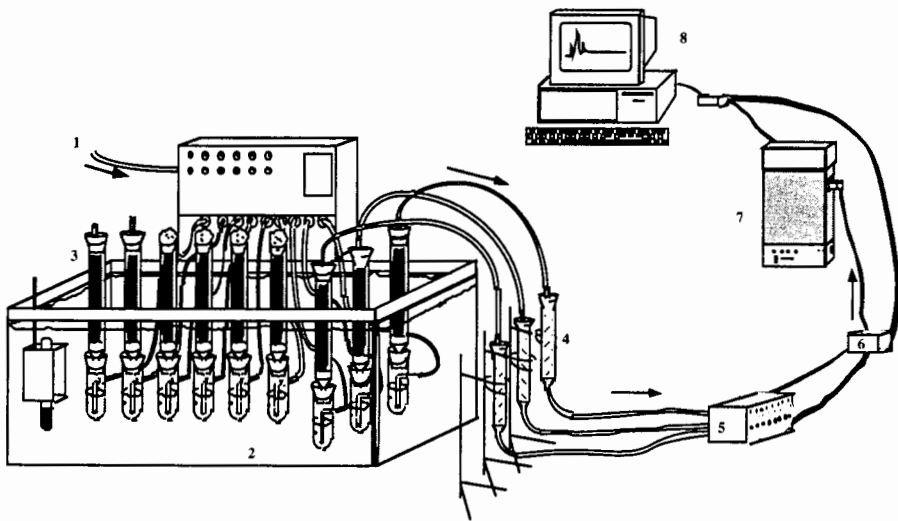
Pour les FMS contenant de la bagasse de canne à sucre mélangée avec des grignons d'olive ou du tourteau de coprah, l'humidité est maintenue constante à 65% pendant la durée de la culture. Les autres paramètres ont été fixés au départ avec les valeurs suivantes : pH 4,9 et 5,3, respectivement, glucose 52 mg / gSS et protéine 2 mg/g SS.

### 3.5.2.4 Installation de la fermentation

Les colonnes, contenant le matériel solide inoculé, sont fixées sur les humidificateurs puis placées dans le bain-marie thermostaté et le dispositif d'analyse automatisé des effluents gazeux issus des FMS est connecté (Figure 3.2). Cette installation fonctionne en continu et de manière indépendante pour chaque incubateur. Ainsi il est possible de prélever des échantillons (colonnes) à des temps différents sans perturber le reste du dispositif.

### 3.5.3 Analyse de gaz en FMS (respirométrie)

Le système d'analyse des gaz (Figure 3.2) est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à conductivité thermique couplé à un ordinateur permettant de suivre l'évolution des gaz au cours de la fermentation (DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; SOCCOL, 1992 ; TREJO-HERNANDEZ, 1992; PERRAUD GAIME, 1995; KABBAJ, 1997).



**Figure 3.2 :** Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz. 1) Entrée d'air, 2) Bain-marie thermostaté, 3) Colonnes de fermentation, 4) Colonne en silicagel, 5) Echantillonneur, 6) Boîtier de commande de l'injection automatique, 7) CPG et 8) Ordinateur.



Les résultats de la respirométrie (mesures de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>) sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale. Les analyses permettent de mesurer directement la vitesse instantanée (dérivée) de l'évolution des gaz ou de déterminer leur production globale (intégrale).

La mesure directe de la vitesse instantanée de la production ou de la consommation des gaz est réalisée par l'échantillonnage d'un courant d'air provenant de la fermentation. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{CO}_2 \text{ ou O}_2) * \text{Débit} * 60}{\text{Poids initial} * \% \text{MSI}} = \text{ml de gaz} / (\text{h gMSI})$$

où CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sont les teneurs des gaz dans l'air, exprimés en pourcentage, le débit de l'air est exprimé en ml/min, le poids du contenu de la colonne est exprimé en gramme et la teneur en matière sèche initiale est exprimée en pourcentage (%MSI).

L'accumulation ou la consommation totale des gaz peut être calculée en intégrant les données de la vitesse par la règle de trapèze selon la relation suivante :

$$\Delta t * C_i + (C_{i+1} - C_i) * \Delta t * 0,5.$$

où  $\Delta t$  est l'intervalle de temps entre deux analyses,  $i$ , et  $i+1$ ,  $C_i$  est la valeur de la concentration du gaz au début de l'intervalle de temps, et  $C_{i+1}$  est la valeur du gaz à la fin du même intervalle.

par ailleurs, le quotient respiratoire est donné par la relation :

$$\text{QR} = \frac{\text{Quantité de CO}_2 \text{ produit}}{\text{Quantité d'O}_2 \text{ consommé}}$$

### 3.5.4 Prélèvements et traitement des échantillons

Pour étudier les paramètres de la FMS en fonction du temps, il est nécessaire de prélever une colonne complète correspondant à un temps de fermentation donné. Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, ceux-ci sont conservés à -20°C au fur et à mesure des prélèvements.

Les échantillons prélevés au cours des fermentations sont soumis à un traitement standard permettant la réalisation des analyses physico-chimiques et biochimiques. Chaque analyse est réalisée en double. Dans le Tableau 3.1, la quantité de matière humide prélevée pour les différentes analyses est indiquée.

Tableau 3.1 Quantité de matière humide prélevée (g) pour les différentes analyses au cours des FMS.

Fermentation	Humidité	Poids des échantillons prélevés (g) pour les analyses		
		Glucose Protéine pH	Lipases	Protéine intracellulaire
FMS I	5 - 8	1	1	-
FMS II	5 - 8	1	0,2-0,4	1

FMS I : FMS contenant uniquement de la bagasse de canne à sucre comme support.

FMS II : FMS contenant comme des supports la bagasse de canne à sucre mélangée avec le grignon d'olive ou le coprah de coco.

Pour les analyses de glucose, protéine (extracellulaires) et pH au cours d'une FMS, une suspension est préparée contenant 1g d'échantillon solide plus 10 ml d'eau distillé. Cette suspension est homogénéisée par agitation à l'aide d'un barreau aimanté à 250 tours/min pendant 15 min. Sur cette suspension le pH est mesuré, et 1,5 ml du surnageant sont prélevés avec une seringue et centrifugés à 10,000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour l'analyse du glucose et des protéines.

### 3.6 Méthodes analytiques

#### 3.6.1 Méthodes physico-chimiques

##### 3.6.1.1 Matière sèche

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du milieu de culture. En effet, l'eau produite lors de la dégradation des substrats carbonés, de même que la perte de poids sec due à la respiration, ainsi que le transfert de l'eau par le flux de l'air conduisent à des variations d'humidité au cours de la fermentation. De plus, cette mesure de l'humidité permet d'exprimer la quantité de métabolites produits par rapport au substrat carboné initial ou par rapport à la matière sèche.

Le poids sec est évalué par différence de pesée. Environ 5 à 7 g d'échantillon de matière fraîche sont pesés à l'aide d'une balance de précision, l'échantillon est mis à sécher pendant 24h

à 105°C (SATO et coll., 1983). Une fois sec, il est refroidi dans une atmosphère sèche (dessiccateur contenant du silicagel). Puis, il est à nouveau pesé sur la même balance.

La perte d'eau de l'échantillon ainsi calculée permet d'évaluer la matière sèche ou la teneur en eau initiale. Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche ou en pourcentage d'humidité.

### **3.6.1.2 Mesure du pH**

La détermination du pH est effectuée directement sur la suspension obtenue avec l'échantillon de fermentation solide dans de l'eau distillée (1g/ 10 ml). La mesure est réalisée à l'aide d'un pH-mètre digital Knick muni d'une électrode combinée. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen de solutions tampon (Schott-Geräte).

### **3.6.2 Sucres réducteurs (DNS)**

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de MILLER (1959). Les sucres réduisent l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, à chaud et en milieu basique. Le produit de la réaction présente une coloration jaune orangée présentant un maximum d'absorption à 575 nm. La composition du réactif DNS est la suivante (g/l) : acide 3,5-dinitrosalicylique 10,0 ; hydroxyde de sodium 0,5 ; phénol 2,0.

L'échantillon à doser est dilué convenablement de façon à obtenir une concentration en sucres réducteurs voisine de 1g/l. A 1 ml de cette dilution, on ajoute 1 ml de réactif au DNS. Le mélange est porté à ébullition pendant 5 min et refroidi rapidement. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex, et la densité optique est lue à 575 nm, une courbe étalon de glucose est réalisée de 0 à 1g/l.

### **3.6.3 Protéines (BRADFORD)**

#### **3.6.3.1 Analyse des protéines**

Les protéines ont été dosées par la méthode de BRADFORD (1976). Cette méthode de dosage est basée sur le fait, que le bleu brillant de Coomassie existe sous deux colorations différentes, rouge et bleue. La coloration rouge du réactif colorant est convertie en coloration

bleue lors de la liaison du réactif colorant avec la protéine. La liaison du colorant à la protéine cause un changement dans l'absorbance maximale du colorant, de 465 à 595 nm. La mesure de l'absorbance se fait donc à 595 nm. La liaison du colorant réactif à la protéine est rapide (2 minutes), et le complexe protéine-colorant reste stable en solution pendant une heure.

Le réactif colorant bleu brillant de Coomassie est préparé selon la méthode suivante :

Dissoudre 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G (Sigma) dans 50 ml d'alcool éthylique absolu. Ajouter à cette solution 100 ml d'acide phosphorique à 85%. Enfin, la solution obtenue est diluée à un volume final de 1000 ml avec de l'eau distillée.

Les dosages s'effectuent sur 0,5 ml de l'échantillon (convenablement dilué, de façon à obtenir une concentration protéine inférieure à 100 mg/l) plus 2,5 ml du réactif bleu brillant de Coomassie. En parallèle, une gamme étalon d'albumine bovine (Sigma) de 0 à 100 mg/l est élaborée.

### **3.6.3.2 Analyse des protéines intracellulaires**

Pour l'analyse de la protéine intracellulaire des champignons cultivés en FMS, la méthode établie par CORDOVA et coll. (1996) a été utilisée. Cette méthode consiste en une hydrolyse préalable de la biomasse et un analyse de la protéine fongique libérée par la biomasse, en utilisant le réactif bleu de Coomassie.

1g de l'échantillon solide contenant la biomasse fongique est mélangé avec 10 ml de  $H_3PO_4$ . Cette suspension est maintenue en ébullition pendant 15 min. Après refroidissement, la suspension est agitée au vortex et un échantillon du surnageant est récupéré avec une seringue. 1,5 ml du surnageant est centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 min. La protéine de la solution résultante est analysée comme précédemment et sa concentration exprime le contenu totale de protéine dans la fermentation (intra et extracellulaire). La concentration de protéine intracellulaire est donc la différence entre les protéines totales et les protéines extracellulaires.

### **3.6.4 Acides gras**

Pour mesurer les acides gras, la méthode colorimétrique développée par LOWRY et TINSLEY (1976) et modifiée par KWON et RHEE (1986) est utilisée. Dans une phase

organique (iso-octane) contenant les acides gras, un complexe coloré (savon) est formé lors de la réaction entre ces acides gras et le cuivre (dans milieu tamponné- acétate-pyridine). Cette coloration formée est mesurée à 715 nm.

Le réactif du cuivre consiste à une solution aqueuse filtrée, contenant 5% d'acétate de cuivre. Le pH de cette solution est ajusté à 6,1 en utilisant de la pyridine pure (Sigma).

A 2,5 ml de la phase organique contenant les acides gras, 0,5 ml d'acétate de cuivre pyridine est ajouté. Ce mélange est agité en utilisant un vortex en vitesse maximale pendant 1.5 min. Le surnageant est prélevé et sa densité optique lue à 715 nm.

Par ailleurs, une gamme étalon contenant de 0 à 25  $\mu$ moles d'acide oléique dans 2,5 ml d'iso-octane, a été réalisée.

### **3.6.5 Biomasse**

Le contenu d'une culture liquide (70 ml) est filtré sur un papier (Whatman No. 1) de poids connu. La biomasse ainsi récupérée est lavée avec 100 ml d'eau et séchée à 100 °C, pendant 24h. La biomasse et le papier sont pesés et la différence en poids entre la biomasse et le papier est notée comme la biomasse sèche.

## **3.7 Mesure de l'activité lipasique**

### **3.7.1 En culture superficielle**

Pour la détection des lipases HANKIN et ANAGNOSTAKIS (1975), le milieu gélosé employé contient essentiellement du  $\text{CaCl}_2$  et du tween 20 (sorbitan monolaurate), lequel est utilisé comme substrat lipidique (§ 3.2.6.1). La production des lipases est mise en évidence par la formation autour de la colonie d'un précipité visible du sel du laurate de calcium, provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'ester de l'acide laurique. Cependant, l'activité enzymatique détectée par cette technique n'est pas nécessairement une activité lipolytique, sinon qu'il s'agit plutôt d'une activité estérase.

Pour évaluer l'activité estérase d'un champignon, nous avons introduit le terme vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ). Cette vitesse représente la distance radiale d'avance du halo du précipité formé au dessous des colonies (mm) en fonction du temps (h). Ce terme exprime la

sécrétion continue des estérases par le mycélium et la diffusion de ces enzymes dans le milieu gélosé.

Les vitesses de formation du précipité ( $V_{fp}$ ) sont calculées sur la partie linéaire du graphique de l'avance radiale du halo du précipité (mm) en fonction du temps (h).

### 3.7.2 Techniques analytiques complémentaires

En culture liquide et solide, la mesure de l'activité lipase est quantifiée par la libération des acides gras pendant la réaction d'hydrolyse de triglycérides contenus dans une émulsion tamponnée. Cette analyse est différente selon la nature de l'échantillon utilisé (liquide ou solide). Cependant, pour les deux cas, le milieu de réaction des lipases consistant en une émulsion tamponnée et l'extraction des acides gras suit le même traitement

#### 3.7.2.1 Emulsion

##### A - Composition du tampon

Tris-HCl (0,1 M) + 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,25% alcool polyvinylique (PVA). Le pH (à 25°C) de ce tampon est généralement de pH 8,7. Cependant, pour les études de l'activité lipase à différents pH et températures d'incubation les tampons suivants ont été utilisés :

- tampon MES pH : 6, 6,5 et 7 ;
- tampon Tris-HCl pH : 7,5, 8, 8,5 et 9 ;
- tampon CHES pH : 9, 9,5, 10 et 10,5.

##### B - Préparation de l'émulsion :

Juste avant son utilisation, l'émulsion est préparée à 4°C par agitation de 100 ml de tampon et de 20 g de l'huile d'olive (Sigma) à l'aide d'un ultra-turrax à la vitesse de 9,000 tpm.

#### 3.7.2.2 Extraction des acides gras

Après la réaction enzymatique, les tubes sont mis dans un bain marie à ébullition pendant 5 min. Afin d'extraire la partie lipidique, 3 ml d'iso-octane (pour l'échantillon provenant de la culture liquide) ou 5ml d'iso-octane (pour l'échantillon provenant de la culture solide) sont

ajoutés à l'émulsion. Ce mélange est agité énergiquement au vortex pendant 1,5 min. Pour séparer les deux phases, le mélange est centrifugé à 5000 tpm pendant 10 minutes. Finalement, la quantification des acides gras libres est réalisée.

### **3.7.3 En culture liquide**

#### **3.7.3.1 Réaction enzymatique**

##### A - Echantillons à faible activité lipasique :

Pour la détermination de faibles activités lipases présentes dans les échantillon des cultures liquides, nous avons d'abord précipité les protéines au sulfate d'ammonium(70% de saturation) avant de les doser. On opère ainsi de la manière suivante :

4,72 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés à 10 ml de filtrat. Après agitation et solubilisation du sulfate d'ammonium, la solution est reposée pendant une nuit en chambre froide. Le culot est récupéré après centrifugation pendant 30 minutes à 5.000 tpm. Ce culot est resolubilisé dans 0,5 ml de tampon Tris (0,05 M ; pH 8,5).

La réaction enzymatique est réalisée en ajoutant à l'échantillon resolubilisé 5 ml d'émulsion. Ce mélange est incubé à 47°C pendant une heure. La réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant 1 ml HCl concentré.

##### B - Echantillons à activité lipasique modérée ou forte:

0.1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté dans 1 ml de l'émulsion. Ce mélange est agité et incubé pendant 30 minutes à 40°C pour les lipases des souches de *Rh. microsporus* ou à 50°C pour les lipases des souches de *Rh. pusillus*. La réaction enzymatique est stoppée en ajoutant 0.2 ml de Cl concentré. En parallèle, un témoin est préparé en ajoutant au départ le Cl concentré et incubé sous les conditions précédentes.

#### **3.7.3.2 Rupture de la biomasse pour la mesure des lipases intracellulaires**

Afin de mesurer l'activité lipasique intracellulaire, les biomasses sont décongelées à la température ambiante. A chaque échantillon, 20 ml d'eau distillé sont ajoutés et la biomasse est cassée au Potter à 1.300 tpm pendant 6 min. Ensuite, la suspension est soniquée pendant 20 minutes. Cette suspension est alors congelée pendant 24 h. Après décongélation, la biomasse

est à nouveau soumise au même traitement précédent (Potter, sonicateur). Finalement, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 5.000 tpm. Le surnageant est récupéré afin de mesurer l'activité lipasique intracellulaire.

### 3.7.4 En culture solide

#### Réaction enzymatique

5 ml de l'émulsion sont ajoutés à environ 0,3 g de matière fermentée. Ce mélange est agité et par la suite incubé pendant 30 minutes à 40°C pour les lipases des souches de *Rh. microsporus* ou à 50°C pour les lipases des souches de *Rh. pusillus*. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de HCl concentré. En parallèle, un témoin est préparé en ajoutant au départ le HCl concentré et incubé sous les conditions précédentes.

### 3.7.5 Expression des résultats en Unités de Lipases :

Une Unité de lipase correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer 1  $\mu$ mole d'acide oléique par minute à 40°C dans un tampon Tris-HCl 0,1 M et à pH 8,0 pour les lipases de *Rh. microsporus* ou à 50°C et à pH 8,7 pour les lipases de *Rh. pusillus*.

## 3.8 Méthodes chromatographiques

### 3.8.1 Chromatographie en Couche Mince (CCM)

Cette méthode de dosage permet d'évaluer les différentes classes de lipides présentes dans les produits de la réaction enzymatique, à savoir, les triglycérides, les diglycérides 1-2 et 2-3, et les acides gras (MONTET, 1984).

Une goutte de la phase organique (§3.5.2.2) contenant les produits de l'hydrolyse lipasique (environ 40 $\mu$ g de lipides) est déposée (1 cm du bord de la plaque) à l'aide d'un capillaire sur une plaque de CCM. Cette plaque est recouverte d'un gel de silice 60 G d'épaisseur 0,25 mm. Les lipides sont migrés en utilisant un solvant de migration composé d'hexane/ éther diéthylique/acide acétique (75:25:1 V/V/V). Après migration, la plaque est séchée, puis, les spots sont révélés à 110°C pendant 20 min par vaporisation d'un mélange d'une solution saturée d'acétate de cuivre et d'acide phosphorique (50:50, V/V). Après



révélation, dans une bande (d'en bas à haut), 6 spots sont distingués: (1) l'application de l'échantillon et les monoglycérides, (2) les diglycérides 1,2 et 2,3, (3) les diglycérides 1,3, (4) un composé inconnu provenant de l'huile d'olive, (5) l'acide oléique et (6) l'huile d'olive non hydrolysé.

### 3.8.2 CPG (Analyse de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>)

L'analyse des effluents gazeux permet d'étudier la respiration des champignons cultivés en FMS (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Ces analyses de gaz permettent de suivre les différentes étapes de procédé de fermentation, *in situ*, en continu et de façon non destructive.

Le chromatographe est un IGC 11 de DELSI équipé d'un détecteur à catharomètre, et d'un four permettant de régler la température de façon isothermique. Cet appareil est utilisé avec un injecteur automatique.

La colonne utilisée pour séparer les composants est une colonne concentrique de type "Alltech" CRT I. Sa partie extérieure est remplie d'un support assurant un tamis moléculaire de 5 Å, tandis que sa partie centrale est remplie de Porapak, polymère poreux ne retenant pas les gaz. Les conditions opératoires de la CPG sont les suivantes :

Détecteur : Conductivité thermique  
 Température : 30°C isothermique  
 Phase mobile : Hélium  
 Débit de l'éluant : 55 ml/min  
 Tension du catharomètre : 160 mA  
 volume injecté : 0,3 ml

Chaque gaz présente une conductibilité thermique différente, il est donc nécessaire d'étalonner le détecteur avant de procéder à l'analyse des gaz à mesurer (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>). Pour cela, des mélanges étalons sont utilisés et des courbes de calibration sont établies pour chaque gaz. La colonne permet de séparer les composés dont la liste est donnée dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Liste des composants séparés par la colonne CTR1.

Composants	Séparation	Temps de rétention (min)
Air	Colonne porapak	0,38
Méthane	Colonne porapak	-
Dioxyde de carbone	Colonne porapak	0,6
Oxygène	Colonne tamis moléculaire	1,5
Azote	Colonne tamis moléculaire	2,2
Méthane	Colonne tamis moléculaire	-
Monoxyde de carbone	Colonne tamis moléculaire	-

Après intégration et calcul des pourcentages des différents gaz dans l'échantillon, on trace les cinétiques de production de CO<sub>2</sub> rapportées aux débits d'air traversant les colonnes de fermentation ainsi qu'au poids sec.

### 3.8.3 HPLC

Des analyses de produits des cultures fongiques ont été effectuées au moyen d'un appareillage HPLC modulaire qui présente les caractéristiques suivantes:

- pompe : LDC 3200 Consta Metric
- vanne d'injection : Vanne rhéodyne 7125 munie d'une boucle d'injection de 20 µl
- colonne : Aminex HPX87H (Biorad)
- four : Jones Chromatography
- détecteurs : Réfractomètre PHILIPS PU 4026, spectrophotomètre LDC 3100
- intégrateur : Logiciel CHROMA (Biosystem).

La colonne utilisée dans cette étude sépare les acides organiques des sucres simples ou complexes et des différents alcools par l'action combinée d'interactions hydrophobes, de tamisage moléculaire et d'échanges d'ions. La résine greffée H<sup>+</sup> est un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl benzène. Deux détecteurs sont branchés en série en sortie de colonne : un réfractomètre pour détecter les sucres, les alcools et quelques acides organiques et un détecteur U.V. à 210 nm qui met en évidence les substances présentant des doubles liaisons. L'analyse par réfractométrie a un seuil de détection relativement faible, mais permet un dosage précis pour des concentrations supérieures à 300 mg/l.

Les conditions opératoires sont les suivantes (GIRAUD, 1993) :

- Phase mobile : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mM, dégazé sous hélium
- |                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| Débit du solvant : | 0,8 ml/min              |
| Pression :         | 800 - 900 PSI ou MegaPa |
| Volume injecté :   | 20 µl                   |
| Température :      | 65 °C                   |

**ISOLEMENT ET  
IDENTIFICATION DE  
CHAMPIGNONS  
THERMOPHILES**

#### **4. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE CHAMPIGNONS THERMOPHILES**

A ce jour, très peu de champignons thermophiles ont été décrits et utilisés en biotechnologie (§2.3.2). Par conséquent, une des principales contributions de ce premier chapitre de résultats consiste à la recherche des nouveaux champignons thermophiles ayant des propriétés originales et potentielles au niveau industriel.

Ce chapitre décrit dans un premier temps l'isolement et l'identification de champignons thermophiles à partir d'échantillons collectés autour des usines mexicaines qui utilisent la noix de coco comme matière première. La deuxième partie est consacrée à la composition en champignons thermophiles et thermotolérants des biotopes naturels et quelques aspects sur l'éventuelle pathogénicité des souches isolées.

##### **4.1 Isolement et purification de nouveaux champignons thermophiles**

A partir des échantillons provenant des zones tropicales du Mexique, notre stratégie d'isolement a été planifiée en deux étapes. D'abord, pour favoriser la croissance des champignons thermophiles, un milieu d'enrichissement sélectif, en combinaison avec une température élevée d'incubation des cultures, ont été utilisés. Ensuite, pour purifier les différents champignons obtenus à partir d'un même échantillon, des repiquages successifs ont été réalisés sur le milieu d'enrichissement contenant un antibiotique spécifique.

Un certain nombre de caractéristiques ont été réunies lors des étapes de purification. Parmi ces caractéristiques, la vitesse de croissance apicale, l'indice de sporulation, la facilité de prélèvement et la hauteur de la colonie, ont été décrites.

40 échantillons constitués de débris de pulpe de noix de coco, de déchets mixtes coco-sol et de tourteaux de coprah (Tableau 4.1), ont été prélevés dans des régions tropicales du Mexique (Guerrero et Estado de Mexico) par S. ROUSSOS en 1993 au cours d'une mission dans le cadre d'un projet de recherche du MRT sur la valorisation du tourteau de coprah (ROUSSOS et coll., 1994).

Des fragments de ces échantillons ont été déposés aseptiquement à la surface d'un milieu gélosé à base de coprah et incubés pendant cinq jours à 50°C (§3.3.1). Les champignons de forte sporulation ainsi collectés ont été cultivés par étalement en surface (technique des stries),

ou par transfert d'un fragment de mycélium à l'aide d'un scalpel dans le cas de champignons à faible sporulation. Des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement additionné de chloramphénicol ont été incubés à 50°C, jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Dans le cas où des bactéries persistaient à se développer dans ces conditions de culture, les champignons étaient transférés dans un milieu composé de PDA additionné de chloramphénicol.

Les échantillons solides ont été directement déposés sur un milieu gélosé afin de mettre en évidence, même les populations des champignons faiblement représentées. Au contraire, si la méthode de la dilution avait été utilisée, on aurait favorisé uniquement le développement des espèces majoritaires. Néanmoins, même avec l'utilisation de cette technique d'enrichissement, il y a eu des échantillons ne contenant pas de champignons capables de se développer dans les conditions de culture imposées (Tableau 4.1).

Bien que la croissance apicale des champignons isolés était rapide (après 24h, le mycélium couvrait entièrement la surface du milieu gélosé dans la boîte de Pétri), la durée d'incubation pour l'isolement a été fixée à 5 jours, afin de permettre au mycélium de former les corps fructifères et postérieurement, les spores. Ces spores ont été prélevées à l'aide d'une anse et déposées sur un milieu neuf. Cette opération a été répétée au moins six fois successivement afin de purifier chaque souche.

Dans le Tableau 4.1, la nature et l'origine de chaque échantillon ont été rapportées. A partir des 40 échantillons provenant du Mexique, 44 souches de champignons thermophiles ont été isolées. Cependant, on a constaté que 30% d'échantillons ne contenaient pas de champignons thermophiles. Par contre, il a été possible d'isoler trois ou quatre souches différentes (morphologiquement) à partir d'un même échantillon.

Les échantillons de débris de coco contenaient pratiquement une seule souche de champignon thermophile; alors que, les échantillons du sol en contenaient plusieurs. Tous les échantillons de tourteaux de coprah provenant des usines de « Atoyac » ou de « La Corona » ne contenaient pas (sauf un seul) de champignons thermophiles. En effet, au cours de l'extraction de l'huile de coco, le coprah est soumis à des pressions importantes qui provoquent une élévation importante de la température, et par conséquent, une stérilisation du tourteau du coprah. De ce fait les échantillons de sols tropicaux constituent la meilleure source pour

l'isolement des champignons thermophiles et contiennent une biodiversité fongique significative.

Tableau 4.1 Nature et origine des échantillons prélevés dans les zones tropicales mexicaines, ainsi que le numéro assigné aux 44 souches isolées \*.

Numéro de l'échantillon	Nature	Origine	Numéro de souches isolées
1	Sol	Atoyac	-
2	Coco râpée	Atoyac	2a
3	Débris de coco	La corona	3a
4	Débris de coco	La corona	4a, 4b
5	Débris de coco	La corona	5a, 5b
6	Débris de coco	La corona	6a
7	Débris de coco	La corona	7a
8	Débris de coco	La corona	8a
9	Débris de coco et sol	La corona	9a
10	Débris de coco et sol	La corona	10a, 10b
11	Débris de coco et sol	La corona	11a
12	Débris de coco et sol	La corona	12a
13	« éponge blanche »	Guerrero	13a
14	« éponge noire »	Guerrero	-
15	Coco râpée blanche	Guerrero	-
16	Coco râpée blanche	Guerrero	16a
17	Coco râpée brune	Guerrero	17a
18	Débris de coco	Guerrero	18a
19	Débris de coco	Guerrero	19a, 19b, 19c
20	Débris de coco	Guerrero	-
21	Débris de coco	Guerrero	-
22	Débris de coco	Guerrero	22a
23	Débris de coco	Guerrero	-
24	Sol	Guerrero	24a, 24b
25	Sol	Guerrero	-
26	Sol	Guerrero	26a
27	Sol	Guerrero	27a, 27b
28	Sol	Guerrero	28a, 28b
29	Sol	Guerrero	29a, 29b
30	Sol	Guerrero	30a, 30b
31	Sol	Guerrero	31a
32	Sol	Guerrero	32a, 32b
33	Sol	Guerrero	33a, 33b
34	Sol	Guerrero	34a, 34b, 34c, 34d
35	Sol	Guerrero	35a
36	Tourteaux de coprah	Atoyac	36a
37	Tourteaux de coprah	Atoyac	-
38	Tourteaux de coprah	Atoyac	-
39	Tourteaux de coprah	Atoyac	-
40	Tourteaux de coprah	La corona	-

\* Note: les souches ont été classées par rapport à leur origine, le numéro correspond à l'échantillon et la lettre à droite, est ajoutée pour distinguer les différentes souches isolées à partir d'un même échantillon.

Les isolements de champignons thermophiles rapportés dans la littérature, ont été obtenus principalement à partir de **compost de végétaux** (COONEY et EMERSON, 1964;

CHANG; 1967, KANE et MULLINS, 1973; TANSEY et coll., 1977; NONOMURA. 1978; MOUBASHER et coll., 1982; RAJASEKARAN et MAHESHWARI, 1993; STRAATSMA et coll., 1994), de **graines** (FLANNIGAN et SELLARS, 1977; OGUNDERO, 1983; ABDEL-HAFEZ et coll., 1987), du **sol** (TANSEY et JACK, 1976 et 1977; JAIN et coll., 1979; ABDEL-HAFEZ et coll., 1983) et de l'**air** (LACEY, 1981 THAKUR, 1977).

Le milieu de culture d'isolement, contenant uniquement des extraits de tourteaux de coprah, a favorisé la croissance des micro-organismes hétérotrophes aérobies ayant peu d'exigences nutritionnelles. En général, les micro-organismes qui demandent moins de compléments nutritionnels sont les champignons (ROQUEBERT, 1984). De ce fait, ce milieu de culture a été sélectif pour l'isolement de champignons thermophiles et il est recommandé comme milieu d'enrichissement.

L'isolement des souches de champignons a été réalisé en utilisant un milieu de culture avec un pH de 5,6. Ce pH, légèrement acide favorise la croissance des champignons; tandis que la prolifération des bactéries est nettement ralentie. DIX et WEBSTER (1995a) ont rapporté que la majorité des champignons ont un pH optimum de croissance compris entre 5 et 6.

Suite à l'étape de purification, les souches obtenues ont été conservées soit à 4°C dans des piluliers contenant le milieu d'isolement soit à -20°C dans des tubes contenant du glycérol à 10%.

#### **4.2 Identification des souches sauvages**

L'identification des souches est une étape qui permet non seulement de les classer parmi les souches connues et répertoriées, mais également de connaître leur possible pathogénicité. Le critère de la non pathogénicité vis à vis de l'homme sera pris en considération pour réaliser le premier criblage de nos souches et éliminer en priorité les souches suspectes.

Cette identification des souches sauvages a été réalisée d'une manière classique d'après leurs caractères cultureux et morphologiques (micro et macroscopiques). Les observations faites pour arriver à l'identification du groupe, du genre et de l'espèce pour une souche, correspondent aux clés d'identification utilisées par les spécialistes de l'identification des champignons (BOTTON et coll., 1985; SAMSON et coll., 1996; DOMSCH et GAMS, 1993).

Le milieu de culture utilisé dans cette étude a été le Malt Extrait Agar (MEA). Les cultures ont été mises en incubation pendant une semaine à une température de 30°C. Même si les champignons récemment isolés se développent mieux à des températures élevées (thermophiles), les descriptions morphologiques doivent être faites sur des cultures réalisées à 30 °C afin de pouvoir les comparer avec celles de la littérature.

#### 4.2.1 Caractères cultureux

Tout d'abord, les 44 souches sauvages ont été réparties dans trois groupes par rapport à la couleur des colonies observée après une semaine de culture sur le milieu MEA. Le premier groupe (Groupe I) rassemble 19 souches dont les colonies prennent différentes tonalités entre le marron clair et le marron. Le deuxième groupe (Groupe II) contient six souches dont les colonies sont marron très foncé (Tableau 4.2). Le troisième groupe (Groupe III) réunit 19 souches dont les colonies sont vertes.

Il faut également souligner que pendant les premiers jours de culture, quand le mycélium est jeune, la couleur de la colonie de tous les champignons est blanche, et au fur et à mesure que ces colonies vieillissent, elles commencent à prendre leurs colorations spécifiques dues aux corps fructifères. De plus, dans le cas des Groupes I et II, une pigmentation marron diffuse dans le milieu gélosé à la fin de la culture.

D'autres différences facilement perceptibles permettent de distinguer les souches des Groupes I et II (Tableau 4.2):

- La hauteur moyenne du mycélium dans des erlens du Groupe II (26 mm) a été dix fois plus grande que celle du Groupe I (2,6 mm)
- La vitesse de croissance apicale a été plus élevée pour le Groupe II que pour le Groupe I aux deux températures étudiées 30 et 37°C. En effet, pour le Groupe I, on a mesuré une croissance apicale moyenne de 0,26 mm/h à 30°C et une de 0,48 mm/h à 37°C (Tableau 4.2). Pour le Groupe II, la croissance apicale a été beaucoup plus élevée (0,63 mm/h à 30°C et 1,06 mm/h à 37°C).
- La phase de latence est plus longue pour le groupe I comparé à celle du groupe II. A 30°C, la phase de latence du Groupe I est deux fois supérieure à celle du Groupe II, (24h et 12h,



respectivement). A 37°C, la phase de latence du groupe I est sept fois plus élevée que celle du Groupe II (48 et 6,5 heures, respectivement).

- Les souches du Groupe I sont capables de consommer soit le glucose, soit le saccharose comme unique source de carbone en cultures sur milieux gélosés. En revanche, les champignons du Groupe II sont incapables de consommer le saccharose (Photo 2).

Tableau 4.2 Vitesses de croissance apicale (Va) des champignons thermophiles des groupes I et II cultivées sur MEA à deux températures d'incubation (30°C et 37°C).

Groupe I	Va (mm/h)		Phase de latence (heures)		Hauteur (mm)
	30°C	37°C	30°C	37°C	
Souche					
2a	0,27	0,44	22	36	1
4a	0,31	0,53	26	38	3
5a	0,31	0,48	24	38	3
6a	0,29	0,58	24	38	6
7a	0,29	0,56	24	38	5
8a	0,27	0,48	19	34	3
10a	0,20	0,42	19	41	1
12a	0,25	0,48	26	38	5
16a	0,22	0,47	26	60	1
17a	0,26	0,51	24	36	2
19a	0,28	0,55	22	58	4
22a	0,19	0,33	46	65	1
24a	0,21	0,45	26	38	1
29a	0,25	0,49	22	62	2
32a	0,29	0,51	24	60	2
33a	0,29	0,49	26	60	2
33b	0,28	0,48	24	58	4
34a	0,24	0,45	26	62	2
35a	0,22	0,41	26	60	1
<b>Moyenne</b>	<b>0,26</b>	<b>0,48</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>2,6</b>
Groupe II	Va (mm/h)		Phase de latence (heures)		Hauteur (mm)
30°C	37°C	30°C	37°C		
Souche					
10b	0,63	1,14	10	7	23
11a	0,64	1,03	12	5	30
13a	0,57	1,00	14	7	35
27a	0,63	1,04	12	5	20
28a	0,68	1,14	12	7	22
36a	0,64	1,00	12	7	26
<b>Moyenne</b>	<b>0,63</b>	<b>1,06</b>	<b>12</b>	<b>6,5</b>	<b>26</b>

A 37°C, les vitesses de croissance apicale des souches du groupe II sont très rapides et comparables à celles mesurées pour *Rhizopus stolonifer* (TRINCI, 1971). Par contre, les vitesses du groupe I sont plus faibles et peuvent être comparées à celles de *Mucor racemosus* et d'*Actinomucor repens* (TRINCI, 1971).

En ce qui concerne le Groupe III (de colonies vertes), il est constitué par les souches 3a, 4b, 5b, 9a, 17b, 18a, 19b, 24b, 26a, 27b, 28b, 29b, 30a, 30b, 31a, 32b, 34b, 34c et 34d. La croissance aérienne des souches de ce groupe se situe au ras de la surface (la hauteur de la colonie atteint 1 mm au maximum). Par ailleurs, la pigmentation de la gélose due à l'activité métabolique des souches varie du beige au vert, en passant par le jaune.

A 30°C, les vitesses de croissance apicale ( $V_a$ ) et les durées de la phase de latence sont très proches pour l'ensemble du Groupe III. Les moyennes calculées de  $V_a$  et de la durée de la phase de latence sont de 0,22 mm/h et de 18h, respectivement. Ces valeurs sont similaires aux moyennes de  $V_a$  et la durée de la phase de latence observées pour les souches du groupe I.

#### 4.2.2 Caractères morphologiques

Afin d'affiner l'identification des souches sauvages, les observations des caractères microscopiques des champignons doivent être comparées à celles rapportées dans la littérature et à celles des souches de référence. Les dimensions des structures des champignons données dans les tableaux (sporange, columelle et spores) représentent la moyenne d'un ensemble de dix mesures faites pour chaque structure.

##### 4.2.2.1 Groupe I

Les caractéristiques morphologiques des souches du groupe I, pour classer les souches dans un ordre, dans un genre et dans une espèce ont été les suivantes :

###### Caractéristiques pour le rattachement à un ordre:

- Le mycélium est sans cloisons ou à cloisons, présentes uniquement au niveau des appareils reproducteurs.

Les spores asexuées endogènes (sporangiospores) sont contenues dans un sac (sporange) porté par un sporangiophore (Photo 1).

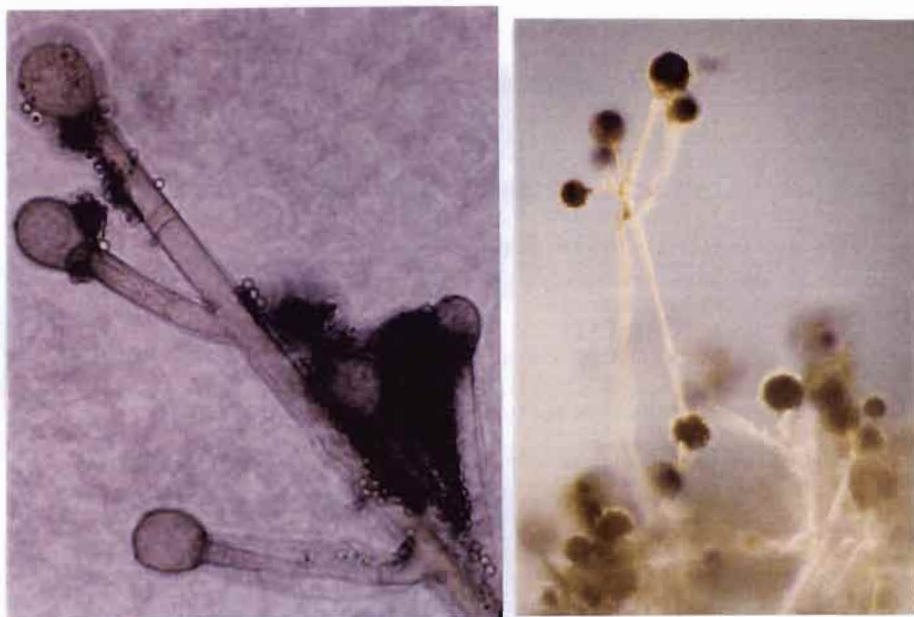


Photo 1 Sporangiofores typiques du Groupe I (*Rh. pusillus*) cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine. Observations, à la loupe (à droite) et au microscope (à gauche, 40X).



Photo 2 Groupe II (souche 27a de *Rh. microsporus*) cultivée sur des milieux gélosés contenant uniquement du glucose (à droite) ou de la saccharose comme source de carbone.

Ces deux caractéristiques permettent de rapprocher ces champignons à l'ordre des **Mucorales**.

#### Caractéristiques pour le rattachement à un genre

- Les hyphes ne présentent pas de couleur
- Les sporangiophores sont isolés et ramifiés
- Les stolons et les rhizoïdes sont parfois présents
- Les sporanges n'ont pas d'apophyses
- Les spores asexuées sont lisses et sans appendices
- Les champignons sont thermophiles

Ces caractéristiques permettent de rattacher le Groupe I au genre *Rhizomucor* (Photo 1).

#### Caractéristiques pour le rattachement à une espèce(Tableau 4.3)

- Les sporangiophores sont ramifiés vers le haut en monopodes ou en sympodes
- Les sporanges mesurent en moyenne 45 µm de diamètre
- Les columelles sont sousglobuleuses et ont une largeur et une longueur moyennes de 24,8 µm et 29,2 µm, respectivement
- Les sporangiospores mesurent entre 3 et 4 µm
- La forme de reproduction sexuée (zygospore) est absente dans une souche isolée, ce qui confère à l'ensemble du groupe un caractère hétérothallique.

L'ensemble de caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques citées ci-dessus, suggèrent l'appartenance des souches du groupe I à l'espèce *Rhizomucor pusillus*.

#### **4.2.2.2 Souches de référence de *Rh. pusillus* et de *Rh. miehei***

Afin de consolider l'hypothèse de l'appartenance des souches du Groupe I à l'espèce de *Rhizomucor pusillus*, les caractéristiques de ce groupe ont été comparées avec celles de quatre souches de référence : deux souches de *Rhizomucor pusillus* (Rp183.67 et Rp253.53) et deux souches de *Rhizomucor miehei* (Rm182.67 et Rm370.65) répertoriées par le CentraalBureau voor Schimmelcultures (CBS) aux Pays-Bas.

L'état sexuel des souches de *Rh. pusillus* est négatif pour Rp183.67 et positif pour Rp253.53. Il faut signaler que la souche de référence *Rh. miehei* a été incluse dans cette étude, à cause de sa similitude morphologique avec la souche de *Rh. pusillus* (DOMSCH et GAMS, 1993).

Les expériences mises en œuvre avec les souches de référence de *Rh. pusillus* consistaient d'une part, à noter ses caractères cultureux et morphologiques et d'autre part, à essayer de faire des croisements entre ces souches de référence et nos souches sauvages, afin de mettre en évidence leurs états sexuels. Les souches de référence ont été cultivées dans les mêmes conditions expérimentales que les souches sauvages.

### Caractères cultureux

En ce qui concerne les caractéristiques culturelles des souches de référence de *Rh. pusillus*, on a remarqué qu'au début de la culture, la colonie est blanche et après quelques jours d'incubation, elle devient marron claire et le milieu gélosé est pigmenté marron. Le mycélium atteint 2 mm de hauteur. De plus, pour une température d'incubation de 30°C, la vitesse de croissance apicale a été de 0,25 mm/h et la phase de latence a duré 17h.

L'assimilation du saccharose est une autre caractéristique importante qui sépare les espèces de *Rh. pusillus* de celles de *Rh. miehei*. En effet, les souches de *Rh. miehei* sont incapables d'assimiler le saccharose (DOMSCH et GAMS, 1993). Afin de mettre en évidence les capacités d'assimilation du saccharose, les souches du Groupe I et les souches de référence de *Rh. pusillus* et *Rh. miehei* ont été cultivées sur des milieux gélosés contenant soit du glucose soit du saccharose comme unique source de carbone et d'énergie.

Après une semaine de culture à 30°C, seulement les souches du Groupe I et les souches de référence de *Rh. pusillus* sont capables de se développer en utilisant les deux sources de carbone; alors que, les souches de *Rh. miehei* sont incapables de consommer le saccharose. Ce fait offre un nouveau élément qui rapproche nos souches sauvages à *Rh. pusillus*.

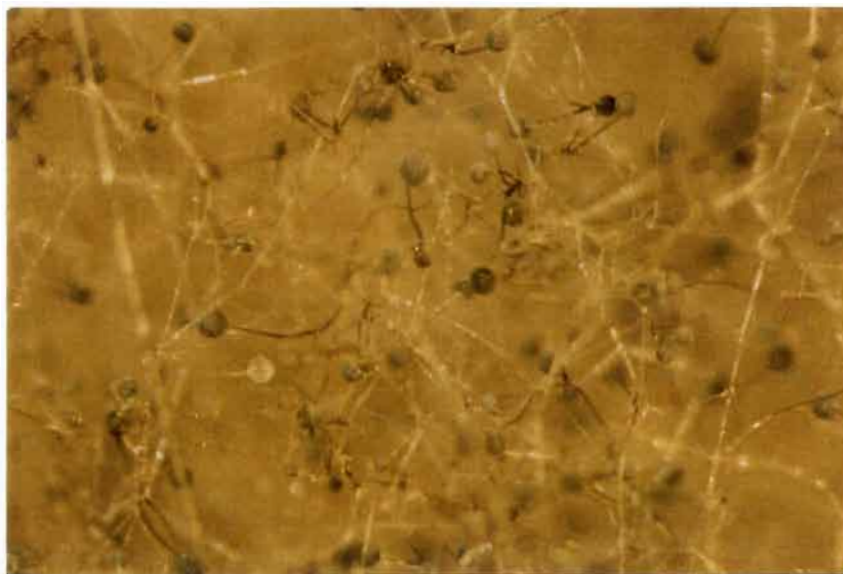


Photo 3 Mycélium aérien typique du Groupe II (*Rh. microsporus*) observé à la loupe et cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine.

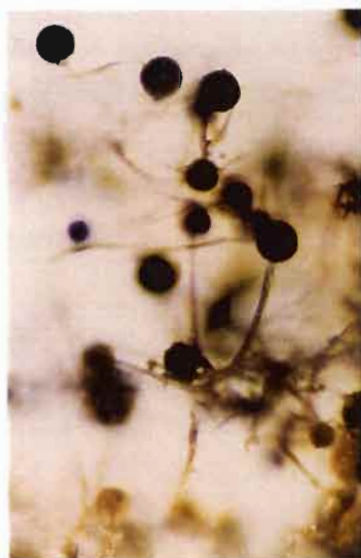


Photo 4 Sporangiohores typiques du Groupe II (*Rh. microsporus*) observés à la loupe (à gauche) et au microscope (à droite, 40X) cultivé sur MEA à 30°C pendant une semaine.

Finalement, les souches de référence de *Rh. pusillus* ainsi que nos souches de champignons thermophiles présentent une très faible croissance à 20°C. Des colonies d'environ de 5 mm de diamètre sont obtenues après 13 jours de culture à 20°C. Ces observations ont été faites par COONEY et EMERSON (1964), SCHIPPER (1978) et DOMSCH et GAMS (1993).

#### Caractères morphologiques

Grâce aux observations microscopiques des souches de référence de *Rh. pusillus*, on a pu constater que : Le mycélium est siphonné (sans cloisons) et sans couleur. Les sporangiospores sont dépourvues d'appendices et sont contenues dans un sporange. Ce sporange n'est pas apophysé et il est porté par un sporangiophore ramifié vers le haut en monopodes ou en sympodes. Les stolons et les rhizoïdes sont parfois présents. On a également constaté (Tableau 4.4) que les sporanges, les columelles (sous-globuleuses) et les sporangiospores présentent des dimensions similaires à nos souches du Groupe I et à celles rapportées par SCHIPPER (1973).

#### Expériences de croisements

Toutes les caractéristiques morphologiques des souches de référence de *Rh. pusillus* sont à peu près identiques à celles de nos souches sauvages du Groupe I. Pour valider notre identification, la dernière colonne du Tableau 4.3 montre les résultats des croisements réalisés entre les souches de référence et les souches sauvages. Ces croisements ont donné naissance à la formation de zygospores de couleur brun-rouges à noires, ornementées, d'environ 65 µm de diamètre et tenues par des suspenseurs identiques. Ces zygospores sont plus grandes et présentent des pics plus aiguës que celles observées pour *Rh. miehei*, présentant un diamètre de 38µm (Photo 6). De plus, on a remarqué que la majorité des souches du Groupe I présente un état sexuel négatif. Enfin, il faut signaler qu'en général, la formation de zygospores a été faible et difficile à mettre en évidence. Par ailleurs, dans quelques cas (souches 2a, 4a, 35a), on n'a jamais pu les mettre en évidence.

### Différences morphologiques de *Rh. miehei*

Parmi les caractéristiques morphologiques et nutritionnelles détectées au cours de cette étude, qui différencient les espèces de *Rh. miehei* de celles de *Rh. pusillus* on peut citer les suivantes :

- La couleur de la colonie est grise
- Les souches ne se développent pas à 20°C après 30 jours de culture,
- Le saccharose n'est pas utilisé comme source de carbone et d'énergie
- Les sporanges, columelles et zygospores sont plus petits (Tableau 4.4)
- Les souches sont homothaliques.

Tableau 4.3 Dimensions ( $\mu\text{m}$ ) des structures microscopiques des champignons du Groupe I cultivés pendant une semaine sur MEA à 30 °C.

Souche Numéro	Sporange Diamètre	Columelle		Spore Diamètre	Etat sexuel
		largeur	longueur		
2a	46,1	25,8	30,8	3-4	nd
4a	36,3	27,0	31,0	3-4	nd
5a	48,1	22,5	28,3	3-4	-
6a	46,7	25,0	36,3	3-4	+
7a	55,6	31,7	34,6	3-4	+
8a	48,3	29,2	33,3	3-4	-
10a	39,0	22,1	27,1	3-4	-
12a	51,9	24,6	28,8	3-4	+
16a	36,8	21,5	24,8	3-4	-
17a	45,0	25,3	28,1	3-4	-
19a	39,5	29,1	31,3	3-4	-
22a	55,7	27,2	32,2	3-4	-
24a	43,2	22,3	26,7	3-4	-
29a	41,3	24,4	28,8	3-4	-
32a	50,0	22,1	25,6	3-4	-
33a	45,0	25,4	28,8	3-4	-
33b	45,0	24,5	29,0	3-4	-
34a	39,5	17,8	21,7	3-4	-
35a	42,2	23,3	27,5	3-4	nd
<b>Moyenne</b>	<b>45,0</b>	<b>24,8</b>	<b>29,2</b>	<b>3-4</b>	

nd= formation de zygospore non détectée

Etant donné la grande ressemblance entre les caractères cultureux et morphologiques des souches du Groupe I avec ceux des souches de référence de *Rh. pusillus* et avec ceux cités dans la littérature, on peut affirmer leur appartenance à cette espèce.



Tableau 4.4 Dimensions ( $\mu\text{m}$ ) des structures microscopiques des souches de référence cultivées pendant une semaine sur MEA à 30 °C.

Souche	Sporange	Columelle		Spore	Zygosporé
	Diamètre	Largueur	Longueur	Diamètre	Diamètre
<i>Rh. pusillus</i> 183.67	42,5	24,2	30,8	3-4	70
<i>Rh. pusillus</i> 253.53	52,1	39,2	43,3	3-4	70
<i>Rh. pusillus</i> <sup>1</sup>	50-80	15-35	45-60	3-5	70
<i>Rh. miehei</i> 182.7	38,9	17,9	21,4	3-4	36,5
<i>Rh. miehei</i> 370.7	33,3	21,3	27,5	3-4	38,0
<i>Rh. miehei</i> <sup>1</sup>	50	25	28	3-4	40
					<b>Sporangio- phore</b>
<i>Rh. microsporus</i> 607.73	64	31,25	39	4-5	217,5
<i>Rh. microsporus</i> 609.81	73	58	69	4-5	290
<i>Rh. microsporus</i> <sup>2</sup>	80			4,5	150-500

Dimensions reprises de: 1) SCHIPPER (1973) et DOMSCH et GAMS (1993) ; et 2) SCHIPPER et STALPERS (1984). *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis*.

#### 4.2.2.3 Groupe II

En ce qui concerne le groupe II, après avoir réalisé les observations morphologiques des souches, les caractéristiques globales suivantes ont été dégagées:

##### Caractéristiques pour le rattachement à un ordre:

- Le mycélium est non cloisonné ou cloisonné uniquement au niveau des appareils reproducteurs
- Les spores asexuées sont endogènes (sporangiospores) et contenues dans un sac (sporange) porté par un sporangiophore.

Ces deux caractéristiques (Photos 3 et 4) permettent de classer ces souches dans l'ordre des

**Mucorales.**

### Caractéristiques pour la détermination du genre

- La vitesse de la croissance apicale est extrêmement rapide et le mycélium est luxuriant.
- Les sporangiophores sont fortement pigmentés et non ramifiés. Le plus souvent ils se présentent en paires avec des rhizoïdes à la base et liés avec des stolons (Photo 4).
- Les sporanges sont marron-noirs, globuleux, multispores et apophysés (Photo 4).
- Les columelles sont brunes et sous-globuleuses (Photo 4).
- Les spores asexuées sont sous-globuleuses, sans appendices et granuleuses.
- Les zygosporangies verruqueuses sont formées entre mycéliums voisins aériens et tenues entre deux suspenseurs pour les souches 11a et 13a (Photos 5 et 6). Pour les autres souches, la reproduction sexuée n'a pas été détectée.

Ces caractéristiques permettent de classer ces souches du Groupe II dans les *Rhizopus*.

### Caractéristiques pour le rattachement à une espèce

Dans le Tableau 4.5, les dimensions microscopiques des différentes structures des *Rhizopus* cultivés à 30°C sur MEA sont présentées et sont les suivantes :

- Les sporangiophores mesurent en moyenne 0,3 mm de longueur
- Le diamètre moyen des sporanges est de 74 µm
- Les columelles ont (en moyenne) une largeur de 46µm et une longueur 57µm
- Le diamètre des sporangiospores est compris entre 5 et 6 µm
- les zygosporangies des souches 11a et 13a mesurent environ 34 µm (Photos 5 et 6). De ce fait, elles sont plus petites que celles de *Rh. pusillus* et présentent la même taille que celles de *Rh. miehei* (Tableau 4.4 et Tableau 4.5).

Dans ce cas, il est plus compliqué d'essayer de rattacher nos souches sauvages à une espèce connue. Si on utilisait les clés d'identification établies par SCHIPPER (1984), il serait possible de les classer parmi les trois espèces de *Rhizopus* connues (§2.2.2.1) : *Rh. stolonifer*, *Rh. oryzae* et *Rh. microsporus*.

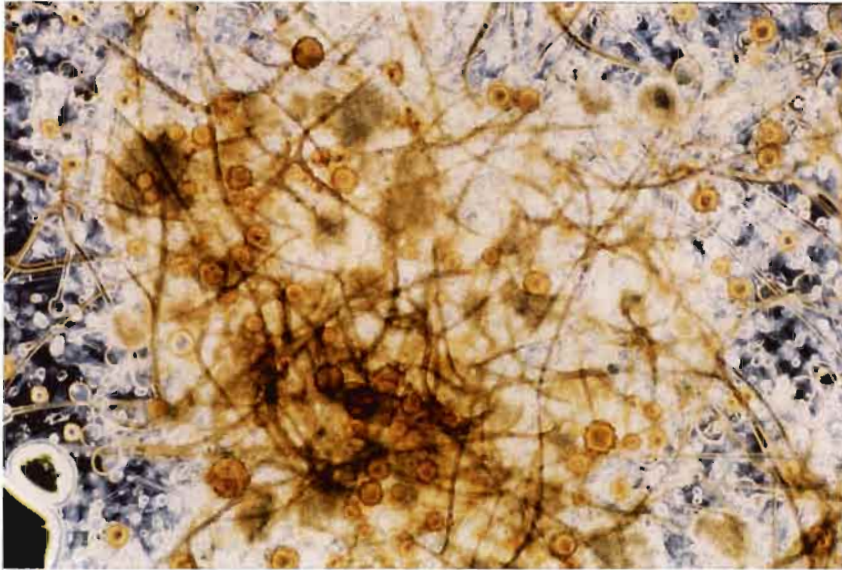


Photo 5 Caractère homothallicque des souches 11a et 13a (*Rh. microsporus*) cultivées sur MEA à 30°C pendant une semaine. Les « petites étoiles jaunes » sont les Zygospores observées au microscope (10X).



Photo 6 Zygospores typiques pour les souches 11a et 13a (à gauche) comparées avec les zygospores de *Rh. miehei* (à droite). Observations réalisées au microscope (100X).

Cependant, les espèces de *Rh. stolonifer* et de *Rh. oryzae* sont écartées, car, leurs températures maximales de croissance sont de 36°C et 45°C, respectivement (SCHIPPER, 1984); et toutes nos souches ont une bonne croissance à 50°C. En effet, elles sont capables d'envahir la surface d'une boîte de Pétri au bout de 120 h.

Par ailleurs, le caractère homothallicus des souches 11a et 13a (Tableau 4.5) suggère de classer ces deux souches dans le groupe de *Rh. homothallicus*. Cependant, les deux champignons se développent très bien à 50°C, ce qui n'a pas été décrit jusqu'à présent chez cette espèce (SCHIPPER et STALPERS, 1984). De plus, la taille de leurs zygospores est beaucoup plus petite (34 µm) que celle rapportée pour *Rh. homothallicus* (>125 µm).

D'autres différences morphologiques qui séparent les souches 11a et 13a de l'espèce de *Rh. homothallicus* sont également décrites dans le Tableau 4.5 et se résument ainsi :

- La taille des sporangiophores (environ 350 µm pour 11a et 13a et >850µm pour *Rh. homothallicus*)
- Le diamètre des sporanges (environ 80 µm et >100 µm, respectivement)
- La forme de la columelle (sousglobuleuse et élongué-conique, respectivement)

Le diamètre des sporangiospores (5-6 et 7, 5-8, respectivement ).

Puisque le reste des souches du Groupe II ne présente pas de forme de reproduction sexuée, elles ne peuvent pas être rattachées à l'espèce *Rh. homothallicus*. Par ailleurs, toutes les souches du Groupe II présentent des caractéristiques similaires à celles observées pour l'espèce de *Rhizopus microsporus* et plus particulièrement, à la variété *rhizopodiformis* laquelle à la différence des autres variétés de *Rh. microsporus*, est la seule espèce capable d'avoir une bonne croissance à 50°C (plus de 35 mm après 120 h de culture, selon le critère de SCHIPPER et STALPERS, 1984).

Néanmoins, le caractère homothallicus des champignons 11a et 13a n'est pas pris en considération chez *Rh. microsporus var rhizopodiformis* (SCHIPPER et STALPERS, 1984). Avec cette différence majeure, nous ne sommes pas capables de regrouper les souches 11a et 13a dans une espèce connue et nous suggérons de les incorporer dans une nouvelle variété.

#### 4.2.2.4 Souches de référence de *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis*

Afin de consolider l'identification de l'espèce et éventuellement de la variété pour les champignons thermophiles du Groupe II, deux souches appartenant à la collection du CBS de *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis* (Rμ607.73 et Rμ609.81), présentant un état sexuel positif pour les deux souches, ont été cultivées et utilisées comme souches de référence. Ces caractères cultureux et morphologiques ont été notés :

##### Caractères cultureux

On remarque qu'au début de la culture, les colonies sont blanches et en maturité, elles développent une couleur marron très foncée. La hauteur aérienne du mycélium dans les erlenmeyers est d'environ 20 mm pour les deux souches.

##### Caractères morphologiques

Dans le Tableau 4.4, on remarque que les dimensions structurales de Rμ607.73 et Rμ609.81 sont similaires à celles rapportées par SCHIPPER et STALPERS (1984) pour la même espèce de champignon. De plus, si on compare les structures microscopique des souches de référence avec celles des souches sauvages 10b, 27a, 28a et 36a (tableaux 4.4 et 4.5), on constate une forte similitude.

Etant donné que les souches sauvages 10b, 27a, 28a et 36a sont très proches des observations faites pour les souches de référence et des caractéristiques rapportées dans la littérature, ces souches peuvent être classées comme des *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis*.

Tableau 4.5: Dimensions (μm) des structures microscopiques des champignons du Groupe II cultivés pendant une semaine sur MEA à 30 °C.

Souche	Sporangio- phore	Sporange	Columelle		Sporangio- spore	Zygosporé
			largeur	longueur		
10b	204	67,5	36,1	46,1	5	-
11a	375	83,1	56,7	76,7	5-6	33
13a	317,5	66,9	35,9	45,6	5-6	35
27a	285	76,7	33,9	42,9	5-6	-
28a	285	74,0	59,2	68,3	6	-
36a	291,7	76,7	45	51,5	6	-
<b>Moyenne</b>	<b>310,8</b>	<b>74,1</b>	<b>46,1</b>	<b>57,0</b>	<b>5-6</b>	-

Finalement, on remarque que les souches 11a et 13a présentent des caractéristiques similaires au reste des souches du groupe en question et bien entendu, aux souches de référence de *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis* analysées dans ce travail. Cependant, la seule différence importante est la présence de zygospires. De ce fait, soit elles appartiennent à une nouvelle variété de *Rh. microsporus* jamais décrite à ce jour, soit il s'agit de deux souches de champignons dans une seule « souche isolée » qui ont les mêmes caractéristiques morphologiques, mais qu'elles se complètent dans leurs états sexuels (une avec un état sexuel +, et l'autre un état sexuel -). Mais, il faut ajouter, que jusqu'à présent, aucun état sexuel négatif n'a été rapporté pour *Rh. microsporus* var *rhizopodiformis*. La collection de souches que le CBS dispose, ne comprend que des souches dont l'état sexuel est positif et les expériences des croisements ont été faites avec une autre variété de *Rh. microsporus* (var *microsporus*), laquelle ne se développe pas à 50°C (SCHIPPER et STALPERS. 1984). A ce niveau de l'étude et avec les éléments dont on dispose, nous pourrions déclarer que les souches 11a et 13a appartiennent à l'espèce de *Rh. microsporus* dont la variété est inconnue.

#### 4.2.2.5 Groupe III

En ce qui concerne le Groupe III, on a trouvé les caractéristiques microscopiques suivantes:

##### Caractéristiques pour le rattachement à une classe:

- Le mycélium présente des cloisons régulières
- Les spores asexuées ne sont pas formées dans des sporanges, ni dans des asques
- On n'a pas aperçu de forme de reproduction sexuée

Ces caractères permettent de diagnostiquer l'appartenance de ce groupe de champignons à la classe de **Deutéromycètes**

##### Caractéristiques pour la détermination du genre:

- Le mycelium présente une cellule podale qui porte des coniophores dressés et renflés en vésicule.

- La vésicule porte des phialides qui produisent des spores asexuées (conidies).
- Les conidies sont associées en chaînes.

Toutes ces caractéristiques morphologiques permettent de les classer dans le genre d'*Aspergillus*.

#### Caractéristiques pour le rattachement à une espèce

- Ces souches ont des têtes aspergillaires (conidiophores) de couleur vert-foncé, rangées en colonne compacte, et leur diamètre est généralement uniforme.
- La vésicule a une forme spatulée, et sur la partie supérieur de sa surface, on remarque la présence des phialides directement insérées, c'est à dire, en absence de métules (*Aspergillus* unisériés).
- Les conidies sont (sous)globuleuses à surface rugueuse.
- La croissance est rapide à 37°C (thermotolérant).

Ces caractères morphologiques permettent de rattacher les souches du Groupe III à l'espèce d'*Aspergillus fumigatus*. Puisque l'identification de ce champignon est relativement aisée et catégorique (DOMSCH et coll., 1980), il n'a pas été nécessaire de chercher la comparaison avec une souche de référence. D'autant que ces souches se développent abondamment à 50°C, et qu'*A. fumigatus* est l'espèce la plus thermotolérante du genre *Aspergillus*.

### **4.3 Composition de la microflore fongique isolée**

Globalement, en fonction des souches isolées et identifiées, la composition fongique des échantillons prélevés autour des usines de la manufacture de coco a été établie. Au cours de ce travail, trois espèces de champignons thermophiles ont été mises en évidence: *Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus*. Ces espèces représentent respectivement 43%, 14% et 43% de l'ensemble de la microflore fongique thermophile isolée.

Par ailleurs, ces groupes de champignons, constituants de la microflore thermophile, ont été mis en évidence dans des écosystèmes différents, tels que : la plante de guayule (*Parthenium argentatum*) (COONEY et EMERSON, 1964), le compostage de paille du blé (CHANG, 1967; MOUBASHER et coll., 1982; STRAATSMA et coll., 1994), le compostage des déchets

urbains (KANE et MULLINS, 1973; TANSEY et coll. 1977), les graines (FLANNIGAN et SELLARS, 1977; OGUNDERO, 1983; ABDEL-HAFEZ et coll., 1987), le sol (TANSEY et JACK, 1976 et 1977; JAIN et coll., 1979, ABDEL-HAFEZ et coll., 1983), l'air (THAKUR, 1977), les algues accumulées (NONOMURA, 1978), les aliments pour les volailles (OGUNDERO, 1980) et l'huile de palme (OGUNDERO, 1981).

Il est important de remarquer que dans la majorité des études citées, les auteurs ont isolé une microflore fongique thermophile plus variée que la nôtre. La raison de cette différence peut être due soit à la diversité des écosystèmes analysés, soit à la stratégie d'isolement et aux conditions d'isolement (milieu de culture plus riche et température d'incubation plus faible).

Pendant les isolements de champignons thermophiles, *A. fumigatus* est l'espèce qui a le plus d'incidence (grâce à sa thermotolérance) comme un contaminant courant (DOMSCH et coll. (1980). D'ailleurs, cette espèce a été isolée à partir de prélèvements de l'air, avec une fréquence de 69% par rapport aux 14 spores/m<sup>3</sup> collectées (THAKUR, 1977). Elle a également été isolée des échantillons provenant d'écosystèmes très variés (LACEY, 1981), tels que, le sol (TANSEY et JACK, 1976 et 1977) et l'eau (ELLIS, 1980a). Elle a été trouvée dans les biotopes chauds, mais également dans certains biotopes gelés (sols de l'antarctique, ELLIS, 1980b). Etant donné qu'elle est une espèce ubiquiste, ce n'est pas étonnant de l'avoir trouvée dans la plupart des échantillons prélevés autour des huileries mexicaines.

#### 4.4 Aspect pathologique de certaines souches isolées

En ce qui concerne la pathogénicité des champignons vis-à-vis des vertébrés, sur un total de 205 espèces testées, seulement 13% des champignons appartenant à la classe de Zygomycètes sont pathogènes. Parmi ces champignons, aucun toxigène n'a été décrit. Par contre, 73% des champignons de la classe de Deuteromycètes sont pathogènes, et parmi eux, 13 espèces sont toxigènes (AINSWORTH, 1968).

Les champignons que nous avons isolés sont capables de se développer dans des environnements chauds et, par conséquent, ils seraient susceptibles d'attaquer les mammifères. La capacité d'infection opportuniste d'un micro-organisme peut être reliée à sa thermotolérance.



mais, cette caractéristique isolée n'explique pas à elle seule l'incidence de la maladie, beaucoup de micro-organismes thermotolérants sont en effet saprophytes et inoffensifs (LACEY, 1981).

Cependant, les souches que nous venons d'isoler et d'identifier sont rapportées comme des champignons responsables des certaines mycoses chez les animaux, à savoir: l'espèce *Rhizomucor pusillus* pourrait produire des toxicoses à effets abortifs (BOTTON et coll., 1985) et des mycoses chez les lapins, les souris, les chevaux, les vaches et les chiens (COONEY et EMERSON, 1964; SCHIPPER, 1973; DOMSCH et GAMS, 1993). Egalement, l'espèce *Rhizopus microsporus* est capable de provoquer des mycoses (DOMSCH et coll. 1980; SCHIPPER et STALPERS, 1984).

Par ailleurs, *Aspergillus fumigatus* est un champignon pathogène pour l'homme et cause des infections de différents types. Dans la plupart des cas, ces infections (Aspergilloses) ne sont pas aiguës (DOMSCH et coll., 1980, ou bien, la gravité des aspergilloses dépendra de l'état immunologique de l'individu. A cause de cet aspect, *A. fumigatus* est considéré comme un champignon opportuniste (COOKE, 1979). Selon certaines prédispositions du patient, l'infection peut attaquer le système cardio-vasculaire et urinaire, et même le cerveau. *A. fumigatus* peut participer également dans une infection de la peau, de l'ouïe, de l'œil, et encore. provoquer des allergies (RAPER et FENNEL, 1965 ; LANCEY, 1975 ; COOKE, 1979).

*A. fumigatus* est impliqué dans la plupart des aspergilloses (RAPER et FENNEL, 1965); ALEXOPOULOS et MIMS, 1979). D'ailleurs, COOKE (1979) a rapporté qu'une aspergillose chez des personnes exposées à la climatisation dans un immeuble. a été provoquée par un *A. fumigatus* développé dans des poussières accumulées dans un circuit de climatisation.

Enfin, les rapports concernant l'infection d'animaux provoqué par *A. fumigatus* sont bien documentés (LANCEY, 1975; DOMSCH et coll., 1980).

Par conséquent, si l'on considère qu'en présence d'*Aspergillus fumigatus*, on est dans une situation risquée, il faudra éviter de travailler avec ce champignon. De ce fait, l'ensemble des souches d'*A. fumigatus* isolées lors de cette étude ont été écartées dès le départ. Nous avons, par contre, retenu les deux autres espèces de champignons thermophiles *Rh. pusillus* et *Rh. microsporus* étant donné qu'ils ne présentent pas de problèmes de pathogénicité.

L'incidence élevée d'*A. fumigatus* dans les échantillons provenant des usines qui utilisent le coprah de coco comme matière première représente un problème grave de santé publique, non seulement pour les travailleurs, mais également, par les utilisateurs des tourteaux de coprah en alimentation animale et bien entendu, pour les animaux, et pour les consommateurs de lait. De plus, il est bien connu que ce champignon produit des mycotoxines (LANCEY, 1975). Il serait convenable de prendre des mesures pertinentes de sécurité et d'hygiène, et de procéder à l'élimination des lots de tourteaux de coprah contaminés par *A. fumigatus* (contamination verte).

Pour terminer ce chapitre, il faut souligner que toute nouvelle espèce, avant de pouvoir être utilisée dans l'industrie des aliments, doit être soumise à une étude toxicologique poussée, ce qui demande beaucoup de temps, pour que la dénomination G.R.A.S. soit attribuée. On préfère donc souvent chercher dans une espèce reconnue « G.R.A.S », une souche productrice d'enzyme et cela explique le nombre restreint de micro-organismes mis en œuvre par l'industrie des enzymes. Dans le cas spécifique de *Rh. pusillus* et de *Rh. miehei*, ces deux espèces sont considérées comme G.R.A.S. pour la production de lipases et de protéases destinées à l'industrie alimentaire (SCRIBAN, 1993).

#### 4.5 Conclusion

Etant donné que les échantillons provenaient d'un environnement tropical humide et riche en matière organique, ils étaient susceptibles de contenir une microflore riche en champignons thermophiles. Il faut également souligner que le coco, matière première riche en composés lipidiques, constitue un microécosystème particulier qui favorise la présence de champignons lipolytiques.

La stratégie et la technique d'isolement utilisées dans cette étude ont permis d'isoler de nouvelles souches thermophiles capables de se développer à 50°C. Ainsi, nous avons isolé 44 souches de champignons filamenteux à partir de 40 échantillons prélevés autour d'huileries mexicaines, qui traitent le coprah de coco.

Les souches isolées et purifiées ont été identifiées et rattachées aux espèces *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus* et *Aspergillus fumigatus*. Suivant leurs caractères morphologiques, quatre souches de *Rh. microsporus* ont été rattachées à la variété *rhizopodiformis*. Par contre, les souches 11a et 13a ont montré une notable différence morphologique ce qui les exclue de cette variété. Leur caractère hétérothallique reste encore inconnu et nous avons proposé de les classer dans une nouvelle variété.

Pour les écosystèmes tropicaux analysés, la biodiversité des champignons filamenteux thermophiles a été établie. Avec notre stratégie d'isolement, nous avons détecté une composition de la microflore fongique thermophile restreinte à trois espèces différentes, dont la distribution a été de 43% pour *Rh. pusillus*, 14% pour *Rh. microsporus* et 43% pour *A. fumigatus*.

Etant donné le caractère pathogène d'*A. fumigatus*, nous avons décidé d'écarter toutes ces souches et d'éviter son utilisation pour les études postérieures sur la production des lipases. Nous avons également recommandé aux personnes concernées de prendre les mesures de précaution pertinentes dans la manipulation de la coprah de coco stockée.

**PHYSIOLOGIE DES  
CHAMPIGNONS  
THERMOPHILES**

## 5 PHYSIOLOGIE DES CHAMPIGNONS THERMOPHILES

Dans ce chapitre, nous allons présenter quelques aspects physiologiques des souches thermophiles cultivées sur milieux gélosés contenant différentes sources de carbone. Par la suite, nous allons étudier la thermophilie ou la thermotolérance des souches et enfin, nous allons montrer les indices de sporulation de ces champignons.

### 5.1 Caractérisation nutritionnelle des souches

Les souches de *Rhizomucor pusillus*, de *Rhizopus microsporus* et d'*Aspergillus fumigatus* ont été cultivées sur milieux gélosés contenant différentes sources de carbone comme les protéines, les lipides, l'amidon ou la CarboxyMethyl Cellulose (CMC), afin de mettre en évidence leurs capacités à se développer sur ces sources de carbone et cribler indirectement la production des enzymes extracellulaires. Par la suite, les souches thermophiles ont été cultivées sur des différents milieux contenant des esters, afin d'explorer leurs potentialités de dégradation des différents acides gras.

#### 5.1.1 Croissance des souches sur différentes sources de carbone

En raison des grandes vitesses de colonisation de surfaces solides, ces souches thermophiles ont été incubées pendant trois jours à 50°C. L'estimation visuelle a été gardée comme un critère de la mesure du développement mycélien, étant donné que la comparaison des vitesses de la croissance apicale, obtenue par des sources de carbone de nature très différentes, pourrait nous conduire à des conclusions erronées sur la croissance de ces champignons. En effet, nous avons pu constater que les vitesses d'élongation mycéliennes, pour une même souche, ont été similaires quelque soit la source de carbone utilisée. Cependant, la quantité de biomasse produite était variable selon la source de carbone du milieu de culture. Par exemple, une souche cultivée sur deux milieux différents (amidon et cellulose) présente les mêmes vitesses de la croissance apicale, néanmoins sur l'amidon, la biomasse forme une couche épaisse de mycélium, alors que sur la CMC, on remarque la présence de quelques filaments sur la surface du milieu gélosé (résultats non montrés). Lorsque la source de carbone est

difficilement assimilable (cellulose) par le champignon, le mycélium s'allonge afin de le chercher ailleurs et limite sa ramification, en réduisant ainsi la production de biomasse. Selon MANDELS (1965), l'extension linéaire d'un champignon sur la surface d'un milieu gélosé, sans source de carbone disponible, peut être similaire ou plus rapide que l'extension sur un milieu complet.

D'ailleurs, on sait que la vitesse de croissance spécifique ( $\mu$ ) et la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) sont liées, si la longueur de la zone périphérique de croissance ( $w$ ) est constante ( $V_a = \mu w$ ). Ce fait limite significativement l'application de  $V_a$  comme une mesure de la vitesse de croissance, car  $w$  varie considérablement entre les espèces et les souches, ainsi qu'avec de nombreux facteurs environnementaux et nutritionnels. En conséquence,  $V_a$  est une mesure indirecte de  $\mu$  et son utilisation nécessite la prise en compte des effets associés à la ramification et au diamètre de l'hyphe (PROSSER, 1995).

Les résultats présentés dans la Figure 5.1 sont les valeurs moyennes obtenues de la croissance apicale pour l'ensemble de chaque groupe de champignons cultivés sur quatre milieux de culture. En général, la meilleure colonisation des surfaces a été obtenue avec des milieux contenant de l'amidon ou des lipides (tournesol). Au contraire, le plus faible développement des souches a été observé pour le milieu contenant de la CMC.

L'activité amylolytique est une caractéristique très courante chez les champignons thermophiles (OGUNDERO, 1979a). Par ailleurs, la bonne croissance apicale sur les lipides peut s'expliquer par le fait que les souches ont été isolées d'habitats contenant des substrats riches en matières grasses.

Dans le cas de *Rh. microsporus*, on peut remarquer que ces souches utilisent aussi très efficacement la gélatine comme source de carbone et d'énergie. Par contre, pour les souches de *Rh. pusillus* cette capacité est diminuée, et elle est encore plus faible pour les souches de *A. fumigatus*.

*Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus* sont connus comme producteurs des lipases, très fréquemment trouvés dans des substrats riches en huiles, comme les graines et les tourteaux de produits huileux (ADAMS et DEPLOEY, 1978 ; OGUNDERO, 1979b, 1980, 1983 ; SATYANARAYANA et JOHRI, 1981). De plus, la capacité de ces champignons pour

dégrader l'huile de la palme Nigérienne, a été démontrée (OGUNDERO, 1981). D'ailleurs, les micro-environnements où les champignons thermophiles ont été isolés le plus fréquemment, sont les composts (RAJASEKARAN et MAHESHWARI, 1993). Les lipases ont été rapportées comme produites pendant les processus de compostage, ce qui suggère leurs rôles dans la décomposition de matériaux végétaux (HANKIN et ANAGNOSTAKIS, 1975).

L'incapacité de *Rh. pusillus* et de *Rh. microsporus* à dégrader la cellulose a déjà été rapportée par différents auteurs ; FERGUS (1969), TANSEY (1971), ROSENBERG (1978), UPRETI et JOSHI (1984) et THAKRE et JOHRI (1980). Par contre, ces mêmes auteurs ainsi que JAIN et coll. (1979), ont détecté une activité cellulase significative chez *A. fumigatus*. Cette divergence, au niveau de l'utilisation de la cellulose, entre nos résultats et ceux des auteurs cités, pourrait être attribuée à une durée d'incubation plus longue ou à une meilleure disponibilité du substrat pour le champignon.

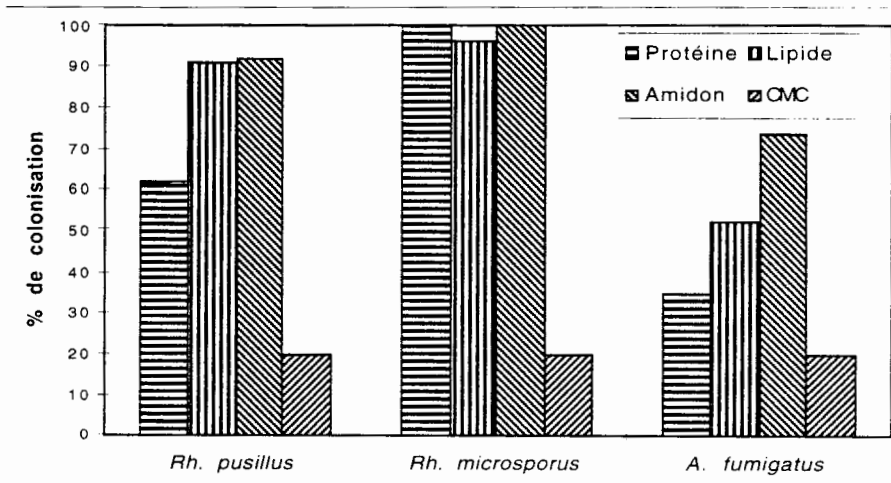


Figure 5.1 Développement des souches sur différentes sources de carbone, évalué comme un pourcentage de la colonisation totale de la surface d'une boîte de Pétri. Condition de culture: trois jours à 50°C.

Ces résultats suggèrent que ces champignons thermophiles et thermotolérants sont capables de produire des lipases et des amylases extracellulaires et lors de leur croissance à

50°C, on pourrait soupçonner une thermostabilité de ces enzymes. De même, dans le cas de *Rh. pusillus*, les protéases thermostables pourraient être produites.

### 5.1.2 Croissance des souches sur des milieux gélosés contenant des lipides

Etant donné que les champignons thermophiles montrent une bonne croissance à partir des lipides, on a voulu rechercher, encore plus les possibilités de ces souches à se développer sur différents lipides, comparés avec une source de carbone facilement assimilable, le glucose.

Certaines souches de chaque groupe ont été sélectionnées dans cette étude, à savoir, les souches 2a, 6a, 16a, 29a et 33a appartenant au groupe de *Rh. pusillus*; 10b, 13a et 28a du groupe *Rh. microsporus*; et 3a, 30a et 30b du groupe *A. fumigatus*. Ces souches ont été cultivées à 50°C et la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) a été mesurée sur les différents milieux gélosés et rapportée comme une moyenne pour l'ensemble de chaque groupe.

Il a été observé que les différents lipides influencent les vitesses de croissance apicale des ces champignons thermophiles (Figure 5.2) et que les magnitudes de ces vitesses sont comparables aux vitesses observées sur le glucose. De plus, il a été montré que les souches de *Rh. microsporus* ont des vitesses de croissance apicale plus élevées que les autres souches; alors que les *Aspergillus* présentent les vitesses les plus faibles. En particulier, on remarque que les *Rh. microsporus* ont une nette préférence pour l'huile de coco.

Par ailleurs, il a été observé qu'un substrat synthétique (le Tween 20) est facilement assimilable par l'ensemble des champignons, en particulier, par le groupe de *Rh. microsporus*. Ce qui suggère que les lipases impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides naturels, pourraient être les mêmes que celles impliquées dans la coupure de la liaison ester entre le lauréate et le sorbitan qui composent le Tween 20.



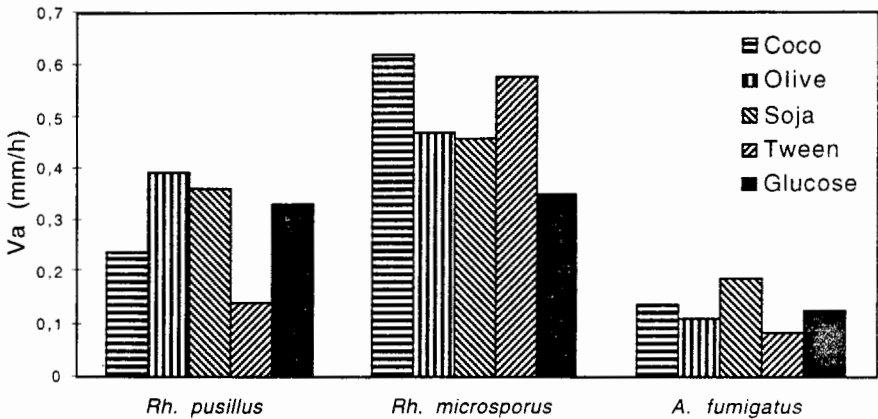


Figure 5.2 Vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ), exprimée en mm/h sur des milieux gélosés contenant différents lipides comme source de carbone pour les souches de champignons thermophiles cultivées à 50°C.

## 5.2 Caractérisation de la thermophilie des souches

La croissance des champignons est influencée par différents facteurs environnementaux tels que la température, l'aération, la disponibilité de l'eau, le pH et les nutriments. En particulier, la température affecte le temps de la phase de latence, la vitesse de la croissance spécifique et apicale, et ainsi que les rendements de la production des métabolites.

La vitesse de croissance apicale d'un champignon filamenteux dépend de la largeur de la zone périphérique de croissance ( $w$ ) et de la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ). Il a été démontré que la largeur de la zone périphérique de croissance n'est pas affectée par la température (TRINCI, 1971). En conséquence, la vitesse de croissance apicale d'un champignon répondra à la température, d'une manière similaire que la vitesse spécifique de croissance. Etant donné que les vitesses apicales peuvent être calculées beaucoup plus facilement et rapidement que les vitesses spécifiques, les études plus détaillées concernant l'effet de la température sur la croissance des champignons portent principalement sur la croissance d'une colonie fongique à la surface d'un milieu gélosé.

Les vitesses de croissance apicale sont calculées sur la partie linéaire du graphique de l'avance radiale de la colonie (mm) en fonction du temps (h). Il faut signaler qu'à cause de la

déshydratation des milieux gélosés dans le cas des températures élevées, la partie linéaire du graphique devient de plus en plus courte. En effet, pour la température la plus élevée où une croissance a été détectée (61°C), cette partie linéaire est limitée à moins de deux jours.

Afin de définir plus clairement la thermophilie ou la thermotolérance des souches isolées, nous avons étudié le comportement de ces souches, sur un milieu gélosé, en utilisant différentes températures d'incubation, de 20°C jusqu'à 63°C (§ 3.2.5).

### 5.2.1 Températures cardinales de *Rhizomucor pusillus*

Les températures cardinales pour les 1souches de *Rhizomucor pusillus* sont les suivantes (Figure 5.3) :

- Minimale < 20 °C
- Optimale de 45°C
- Maximale de 61°C. A l'exception de la souche 29a, dont la température supérieure limite de croissance se situe à 58°C.

Ces températures cardinales coïncident avec les études de COONEY et EMERSON (1964) et de DOMSCH et GAMS (1993) pour la même espèce de champignon. En conséquence, ces souches de *Rh. pusillus* sont classées comme thermophiles car d'une part, elles sont capables de se développer à 50°C et d'autre part, elles sont presque incapables de se développer à 20°C (COONEY et EMERSON, 1964).

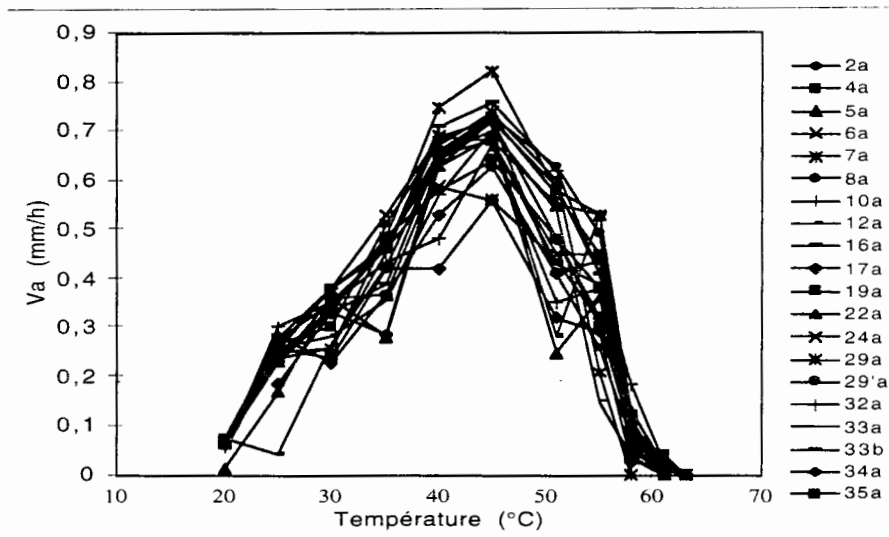


Figure 5.3 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des 19 souches de *Rh. pusillus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.

Les vitesses de croissance apicales des souches à 20°C, suggèrent que la température minimale pour la croissance se situe au-dessous de 20°C (Figure 5.3). Cependant, la Figure 5.4 montre que pour les températures inférieures à 25°C, la germination des spores (phase de latence) des souches de *Rh. pusillus* diminue exponentiellement, de telle sorte qu'à la température de 20°C, ces champignons nécessitent environ 10 jours d'incubation pour démarrer leur croissance. A partir de cette observation, on remarque que la souche 8a démarre le plus rapidement sa croissance à 20°C (8 jours), tandis que la souche 16a l'en fait le plus lentement (13 jours).

D'ailleurs, quand les souches de *Rh. pusillus* sont incubées à des températures comprises entre 30 et 60°C, la durée de la phase de latence est réduite à 8 heures.

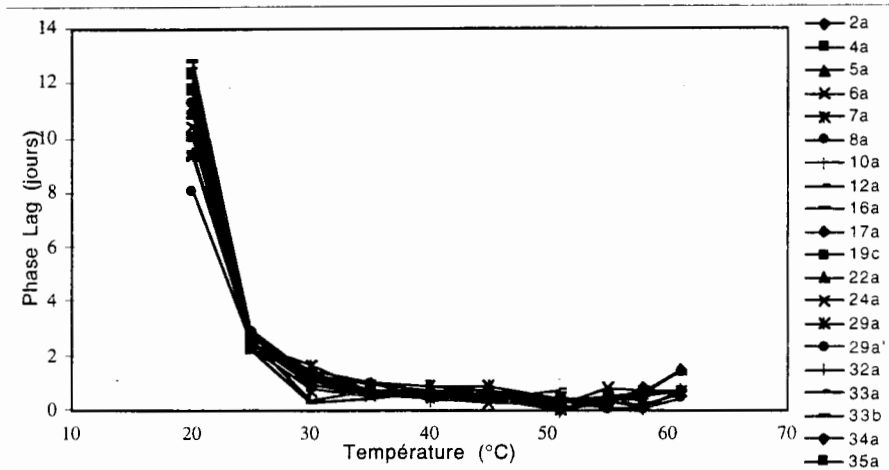


Figure 5.4 Evolution du temps de germination (Phase de latence) des souches de *Rh. pusillus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.

### 5.2.2 Températures cardinales de *Rhizopus microsporus*

Les températures cardinales des souches de *Rh. microsporus* sont les suivantes (Figure 5.5) :

- Minimale d'environ 11 °C (par extrapolation)
- Optimale de 45°C (sauf pour la souche 10b qui exhibe un optimum à 40°C)
- Maximale ; la température maximale est variable et inhérente à chaque souche. En effet, pour la souche 36a, on remarque la plus faible température limite de croissance (52°C). Pour la 28a, de 56°C; pour la 10b, la 13a et la 27a, de 58°C; et celle qui montre la plus grande thermotolérance est la souche 11a, présentant une température maximale de 61°C.

Etant donné que les températures minimales de ces souches de *Rh. microsporus* sont situées clairement au-dessous de 20°C, elles sont considérées comme des champignons thermotolérants (COONEY et EMERSON, 1964).

De plus, on remarque que ces souches peuvent se développer dans un très large spectre de températures, à partir de presque 10°C, jusqu'à 60°C, soit une marge de 50°C. Vis-à-vis de la température, ces champignons ont des caractéristiques partagées avec celles des mésophiles, mais avec une thermotolérance additionnelle.

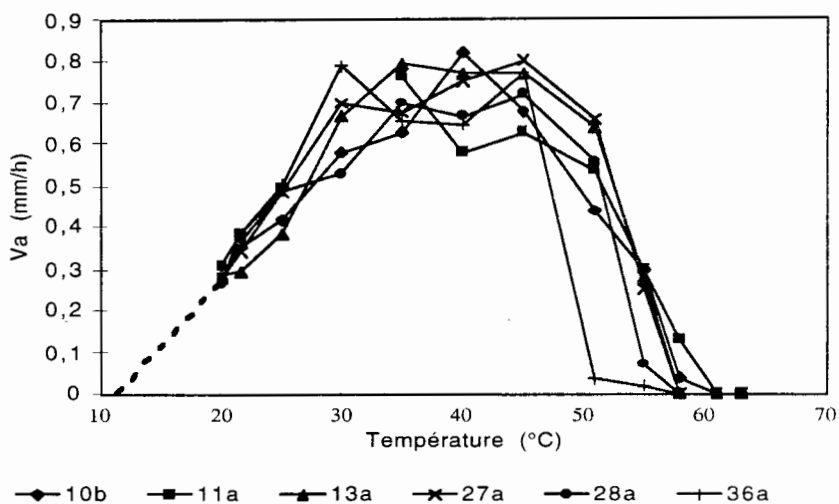


Figure 5.5 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.

Les souches de *Rh. microsporus* présentent des temps de germination légèrement variables aux températures étudiées. Ainsi, on remarque qu'à 20°C, elles mettent environ 24 h pour démarrer leur croissance. Au fur et à mesure que la température d'incubation augmente, la durée des phases de latence diminue progressivement. A 35°C, le temps de germination des spores est très court pour l'ensemble des souches de ce groupe. La croissance mycélienne démarre presque instantanément lorsque les spores sont mises en contact avec le milieu de culture (environ 4 h). Cependant, la germination n'est pas identique pour toutes les souches. Le temps de la germination des souches 13a, 27a, 28a et 36a n'est pas notablement affecté pour des températures comprises entre 40°C et 60°C, tandis que celui de la souche 11a augmente à partir d'une température d'incubation de 35°C et à 60°C, elle met environ 34h pour démarrer sa croissance. Également, le temps de latence de la souche 10b augmente à partir de 45°C et lorsque les spores de cette souche sont incubées à 60°C, elles mettent 17h pour germer (Figure 5.6).

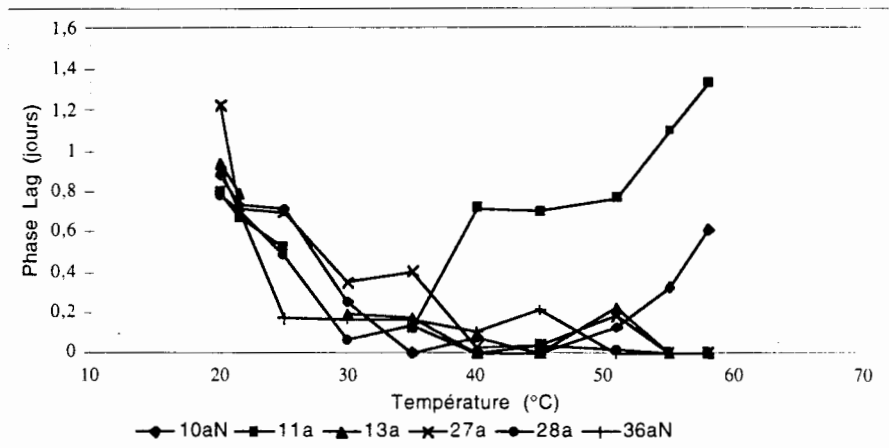


Figure 5.6 Evolution du temps de germination (phase de latence) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.

### 5.2.3 Températures cardinales d'*Aspergillus fumigatus*

La croissance apicale des souches d'*A. fumigatus* varie de la même manière en fonction de la température. Ces souches présentent les températures cardinales suivantes (Figure 5.7) :

- Minimale d'environ 15 °C (par extrapolation)
- Optimale de 40°C
- Maximale de 58°C.

Ces températures cardinales coïncident avec celles rapportées par COONEY et EMERSON (1964) qui ont choisi cette espèce comme modèle pour décrire la thermotolérance des champignons. En conséquence, les souches de *A. fumigatus* sont classées comme thermotolérantes, car elles se développent aux températures inférieures à 20°C et tolèrent des températures d'incubation supérieures à 55°C.

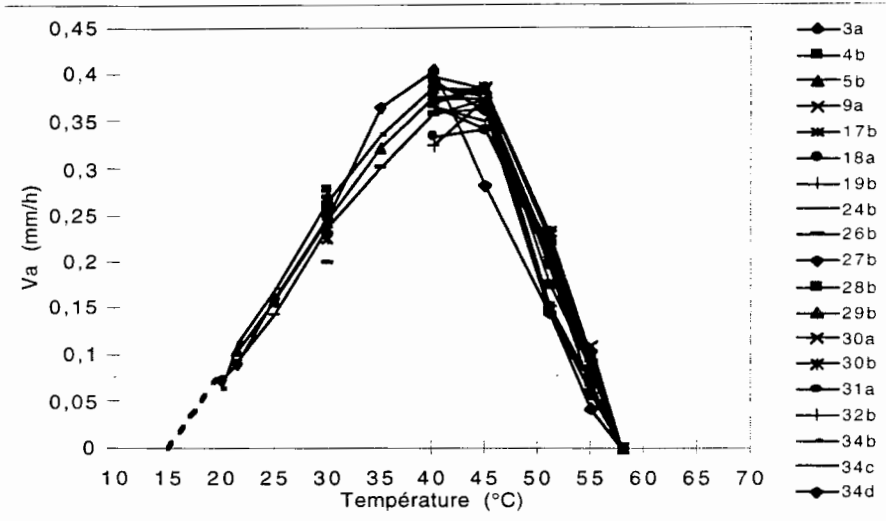


Figure 5.7 Evolution de la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) des souches d'*A. fumigatus* en fonction de la température d'incubation, cultivées sur un milieu gélosé.

Par ailleurs, à une température d'incubation de 20°C, le temps de germination des spores est d'environ 30h. Avec l'augmentation de la température d'incubation de cultures, les phases de latence se raccourcissent graduellement. Néanmoins à 55°C, les souches ont des comportements différents. Soit les phases de latence augmentent pour atteindre 30h en moyenne, comme dans le cas des souches 3a, 4b, 31a et 34c ; soit la durée des phases de latence reste constante, comme c'est le cas pour le reste des souches étudiées (Figure 5.8).

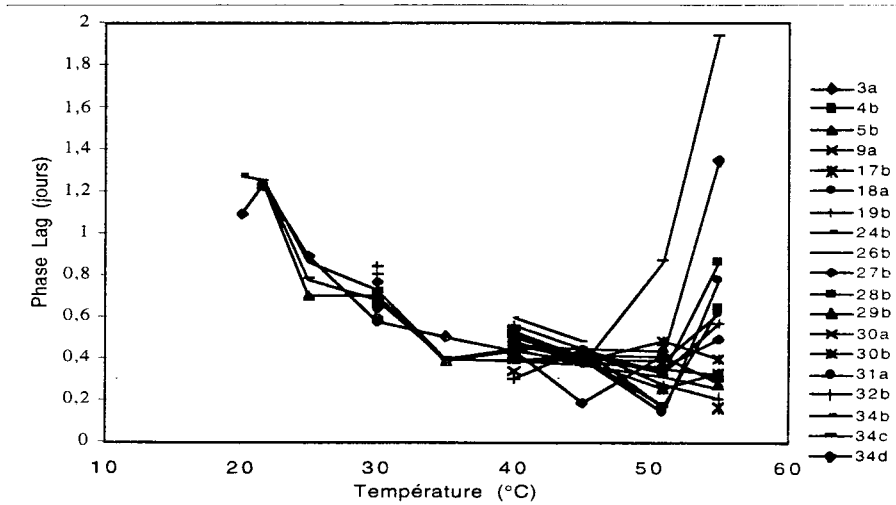


Figure 5.8 Evolution du temps de germination (Phase de latence) des souches de *A. fumigatus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé.

#### 5.2.4 Thermophilie et la thermotolérance des champignons

Dans cette section, les généralités du comportement des souches, vis-à-vis de la température, sont discutées et comparées.

On a constaté que chacune des souches étudiées présente une courbe de croissance particulière en fonction de la température. Ces différences de comportement, vis-à-vis de la température, mettent en évidence qu'une souche est différente par rapport à l'autre (Figures 5.3, 5.5 et 5.7).

Par ailleurs, on observe que toutes les souches se développent sur une vaste gamme de températures d'incubation. Elles montrent une courbe typique de la croissance des micro-organismes en fonction de la température. D'abord, la croissance apicale est très faible quand les températures sont proches de leurs températures minimales. Au fur et à mesure que la température augmente, une augmentation progressive de la vitesse de la croissance apicale, jusqu'à l'obtention d'un optimum, est observée. Finalement, une forte chute de la croissance apicale à des températures élevées est notée, de sorte que la température maximale que le



champignon tolère pour se développer est située, à peine, quelques degrés au-delà de la température optimale (Figure 5.9a).

Les souches de *Rh. microsporus* affichent les vitesses de croissance les plus élevées, par rapport aux autres deux groupes des champignons. De 20 à 35 °C, les vitesses de la croissance apicale de *Rh. pusillus* et *A. fumigatus* sont similaires, tandis que celles de *Rh. microsporus* prennent des valeurs de plus de deux fois supérieures. De 40°C à 60°C, les vitesses apicales des *Rh. microsporus* et *Rh. pusillus* prennent des valeurs similaires; tandis que celles de *A. fumigatus* sont sensiblement plus faibles (Figure 5.9a).

Alors que pour les souches de *Rh. pusillus*, la zone de la croissance maximale se situe sur un pic aigu, les souches de *Rh. microsporus* montrent un grand palier. *Rh. microsporus* présente une vaste gamme des températures pour se développer de manière optimale (de 30 à 45°C). D'ailleurs, les souches de *A. fumigatus* présentent une zone de croissance maximale comprise entre 35 et 45°C (Figure 5.9a).

L'excellente croissance de *Rh. microsporus* sur une zone étendue de températures, permet d'envisager son utilisation dans un procédé de Fermentation en Milieu Solide, car, comme il a été remarqué dans la section 2.5.3, un des principaux inconvénients de cette technique est la difficulté d'empêcher l'augmentation de la température liée à l'activité métabolique du micro-organisme cultivé (HESELTINE, 1972). Ainsi, la thermotolérance confère à ces champignons des avantages très intéressants, par rapport aux autres micro-organismes mésophiles employés couramment en FMS.

Enfin, on observe que l'espèce qui présente la plus grande thermorésistance pour se développer est *Rh. pusillus*. Au contraire, *Rh. microsporus* est l'espèce la plus capable de se développer aux plus faibles températures (Figure 5.9a).

En ce qui concerne les études des phases de latence, la Figure 5.9b montre que les souches qui mettent le plus de temps pour démarrer leur croissance à basse température sont les *Rh. pusillus*, lesquelles présentent des phases de latence dix fois supérieures à celles des autres espèces pour une température d'incubation de 20°C. Cet aspect suggère l'inefficacité de *Rh. pusillus* pour s'adapter aux basses températures. En revanche, quand la température

d'incubation augmente (de 35 à 58°C), la phase de latence pour les souches de *Rh. pusillus* diminue et atteint des valeurs similaires aux autres deux espèces.

Par contre, les souches d'*A. fumigatus*, et en particulier, les souches de *Rh. microsporus* montrent une excellente capacité d'adaptation aux différentes températures d'incubation permettant la croissance de ces champignons. La température n'affecte que légèrement l'initiation de la croissance de ces champignons. Dans la nature, la thermotolérance de ces champignons permet leur adaptation aux températures environnementales changeantes et leur garantie une permanence dans les successions des populations fongiques d'un écosystème donné.

Cette capacité d'adaptation aux différentes températures, pourrait être expliquée avec l'aide des théories énoncées par CRISAN (1973) qui reposent essentiellement sur deux points :

- Le renouvellement rapide des acides gras de la membrane. A des températures élevées, il y aurait une synthèse rapide des acides gras saturés qui remplaceraient les acides gras insaturés membranaires. A basses températures, il y aurait l'effet contraire (SUMNER et coll., 1969 ; DIX et WEBSTER, 1995b).
- La thermostabilité des protéines fongiques. Il existe de nombreuses évidences expérimentales qui ont constaté la synthèse des protéines thermostables issus du métabolisme des champignons thermophiles et thermotolérants, et en particulier de leurs enzymes (CRISAN, 1973; SORENSEN et CRISAN, 1974; OMAR et coll., 1987; SUGIYAMA, 1993; DA SILVA et coll., 1994, CAMPOS et FELIX, 1995, FISHER et coll., 1995).

Probablement, au lieu de considérer la croissance d'un champignon à 20°C, pour le caractériser de thermotolérant ou de thermophile, il serait plus convenable de parler de thermotolérance d'un champignon par rapport à sa facilité à s'adapter aux températures extrêmes d'incubation situées entre 20-50°C et de définir la thermophilie d'un champignon, par rapport à l'énorme difficulté que représente pour lui le démarrage de sa croissance aux alentours de 20°C. Puisque, si les champignons appartenant au groupe de *Rh. pusillus* (une espèce typiquement thermophile) sont incubés longtemps à 20°C, on finit par observer une croissance.

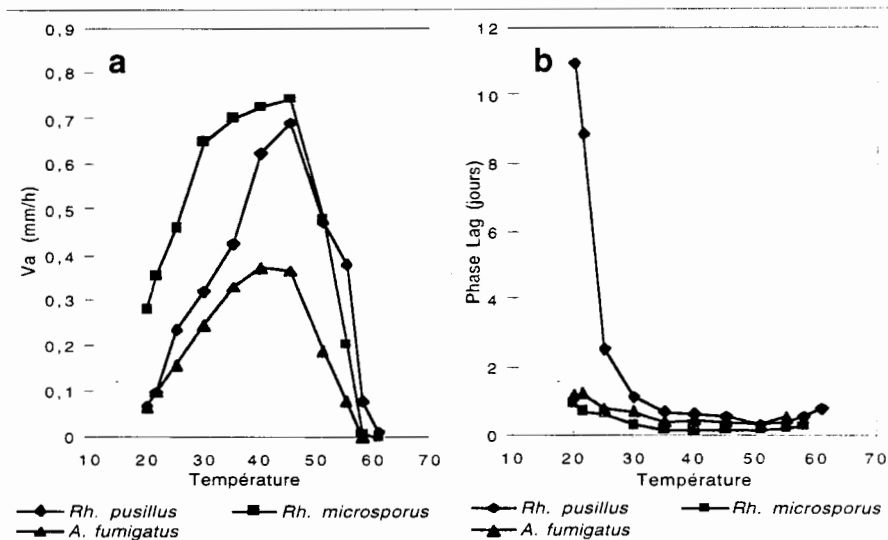


Figure 5.9 Courbes de croissance (a) et de temps de germination (b) pour la moyenne de chaque groupe de souches thermophiles et thermotolérantes sauvages en fonction de la température sur un milieu gélosé. Va est la vitesse de la croissance apicale.

A notre connaissance, les observations fondamentales, concernant les temps de germination (phase de latence) des champignons thermophiles aux différentes températures d'incubation, n'ont jamais été mentionnées dans la littérature.

Pour compléter l'étude de la thermophilie des souches, il nous a paru pertinent de comparer les souches sauvages avec celles provenant de collections internationales, *Rh. pusillus* et *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*.

En ce qui concerne l'espèce de *Rh. pusillus*, les souches de référence Rp183.67 et Rp253.53 présentent des courbes de croissance, en fonction de la température, dissemblables l'une de l'autre. Ces températures cardinales sont, aussi, un peu différentes par rapport aux souches sauvages. Il semble y avoir une température minimum au-dessous de 20°C, un optimum à 50°C et un maximum de 58°C. De plus, les valeurs des vitesses apicales sont la moitié de celles des souches sauvages (Figure 5.10a).

Par ailleurs, à 20°C, la souche Rp183.67 présente une phase de latence de 4 jours: tandis que les spores de la souche Rp253.53 nécessitent 5.5 jours pour germer. Ces valeurs correspondent à la moitié de celles atteintes pour les souches sauvages (Figure 5.10b).

Au sujet des souches de référence de *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*, on remarque que les courbes de croissance des souches Rμ607.73 et Rμ609.81 sont similaires entre elles et ces températures cardinales correspondent à celles de ces homologues sauvages (Figure 5.10a).

Par ailleurs, on observe une germination rapide aux différentes températures d'incubation comme cela a été observé dans le cas des souches sauvages. La souche Rμ607.73 maintient la même phase de latence (12h) vis-à-vis des fluctuations de la température d'incubation. Par contre, les spores de la souche Rμ609.81 aux températures comprises entre 20 et 50°C, sont capables de démarrer leur croissance 4h après l'inoculation des spores. En revanche, à 55°C, la phase de latence est de 24h (Figure 5.10b).

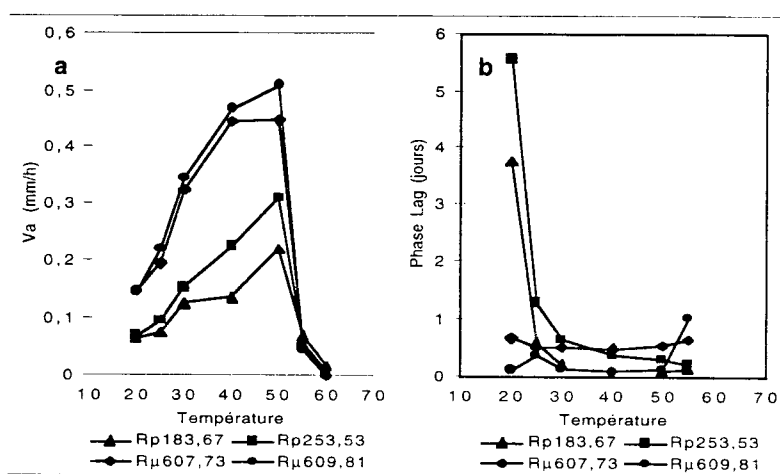


Figure 5.10 Courbes de croissance (a) et de temps de germination (b) des souches thermophiles et thermotolérantes de la collection du CBS en fonction de la température sur un milieu gélosé. Va est la vitesse de la croissance apicale. Rp est *Rh. pusillus* et Rμ est *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*.

### 5.2.5 Influence de la température sur la croissance des champignons

Etant donné que dans les études de l'influence de la température sur la croissance fongique, la vitesse de la croissance apicale ( $V_a$ ) offre une même réponse que celle de la vitesse de la croissance spécifique (CARLILE et WATKINSON, 1996b), cette section a été consacrée à l'analyse de l'évolution de la  $V_a$  en fonction de la température d'incubation des cultures en utilisant l'équation d'Arrhenius pour interpréter l'effet de la température sur les cinétiques de croissance (ROELS, 1983a).

L'équation d'Arrhenius lie la vitesse d'une réaction chimique ( $K$ ) avec la température ( $T$ ), par l'expression (SEGEL, 1976) :

$$K = A e^{-E_a/RT}$$

Où,  $R$  est la constante universelle des gaz,  $E_a$  est l'énergie d'activation de l'enzyme qui limite la croissance et  $A$  est la fréquence de formation du complexe activé des molécules réactives. La linéarisation de cette équation donne l'expression suivante:

$$\ln K = \ln A - E_a/RT$$

Dans la Figure 5.11a, on a pu mettre en évidence trois régions différentes de la courbe de croissance influencées par la température. La première, où la croissance est stimulée par l'augmentation de la température; la deuxième, où la vitesse de croissance atteint le maximum, qui est maintenue sur une petite gamme de températures ; et la troisième, où la vitesse de croissance diminue rapidement à cause de l'augmentation de la température. La première région est utilisée pour calculer les énergies d'activation et la troisième, pour calculer les énergies d'inactivation.

#### 5.2.5.1 Energie d'activation

On peut considérer que la croissance des champignons est le produit final d'une séquence de réactions enzymatiques et que la vitesse de cette séquence est déterminée par une réaction biochimique limitante (ou un groupe de réactions). De plus, on peut supposer que la vitesse de cette réaction dépend de la fréquence de collisions entre les molécules qui y participent. Cette fréquence de collisions est influencée par la concentration et la rapidité de mouvement (énergie cinétique) des molécules impliquées dans la réaction.

Par conséquent, la vitesse de la réaction qui limite la croissance s'accélère avec l'augmentation de la température, car l'énergie cinétique des molécules qui participent dans la réaction dépend de la température. Cependant, la vitesse de la réaction n'est pas égale à la fréquence des collisions, parce que seule une faible proportion de ces collisions possède suffisamment d'énergie pour aboutir à une réaction. Cette énergie minimale requise pour qu'une réaction chimique se réalise, correspond à l'énergie d'activation (SEGEL, 1976).

Les énergies d'activation ont été calculées pour tous les champignons sur la première partie de la courbe qui a montré un comportement linéaire (Annexe 1). Différents points de température ont été considérés pour effectuer la linéarisation: Pour *Rh. pusillus* 20, 25, 30, 35, 40 et 45°C; pour *Rh. microsporus* et *A. fumigatus* 20, 21.5, 25 et 30°C.

Le Tableau 5.1 montre les énergies d'activation (Ea) pour les trois groupes de souches. Les valeurs de Ea sont similaires pour les souches d'un même groupe : ainsi, la moyenne pour chaque espèce est de 15,2(±2), 14,6 (±6) et 20,1 (±2) Kcal/mole pour *Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus*, respectivement. De plus, on observe que l'Ea de chaque groupe ressemble à celle de leur homologue de référence.

De ces valeurs de l'Ea, on souligne que les *A. fumigatus* ont besoin d'une plus grande quantité d'énergie pour que ses réactions se réalisent, en augmentant les vitesses de croissance. C'est-à-dire que, pour une même augmentation de la température, les souches de *A. fumigatus* augmentent plus lentement leurs vitesses de croissance que pour les autres souches. Par contre, les souches de *Rh. pusillus* et de *Rh. microsporus* ont des énergies d'activation similaires, ce qui suggère qu'elles ont le même comportement face à l'augmentation de la température.

Des autres valeurs d'Ea rapportées d'Ea correspondent à 8.2 Kcal/mole pour *Penicillium chrysogenum* (CALAM et coll., 1951, en AIBA et coll., 1973) et à 20,6 Kcal/mole pour *Klebsiella pneumoniae* (ESENER et coll., 1981). D'ailleurs, WATIER et coll. (1996) ont trouvé chez *Pectinatus sp.*, une inflexion additionnelle de sa courbe de croissance en fonction de la température à 26°C (avant l'optimum de croissance); donc, ils ont rapporté deux Ea, une de 10,9 Kcal/mole (au-dessus de 26°C) et une autre de 68 Kcal/mole (au-dessous de 26°C).

Tableau 5.1 Energies d'activation des réactions biochimiques qui limitent la croissance des champignons thermophiles et thermotolérants.

Souches		Souches	
<i>Rh. pusillus</i>	Ea (Kcal/mole)	<i>Rh. microsporus</i>	Ea (Kcal/mole)
2a	13,44	10b	12,03
4a	14,76	11a	15,75
5a	15,87	13a	15,34
6a	15,19	27a	16,04
7a	17,43	28a	11,01
8a	16,66	36a	17,56
10a	16,10	<b>Moyenne</b>	<b>14,62</b>
12a	15,76	R $\mu$ 607.73	13,63
16a	17,66	R $\mu$ 609.81	15,30
17a	14,03		
19a	15,74		
22a	12,72		
24a	13,40		
29a	16,10		
32a	15,01		
33a	15,08		
33b	15,57		
34a	12,80		
35a	15,27		
<b>Moyenne</b>	<b>15,19</b>		
Rp183.67	11,51		
Rp253.53	14,02		

Souches	
<i>A. fumigatus</i>	Ea (Kcal/mole)
3a	21,94
24b	23,22
26b	19,33
29b	17,83
<b>Moyenne</b>	<b>20,58</b>

### 5.2.5.2 Energies d'inactivation

A des températures supérieures à la température optimale de la croissance des champignons, la vitesse de croissance chute. A ce niveau, on suppose que la structure de l'enzyme(s) qui contrôle la séquence des réactions de la croissance commence à être dénaturée et que uniquement l'enzyme qui reste non dénaturée est la seule responsable de la continuation ces réactions. Dans ce cas, l'équation d'Arrhenius peut être réécrite, en considérant ce phénomène (ROELS, 1983b) :

$$K = C e^{-E_i/RT}$$

Où,  $E_i$  est l'énergie d'inactivation de la réaction de dénaturation et  $C$  est une constante. La linéarisation de cette équation donne la expression suivante:

$$\ln K = \ln C - E_i/RT.$$

L'énergie d'inactivation a été calculée sur plusieurs points du graphique du  $\ln K$  vs  $1/T$  (Annexe 1), où un comportement linéaire a été remarqué. Les températures qui ont été

sélectionnées sont: *Rh. pusillus* : 51°C, 55°C et 58°C. *A. fumigatus* : 45°C, 51°C et 55°C. *Rh. microsporus* : 45°C et 51°C, pour la souche 36a ; 51°C et 55°C pour les souches 27a et 28a ; et 51°C, 55°C et 58°C pour les souches 10b et 11a.

Le Tableau 5.2 présente, pour tous les champignons, les énergies d'inactivation de l'enzyme responsable de la réaction limitante de la croissance de chaque groupe. Les souches de *Rh. pusillus* et *Rh. microsporus* montrent une hétérogénéité des énergies d'inactivation, ce qui indique les différentes réponses à la dénaturation de ces enzymes vis-à-vis de la température. Cependant, on peut distinguer une moyenne pour la  $E_i$  du groupe de *Rh. pusillus* de 56,6 Kcal/mole. Par contre, cette hétérogénéité est plus marquée chez *Rh. microsporus* ; il faudrait probablement diviser ce groupe en deux : A) 10b, 11a, 13a, 27a, avec une moyenne de 52 Kcal/mole et B) 28a, 36a, R $\mu$ 607.73 et R $\mu$ 609.81 avec une moyenne de 103 Kcal/mole. Chez *A. fumigatus*, les  $E_i$  des souches est similaire et la moyenne calculée est de 32.5 Kcal/mole. Enfin, l' $E_i$  de chaque espèce ressemble à celle de leur respective souche de référence.

Les  $E_i$  d'*A. fumigatus* sont les plus faibles ce qui signifie que l'enzyme qui limite la croissance des ces champignons est dénaturée plus lentement, face à l'augmentation de la température d'incubation.

Les souches de *Rh. pusillus* et *Rh. microsporus* ont des  $E_i$  élevées, ce qui signifie que leurs croissances sont plus sensibles d'être affectées par les augmentations de température (au-dessus de leurs températures optimales de croissance). Cette caractéristique est encore plus prononcée pour les souches de *Rh. microsporus* 28a, 36a, R $\mu$ 607.73 et R $\mu$ 609.81.

Les valeurs des  $E_i$  rapportées dans ce travail peuvent être comparées à celle rapportée pour *Klebsiella pneumoniae* de 70 Kcal/mole (ESENER et coll., 1981).



Tableau 5.2 Energies d'inactivation des enzymes qui limitent la croissance des champignons.

Souches <i>Rh. pusillus</i> Ei (Kcal/mole)		Souches <i>Rh. microsporus</i> Ei (Kcal/mole)	
2a	71,78	10b	69,98
4a	47,96	11a	42,89
5a	40,95	13a	43,69
6a	42,12	27a	51,30
7a	63,07	28a	109,89
8a	83,30	36a	104,62
10a	34,63	<b>Moyenne</b>	<b>70,39</b>
12a	79,73	Rμ607.73	94,59
16a	52,23	Rμ609.81	102,59
17a	56,96		
19a	78,81		
22a	60,22		
24a	47,75		
29a	55,48		
29'a	49,76		
32a	39,06		
33a	58,01		
33b	67,38		
34a	53,02		
35a	50,45		
<b>Moyenne</b>	<b>56,63</b>		
Rp183.67	57,41		
Rp253.53	88,22		

Souches <i>A. fumigatus</i> Ei (Kcal/mole)	
3a	32,00
4b	34,98
5b	29,51
9a	27,40
17b	30,47
18a	27,30
19b	28,91
24b	35,94
26b	36,56
27b	43,58
28b	31,15
29b	29,97
31a	28,69
32b	25,73
34c	37,99
34d	37,09
<b>Moyenne</b>	<b>32,33</b>

### 5.3 Indices de sporulation

Généralement, la source d'inoculum pour une culture de champignons, est constituée de spores, car elles sont faciles à manipuler, résistantes aux agressions physico-chimiques, stables pendant la conservation et, dans le cas des fermentations en milieu solide (FMS), elles peuvent être distribuées de manière homogène sur la surface et à l'intérieur du solide. Dans l'industrie des fermentations, la production d'un inoculum viable et en quantité suffisante revêt une importance primordiale. Plusieurs rapports scientifiques ont été publiés concernant la production de spores de champignons filamenteux (LARROCHE et coll., 1985; GERVAIS et coll., 1988; LARROCHE et coll., 1989; ROUSSOS et coll., 1991).

En plus, comme on l'a aperçu dans la synthèse bibliographique (§2.5.3), un des principaux désavantages de la FMS réside dans l'utilisation de fortes concentrations d'inoculum: donc en FMS, l'indice de sporulation d'un champignon revêt une importance capitale et cette caractéristique peut être prise en considération comme un critère pour la sélection d'une souche utilisable en FMS (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982).

Nous avons étudié la production de spores sur le milieu gélosé PDA après une semaine de culture à 30°C et 50°C pour les différentes souches de Mucorales (§3.3.4). Les souches ont été incubées pendant semaine, dû à la faible croissance des *Rhizomucor pusillus* à 30°C.

### 5.3.1 Souches de *Rhizomucor pusillus*

Les résultats obtenus pour les souches de *Rh. pusillus* cultivées à la même température, montrent que le degré de sporulation varie d'une souche à l'autre. De plus, la température d'incubation (30 ou 50°C) affecte la sporulation d'une manière plus ou moins drastique, selon la souche. Ainsi, la sporulation des souches 7a et 8a ne semble pas affectée par le changement de température d'incubation. Par contre, les souches 6a, 17a et 33b sont fortement affectées, de sorte qu'à 50°C, leurs taux de sporulation sont presque négligeables. Néanmoins, en général, la sporulation à 30°C est supérieure à celle obtenue à 50°C (Figure 5.11). Ces observations sont en accord avec les rapports de DOMSCH et GAMS (1993), qui ont remarqué, qu'à une température de 55°C, *Rh. pusillus* produit uniquement du mycélium stérile.

A une température d'incubation de 30°C, il semble y avoir une sporulation de  $7,8 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>. Un maximum de sporulation de  $15,1 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> est observé pour la souche 17a. Par contre, la souche 33b a le plus faible degré de sporulation ( $4,1 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>). Concernant les souches de référence de *Rh. pusillus*, on souligne qu'elles ont un indice de sporulation similaire à celui des souches sauvages ( $8,9 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rp183.67 et  $3,8 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rp370.65).

A une température d'incubation de 50°C, la moyenne de sporulation est calculée de  $3,4 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>.

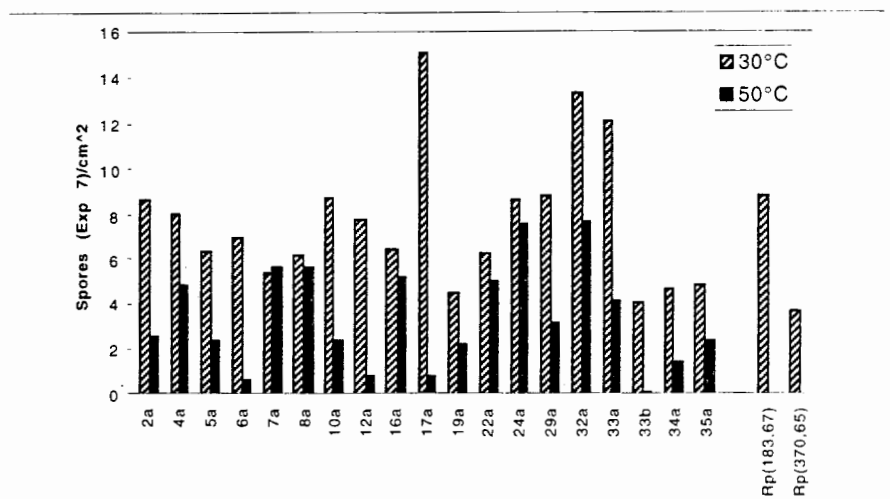


Figure 5.11 Production de spores par différentes souches de *Rhizopus pusillus* sur milieu gélosé.

### 5.3.2 Souches de *Rhizomucor microsporus*

Les souches de *Rh. microsporus* présentent un profil variable de l'indice de sporulation d'une souche à l'autre à une température d'incubation constante. De plus, on remarque que la température d'incubation (30 ou 50°C) détermine catégoriquement le degré de sporulation de ces souches. En effet, la sporulation à 50°C est négligeable pour l'ensemble de ce groupe de champignons (Figure 5.12).

A 30°C, on peut estimer une moyenne de sporulation pour les souches sauvages de  $4 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>. Les souches 10b et 28a ont le maximum de sporulation de  $5,7 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>. En revanche, la souche 11a a le plus faible degré de sporulation ( $1,3 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>). En ce qui concerne les souches de référence de *Rh. microsporus*, on observe qu'elles ont un indice de sporulation de  $3,3 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rμ607.73 et  $1,8 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rμ609.8, indices similaires à la moyenne des souches sauvages (Figure 5.12).

Par contre, la comparaison des moyennes de sporulation pour les groupes de *Rh. pusillus* et de *Rh. microsporus* ( $7,6 \times 10^7$  et  $3,6 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>, respectivement), révèle que le premier produit le double de spores du second.

D'ailleurs, les souches de *Rh. miehei* ont également été cultivées à 30°C, et les titres de sporulation obtenus sont plus faibles que ceux des groupes précédents :  $1,14 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rm182.67 et  $2,48 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour Rm370.65.

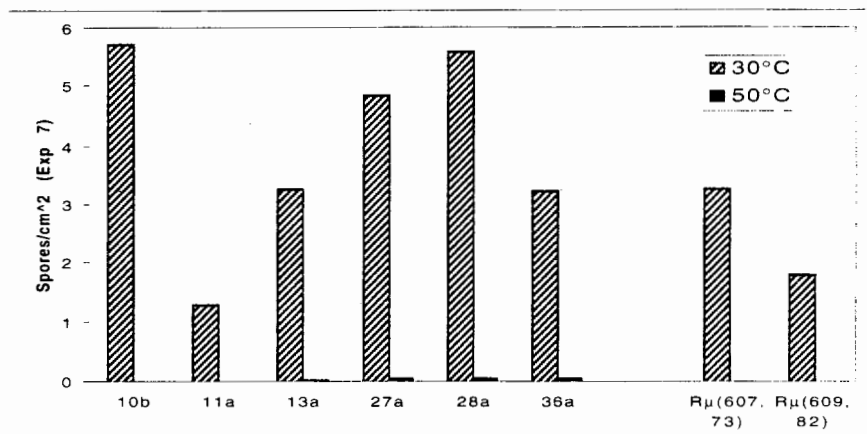


Figure 5.12 Production de spores par les différentes souches de *Rhizopus microsporus* sur milieu gélosé.

D'après nos observations, elles nous permettent d'affirmer qu'à des températures élevées, les indices de sporulation sont faibles. En conséquence, pour produire un inoculum viable pour les expériences futures, il faudra incuber ces souches à 30 °C, pendant une semaine.

Finalement, les techniques de récupération des spores sont efficaces et faciles à mettre en œuvre. Il n'est pas nécessaire lors de la récupération des spores de mettre des billes de verre pendant l'agitation magnétique, comme le recommande SOCCOL (1992) car, nous avons constaté au microscope que les spores ont été séparées du sporange. En effet, le degré de sporulation de 17 souches de *Rhizopus* obtenu par SOCCOL (1992) est sensiblement le même (entre  $0,081$  et  $4,7 \cdot 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>) que celui obtenu pour nos souches de *Rhizopus microsporus*.

## 5.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, quelques aspects physiologiques des souches thermophiles et thermotolérantes, en particulier, une brève caractérisation nutritionnelle, la sporulation, la thermophilie ou la thermotolérance ont été étudiés.

Pour la culture des souches, différentes sources de carbone (amidon, lipides, protéines et cellulose) ont été utilisées afin d'estimer indirectement la production des enzymes extracellulaires. Les meilleures colonisations des surfaces des milieux gélosés par les champignons, ont été obtenues avec des milieux contenant de l'amidon ou des lipides. Au contraire, le plus faible développement des souches a été observé pour le milieu contenant de la carboxyméthyl cellulose. Ces résultats suggèrent que ces champignons thermophiles et thermotolérants sont capables de produire des lipases et des amylases extracellulaires.

Il a été également remarqué que les vitesses de croissance apicale des ces champignons sont influencées par les différents esters utilisés comme sources de carbone. Pour les cultures sur ces substrats, les souches de *Rhizopus microsporus* ont montré les vitesses de croissance apicale les plus élevées par rapport aux autres souches. En particulier, ces souches ont eu une nette préférence pour l'huile de coco et pour le Tween 20.

Les températures cardinales trouvées pour les différentes espèces sont, *a grosso modo*, les suivantes:

Espèces	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
<i>Rh. pusillus</i>	<20	45	61
<i>Rh. microsporus</i>	11	45	52-61
<i>A. fumigatus</i>	15	40	58

Vu le comportement des souches vis-à-vis de la température, *Rh. pusillus* est classé comme thermophile, *Rh. microsporus* et *Aspergillus fumigatus* sont classés comme des champignons thermotolérants.

En général, les températures élevées (qui permettent la croissance des champignons), résultent en vitesses métaboliques élevées et phases de latence réduites.

Les souches du groupe de *Rh. microsporus* ont présenté les vitesses de la croissance apicale, les plus élevées (jusqu'à 0,82 mm/h). Ces souches ont montré un seuil très large de

température pour leur développement optimum (de 30 à 45°C). Cette caractéristique offre des nouvelles possibilités pour leur utilisation dans les procédé de FMS.

Pour achever les réactions biochimiques qui limitent la croissance, les espèces requièrent en moyenne, une énergie d'activation de 15,2, 14,6 et 20,1 Kcal/mole, respectivement pour *Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus*.

Les énergies d'inactivation présentées pour chaque groupe des souches ont été (en moyenne) : de 56,6 Kcal/mole pour *Rh. pusillus*, de 52 et 103 Kcal/mole pour *Rh. microsporus* et de 32,5 Kcal/mole pour *A. fumigatus*. Les souches de 28a, 36a, Rμ607.73 et Rμ609.S1 de *Rh. microsporus* ont présenté les énergies d'inactivation les plus élevées, ce qui signale qu'au-dessus de leurs températures optimales de croissance, leurs vitesses de croissance sont les plus affectées par l'augmentation de la température.

Pour avoir un inoculum abondant, robuste et viable, les souches doivent être cultivées sur milieu PDA à 30 °C, pendant une semaine. Avec ces conditions d'incubation, les sporulations obtenues (en moyenne) ont été de  $7,6 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour les souches de *Rh. pusillus* et de  $3,6 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour les souches de *Rh. microsporus*.

Enfin, les profils des vitesses de croissance apicale et les durées de la phase de latence en fonction de la température d'incubation, les énergies d'activation et d'inactivation, ainsi que les indices de sporulation ont offert des éléments qui ont mis en évidence les différences inhérentes entre chaque souche de champignon isolée des biotopes tropicaux.

**DETECTION D'ESTERASES EN  
CULTURE SUPERFICIELLE**

## 6 DETECTION D'ESTERASES EN CULTURE SUPERFICIELLE

Toutes les souches des champignons thermophiles et thermotolérants se sont bien développées sur des milieux de culture contenant des lipides comme unique source de carbone (§5.1.1 et §5.1.2). Ce fait signale leur capacité à produire des lipases et, vu l'importance biotechnologique de ces enzymes (§2.4.10), nos recherches ont été orientées vers la production de lipases fongiques.

En règle générale, les techniques de criblage des micro-organismes, en vue de la production des enzymes, se réalisent en utilisant des milieux liquides agités. La mise en oeuvre de ces techniques est lourde et fastidieuse, étant donné le grand nombre de souches à tester. Par conséquent, la culture superficielle en milieu gélosé a été utilisée dans un premier temps pour la détection d'une activité estérase.

### Technique de détection des estérases

Quelques techniques de détection des enzymes fongiques extracellulaires en culture superficielle ont été décrites par HANKIN et ANAGNOSTAKIS (1975), en particulier la technique pour la détection des lipases (§3.7.1). D'ailleurs, cette technique a été reprise et modifiée par CHANG et coll., (1992). Le milieu gélosé employé contient essentiellement du  $\text{CaCl}_2$  et du tween 20 (sorbitan monolaurate), lequel est utilisé comme substrat lipidique. La production des lipases est mise en évidence par la formation d'un précipité visible autour de la colonie, le lauréate de calcium, provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'ester de l'acide laurique (Photo 7). Il faut cependant souligner que d'une part le substrat n'est pas un triglycéride et d'autre part le substrat ne se trouve pas dans une interface lipide-eau (§2.4.2). A cause de ces deux points, l'activité enzymatique détectée par cette technique n'est pas nécessairement une activité lipolytique, sinon qu'il s'agit plutôt d'une activité estérase.

Par ailleurs, cette technique a été utilisée aisément pour mesurer l'activité lipase (estérase) des champignons comme *Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus* entre autres (SATYANARAYANA et JOHRI, 1981).

De plus, le tween 20 a été utilisé comme substrat lipidique pour l'analyse des estérases de *Rh. miehei* et il a été montré que ces enzymes hydrolysent le tween 20 plus efficacement que d'autres lipides naturels (ADAMS et DEPLOEY, 1978). Il a été également montré dans la



section 5.1.2, que nos souches sont capables d'hydrolyser et d'assimiler le tween 20, comme unique source de carbone.

Lors de la mise au point de cette technique dans notre laboratoire, l'utilisation d'une membrane de Cellophane proposée par CHANG et coll. (1992), n'a pas été retenue, car la couche de biomasse formée sur la surface gélosée n'interfère pas avec la visualisation du précipité. En effet, lors de la culture superficielle des champignons, la présence du précipité a été facilement mise en évidence (Photo 7). Par conséquent, dans cette étude uniquement la technique de HANKIN et ANAGNOSTAKIS (1975) a été employée.

Trois objectifs sont proposés dans le présent chapitre. D'abord, mettre en évidence la synthèse d'estérases par des champignons thermophiles et thermotolérants. Ensuite, étudier l'effet de la température sur la synthèse des estérases. Enfin, sélectionner la meilleure souche pour la production d'estérases en milieu gélosé.

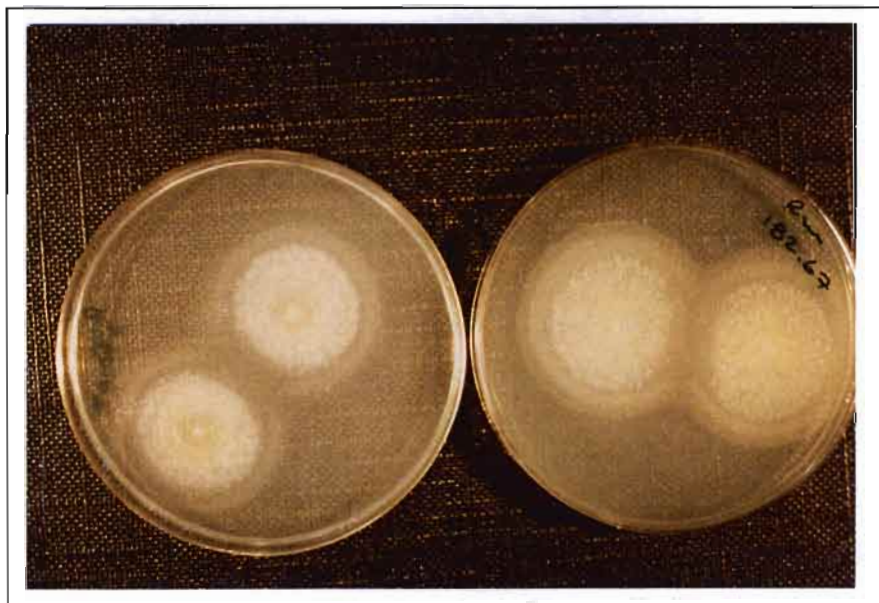


Photo 7 Colonie fongique et précipité (lauréate de calcium) formé grâce à la présence d'estérases. Souche de *Rh. miehei* cultivée sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ .

## 6.1 Effet de la température sur la synthèse d'estérases

La température d'incubation des cultures est un facteur essentiel qui influence directement la croissance et la synthèse des enzymes des micro-organismes. Cependant, l'optimum de la température pour la synthèse d'une enzyme en particulier, peut être différent de l'optimum de la température pour la croissance. De plus, la réaction catalysée par les enzymes est également influencée par la température. Néanmoins, la température optimale de l'activité de l'enzyme ne correspond pas, dans la plupart des cas, ni à la température optimale de la croissance, ni à la température optimale de la synthèse de l'enzyme (FROST et MOSS, 1987).

Pour évaluer l'activité estérasique d'un champignon cultivé sur milieu gélosé contenant du tween 20 et du  $\text{CaCl}_2$ , nous avons introduit un nouveau terme : La vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ). Cette vitesse représente la distance radiale d'avance du halo du précipité formé au dessous des colonies (mm) en fonction du temps (h). Ce terme exprime la sécrétion continue des estérases par le mycélium et la diffusion de ces enzymes dans le milieu gélosé. Les cultures des souches de champignons ont été incubées à différentes températures (de 20 à 63°C) et les  $V_{fp}$  ont été calculées.

Il faut signaler qu'à cause de la déshydratation rapide des milieux gélosés dans le cas de températures élevées, la partie linéaire du graphique devient de plus en plus courte. En effet, pour les températures les plus élevées, où une activité estérasique a été détectée (61 °C), cette partie linéaire est limitée à moins de deux jours.

### 6.1.1 *Rhizomucor pusillus*

Dans la Figure 6.1a les  $V_{fp}$  des souches de *Rh. pusillus* sont représentées. On remarque que chaque souche présente un profil de  $V_{fp}$  particulier en fonction de la température d'incubation. Ainsi, la souche 7a présente la  $V_{fp}$  la plus élevée (0,8 mm/h), alors que la souche 2a montre la  $V_{fp}$  la plus faible (0,53 mm/h). Cependant, il faut signaler que la majorité des souches s'approche à la  $V_{fp}$  présentée par la souche 7a.

Les températures cardinales pour la production des estérases des souches de *Rhizomucor pusillus*, sont les suivantes :

- Minimale de 18 °C (par extrapolation)

- Optimale de 45°C
- Maximale de 61°C.

D'autres auteurs ont déjà rapporté des valeurs similaires (entre 45 et 50°C) aux nôtres pour la température optimale de la synthèse des lipases des champignons thermophiles *Rh. pusillus*, *Humicola grisea*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus* (OGUNDERO, 1980), *Rh. miehei* (DEPLOEY et coll. 1981) et *Humicola lanuginosa* (ARIMA et coll., 1972).

La Figure 6.1b montre qu'à des températures inférieures à 25°C, le temps d'initiation de la formation du précipité (Tip) des souches de *Rh. pusillus* est très lent, de telle sorte qu'à 20°C, ces champignons nécessitent en moyenne, environ 10 jours d'incubation pour produire l'enzyme.

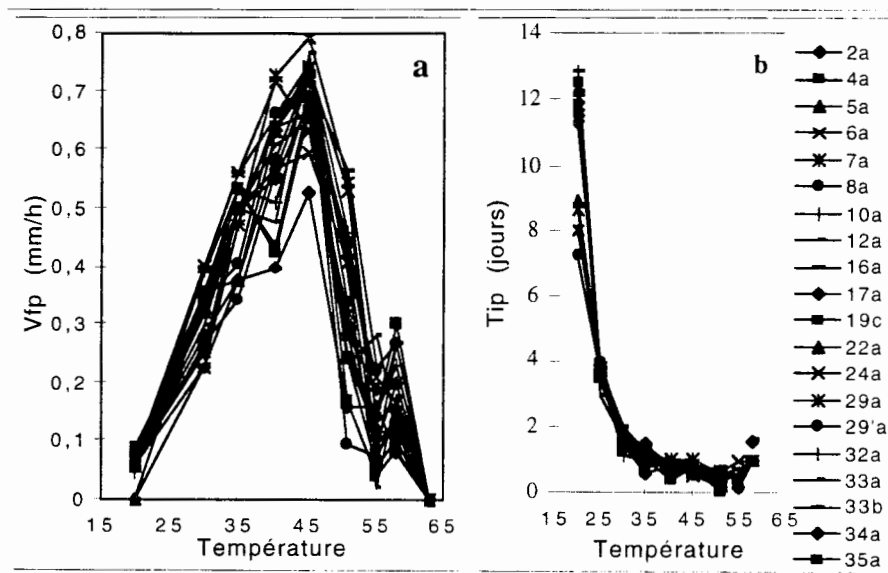


Figure 6.1 Effet de la température d'incubation sur le précipité formé comme conséquence de la présence d'estérases. Souches de *Rh. pusillus* cultivées sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ . a) Vitesse de formation du précipité ( $V_{ip}$ ). b) Temps d'initiation de la formation du précipité (Tip).

Globalement, les vitesses de formation du précipité ( $V_{ip}$ ) ainsi que les temps d'initiation du précipité (Tip) présentent des valeurs et des comportements similaires que ceux observés

pour les vitesses de croissance apicale et la durée de la phase de latence des mêmes souches, respectivement (comparaison entre la Figures 6.1 et les figures 5.3 et 5.4). Ce comportement semble être le résultat d'une production continue de l'estérase à même temps que *Rh. pusillus* se développe et s'allonge sur la surface du milieu gélifié.

## 6.2 *Rhizopus microsporus*

La Figure 6.2 montre que pour chaque souche de *Rhizopus microsporus* existent des différences très nettes de la vitesse de formation des précipités ( $V_{fp}$ ) en fonction de la température d'incubation. Tout d'abord, on remarque que les souches 10b, 13a et 27a présentent les  $V_{fp}$  les plus élevées (d'environ 0,9 mm/h) et une continuité de la synthèse estérasique à des températures élevées (<55°C). Ensuite, on observe que les souches 10b et 27a présentent un seuil de  $V_{fp}$  en fonction de la température compris entre 35 et 51°C, pendant lequel, le même niveau de synthèse des enzymes est soutenu. Pour des températures supérieures à 51°C, la  $V_{fp}$  des souches 10b, 13a et 27a chute nettement, et à 55°C, il n'y a plus de précipité, ce qui confirme l'absence de la synthèse estérasique à des températures d'incubation supérieures à 51°C.

D'ailleurs, la souche 28a présente un intervalle de température très réduit pour la synthèse des estérases. Cet intervalle est compris entre 30 et 45°C. Egalement, on observe que la souche 36a ne forme pas de précipité, sauf à 45°C où la formation d'un précipité très dispersé a été remarqué.

A partir des discussions précédentes, on constate que les températures cardinales de la production d'estérases des souches de *Rh. microsporus* sont inhérentes à chaque souche (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 Températures cardinales de la synthèse d'estérases des souches *Rh. microsporus*.

Souches	Minimale*	Température (°C)	
		Optimale	Maximale
10b	14	entre 35 et 51	50
11a	13	45	45
13a	13	49	50
27a	14	entre 35 et 51	50
28a	30	35	40
36a	45	45	45

\* La température minimale a été obtenue par extrapolation des données de la Figure 6.2

En comparant les vitesses de croissance apicale ( $V_a$ ) avec les  $V_{fp}$ , on constate que même si la plupart des souches de *Rh. microsporus* sont capables de se développer à des températures supérieures à 55°C (Figure 5.5), la synthèse des estérases est arrêtée avant d'atteindre ces températures ou bien, que ces enzymes continuent à être produites, mais qu'elles ne sont pas thermostables.

De plus, il faut signaler que pendant la culture des souches de *Rh. microsporus*, on a constaté la formation du précipité uniquement au niveau superficiel de la gélose. Ce qui suggère que les estérases sont inactivées en présence du Tween 20. En effet, une expérience précédente a montré que la lipase de la souche 13a est extrêmement sensible à la présence de ce tensioactif et de ce fait, elle est inactivée (Résultats non montrés). Cependant, la présence d'un précipité superficiel dans le milieu gélosé indique que l'estérase est produite et qu'elle hydrolyse faiblement son substrat du fait qu'elle ne soit pas complètement inhibée par la présence du tensioactif. De ce fait, la présence d'un grand halo du précipité pourrait indiquer la synthèse continue et accélérée de l'estérase par ces souches.

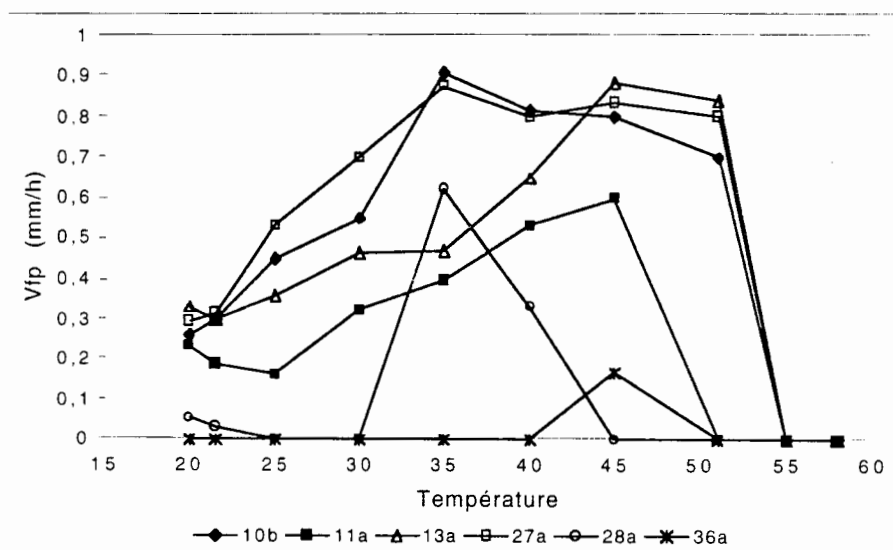


Figure 6.2 Evolution de la vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ) due à la présence de estérases en fonction de la température d'incubation. Souches de *Rh. microsporus* cultivées sur un milieu gélosé contenant du tween 20 et  $CaCl_2$ , entre autres.

Par ailleurs, une fois que le mycélium de ces souches a couvert complètement la surface de la boîte de Pétri (après trois jours de culture), le précipité a commencé à disparaître à cause de la consommation du lauréate du calcium.

A l'exception des souches 10b et 27a, le reste des souches de *Rh. microsporus* ne présente pas de profils similaires, ni des vitesses de formation du précipité, ni des vitesses de la croissance apicale. Par conséquent, la croissance apicale de ces souches ne répond pas de la même manière que la synthèse de l'enzyme vis-à-vis des températures d'incubation (Figure 5.5 et Figure 6.2). En d'autres termes, la vitesse d'élongation apicale du mycélium est indépendante de la synthèse d'estérases pour les souches de *Rh. microsporus*.

Par ailleurs, l'influence de la température sur les temps d'initiation de la formation du précipité (Tip), présente un profil similaire pour l'ensemble des souches. Entre 20°C et 45°C, le Tip diminue (en moyenne) de 31 h à 14 h. A une température d'incubation de 50°C, le Tip augmente à 22h pour les souches 13a et 27a; et à 45h pour la souche 10b.

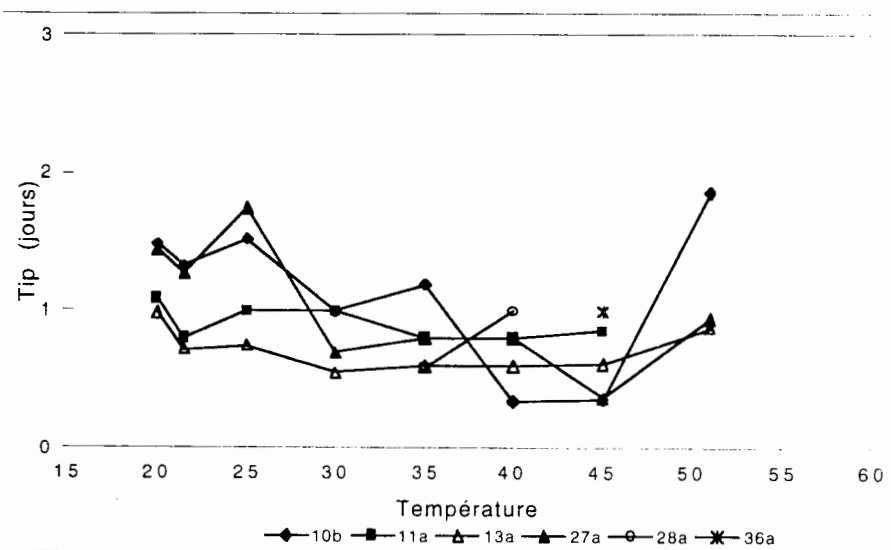


Figure 6.3 Evolution du temps d'initiation de formation du précipité (Tip) des souches de *Rh. microsporus* en fonction de la température d'incubation sur un milieu gélosé contenant du tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ , entre autres.

Si on compare la durée de la phase de latence (Figure 5.6) et le temps d'initiation de la biosynthèse des estérases (Figure 6.3) des souches de *Rh. microsporus*, on observe que l'initiation de cette biosynthèse est un peu décalée par rapport au démarrage de la croissance apicale, ce qui suggère que le degré de différenciation (état physiologique) du mycélium influence la production de l'enzyme.

### 6.3 *Aspergillus fumigatus*

Les 19 d'*A. fumigatus* présentent des courbes similaires à la vitesse de formation du précipité ( $V_p$ ) en fonction de la température d'incubation (Figure 6.4a). Les températures cardinales de la synthèse des estérases, pour ces souches, sont les suivantes :

- Minimale: environ 17 °C (par extrapolation)
- Optimale: 35°C
- Maximale: variable suivant les souches :
  - <55°C, pour les souches 3a, 19b, 26b, 27b, 28b, 31a, 32b, 34b, 34d
  - 58°C, pour le reste des souches de *A. fumigatus*.

Les limites de température de la biosynthèse des estérases coïncident avec les limites de température de la croissance apicale de cette espèce (Figure 5.9). Par contre, les températures optimales de la croissance et de la production des estérases sont différentes, car la croissance optimale est située à 40°C. D'ailleurs, les valeurs des vitesses de la croissance apicale et de la formation du précipité sont similaires.

La température optimale de la synthèse des estérases d'*A. fumigatus* obtenue dans ce travail est similaire à celles présentées (30 et 35°C) par quelques champignons mésophiles pour la production des lipases: *A. niger* (PAL et coll., 1978) et *Geotrichum candidum* (CHANDER et KLOSTERMEYER, 1983).

Par ailleurs, le temps de l'initiation de la synthèse estérasique (Tip) présente trois étapes par rapport à l'augmentation de la température : (i) De 20 à 40°C, les Tip diminuent linéairement de 91h, jusqu'à 24h. (ii) De 40 à 45°C, les Tip restent stables à 24h. (iii) De 45 à 55°C, les Tip augmentent linéairement de 24h, jusqu'à 72h pour les souches 29b, 30a et 30b et jusqu'à 96h pour le reste des souches.

Les initiations de la synthèse de l'estérase et de la croissance apicale des colonies sont décalées, ce qui suggère que la zone d'extension mycélienne (partie de l'hyphe qui avance vers le milieu inexploré - §2.1.2.3-) n'est pas directement impliquée dans la synthèse de l'enzyme. Probablement, les zones productives et de fructification de la colonie seraient les responsables de la cette synthèse enzymatique.

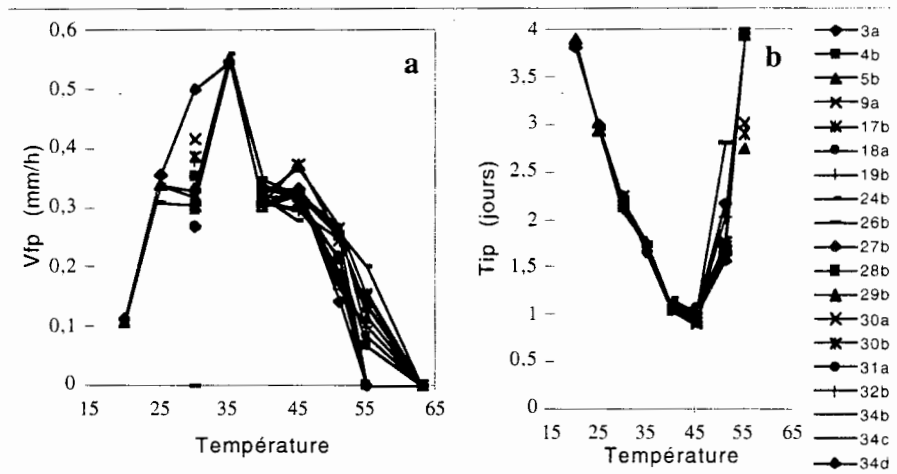


Figure 6.4 Effet de la température d'incubation sur le précipité formé grâce à la présence d'estérases. Souches de *A. fumigatus* cultivées sur un milieu gélosé contenant essentiellement du Tween 20 et  $\text{CaCl}_2$ . a) Vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ). b) Temps d'initiation de la formation du précipité (Tip).

#### 6.4 Comparaison des productions des estérases

La Figure 6.5a présente les moyennes de la vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ) pour les souches de *Rh. pusillus* et d'*A. fumigatus*. Etant donné que les *Rh. microsporus* ont des profils différents, il n'a pas été possible de calculer une moyenne. Néanmoins, la Figure 6.5a inclue la courbe de la souche 27a, appartenant à cette dernière espèce. Dans cette figure, on remarque que pour les trois espèces de champignons, la synthèse des estérases est essentiellement obtenue pour des températures d'incubation comprises entre  $<20^\circ\text{C}$  et  $55^\circ\text{C}$ . *Rh. pusillus* a une nette préférence pour produire ses estérases à des températures élevées ( $45^\circ\text{C}$ ), *A. fumigatus* préfère plutôt les températures moyennes ( $35^\circ\text{C}$ ) et dans le cas de la souche 27a (*Rh.*



*microsporus*), on remarque une préférence située dans une grande marge des températures, de moyennes à élevées (de 35°C à 51°C).

En particulier, les  $V_{fp}$  accélérées à des températures élevées de la souche 27a (et 10b) indiquent que les estérases sont produites rapidement et d'une manière continue. Ce fait suggère une thermostabilité de ces enzymes. Cette caractéristique remarquable de pouvoir produire les estérases indifféremment dans une grande marge des températures, représente un intérêt notable pour les fermentations en milieu solide, au cours desquelles, les températures peuvent augmenter considérablement (§2.5.3). Enfin, on remarque que *Rh. pusillus* produit des estérases à la température la plus élevée (58°C).

En ce qui concerne les souches de référence de *Rh. pusillus* (Rp183.67 et Rp253.53) et *Rh. microsporus* (Rμ607.73 et Rμ609.81), on observe qu'elles produisent des estérases à peu près dans la même échelle des températures d'incubation que celles observées pour les souches sauvages. Cependant, leurs vitesses de formation du précipité ( $V_{fp}$ ) sont notamment inférieures à celles des souches sauvages. En particulier, les souches *Rh. microsporus* Rμ607.73 et Rμ609.81 présentent des comportements divergents des  $V_{fp}$ , comme cela a été précédemment décrit pour les souches sauvages de *Rh. microsporus* (Figure 6.5b).

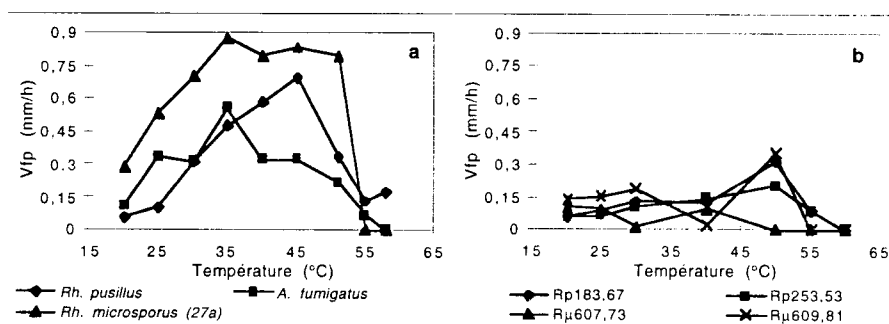


Figure 6.5 Evolution de la vitesse de formation du précipité ( $V_{fp}$ ) due à la présence d'estérases en fonction de la température d'incubation. a) Souches sauvages. b) Souches de référence (Rp = *Rh. pusillus* et Rμ = *Rh. microsporus*).

Par ailleurs, à 20°C, les souches de *Rh. pusillus* présentent les temps d'initiation de la synthèse des estérases ( $T_{ip}$ ) les plus longs, 11 jours pour les souches sauvages et 5 jours pour

les souches de référence. Cependant, à partir de 30°C, les trois espèces présentent à peu près les mêmes  $T_{ip}$  (Figure 6.6 a et b).

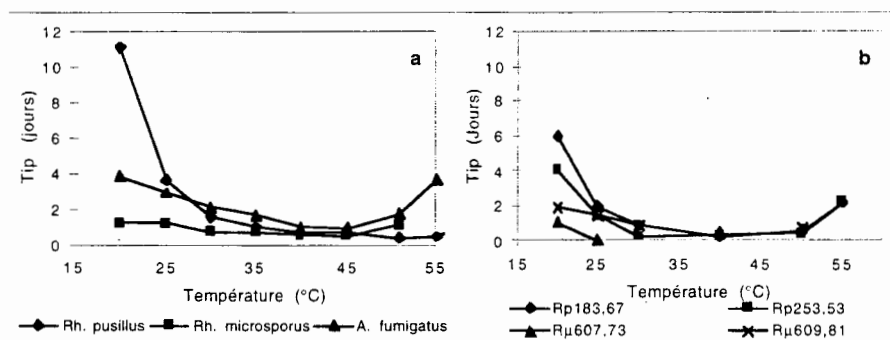


Figure 6.6 Evolution des temps d'initiation de formation du précipité en fonction de la température d'incubation. a) Souches sauvages . b) Souches de référence (Rp = *Rh. pusillus* et Rμ = *Rh. microsporus*).

## 6.5 Conclusion

La formation d'un précipité du lauréate de calcium dans des milieux gélosés a permis la détection d'estérases par les champignons thermophiles et thermotolérants isolés au cours de ce travail.

Ces souches ont été capables de produire des estérases dans un grand intervalle de températures (<20°C à 55°C). Les températures optimales de la vitesse de formation du précipité ( $V_{ip}$ ) ont été les suivantes : 45, 35 et 35-50°C respectivement pour les souches de *Rh. pusillus*, *A. fumigatus* et *Rh. microsporus* (souches 10b, 13a, 27a). Les  $V_{ip}$  plus élevées (0,9 mm/h) sont atteintes par l'espèce *Rh. microsporus*, alors que la synthèse d'estérases à la température la plus élevée (58°C) est obtenue pour *Rh. pusillus*.

Il a été observé que les souches de *Rh. pusillus* ont produit des estérases au fur et à mesure que le mycélium s'allonge sur la surface du milieu gélosé.

Par ailleurs, les limites de température de la biosynthèse d'estérases d'*A. fumigatus* coïncident avec les limites de la croissance apicale de cette espèce. Par contre, les températures optimales de la croissance (40°C) et de  $V_{ip}$  (35°C) sont différentes. De plus, les initiations de la

synthèse de l'estérase et de la croissance apicale des colonies d'*A. fumigatus* sont décalées dans le temps, ce qui suggère que la zone d'extension mycélienne n'est pas impliquée dans la synthèse de l'enzyme.

En ce qui concerne l'espèce de *Rh. microsporus*, aucune corrélation entre la  $V_{fp}$  et la vitesse de la croissance apicale n'a été constatée. Ce qui suggère que la vitesse d'élongation apicale du mycélium est indépendante de la synthèse d'estérases pour les souches de *Rh. microsporus*. Il a été également remarqué que la synthèse des estérases de ces souches est arrêtée avant d'atteindre leurs températures maximales de la vitesse de croissance apicale. D'ailleurs, les  $V_{fp}$  les plus élevées (0,9 mm/h) ont été présentées pour les souches 10b, 13a et 27a. De plus, un très grand seuil de température a été observé pour les souches 10b et 27a (de 35 à 51°C), pendant lequel, la valeur maximale de  $V_{fp}$  est soutenue.

D'ailleurs, le temps de l'initiation de la biosynthèse des estérases des souches de *Rh. microsporus* est un peu décalé par rapport au démarrage de la croissance, ce qui suggère que l'état physiologique du mycélium influence la production de l'enzyme.

**CARACTERISATION DE  
L'ACTIVITE LIPASE DES  
EXTRAITS BRUTS**

## 7. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE LIPASE DES EXTRAITS BRUTS

Les études des lipases sont compliquées à réaliser à cause de plusieurs facteurs, notamment, les difficultés associées à la mesure de l'activité d'une enzyme soluble dans l'eau sur des substrats insolubles. En général, les méthodes d'analyse des lipases sont méticuleuses et il est nécessaire que le manipulateur aie de l'expérience et des réactifs et/ou équipements chers (LINFELD et coll., 1985).

Etant donné que la culture liquide est simple de mettre en œuvre et qu'elle facilite l'échantillonnage et les analyses, elle offre un bon moyen pour apprendre et pour maîtriser les techniques de culture et d'analyse; particulièrement, en ce qui concerne l'analyse des lipases produites. Il faut souligner que c'est la première fois que notre laboratoire aborde cette ligne de recherche et nous ne avons pas avec l'expérience.

Par conséquent, la première étape de notre démarche scientifique concernant la production des lipases a consisté à la mise au point des techniques pour la mesure de l'activité lipolytique. Postérieurement, nous avons appliqué ces connaissances aux cultures d'une souche de référence et à quelques souches appartenant à notre collection afin de caractériser les lipases produites.

Par ailleurs, il faut signaler qu'un des objectifs principaux de notre travail est la recherche des nouvelles enzymes fongiques, potentiellement applicables aux aliments, grâce au statut GRAS que la majorité des Mucorales possèdent (JAEGER et coll. 1994). L'étude de l'effet du pH et de la température sur l'activité des lipases fongiques est une étape importante pour la caractérisation de ces enzymes produites par les nouvelles souches de champignons thermophiles et thermotolérantes. De plus, au cours de cette étude, les conditions standards d'analyse des lipases seront en priorité établies.

## 7.1 Mise en oeuvre des essais lipasiques

### 7.1.1 Méthode du pHstat

La méthode classique pour mesurer les « vraies » lipases est la méthode du pHstat, laquelle grâce à une agitation continue de deux phases lipide-aqueuse forme une émulsion qui offre aux lipases une interface adéquate et favorise la réaction lipolytique (JAEGER, 1994). Les acides gras, de longue chaîne, libérés pendant la réaction d'hydrolyse de triglycérides sont neutralisés avec une solution de soude ajoutée en continu au mélange de la réaction, afin de maintenir le pH de l'émulsion constant. Même si cette méthode consomme beaucoup de temps, elle constitue la première approche de l'analyse de lipases. Notre démarche expérimentale de la mise au point de la méthode du pHstat a été basée sur trois étapes.

- a- Sur l'analyse des lipases commerciales.
- b- Sur l'analyse d'un extrait enzymatique produit par une souches de référence sous conditions de culture connues pour la synthèse de la lipase.
- c- Sur l'analyse de trois extraits enzymatiques produits par des souches sauvages cultivées dans le mêmes conditions de culture que la souche de référence.

D'abord, les activités de deux lipases commerciales, une de *Rhizopus oryzae* et une autre de *Rhizomucor miehei*, ont été analysées par la méthode modifiée du pHstat proposée par FUKUMOTO et coll. (1964). Pour ces analyses un pH de 7 et 8,7 et une température d'incubation de 37 et de 47°C ont été appliqués respectivement pour chaque enzyme. Des réponses linéaires de l'addition de NaOH (0,05M) en fonction du temps (jusqu'à 2 h) ont été trouvées, avec des valeurs d'activité enzymatique similaires aux spécifications indiquées sur le catalogue de ces produits (Annexe 2).

Pour mettre en œuvre l'analyse des lipases sur des cultures fongiques, la méthodologie de la culture liquide de IWAI et TSUJISAKA (1974a) a été reprise, en utilisant leur souche de *Rhizopus oryzae* (*Rh. delemar* ATCC-34612). Le milieu (peptone, 5%; glucose, 2% et sels) et les conditions de culture (incubation à 27°C, 4 jours de culture) proposés par ces auteurs ont été

utilisés et décrits précédemment (§ 3.2.6.2). Ces conditions expérimentales de production et de l'analyse des lipases fongiques nous ont permis de se familiariser avec ces enzymes et de comparer nos résultats avec ceux rapportés par les mêmes auteurs.

Trois souches de *Rh. pusillus* (7a, 8a, 22a) ont été cultivées dans les mêmes conditions décrites par IWAI et TSUJISAKA (1974a et 1974b), sauf que la température d'incubation a été fixée à 47°C. A la fin des cultures, les biomasses ont été filtrées et les liquides de fermentation ont été récupérés. En utilisant la méthode du pHstat, la mesure directe de l'activité lipase sur ces liquides n'a montré aucune réponse, ni à une température d'incubation de 25°C, ni à 47°C. Afin de mettre en évidence la présence des lipases dans les liquides de fermentation, une concentration des protéines par précipitation avec du sulfate d'ammonium (70% de saturation) a été réalisée. Le facteur de concentration a été de 7 fois. Les extraits protéiques ainsi concentrés ont présenté des activités lipolytiques d'environ 2 U/ml. Ce résultat confirme la nécessité d'une concentration enzymatique préalable avant de procéder à l'analyse des lipases par la méthode du pHstat.

### **7.1.2 Adaptation et mise au point de la méthodologie d'analyse des lipases**

Etant donné que la méthode du pHstat est fastidieuse et très longue, l'utilisation d'une autre méthodologie mieux adaptée à nos besoins, a été envisagée dès le départ. On considère également qu'une « véritable » lipase doit être capable d'hydrolyser les triglycérides contenant des acides gras de longue chaîne, disponibles dans une interface adéquate. Pour cette raison, l'obtention d'une émulsion correcte qui proportionne la plus grande surface interfaciale doit être recherchée. Enfin, une technique simple, rapide et précise doit être adoptée pour l'analyse des acides gras libérés pendant la réaction lipolytique.

#### **7.1.2.1 Préparation de l'émulsion**

Pour la préparation de l'émulsion, deux agents émulsifiants, la gomme arabique (GA) et l'alcool polyvinylique (PVA) ont été comparés. Par la suite, la concentration du substrat (huile d'olive) dans l'émulsion a été optimisée.

### Sélection et concentration de l'agent émulsifiant

Des études précédentes, en utilisant la méthode du pHstat dans un système agité en continu, ont montré qu'à une concentration de 1%, la GA et le PVA n'affectent pas l'activité lipasique, par rapport à un témoin sans agent émulsifiant (résultats non montrés).

Par ailleurs, différentes émulsions ont été préparées à l'ultra-turrax à différentes concentrations d'agent émulsifiant (de 0 à 30 g/l) et avec une concentration constante en huile d'olive (1g / 5 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8,5). Avec ces émulsions, les activités de la lipase commerciale de *Rh. miehei* et de la souche 13a (*Rh. microsporus*) ont été évaluées. Les résultats obtenus révèlent que la gomme arabique (GA) et l'alcool polyvinylique (PVA) contenus dans l'émulsion, à la même concentration, offrent essentiellement les mêmes résultats en activité lipolytique. Cependant, l'émulsion préparée avec du PVA semble être plus stable dans le temps. Pour cette raison, le PVA a été retenu comme l'agent émulsifiant. A partir de ces résultats, une concentration de 2,5 g/l de PVA a été définie comme la concentration optimale pour l'obtention de la plus grande activité lipase (Annexe 3).

### Concentration de l'huile d'olive dans l'émulsion

Afin d'optimiser la concentration de l'huile d'olive dans l'émulsion, différentes quantités d'huile (de 0 à 1,5g) ont été émulsionnées à l'ultra-turrax dans 5 ml d'un tampon Tris-HCl 0,1M à pH 8,5 contenant 0.25 % de PVA. L'extrait enzymatique obtenu par précipitation du surnageant avec du sulfate d'ammonium d'une culture en milieu liquide de la souche 8a a été utilisé dans cette étude (§3.7.3.1).

Pour des concentrations en huile d'olive de 0 à 1,5g/5ml de tampon, la courbe rapportée dans la Figure 7.1a présente apparemment une forme parabolique. Cependant, si on observe de plus près cette courbe (Figure 7.1b), on peut constater une forme sigmoïde. En effet, à des concentrations très faibles d'huile (< 2g/l ou < 2mM), la lipase ne montre pas d'activité, étant donné que l'huile est partiellement soluble à ces faibles concentrations et à une température de réaction de 50°C. Cette particularité a été aperçue par SARDA et DESNUELLE (1958) et DESNUELLE (1961). Cependant, quand la limite de saturation du substrat est dépassée, la



lipase est progressivement activée dans la mesure que le substrat forme une émulsion et que l'aire interfaciale est augmentée. L'aire interfaciale optimale est obtenue à partir d'une relation de 0,7 g d'huile d'olive / 5 ml solution aqueuse. Néanmoins, par sécurité, dans nos démarches expérimentales postérieures, une concentration de 1 g d'huile d'olive / 5 ml de tampon a été retenue.

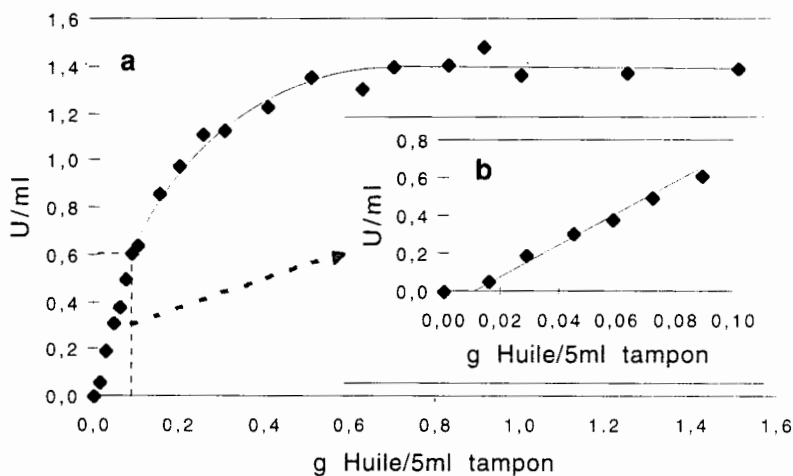


Figure 7.1 Influence de la relation huile d'olive-phase aqueuse sur l'activité lipolytique de la souche 8a. Emulsion préparée avec 0,25% de PVA et tampon Tris-HCl 0,1M (pH 8,5) et incubée pendant 30 min à 50°C. La courbe b représente un agrandissement de l'échelle de la courbe a.

### 7.1.2.2 Analyse des acides gras

En ce qui concerne l'analyse des acides gras libérés par les lipases, la méthode proposée par LOWRY et TINSLEY (1976) et postérieurement modifiée par KWON et RHEE (1986) a été utilisée (§3.7.2). L'élaboration d'une courbe d'étalonnage a présenté un comportement parfaitement linéaire entre 10 et 1110  $\mu$ moles d'acide oléique par 5 ml d'iso-octane (Annexe 3). Cette méthode est rapide, précise, sensible et très facile à réaliser.

Une fois que la méthodologie de l'analyse de l'activité lipase a été modifiée, adaptée et mise au point, la linéarité de plusieurs cinétiques de réactions lipolytiques a été vérifiée. Pour atteindre cet objectif, l'enzyme commerciale de *Rh. miehei* et les extraits enzymatiques concentrés des souches 8a et 13a ont été testés. A 47°C d'incubation et pH 8, la lipase de la souche 8a a montré une linéarité pendant une heure. Par contre, les lipases de 13a et de *Rh. miehei*, ont montré une linéarité jusqu'à 35 et 45 min, respectivement (Annexe 3).

## 7.2 Précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium

La précipitation de protéines par le sulfate d'ammonium représente une étape de concentration et une première étape de purification. Normalement cette purification peut atteindre un facteur de trois. De plus, le facteur de purification peut être plus élevé encore si une précipitation fractionnée est réalisée.

Une précipitation fractionnée avec le sulfate d'ammonium a été appliquée à 100 ml (137 U totales) du filtrat d'une culture de la souche 8a, dans le milieu cité au-dessus, obtenu après 4 jours d'incubation à 47°C. Dans le Tableau 7.1, on observe à chaque étape de précipitation, la présence d'une activité lipolytique. Ces résultats montrent les différences physico-chimiques des fractions lipasiques, en suggérant que l'extrait enzymatique cru, peut contenir plusieurs lipases. L'activité lipolytique plus forte a été mise en évidence pour la fraction récupérée avec le 70% de saturation de sulfate d'ammonium. Par addition des fractions, jusqu'à la fraction obtenue avec 70% de saturation de sulfate d'ammonium, la précipitation de 80% des lipases peut être récupérée.

Tableau 7.1 Précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium de 100 ml d'extrait lipasique de la souche 8a

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% de saturation)	Lipases (U* par fraction)	activité récupérée (%)
30	19,8	14,5
40	14,9	10,9
50	15,3	11,2
60	15,3	11,2
70	43,9	32,2
80	23,0	16,9
90	5,2	3,1
Unidades totales =	137	100

\* 1 U = 1 μmole d'acide gras libéré par min, à une température d'incubation de 47°C et un pH de 9.

### **7.3 Effet du pH et de la température sur l'activité lipases de trois extraits bruts**

En général, les enzymes présentent une augmentation de leur activité au fur et à mesure que la température d'incubation augmente, jusqu'à ce que le phénomène de dénaturation enzymatique ait eu lieu.

Le pH du milieu de réaction est un autre facteur important sur l'activité enzymatique. En effet, il agit sur l'ionisation des groupes donneurs ou accepteurs de protons des acides aminés ionisables qui constituent l'enzyme. Cette ionisation provoque une modification de la structure tertiaire de la protéine et éventuellement, sa dénaturation, en affectant indirectement la disposition du site actif ou bien, le pH peut agir directement sur le site actif, composé fréquemment des acides aminés contenant des groupes ionisables qui doivent être dans une forme ionique appropriée pour maintenir la conformation du site actif, la liaison au substrat ou la catalyse de la réaction (SEGEL, 1976; ZUBAY et coll., 1995).

#### **7.3.1 Extraits enzymatiques des souches 7a et 8a**

##### **7.3.1.1 Effet du pH**

Pour déterminer l'effet du pH sur l'activité lipolytique, différentes valeurs de pH (entre 7 et 10,5) du milieu de réaction enzymatique ont été étudiées. Le filtrat concentré de la souche 8a cultivée en liquide à 47°C d'incubation pendant 4 jours, a été utilisé. La méthode d'analyse des lipases a été le pHstat.

Les résultats sont montrés dans la Figure 7.2. On observe qu'à des valeurs de pH inférieures à 7, l'activité lipolytique mesurée est négligeable. Cependant à des valeurs de pH compris entre 7,5 et 8,5, l'activité de l'enzyme augmente linéairement. Cette augmentation de l'activité pourrait être expliquée d'une part, grâce à une meilleure disposition de la structure de l'enzyme dans l'espace (structure tertiaire), en particulier de son site actif et d'autre part, grâce à sa contribution dans le mécanisme de la réaction.

En effet, à des pH acides, l'attaque nucléophile de la sérine sur la liaison ester du carbone carbonyle du lipide ne serait pas favorisée par l'anneau imidazole de l'histidine qui se trouve à proximité, car l'azote de l'histidine impliqué dans le renforcement de cette attaque nucléophile serait protonné. De plus, la charge positive du même anneau imidazole ne serait pas stabilisée par la charge négative du résidu acide de l'acide aspartique, étant donné que la charge négative de son groupe carboxylique serait aussi occupée par un proton (§2.4.5).

Par ailleurs, pour des valeurs de pH situés entre 9 et 10 du milieu réactionnel, l'activité lipase diminue linéairement. Cette diminution, à des pH alcalins, pourrait être expliquée par la dénaturation de la protéine, par une forme inappropriée du site actif et/ou par l'empêchement de l'attaque nucléophile de la sérine sur la liaison ester du triglycéride. D'ailleurs, à des pH situés entre 10 et 11,5, la lipase présente la même activité, en suggérant, un soutien de l'activité à des pH encore plus alcalins, étant donné que cette activité enzymatique résiduelle est encore importante et représente environ 30% de l'activité optimale.

Pour la souche 8a (*Rh. pusillus*), l'optimum de pH pour l'hydrolyse lipasique est compris entre 8,5 et 9. En revanche, un autre rapport concernant l'extrait enzymatique de la même espèce, a révélé un optimum du pH pour l'hydrolyse lipasique de 6 (OGUNDERO, 1980). Des autres auteurs ont rapporté les optimums de pH pour les lipases d'espèces proches à *Rh. pusillus*, à savoir, pour *Rh. miehei*, un pH de 7 (HUGE-JENSEN et coll., 1988) et de 8 (WU et coll., 1996) et pour *Mucor* sp., un pH de 7 (TATARA et coll., 1985). Les optimums de pH pour les lipases d'autres champignons thermophiles sont également disponibles dans la littérature : *Thermomyces lanuginosus*, pH 8 (ARIMA et coll. 1972) et pH 7 (OMAR et coll. 1987). *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus* et *Humicola grisea*, pH 5,5 (OGUNDERO, 1980).

Cette comparaison implique que les lipases de nos souches isolées appartenant à *Rh. pusillus*, préfèrent les pH plus alcalins que les lipases des souches citées au-dessus. Cette caractéristique revêt une importance capitale dans l'industrie de détergents.

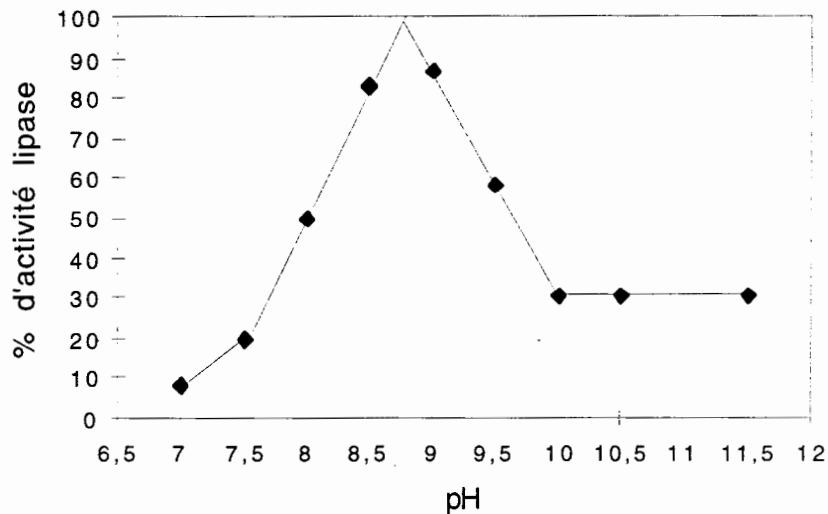


Figure 7.2 Effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité lipolytique de l'extrait enzymatique de la souche 8a, mesurée avec la méthode du pHstat.

### 7.3.1.2 Effet de la température

Pour évaluer l'effet de la température sur l'activité lipase, la méthode du pHstat et les extraits enzymatiques concentrés avec du sulfate d'ammonium (70% de saturation) des souches 7a et 8a ont été utilisés.

La Figure 7.3 montre un comportement similaire de l'activité lipolytique en fonction de la température de réaction entre les souches 7a et 8a. Ces courbes présentent deux étapes, une correspondant à l'activation enzymatique et une autre correspondant au maintien de l'activité lipolytique. Dans la première étape, on observe qu'au fur et à mesure que la température de la réaction augmente de 20 jusqu'à 45°C, l'activité lipase augmente. Dans la deuxième étape, à des températures supérieures à 45°C, les vitesses initiales ne sont pas modifiées; par contre, la stabilité de l'enzyme est fortement affectée par l'augmentation de la température (Annexe 4).

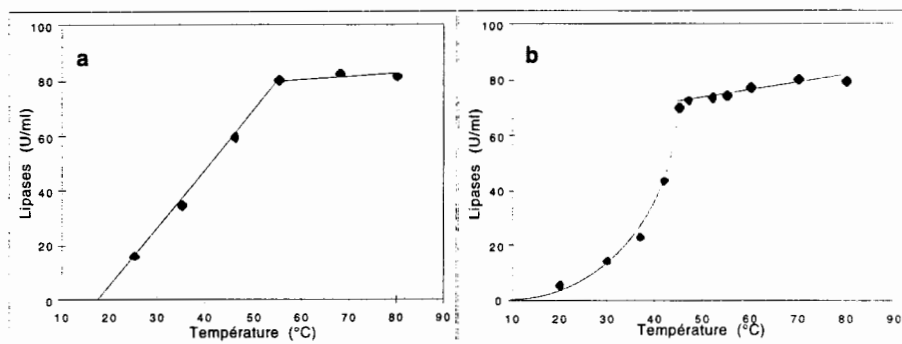


Figure 7.3 Effet de la température sur l'activité lipase. a: souche 7a. b: souche 8a. Filtrats concentrés 10 fois avec 70% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  d'une culture de 4 jours, à 47°C d'incubation, en utilisant le milieu cité dans le texte .

Les observations antérieures peuvent avoir une interprétation au niveau physiologique:

- A des températures inférieures à 20°C, l'activité des lipases est négligeable, ce qui explique la difficulté de ces champignons thermophiles (*Rhizomucor pusillus*) de se développer à des faibles températures (§ 5.2.1).
- A des températures comprises entre 20 et 45°C, l'activité lipase augmente, ce qui peut expliquer la raison pour laquelle, au fur et à mesure que la température d'incubation augmente, les conditions de croissance deviennent de plus en plus favorables, car dans cet intervalle de températures, la croissance augmente linéairement (§5.2.1). La température de 45°C représente d'une part, la température optimale d'incubation pour la croissance de *Rh. pusillus* et d'autre part, la température optimale pour la réaction lipolytique où la vitesse d'hydrolyse et la stabilité enzymatiques sont les plus élevées.
- A des températures supérieures à 45°C, les vitesses initiales de la réaction lipasique ne sont que légèrement affectées. Cependant à ces températures élevées, les enzymes commencent à être dénaturées et la croissance du champignon diminue.

Pour les souches 7a et 8a (*Rh. pusillus*), l'optimum de température pour l'hydrolyse lipasique est compris entre 50 et plus de 80°C. En revanche, un autre rapport concernant l'extrait enzymatique de la même espèce, a révélé un optimum de la température pour l'hydrolyse

lipasique de 45°C (OGUNDERO, 1980). Des autres auteurs ont rapporté les optimums de températures pour les lipases d'espèces proches à *Rh. pusillus*, à savoir, pour *Rh. miehei*, 50°C (WU et coll., 1996) et pour *Mucor* sp., 35°C (TATARA et coll., 1985). Les optimums de température pour les lipases d'autres champignons thermophiles sont également disponibles dans la littérature : *Thermomyces lanuginosus*, 60°C (ARIMA et coll. 1972) et 45°C (OMAR et coll. 1987). *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus* et *Humicola grisea*, 50°C (OGUNDERO, 1980).

Cette comparaison implique que les lipases de nos souches isolées appartenant à *Rh. pusillus*, ont des activités catalytiques à des températures plus élevées que celles rapportées pour d'autres souches de champignons thermophiles. Cette caractéristique revêt une importance capitale pour l'application de cette enzyme dans des procédés biotechnologiques.

#### Calcul des énergies d'activation

Comme dans la section 5.2.5, la relation entre l'énergie d'activation et la température de la réaction peut être représentée par l'équation d'Arrhenius et la même théorie mathématique peut être développée pour expliquer l'influence que la température exerce sur l'activité enzymatique:

$$\ln K = \ln A - E_a/RT$$

Les valeurs des énergies d'activation calculées pour les souches 7a et 8a sont de 12 et 18 Kcal/mole, respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées (12 Kcal/mole) pour la plupart des enzymes (ZUBAY et coll., 1995) et sont comparables à celles rapportées pour la lipase (14,4 Kcal/mole) de *Candida curvata* (MONTET, 1984), pour la xylanase (10 Kcal/mole) de *Thermoanaerobacterium* sp. (SHAO et coll., 1995a) et pour la glucose-isomerase (18 Kcal/mole) (ROELS, 1983a). Cependant, elles sont plus élevées que celles rapportées pour la lipase (3-5 Kcal/mole) de *Rh. arrhizus* (BELL et TODD, 1981), pour la  $\alpha$ -Glucuronidase (6,3 Kcal/mole) de *Thermoanaerobacterium* sp. (SHAO et coll., 1995b) et pour l'estérase (3 Kcal/mole) de *Bacillus circulans* (KADEMI, 1997).

Etant donné que, les vitesses initiales de l'hydrolyse des triglycérides ne sont pas affectées par l'augmentation de la température de la réaction entre 45 et 80°C, il n'est pas

possible de calculer les énergies d'inactivation des lipases pour les souches 7a et 8a. Pour faire cette analyse, des températures d'incubation plus élevées doivent être étudiées. Cependant, avec la méthode du pHstat, il n'est pas recommandé de travailler à des températures qui dépassent la limite d'utilisation de l'électrode de pH. Comme nous n'avons pas résolu ce problème technique, cette analyse n'a pas été faite.

### **7.3.2 Extrait enzymatique brut de la Souche 13a**

Dans cette deuxième partie de l'effet de la température sur l'activité lipase, l'étude de souche 13a a été approfondie. Le filtrat obtenu après quatre jours de fermentation a été concentré 10 fois avec du sulfate d'ammonium (70% de saturation). La méthode d'analyse utilisée a été la méthode spectrophotométrique dont le principe d'analyse est le suivant : le cuivre réagit avec les acides gras libérés par l'hydrolyse enzymatique des triglycérides et forme un complexe de couleur bleu-vert, dont l'intensité est mesurée à 715 nm (KWON et RHEE, 1986). Les émulsions, aux différents pH, ont été préparées en utilisant les tampons (0,1M) MES, TRIS-HCl et CHES. La modification du pH due au changement de la température d'incubation a été calculée et modifiée dans notre traitement des données.

#### **7.3.2.1 Effet combiné du pH et de la température**

La Figure 7.4 montre l'influence combinée du pH et de la température sur les lipases d'un extrait enzymatique de la souche 13a. Une série d'observations peuvent être soulignées:

1. Capacité catalytique: cette lipase présente une grande capacité catalytique dans une ample marge de températures et de pH. En particulier, cette lipase hydrolyse les triglycérides d'une part, à des températures inférieures à 10°C et supérieures à 60°C et d'autre part, à des pH inférieurs à 5 et supérieurs à 10,5.
2. Activités lipasiques maximales: les activités catalytiques maximales (plus de 90% de l'activité maximale) de la lipase de la souche 13a peuvent être obtenues, en incubant l'enzyme à 40°C, entre les pH de 6 et 8. En particulier, l'activité maximale (100%) est atteinte à 40°C pour un pH de 8. D'ailleurs, les températures d'incubation, où les activités lipases sont optimales, changent par rapport au pH du milieu réactionnel, de sorte que, entre les valeurs de pH de 5



et 9, les activités maximales sont obtenues à 40°C; entre les pH de 9,5 et 10,5, les activités maximales sont obtenues à 20°C.

3. Activités à basses températures: Pour notre étude, à la température la plus faible (10°C), cette enzyme présente encore une importante activité lipolytique, particulièrement aux pH les plus élevés (entre 8 et 10,5), où des activités enzymatiques d'environ 40% (par rapport à la valeur maximale) sont possibles d'obtenir. Si le pH du milieu devient de plus en plus acide, l'activité enzymatique tend à diminuer. En effet, à pH 5, l'activité lipase ne représente que 18% de l'activité maximale.
4. Thermorésistance: Une thermorésistance de la lipase de plus en plus prononcée est remarquée, au fur et à mesure que le pH du milieu de réaction diminue entre 7,5 et 5. En effet, à pH de 5 et à une température de 60°C, l'activité lipase peut atteindre jusqu'à 40% de l'activité catalytique maximale, en suggérant une continuation de cette activité à des températures plus élevées encore dans des conditions acides. Ce fait suggère deux alternatives:
  - Que l'extrait enzymatique brut inclut un groupe varié de lipases qui hydrolysent leur substrat dans des conditions différentes de pH et de températures pour chaque lipase.
  - Qu'il s'agit d'une seule lipase, mais que sa nouvelle structure tertiaire acquise à pH 5 favorise la présence de ponts d'hydrogène additionnels, de nouvelles interactions électrostatiques et hydrophobiques et peut être d'une compactation de la protéine qui confèrent à la lipase des nouvelles propriétés de résistance à la température.

D'ailleurs, si le pH du milieu de réaction est augmenté entre 8 et 10,5, la lipase devient de plus en plus sensible à des augmentations de la température. En effet, à pH 10,5, les températures qui permettent l'activité catalytique maximale sont de 10°C et 20°C.

En règle générale, on a observé que pour des températures élevées d'incubation (50 et 60°C) de l'extrait enzymatique concentré de la souche 13a, en contact avec une émulsion contenant l'huile d'olive, les meilleures activités lipases ont été obtenues à des pH acides (inférieurs à 7). Inversement, pour des basses températures d'incubation (10 et 20°C), les meilleures activités lipases ont été obtenues à des pH alcalins (supérieurs à 7).

L'ensemble des observations collectées, tels que l'ample capacité catalytique de pH et de température, signalent qu'effectivement, un groupe de lipases composent l'extrait lipasique brut.

Ce groupe pourrait contenir au moins trois lipases différentes qui catalysent les réactions de lipolyse. La première qui agit à des pH acides et à des températures élevées, la seconde qui agit à des pH élevés et à des basses températures et la troisième qui agit à des températures moyennes (entre 35 et 45°C) et à des pH légèrement alcalins (entre 7 et 8).

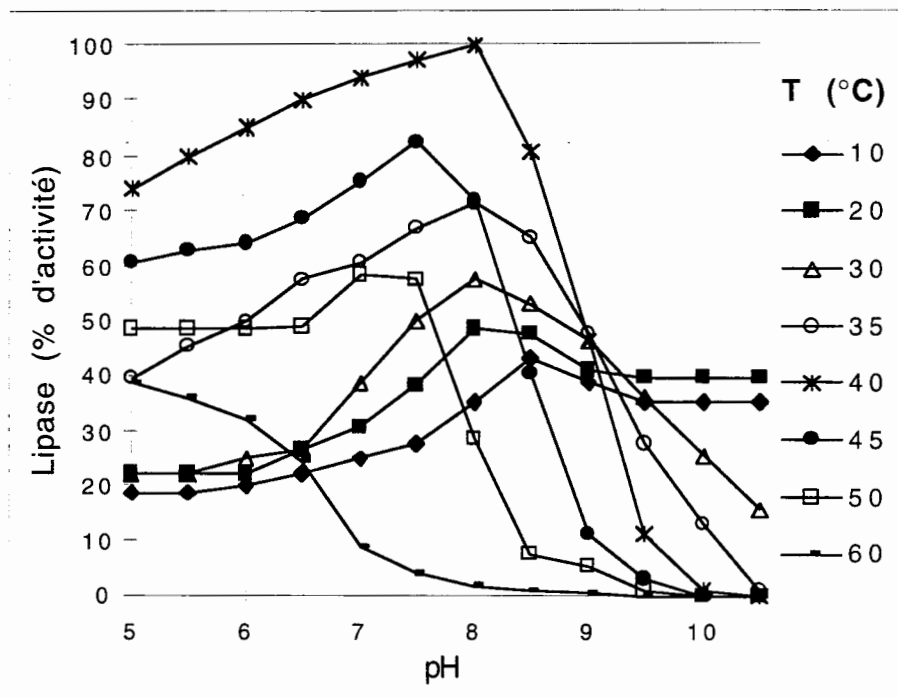


Figure 7.4 Effet combiné du pH et de la température du milieu réactionnel sur l'activité lipolytique de l'extrait enzymatique de la souche 13a, obtenu par filtration et concentration d'une culture de 4 jours, à 47°C.

Les réactions enzymatiques à des basses températures pourraient expliquer la faculté de la souche 13a de *R. microsporus* à se développer à des températures faibles d'incubation. De plus, on constate que la température optimale des activités lipases à des pH compris entre 5 et 8,5, coïncide avec la température optimale de croissance de cette souche (40°C). Egalement, les activités lipasiques, à une température de 60°C et à des pH près de la neutralité, sont aussi

négligeables comme la vitesse de croissance de la souche 13a incubée à la même température (§5.2.2).

D'autres rapports concernant l'extrait enzymatique d'espèces proches à *Rh. microsporus* ont révélé un optimum de pH et de température de 5,6 et de 30-35°C respectivement, pour *Rhizopus oryzae* (IWAI et TSUJISAKA, 1974b), de 4 et 8 et de 50°C, pour *Rhizopus* sp. (UPADHYAY et coll. 1989).

#### A - Energies d'activation

Les valeurs des énergies d'activation calculées pour la souche 13a varient par rapport au pH utilisé pendant l'incubation du mélange réactionnel. Les énergies d'activation sont calculées à partir de la Figure 7.5. Dans cette figure, il peut être apprécié que, dans le cas des pH 5, 5.5, 6 et 6.5, deux pentes sont présentées pendant la première étape d'activation lipolytique par la température; par conséquent, deux énergies d'activation ont été calculées et rapportées dans le Tableau 7.2. La première de ces pentes est très faible et indique une légère influence de la température pour accélérer la réaction (1,6 Kcal/mole en moyenne). Par contre, la deuxième pente est très prononcée et indique le rôle important de la température sur l'accélération de la réaction. Probablement, la première vitesse est le produit de la réaction catalysée par une lipase et la deuxième vitesse correspond au produit d'hydrolyse d'une autre lipase.

D'ailleurs, au fur et à mesure que le pH de la réaction augmente (de 7 à 10,5), l'énergie d'activation diminue ce qui suggère qu'aux pH alcalins, l'activité devient peu sensible à l'augmentation de la température. A ces pH alcalins, les énergies d'activation (2-5 Kcal/mole) sont comparables à celles rapportées pour la lipase de *Rh. arrhizus* (3-5 Kcal/mole) (BELL et TODD, 1981), et pour l'estérase de *Bacillus circulans* (3 Kcal/mole) (KADEMI, 1997).

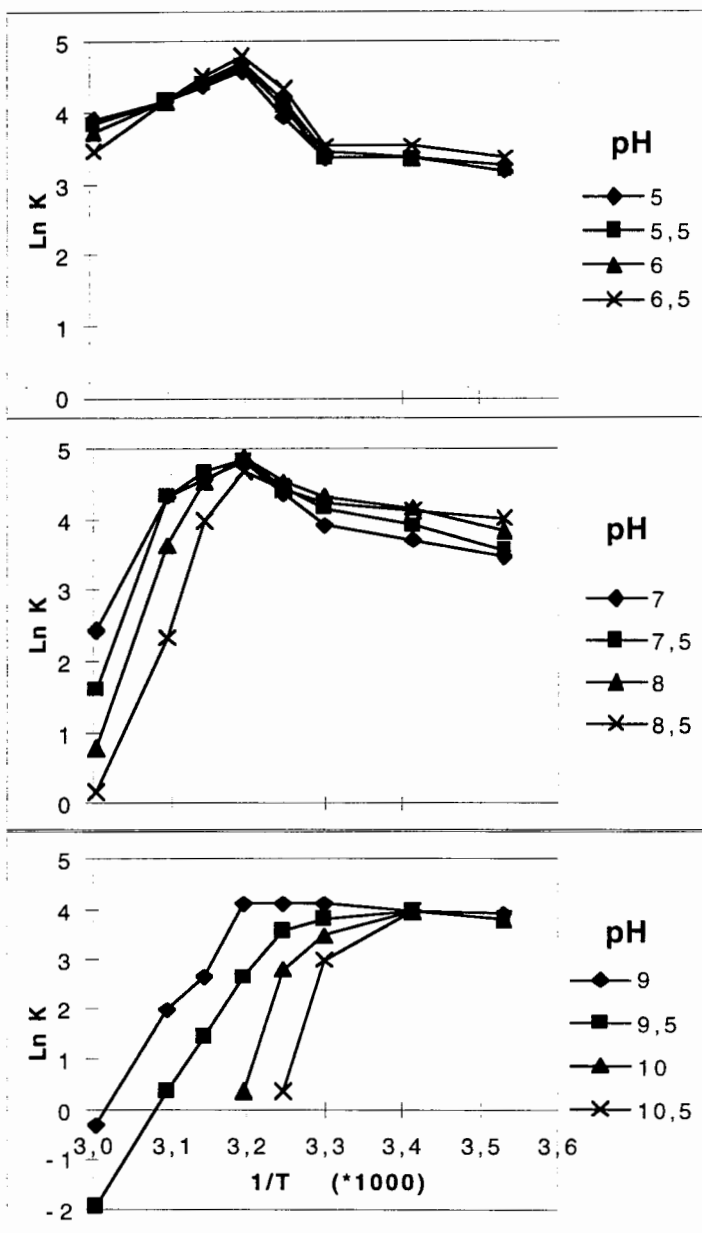


Figure 7.5 Logarithme naturel de la vitesse d'hydrolyse des triglycérides en fonction de l'inverse de la température ( $\text{K}^{-1}$ ). Ces graphiques ont été utilisés pour effectuer les calculs des énergies d'activation et d'inactivation.

Si on compare l'énergie d'activation à pH 8 (3,7 Kcal/mole) qui représente l'optimum de l'activité lipasique, avec l'énergie calculée pour les souches 7a et 8a (12 et 18 Kcal/mole), on peut constater que la réaction catalysée par l'extrait lipasique de la souche (thermotolérante) 13a, est beaucoup moins influencée par la température d'incubation que celle des souches thermophiles. Cet aspect suggère qu'aux faibles températures (de 10 à 30°C) les réactions lipolytiques de la souche 13a sont faiblement régulées par la température. Cette faible influence de la température sur l'accélération de la réaction lipolytique apporte des nouveaux éléments qui permettent d'expliquer la raison pour laquelle cette souche de *Rh. microsporus* est capable de se développer dans un large spectre de températures. Il paraît que ces réactions enzymatiques ont besoin de moins d'énergie pour s'accomplir.

Tableau 7.2 Energies d'activation calculées pour les différents pH d'incubation de l'extrait lipasique brut de la souche 13a.

pH	Energie d'activation	
	Kcal/mole (1)	Kcal/mole (2)
5	1,4	22,8
5,5	1,4	24,2
6	1,9	23,2
6,5	1,6	23,1
7	4,7	
7,5	4,9	
8	3,7	
8,5	2,2	
9	1,6	
9,5	1,9	
10	1,9	
10,5	1,9	

(1) : Première pente de la Figure 7.5.

(2) : Deuxième pente de la Figure 7.5.

### B - Désactivation enzymatique

A partir de la Figure 7.5, les énergies d'inactivation ont été calculées (partie gauche de la figure) et sont présentées dans le Tableau 7.3. Les valeurs des énergies d'inactivation deviennent de plus en plus grandes, au fur et à mesure que le pH du milieu de réaction augmente. Ce qui signifie qu'à des pH acides, l'effet de la température est moins déterminante,

pour la dénaturation des lipases qu'à des pH alcalins. Néanmoins, une moyenne de 47 Kcal/mole est observée aux alentours des pH alcalins (compris entre 7 et 9,5). Cette valeur est comparable à celle obtenue par SIZER (1944, en AIBA et coll., 1973) pour la catalase du foie de bœuf (51 Kcal/mole) et elle est plus élevée que la  $E_i$  (22 Kcal/mole) de la lipase de *Candida curvata* (MONTET et coll., 1985) et que la  $E_i$  (11,8 Kcal/mole) de la lipase d'*Aspergillus niger* (GARCIA et coll., 1991).

Tableau 7.3 Energies d'inactivation de l'extrait lipasique brut de la souche 13a à des différents pH du tampon.

pH	Energie d'inactivation (Kcal/mole)
5,0	6,8
5,5	8,3
6,0	10,1
6,5	13,7
7,0	40,4
7,5	44,9
8,0	54,0
8,5	48,5
9,0	44,8
9,5	47,6
10,0	93,7
10,5	98,0

#### 7.4 Spécificité de lipases des souches thermophiles et thermotolérantes

Toutes les souches de notre collection ont été cultivées en milieu liquide pendant 5 jours 47°C (§3.2.6.3). A la fin des cultures liquides, les protéines du surnageant, ont été précipitées au sulfate d'ammonium. L'extrait enzymatique obtenu a été ajouté à une émulsion (§3.7.2.1) et ce mélange a été incubé à 47°C (pH 8,5) pendant une heure. Les échantillons contenant les produits de l'hydrolyse des triglycérides ont été extraits avec un solvant organique et placés sur des plaques de chromatographie en couche mince (CCM) selon la technique (§3.8.1) proposée par MONTET (1984).

Les résultats montrent que les lipases produites par les souches thermophiles et thermotolérantes ne présentent pas de spécificité d'hydrolyse au niveau de la position de la

liaison acyl-ester C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> du triglycéride, tout au moins, en ce qui concerne la structure glycéridique de l'huile d'olive (Photo 8). Ou bien, ces lipases hydrolysent uniquement les liaisons esters primaires (atomes C1 et C3 du glycérol). Cependant, la molécule se réarrange instantanément pour donner une structure plus stable thermodynamiquement, le 1,3-diglycéride. Cette « non spécificité » des lipases trouvée pour l'ensemble de nos souches est commune aux lipases des champignons tels que, *Rhizopus oryzae* (BENZONANA et ESPOSITO, 1971), *Candida curvata* (MONTET, 1984), *Rhizomucor miehei* (SONNET, 1988) et *trichosporon fermentans* (CHEN et coll, 1994). Il faut également souligner que la spécificité des lipases a été mesurée dans le cas des extraits bruts. Ce fait implique que s'il s'agit d'un groupe de lipases présentant différentes spécificités et l'ensemble pourrait donner des résultats erronés qui cacheraient la participation individuelle de chacune des lipases. En conclusion, pour mesurer avec exactitude la spécificité d'une lipase, il est indispensable de disposer d'un extrait enzymatique préalablement purifié.

Nous avons constaté que l'extrait enzymatique de la souche 13a, incubée à des températures différentes et à un pH constant (pH 8) dans le milieu de réaction, n'hydrolyse pas spécifiquement les liaisons esters de l'huile d'olive à des températures comprises entre 10 et 40°C. Par contre, quand la température d'incubation est augmentée à 60°C, on remarque une spécificité d'hydrolyse vers la position de la liaison ester C2 du triglycéride.

En effet, dans la Photo 9, on distingue les différents échantillons appliqués en double sur les plaques de chromatographie en couche mince (CCM). Le premier échantillon correspond au témoin (huile d'olive sans hydrolyser) et le reste des échantillons correspondent aux produits de l'hydrolyse catalysée par la lipase aux différentes températures, dont le premier pair correspond à l'incubation à pH 10 et 60°C, le deuxième à pH 8 et 10°C, le troisième à pH 8 et 20°C et ainsi successivement pour les températures 30, 40, 50 et 60°C. Dans une bande (d'en bas à haut), on distingue 6 taches correspondant à : (a) l'application de l'échantillon, (b) les diglycérides 1-2 et 2-3 (sous ces conditions d'analyse, il ne sont pas séparées), (c) les diglycérides 1,3, (d) une tache d'un composé inconnu contenu dans l'huile d'olive, (e) les acides gras libres (acide oléique) et (f) l'huile d'olive non hydrolysé.

On peut apprécier que pour les températures de 10, 20, 30, et 40°C, les tâches correspondantes aux diglycérides 1-2 et 2-3 (tâche 2) sont plus obscures que celles des diglycérides 1-3 en suggérant que le triglycéride est hydrolysé deux fois plus dans les positions 1-2 et 2-3 que dans la position 1-3. Ce qui impliquerait que la lipase n'hydrolyse pas de manière spécifique les liaisons esters du triglycéride. En revanche, quand l'extrait lipasique est incubé à 60°C, on observe une intensité plus prononcée des tâches correspondantes aux diglycérides 1-3 (tâche 3). Cette caractéristique peut être constatée dans les échantillons appliqués provenant de l'incubation à 60°C et pH 8, mais également, à 60°C et pH 10 (Photo 9). Ces évidences suggèrent une spécificité de la lipase pour l'hydrolyse de la liaison ester C2. Cette spécificité d'hydrolyse n'a jamais été rapportée et nous recommandons d'approfondir les recherches sur ce sujet.

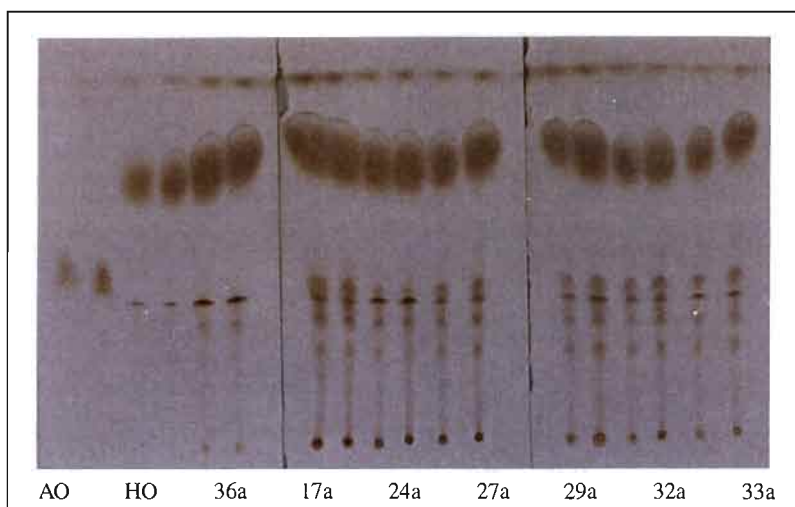


Photo 8 Produits de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive catalysée (à 47°C et pH 8,5) par les lipase des souches 36a, 17a, 24a, 27a, 29a, 32a et 33a et analysés par CCM. Chaque échantillon a été appliqué en double. Les deux premiers échantillons correspondent à l'acide oléique (AO), les deux suivants au témoin (huile d'olive sans hydrolyser = HO). Pour l'interprétation des tâches, voir les commentaires de la photo 9.



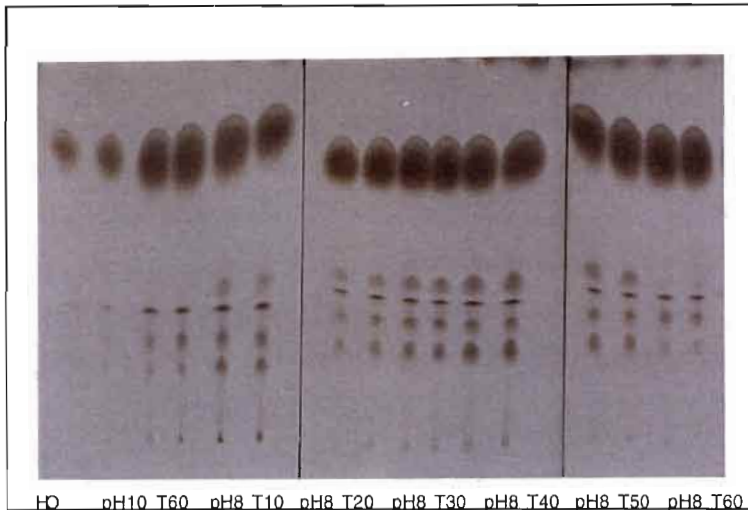


Photo 9 Produits de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive catalysée par la lipase de la souche 13a à des différentes températures d'incubation analysée par CCM. De gauche à droite, les deux premiers échantillons correspondent au témoin (huile d'olive sans hydrolyser), les deux suivants à l'incubation à pH 10 et 60°C, les deux suivants à pH 8 et 10°C et ainsi successivement pour les températures 20, 30, 40, 50 et 60°C, avec un pH constant de 8. Dans une bande (d'en bas à haut), on distingue 6 taches: (1) l'application de l'échantillon, (2) les diglycérides 1-2 et 2-3, (3) les diglycérides 1-3, (4) composé inconnu contenu dans l'huile d'olive, (5) l'acide oléique et (6) l'huile d'olive non hydrolysé.

## 7.5 Conclusion

Afin de caractériser l'activité des lipases obtenues à partir des extraits bruts de cultures des champignons thermophiles et thermotolérants, deux méthodes ont été testées. La méthode du pHstat et une méthode spectrophotométrique qui mesure la coloration du complexe cuivre-acide gras. La méthode du pHstat a donné d'excellents résultats, mais la durée de l'analyse a été considérablement longue. De ce fait, la méthode colorimétrique a été adaptée aux conditions d'analyse des lipases de nos souches de champignons, en utilisant des temps d'analyse plus courts. En effet, les concentrations de l'agent émulsifiant et de l'huile d'olive dans l'émulsion ont été optimisées. Une émulsion adéquate pour l'analyse des lipases a été préparée avec 0,25% de Polyvinylalcool et avec une proportion de 1 g d'huile d'olive pour 5 ml de solution aqueuse.

Vu les faibles concentrations des lipases dans les cultures liquides, pour leur mise en évidence, une précipitation des protéines du surnageant a été nécessaire. La précipitation avec 70% de sulfate d'ammonium a été retenue pour la suite des expériences.

A une température d'incubation constante de 47°C, l'extrait enzymatique de la souche 8a (*Rh. pusillus*) a présenté un pH optimum de l'activité lipase situé entre 8,5 et 9. A des pH inférieurs à 7, cette activité a été négligeable. A des pH compris entre 10 et 11,5, la lipase a présenté la même activité (30% de l'activité maximale), en suggérant que cette activité est conservée à des pH encore plus alcalins.

A un pH de 9, maintenu constant dans le milieu de réaction, les extraits enzymatiques des souches 7a et 8a (*Rh. pusillus*) ont présenté les caractéristiques suivantes : A des températures de réaction inférieures à 20°C, les activités lipases ont été négligeables ; à des températures comprises entre 20 et 45°C, ses activités ont augmenté linéairement ; à des températures comprises entre 45 et 80°C, les vitesses initiales n'ont pas été modifiées. Cependant, au fur et à mesure que la température de la réaction a été augmentée, la stabilité de ces enzymes a été affectée.

L'extrait enzymatique de *Rh. microsporus* (souche 13a) a montré une grande capacité catalytique, d'une part à des températures inférieures à 10°C et supérieures à 60°C, et d'autre part à des pH inférieurs à 5 et supérieurs à 10,5.

Entre les pH 5 et 9, les activités lipasiques de la souche 13a sont maximales à 40°C. Entre les pH 9,5 et 10,5, les activités maximales sont obtenues à 20°C. Spécifiquement, l'optimum de l'hydrolyse des triglycérides pour la souche 13a a été situé à pH 8 et à 40°C.

A 10°C, l'extrait enzymatique de la souche 13a a présenté une importante activité lipasique, particulièrement, à des pH compris entre 8 et 10,5 (40% de l'activité maximale). D'ailleurs, entre les pH de 7,5 et 5, une thermorésistance de la lipase de la souche 13a, de plus en plus prononcée, a été remarquée. A une température de 60°C et à un pH de 5, l'activité lipasique a pu atteindre jusqu'à 40% de l'activité catalytique maximale. Par contre, quand le pH du milieu de réaction a été augmenté de pH 8 à pH 10,5, cette lipase est devenue de plus en plus sensible à la température. En effet, pour un pH de 10,5, les températures d'incubation qui ont permis d'atteindre les meilleures activités catalytiques ont été de 10°C et 20°C.

Les valeurs des énergies d'activation calculées pour les extraits lipasiques bruts des souches 7a et 8a (à pH 8,7) ont été de 12 et 18 Kcal/mole, respectivement. Egalement, celle de l'extrait de la souche 13a (à pH 8) a été de 3,7 Kcal/mole. De plus, pour l'extrait enzymatique de la souche 13a, la valeur de l'énergie d'inactivation calculée (à pH 8) a été de 54 Kcal/mole.

Les extraits enzymatiques bruts de la totalité des souches n'ont présenté aucune spécificité d'hydrolyse au niveau de la position C1, C2 et C3 de la liaison acyl-ester des structures glycéridiques de l'huile d'olive. Cependant, quand l'extrait enzymatique de la souche 13a a été incubée à 60°C, une spécificité pour l'hydrolyse de la liaison ester C2 du triglycéride a été constatée.

**PRODUCTION DE LIPASES EN  
CULTURE LIQUIDE**

## 8. PRODUCTION DE LIPASES EN CULTURE LIQUIDE

Bien que les études sur les lipases aient commencé il y a environ 150 ans, le premier rapport sur la production de lipases par un champignon thermophile (*Humicola lanuginosa*) a été publié en 1972 (ARIMA et coll., 1972). A l'heure actuelle, les travaux publiés concernant ce sujet ne sont pas nombreux (§2.4.8).

Dans le chapitre précédent, la technique de détection d'estérases produites par les champignons thermophiles et thermotolérants cultivés en milieu gélosé a montré que toutes les souches testées produisent ces enzymes. Cependant, cette technique ne nous a pas permis de sélectionner une ou plusieurs souches dont la production des estérases soit importante, car cette technique n'offre pas de résultats d'ordre quantitatif. L'objectif de ce chapitre consiste à étudier la synthèse de lipases des souches et à sélectionner la plus performante pour la production de lipases en milieu liquide.

### 8.1 Cinétiques de la production de lipases des souches 8a et Rp183.67

Afin de fixer la durée d'incubation des cultures fongiques pour la production optimale de lipases et d'essayer de corréler l'évolution de cette production avec l'évolution d'autres paramètres de la culture liquide (croissance, production de protéines, consommation du glucose et pH), les cinétiques des souches 8a et Rp183.67 (*Rh. pusillus*) ont été réalisées. Les mêmes conditions de culture que celles de IWAI et TSUJISAKA (1974a et 1974b) ont été utilisées (§3.4.1), à l'exception de la température d'incubation, qui a été fixée à 47°C. Cette température a été choisie, en considérant que la production de lipases chez les champignons thermophiles a été antérieurement mentionnée entre 45°C et 50°C, en particulier pour les champignons tels que : *Humicola lanuginosa* (ARIMA et coll., 1972 ; LIU et coll. 1972), *Rh. pusillus*, *Humicola grisea*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus* (OGUNDERO, 1980) et *Rh. miehei* (DEPLOEY et coll. 1981). De plus, dans la section 5.2, la croissance optimale de la majorité des souches de notre collection a été rapportée aux alentours de 47°C.

### 8.1.1 Cinétiques de *Rhizomucor pusillus* (souche 8a)

Pour la souche 8a (*Rh. pusillus*), la production maximale des lipases dans le milieu liquide, est atteinte au bout de 5 jours de culture. Apparemment, la synthèse de la lipase est initiée après trois jours de culture et l'activité de cette enzyme disparaît après six jours de culture (Figure 8.1e). Cette disparition de l'activité lipasique semble être provoquée par la présence des protéases ou bien, par la faible stabilité des lipases à une température d'incubation élevée.

D'ailleurs, la synthèse de la lipase en culture liquide est liée à l'évolution des quatre paramètres suivants : la consommation du glucose, l'augmentation de la biomasse, la production des protéines et le pH.

On peut constater dans la Figure 8.1a que la synthèse de l'enzyme est initiée quand la biomasse a bien atteint la phase de sénescence (Figure 8.1a). Ce fait suggère, qu'en absence d'un inducteur dans le milieu de culture (§3.2.6.2), l'hydrolyse des lipides de réserve intracellulaires est achevée par la biosynthèse de lipases, ce qui permet au champignon de préserver sa viabilité. Plus tard, la lyse mycélienne permet possiblement, la libération de l'enzyme dans le milieu de culture. D'ailleurs, les observations concernant la biosynthèse des lipases dans la phase stationnaire ont été constatées par FUKUMOTO et coll. (1964). De plus, dans le cas des champignons, jusqu'à 87 % des lipides intracellulaires contenues dans des vésicules ont été rapportés (GRIFFIN, 1994).

D'autre part, la synthèse de lipases dans le surnageant des cultures de la souche 8a commence une fois que tout le glucose du milieu de culture a été épuisé. Ce qui suggère que cette synthèse est réprimée par la présence du glucose dans un milieu liquide. Des évidences qui illustrent ce phénomène ont été rapportées par des champignons tels que : *Mucor javanicus* (SAIKI et coll., 1968), *Rhizopus chinensis* (NAKASHIMA et coll., 1988), *Rh. miehei* (MAREK et BEDNARSKI, 1996) et *A. niger* (MACRIS et coll., 1996).

Par ailleurs, il semble y avoir une relation entre la synthèse de l'enzyme et le pH du milieu de culture. En effet, on remarque qu'au début de la culture, le pH est proche de la neutralité ; cependant, au fur et à mesure que le glucose est consommé, le pH diminue pendant les premières 50h de culture. Ce phénomène est probablement dû à la synthèse des acides organiques qui ont été détectés par HPLC (résultats non montrés). Postérieurement, à partir des

75h de culture, le pH augmente et la synthèse de la lipase démarre (Figure 8.1c). Etant donné que le glucose est épuisé, cette étape d'augmentation du pH semble être la conséquence d'une consommation des acides aminés initialement présents dans le milieu de culture (§3.2.6.2).

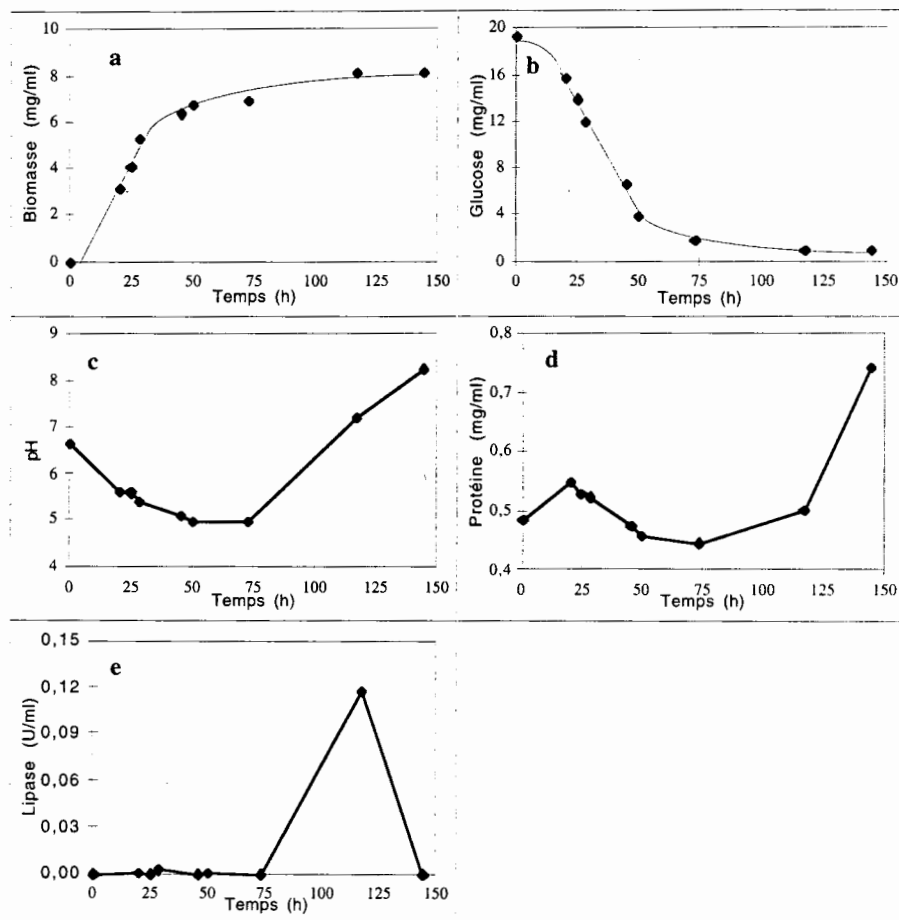


Figure 8.1 Culture de la souche 8a (*Rh. pusillus*) en milieu liquide à 47°C. Cinétiques de la croissance (a), de la consommation du glucose (b), du pH (c) et de la biosynthèse de protéines (d) et de lipases (e).

Finalement, l'évolution de la concentration des protéines dans le milieu de culture semble aussi être un indicateur de l'apparition de l'activité lipasique. En effet, comme il est observé

dans la Figure 8.1d, au moment que la lipase est libérée (75h), la concentration de protéines atteint sa valeur la plus faible et à partir de ce moment là, cette concentration présente une légère augmentation. Plus tard, même si l'activité lipasique a disparu, la concentration des protéines augmente rapidement. Ce fait peut être dû à la biosynthèse d'autres enzymes, comme les protéases, ce qui pourrait expliquer la disparition des lipases, ou bien à une lyse du mycélium.

### 8.1.2 Cinétiques de *Rhizomucor pusillus* (souche Rp183.67)

La Figure 8.2 montre les cinétiques de la culture de Rp183.67 (*Rh. pusillus*), souche de la collection CBS, Baarn, Hollande. On observe que l'activité lipasique maximale a été obtenue après cinq jours de culture. Cette activité maximale est accompagnée d'un épuisement du glucose et d'une production maximale de protéines. De plus, on remarque que la production des lipases est trois fois supérieure à celle obtenue pour la souche 8a.

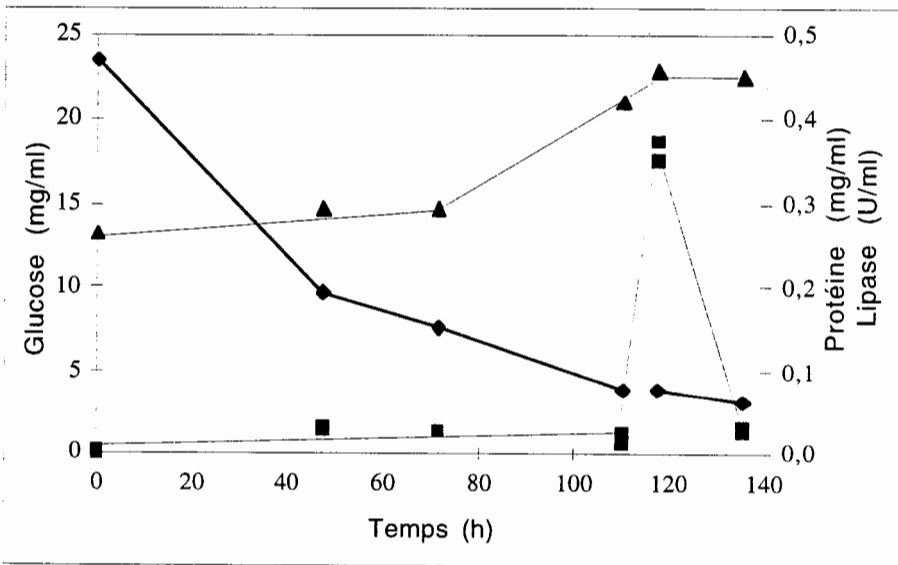


Figure 8.2 Culture de la souche Rp183.67 (*Rh. pusillus*) en milieu liquide à 47°C. Cinétiques de la consommation du glucose (◆) et de la biosynthèse de protéines (▲) et de lipases (■).



En considérant les informations obtenues à partir des deux cinétiques antérieures et comme une première approche de la production globale des lipases par la totalité des souches, un temps d'incubation fixe de cinq jours a été choisi, sous les mêmes conditions de culture. Cette décision a été renforcée par quelques études précédentes en utilisant des champignons pour la production de lipases. Des temps de production compris entre 5 et 6 jours de culture ont été obtenus pour *Humicola lanuginosa* (LIU et coll. 1972, FRICH et coll., 1994), *Rh. pusillus* (OGUNDERO, 1980), *P. roqueforti* (PETROVIC et coll., 1989), *Rhodoturula glutinis* (PAPAPARASKEVAS et coll., 1992), *P. citrinum* (PIMENTEL et coll., 1994), *Rhizopus oryzae* (BEN SALAH et coll., 1994), *A. niger* (MACRIS et coll., 1996) et *A. flavus* (LONG et coll., 1996).

## 8.2 Productions globales des lipases pour la totalité des souches

Après cinq jours d'incubation à 47°C de l'ensemble des souches de notre collection, l'activité lipasique intracellulaire et extracellulaire, la concentration résiduelle du glucose, la concentration en protéines et le pH des cultures ont été analysés. Les activités lipases ont été mesurées, d'une part, dans les extraits enzymatiques obtenus après la filtration et la concentration (par précipitation avec du sulfate d'ammonium) des cultures et d'autre part, dans les extraits enzymatiques obtenus de la rupture de la biomasse récupérée par filtration (§3.7.3.2). Dans ce dernier cas, l'activité lipase a été mesurée directement sans la concentrer, et même, pour la biomasse de certaines souches, une dilution a été nécessaire avant d'analyser cette activité.

Dans le Tableau 8.1, on observe que chaque souche produit des lipases à des concentrations différentes. De plus, le rapport lipases intracellulaires / lipases extracellulaires change d'une souche à l'autre. On remarque que la majorité des souches produit ses lipases de manière intracellulaire. Ce fait est probablement dû à l'absence d'un inducteur de la synthèse des lipases dans le milieu de culture (§3.2.6.2). Ces lipases sont probablement produites afin d'hydrolyser les lipides intracellulaires accumulés comme source de réserve du champignon.

En général, en absence d'inducteur de lipases dans le milieu de culture, les souches de *Rh. pusillus* produisent de quantités très faibles de lipases intra- et extracellulaires (aux alentours de 4,4 U/Erlenmeyer). Les souches 32a et 34a de *Rh. pusillus* produisent les activités lipasiques totales les plus élevées (14 U/Erlenmeyer). On remarque que la souche 13a (*Rh. microsporus*) produit la concentration totale en lipases (extra et intracellulaires) la plus importante (198,5 U/Erlenmeyer), dont la production des lipases intracellulaires est très élevée (92%).

Tableau 8.1 Production des lipases (intracellulaires et extracellulaires) par l'ensemble de souches cultivées dans un milieu liquide (§3.2.6.2) pendant cinq jours à 47°C.

<i>Rh. pusillus</i> Souches	Activités lipasiques			
	Extracellulaire U/Erlenmeyer*	Intracellulaire U/Erlenmeyer*	Extracellulaire %	Intracellulaire %
2a	0,81	0,17	83	17
4a	1,04	0,33	76	24
5a	0,74	0,11	87	13
6a	0,62	0,21	75	25
7a	0,50	0,35	59	41
8a	1,35	0,08	94	6
10a	1,06	0,57	65	35
12a	2,38	0,35	87	13
16a	2,18	2,47	47	53
17a	1,40	5,24	21	79
19a	0,98	5,10	16	84
22a	1,27	3,35	28	72
24a	0,23	1,31	15	85
29a	1,69	5,97	22	78
32a	1,97	10,05	16	84
33a	2,71	4,08	40	60
33b	1,17	2,33	34	66
34a	3,67	11,66	24	76
35a	1,27	3,49	27	73
<b><i>Rh. microsporus</i></b>				
10b	0,02	0,01	67	33
11a	0,83	1,46	36	64
13a	31,5	365,5	8	92
27a	0,90	0,51	64	36
28a	0,00	0,00	-	-
36a	0,12	0,14	45	55

\* Chaque Erlenmeyer contient 70 ml de milieu de culture.

En ce qui concerne le pH, les concentrations du glucose et des protéines, à la fin de la culture, on constate que (Tableau 8.2) :

- Le glucose consommé représente 98% de la concentration du départ (20 g/l).
- Le pH augmente et passe de 6,3 au début de la culture à 7,4 à la fin de la culture.
- Les protéines ne montrent pas de variations significatives du départ jusqu'à la fin de la culture.
- La biomasse sèche produite par l'espèce *Rh. pusillus* est deux fois plus élevée (6,6 g/l) que celle produite par l'espèce *Rh. microsporus* (3 g/l).

Tableau 8.2 Concentrations du glucose, des protéines et valeurs du pH après 5 jours de culture en milieu liquide de l'ensemble de souches.

<i>Rh. pusillus</i> Souches	pH	Glucose (g/l)	Protéine (g/l)	Biomasse (g/l)
2a	8,65	0,44	0,38	7,04
4a	8,03	0,44	0,49	6,59
5a	8,03	0,43	0,44	6,45
6a	7,80	0,40	0,27	7,10
7a	7,88	0,39	0,26	7,28
8a	8,38	0,47	0,28	6,79
10a	8,35	0,46	0,53	6,12
12a	8,33	0,49	0,31	5,86
16a	6,26	0,16	0,29	6,73
17a	7,23	0,35	0,35	5,04
19a	7,41	0,46	0,30	6,61
22a	7,38	0,54	0,40	6,48
24a	6,44	0,53	0,36	6,93
29a	7,40	0,48	0,38	6,66
32a	6,94	0,56	0,34	6,10
33a	7,25	0,55	0,39	6,30
33b	7,37	0,47	0,61	6,61
34a	7,47	0,40	0,60	7,44
35a	7,06	0,49	0,40	6,95
<i>Rh. microsporus</i> Souches	pH	Glucose (g/l)	Protéine (g/l)	Biomasse (g/l)
10b	8,22	0,41	0,57	2,84
11a	8,23	0,35	0,37	2,23
13a	7,19	0,15	0,32	4,23
27a	6,94	0,12	0,23	3,15
28a	6,98	0,20	0,43	2,90
36a	6,29	0,17	0,38	2,42

Il est important de souligner qu'à la fin des fermentations, une forte odeur d'alcool a été remarquée. Par la suite, la présence d'éthanol a été vérifiée par HPLC. Ceci indique que la culture a été orientée vers une fermentation alcoolique, probablement à cause de la faible concentration d'oxygène dans le milieu de culture, phénomène probablement provoqué par la faible solubilité de l'oxygène dans les milieux liquides chauds et insuffisamment agités.

### 8.3 Effet de la taille de l'inoculum sur la production de lipases

Le but de cette expérience est de connaître l'influence de la taille de l'inoculum sur la production de lipases des champignons, étant donné que des concentrations de  $5 \times 10^5$  spores/ml et  $5 \times 10^6$  spores par ml de milieu de culture ont été inoculées en milieu liquide et solide, respectivement. La raison de cette augmentation de l'inoculum sera discutée dans le prochain chapitre.

Pour cette expérience, l'effet de deux concentrations de spores ( $5 \times 10^5$  spores/ml et  $5 \times 10^6$  spores/ml) sur la production de lipases des souches 13a et 16a a été étudié.

#### 8.3.1 *Rhizopus microsporus* (Souche 13a)

En ce qui concerne la culture liquide de la souche 13a (*Rh. microsporus*), dans la Figure 8.3, on remarque une activité métabolique plus rapide que celle des souche 8a et Rp183,67 (*Rh. pusillus*). En effet, une consommation du glucose avant 25h de culture et une biosynthèse maximale de protéines à 50h de culture ont été observées pour les deux inoculums ( $5 \times 10^5$  spores/ml et  $5 \times 10^6$  spores/ml).

De plus, les valeurs des productions maximales de lipases atteintes pour les deux concentrations de spores sont à peu près les mêmes (0,5 U/ml), sauf que cette production est plus rapide quand une concentration de  $5 \times 10^6$  spores/ml est utilisée. En effet, la production maximale de lipases avec une concentration de  $5 \times 10^5$  spores/ml est atteinte au bout de deux jours de culture ; par contre, avec une concentration de  $5 \times 10^6$  spores/ml, cette production est atteinte après seulement un jour de culture (Figure 8.3b).

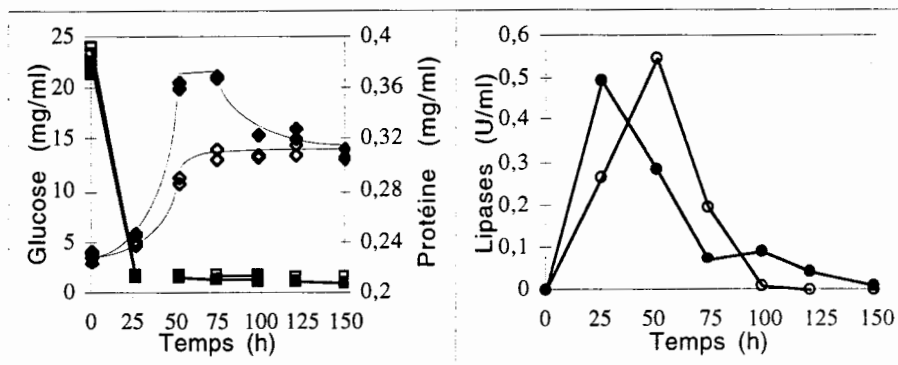


Figure 8.3 Effet de la taille de l'inoculum sur les cinétiques de la consommation de glucose ( $\square$ - $\blacksquare$ ), de la synthèse de protéines ( $\circ$ - $\bullet$ ) et de la production de lipases ( $\Delta$ - $\blacktriangle$ ) pour la souche 13a. Les symboles vides et pleins correspondent aux taux d'inoculation  $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu, respectivement.

### 8.3.2 *Rhizomucor pusillus* (Souche 16a)

En milieu liquide, la souche 16a (*Rh. pusillus*) présente une activité métabolique faible, même plus faible que celle de la souche 8a de la même espèce. En effet, la consommation du glucose a été accomplie après 4 jours de culture pour les deux concentrations d'inoculum. De plus, une biosynthèse maximale des protéines a été observée après 6 jours de culture pour les deux concentrations (Figure 8.4a).

Par ailleurs, les cinétiques de production de lipases changent par rapport à la concentration de l'inoculum. En effet, si une concentration de  $5 \times 10^5$  spores/ml est inoculée, le temps de production maximale de lipases dépasse les 6 jours et demi de culture. Par contre, si une concentration de  $5 \times 10^6$  spores/ml est utilisée, la production maximale de lipases (0,11 U/ml) est apparemment obtenue à 6 jours et demi de culture (Figure 8.4b). Comme il peut être constaté, ces temps des productions maximales de lipases sont un peu plus longs que ceux obtenus par la souche 8a et beaucoup plus longs que ceux présentés par la souche 13a. Ce fait confirme l'observation que l'activité métabolique de *Rh. microsporus* est plus rapide que celle de *Rh. pusillus*.

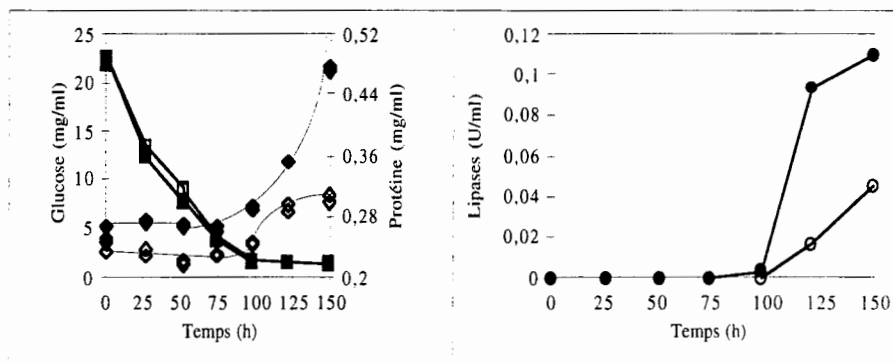


Figure 8.4 Effet de la taille de l'inoculum sur les cinétiques de la consommation de glucose (□-■), de la synthèse de protéines (○-●) et de la production de lipases (△-▲) pour la souche 16a. Les symboles vides et pleins correspondent respectivement aux taux d'inoculation  $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu.

#### 8.4 Cinétique de la biosynthèse des lipases intra et extracellulaires

Etant donné que l'activité métabolique de la souche 13a est plus rapide que les souches de *Rh. pusillus* et que les niveaux de lipases intracellulaires de la souche 13a sont beaucoup plus importants que les niveaux extracellulaires, il a été considéré pertinent de réaliser des cinétiques de la production de lipases intracellulaires et extracellulaires, afin de définir plus précisément, le temps de la production enzymatique maximale et les valeurs de l'activité lipasique atteintes.

Dans cette cinétique, le maximum d'activité lipasique extracellulaire (28 U/Erlenmeyer) est maintenue pour des temps de culture supérieurs à 44h et inférieurs à 70h. D'ailleurs, une activité lipasique intracellulaire commence à être détectée aux alentours de 30h de culture. Cette activité est maximale après 70h de culture (370 U/Erlenmeyer).

Il faut souligner qu'apparemment, la production des lipases extracellulaires et celle des lipases intracellulaires commencent au même temps de culture (30h). Aux premières heures de cette synthèse, il semble que ces lipases sont excrétées au fur et à mesure qu'elles sont produites. Ce fait suggère une synthèse constitutive de l'enzyme où, la présence des lipases n'est pas nécessaire au niveau intracellulaire, sinon qu'elles sont utilisées pour explorer le milieu extérieur au mycélium.

Entre 44 et 70h de culture, les concentrations en lipases intracellulaires continuent à augmenter fortement, cependant ces lipases ne sont plus transportées hors de la cellule. Ceci suggère que dans cette période de temps, l'enzyme est induite par la présence des lipides de réserve, accumulés par le champignon, et elle est retenue dans le mycélium pour accomplir ses fonctions catalytiques.

Quand la valeur maximale de la production intracellulaire de lipases est atteinte (1250 unités par gramme de biomasse sèche), cette activité lipasique représente 92% de l'activité totale. Après 70h de culture, les activités lipasiques chutent brusquement, ce qui suggère que les lipases sont attaquées par des protéases ou qu'elles ne sont pas stables à la température d'incubation (47°C).

Probablement, pour que la lipase de cette souche soit produite extracellulairement et à des concentrations supérieures, un inducteur de lipases devrait être ajouté initialement au milieu de culture.

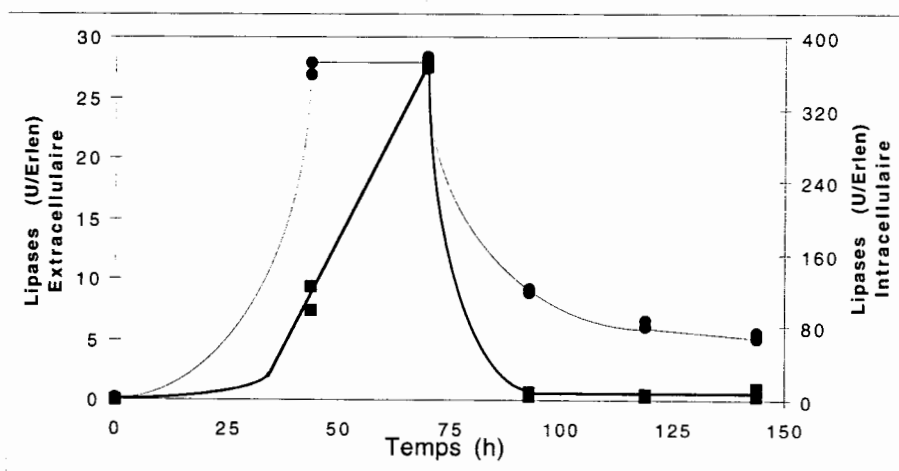


Figure 8.5 Cinétiques de la biosynthèse des lipases intracellulaires (■) et extracellulaires (●) de la souche 13a. Un Erlenmeyer contient 70 ml de milieu de culture.

## 8.5 Production de lipases par les souches provenant du CBS

Pour conclure l'étude de la production de lipases en culture liquide, des cinétiques des souches de la collection internationale du CentraalBureau voor Schimmelcultures (CBS) ont été réalisées.

Dans le Tableau 8.3, les paramètres principaux des cinétiques sont présentés. Ici, on peut constater que les temps d'épuisement du glucose du milieu pour les souches de *Rh. pusillus* (Rp183.67 et Rp253.53) sont similaires que pour nos souches de *Rh. pusillus* testées; ainsi que pour les souches de *Rh. miehei* CBS (Rm182.67 et Rm370.65). Par contre, les souches de *Rh. microsporus* présentent des temps d'épuisement du glucose beaucoup plus courts, à l'instar des souches sauvages appartenant à la même espèce.

La synthèse maximale de protéines est obtenue en des temps similaires entre les souches de référence et les souches sauvages de *Rh. pusillus*. Par contre, pour les souches de *Rh. microsporus*, ces temps sont différents.

En ce qui concerne les valeurs des activités lipasiques extracellulaires maximales obtenues, on peut observer que la souche Rp183.67 (*Rh. pusillus*) produit l'activité la plus importante de lipases au bout de 5 jours de culture (0,35 U/ml). Cette activité est supérieure aux activités des souches sauvages appartenant à la même espèce. De plus, l'activité lipasique maximale (extracellulaire) obtenue par la souche Rμ607.73 (0,44 U/ml) est similaire à celle obtenue par la souche 13a appartenant à la même espèce (*Rh. microsporus*). Néanmoins, cette production maximale est atteinte après 3 jours de culture pour la souche Rμ607.73, contre deux jours pour la souche 13a (Tableau 8.3).

En revanche, l'espèce de *Rh. miehei* ne produit pas de lipases sous ces conditions de culture, malgré le fait que cette souche ait montré une activité estérasique détectée par la précipitation du sel de calcium des acides gras libérés pendant l'hydrolyse du Tween 20 en culture gélosée (résultats non montrés) et que la souche Rm370,65 ait été déposée et étudiée par l'entreprise NOVO (des détergents).



Tableau 8.3 Paramètres principaux des cinétiques de la culture des souches de référence.

Souches	Temps de consommation du glucose (h)	Temps de synthèse maximale de protéine (h)	Temps de l'activité lipasique maximale (h)	Activité * lipasique maximale (U/ml)
Rp183.67	100	120	120	0,35
Rp253.53	100	120	135	0,10
Rm182.67	100	120	-	-
Rm370.65	100	120	-	-
Rμ607.73	<40	110	70	0,44
Rμ609.81	<40	110	70	0,20

\* Activité lipasique maximale extracellulaire

## 8.6 Conclusion

La synthèse des lipases en culture liquide a pu être liée à l'évolution de la production des protéines et de la biomasse, de la consommation du glucose et du pH. On a constaté que la production des lipases des champignons a commencé une fois que le glucose présent dans du milieu de culture a été épuisé, que la biomasse a atteint la phase stationnaire et que le pH est descendu à sa valeur la plus faible.

Une activité métabolique plus rapide a été observée pour *Rh. microsporus* (souche 13a), en comparaison à *Rh. pusillus* (souche 8a, 16a, Rp183,67 et Rp253,53). En effet, la consommation de glucose, la production de protéine et de lipases ont été beaucoup plus rapides pour *Rh. microsporus* que pour *Rh. pusillus*. La souche 13a a consommé la totalité du glucose du milieu avant un jour de culture, alors que la souche 16a l'a consommé après 4 jours de culture. La souche 13a a produit une concentration maximale de protéine après deux jours de culture ; tandis que pour la souche 16a, cette concentration a été atteinte après 6 jours et demi de culture. Les activités lipasiques extracellulaires maximales (0,5 et 0,11 U/ml) ont été produites après un jour et 6,5 jours de culture pour les souches 13a et 16a, respectivement.

La culture liquide des six souches de référence a montré que :

- *Rh. pusillus* (Rp183.67) a produit la concentration la plus importante en lipases extracellulaires (0,35 U/ml) de cette espèce.
- *Rh. microsporus* Rμ607.73 a produit 0,44 U/ml de lipases extracellulaires.
- *Rh. miehei* n'a pas produit de lipases.

Une influence négligeable de la taille de l'inoculum sur la production des lipases, de la souche 13a, a été constatée. Cependant, un effet de l'inoculum a été principalement aperçu au niveau de la productivité de cette enzyme. En effet, la production maximale des lipases (0,5 U/ml) a été obtenue après un ou deux jours de culture en utilisant un inoculum de  $5 \times 10^6$  ou de  $5 \times 10^5$  spores/ml.

La production de lipases globales de la totalité des souches mesurées après cinq jours de culture, a montré que les souches de *Rh. pusillus* ont produit des quantités faibles de lipases intracellulaires et extracellulaires (0,06 U/ml). Parmi cette espèce, les souches 32a et 34a produisent les activités lipasiques totales les plus élevées (0,2 U/ml). D'ailleurs, la souche 13a de *Rh. microsporus* a produit les concentrations les plus élevées en lipases extracellulaires (0,5 U/ml). Cependant, il a été montré que cette souche a produit intracellulairement 92% des lipases totales (5,7 U/ml).

**PRODUCTION DE LIPASES EN  
FMS SUR SUPPORT**

## 9. PRODUCTION DE LIPASES EN FMS SUR SUPPORT

Les recherches concernant la production de lipases en Fermentation en Milieu Solide (FMS) concrétisées comme des articles scientifiques sont négligeables par rapport au développement atteint par les cultures liquides. Quelques exemples relevant de l'application de ces procédés pour la production de lipases incluent : l'utilisation de *Rhizopus oryzae* cultivé sur le riz et le soja (OHNISHI, 1994), d'une levure alkalophile cultivée sur le riz et le blé (BRUSHAN et coll., 1994) et de *Rhizopus delemar* cultivé sur un support inerte imprégné d'un milieu de culture optimisé pour la production de lipases (CHRISTEN et coll., 1995). Cependant, à notre connaissance, les études concernant la production de lipases en FMS par des champignons thermophiles sont inexistantes.

Par conséquent, une de plus importantes contributions du présent travail a consisté à explorer les perspectives d'application des champignons thermophiles cultivés en FMS, en particulier, l'obtention de productivités élevées et l'utilisation de sous-produits solides agro-industriels.

Dans un premier temps nous allons présenter le modèle le plus simple d'une FMS en utilisant comme support, la bagasse de canne à sucre imprégnée du même milieu de culture que celui employé dans le chapitre précédent pour la culture liquide. Postérieurement, nous allons étudier le rôle de quelques inducteurs sur la production de l'enzyme.

### 9.1 Adaptation des FMS pour la culture des champignons thermophiles

Dans le cadre de ce travail, il était indispensable de réaliser une étude préliminaire pour définir les conditions de culture des champignons thermophiles sur un support solide. Etant donné que les FMS sont des procédés qui se déroulent généralement dans des conditions non aseptiques, la manière d'imposer le développement d'un micro-organisme particulier consiste à utiliser un inoculum important de l'ordre de  $10^7$  spores/g de substrat solide (RAIMBAULT, 1980 ; ORIOL, 1987 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Pour cette raison, l'inoculum pour les FMS a été augmenté de dix fois par rapport à la culture liquide, de  $5 \times 10^5$  à  $5 \times 10^6$  spores/ml de milieu d'imprégnation, soit  $1,5 \times 10^7$  spores/g de support sec.

Malgré l'adoption de cette stratégie, la contamination bactérienne a été très importante et elle a empêché le développement des champignons dans les cultures solides. Cette contamination était facile à mettre en évidence à cause de la couleur jaune de la bagasse et de l'odeur nauséabonde dégagée par les cultures contaminées. Par la suite, la bactérie responsable de cette contamination a été identifiée. Il s'agissait d'un *Bacillus* qui formait des endospores, en conséquence, sa dispersion dans le laboratoire était très répandue. Un antibiotique (le chloramphénicol) a donc été additionné systématiquement au milieu nutritif avant de l'imprégner sur le support solide.

Une série d'expériences a été planifiée pour démontrer que le chloramphénicol est inoffensif pour la croissance et pour la production de lipases des champignons thermophiles en FMS. En particulier, des cultures aseptiques ou non aseptiques ont été réalisées en flacons contenant la bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu nutritif avec ou sans antibiotique. Ces flacons ont été inoculés soit avec *Rh. pusillus* (souche 16a), soit avec *Rh. microsporus* (souche 13a) et incubés à 47°C pendant 2 jours.

Il a été montré que le chloramphénicol (à 50 ppm) n'a aucun effet sur la croissance et sur la production de lipases pour les deux souches étudiées. Par contre, cet antibiotique a montré une grande efficacité pour empêcher la contamination bactérienne. De ce fait, pour toutes les cultures en milieu solide que nous avons réalisé, l'addition de l'antibiotique dans les milieux nutritifs a été systématique. De plus, afin d'adapter la technique de FMS à des températures élevées, quelques légères modifications ont été apportées (§3.5.2.3), en particulier pour le maintien constant de la température et de l'humidité tout au long du procédé de FMS.

Lors des études précédentes (chapitre 8) concernant les cinétiques de production de lipases en culture liquide, il avait été observé que l'activité métabolique varie selon la souche étudiée. En prévision de ces différences inhérentes à chaque souche, plusieurs cinétiques de consommation des substrats et de production de métabolites en FMS ont été faites pour différentes souches. Une fois que le temps de la production maximale de lipases a été connu, la totalité des souches (sauvages et de référence) ont été cultivées en FMS et les productions en lipases ont été testées et comparées.

Pendant ces cinétiques, les études respirométriques mises au point par SAUCEDO-CASTAÑEDA (1991) pour le suivi en continu de l'échange gazeux entre les cultures solides et le milieu environnemental, ont été réalisées.

## 9.2 Cinétiques de la consommation des substrats et de la synthèse des produits

Comme une première approche et afin de simplifier la comparaison des deux systèmes de culture (liquide et solide), le même milieu nutritif que celui employé dans les cultures liquides a été utilisé pour réaliser les FMS. L'inoculum a été ajouté dans le milieu liquide pour favoriser la dispersion homogène des sporangiospores et après agitation, la suspension obtenue a été absorbée sur la bagasse de canne à sucre. La bagasse ainsi préparée a servi pour remplir les bioréacteurs qui ont été placés dans le dispositif de FMS (§3.5.1) selon la technique de RAIMBAULT et ALAZARD (1980).

Pour la mise en place des FMS, les paramètres suivants ont été fixés au départ :

Humidité	75%
Quantité de support humide par réacteur	30g
Débit d'air	30 ml/ min
Inoculum	$1,5 \times 10^7$ spores/g de support sec
Température d'incubation	47°C
pH initial	5,4
Glucose et protéines initiales	64 et 2,6 mg/g de support sec

Avec les conditions de culture décrites dans la section 3.5.2.3, les cinétiques de consommation des substrats et de synthèse des produits de neuf souches (2a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 10a, 13a et 16a) ont été étudiées. La comparaison de ces cinétiques et la respirométrie de la totalité des souches a permis de mettre en évidence les similitudes entre toutes les souches étudiées (résultats non montrés). A titre d'exemple, nous allons présenter uniquement les cinétiques d'un champignon représentatif de chaque espèce considérée (*R. pusillus* et *R. microsporus*).

### 9.2.1 Cinétiques détaillées des souches 13a et 16a

La Figure 9.1 présente les cinétiques détaillées de l'évolution du pH, de l'humidité, de la consommation de glucose, et de la synthèse des produits (protéine, lipases) pour les souches 13a (*Rh. microsporus*) et 16a (*Rh. pusillus*) cultivées en FMS. Pendant ces cultures, l'humidité a été maintenue constant (75%) (Figure 9.1a).

Par ailleurs, le suivi de la FMS montre que l'activité métabolique des deux souches est extrêmement rapide en utilisant cette technique de culture. A notre connaissance, dans un procédé de FMS, ces activités métaboliques n'ont jamais été rapportées dans la littérature, en particulier, pour la production d'enzymes. Pour les deux souches, la biosynthèse de lipases commence à partir de 6h de culture et leur concentration maximale est obtenue après 12 h de culture en FMS (Figure 9.1c).

Les études qui s'approchent le plus aux activités métaboliques présentées par les souches thermophiles utilisées dans ce travail, sont celles réalisées en FMS par CHRISTEN et coll. (1995) et par SAUCEDO-CASTAÑEDA (1991), en utilisant *A. niger* et *Schwanniomyces castelli*, respectivement. Ces auteurs ont obtenu respectivement, une production maximale d' $\alpha$ -amylase et de lipase après 18 h et 30 h de culture.

Par ailleurs, on peut observer que la production de lipase est corrélée à la consommation de glucoses, à la biosynthèse de protéines et au pH (Figure 9.1.b). En effet, la biosynthèse des lipases commence après l'épuisement du glucose du milieu imprégné. Egalement, la production de lipases est initiée une fois que la concentration des protéines et que le pH du milieu commencent à augmenter (Figure 9.1 a et b). Après 12h, les valeurs maximales de protéines (60 mg de protéine/gSS) et de pH (7,7) sont atteintes et c'est à ce moment là que la production maximale de lipases est obtenue.

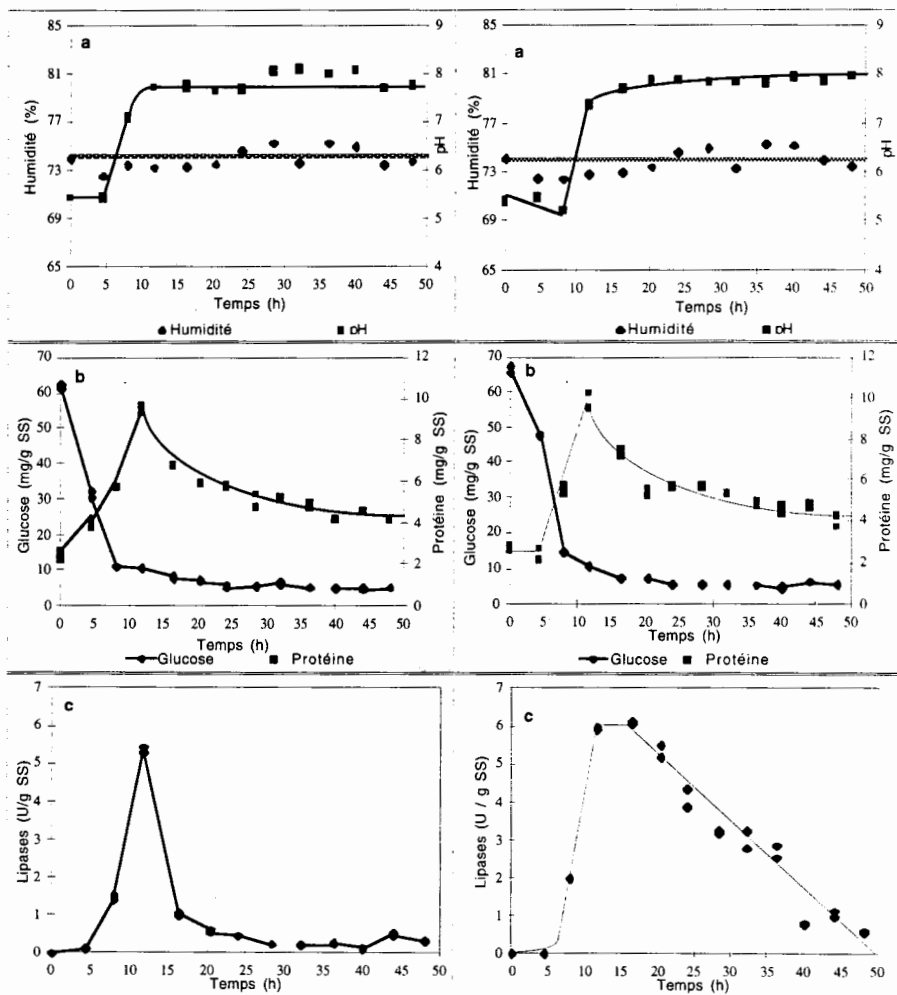


Figure 9.1 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 13a et 16a en FMS sur bagasse imprégnée. a) évolution du pH et de l'humidité, b) consommation du glucose et production de protéines et c) production de lipases. A gauche, cinétique de *Rh. microsporus* 13a, et à droite *Rh. Pusillus* 16a.



Il faut souligner que l'activité lipasique de ces champignons disparaît rapidement, une fois que la production maximale de lipases a été atteinte (6 U/gSS). Cette disparition pourrait être due à la présence de protéases, étant donné qu'après 12h de culture, les seules sources de carbone et d'énergie disponibles dans le milieu de culture sont les protéines (les lipases comprises) et éventuellement des acides aminés. Cependant, l'instabilité thermique des lipases devrait aussi être considérée, car, la disparition accélérée de la lipase de la souche 13a pourrait être expliquée par cette hypothèse. En effet, la biosynthèse de lipases chez la souche 13a est représentée comme un pic aigu, d'activité enzymatique qui commence à être détectée après 6h de culture et disparaît rapidement. Après 17h de culture, cette activité est devenue négligeable, malgré la présence d'une concentration encore élevée en protéines. Par ailleurs, l'activité lipasique de la souche 16a apparaît après 6h de culture ; également, mais une fois atteint le maximum d'activité (12h), elle disparaît plus progressivement, car après 50 h de FMS l'activité lipasique est encore faiblement détectée (Figure 9.1c).

Ces phénomènes ont été également rapportés par OHNISHI et coll. (1994), en utilisant *Rh. oryzae* pour la production de lipases en FMS, ces auteurs ont justifié la perte d'activité lipasique par de la présence de protéases. Une autre étude qui révèle cette disparition enzymatique est rapportée par CHRISTEN et coll. (1995), en utilisant *A. niger* pour la production de lipases en FMS.

### 9.3 Etudes respirométriques

Pendant les cultures en FMS, une étude respirométrique de la totalité des souches a été réalisée. Cette technique, appuyée par des observations au microscope, nous a permis de connaître les différentes étapes du développement physiologique des champignons cultivés en FMS, à savoir, le moment de la germination des spores, la période de la croissance exponentielle, l'instant de l'activité métabolique maximale, le moment du déclin de cette activité, ainsi que le moment où l'activité métabolique des champignons thermophiles et thermotolérants a atteint les niveaux les plus bas.

De plus, cette analyse respirométrique s'est révélée une technique très puissante pour détecter l'activité microbienne, puis pour connaître le degré de différenciation mycélienne et

prédire l'épuisement du glucose, la vitesse de croissance maximale, la synthèse des lipases et enfin, pour suivre en continu et de manière non destructive, l'évolution globale du procédé de FMS.

A partir de ces études respirométriques, il a été possible de calculer les moyennes suivantes : pour l'ensemble des 31 souches étudiées (sauvages et de référence) qui n'ont pas fourni des résultats significativement différents :

Temps de démarrage de la croissance	entre 4 et 5h
Temps d'activité respiratoire maximale	7 h ( $\pm$ 1h)
Temps de ralentissement de la chute de l'activité métabolique	12h
Temps d'activité métabolique minimale	après 24h

Le suivi de la respiration des souches 13a et 16a est illustré dans les Figures 9.2 et 9.3. La respiration des souches est initiée très rapidement (après 4h d'incubation). La production de CO<sub>2</sub> et la consommation d'O<sub>2</sub> les plus importantes sont obtenues à 7h d'incubation, ce qui coïncide avec l'initiation de la synthèse des lipases, avec l'épuisement du glucose dans le milieu de culture et avec l'augmentation du pH (Figures 9.1 et 9.2). Postérieurement, cette activité respiratoire diminue, d'abord très rapidement et par la suite, cette diminution présente un ralentissement progressif. L'activité lipasique maximale est détectée après 12h de culture, pendant la phase du ralentissement de la chute respiratoire.

Comme il a pu être constaté dans la Figure 9.1b, au bout de 10h de culture, le glucose consommé représente 85% de la concentration initiale en sucres. D'ailleurs, dans la Figure 9.3, on peut remarquer qu'au bout de 10h de culture, la production de CO<sub>2</sub> pour les deux souches est de 20 ml/ g de support sec initiale (SSI). Si on considère, que pendant ces premières heures de la croissance fongique, le glucose est utilisé comme la seule source de carbone, cela impliquerait que 50% du glucose consommé est dégradé sous forme de CO<sub>2</sub>, et en conséquence, utilisé pour approvisionner l'énergie dont les champignons ont besoin pour leurs activités métaboliques. Les 50% restant serait principalement assimilé comme source de carbone pour la croissance fongique.

D'ailleurs, même si après 10h de culture, le glucose est épuisé dans le milieu de culture, la production de CO<sub>2</sub> et la consommation d'O<sub>2</sub> augmentent faiblement (Figure 9.3). Cette poursuite de la respiration serait permise grâce à l'utilisation des acides aminés et des protéines

contenus dans le milieu de culture ou bien le champignon utiliserait une partie de ses réserves cytoplasmiques.

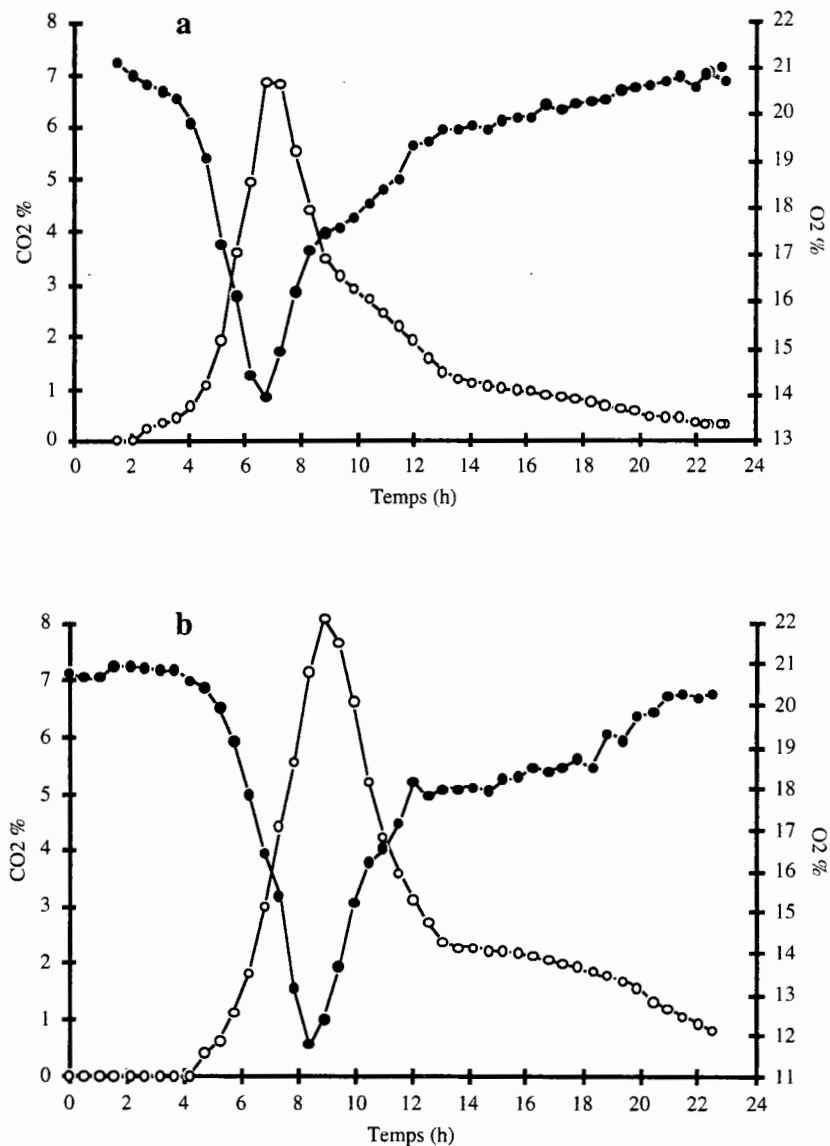


Figure 9.2 Respirométrie des souches *Rh. microsporus* 13a (a) et *Rh. pusillus* 16a (b) au cours de la culture solide sur bagasse imprégnée. Les cercles vides et pleins correspondent respectivement au CO<sub>2</sub> produit (%) et à l'O<sub>2</sub> consommé (%).

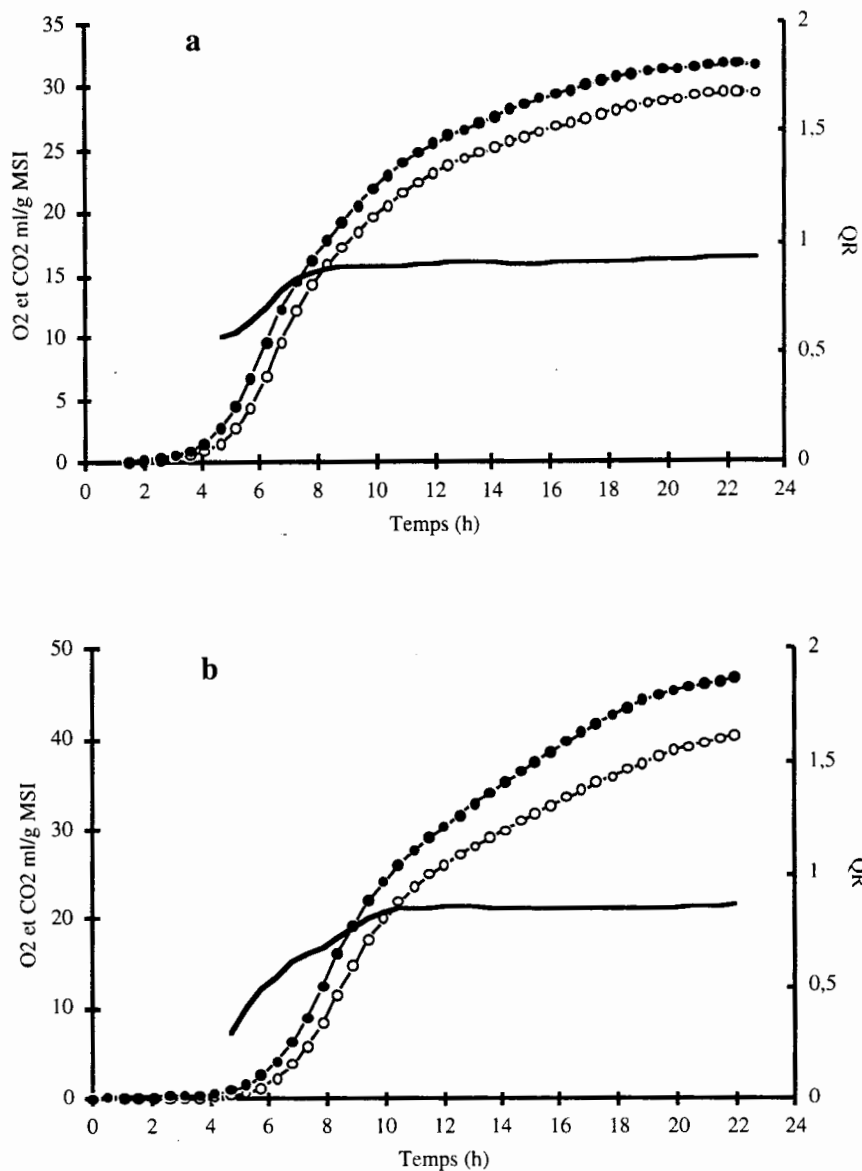


Figure 9.3 Respirométrie des souches *Rh. microsporus* 13a (a) et *Rh. pusillus* 16a (b) au cours de la culture solide sur bagasse imprégnée. Les cercles vides et pleins correspondent respectivement au CO<sub>2</sub> produit (ml/gSSI) et à l'O<sub>2</sub> consommé (ml/gSSI) et la ligne continue représente le coefficient respiratoire  $Q_R$  ( $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{O}_2$ ).

Pendant le temps de la croissance exponentielle, les valeurs du coefficient respiratoire ( $Q_R$ ) sont très faibles, ce qui suggère que, d'une part, une proportion élevée du glucose consommé est transformé en biomasse (en libérant peu de  $CO_2$ ) et que, d'autre part, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons (consommation élevée d' $O_2$ ). Une fois que la croissance se ralentie (à partir d'environ 10h), le  $Q_R$  est très proche à l'unité, ce qui suggère qu'il n'y a plus de formation de produits (ERICKSON et coll. 1978) et que la source de carbone est utilisée essentiellement comme source d'énergie, en étant transformée presque équimolairement dans une mole de  $CO_2$  par mole d' $O_2$  consommé, pour le maintien en vie du mycélium.

#### 9.4 Production globale de lipases en FMS pour toutes les souches

Une fois que les cinétiques de biosynthèse des lipases ont été connues pour les deux souches (*Rh. microsporus* et *Rh. pusillus*), la production des lipases de l'ensemble des champignons thermophiles (*Rh. pusillus* et *Rh. miehei*) et des champignons thermotolérants (*Rh. microsporus*) a été recherchée uniquement après 12 h et 24h de culture en FMS (Tableaux 9.1, 9.2 et 9.3). Pendant cette étude, la similitude des profils respiratoires a été vérifiée pour chaque souche testée. Des profils du  $CO_2$  produit et de l' $O_2$  consommé, reproductibles et répétitifs ont été constatés au cours des différentes cultures en FMS. D'ailleurs, l'humidité du produit solide a été contrôlée à 75% pendant la durée de la FMS, pour l'ensemble des souches étudiées.

Au départ des cultures en FMS, les valeurs du pH ont été de 5,6 (en moyenne) et les concentrations de glucose et de protéines ont été respectivement de 67 mg/gSS et 2,4 mg/gSS (en moyenne). Plus tard, pendant les cultures des 31 souches, le pH et le glucose résiduel ont maintenu une valeur constante (en moyenne) entre 12 et 24h de culture, de 7,7 et de 6 mg/gSS, respectivement. Par contre, la concentration de protéines produites a diminué (en moyenne) de 10 mg/gSS à 12h à 4,8 mg/gSS à 24h de culture. Ce fait pourrait expliquer pourquoi l'activité lipasique détectée à 12h de culture a été plus importante qu'à 24h de culture (Tableaux 9.1, 9.2 et 9.3).

En moyenne, les 19 souches sauvages de *Rh. pusillus* ont produit 3,4 unités de lipases/ g Support Sec à 12h de culture et 2,2 U/gSS à 24h. Notamment, les souches 16a et 29a ont produit les activités les plus élevées en lipases (6,1 et 7,5 U/gSS, respectivement). De plus, les souches de référence de la même espèce ont produit 9,3 U /gSS à 12h et 0,6 U/gSS à 24h. Certainement, les souches de référence produisent plus de lipases que les souches sauvages ; cependant, on peut apercevoir que la stabilité de lipases des souches sauvages est meilleure que celle des souches de référence. En effet, l'activité lipasique des souches sauvages, à 24h de culture, diminue à 65% de l'activité atteinte à 12h ; par contre, l'activité lipasique des souches de référence, à 24h de culture, chute à 5% de l'activité atteinte à 12h (Tableau 9.1).

D'ailleurs, les souches *Rh. microsporus* ont produit des concentrations variées en lipases. Notamment les souches sauvages 11a et 13a en ont produit 0,9 et 6 U/gSS, respectivement ; par contre, le reste des souches sauvages n'en ont pas produit. De plus, ces souches de référence répertoriées comme productrices de lipases, en ont produit très peu dans nos conditions de culture (0,7 U/gSS en moyenne, après 12h de culture). Il faut souligner que comme il avait été observé précédemment, la stabilité des lipases de la souche 13a est très faible et 12h après leur production, l'activité enzymatique a diminué de 90% (Tableau 9.2).

Les activités des lipases les plus importantes sont produites par les souches de collection de *Rh. miehei*. En effet, les souches Rm182.67 et Rm370.65 ont produit 65,5 et 57,6 U/gSS à 12h de culture en FMS, respectivement. Par contre, ces enzymes ne sont pas très stables et après 24h de culture, les activités lipases chutent à 7,8 et à 22,4 U/gSS, respectivement. Cette production très élevée de lipases n'a pas encore été rapportée pour ces souches, étant donné que cette technique de FMS est appliquée pour la première fois. Il a été montré, dans le chapitre précédent (§8.5), que ces souches de *Rh. miehei* n'ont pas produit de lipases en culture liquide, ce qui démontre clairement les différences entre les deux modes de cultures. Ces différences seront discutées dans le chapitre 11.

Il faut souligner que ces productions de lipases ont été réalisées en absence d'un inducteur, ce qui suggère que ces enzymes sont constitutives.

Tableau 9.1 Productions globales en lipases des souches de *Rh. pusillus* après 12 et 24h de culture en FMS.

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
2a	12	3,6
	24	1,6
4a	12	3,2
	24	2,1
5a	12	4,1
	24	2,4
6a	12	4,1
	24	2,8
7a	12	3,0
	24	1,6
8a	12	2,7
	24	1,8
10a	12	1,9
	24	2,0
12a	12	6,5
	24	3,0
16a	12	6,1
	24	4,1
17a	12	5,6
	24	4,7
19a	12	1,5
	24	0,7

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
22a	12	4,0
	24	2,4
24a	12	2,4
	24	1,6
29a	12	7,5
	24	3,7
32a	12	2,3
	24	2,2
33a	12	3,0
	24	2,1
33b	12	1,6
	24	1,3
34a	12	1,8
	24	1,8
35a	12	1,5
	24	1,3
Rp183.67	12	8,2
	24	1,0
Rp253.53	12	10,4
	24	0,2

Tableau 9.2 Productions globales en lipases des souches de *Rh. microsporus* après 12 et 24h de culture en FMS.

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
10b	12	0,2
	24	0,1
11a	12	1,0
	24	0,4
13a	12	6
	24	0,6
27a	12	0,0
	24	0,1

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
28a	12	0,0
	24	0,0
36a	12	0,0
	24	0,1
R $\mu$ 607.73	12	1,0
	24	0,4
R $\mu$ 609.81	12	0,4
	24	0,0

Tableau 9.3 Productions globales en lipases des souches de *Rh.miehei* après 12 et 24h de culture en FMS.

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
Rm182.67	12	65,5
	24	7,8

Souche	Temps (h)	Lipase (U/gSS)
Rm370.65	12	57,6
	24	22,4

## 9.5 Effet des inducteurs sur la biosynthèse de lipases

Afin de chercher une amélioration de la production de lipases en FMS, l'influence de cinq inducteurs sur la biosynthèse des lipases de *Rh. pusillus* sera étudiée. Les inducteurs ont été choisis parmi ceux qui ont montré l'effet le plus marqué sur l'augmentation de la production de l'enzyme. L'induction de lipases par l'huile d'olive (OHNISHI et coll., 1994 ; HATZINIKOLAOU et coll., 1996 ; DEL RIO et coll., 1990 ; RAPP, 1995 ; WALLER et COMEAU, 1990 ; NOVOTNY et DOLEZALOVA, 1993), l'acide oléique (OBRADORS et coll., 1993 ; RAPP, 1995), le stéaryl alcool (USHIO et coll., 1996, le Triton X-100 (LIN et coll., 1995 et le Tween 80 (MARTINEZ CRUZ et coll., 1993) ont été étudiés. Par rapport à ces études, la concentration de chaque inducteur a été fixée (§3.2.6.3).

Pour réaliser cette étude, nous avons été confrontés tout d'abord au problème de la dispersion homogène de l'huile d'olive et de l'acide oléique sur le support solide. Afin de distribuer d'une manière homogène ces composés, il a été nécessaire de préparer une émulsion en ajoutant un agent émulsifiant dans le milieu de culture avant de l'incorporer sur la bagasse.

Afin de montrer l'innocuité de l'agent émulsifiant sur la vitesse de la croissance apicale de plusieurs champignons, des expériences ont été réalisées sur des milieux gélosés avec ou sans la gomme arabique. Les résultats ont montré que la présence de la gomme arabique (à une concentration de 30 g/l) n'affecte pas la croissance apicale des champignons (souches 2a, 24a et 10b) sur de milieux gélosés.

Par conséquent, la gomme arabique (30 g/l) a été ajoutée dans le milieu de culture afin d'émulsionner l'huile d'olive et l'acide oléique. Egalement, un milieu de culture témoin a été préparé, en ajoutant la gomme arabique dans le milieu de culture sans inducteur. Etant donné la nature hydrosoluble du reste des inducteurs, ils ont été mélangés directement avec le milieu de culture (sans agent émulsifiant).

Pour la réalisation des FMS, les conditions de culture ont été fixées comme il a été décrit précédemment (§9.2 et §3.5.2.3) : durée de 40 h et la souche 16a (*R. Pusillus*) a été utilisée



comme inoculum. Pendant la durée des six cultures, l'humidité a été contrôlée entre 71 et 74 % (Figure 9.5b).

Les seules FMS qui ont révélés une croissance abondante, ont été celles qui contenaient l'huile d'olive et l'acide oléique. Au microscope, il a été constaté une faible croissance de *Rh. Pusillus* (16a) dans les FMS additionnées des inducteurs stéaryl alcool, Triton X-100 et Tween 80. Ce qui implique que ces inducteurs inhibent la croissance de ce champignon. Une inhibition de la croissance a également été observée pour la FMS témoin (sans inducteur, mais contenant de la gomme arabique), ce qui signifie qu'en FMS, la gomme arabique affecte la croissance du champignon. Cette inhibition est constatée par la comparaison de l'évolution de la concentration de CO<sub>2</sub> sans ou avec l'addition de la gomme arabique (figures 9.2b et 9.4). En effet, une production maximale de 6% de CO<sub>2</sub>, dans le débit gazeux à la sortie du bioréacteur, a été atteinte pour la FMS sans gomme arabique contre 2% pour la FMS contenant l'agent émulsifiant.

Cependant, cette inhibition de la croissance du champignon n'a pas été remarquée en culture sur des milieux gélosés. Par contre, une inhibition complète de la souche 13a en culture liquide contenant Triton X-100 a été remarquée (résultats non montrés). Ce qui montre les différences physiologiques entre chaque type de culture.

L'activité respiratoire la plus élevée est observée pour la FMS contenant de l'acide oléique, avec une concentration maximale de CO<sub>2</sub> de 5,7% est atteinte à 11h de culture. Cette valeur est légèrement plus faible que celle obtenue pour la FMS dans la section 9.2 pour le même champignon (souche 16a). Cependant, on devrait considérer que dans cette expérience la quantité totale de substrat a été pratiquement doublée. En effet, la même concentration en glucose que l'expérience précédente (60 mg de glucose/gSS), plus, une quantité de 55 mg d'acide oléique /gSS ont été additionnées. Par conséquent, l'activité respiratoire est très inférieure à celle espérée, ce qui permet d'apercevoir aussi l'inhibition de la gomme arabique sur cette FMS. Cette inhibition est probablement due à l'abaissement de l'activité d'eau provoqué par l'agent émulsifiant ou à des problèmes sur le transfert de masse provoqués par l'augmentation de la viscosité du milieu de culture.

Pour le reste de FMS, les productions de CO<sub>2</sub> maximales sont comprises entre 2 et 3%, dans un temps de culture entre 8 et 10h, qui sont donc des valeurs très sensiblement inférieures à celle obtenue pour la FMS contenant de l'acide oléique (Figure 9.4).

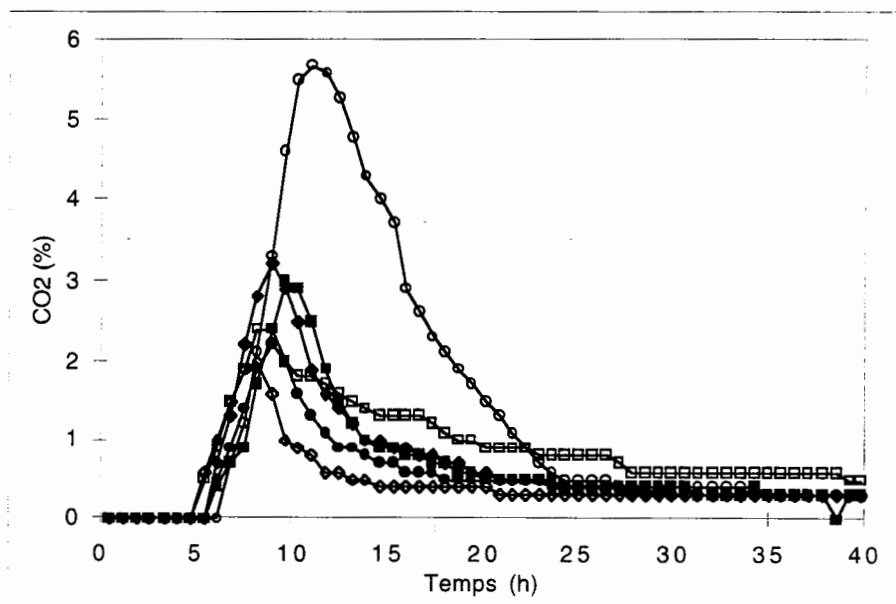


Figure 9.4 Effet des inducteurs de lipases sur l'activité respiratoire (% de CO<sub>2</sub>) de *Rh. Pusillus* 16a en FMS. Témoin (◇), huile d'olive (□), acide oléique (○), stéaryl alcool (◆), Triton X-100 (■) et Tween 80 (●).

Pour les FMS additionnées du stéaryl alcool, du Triton X-100 et du Tween 80, ainsi que pour le témoin, le pH augmente de 5,5 au début de la culture à 7,7 après 15 h de culture (Figure 9.5a). Le glucose est consommé complètement très rapidement (Figure 9.5c). Cependant, vu les faibles croissances et les faibles activités respiratoires, une déviation des voies métaboliques pourrait être considérée, où le glucose pourrait desservir des voies différentes à la biosynthèse de la biomasse. Cette caractéristique peut également être appréciée par l'observation des protéines, lesquelles présentent une faible concentration pendant les cultures (Figure 9.5d). Les productions maximales de lipases sont obtenues après 15h de culture. L'activité lipase atteinte par la FMS témoin est de 1U/g SS, ce qui signifie qu'en FMS, la gomme arabique, à une

concentration de 30 g/l, inhibe fortement la production des lipases, car une diminution de l'activité enzymatique de six fois a été observée (figures 9.1c et 9.5f).

Les productions maximales de lipases pour les la FMS additionnées du stéaryl alcool, du Triton X-100 et du Tween 80 sont respectivement de 1, 0,45, et 4 U/g SS, ce qui représente une diminution de l'activité lipase par rapport à la FMS sans inducteur (et sans gomme arabique) de 6, 13 et 1,5 fois, respectivement. Par conséquent, le stéaryl alcool, le Triton X-100 et le Tween 80, au lieu d'induire la synthèse de lipases, l'affecte. Cet effet peut être dû à l'inhibition de la croissance du champignon par ces composés.

Notamment, l'activité lipase maximale est obtenue après la consommation totale du glucose, quand la concentration de protéines est maximale, au moment où le pH atteint sa valeur la plus élevée et une fois où la chute de l'activité respiratoire s'est nettement ralentie.

En ce qui concerne les FMS complétées avec de l'huile d'olive ou de l'acide oléique, on observe que le pH augmente plus lentement que la FMS témoin et passe de 5,2 pour la FMS contenant de l'huile d'olive et de 4,5 pour la FMS contenant de l'acide oléique (au début de la culture) à un pH de 7,3 après 24 h de culture (Figure 9.5a). De plus, pour ces deux FMS, la vitesse de consommation de glucose est plus lente que celle présentée pour la FMS témoin. Ces FMS ont besoin d'environ 28h pour consommer totalement le glucose, contre 15h pour la FMS témoin (Figure 9.5c).

On remarque également que les deux sources de carbone disponibles (le glucose et l'huile d'olive ou l'acide oléique) sont assimilées simultanément. Pour la FMS, additionnée de l'acide oléique, on observe que cet acide gras est consommé totalement après 15h de culture (Figure 9.5e), tandis que le glucose reste encore dans le milieu de culture (figures 9.5c et d). Ce qui suggère que l'acide oléique est préféré comme source de carbone ou bien que, grâce à ses propriétés physico-chimiques, la molécule de l'acide gras dans l'émulsion, soit plus accessible au champignon cultivé en FMS. Cette consommation rapide et simultanée de l'acide gras et du glucose pourrait expliquer l'abondant développement fongique et l'activité respiratoire élevée dans cette FMS (figures 9.4 et 9.5c et d).

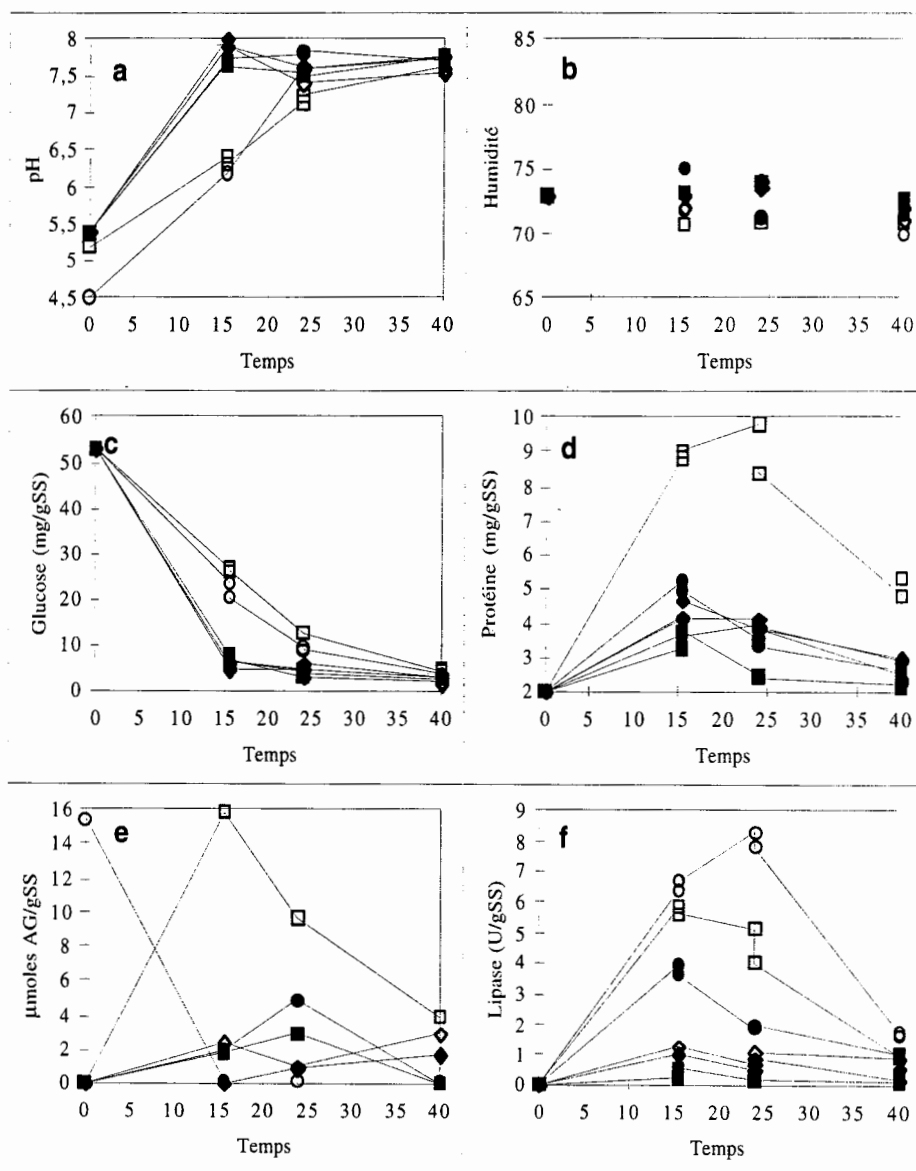


Figure 9.5 Effet des inducteurs de lipases sur les différents paramètres au cours de la croissance de *Rh. pusillus* 16a en FMS sur bagasse imprégnée. Evolution de : a) pH, b) humidité, c) consommation du glucose, d) production de protéines, e) consommation des acides gras, f) production de lipases. Témoin ( $\diamond$ ), huile d'olive ( $\square$ ), acide oléique ( $\circ$ ), stéaryl alcool ( $\blacklozenge$ ), Triton X-100 ( $\blacksquare$ ) et Tween 80 ( $\bullet$ ).

Note : Dans le graphique e) les valeurs des acides gras pour la FMS additionnée d'acide oléique ( $\circ$ ) ont été divisées par un facteur de 10.

Par ailleurs, dans le cas de la FMS additionné d'huile d'olive, à 15h de culture, une concentration d'acide oléique de 16  $\mu\text{moles/g SS}$  est détectée, ce qui suggère que la vitesse d'hydrolyse de l'huile catalysée par les lipases est plus rapide que celle de la consommation des acides gras. Puisque la consommation de l'huile par le champignon est possible grâce à une hydrolyse préalable des lipases, ce fait pourrait expliquer la consommation un peu tardive des acides gras par rapport à la FMS contenant au départ l'acide oléique (Figure 9.5e). De plus, il a été suggéré par DEL RIO et coll. (1990) que la consommation de l'acide oléique est réprimée par la présence du glycérol, produit par l'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de *Candida rugosa*.

Les productions maximales de lipases pour les FMS, en présence de l'huile d'olive ou de l'acide oléique, ont été obtenues à 15 et 24 h, en atteignant 6 et 8 U/g SS respectivement, ce qui représente une augmentation de la production de lipases de 6 et 8 fois, respectivement, par rapport à celles atteintes par le témoin en absence d'un inducteur. Notamment, à 15h de culture, les activités lipases sont similaires pour les FMS additionnées par ces deux inducteurs. Cependant, à 24h de culture, cette activité diminue légèrement pour la FMS contenant de l'huile d'olive, tandis qu'elle augmente pour la FMS contenant de l'acide oléique. Enfin, on remarque également que l'activité lipase maximale est obtenue une fois que la chute de l'activité respiratoire est ralentie.

Par conséquent, parmi les six composés testés (l'huile d'olive, l'acide oléique, le stéaryl alcool, le Triton X-100, le Tween 80 et la gomme arabique), uniquement l'acide oléique et l'huile d'olive sont capables d'induire la synthèse de la lipase.

## 9.6 Conclusion

Au cours de ce chapitre, des FMS ont été réalisées en utilisant comme support la bagasse de canne à sucre imprégnée d'une solution nutritive. Les cinétiques de la consommation des substrats et de la synthèse des produits par neuf souches de champignons ont présenté des profils et des valeurs similaires. Egalement, ces ressemblances ont été vérifiées par le suivi de la respirométrie de la totalité des cultures fongiques.

En FMS, la respirométrie a permis de mettre en évidence les différentes étapes du développement fongique, le moment de la biosynthèse de lipases et l'évolution globale du procédé. De plus, elle a représenté un moyen non destructif et très simple de mise en pratique.

Le suivi des FMS a montré que le métabolisme des souches est extrêmement rapide, le démarrage de la croissance a eu lieu entre 4 et 5h de culture et l'activité métabolique s'est terminée pratiquement après 12h de culture.

La biosynthèse de lipases a commencé à partir de 6h de culture et l'activité maximale a été obtenue après 12 h de culture en FMS. Cette production de lipases est corrélée à la production de protéines, la consommation du glucose et d'acide oléique, l'augmentation du pH et la respirométrie. Cependant, une fois que la production maximale des lipases a été atteinte, l'activité lipasique de ces champignons disparaît rapidement. Notamment, les lipases de *Rh. pusillus* sont plus stables que celles de *Rh. microsporus* et que celles de *Rh. miehei*.

Il a été suggéré que pendant la croissance exponentielle des champignons, la moitié du glucose consommé est utilisée pour la biosynthèse de biomasse et l'autre moitié comme source d'énergie. Par contre, pendant la phase stationnaire, le substrat est utilisé presque exclusivement comme source d'énergie, pour le maintien en vie du champignon.

La production globale de lipases de la totalité des souches après 12h de culture a montré que :

- La production moyenne de lipases des 19 souches sauvages de *Rh. pusillus* a été de 3,4 U/g SS. Notamment, les souches 16a et 29a ont produit les activités les plus élevées de 6,1 et 7,5 U/gSS, respectivement. De plus, les souches de référence, de la même espèce, ont produit 9,3 U/gSS.
- Les souche sauvages 11a et 13a ont produit 1 et 6 U lipases/gSS, respectivement. Par contre, le reste des souches sauvages appartenant à *Rh. microsporus* n'en ont pas produit. De plus, Les souches de référence en ont produit 0,7 U/gSS.
- Les activités lipasiques les plus importantes ont été produites par les souches de *Rh. miehei*. Les souches de référence Rm182.67 et Rm370.65 en ont produit 65,5 et 57,6 U/gSS, respectivement. Cette production très élevée de lipases n'a pas encore été rapportée pour ces souches, étant donné que cette technique de FMS est appliquée pour la première fois.

Les effets de cinq composés, connus comme des inducteurs de la biosynthèse des lipases de la souche 16a (huile d'olive, acide oléique, stéaryl alcool, Triton X-100 et Tween 80), ont été étudiés. Il a été observé que seulement les FMS qui contenaient l'huile d'olive et l'acide oléique ont montrés une croissance abondante. Cette observation a été appuyée par les études respirométriques. La présence du stéaryl alcool, du Triton X-100, du Tween 80 et de la gomme arabique ont provoqué une diminution des activités respiratoires du champignon (entre 3 et 4 fois). Par contre, l'addition de l'acide oléique a entraîné une augmentation de cette activité (de deux fois).

Dans le cas des FMS contenant de l'huile d'olive et de l'acide oléique, une consommation simultanée du glucose et du substrat lipidique a été remarquée. De plus, pour ces FMS, la production de lipases a été augmentée de 6 et 8 fois obtenues après 15 et 24 h de culture, respectivement.

Pour les FMS additionnées avec : stéaryl alcool, Triton X-100, Tween 80 ou gomme arabique, une diminution de la production de lipases a été aperçue de 6, 13, 1.5 et 6 fois, respectivement. Ce qui montre que les seuls composés capables d'induire la synthèse de lipases chez la souche 16a (*Rh. pusillus*) est l'acide oléique et l'huile d'olive.

**PRODUCTION DE LIPASES EN  
FMS SUR DIVERS SUBSTRATS**



## 10. PRODUCTION DE LIPASES EN FMS SUR DIVERS SUBSTRATS

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la production des lipases peut être augmentée par la présence d'un inducteur (l'acide oléique ou l'huile d'olive). Cependant, nous avons considéré que cette production pourrait être aussi augmentée par l'incorporation de résidus des huileries qui pourraient avoir un rôle d'inducteur de la synthèse de l'enzyme et comme substrats solides en FMS.

Les substrats que nous allons tester sont les résidus qui résultent de l'extraction de l'huile d'olive et de coco. Ces sous-produits (le grignon d'olive et le tourteau de coprah de coco) sont peu coûteux et peuvent représenter dans la nature des problèmes écologiques.

Pour ces études, les souches, dont la production des lipases a été la plus importante ou en raison des caractéristiques catalytiques de l'enzyme (**chapitre 7**), ont été sélectionnées : *Rh. pusillus* (souches 8a et 16a), *Rh. microsporus* (souche 13a) et une souche de référence de *Rh. miehei* (Rm370.65).

Dans un premier temps, l'utilisation directe du grignon d'olive comme support et source de nutriments a été envisagée. Cependant, la capacité d'absorption d'eau de ce sous-produit est très limitée et l'humidité maximale est limitée à 50%. Par conséquent, une première série d'expériences a été planifiée afin d'obtenir la meilleure relation bagasse de canne à sucre/grignon d'olive afin d'obtenir le meilleur développement fongique en FMS. Les relations de bagasse/grignon d'olive de 0:100, 30:70 et 50:50, contenant respectivement 50%, 60% et 65% d'humidité ont été comparées. Les souches choisies pour ces expériences ont été la 13a et la 16a. Les conditions de culture ont été fixées comme dans le chapitre précédent, en ajoutant le même milieu de culture afin d'achever les humidités signalées ci-dessus.

La relation qui offre le meilleur développement pour les deux souches testées est la relation 50:50 de bagasse et grignon d'olive, contenant 65% d'humidité. Un développement abondant a été constaté après 20h de culture. D'ailleurs pour la relation 30:70, la souche 16a a été la seule à se développer après 40h de culture. Par contre, la croissance d'aucune des souches n'a été aperçue au bout de 92h de culture en utilisant une relation 0:100, ce qui confirme la limitation d'eau disponible pour la croissance (résultats non montrés).

Par conséquent, la relation utilisée pour les expériences postérieures a consistée en 50:50 de bagasse de canne à sucre et de grignon d'olive ou de coprah de coco.

Pour la mise en place des FMS (§3.5.2.3), les paramètres suivants ont été fixés au départ :

Humidité	65%
Quantité de support humide par réacteur	30g
Débit d'air	30 ml/ min
Inoculum	0,93x10 <sup>7</sup> spores/g de support sec
Température d'incubation :	47°C

## 10.1 Utilisations des grignons d'olive sur la production de lipases

L'effet de l'addition du grignon d'olive en FMS sur la biosynthèse des lipases a été étudié. Des cinétiques détaillées de la consommation des substrats (glucose, oxygène et acides gras), les synthèses des produits (protéines extracellulaires et celles contenues dans la biomasse, lipases et CO<sub>2</sub>), ainsi que l'évolution du pH des FMS ont été réalisées pour les souches 8a et 16a (*Rh. pusillus*), 13a (*Rh. microsporus*) et Rm370.65 (*Rh. miehei*).

### 10.1.1 Production de lipases par *Rh. pusillus* sur grignons d'olive

Dans les Figures 10.1 et 10.2 on observe que le métabolisme des souches 8a et 16a (*Rh. pusillus*) est rapide et après 30h, est pratiquement terminé. Cependant, cette vitesse métabolique n'est pas aussi rapide que dans le cas des FMS contenant uniquement la bagasse de canne à sucre comme support (chapitre 9). D'ailleurs, on remarque dans la Figure 10.1a que l'humidité est maintenue constante aux alentours de 65%.

Les productions de lipases obtenues pour les souches 8a et 16a sont de 35 et 25 U/g de support sec, respectivement. Ces productions sont largement augmentées par rapport aux FMS contenant comme support uniquement de la bagasse. En effet, les productions de lipases des souche 8a et 16a ont été augmentées de 13 et 4 fois respectivement (comparaison du Tableau 9.1 et de la Figure10,1c). Cependant, les lipases sont produites à des temps de fermentation plus longs que celles produites en utilisant uniquement la bagasse comme support en FMS. Dans ce cas, les lipases commencent à être produites à partir de 12h et la production maximale est obtenue à 24h de culture, contre 6h et 12h respectivement pour la FMS contenant uniquement la

bagasse. De plus, on remarque que l'enzyme possède une stabilité enzymatique élevée. L'activité enzymatique maximale est soutenue pendant 40 h (Figure 10.1c), ce que n'a pas été remarqué dans le cas de la FMS ne contenant que la bagasse (Figure 9.1c).

Dans ces FMS complétées avec du grignon d'olive, on observe que la synthèse des lipases est liée à l'augmentation du pH (Figure 10.1a), à la production des protéines extracellulaires (Figure 10.1b), à la consommation des acides gras (du grignon d'olive), à la synthèse de biomasse (protéines intracellulaires) (Figure 10.1d) et à la respiration (Figure 10.2).

Apparemment, le glucose n'est pas consommé totalement au moment de la synthèse de l'enzyme, ce qui est en opposition avec les résultats trouvés précédemment. Ce fait pourrait être expliqué par l'interférence d'autres composés provenant du grignon d'olive. En effet, au temps zéro de la culture solide, la concentration du glucose analysé par la méthode des sucres réducteurs (MILLER, 1959) correspond à 52 mg/gSS, cependant, le glucose réellement ajouté dans le milieu de culture est de 37 mg/gSS.

Par ailleurs, l'activité lipase maximale est mise en évidence lorsque :

- Les acides gras du grignon d'olive sont consommés totalement, ce qui suggère une induction de la lipase par ces acides gras (Figure 10.1c).
- La croissance fongique atteint son maximum (Figure 10.1d).
- La chute de l'activité respiratoire est ralentie (Figure 10.2).

Il faut souligner que l'évolution de la synthèse de la lipase présente un comportement similaire à celui montré par la croissance de la souche 8a (figures 10c et d). Ce qui suggère que si le champignon est cultivé en présence d'un inducteur, la lipase est produite issus d'un métabolisme primaire. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que ces souches montrent une préférence pour la consommation des acides gras. Même si le glucose était disponible dans le milieu de culture (§9.4), il serait possible que la consommation des acides gras entraîne l'induction immédiate des lipases.

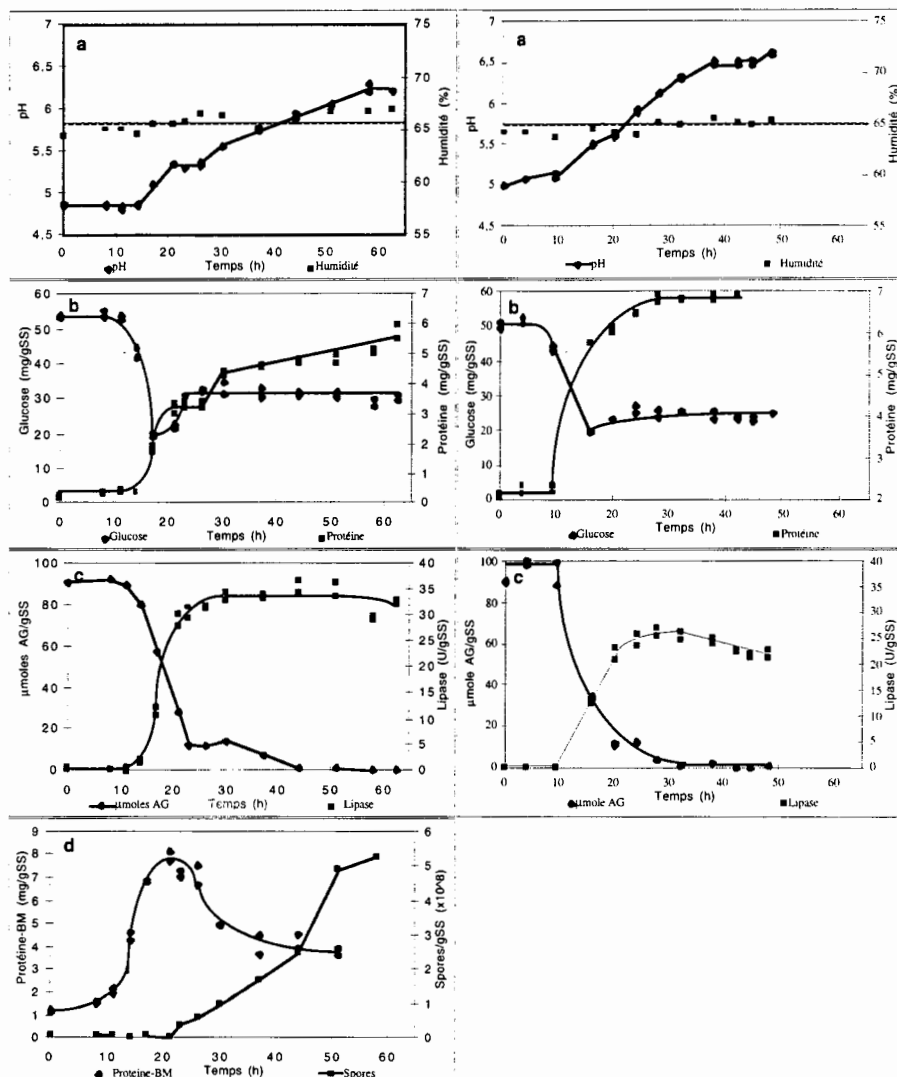


Figure 10.1 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 8a (à gauche) et 16a (à droite) en FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif. a) pH et humidité, b) consommation du glucose et production des protéines extracellulaires, c) consommation d'acides gras et production des lipases, d) production des protéines intracellulaire et sporulation.

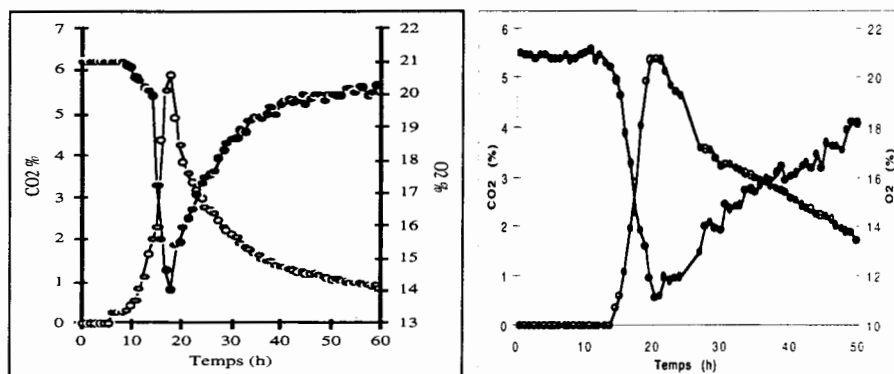


Figure 10.2 Respirométrie des souches 8a (à gauche) et 16a (à droite) au cours de la culture solide sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif. Les symboles vides et pleins correspondent respectivement au  $\text{CO}_2$  produit (%) et à l' $\text{O}_2$  consommé (%).

Par ailleurs, il faut signaler que l'activité respiratoire commence au même temps que la synthèse de la biomasse et que l'activité respiratoire maximale est détectée quand la biomasse atteint sa valeur maximale. Ce fait indique la fiabilité de l'analyse de la protéine fongique comme une méthode indirecte de la quantification de la biomasse (CORDOVA et coll., 1996). D'ailleurs, on remarque que la protéine de la biomasse atteint un maximum puis elle commence à diminuer (Figure 10.1d). Ce fait pourrait être expliqué d'une part par la lyse du mycélium, ce qui implique une libération des protéines vers le milieu de culture (Figure 10.1b) et d'autre part par le transport des protéines depuis les hyphes jusqu'aux structures fructifères du champignon. Etant donné que la méthode d'analyse des protéines contenues dans la biomasse est valable uniquement pour les protéines contenues dans la forme végétative du champignon, une fois que la sporulation commence et que les protéines de la biomasse sont transportées vers les spores, une diminution des protéines intracellulaires est observée. Ce phénomène peut être constaté dans la Figure 10.1d, où le nombre de spores augmente au fur et à mesure que la protéine de la biomasse diminue.

### 10.1.2 Production de lipases par *Rh. microsporus* sur grignons d'olive

Sous ces conditions de culture et en utilisant le grignon d'olive comme inducteur des lipases et comme source de nutriments, la souche 13a (*Rh. microsporus*) présente la même activité métabolique que les souches de *Rh. pusillus* (Figure 10.3). On remarque également que l'humidité est maintenue constante à 65% (Figure 10.3a).

Une production de lipases maximale de 140 U/g de support sec est obtenue au bout de 24h, ce qui représente une augmentation de 26 fois par rapport à la FMS analogue contenant uniquement la bagasse de canne à sucre comme support (comparaison du Tableau 9.2 et de la Figure 10.3c). Dans ce procédé de FMS, même si l'activité lipase tend à être inactivée, on remarque une stabilité enzymatique beaucoup plus prononcée que celle obtenue pour la FMS ne contenant que la bagasse (Figures 9.1c et 10.3c). L'activité enzymatique résiduelle, après 25 h d'obtenir l'activité maximale, représente un 65 % de celle-ci (Figure 10.3c).

Contrairement aux observations précédentes, on observe que l'augmentation du pH et la consommation des acides gras libres provenant du grignon d'olive sont faiblement corrélées à la synthèse des lipases (figure 10.3a et c). Par contre, la synthèse des protéines extracellulaires, la consommation totale du glucose et l'activité respiratoire offrent des éléments précieux qui prédisent le temps d'initiation de la synthèse enzymatique (figures 10.3 b, c et d).

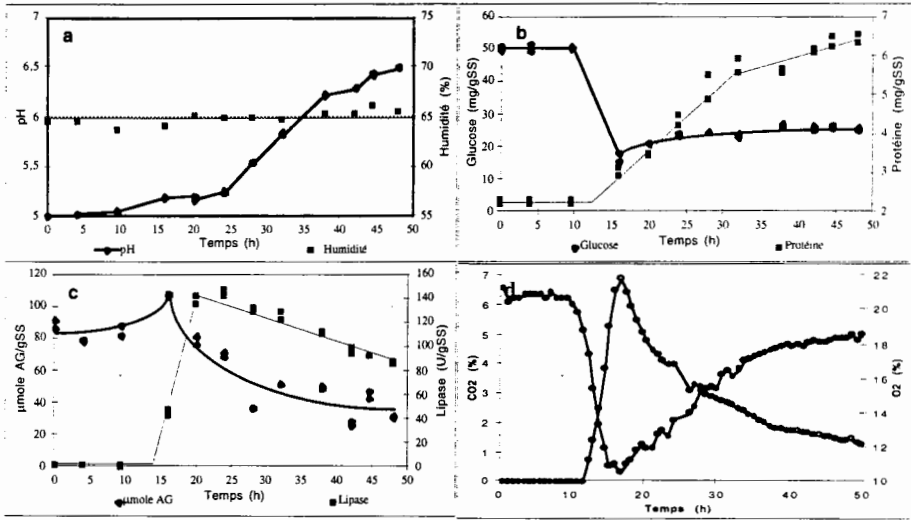


Figure 10.3 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de la souche 13a en FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif. a) pH et humidité, b) consommation du glucose et production de protéine, c) consommation des acides gras et production des lipases et d) respirométrie (les cercles vides et pleins correspondent respectivement au CO<sub>2</sub> produit et à l'O<sub>2</sub> consommé).

### 10.1.3 Production de lipases par *Rh. miehei* sur grignons d'olive

Pendant la culture de la souche de référence Rm370.65 (*Rh. miehei*), le développement, sous ces conditions, a été difficile. On a constaté que l'absence d'eau, suffisamment disponible, a joué un rôle déterminant dans le développement de cette souche. Dans le bioréacteur en forme de colonne, la croissance fongique a été aperçue progressivement du bas jusqu'au haut de la colonne. Cette façon particulière de coloniser la colonne est attribuée à l'entrée d'air, préalablement humidifié au fond de la colonne, qui a humidifié progressivement la matière solide dans le bioréacteur. Cette colonisation a été mesurée et schématisée dans la Figure 10.4d. Dans cette figure, on observe que la croissance commence après 24h de culture et avance linéairement jusqu'à la complète colonisation de la colonne au bout de 70h. De plus, cette colonisation a été mise en évidence par la mesure de la protéine intracellulaire (Figure 10.4d) et par la respirométrie (Figure 10.4 e).

La nécessité d'eau pourrait être, également, la cause de la faible activité métabolique trouvée au cours de cette FMS (Figure 10.4). En conséquence, les vitesses de consommation de substrats et de production de métabolites sont beaucoup plus faibles par rapport à celles obtenues pour les souches de *Rh. pusillus* et *Rh. microsporus* (figures 10.1, 10.3 et 10.4). Cependant, la production des lipases à 70h de culture a atteint une activité maximale de 140 U/gSS, laquelle est identique à celle obtenue pour la souche 13a (Figure 10.4c).

On remarque également que la lipase est couplée à la croissance (déterminée comme protéine intracellulaire) (Figure 10.4d), à la consommation des acides gras (Figure 10.4c) et à la respiration (Figure 10.4e).

Par contre, dans ce cas, l'évolution du pH, de la consommation du glucose et de la production de la protéine n'offrent aucune information permettant de prédire la synthèse des lipases.

Enfin, pour augmenter l'activité métabolique de cette souche, il serait nécessaire d'augmenter l'eau disponible dans la culture solide. Pour cela, il faudrait augmenter la relation bagasse de canne à sucre/grignon d'olive, afin de pouvoir augmenter le contenu d'eau.



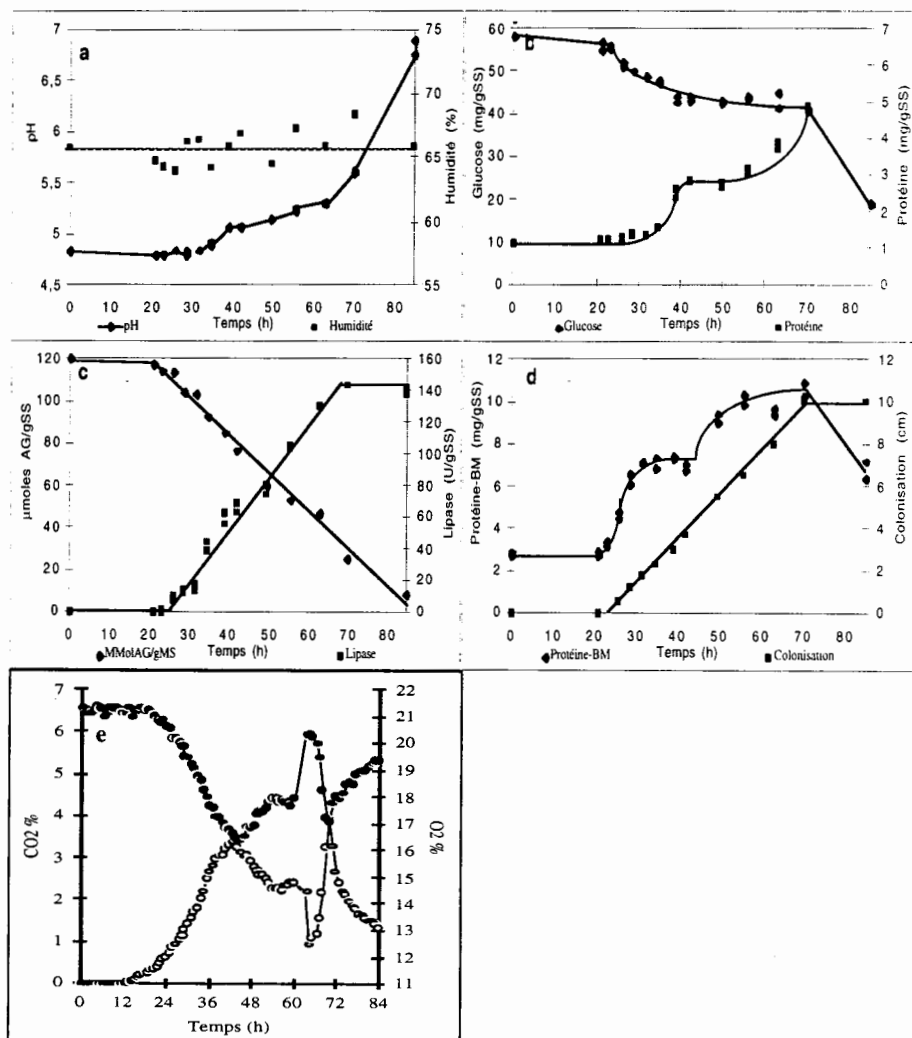


Figure 10.4 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de la souche Rm370.65 (*Rh. miehei*) FMS sur bagasse de canne à sucre, additionnée du grignon d'olive et imprégnés d'un milieu nutritif. a) pH et humidité, b) consommation du glucose et production de protéine, c) consommation des acides gras et production des lipases et d) Protéine intracellulaire et colonisation fongique sur la colonne de fermentation et e) respirométrie (les cercles vides et pleins correspondent respectivement au  $\text{CO}_2$  produit et à l' $\text{O}_2$  consommé).

## 10.2 Utilisation du coprah de coco pour la production de lipases

Dans cette section, l'effet du coprah de coco sur la production de lipases a été étudié chez les souches 8a (*Rh. pusillus*) et Rm370.65 (*Rh. miehei*). L'utilisation de ce sous-produit de l'industrie de l'huile a été considérée, étant donné que les souches sauvages ont été isolées des biotopes contenant ce sous-produit. Pour les FMS complétées avec le coprah de coco, les mêmes conditions de culture que pour les FMS complétées avec le grignon d'olive ont été reproduites, la seule différence a consisté en la substitution du grignon par la coprah, en utilisant la même relation (50:50) de bagasse de canne à sucre/coprah de coco.

Les résultats montrent que les cinétiques pour les deux champignons sont extrêmement rapides (Figure 10.5). Elles sont plus rapides que celles présentées par les FMS additionnées de grignon d'olive et aussi rapides que celles des FMS contenant uniquement de la bagasse de canne à sucre. Notamment, on remarque que l'humidité est contrôlée au même niveau que les FMS complétées avec le grignon (65%), ce qui implique que l'eau est plus disponible pour la croissance fongique en utilisant la coprah de coco ou bien que le grignon d'olive contient des autres composés qui empêchent un développement adéquat des champignons. Néanmoins, la cinétique présentée pour la souche 8a de *Rh. pusillus* est légèrement plus rapide à celle présentée pour la souche Rm370.65 de *Rh. miehei* (Figure 10.5).

En ce qui concerne la production des lipases, on observe que l'activité enzymatique maximale de la souche 8a représente un quart de l'activité maximale atteinte pour la même souche dans la FMS additionnée avec du grignon d'olive (10 U/gSS au bout de 20 h). Par contre, pour la souche Rm370.65, les activités maximales atteintes par les deux FMS (avec grignon ou avec coprah) sont similaires. Le grand avantage consiste à ce que la productivité soit augmentée de quatre fois. En effet, les productions maximales et les temps pour atteindre ces productions sont respectivement de 120 U/gSS et 15h pour la FMS additionnée avec du coco (Figure 10.5c) et 140 U/gSS et 70h pour la FMS additionné avec du grignon. La tendance de la Figure 10.5c indique une augmentation plus forte de l'activité lipasique à des temps d'incubation plus longs, mais malheureusement, dû à un incident, la culture a été arrêtée prématurément (à 15h).

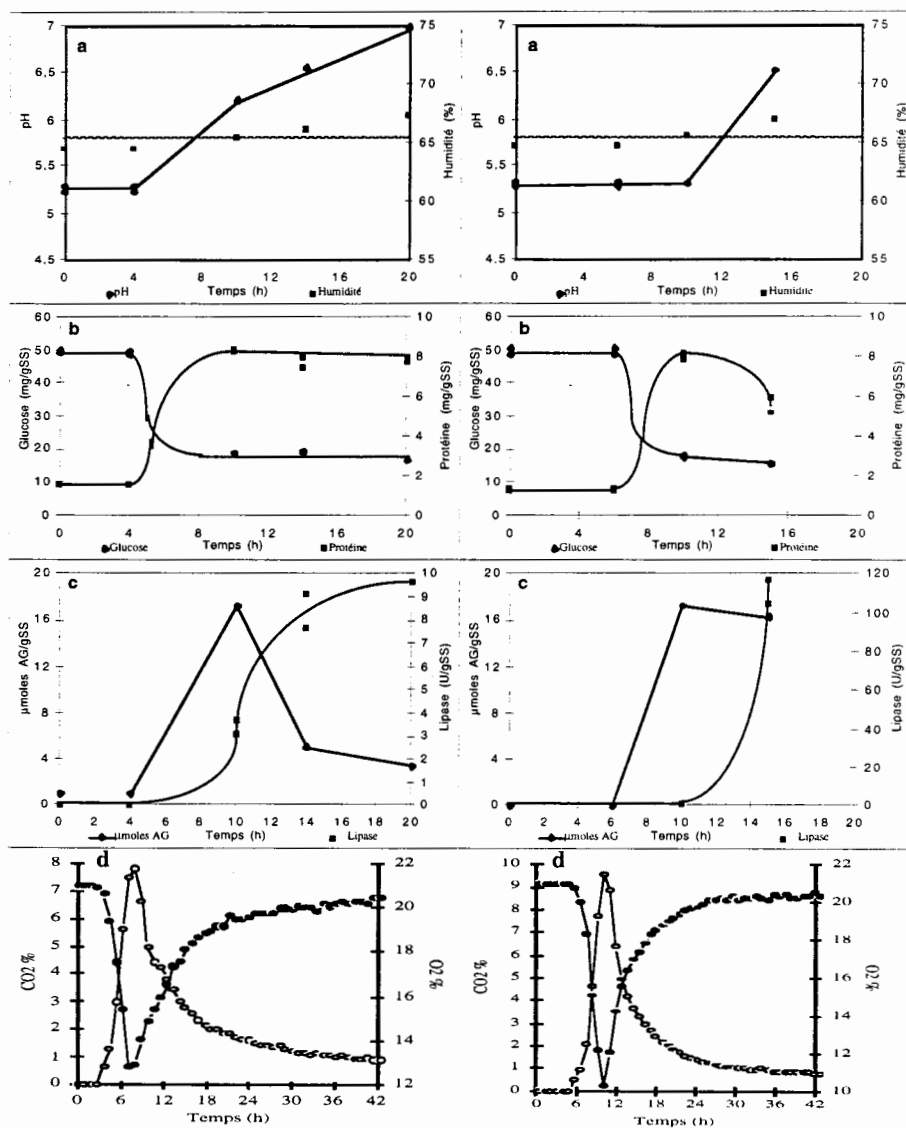


Figure 10.5 Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance des souches 8a (à gauche) et Rm370.65 (à droite) en FMS sur bagasse additionnée de la coprah de coco imprégnés d'un milieu nutritif. **a)** pH et humidité, **b)** consommation du glucose et production de protéine, **c)** consommation des acides gras et production des lipases et **d)** respirométrie (les cercles vides et pleins correspondent respectivement au CO<sub>2</sub> produit et à l'O<sub>2</sub> consommé).

### 10.3 Conclusion

Avec le mélange (50:50) de la bagasse à canne sucre et des sous-produits de l'industrie de l'huile (le grignon d'olive et le coprah de coco), dans un procédé en FMS, les productions en lipases ont été largement augmentées par rapport à celles ne contenant que la bagasse à canne sucre comme support. Cependant, cette augmentation a été variable selon la souche testée. L'addition du grignon d'olive a augmenté la production de lipases à 13, 4, 26 et 2.5 fois (35, 25, 140, 140 U/gSS), pour les souches 8a, 16a, 13a et Rm370.65 respectivement. Ces productions ont été obtenues après 24 h de culture pour les souches 8a, 16a et 13a, et après 70 h de culture pour la souche de Rm370.65.

Quand le grignon d'olive a été substitué par le coprah de coco en FMS, des résultats similaires de la production des lipases ont été obtenus pour la souche Rm370.65. Cependant, un grand avantage a été remarqué quand cette substitution a été réalisée, en ce qui concerne la cinétique de production. En effet, au bout de 24h la FMS était pratiquement terminée. Par conséquent, une amélioration de la productivité des lipases a été obtenue car la production maximale de 120 U/gSS a été atteinte après 15h de culture. Par contre, pour la souche 8a, une diminution de la production de lipases (9 U/gSS) a été remarquée. Cependant, la cinétique de cette culture est similaire à celle obtenue pour la souche Rm370.65.

De plus, on a remarqué que les lipases produites par les FMS additionnées de sous-produits de l'industrie de l'huile ont montré une très forte stabilité enzymatique au cours de la culture.

Pour chaque souche étudiée, les analyses du pH, de la concentration de protéines extracellulaires et intracellulaires, du glucose consommé, des acides gras libres et de la respiration fournissent des éléments précieux pour prédire la synthèse des lipases. Notamment, cette synthèse a été fortement corrélée à la croissance, mise en évidence par la concentration de protéines intracellulaires et par l'activité respiratoire.

Ces productions et productivités en lipases sont très élevées et concurrencent favorablement avec la majorité de celles rapportées par d'autres champignons hyper-producteurs (HATZINIKOLAOU et coll., 1996). Ces résultats montrent donc l'application de la FMS pour la valorisation des déchets de l'agro-industrie.

**PRODUCTION COMPAREE DE  
LIPASES**

## 11. PRODUCTION COMPAREE DE LIPASES

Dans ce dernier chapitre de résultats et discussion, la production de lipases des souches de champignons thermophiles et thermotolérants a été comparée dans des conditions de culture différentes. Cette comparaison a été faite, tout d'abord pour montrer clairement les avantages de la culture solide par rapport à la culture liquide, ensuite pour mettre en évidence les caractéristiques de chaque souche et enfin pour établir les meilleures conditions de culture pour la production de lipases par ces champignons.

Quatre souches sélectionnées grâce à leurs productions de lipases ou aux caractéristiques catalytiques de leurs lipases produites (*Rh. pusillus* - 8a, 16a -, *Rh. microsporus* -13a- et *Rh. miehei* -Rm370.65-) ont été cultivées, soit en milieu liquide soit en FMS, en utilisant comme support solide (imprégné du même milieu nutritif utilisé pour les cultures liquides) : i) La bagasse de canne à sucre (FMS I). ii) Un mélange 50:50, bagasse/grignon d'olive (FMS II). iii) Un mélange 50:50, bagasse/tourteau de coprah (FMS III). Afin de réaliser ces comparaisons, les productions de lipases obtenues en FMS (U/gSS) ont été exprimées en unités par ml de milieu de culture absorbé dans le support solide.

Les résultats obtenus lors de la culture de quatre souches en milieu liquide ou en FMS ont été rassemblés sur le Tableau 11.1. Dans ce tableau, on remarque que la production de lipases est nettement plus élevée en FMS qu'en culture liquide. On observe également que les temps d'incubation nécessaires pour l'obtention de ces productions sont plus courts en FMS. Il faut souligner que la souche *Rh. miehei* (Rm370.65) n'a pas produit de lipases en culture liquide. En revanche, pour la même souche, la production de lipases en FMS a été très élevée, ce qui montre clairement les différences entre les deux types de culture.

Parmi les FMS réalisées, on remarque que la production de lipases la plus élevée correspond à celle obtenue par la FMS II, en utilisant les souches 13a et Rm370.65 (75 U/ml). Cette production est atteinte au bout 24h pour la souche 13a et après 70h pour la souche Rm370.65, ce qui représente, pour la souche 13a, une amélioration de 3 fois la productivité atteinte pour la souche Rm370.65.

Il faut souligner que la souche Rm370.65 est un champignon thermophile qui a été isolée et déposée par NOVO dans la collection CBS, pour ses performances de production de lipases.

Ce qui explique les énormes productions de lipases atteintes pour cette souche, au cours de ce travail.

Tableau 11.1 Comparaison entre les productions maximales de lipases (U/ml) et les temps de culture (h) nécessaires pour les obtenir, pour quatre souches de champignons, cultivées en milieu liquide (CL) et en FMS.

Souches	Temps de culture (h) pour l'obtention de la production maximale de lipases				Productions de lipases (U/ml)			
	CL	FMS I	FMS II	FMS III	CL*	FMS I	FMS II	FMS III
8a	120	12	24	11	0,1	1	19	5
16a	150	12	24	ND	0,1	2	14	ND
13a	24	12	24	ND	0,6	2	75	ND
Rm370.65	-	12	70	15	0	19	75	65

FMS I : FMS contenant uniquement la bagasse de canne à sucre imprégnée avec un milieu de culture

FMS II : FMS contenant un mélange bagasse de canne à sucre : grignon d'olive (50:50)

FMS III : FMS contenant un mélange bagasse de canne à sucre : coprah de coco (50:50)

ND = non déterminée

CL\* activité extracellulaire, en utilisant un inoculum de  $5 \times 10^8$  spores/ml de milieu

Les productivités de lipases, les plus élevées, ont été obtenues en cultivant la souche 13a avec la FMS II et la souche Rm370.65 avec la FMS III (0,7 et 0,96 U/ml.h, respectivement). Ces productivités sont similaires à celle rapportée par CHRISTEN et coll. (1995) en utilisant *Rh. delemar* cultivé sur une résine (amberlite) imbibée de milieu nutritif.

L'augmentation de la production de lipases obtenue grâce à l'incorporation de grignon d'olive ou de tourteau de coprah, pourrait être expliquée non seulement par l'addition d'un inducteur dans le milieu de culture, sinon aussi par l'incorporation d'un substrat complémentaire. Un développement du mycélium beaucoup plus abondant a été mis en évidence à l'œil nu et au microscope dans le cas des FMS additionnées avec les résidus de l'olive ou du coco, par rapport aux FMS contenant uniquement le milieu de culture absorbé dans la bagasse de canne à sucre (Photos 10, 11, 12 et 13). Ce milieu plus riche pourrait également expliquer la stabilité enzymatique conservée pendant la durée de la culture en FMS, étant donné que le champignon n'aurait pas besoin de consommer ses propres protéines à cause de l'épuisement de nutriments à la fin de la culture. Ces faits méritent une étude approfondie pour l'optimisation du milieu de culture.

La production de lipases de *Rh. pusillus* (8a et 16a) est inférieure à la production atteinte par *Rh. microsporus* (13a) et par *Rh. miehei* (Rm370.65). Cependant, il est important de souligner que l'intérêt de produire les lipases de *Rh. pusillus* concerne les caractéristiques catalytiques de leurs enzymes, à savoir, la thermostabilité (températures de catalyses supérieures à 80°C), les pH alcalins (pH 9) et la stabilité vis-à-vis des détergents. Néanmoins, les caractéristiques catalytiques de la lipase de la souche 13a sont également remarquables, étant donné la gamme variée des températures d'utilisation ( $\leq 10^{\circ}\text{C}$  et  $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ). De plus comme il a été suggéré dans la section 7.4, parmi les lipases produites par cette souche, on pourrait y trouver une lipase spécifique pour l'hydrolyse de la position C2 du triglycéride. Ce fait est de capitale importance, puisque jusqu'à présent, il n'existe pas de lipase rapportée ayant cette propriété. La spécificité C2 de la lipase de la souche 13a reste à vérifier avec la purification des différentes lipases contenues dans l'extrait enzymatique cru et avec l'analyse des spécificités de chaque lipase purifiée. Cependant, il faut signaler que ces lipases sont extrêmement sensibles à la présence de tensio-actifs (Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Nonidet p-40), de telle sorte, que leur application comme additifs dans les détergents est écartée. Néanmoins, leur utilisation dans l'industrie alimentaire et chimie est très prometteuse.

Enfin, la production élevée de lipases des souches 13a et Rm370.65 et le temps court nécessaire pour la produire, en FMS, devraient contribuer pour leur sélection dans un procédé industriel. De plus, le caractère thermotolérant de la souche 13a est tout à fait convenable pour la production industrielle de lipases en FMS, en utilisant des sous-produits agro-industriels.





**Photo 10** Comparaison de la croissance des souches 13a et 16a après deux jours culture dans les colonnes obtenues à partir des différents procédés de FMS. De gauche à droite : 1) Témoin (Bagasse de canne à sucre sans croissance fongique). 2) FMS ne contenant que la bagasse imprégnée du milieu. 3) FMS contenant un mélange bagasse /grignon d'olive (Souche 13a). 4) FMS contenant un mélange bagasse /grignon d'olive (Souche 16a).



**Photo 11** Témoin : Bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu au temps zéro de culture



**Photo 12** FMS contenant la bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu après deux jours culture (Souche 13a).



**Photo 13** FMS contenant un mélange bagasse de canne à sucre/grignon d'olive après deux jours de culture (Souche 13a).

## **CONCLUSIONS GENERALES**

## 12 CONCLUSION GENERALE

La conception de ce travail repose sur l'observation que les champignons thermophiles présentent des vitesses de croissance élevées à des températures d'incubation élevées. De ce fait, on pourrait supposer que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide, en particulier, la production de leurs enzymes. Etant donné l'adaptation de ces champignons à des températures élevées, on pourrait également supposer que leurs enzymes produites seraient thermostables. Par ailleurs, on sait que les lipases ont des propriétés très diverses (spécificité d'hydrolyse pour la position et la nature de l'acide gras, le pH optimum, la thermostabilité, etc) qui découlent de leur origine de production. Ce qui suggère qu'une lipase spécifique pour un procédé pourrait être recherchée chez un micro-organisme nouveau.

A partir de ces trois hypothèses, nous avons structuré la présente thèse. Tout d'abord, des souches de champignons thermophiles et thermotolérants ont été isolées et quelques aspects physiologiques de ces souches ont été étudiés. Ensuite, la synthèse d'estérases et de lipases des souches a été mise en évidence, une méthodologie d'analyse de lipases a été proposée et les caractéristiques catalytiques de ces enzymes ont été déterminées. Enfin, pour la production de lipases, ces champignons ont été cultivés en milieu liquide et en FMS. Afin d'augmenter cette production, différents inducteurs et sous-produits de l'industrie de l'huile ont été incorporés, dans le milieu de culture, au cours des procédés de FMS.

Au niveau de la recherche bibliographique, nous avons trouvé de nombreuses publications qui signalent l'existence d'une corrélation entre la thermophilie des champignons et la thermostabilité de leurs protéines. De plus, nous avons constaté que les champignons thermophiles connus, à nos jours, ne représentent qu'une trentaine d'espèces.

L'analyse bibliographique nous a également montré que l'utilisation des lipases est très variée et leur application exhaustive, dans les procédés industriels, s'accroît chaque jour. Cependant, le principal obstacle qui freine ces applications potentielles repose dans le coût de ces enzymes. Pour cette raison, il est impératif de chercher de nouvelles voies de production des lipases afin de diminuer leurs coûts de production.

Nous avons constaté que les applications concernant les cultures de champignons en FMS sont nombreuses. Néanmoins, nous n'avons pas trouvé de travaux concernant la production de lipases des champignons thermophiles par FMS.

Afin de chercher de nouvelles souches de champignons thermophiles, nous avons conçu une stratégie d'isolement en utilisant un milieu d'enrichissement et une température d'incubation de 50°C. Avec ces conditions de culture, 44 souches des champignons filamenteux ont été isolées, à partir d'échantillons prélevés dans les zones tropicales du Mexique. Pour identifier ces souches isolées, leurs caractères cultureux et morphologiques

ont été comparés à ceux de quatre souches de référence. Nos souches ont été identifiées comme *Rhizomucor pusillus* (19), *Rhizopus microsporus* (6) et *Aspergillus fumigatus* (19). Cette identification nous a permis de classer ces souches sauvages et d'éliminer les pathogènes (*A. fumigatus*). Parmi les souches appartenant à *Rh. microsporus*, quatre ont été rapprochées à la variété *rhizopodiformis*. Par contre, deux autres souches de *Rh. microsporus* ont montré une notable différence, leur caractère homothallique, qui les excluent de cette variété.

Pour déterminer la thermophilie ou la thermotolérance de l'ensemble des souches isolées, elles ont été cultivées sur des milieux gélosés à différentes températures. Les températures cardinales de la croissance pour les différentes espèces sont les suivantes :

Espèces	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
<i>Rhizomucor pusillus</i>	<20	45	61
<i>Rhizopus microsporus</i>	11	45	52-61
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15	40	58

Etant donné que toutes les souches sont capables de se développer à 50°C, les souches appartenant à *Rh. pusillus* sont classées comme thermophiles car cette espèce se développe difficilement à 20°C. Cet aspect est clairement mis en évidence grâce à l'observation des longs temps de germination de spores à 20°C. Par contre, les souches de *Rh. microsporus* et *A. fumigatus* sont classées comme des champignons thermotolérants, car elles sont capables de germer et de se développer rapidement à des températures inférieures à 20°C.

Au cours de ces études, nous avons trouvé que *Rh. microsporus* présente les vitesses de croissance apicale les plus élevées (0,8 mm/h). De plus, cette espèce montre un grand seuil pour son développement optimum à des températures élevées (de 30 à 45°C). Cette caractéristique offre des nouvelles possibilités pour leur utilisation dans les procédés de FMS.

Cette étude a également montré que les énergies d'activation présentées pour *Rh. pusillus*, *Rh. microsporus* et *A. fumigatus* sont de 15, 15 et 20 Kcal/mole, respectivement. De plus, les énergies d'inactivation sont de 57 ; 52 et 105 ; et 33 Kcal/mole, respectivement. Ces valeurs montrent l'influence de la température sur la croissance fongique et ne reflètent pas la thermotolérance ou la thermophilie des champignons. A des températures inférieures à la température optimale de croissance, la réaction biochimique qui limite la croissance d'*A. fumigatus*, est celle qui a le plus besoin d'énergie pour s'achever, parmi toutes les espèces. A des températures supérieures à l'optimale, les enzymes qui limitent les réactions biochimiques de croissance sont rapidement dénaturées pour *Rh. pusillus* et particulièrement pour *Rh. microsporus*.

Une étude physiologique sur les caractéristiques nutritionnelles des souches sur milieux gélosés a montré que l'ensemble de souches sont susceptibles de produire des amylases et des lipases. Afin de constater la biosynthèse des lipases, un premier criblage des souches a été réalisé sur des milieux gélosés contenant essentiellement du Tween 20 et du

CaCl<sub>2</sub>. Grâce à la formation d'un précipité autour des colonies, la présence d'estérases a été mise en évidence. Il a été apprécié que toutes les souches sont capables de produire des estérases dans un grand intervalle de températures (<20 à 55°C). Pour les souches de *Rh. pusillus* et d'*A. fumigatus*, la vitesse de formation du précipité suit un comportement similaire à celui présenté par la vitesse de croissance apicale. Par contre, pour les souches de *Rh. microsporus*, ces vitesses diffèrent. De plus, pour les souches 10b et 27a, une très grande plage de température est observée (de 35 à 51°C), pendant laquelle la vitesse de formation du précipité est maintenue. Cette caractéristique remarquable de pouvoir produire indifféremment les estérases dans une grande marge des températures élevées représente un notable intérêt. Etant donné que cette technique n'offre pas de résultats quantitatifs, on n'a pas pu sélectionner une souche performante.

Dans la culture d'un champignon filamenteux, les spores représentent la source de l'inoculum. En FMS, l'indice de sporulation d'un champignon revêt une importance capitale due aux concentrations élevées des spores inoculées. Ces concentrations peuvent être dix fois supérieures à celles inoculées en milieu liquide. Pour cette raison, la production de spores des souches thermophiles a été étudiée. Il a été montré que les meilleures sporulations des souches sont obtenues à des températures modérées. A une température d'incubation de 30°C, les sporulations obtenues ont été de  $7,6 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour les souches de *Rh. pusillus* et de  $3,6 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour les souches de *Rh. microsporus*.

Avant d'aborder la production de lipases, une technique d'analyse a été mise au point pour mesurer l'activité enzymatique. Postérieurement, les caractéristiques catalytiques des lipases ont été étudiées. Pour cette étude, les extraits enzymatiques crus de *Rh. pusillus* et de *Rh. microsporus* ont été utilisés. Il a été montré que :

- Les extraits enzymatiques bruts de la totalité des souches ne présentent aucune spécificité d'hydrolyse au niveau de la position C1, C2 et C3 de la liaison acyl-ester des triglycérides.
- A 47°C, l'activité lipasique de *Rh. pusillus* (souches 7a et 8a) présente un pH optimum entre 8,5 et 9. A un pH constant de 9, cette activité présente un maximum de températures comprises entre 45 et 80°C. Dans cette marge de températures, les vitesses initiales de l'hydrolyse des triglycérides ne sont pas modifiées. Cependant, au fur et à mesure que la température de la réaction est augmentée, la stabilité de ces enzymes est affectée.
- L'extrait enzymatique de *Rh. microsporus* (13a) présente une grande capacité catalytique, d'une part à des températures inférieures à 10°C et supérieures à 60°C, et d'autre part, à des pH inférieurs à 5 et supérieurs à 10,5. L'optimum d'hydrolyse pour cet extrait enzymatique est situé à pH 8 et à 40°C.

Cette étude a également montré que les énergies d'activation pour les extraits lipasiques des souches 7a et 8a (à pH 8,7) sont de 12 et 18 Kcal/mole, respectivement ; et celle de l'extrait de la souche 13a (à pH 8) est de 4 Kcal/mole. Ce qui montre que la vitesse

de la réaction catalysée par la lipase de *Rh. pusillus* est plus influencée par la température que celle de *Rh. microsporus*.

Pour la production de lipases, nous avons cultivé les différentes souches en milieu liquide et en FMS :

En culture liquide, l'activité métabolique de *Rh. microsporus* est plus rapide que celle présentée par *Rh. pusillus*. L'activité lipasique maximale est atteinte après un jour de culture pour *Rh. microsporus* et après six jours pour *Rh. pusillus*. En revanche, *Rh. miehei* ne produit pas de lipases sous ces conditions de culture ; malgré le fait que cette souche soit décrite comme une souche productrice de lipases. De plus, nous avons montré que la synthèse de la lipase est directement liée à l'évolution de quatre paramètres : la production des protéines, l'augmentation de la biomasse, la consommation du glucose et le pH. En effet, la production des lipases des souches commence une fois que le glucose du milieu de culture est complètement consommé, la biomasse atteint la phase stationnaire, le pH du milieu et la concentration en protéines atteignent les valeurs les plus faibles.

La production de lipases intracellulaires et extracellulaires globales de la totalité des souches, mesurées après cinq jours de culture, a montré que *Rh. pusillus* a produit des quantités très faibles de lipases extracellulaires (0,03 U/ml). Par contre, *Rh. microsporus* (13a) a produit les concentrations les plus élevées en lipases extracellulaires (0,5 U/ml). Cependant, cette souche conserve intracellulairement une grande proportion des lipases totales produites (90% d'un total de 5,7 U/ml).

La taille de l'inoculum présente une faible influence sur la production totale de lipases. Cependant, un effet de la taille de l'inoculum a été constaté sur le temps nécessaire pour sa production. En effet, *Rh. microsporus* (13a) montre une activité lipase extracellulaire maximale (0,5 U/ml) après deux jours de culture, en utilisant un inoculum de  $5 \times 10^5$  spores/ml, tandis qu'elle met un jour de culture pour cette synthèse, quand un inoculum de  $5 \times 10^6$  spores/ml est utilisé.

En FMS, la production de lipases est liée à l'évolution de : la production de protéines, la croissance, la consommation du glucose, l'augmentation du pH et la respirométrie. La respirométrie a permis de mettre en évidence les différentes étapes du développement fongique, le moment de la biosynthèse de lipases et l'évolution globale du procédé.

Les FMS en utilisant comme support la bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu de culture ont montré que le métabolisme des souches est extrêmement rapide : le démarrage de la croissance a eu lieu à 4h de culture et l'activité métabolique se termine pratiquement après 12h de culture. La biosynthèse de lipases commence après 6h de culture et l'activité maximale est obtenue après 12 h de culture. Cependant, une fois que la production maximale des lipases est atteinte, l'activité lipasique de ces champignons disparaît rapidement. La production de lipases après 12 h de culture est de 6 U lipases /gSS pour *Rh. pusillus* (16a) et pour *Rh. microsporus* (13a). L'activité lipasique la plus importante (62 U/gSS) est produite



par *Rh. miehei* sous ces conditions de culture. Cette production très élevée de lipases n'a pas encore été rapportée pour ces souches, étant donné que cette technique de FMS est appliquée pour la première fois.

Afin d'augmenter la production de lipases, l'effet de six composés (huile d'olive, acide oléique, stéaryl alcool, Triton X-100, Tween 80 et gomme arabique) et l'addition d'autres substrats solides sur la biosynthèse des lipases ont été étudiés.

Il a été observé que les seules FMS qui ont montrées une croissance abondante, ont été celles qui contenaient l'huile d'olive et l'acide oléique. Le stéaryl alcool, le Triton X-100, le Tween 80 et la gomme arabique (rapportés comme des inducteurs de la biosynthèse de lipases) ont inhibé la croissance de *Rh. pusillus* (16a), ainsi que la production de lipases. Egalement les activités respiratoires ont diminué entre 3 et 4 fois en présence de ces composés. De plus, la production de lipases a été diminuée de 6, 13, 1.5 et 6 fois respectivement pour chacun de ces composés testés. Dans le cas des FMS contenant de l'huile d'olive et de l'acide oléique, les productions de lipases ont été augmentées de 6 et 8 fois, respectivement. Pour ces FMS, une consommation simultanée du glucose et du substrat lipidique a été remarquée.

Les productions de lipases ont été largement augmentées, en mélangeant (50:50) la bagasse de canne à sucre et des sous-produits de l'industrie de l'huile (grignon d'olive et coprah de coco). De plus, on a remarqué que les lipases produites dans ces FMS ont montré une remarquable stabilité enzymatique au cours de la culture. Cependant, les augmentations des productions de lipases sont variables selon la souche étudiée. L'addition du grignon d'olive a augmenté les productions de lipases par rapport à leurs respectives FMS ne contenant que la bagasse de canne à sucre comme support à 13, 4, 23 et 2.5 fois (35, 25, 140, 140 U/gSS), respectivement, pour les souches 8a, 16a, 13a et Rm370.65. D'ailleurs, les productions maximales de lipases ont été obtenues après 24 h de culture pour les souches 8a, 16a et 13a, et après 70 h pour la souche de Rm370.65.

Quand le grignon d'olive a été substitué par le coprah de coco en FMS, des résultats similaires de la production des lipases ont été obtenus pour la souche Rm370.65. Cependant, un grand avantage a été remarqué, concernant l'augmentation de l'activité métabolique. En effet, au bout de 24h la FMS a été pratiquement terminée et une amélioration de la productivité des lipases de quatre fois a été obtenue. Par contre, pour la souche 8a, une diminution de la production de lipases (9 U/gSS) a été remarquée. Cependant, une activité métabolique similaire à celle obtenue pour la souche Rm370.65 a été aperçue.

Ces productions et les productivités en lipases sont très élevées et dépassent la majorité de celles rapportées pour d'autres champignons hyper-producteurs. Ces résultats montrent donc les avantages de la FMS pour valoriser les déchets de l'agro-industrie.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

### 13 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDEL HAFEZ, A.I.I., MOHARRAM, A.M.M. ABDEL MALLEK, A.Y. 1987. Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of Umbelliferae from Egypt [caraway, cummin, fennel, anise, coriander]. *Cryptogamie Mycologie*. **8** : 315-320.
2. ABDEL HAFEZ, S.I.I., ABDEL HAFEZ, A.I.I. ABDEL KADER, M.I.A. 1983. Composition of the fungal flora of Syrian soils, 4: thermophilic fungi. *Mycopathologia*. **81** : (3) 177-181.
3. ADAMS, P.R. DEPLOEY, J.J. 1978. Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia*. **70** : (4) 906-910.
4. AIBA, S., HUMPHREY, A.E. MILLIS, N.F. 1973. Kinetics. En 'Biochemical Engineering'. Academic Press. New York. 92-127.
5. AIDOO K.E, HENDRY R., WOOD J.B. 1982. Solid substrate fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. **28** : 201-237.
6. AINSWORTH, G.C. 1968. Fungal Parasites of Vertebrates. En 'The Fungi'. Academic Press. London. Vol. III. Fungal Population . 211-224.
7. AIRES-BARROS M.R., TAIPA M.A. & CABRAL J.M.S. 1994. Isolation and Purification of Lipases. En 'Lipases, their Structure, Biochemistry and Application'. Ed. P. WOOLLEY & S.B. PETERSEN. Cambridge University Press. Cambridge. 271-288.
8. ALEXOPOULOS C.J. & MIMS C.W. 1979. Subdivision Zygomycotina. En 'Introductory Mycology'. John Wiley & Sons. New York. 191-228
9. ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W. & BLACKWELL M. 1996a. Phylum Zygomycota. En 'Introductory Mycology'. John Wiley & Sons. New York. 127-171
10. ALEXOPOULOS CJ, MIMS CW & BLACKWELL M. 1996b. Fungal Systematics. En 'Introductory mycology'. John Wiley & Sons, Inc. New York. 61-85.
11. ANAND L, VITHAYATHIL PJ. 1996. Xylan-degrading Enzymes from the Thermophilic Fungus *Humicola lanuginosa* : Action pattern of xylanase and Beta-glucosidase on xylan, xylooligomers and arabinoxylooligomers. *J. Ferment. Bioeng.* **81** : (6) 512-517
12. ARBIGE, M.V. & PITCHER, W.H. 1989. Industrial Enzymology: a look towards the future. *Trends Biotechnol.* **7** : 330-335.
13. ARIMA, K; LIU, WH &, BEPPU T. 1972. Isolation and Identification of the Lipolytic and Thermophilic Fungus. *Agr. Biol. Chem.* **36** : (11) 1913-1917.
14. BAJRACHARYA R., MUDGETT R.E. 1980. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnology and Bioengineering*. **22** : 2219-2235.
15. BALDENSPERGER, J., LE MER J., HANNIBAL, L. AND QUINTO, P.J. 1985. Solid state fermentation of banana wastes. *Biotechnol. Lett.* **7** : 743-748.
16. BARBIER, G. 1994. Micro-organismes Thermophiles et Enzymes Thermostables. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **9** : 13-18.
17. BARRIOS-GONZALEZ, J., TOMASINI, A., VINIEGRA-GONZALEZ, G. AND LOPEZ, L. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* **10** : 793-798.
18. BARSTOW L.M., DALE B.E., TENDERDY R.P. (1988) Evaporative temperature and moisture control in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Techn.* **2** : (4) 237-242.
19. BELL, G, TODD, J. 1981. Hydrolysis of Triglyceride by Solid Phase Lipolytic Enzymes of *Rhizopus arrhizus* in Continous Reacteur Systems. *Biotechnol. Bioeng.* **23** : 1703-1719.
20. BEN SALAH, A, FENDRI, K. & GARGOURY Y. 1994. La Lipase de *Rhizopus oryzae* : Production, Purification et Caractéristiques Biochimiques. *Revue Française des Coprs Gras.* **41** : (5-6) 133-137
21. BENZONANA, G. & ESPOSITO, S. 1971. On the Positional Specificity of *Candida cylindracea* lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* **213** : 15.

22. BOCQUET, J. 1993. Généralités sur les micro-organismes. En 'Biotechnologie'. Ed. R. SCRIBAN. Tec. Doc. Lavoisier. Paris. 38-46.
23. BOTTON, BRETON, FEVRE, GUY, LARPENT et VEAU. 1985a. Clés de détermination de groupes et genres traités. En Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson - Paris. 48-75.
24. BOTTON, BRETON, FEVRE, GUY, LARPENT et VEAU. 1985b. Synthèse des Métabolites et Biotransformation. En : Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson - Paris. 292-312.
25. BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72** : 248-254
26. BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. MENGE, U. 1990. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. *Nature*. **343** : 767-770.
27. BROCK, T.D., MADINGAN, M.T., MARTINGO, J.M. & PARKER, J. 1994a. Métabolisme, Biosynthesis and Nutrition. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 89-124.
28. BROCK, T.D., MADINGAN, M.T., MARTINGO, J.M. & PARKER, J. 1994b. Growth and Its Control. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 321-360.
29. BROCK, T.D., MADINGAN, M.T., MARTINGO, J.M. & PARKER, J. 1994c. Major Microbial Diseases. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 524-574.
30. BROCK, T.D., MADINGAN, M.T., MARTINGO, J.M. & PARKER, J. 1994d. Eukarya : Eukaryotic Microorganisms. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 843-856.
31. BRUSHAN B., DOSANJH K., KUMAR K. HOONDAL G.S. 1994. Lipase Production from an Alkalophilic Yeast sp. by Solid State Fermentation. *Biotechnol. Letters*. **16**: (8) 841-842.
32. BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, U., Z.S., DODSON, G.G., LAWSON, D.M., TURKENBURG, J.P., BJORKLING, F., HUGE-JENSEN, B., PATKAR, S.A. & THIM, L. (1991). A model for Interfacial Activation in Lipases from the Structure of a Fungal Lipase Inhibitor Complex. *Nature*. **351** : 491-494.
33. BRZOZOWSKI, A.M. 1993. Crystallization of a *Humicola lanuginosa* lipase-inhibitor complex with the use of polyethylene glycol monomethyl ether. *Acta crystallographica*. **49** : (3) 352-354.
34. CALAM, C.T., DRIVER, N. & BOWERS, R.H. 1951. Studies in the Production of Penicillin, respiration and growth of *Penicillium chrysogenum* in Submerged Culture, in relation to Agitation and Oxygen Transfer. *J. Appl. Chem*. **1** : 209
35. CAMPOS, L. FELIX, C.R. 1995. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. *Appl. Environ. Microbiol*. **61** : (6) 2436-2438.
36. CARLILE MJ & WATKINSON, S.C. 1996a. The Fungi as a Major Group of Organisms. En: 'The Fungi'. Academic Press. London. 1-7.
37. CARLILE MJ & WATKINSON, S.C. 1996b. Fungal Cells and Vegetative Growth. En: 'The Fungi'. Academic Press. London. 121-139.
38. CARLILE MJ & WATKINSON S.C. 1996c. Saprophytes and Ecosystems. En: 'The Fungi'. Academic Press. London. 251-303.
39. CHANDER H., BATISH V.K. PARKASH O. 1981. Role of lipids in growth and lipase production by *Rhizopus stolonifer* [Soil fungi, food contaminants]. *Journal of Food Protection*. **44**: (2) 353-354.

40. CHANDER, H. & KLOSTERMEYER, H. 1983. Production of Lipase by *Geotrichum candidum* under various Growth Conditions. *Michwissenschaf*. **38** : 410.
41. CHANG, Y. 1967. The Fungi of Wheat Straw Compost; II. Biochemical and Physiological Studies. *Trans. Br. mycol. Soc.* **50** : (4) 667-677.
42. CHANG, T.T., YANG, X.Y. KO, W.H. 1992. A Sensitive Method for Detecting Production of Extracellular Enzymes by Fungi on Solid Media. *Mycologia*. **84** : (6) 923-926.
43. CHEN, J., SHIMURA, S., KIRIMURA, K. USAMI, S. 1994. Purification of extracellular lipases from *Trichosporon fermentans* WU-C12. *J. Ferment. Bioeng.* **77** : (5) 548-550.
44. CHRISTEN, P., VILLEGAS, E. AND REVAH, S. 1994. Growth and aroma production by *Ceratocystis fibriata* in various fermentation media. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1183-1188.
45. CHRISTEN P., ANGELES N., CORZO G., FARRAS A. REVAH S. 1995. Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechnol. Techn.* **9**: (8) 597-600.
46. CONNEY, GD & EMERSON, R. 1964. Thermophilic fungi. W. H. FREEMAN AND COMPANY. San Francisco et London. pg. 3-28
47. COOKE W.B. 1979. Population Groups-Air. En 'The Ecology of the Fungi'. CRC Press. Boca Raton . 157-160.
48. CORDOVA-LOPEZ, J., GUTIERREZ-ROJAS, M., HUERTA, S., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. & FAVELA-TORRES, E. 1996. Biomass Estimation of *Aspergillus niger* growing on Real and Model Supports in Solid State Fermentation. *Biotechnol. Techn.* **10** : (1) 1-6.
49. CRISAN, E.V. 1973. Current Concepts of Thermophilism and the Thermophilic Fungi. *Mycologia*. **65** : 1170-1198.
50. DA SILVA, R; YIM, D.K.& P.A.R.K. Y.K. 1994. Application of Thermostable Xylanases from *Humicola sp.* for Pulp Improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **77** : (1) 109-111.
51. DEL RIO, J.L., SERRA, P., VALERO, F., POCH, M. SOLA, C. 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. *Biotechnol. Letters.* **12** : (11) 835-838.
52. DEPLOEY J.J., FORTMAN, B. & PERVA, L. 1981. Daily Measurements of *Mucor* Lipase Activity. *Mycologia*. **73** : 953-958.
53. DESCHAMPS, F., RAIMBAULT, M. AND SENEZ, J.C. 1982. Solid state fermentation in the development of agro-food by-products. *Industry & Environ.* **5** (2): 27-30.
54. DESNUELLE, P. 1961. Pancreatic Lipase. *Adv. Enzymol.* **23** : 129-161.
55. DEVERALL, B.J. 1965. The Physical Environment for Fungal Growth. En 'The Fungi, an Advanced Treatise'. Ed. G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN. Vol. I. Academic Press. New York. 543-550.
56. DIX NJ & WEBSTER J. 1995a. Structure of Fungal Communities. En 'Fungal Ecology'. Chapman & Hall. London. 39-84.
57. DIX NJ & WEBSTER J. 1995b. Fungi of Extreme Environments. En 'Fungal Ecology'. Chapman & Hall. London. 322-332.
58. DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H. (1980) Compendium of soil fungi. Vol.1. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
59. DOMSH KH & GAMS W. 1993. *Rhizomucor*. En 'Compendium of Soil Fungi'. IHW-Verlag. Braunschweig . Vol. I. 700-701.
60. DUFOUR D. (1990) Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques, cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Thèse Doctorat, Université de Technologie de Compiègne. 262p.

61. DURAND A., CHEREAU D. (1988) A new pilot reactor for solid state fermentation : application to the protein enrichment of sugar beet pulp, *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 476-486.
62. DURAND A., DE LA BROISE D., BLACHERE H. (1988) Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, 8 , 59-66.
63. ELLIS, D.H. 1980a. Thermophilic fungi isolated from a heated aquatic habitat [Hazelwood Power Station cooling pond, Victoria, Australia]. *Mycologia*. 72 : (5) 1030-1033.
64. ELLIS, D.H. 1980b. Thermophilous Fungi Isolated from some Antarctic and Sub-Antarctic Soils. *Mycologia*. 72 : (5) 1033-1036.
65. EMERSON, R. 1968. Thermophiles. En 'The Fungi'. Ed. G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN. Vol. III 'The Fungal Population'. Academic Press. New York. 105-128
66. ERICKSON, L.E., MINKEVICH, I.G. & EROSHIN, V.K. 1978. Application of Mass and Energy Balance Regularities in Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 20 : 1595-1621.
67. ESCOBAR, J. STANLEY, B. 1995. Synthesis of Acid Protease from *Mucor miehei*: Integration of Production and Recovery. *Process Biochem.* 30 : (8) 695-700.
68. ESENER, A.A., ROELS, J.A. & KOSSEN, N.W.F. 1981. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1401.
69. ESPINOSA, E., SANCHEZ, S. FARRÉS, A. 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnol. Letters*. 12 : (3) 209-214.
70. FALCH, E.A. 1991. Industrial Enzymes - Developments in Production and Application. *Biotechnol. Advan.* 9: 643-658.
71. FERGUS, C.L. 1969. The Cellulolytic Activity of Thermophilic and Actinomycetes. *Mycologia*. 61 : 120-129.
72. FISCHER, L., SCHECKERMANN, C. WAGNER, F. 1995. Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : (4) 1497-1501.
73. FLANNIGAN, B. SELLARS, P.N. 1977. Amylase, b-glucosidase and b-xylosidase activity of thermotolerant and thermophilic fungi isolated from barley. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 69 : (1) 316-317.
74. FLORENT, J. 1993. Les Moisissures. En 'Microbiologie Industrielle'. Ed. J.Y. LEVEAU & M. BOUIX. 112-118.
75. FRICH, AS; JENSEN, B&, O.L.S.E.N. J. 1994. The Simultaneous Production of Amylase and Lipase by the Thermophilic Fungus, *Thermomyces Lanuginosus*. *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology* : 299-302.
76. FROST, G.M. & MOSS, D.A. 1987. Production of enzymes by Fermentation. En 'Biotechnology'. Ed. J.F. KENNEDY. Vol. 7a 'Enzyme Technology'. VCH. New York. 65-211.
77. FUKUMOTO, J., IWAI, M. TSUJISAKA, Y. 1964. Studies on Lipase: IV. Purification and Properties of a Lipase Secreted by *Rhizopus delemar*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10 : 3257-265.
78. GARCIA, H.S., AMUNDSON, C.H. HILL, C.G.J.R. 1991. Partial characterization of the action of an *Aspergillus niger* lipase on butteroil emulsions. *J. Food Sci.* 56 : (7)1233-1237.
79. GERVAIS P., BENSOUSSAN M., GRAJEK W. (1988) Water activity and water content : comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 27, 389-392.
80. GILBERT, M., BREUIL, C., YAGUCHI, M. SADDLER, J.N. 1992. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35 : 247-259.
81. GIRAUD, E. 1993. Contribution à l'étude Physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de Doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, France. 139p

82. GONZALEZ-BLANCO, P., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. AND VINIEGRA-GONZALEZ, G. 1990. Protein enrichment of sugar cane by-products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Ferment. Bioeng.* **70** : 351-354.
83. GRAJEK W. (1988) Cooling aspects of solid state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. *J. Ferment. Technol.* **66** : (6) 675-679.
84. GRIFFIN, D.H. 1994. Chemistry of the Fungal Cell. En 'Fungal Physiology'. Wiley- Liss. New York. 23-62
85. GROCHULSKI P., YUNGE L.I., SCHRAG J.D., BOUTHILLIER F., SMITH P., HARRISON D., RUBIN B. CYGLER M. 1993. Insights into interfacial activation from on open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: (17) 12843-12847.
86. GUTIERREZ-ROJAS, M., CORDOVA, J., AURIA, R., REVAH, S. AND FAVELATORRES, E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.* **17** : 219-224.
87. HAAS M.J., ALLEN J. BERKA T.R. 1991. Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene.* **109**: (1) 107-113.
88. HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S.L. 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia.* **67** : 597-607.
89. HATZINIKOLAOU D.G., MACRIS J.B., CHRISTAKOPOULOS P., KEKOS D., KOLISIS F.N. FOUNTOUKIDIS G. 1996. Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. lett.* **18**: (5) 547-552.
90. HESSELTINE C.W. (1987) Solid State Fermentation - An Overview. *Int. Biodeterioration.* **23** : 79-89.
91. HESSELTINE, C.W. & ELLIS, J.J. 1973. *Mucorales*. En 'The Fungi'. Vol. IVB. Ed. G.C. AINSWORTH, F.K. SPARROW & A.F. SUSSMAN. Academic Press. New York. 187-217.
92. HESSELTINE, C.W. 1972. Solid State Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **14** : 517-532.
93. HUERTA-OCHOA, S. 1984. Efecto de la transferencia de masa y la acumulación del calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos. *Tesis de Maestría en Ciencias, Ingeniería Química, UAM-Iztapalapa, Mexico*, p. 147.
94. HUGE JENSEN, B., GALLUZZO, D.R. JENSEN, R.G. 1988. Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *JAOCS.* **65** : (6) 905-910.
95. INGOLD, C.T. HUDSON, H.J. 1993. Growth and Nutrition. En 'The Biology of Fungi'. Chapman & Hall. London. 7-24.
96. IWAI, M. TSUJISAKA, Y. 1974a. Interconversion of Two Lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* **38** : (6) 1249-1254.
97. IWAI, M. TSUJISAKA, Y. 1974b. The Purification and the Properties of Three Kinds of Lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* **38** : (6) 1241-1247.
98. JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. MISSET, O. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews.* **15** : 29-63.
99. JAIN, M.K., KAPOOR, K.K. MISHRA, M.M. 1979. Cellulase Activity, Degradation of Cellulose and Lignin, and Humus Formation by Thermophilic Fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* **73** : 185-89.
100. JAY, J.M. 1996. High-Temperature Food Preservation and Characteristics of Thermophilic Microorganisms. En 'Modern food microbiology'. Chapman & Hall. New York. 347-370.
101. JENSEN, R.G. 1983. *Lipids.* **18**: 650.
102. KABBAJ, W., BENSOUSSAN, M. AND ROUSSOS, S. 1997. Factors affecting physiology of mycelial growth and aroma production in solid state fermentation of mushrooms. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G.(Eds.), *Advances in Solid State fermentation.*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, chap.

103. KADEMI, A. 1997. Isolement et Caractérisation de Bactéries Lipolytiques Thermophiles : Purification d'une estérase thermostable. Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée, Marseille, France. 132p.
104. KANE, B.E. MULLINS, J.T. 1973. Thermophilic Fungi in a Municipal Waste Compost System. *Mycologia*. **65** : 1087-1100.
105. KORDEL, M., HOFFMAN, C., SCHOMBURG, D. & SCHMID, R.D. 1991. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC-21808, Purification, Characterization, Crystallization and preliminary X-ray Diffraction Data. *J. Bacteriol.* **173**: 4836-4841.
106. KÖTTING, J. & EIBL, H. 1994. Lipases and Phospholipases in Organic Synthesis. En 'Lipases, their Structure, Biochemistry and Application'. Ed. P. WOOLLEY & S.B. PETERSEN. Cambridge University Press. Cambridge. 159-180.
107. KUMAR P.K.R., LONSANE B.K. (1987) Gibberellic acid by solid state fermentation : consistent and improved yields. *Biotechnology and Bioengineering*. **30** : 267-271.
108. KVESITADZE, E.G., LOMITASHVILI, T.B, KHUTSISHVILI, M.P., LAMED, R. & BAYER, E.A. Isolation and Properties of a Thermostable Endoglucanase from Thermophilic Mutant Strain of *Thielavia terrestris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50** : 137-143.
109. KWON, D.Y. RHEE, J.S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *JAACS*. **63** : 189-92.
110. LACEY, J. 1975. Potential Hazards to Animals and Man from Microorganisms in Fodders and Grain. *Transactions British Mycological Society*. **65** : (2) 171-184.
111. LACEY, J. 1981. The aerobiology of Conidial Fungi. En 'Biology of Conidial Fungi. Vol. 1. Ed. G.T. COLE et B. KENDRICK. Academic Press. New York. 373-410.
112. LARROCHE C., DESFARGES, M. & CROS, J.B. 1985. Production de spores en Fermentation Solide sur Substrat Naturel ou sur Support Artificiel. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Toulouse. 3-5 avril.
113. LARROCHE C., DESFARGES, M. & CROS, J.B. 1989. Strategies for Spore Production by *Penicillium roquefortii* using Solid State Fermentation Techniques. *Process Biochemistry*. 97-103.
114. LASURE, L.L. 1980. Regulation of Extracellular Acid Protease in *Mucor Miehei*. *Mycologia*. **72**: 483-493.
115. LIN, S.F., CHIOU, C.M. & TSAI, Y.C. 1995. Effet de Triton X-100 on Alkaline Lipase Production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Letts*. **17**: (9) 959-962.
116. LINFIELD, W.M., SEROTA, S. SIVIERI, L. 1985. Lipid-lipase interactions. 2. A new method for the assay of lipase activity. *JAACS*. **62** : (7) 1152-1154.
117. LIU, W. H., BEPPU, T. & ARIMA, K. 1972. Cultural Conditions and Some Properties of the Lipase of *Humicola lanuginosa* S-38. *Agric. Biol. Chem.* **36** : (11) 1919-1924.
118. LONG K., GHAZALI, H.M. & ARIFF, G. 1996. Mycelium-Bound Lipase from a Locally Isolated Strain of *Aspergillus flavus* Link : Pattern and Factors Involved in its Production. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **67** : 157-163.
119. LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **7**: 258-265.
120. LOWRY R.R. & TINSLEY I.J. 1976. Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids. *JAACS*. **53** : 470-472.
121. MACRIS, J.B., KOURENTZY, E. & HATZINIKOLAOU, D.G. 1996. Studies on Localisation and Regulation of Lipase Production by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. **31** : (8) 807-812.
122. MANDELS, G.R. 1965. Kinetics of Fungal Growth. En 'The Fungi'. Vol. I. Ed. G.C. AINSWORTH, F.K. SPARROW & A.F. SUSSMAN. Academic Press. New York. 599-612.

123. MAREK A. BEDNARSKI W. 1996. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* **18**: (10) 1155-1160.
124. MARTINELLE, M. & HULT, K. 1994. Kinetics of Triglyceride Lipases. En 'Lipases, their Structure, Biochemistry and Application'. Ed. P. WOOLLEY & S.B. PETERSEN. Cambridge University Press. Cambridge. 159-180.
125. MARTINEZ, C., DE GEUS, P., LAUWEREYS, G., MATTHYSSENS, G. & CABBILLAU, C. 1992. *Fusarium solani* Cutinase is a Lipolytic Enzyme with a Catalytic Serine accessible to Solvent. *Nature*. **356** : 615-618.
126. MARTINEZ-CRUZ P., CHRISTEN P. & FARRAS A. 1993. Medium Optimization by a Fractional Factorial Design for Lipase Production by *Rhizopus delemar*. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: (2) 94-97.
127. MILLER G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. **31** : 426-428.
128. MISRA M.C. (1991) Monitoring and control of parameters in solid state fermentation. in Short term course on solid state fermentation. Karanth N.G. (Ed.), Central Food Technological Research Institute, Mysore, 12.1-12.2.
129. MITCHELL, D.A. 1992. Biomass Determination in Solid State Cultivation. En 'Solid State Cultivation'. Ed. H.W. DOELLE, D.A. MITCHELL & C.E. ROLZ. Elsevier Applied Science. London. 53-62.
130. MONTET, D. 1984. Biofaçonnement des Huiles Végétales et Valorisation de Sous-Produits d'Huilerie et de Raffinerie. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, France. 164p.
131. MONTET, D., RATOMAHENINA, R., PINA, M., GRAILLE, J. & GALZY, P. 1985. Purification and Characterization of a Lipase from *Candida curvata* Lodder and Kreger-van Rij CBS 570. *Fette Seifen Anstrichmittel*. **87** : (5) 181-185.
132. MOO-YOUNG M., MOREIRA A.R., TENDERDY R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation. in The filamentous fungi. Fungal technology. Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B (Eds.) Edward Arnold Publisher, London. **4** : 117-144.
133. MOO-YOUNG, M., CRISTI, Y. & VLACH, D. 1992. Fermentative Conversion of Cellulosic Substrats to Microbial Protein by *Neurospora sitophila*. *Biotechnol. Lett.* **14** : (9) 863-868.
134. MOUBASHER, A.H., ABDEL HAFEZ, S.I.I., ABDEL FATTAH, H.M. MOHARRAM, A.M. 1982. Fungi of wheat and broad-bean straw composts, 2: thermophilic fungi. *Mycopathologia*. **78** : (3) 169-176.
135. MUDGETT R.E. (1986) Solid-state fermentation. in Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Demain A.L., Solomon N.A. (Eds.), Washington, American Society for Microbiology, 66-84.
136. NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., KYOTANI, S. MORIKAWA, H. 1988. Culture Conditions for Intracellular Lipase Production by *Rhizopus chinensis* and its Immobilization within Biomass Support Particles. *J. Ferment. Bioeng.* **66**: (4) 441-448.
137. NARAHARA H., KOYAMA Y, YOSHIDA T., PICHANGKURA S. & UEDA. 1982. Grown and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. *J. ferment. Technol.* **69** : 311-319.
138. NISHIO N., TAI K., NAGAI S. (1979) Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation, *European Journal of Applied Microbiology*. **8** : 263-270.
139. NONOMURA, A.M. 1978. Thermophilic fungi [*Mucor pusillus*, *Malbranchea pulchella sulfurea*, *Aspergillus fumigatus*] isolated from seaweed drift piles [San Francisco Bay]. *Mycologia*. **70** : (4) 874-876.
140. NOVOTNY C. DOLEZALOVA L. 1993. Effect of lipids and detergents on the production and solubilization of extracellular lipase in *Yarrowia lipolytica*. *Folia microbiologica*. **38**: (1) 49-54.



141. OBRADORS N., MONTESINOS J.L., VALERO F., LAFUENTE F.J. SOLA C. 1993. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnol. Letters*. **15**: (4) 357-360.
142. OGUNDERO, V.W. 1979a. Amylase and cellulase activities of thermophilic fungi causing deterioration of tobacco products in Nigeria. *Mycopathologia*. **69** : (3) 131-135.
143. OGUNDERO, V.W. 1979b. Thermophilic and thermotolerant fungi in poultry droppings in Nigeria. *JGM*. **115** : (1) 253-254.
144. OGUNDERO, V.W. 1980. Lipase activities of thermophilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria [Food spoilage, storage diseases]. *Mycologia*. **72** : (1) 118-126.
145. OGUNDERO, V.W. 1981a. Thermophilic fungi from Nigerian palm produce. *Mycologia*. **73** : 198-202.
146. OGUNDERO, V.M. 1981b. Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi from stored groundnuts in Nigeria and determination of their lipolytic activity. *International Biodeterioration Bulletin*. **17** : (21) 51-56.
147. OGUNDERO, V.W. 1983. Thermophilic fungi and fermenting cocoa beans in Nigeria. *Mycopathologia*. **82** : (3) 159-165.
148. OHNISHI K., YOSHIDA Y. SEKIGUCHI J. 1994. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: (5) 490-495.
149. OMAR, I.C., HAYASHI, M. NAGAI, S. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No. 3. *Agric. Biol. Chem.* **51** : (1) 37-45.
150. ORIOL, E. 1987. Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. *Thèse de doctorat*, Université Paul Sabatier, Toulouse, 115 p.
151. ORIOL, E., SCHETTINO, B., VINIEGRA-GONZALEZ, G. AND RAIMBAULT, M. 1988a. Solid- state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.* **66**: 57-62.
152. ORIOL E., RAIMBAULT M., ROUSSOS, S & VINIEGRA-GONZALEZ G. Water and Water Activity in the Solid State Fermentation of Cassava Starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27** : 498-503.
153. PAL, N., DAS, S. & KUNDU, A.K. 1978. Influence of Culture and Nutritional Conditions on the Production of Lipase by Submerged Culture of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* **56** : 593.
154. PAPPAPARASKEVAS, D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D. MACRIS, B.J. 1992. Optimizing Production of Extracellular Lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Letters*. **14** : (5) 397-402.
155. PERRAUD-GAIME, I. 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. *Thèse de Doctorat*, Université Montpellier II, France, 209 p.
156. PETROVIC, S., BANKA, L.J., SKRINJAR, M. VUJICIC, I. 1989. Characterization of *Penicillium roqueforti* extracellular lipases. *Zbornik radova Tehnoloski fakultet u Novom Sadu*. **20** : (2)111-116.
157. PIMENTEL, M.C.B., KRIEGER, N., COELHO, L.C.C.B., FONTANA, J.O., MELO, E.H.M., LEDIGHAM, W.M. LIMA-FILHO, J.L. 1994. Lipase from a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **49** : 59-74.
158. POKORNY D., FRIEDRICH J. CIMERMAN A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Letters*. **16**: (4) 363-366.
159. PRENOSIL, J.E., DUNN, I.J. & HEINZLE, E. 1987. Biocatalyst Reaction Engineering. En 'Biotechnology'. Ed. J.F. KENNEDY. Vol. 7a 'Enzyme Technology'. VCH. New York. 490-545.
160. PROSSER, J.I. 1995. Kinetics of Filamentous Growth and Branching. En 'The Growing Fungus'. Ed. N.A.R. GOW & G.M. GADD. Chapman&Hall. London. 301-318.

161. RAIMBAULT M., ALAZARD D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **9** : 199-209.
162. RAIMBAULT, M. 1980. Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. *Thèse d'Etat*. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.
163. RAJASEKARAN A.K. & MAHESHWARI, R. 1993. Thermophilic Fungi: an Assessment of their Potential for Growth in Soil. *J. Biosci.* **18** : (3) 345-354.
164. RAPER K.B. & FENELL D.I. 1977. Pathogenicity. En : 'The Genus *Aspergillus*'. R.E. Krieger Publishing Company, Inc. 82-128.
165. RAPP P. 1995. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: (9) 832-838.
166. RATHBUN B.L., SHULER M.L. (1983) Heat and mass transfer effects in static-substrate fermentations chambers. *Biotechnol. Bioeng.* **25** : 929-938.
167. ROBERTS, J., STELLA, V.J. DECEDUE, C.J. 1985. A Colorimetric Assay of Pancreatic Lipase: Rapid Detection of Lipase and Colipase Separated by Gel Filtration. *Lipids.* **20**: (1) 42-45.
168. ROELS, J.A. 1983a. The Kinetics of Enzyme reactions. En 'Energetics and kinetics in biotechnology'. Elsevier. Amsterdam. 163-203.
169. ROELS, J.A. 1983b. Unstructured Models for Growth and Product Formation in Microorganisms. En 'Energetics and kinetics in biotechnology'. Elsevier. Amsterdam. 223-258.
170. ROQUEBERT, M.F. 1984. Introduction à la Mycologie Alimentaire. En 'Les Mycotoxines'. Ed. J.L. MULTON & B. CAHAGNIER. C.P.C.I.A. Paris. 3-18.
171. ROSENBERG S.L. 1978. Cellulose and Lignocellulose Degradation by Thermophilic and Thermotolerant Fungi. *Mycologia.* **70** : (1) 1-13.
172. ROUSSOS S. & RAIMBAULT, M. 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I-Screening des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol.* **133** : 455-464.
173. ROUSSOS, S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. *Thèse d'Etat*, Université de Provence, Marseille. 193p.
174. ROUSSOS S., OLMOS A., RAIMBAULT M, SAUCEDO-CASTAÑEDA G. & LONZANE, B.K. 1991. Strategies for large Scale Inoculum for SSF system : Conidiospores of *Trichoderma harzianum* on a mixture. *Biotechnol. Techniques.* **5** : 415-420.
175. ROUSSOS, S., HANNIBAL, L., DURAND, A., DIEZ, M., SAUCEDO, G., MONTET, D. & GRAILLE, J. 1994. Enrichissement en Protéins du Tourteau de Coprah : Sélection de Champignons Filamenteux en FMS. *Oléagineux.* **49** : (5) 235-247.
176. RUIZ-TERAN, F. & OWENS, D. 1996. Chemical and Enzymatic Changes During the Fermentation of Bacteria-Free Soya Bean Tempe. *J. Sci. Food Agric.* **71** : 0-7.
177. SAIKI, T., NARASAKI, T., AMARAKI, K., TAMURA, G. ARIMA, K.E.I. 1968. Studies on the Lipoprotein Lipases of Microorganisms. Part III. Effect of Culture Conditions on the Production of Lipoprotein Lipase by *Mucor javanicus* IAM 6108. *Agr. Biol. Chem.* **32**: (12) 1458-1463.
178. SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C. & FILTENBORG, O. 1996. Identification of the Common Food-Borne Fungi. En 'Introduction to Food-Borne Fungi'. Ed. R.A. SAMSON, E.S. HOEKSTRA, J.C. FRISVAD & O. FILTENBORG. CBS. Baarn, The Netherlands. 3-232.
179. SARDA, L. & DESNUELLE. 1958. Action de la lipase Pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta.* **30** : 513-521.

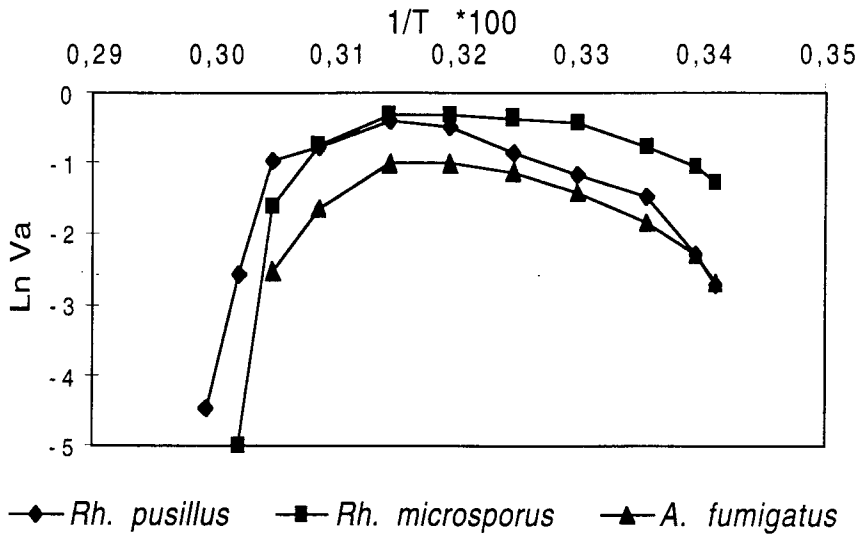
180. SARHY-BAGNON, V., LOZANO, P., PIOCH, D. AND ROUSSOS, S. 1997. Coconut-like aroma production by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in Solid State fermentation*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, chapter. 31: 379-391.
181. SATO K., NAGATANI M., NAKAMURA K., SATO S. (1983) Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state fermentation with forced aeration. *Journal of Fermentation and Technology*. 61 : (6) 623-629.
182. SATYANARAYANA, T. JOHRI, B.N. 1981. Lipolytic activity of thermophilic fungi of paddy straw compost. *Current science*. 50 : (15) 680-682.
183. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., GUTIERREZ-ROJAS, M., BACQUET, G., RAIMBAULT, M. AND VINIEGRA-GONZALEZ, G. 1990. Heat transfert simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng*. 35: 802-808.
184. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. 1991. Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. *Thèse de Doctorat*, Université Montpellier II, France, 212
185. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K., NAVARRO, J.M., ROUSSOS, S. AND RAIMBAULT, M. 1992. Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii* , *Appl. Biochem. Biotechnol*. 36: 47-61.
186. SCHRAG, J.D., LI, Y., WU, S. & CYGLER, M. 1991. Ser-His-Glu Triad Forms the Catalytic Site of Lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*. 351 : 761-764.
187. SCRIBAN, R. 1993. Production des enzymes. En 'Biotechnologie'. Ed. R. SCRIBAN. Tec. Doc. Lavoisier. Paris. 356-363.
188. SEGEL, I.H. 1976. Biochemical Energetics. En 'Biochemical calculations'. John Wiley & Sons. New York. 145-207.
189. SHAO, W., DEBLOIS, S. & WIEGEL, J. 1995a. A High-Molecular-Weight, Cell-Associated Xylanase Isolated from Exponentially Growing *Thermoanaerobacterium sp.* strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol*. 61: (3) 937-940.
190. SHAO, W., OBI, S.K.C., PULS, J. & WIEGEL, J. 1995b. Purification and characterization of the  $\alpha$ -Glucuronidase from *Thermoanaerobacterium sp.* strain JW/SL-YS485. an Important Enzyme for the Utilisation of Substituted Xylans. *Appl. Environ. Microbiol*. 61: (3) 1077-1081.
191. SCHIPPER, M.A.A & STALPERS, J.A. 1984. The *Rh. microsporus*-group. A Revision of the Genus *Rhizopus*. En 'Studies in Mycology, No. 25'. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
192. SCHIPPER, MAA. 1973. A study on Variability in *Mucor Hiemalis* and Related Species. En 'Studies in Mycology, No. 4'. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
193. SCHIPPER, MAA. 1978. On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. En 'Studies in Mycology, No. 17'. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
194. SCHIPPER, MAA. 1984. The *Rh. stolonifer*-group and *Rh. oryzae*. A Revision of the Genus *Rhizopus*. En 'Studies in Mycology, No. 25'. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
195. SMELTZER, M., HART, M.E. IANDOLO, J.J. 1992. Quantitative Spectrometric Assay for Staphylococcal Lipase. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: (9) 2815-2819.
196. SOCCOL C. (1992) Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. Thèse de Doctorat, UTC Compiègne, France, 218 p.
197. SONNET, P.E. 1988. Lipase selectivities. *JAOCs*. 65 : 6900-904.

198. SORENSEN, S.G. CRISAN, E.V. 1974. Thermostable lactase from thermophilic fungi. *J. Food Science*. **39** : (6) 1184-1187.
199. STANBURY, P. F., WHITAKER, A. & HALL, S.J. 1995. The Isolation, Preservation and Improvement of Industrially Important Microorganisms. En ' Principles of Fermentation Technology'. Elsevier Science. Oxford. 35-91.
200. STRAATSMA, G., SAMSON, R.A., OLIJNSMA, T.W., CAMP HJMO, D.E.N., GERRITS, J.P.G. GRIENSVEN LILD, V.A.N. 1994. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : (2) 454-458.
201. SUGIYAMA, H., IDEKOBA, C., KAJINO, T., HOSHINO, F., ASAMI, O., YAMADA, Y. UDAKA, S. 1993. Purification of protein disulfide isomerase from a thermophilic fungus [*Humicola insolens*]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **57** : (10) 1704-1707.
202. SUMNER, J.L., MORGAN, E.D. EVANS, H.C. 1969. The Effect of Growth Temperature on the Fatty Acid Composition of Fungi in the Order Mucorales. *Canadian Journal of Microbiology*. **15** : 515-520.
203. TAKASHIMA, S., NAKAMURA, A., MASAKI, H. & UOZUMI, T. 1996. Purification and characterization of Cellulases from *Humicola grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** : (1) 77-82.
204. TANSEY, M.R. 1971. Isolation of Thermophilic Fungi from Self-Heated, industrial Wood Chip Piles. *Mycologia*. **63** : 537-547.
205. TANSEY, M.R. 1984. Efficient isolation of thermophilic and thermotolerant mucoralean fungi [*Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Absidia corymbifera*]. *Mycopathologia*. **85** : (1/2) 31-42.
206. TANSEY, M.R. JACK, M.A. 1976. Thermophilic fungi in sun-heated soils [Indiana]. *Mycologia*. **68** : (5) 1061-1075.
207. TANSEY, M.R. JACK, M.A. 1977. Growth of thermophilic and thermotolerant fungi in soil in situ and in vitro. *Mycologia*. **69** : (3) 563-578.
208. TANSEY, M.R., MURRMANN, D.N., BEHNKE, B.K. BEHNKE, E.R. 1977. Enrichment, isolation, and assay of growth of thermophilic and thermotolerant fungi in lignin-containing media. *Mycologia*. **69** : (3) 463-476.
209. TATARA, T., FUJII, T., KAWASE, T. & MINAGAWA, M. 1985. Studies on Applications of Lypolytic Enzymes in Detergency II. Evaluation of Adaptability of Various Kinds of Lipases in Practical Laundry Conditions. *JAOCs*. **62** : (6) 1053-1058.
210. THAKRE, R.P. JOHRI, B.N. 1980. Degradation of Natural Cellulose by Thermophilic and Thermotolerant Fungi. *Acta Botanica Indica*. **8** : 45-49.
211. THAKUR, S.B. 1977. Occurrence of spores of thermophilic fungi in the air at Bombay [India]. *Mycologia*. **69** : (1) 197-199.
212. TREJO-HERNANDEZ, M. 1992. Physiologie de croissance de souches de *Claviceps*: Production d'alcaloïdes par fermentation en milieu solide. *Thèse de Doctorat*, Université de Provence, Aix-Marseille I, 164 p.
213. TRINCI, A.P. 1971. Influence of the Width of the Peripheral Growth Zone on the Radial Growth Rate of Fungal Colonies on Solid Media. *Journal of General Microbiology*. **67** : 325-344.
214. UPADHYAY, C.M., NEHETE, P.N. KOTHARI, R.M. 1989. A Lipase Preparation with Dual pH Optima, wide Temperature Optima and Broad Substrate Specificity for Multiple Applications. *Biotechnol. Letters*. **11** : (11) 793-796.
215. UPRETI, J.C. JOSHI, M.C. 1984. Cellulolytic activity of mesophilic and thermophilic fungi isolated from mushroom compost. *Indian Phytopathol.* **37** : 473-476.

216. USHIO, K., HIRATA, T., YOSHIDA, K., SAKAUE, M., HIROSE, M., SUZUKI, T., ISHIZUKA, M. 1996. Super-Inducers for Induction of Thermostable Lipase Production by *Pseudomonas* species NT-163 and other *Pseudomonas*-Like Bacteria. *Biotechnol. Techn.* **10** : (4) 267-272.
217. VAN TILBEURGH, H., EGLOFF, M.P., MARTINEZ, C., RUGANI, N., VERGER, R. & CAMBILLAU, C. 1993. Interfacial Activation of the Lipase Procolipase Complex by mixed Micelles revealed by X-ray Crystallography. *Nature*. **362** : 814-820.
218. VERGER, R., RIVIERE, C., MOREAU, H., GARGOURI, Y., ROGALSKA, E., NURY, S., MOULIN, A., FERRATO, F., RANSAC, S., CARRIERE, F., CUDREY, C. & TRETOUT, N. Enzyme Kinetics of Lipolysis. En 'Lipases : Structure, Mechanism and Genetic Engineering'. Ed. L. ALBERGHINA, R.D. SCHMID & R. VERGER. GBS Monographs. Vol. 16. Bridge. Braunschweig, Germany. 105-116.
219. VORDERWULBECKE, T., KIESLICH, K., ERDMANN, H. 1992. Comparison of Lipases by Different Assays. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 631-639.
220. VULFSON, E.N. 1994. Industrial Application of Lipases. En 'Lipases, their Structure, Biochemistry and Application'. Ed. P. WOOLLEY & S.B. PETERSEN. Cambridge University Press. Cambridge. 271-288.
221. WALLER, W. & COMEAU, L.C. 1990. Sur une Nouvelle Souche de *Candida sp.* productrice d'une Lipase Acide-résistante. *Revue Française des Corps Gras*. **37** : (9/10) 289-296.
222. WATIER, D., DUBOURGUIER, H.C., LEGUERINEL, I. & HORNEZ, J.P. 1996. Response Surface Models to Describe the Effects of the Temperature, pH and Ethanol Concentration on Growth Kinetics and Fermentation end Products of a *Pectinatus sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : (4) 1233-1237.
223. WINKLER, F.K., D'ARCY, A. HUNZIKER, W. 1990. Structure os Human Pancreatic lipase. *Nature*. **343** : 771-774.
224. WU, X.Y., JAASKELAINEN, S. LINKO, Y.Y. 1996. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59** : (2) 145-158.
225. ZUBAY, G.L., PARSON, W.W. & VANCE, D.E. 1995. Enzyme Kinetics. En 'Principles of biochemistry'. WCB Publishers. Oxford. 135-153

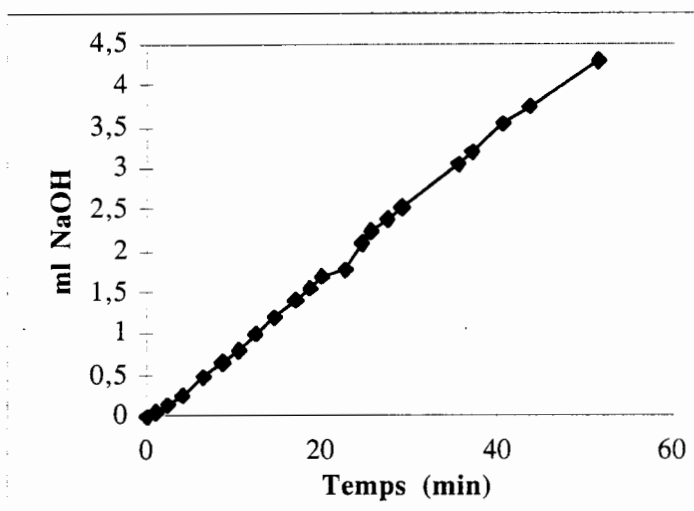
# **ANNEXES**

## ANNEXE 1

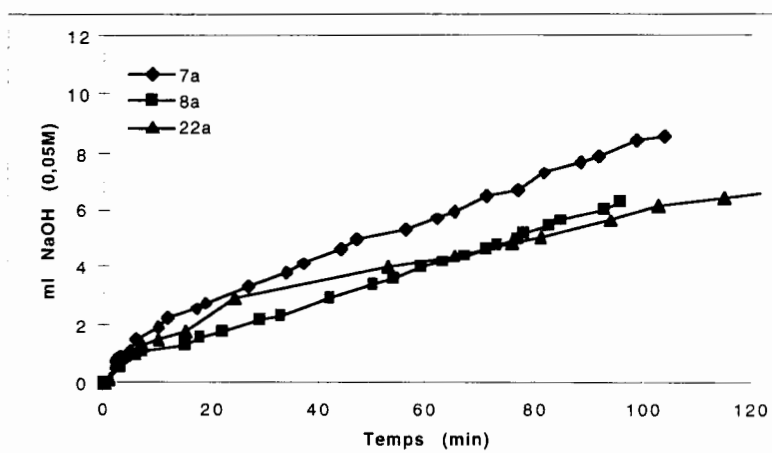


Logarithme naturel de la vitesse de croissance apicale des champignons (la moyenne de chaque groupe) en fonction de la température d'incubation ( $K^{-1}$ ). Ce graphique a été utilisé pour effectuer les calculs des énergies d'activation et d'inactivation des réactions biochimiques qui limitent la croissance des champignons dans la section 5.2.5.

## ANNEXE 2



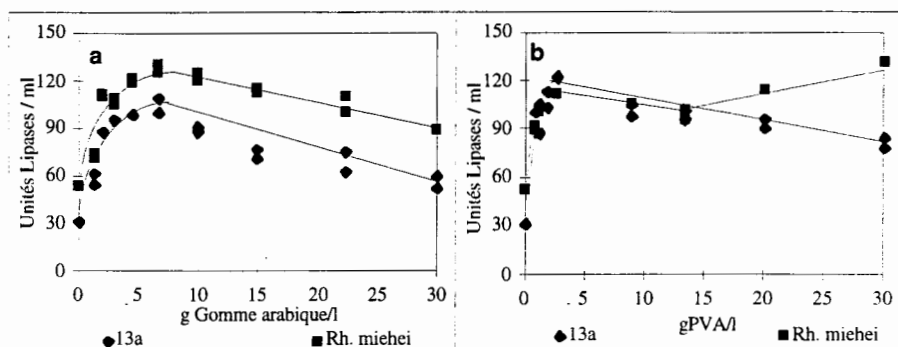
Analyse de lipases par la méthode du pHStat. Enzyme commerciale de *Rh. miehei*. Conditions de réaction : 47°C et pH 8.7.



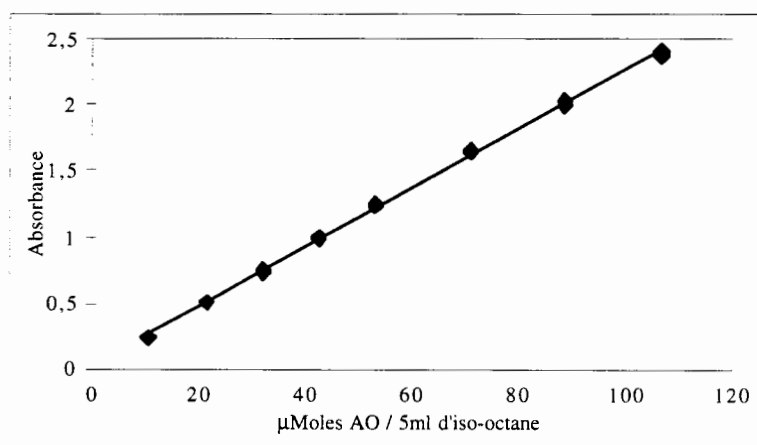
Analyse de lipases par la méthode du pHStat. Extraits enzymatiques des souches 7a, 8a et 22a. Conditions de réaction : 47°C et pH 8.7.



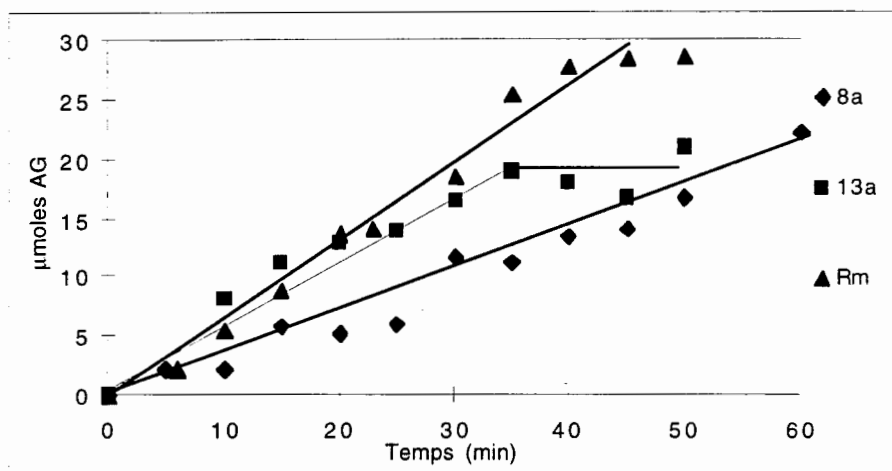
## ANNEXE 3



Effet de la concentration de l'agent émulsifiant, a) Gomme arabique et b) Alcool polyvinylique, sur l'activité lipasique de l'extrait enzymatique de la souche 13a et de la préparation commerciale de *Rh. miehei*.

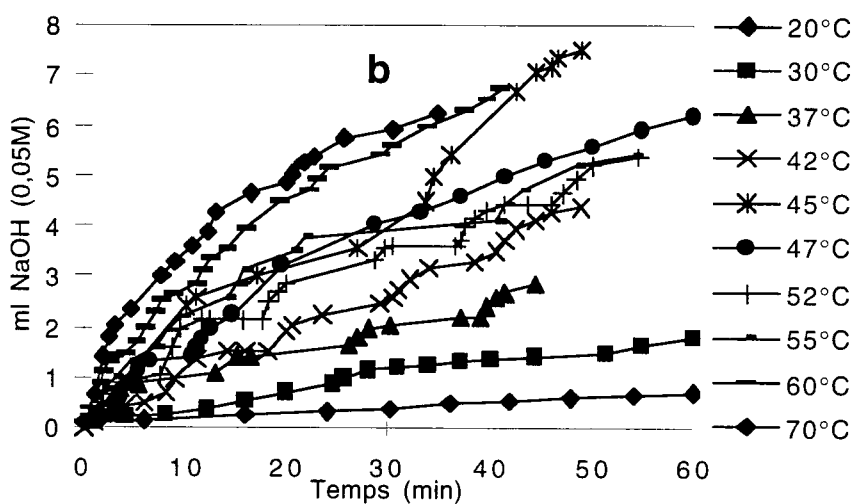
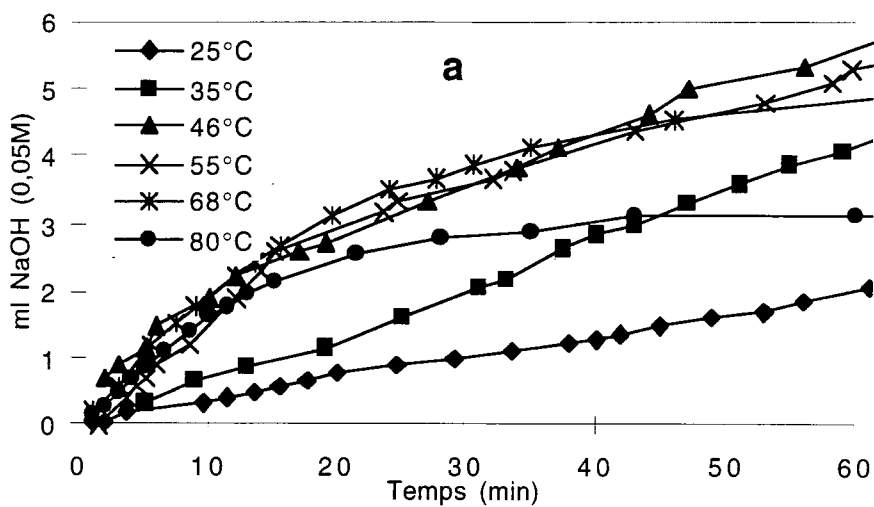


Gamme étalon de l'acide oléique (en  $\mu$ moles) dans 5 ml d'iso-octane.



Cinétique des acides gras libérés par l'hydrolyse de l'huile d'olive catalysée par les lipase des extraits enzymatiques des souches 8a, 13a et de la préparation commerciale de *Rh. miehei*. Conditions de réaction : 47°C et pH 8.

## ANNEXE 4



Analyse de lipases par la méthode du pHStat. Extraits enzymatiques des souches 7a (a) et 8a (b). Conditions de réaction : différentes températures d'incubation et pH constant de 8.7.