

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



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE1
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)



Département : TECHNOLOGIES ALIMENTAIRES

N° d'ordre :92/D3C/2022

N° de série :02/I.N.T/2022

Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité: Technologie agro-Alimentaires

Thème

**Etude et caractérisation des lipides et γ -décalactone
accumulés par la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica***

Présenté par : AL Mualad Wadie Nabil Abdo

Soutenue le : 20 /11/ 2022

Devant le Jury composé de :

Président(e) :	Pr. BOUDJELLAL A.	Prof	INATAA/UFMC1, Algérie
Rapporteur :	Dr. BOUCHEDJA D.N.	MC/A	INATAA/UFMC1, Algérie
Examineurs :	Pr. KABOUCHE Z.	Prof	LOST/UFMC1, Algérie
	Pr. KHELIFI D	Prof	École Nationale Supérieure De Biotechnologie Université Saleh Boubendir- Algérie
	Dr. CHIKHOUNE A.	MC/A	Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agro-Alimentaires (ESSAIA -Alger)

Année 2022-2023

Dédicace

Je dédie mon travail à :

Mon cher père, qui m'a donné l'envie d'avancer, et de terminer mes études.

Ma chère mère, qui m'a poussé en avant, et qui m'a ouvert les portes du paradis.

Mes grands-parents.

Mon frère Mohamed et chère ami Mounif.

Une dédicace spéciale pour ma fiancée.

Toute ma famille.

Et à tous mes amis de l'université de Constantine.

A tous ceux qui me sont chers.

...WADIE

Remerciements

Avant tout Avant tout j'adresse mes remerciements à Dieu puissant qui m'a guidé toutes les années d'étude et m'a donné la volonté, la patience et le courage pour venir à bout de ce travail dans de bonnes conditions.

Ma gratitude et mes remerciements vont à ma directrice de thèse le Docteur BOUCHEDJA Doria Naila, d'avoir accepté de m'encadrer et de me diriger tout au long de mon parcours de thèse. Je remercie également tout le personnels pédagogique et administratif de l'INATAA et à leur tête le professeur BOUDJELLAL Abdelghani, directeur de l'institut et président de mon jury de soutenance, de même que je remercie tous les membres du jury à savoir le Professeur KAABOUCHE Zahia ; le Professeur KHELIFI Douadi et le Docteur CHIKHOUNE Anis, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et de m'enrichir de leurs précieuses remarques.

Mes sincères remerciements sont adressés aux membres des équipes des laboratoires de recherche qui m'ont pris en charge et suivi durant mon parcours, je cite : Le laboratoire d'Enzymologie de Mycologie et de l'Activité microbienne (EMAM/ UFMCI) avec un remerciement particulier au Dr. BATAÏCHE Insaf et au Pr. KACEM-CHAOUCHE Noureddine; Le laboratoire de microbiologie du Centre de Recherches Biotechnologiques de Constantine (CRBt), merci donc à M. SELMANIA Abderahmane et Mme IKHLEF Assya ; Le laboratoire de Obtention de Substance Thérapeutiques (LOST/UFMC1), merci à M. MADADI Ramzi ; Le laboratoire de microbiology de l'Ecole Supérieure de Biotechnologies (ESBT/ USBC3), merci donc à M. BOUCHAALA Antar ; et enfin mon laboratoire d'accueil le Laboratoire de Boitechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL/UFMC1) en particulier les membres de mon équipe de recherche (MAQUAV), sans oublié de nommer Mme. CHERAK Souad.

Je n'oublierai pas de remercier les masterants qui ont contribué à ce travail, avec un remerciement particulier à Melle. NEZZAR Amina ; Melle. SABEG Nourelhouda, M. GHORAB Fares et M. BADAOUI Charaf eddine

Je ne remercierai jamais assez ma mère et mon père pour tous les sacrifices qu'ils ont fait pour moi. Merci à toute ma famille et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de cette thèse, à tous mes enseignants qui se sont évertués à m'enseigner.

J'adresse ma sincère gratitude à mes ami(e)

Table des Matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
INTRODUCTION GENERAL	1
A. YARROWIA LIPOLYTICA	4
A.1. GENERALITE	4
A.2. TAXONOMIE	6
A.3.MORPHOLOGIE	6
A.4.HABITAT ET CARACTERISATIONS PHYSIOLOGIE	8
A.5.APPLICATIONS DE YARROWIA LIPOLYTICA	9
<i>A.5.1.Production de protéases</i>	<i>11</i>
<i>A.5.2. Production de lipases</i>	<i>12</i>
<i>A.5.3.Production de lactones</i>	<i>13</i>
<i>A5.4.Production d'acide citrique</i>	<i>14</i>
<i>A5.5.Production d'huiles</i>	<i>15</i>
<i>A.5.6.Autres application</i>	<i>16</i>
B.LIPIDES	19
B.1.DEFINITION GENERALE	19
B.2.CLASSIFICATION DES LIPIDES	20
<i>B.2.1.En fonction de leur polarité</i>	<i>20</i>
a)Lipides apolaires	20
b)Lipides polaires	20
• Lipides de classe I	20
• Lipides de classe II	20
• Lipides de classe III	20
B.2.2.En fonction de leur structure	21
B.2.3.En fonction de leur nature chimique	21
<i>B.3. Lipides levuriens</i>	<i>22</i>
B.3.1.Principaux lipides biologiques	23
B.3.1.1.Acides gras	24
B.3.1.2.Triacylglycérols	27
B.3.1.3.Phospholipides	29
B.3.1.4.Sphingolipides	31
B.3.1.5.Stérols et stéroïdes	33
C. ACCUMULATION LIPIDIQUE CHEZ YARROWIA LIPOLYTICA	35
<i>C.1. Généralité</i>	<i>35</i>

<i>C.2. Accumulation lipidique et métabolisme</i>	36
C.2.1. Accumulation lipidique de novo.....	37
C.2.1.1. Evénements de l'accumulation lipidique.....	38
a) Production d'acétyl-CoA	38
b) Conversions d'Acetyl-CoA.....	40
c) Voie de Kennedy.....	41
C.2.2. Accumulation lipidique ex novo.....	42
C.2.2.1. Assimilation du substrat	44
C.2.2.2. Transport des acide gras	45
<i>C.3. Facteurs influençant l'accumulation lipidique</i>	46
<i>C.4. Approches d'amélioration de l'accumulation de lipides</i>	46
D. INTERETS DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> A DES FINS ENVIRONNEMENTALES	47
<i>D.1. Préambule</i>	47
<i>D. 2. Déchets résultant de l'industrie</i>	50
D.2.1. Déchets résultant de l'industrie alimentaire.....	50
D.2.1.1. Huiles de cuisson usagées.....	50
D.2.2. Résidus obligatoires des processus industriels	54
D.2.2.1. Déchets de l'huilerie de l'huile olive (Margine)	55
<i>D.3. Bioprocessus pour environnementales et industrielles</i>	56
D. 3.1. Utilisation des huileux Déchets dans les cultures de levure	58
D.3.2. Potentiels de <i>Yarrowia lipolytica</i>	59
D.3.3. Application environnemental de <i>Y.lipolytica</i>	60
D. 3.4. Composés à valeur ajoutée (lipides microbiens)	63
D.3.5. Intérêt des lipides de levures et de <i>Y. lipolytica</i>	64
<i>D.4. Développement durable par yarrowia lipolytica</i>	64
<i>D.5. Conclusion</i>	65
E. PRODUCTION DE γ-DECALACTONE PAR LEVURE <i>Y.LIPOLYTICA</i>	66
<i>E.1. Généralités</i>	66
<i>E.2. Arôme de type lactone</i>	67
E.2.1. γ -déalactone	69
E.2.1.1. Voie de production de γ -déalactone : B-xydation peroxysomale.	71
E.2.1.2. Voie de dégradation de γ -déalactone.....	74
E.2.1.3. Huile de ricin	76
E.2.2. Chiralité des lactones	77
E.2.3. Toxicité des lactones	77
OBJECTIF DE RECHERCHE	79
MATERIEL ET METHODES	80
A. MATERIEL ET MILIEUX DE CULTURES	80
<i>A.1. Matériel biologique</i>	80
A.1.1. Souche microbienne	80
A.1.2. Réactifs	80
A.1.3. Déchets alimentaires et agro-industriels.....	81

<i>A.2. Milieux de cultures</i>	81
A.2.1. Milieu de conservation	81
A.2.2. Milieu d'activation de la souche	82
A.2.3. Milieu de pré-culture	82
A.2.4. Milieu d'accumulation des lipides intracellulaires	82
A.2.5. Milieux production de γ -décylactone	83
<i>A.3. Mise en œuvre des expérimentations</i>	83
A.3.1. Activation des souches	83
A.3.2. Pré-culture	83
A.3.3. Mise en culture	84
A.3.3.1. Culture en fiole	84
A.3.3.2. Bioréacteur autoclavable	84
B. METHODES ANALYTIQUES	86
<i>B.1. Etude de la croissance cellulaire</i>	86
B.1.1. Mesure de la densité optique	87
B.1.2. Analyse morphologique	87
B.1.3. Essais de décoloration de la margine	88
<i>B.2. Etude de l'accumulation lipidique intracellulaire</i>	88
B.2.1. Observation de l'accumulation lipidique intracellulaire	88
C.2.1.1. Coloration de cellules au Noir soudan / Microscopie optique	89
B.2.1.2. Coloration de cellules au rouge Nil / Microscopie à fluorescence	89
B.2.2. Détermination de la biomasse	89
<i>B.3. Dosage des lipides</i>	90
B.3.1. Préparation des échantillons	90
B.3.2. Extraction	90
B.3.3. Purification (évaporation)	91
<i>B.4. Analyse des lipides extraits</i>	92
B.4.1. Gravimétrie	92
B.4.2. Chromatographie en couche mince (C.C.M.)	92
B.4.3. Caractérisation des acides gras totaux	92
B.4.3.1. Transestérification en esters méthyliques d'acides gras	92
B.4.3.2. Conditions opératoires de la caractérisation des acides gras par GC-MS	93
<i>B.5. Etude de la production d'arôme de type lactone</i>	93
B.5.1. Extraction de γ -décylactone	93
B.5.2. Analyse des γ -décylactone extraits	94
B.5.2.1. Gravimétrie	94
B.5.2.2. Caractérisation γ-décylactone	94
<i>B.6. Montage expérimentale utilisée dans cette étude</i>	94
<i>B.7. Étude comparative des données expérimentales</i>	96
B.7.1. Levure <i>Yarrowia lipolytica</i> : comme un modèle d'étude	96
B.7.2. Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> : le mode de conduite	96
B.7.3. Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> : les phases	97
B.7.4. Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> : les substrats	97

RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	99
A. ÉTUDE COMPARATIVE ET CARACTERISATION DU COMPORTEMENT ET PERFORMEE DE LEVURE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> SUR DIVERSES SOURCES CARBONEES	102
A.1. Variables cellulaires	102
A.1.1. Croissance cellulaire de la levure.....	102
A.1.2.Morphologique de <i>Y. lipolytica</i>	107
• Observation microscopique	107
A.2. Variables extracellulaires	109
A.3. Variables intracellulaires.....	111
A.3.1. Coloration au noir Soudan B des cellules.....	111
A.4. Utilité de la souche productrice de lipase à travers les résultats l'étude.....	115
A.4.1. Réponse du <i>Y. lipolytica</i> aux déchets lipides.....	115
A.5. Influence du substrat carboné sur la performance de <i>Y. lipolytica</i>.....	116
A.6. CONCLUSION	117
B. ETUDE ET IDENTIFICATION DES LIPIDES ACCUMULEES INTRACELLULAIRE A PARTIR DE DIVERSES SOURCES CARBONEES PAR LEVUR AEROBIE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	119
<i>B.1. Appliquer de la culture d'accumulation de lipides à partir de substrats l'intérêt en les bioréacteurs</i>	<i>119</i>
<i>B.2. Accumulation de Lipides à partir de diverses sources carbonées : Résultats.....</i>	<i>120</i>
B.2.1. Comportement du <i>Y. lipolytica</i>	120
B.2.1.1. Croissance de <i>Y. lipolytica</i>	121
B.2.1.2. Evaluation de la biomasse et des lipides intracellulaires (LBs)	123
B.2.2. Lipides cellulaires selon substrats	124
B.2.2.1. Détermination des lipides cellulaires	124
B.2.2.2. variation global de performance souche en condition de croissance	126
<i>B.3. Analyse de la composition en acide gras.....</i>	<i>128</i>
B.3.1. Profils acide gras rencontrés chez <i>Y. lipolytica</i>	129
B.3.1.1. Profils d'acides gras de <i>Y lipolytica</i> cultivés sur margine (YPD0MW)	129
B.3.1.2. Profils d'acides gras de <i>Y lipolytica</i> cultivés sur Huile usée (YPD0WCO)	131
B.3.1.3. Profils d'acides gras de <i>Y lipolytica</i> cultivés sur l'acide oléique (YPD0A)	132
B.3.2. Impact global de substrats	134
B.3.3. Données sur des profils en acides gras microbiens.....	135
<i>B.4. Gestion des déchets huileux dans la culture de <i>Y. lipolytica</i>.....</i>	<i>137</i>
B.4.1. Bioremédiation	138
B.4.1.1. Décoloration des déchets des huileries à huile.....	139
<i>B.5. Discussion.....</i>	<i>140</i>
<i>B.6. Conclusion.....</i>	<i>147</i>
C. ETUDE DE LA PRODUCTION DE Γ-DECALACTONE (AROME DE PECHE) PAR LA LEVURE NON PATHOGENE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	149
<i>C.1. Introduction.....</i>	<i>149</i>
<i>C.2. Analyse du comportement du dans <i>Y. lipolytica</i> le milieu de biotransformation.</i>	<i>149</i>
C.2.1. Croissance cellulaire de la levure	149

Sommaire

C.2.2. Analyse du pH.....	152
C.2.3. Caractérisation morphologique cellules et milieu de biotransformation.....	153
C.2.4. Impact des concentrations en huile de ricin.....	155
<i>C.3. Expériences et extraction de lactone.....</i>	<i>158</i>
<i>C.4. Production de gamma décalactone (γ-DL).....</i>	<i>158</i>
<i>C.5. Identification de la γ-Décalactone.....</i>	<i>160</i>
<i>C.6. Intermédiaires de la bioconversion à γ-DL.....</i>	<i>161</i>
D.6.1. Mise en évidence de la présence de précurseurs d'arômes.....	161
<i>C.7. Conclusions.....</i>	<i>163</i>
CONCLUSION ET RECOMENDATION.....	164
REFERENCES.....	167
ANNEXE.....	182
LIST DES PUBLICATION ET COMMUNICATION.....	232

Liste des abréviations

ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACL : ATP citrate lyase
ACP : protéine porteuse d'acyle
ADP : adénosine diphosphate
AEP : protéinase alcaline extracellulaire
AG : acides gras
AGV : acides gras volatils
AMP : 5' adénosine monophosphate
ATP : Adénosine triphosphate
BF3 : Boron trifluoride dibutyl etherate
CL : Cardiolipide
CoA : Co-enzyme A
CO : Castore oiles
CO₂ : dioxyde de carbone
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
CPG : chromatographie en phase gazeuse
DAG : diacylglycérols
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DCW : dry cell weight
DO : Donsité Optique
EM : enzyme malique
FABPs : protéines de liason des acides gras
FAS : acide gras synthétase
FID : détecteur à ionisation de flamme
FML : Fermentation en milieu liquide (en anglais SmF : Submerged fermentation)
FMS : Fermentation en milieu solide (en anglais SSF : Solid state fermentation)
FFA : Free fatty acids
GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate
G3P : Glycérol-3-phosphate
GL : Glycérolipides
GP : Glycérophospholipides
g : grammes
g.L-1: grammes par litre
h : heures
°C : degrés Celsius
H : hydrogène
IMP : inosine 5' monophosphate
IR : index de refraction
L : litre
LL : Lipid Library
MAG : monoacylglycérols

mg : milligramme
mg.mL-1 : milligramme par litre
min : minutes
mL : millilitre
N : azote
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
N/C : ratio azote/carbone
O₂ : dioxygène
OMW : olive mill wastewater
P : Phosphate
PA : acide phosphatidique
PC : Phosphatidyl choline
PCO : Peptone castor-oils
PE : Phosphatidyléthanol amine
PG : Phosphatidyl glycérol
PI : Phosphatidyl inositol
PK : Polyketides
PKS : Polyketide synthase
PR : Prénoides
PS : Phosphatidyl sérine
PSC : poids sec cellulaire
RT: retention time
rpm : Rotations par minute
Se : sélénium
SI : standard interne
SL : Saccharolipides
SP : Sphingolipides
Sub substrat carboné
ST : Stéroïdes
t : temps
T° : température
TAG triacylglycérols
µl : microlitre
µm : micromètres
UV : ultra- violet
V : volume
WCO : Waste Cooking Oil
X : biomasse
YPD : Yeast extract – Peptone-Dextrose
YPDA: Yeast extract – Peptone-Dextrose-Agar/Agar
YPDOA : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Oleic Acid.
YPDO MW : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Olive Mill Wastewater

YPDWCO: Yeast extract – Peptone-Dextrose- Waste Cooking Oil.

YPDLA : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Linoleic Acid.

Liste des figures

- Figure 1: Schéma décrivant la taxonomie de *Y. lipolytica* 6
- Figure 2: la morphologie de la levure *Y. lipolytica* au cours de la croissance : *Y. lipolytica* a été cultivée dans des flacons contenant du (ABC) glucose (D EF) l'huile d'olive comme seule source de carbone et changements dans le DOC. A,d) Cellules individuelles; (b,e) pseudomycelia et cellules uniques; (c,f) mycélium véritable et cellules uniques. Conditions de culture : pH $6 \pm 0,5$; température, 28 ± 1 °C; agitation, 50 tr / min (Bellou *et al.*, 2014). 7
- Figure 3 : Applications biotechnologiques de *Yarrowia lipolytica* 10
- Figure 4: Les lipides pour la cellule levurienne. A) Accumulation de lipides intracellulaires dans une cellule de *Y. lipolytica* (Katre *et al.*, 2012). B) Lipides membranaires et Fonction structurale chez une cellule levurienne.(Ochoa 2012, modifie). 23
- Figure 5: Exemple de la nature d'un acide gras saturé (acide laurique) (Quentin *et al.*, 2015). 24
- Figure 6: 1) Exemple de numérotation des carbones et de doubles liaisons de l'acide palmitique. Il peut s'écrire comme C16:1 Δ^9 , ω^7 ou n-7. 2) Conformation préféré (a) d'une acide gras saturé (acide stéarique) et (b) d'un acide gras polyinsaturé (acide l'acide linoléique 18 :3 $\Delta^{9, 12, 15}$, conformation *cis*) (Beopoulose, 2009 ; Quentin *et al.*, 2015). 25
- Figure 7 : Structure d'une molécule mono, di et triacylglycérols (Quentin *et al.*, 2015). 28
- Figure 8 : Représentation de la structure générale des phospholipides (Quentin *et al.*, 2015). 29
- Figure 9: Structure générale des sphingolipides (Quentin *et al.*, 2015). 32
- Figure 10 : Formule squelettique de Sitostérol et d'Ergostérol (Quentin *et al.*, 2015). 34
- Figure 11: Formation des corps lipidiques. a) Images de microscopie optique (100 \times) après 48 h de culture, montrant la présence de Bosse à la surface de la cellule de *Y. lipolytica*. La culture a été réalisée dans un bioréacteur contenant un milieu YPD enrichi en acide oléique (YPDOA), à 28 ° C, pH 6,0 et limitation en oxygène dissous. b) Image en microscopie optique (100 \times) montrant les corps lipidiques dans les cellules de *Y. lipolytica*, après 24 h de culture dans YPDOA. La culture a été réalisée dans un bioréacteur, à 28 ° C, pH 6,0, sans limitation en oxygène dissous. c) Image en microscopie à fluorescence (100 \times) montrant une forte accumulation de lipides intracellulaires dans une cellule de *Y. lipolytica*. Les lipides intracellulaires ont été révélés avec une coloration rouge du Nil; de même, le lipide assimilé intracellulaire présentait une fluorescence rouge. L'échantillonnage a été effectué après 30 h de culture en bioréacteur à 28 ° C, pH 6 (Bouchedja *et al.*, 2017). 36
- Figure 12: Schéma des voies impliquées dans la biosynthèse des lipides (Ochoa, 2012). 40
- Figure 13: Représentation schématique de l'assimilation du substrat hydrophobe (SH) par *Y. lipolytica*. (1a, 1b) Les SH forment des émulsions et la taille des gouttelettes est réduite par le liposan sécrété. (1b) les TAG sont clivés par la lipase extracellulaire afin de libérer les acides gras. (2) Les gouttelettes de substrat s'accrochent aux protrusions cellulaires. (3) L'incorporation se fait par les mécanismes de transport (i.e. transporteurs ABC). (4) La modification du substrat se fait par des différentes voies (i.e. ω -oxydation pour les alcanes au RE, et le système monooxygénase P450. (5) Dégradation par la voie de la β -oxydation où (6) accumulation des lipides en forme de TAG (Beopoulos *et al.*, 2009). 43
- Figure 14: Interactions entre les cellules de *Y. lipolytica* et les substrats hydrophobes. Adhérence des cellules aux gouttelettes d'hexadécane pendant la croissance de *Y. lipolytica*. Les cellules sont incubées 5 heures sur un milieu minimum en présence de 1 % d'hexadécane comme unique source de carbone. Les cellules absorbent des petites (a) puis

de larges (b) gouttelettes d'alcane. (c) Adhérence des cellules de la souche W29 de <i>Y. lipolytica</i> aux gouttelettes d'acide ricinoléique utilisé comme substrat. <i>Y. lipolytica</i> est capable de fixer des mini-gouttelettes d'acides gras émulsifiées à sa surface (Fickers <i>et al.</i> , 2005).....	44
Figure 15: Analyse de la surface cellulaire de <i>Y. lipolytica</i> en présence d'acide oléique. Photographies en microscopie électronique de cellules de <i>Y. lipolytica</i> en culture sur milieu minimum en présence d'acide oléique. Des gouttelettes lipidiques (flèche rouge) et des protubérances (flèches bleues) sont observées (Mlickova <i>et al.</i> , 2004).....	45
Figure 16: Les différentes approches pour améliorer l'accumulation des acides gras dans les levures (Coa <i>et al.</i> , 2022)	49
Figure 17: Structure et formation de la γ -lactone et la δ -lactone (Dufossé <i>et al.</i> , 1994 et Pagot <i>et al.</i> , 1998 ; Waché <i>et al.</i> , 2002).	68
Figure 18 : Biotransformation de l'acide ricinoléique en γ -décylactone (Pinheiro, 2004).	70
Figure 19: Bioconversion de l'acide ricinoléique en de γ -décylactone (Okui <i>et al.</i> , 1963b; Gatfield <i>et al.</i> , 1993; Feron <i>et al.</i> , 1996a ; Schrader <i>et al.</i> , 2004).....	72
Figure 20: Enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxisomal de levure (Waché <i>et al.</i> , 1998).....	73
Figure 21: Voie de dégradation par la β -oxydation peroxysomale, de composés en C10 issus de l'acide ricinoléique (Waché <i>et al.</i> , 2001 ; Gomes <i>et al.</i> , 2010 ; Waché, 2013 ; Try <i>et al.</i> , 2018).....	75
Figure 22: Molécule de triacylglycérol d'acide ricinoléique (Azevedo <i>et al.</i> , 2009).	76
Figure 23. Modèle d'un bioréacteur autoclavable de 1-20 L « APPLICKON ».....	85
Figure 24: Cellule de Thoma et la formule suivante pour calculer la croissance cellulaire sur la cellule.	87
Figure 25: Schéma d'un montage Soxhlet (Cescut., 2009).	91
Figure 26: Schéma du montage expérimental.	95
Figure 27: Comportement <i>Y.lipolytica</i> concernant par la cinétique croissance cellulaire (DCW g/L) (◆—) et pH (—■—) de cultivée en fiole dans différents milieux de cultures.....	105
Figure 28: Image microscopique ($\times 100$) montrant la croissance cellulaire à 48h de la levure <i>Y.lipolytica</i> cultivée dans différents milieux (YPD, YPDOA, YPDLA et YPDWCO, YPDOMW, YPL) et à 48h de la levure cultivée dans (PCO).....	108
Figure 29: observation microscopique ($\times 100$) de <i>Y. Lipolytica</i> sur milieu des substrats hydrophobes (YPDM) sans (a) et sous une coloration de noir soudan(b).	111
Figure 30 : Images microscopiques (optique : $100\times$) sans et avec Noir Soudan respectivement, pour des milieux de fermentation qui visent à l'accumulation intracellulaire de lipides (YPD, YPDOA, YPDOMW et YPDWCO) après 24h (A), 48h (B) et 72 (C) de mise en culture en fiole.....	113
Figure 31: Cinétique de croissance cellulaire, pH, biomasse de <i>Yarrowia lipolytica</i> . Ce dernier a été cultivé sur 25 g L ⁻¹ de glucose (a), d'acide oléique (b), OMW (d) et WCO (c) comme mentionné dans « Méthodes » . Croissance des cellules (g. L ⁻¹) en fiole et bioréacteur carré pointant rouge et bleu, respectivement ; pH - triangle vert pointant vers le bas, biomasse (g L ⁻¹) -cercle noir. Encart : dans chaque graphique microscopie optique (panneau de gauche), Noir Soudan (panneau du milieu) et images de microscopie à fluorescence rouge du Nile red (panneau de droite) de de <i>Y. lipolytica</i> , respectivement.	122
Figure 32: Biomasse, rendement lipidique et teneur en lipides de <i>Y.lipolytica</i> cultivé sur différents supports des substrats lipidiques : Bar (bleu) Biomasse (X, g L ⁻¹), Bar (écorce	

rouge) Lipide (L, g L ⁻¹), Barre (verte) Teneur en lipides (YL/X) (%). N. B: OA: oleic acid; OMW: olive-mill-wastewater; WCO: Waste cooking oil.....	126
Figure 33: Lipides cellulaires pendant la période d'incubation <i>Y.lipolytica</i> du milieu YPDOA à 24h, 48h et 72h.	127
Figure 34: Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de <i>Y.lipolytica</i> avec margine (OMW) comme substrats de carbone.....	130
Figure 35 : Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de <i>Y. lipolytica</i> avec huile usée (WCO) comme substrats de carbone.....	132
Figure 36: Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de <i>Y. lipolytica</i> avec l'acide oléique comme substrats de carbone.....	133
Figure 37: Procédé biotechnologique dans la gestion des déchets huileux dans la culture de <i>Y. Lipolytica</i>	137
Figure 38: Décoloration des eaux usées des huileries à huile après traitement par <i>Y. lipolytica</i>	139
Figure 39: Cinétique de décoloration lors de la croissance de <i>Y.lipolytica</i> sur les eaux usées brutes des huileries à huile avec une concentration de ~25 g/L. Culture en bioréacteur contrôlée comme décrit ci-dessus.	140
Figure 40: Cinétique de croissance de <i>Y. lipolytica</i> en milieu de biotransformation lors de la culture en fiole (◆) sans ajustement du pH (▲), et dans le bioréacteur (■) après ajustement des valeurs de pH à 6.....	150
Figure 41 : Observation au microscope de <i>Y. lipolytica</i> de culture sur huile de ricin dans des flacons et un bioréacteur. Image réelle des cellules de levure du milieu de biotransformation pendant 1, 3 et 5 jours A, B, C (flacons), D, E, F(bioréacteur), respectivement : (a) forme de levure, (b) forme de levure allongée, (c) formes pseudo-mycéliales, (d) formes mycéliales et (e) gouttelettes d'huile.	154
Figure 42 : Evolution de la croissance cellulaire dans le milieu de bioconversion de <i>Y. lipolytica</i> lors de la culture en flacons sur des volumes de concentration d'huile de ricin différents.	157
Figure 43 : Chromatogramme obtenu avec la souche <i>Y.lipolytica</i> de culture à 29 ± 1°C sur huile de ricin. Le temps est exprimé en minute.....	161
Figure 44: GC-MS des métabolites de l'acide ricinoléique produits par <i>Yarrowia lipolytica</i>	162

Liste des tableaux

Tableau 1. Les acides gras de chaîne constituée de 12 à 20 atomes de carbone(Quentin et al. 2015).....	26
Tableau 2. Composition en acides gras de quelques levures et champignons oléagineux (Ratlidge 1994; Meng et al. 2009; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Moigradean et al. 2013; Babau et al. 2013)	27
Tableau 3. Base biotechnologie de <i>Yarrowia lipolytica</i> pour l'élimination des pollutions de l'environnement et valorisation simultanés.	61
Tableau 5. Propriétés physico-chimiques de l'γ-décalactone (Souchon, 1994).....	69
Tableau 6. Composition du milieu YPD, plus 30 % glycérol pur stérile.	81
Tableau 7. Composition du milieu solide YPDA, de réveil de la souche.	82
Tableau 8. Composition du milieu YPD (Pré-cultures).	82
Tableau 9. Composition des milieux de cultures l'accumulation des lipides intracellulaires ..	82
Tableau 10. Composition du milieu PCO pour production de γ-décalactone	83
Tableau 11. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par <i>Y. lipolytica</i> avec margine (OMW) comme substrats de carbone.....	130
Tableau 12. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par <i>Y. lipolytica</i> avec huile usée (WCO) comme substrats de carbone.....	131
Tableau 13. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par <i>Y. lipolytica</i> avec l'acide oléique comme substrats de carbone.....	133
Tableau 14. Composition en acides gras des lipides accumulés chez <i>Yarrowia lipolytica</i> cultivés sur diverses des substrats.	136

INTRODCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERAL

Avec le développement rapide des industries (alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et aromatiques) et la crise énergétique croissante de ces dernières années et leurs exigences environnementales, la production microbienne avec le statut Generally Recognized as Safe (GRAS) – FDA (Food and Drug Administration) a reçu une attention croissante dans les applications biotechnologiques prometteuses (telles que SCO et l'arôme biotechnologies)(Coelho *et al.*, 2010; Abrahão *et al.*, 2013; Braga et Belo, 2016; Xie, 2017; Liu *et al.*, 2021). Par contre, produits biotechnologiques ont été comme une lampe pour le consommateur étant une excellente alternative naturelle à se débarrasser des produits de synthèse (chimiques) ou d'éviter l'extraction directe de la nature (plantes) comme ils ne s'avèrent plus performants et satisfaisants face à la demande croissante de diverses industries, en raison de ses défauts liés à la fois à la santé, la terre et à l'économie(Gonçalves *et al.*, 2009; Goncalves *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2014; Zinjarde, 2014a; Liu *et al.*, 2015; Madzak, 2021).

En général, les voies de production influencent grandement actuellement les décisions des consommateurs en déterminant l'acceptabilité des produits d'une manière ou d'une autre, étant les composés aromatisants et huileux dans de nombreux aliments et produits industriels connexes. L'utilisation des micro-organismes pour la production de ces produits permet de s'affranchir de la contrainte liée soit à l'utilisation de plantes de grandes cultures ou des moyens chimiques. Parmi ces micro-organismes, les levures sont connues pour leurs propriétés oléagineuses, qui s'orientent plus facilement vers la biosynthèse de « lipides » répondant à un cahier des charges précis, que ce soit pour des huilesx spécifiques ou des précurseurs de synthèse. Car ses produits ont des profils similaires en type et en composition à ceux produits par les plantes (Beopoulos *et al.*, 2009b, 2011; Lopes *et al.*, 2018; McNeil et Stuart, 2018a; Darvishi *et al.* 2018; McNeil et Stuart 2018b; Darvishi *et al.*, 2019; Fabiszewska *et al.*, 2022a).

Parmi les genres de levures, les probabilités plus élevées sont souvent associées au statut non conventionnel, non pathogène et GRAS de *Yarrowia lipolytica* en raison de ses caractéristiques (les outils génétiques disponibles chez cette levure permettent de modifier génétiquement les souches, contrairement à d'autres levures oléagineuses), et de ses applications dans divers domaines et applications biotechnologiques (Fickers *et al.*, 2003a, 2005; Barth 2013; Darvishi Harzevili, 2014a; Gonçalves *et al.*, 2014; Zinjarde 2014a, b; Csutak, *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Madzak, 2021). En plus d'être typique pour l'accumulation de

lipides, les productions composées aromatiques, *Yarrowia lipolytica* est doté d'outils génétiques matures et d'un système enzymatique capable de s'adapter à une variété d'environnements complexes en particulier des substrats de déchets à haute teneur en huile (Guerzoni *et al.*, 2001; Fickers *et al.*, 2005; Beopoulos *et al.*, 2008; Bankar *et al.*, 2009; Beopoulos *et al.*, 2009a, 2011; Fickers *et al.*, 2011; Ben Akacha et Gargouri 2015a; Bouchedja *et al.*, 2017; Larroude *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018)

En Algérie, la production d'huile d'olive est une industrie agricole traditionnelle bien connue, ainsi que, les pratiques de l'industrie du déjeuner dans les restaurants de repas rapides et les restaurants collectives (résidence universitaire) qui conduisent également à une production excessive de déchets tels que les déchets de différentes huiles de cuisson, en plus, les sous-produits à faible valeur ou coût négatif de produits laitiers telle que lactoserume. Tout ça, peuvent avoir un impact négatif sur nombreux écosystèmes et la santé humaine en raison rejetés dans les environnements terrestres, marins et d'eau douce sans traitement préalable des substances indésirables. Par contre, les industries de transformation d'effluent sont quasiment inexistantes. Devant ce constat et afin d'y remédier à cette situation et pour mieux valoriser ces produits, il est utile de se pencher sur sa transformation par l'acquisition de nouvelles technologies, notamment par l'obtention « forte valeur ajoutée » à base sur des matière première bon marché (Papanikolaou et Aggelis 2003; Papanikolaou *et al.*, 2007; Papanikolaou et Aggelis 2009; Federici *et al.*, 2009; Ageitos *et al.*, 2011; Papanikolaou *et al.*, 2011; Abad et Turon 2012; Sarris *et al.*, 2013, 2017; Lopes *et al.*, 2018; Sarris *et al.*, 2019; Hamimed *et al.*, 2020; Zotta *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2021; Fabiszewska *et al.* 2021, 2022b). Compte tenu de sa richesse en huile, ont fait de la biodégradabilité par les levures un critère de conception critique en termes de sélection des matières premières et les coûts. L'incorporation des substrats à valeur faible ou négative dans la formulation de milieux pour la production de composés à valeur ajoutée par de *Yarrowia lipolytica* pourrait être une approche biotechnologique prometteuse pourrait améliorer son économie de production et atteindre la durabilité de environnementales et industrielles (Bankar *et al.*, 2009; Economou *et al.*, 2011; Carota *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2018; Tzirita *et al.*, 2018; Baltrėnas et Baltrėnaitė 2020; Marks *et al.*, 2020; Caporusso *et al.*, 2021; Fabiszewska *et al.*, 2022b; Cao *et al.*, 2022). En complément, et compte tenu de sa profils en huile de levures, bioproduits tels que les huileux et l'arome microbiennes peuvent remplacer l'huile et saveurs produits par les plantes et leur valorisation pourrait représenter une forte valeur ajoutée sur l'intérêt d'écologies et

l'économique (Martínez *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021; Fabiszewska *et al.*, 2022b).

Dans ce contexte, ces travaux ont pour objectif l'étude de l'accumulation des lipides intracellulaires et la production d'arôme gamma décalactone chez de espèce levurienne *Yarrowia lipolytica*. Il s'agit de comprendre la comportement et performances de synthèse d'arôme et d'accumulation de lipides chez la levure *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) avec une approche systémique à différentes échelles d'analyse du niveau intracellulaire pour les lipides de différent sources de carbone, en particulier, dans une démarche combinant la production et bio remédiation. Et ainsi que, du niveau extracellulaire pour biotransformation de huile ricin comme source de carbone à l'arôme de la biotechnologie microbienne.

L'enjeu scientifique de ces travaux réside, à partir de la connaissance des travaux antérieurs et de la mise en place d'un procédé de culture adapté (Bouchedja, 2017), dans la étude du comportement de la levure et de son performance en condition de production d'arôme et d'accumulation de lipides à partir des substrats hydrophobes ou hydrophiles . En complément, La transposition et l'optimisation du procédé de culture en bioréacteurs vers la souche *Y. lipolytica*, modèle d'étude privilégié, contribue à élucider le(s) facteur(s) influant les vitesses croissance de levures, les rendements de la synthèse d'arôme et du accumulation des lipides sur déférent des substrats ou seul substrat pour production d'arôme (huile de ricin). L'utilisation de souches nouvelle de *Y. lipolytica* permet de dégager des hypothèses sur les capacités d'accumulation chez les levures et sur profil cellulaire en acides gras, et sélections des matières premières efficaces et pas coûteuses comme une approches pour améliorer l'accumulation des acides gras dans les levures et réduction des coûts de fermentation.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. *YARROWIA LIPOLYTICA*

A.1. Généralité

Dans la nature, certains micro-organismes sont capables de produire et d'accumuler de grandes quantités de graisse dans les cellules lorsqu'ils sont cultivés dans un milieu contenant des oies, des graisses et des alcanes comme source de carbone. Un microorganisme, appelé oléagineux, en raison de sa nature de stockage des lipides à l'intracellulaires, il peut atteindre plus de 20% (Ratledge 1991, 1993, 1994, 2002, 2004). En général, ces organismes peuvent s'autotrophes tels que les algues photosynthétiques et les bactéries bleues ou hétérotrophes telles que les bactéries, les champignons et les levures. Des 600 espèces des levures connues, seul 30 (5 %) ont été identifiées comme oléagineuses (*Cryptococcus albidus*, *Lipolyces lipofera*, *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia lipolytica*..) (Ratledge 2002; Beopoulos *et al.*, 2009a), qu'ont la capacité de produire et d'accumuler des lipides des valeurs dépassant 72% de la masse sèche de la cellule (Ratledge 1991, 2013; Beopoulos *et al.* 2009a), sachant que le profil lipidique a entraîné des différences entre les espèces (Ratledge 2004; Beopoulos 2006; Beopoulos et Nicaud 2012). Les levures oléagineuses présentent des avantages par rapport aux autres micro-organismes oléagineux en termes modes leur culture et leur productivité, en compléments, utilisé-la grande variété de substrats comme sources de carbone tels que les substrats osidiques, lipidiques ou paraffines ((Barth et Gaillardin 1997; Fickers *et al.*, 2005; Beopoulos *et al.*, 2008, 2010), ainsi que plusieurs types de sous-produits de faible valeur ou nocifs et les bioconvertir en produits à haute valeur ajoutée et en ce qui concerne leur productivité elle capable de accumulé quantités élevée en lipides (c.t.d. des triglycérides (plus de 80% en masse de la matière grasse totale), composés d'acides gras C16 et C18) et d'une petite fraction d'esters de stéryle (SE) (Ratledge 1994, 2004). Ces les avantages est plutôt chez *Yarrowia lipolytica*. Cette levure, anciennement appelée *Candida lipolytica*, *Endomycopsis lipolytica* ou *Saccharomycopsis lipolytica*, est une levure aérobie. Sachant qu'il est le seul capable de collecter de grandes quantités d'acide linoléique, représentant plus de 50% des acides gras accumulés (Beopoulos 2006; Beopoulos *et al.* 2009a). En effet, c'est une levure non pathogène, Il a été isolé de divers environnements liés à l'alimentation (c.-à-d.le fromage, les saucisses...ect), mais également des eaux usées, des sols et des champs de pétrole (Kreger-Van Rij 1984; Guerzoni *et al.*, 1993; Sinigaglia *et al.*, 1994; Roostita 1996; Barth et Gaillardin 1997; Gardini *et al.*, 2001; Guerzoni *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2001; Vasdinyei 2003; Sinigaglia *et al.*, 2010; Bataiche *et al.*, 2014;

Zinjarde 2014a). Elle est classée par la Food and Drug Administration (FDA) comme un microorganisme GRAS (generally recognized as safe) (Groenewald *et al.*, 2014). La levure *Y. lipolytica* est considérée comme un organisme modèle très intéressante pour l'étude du dégradation de substrats hydrophobes (Fickers *et al.*, 2005; Escamilla-García 2008; Beopoulos *et al.*, 2010; Thevenieau *et al.*, 2010; Economou *et al.*, 2011; Fukuda 2013) et du métabolisme lipidique chez les eucaryotes (Beopoulos *et al.*, 2009b, 2011; Fukuda 2013; Sarris *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2018), de la biogenèse des peroxysomes (Endrizzi *et al.*, 1996; Eitzen *et al.*, 1996; Pagot *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Titorenko *et al.*, 2000; Titorenko et Rachubinski 2000; Guo *et al.*, 2003), et pour l'étude de la voie de sécrétion de protéine (Frandsen *et al.*, 2001; Nicaud *et al.*, 2002; Madzak *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2008; Gasmi *et al.*, 2011; Madzak et Beckerich 2013; Madzak 2015, 2021; Yan *et al.*, 2018; Soudier *et al.*, 2019; Vandermies et Fickers 2019), le dimorphisme (Zinjarde *et al.*, 1998, 2008; Bellou *et al.*, 2014; Palande *et al.*, 2014; Bankar *et al.*, 2018). Ainsi que pour des applications biotechnologiques dans des procédés de biodégradation de composés polluants ou sous-produits de faible valeur ou nocifs (alcanes, pétrole) (Zinjarde 2014b; Johnravindar *et al.*, 2018), de biosynthèse acides organiques (Papanikolaou *et al.*, 2009)), de production de lipides (Kavadia *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2003; Papanikolaou et Aggelis 2003b; Ratledge 2004; Papanikolaou *et al.*, 2006; Beopoulos *et al.*, 2008; Papanikolaou et Aggelis 2011a; Kavšček *et al.*, 2015; Rakicka *et al.*, 2015; Dobrowolski *et al.*, 2020; Fabiszewska *et al.*, 2022a; Cao *et al.*, 2022), et de production de lipases (Fickers *et al.*, 2003b, 2004, 2011b, 2013; Brozzoli *et al.*, 2009; Imandi *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012; Moftah *et al.*, 2013; Brígida *et al.*, 2014; Casas-Godoy *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2020), et de bioconversion (arômes : γ -décalactone) à partir de substrats hydrophobes (Braga et Belo 2016; Soares *et al.*, 2017). *Yarrowia lipolytica* a également fait l'objet de nombreuses recherches physiologiques, génétiques et métaboliques (Guerzoni *et al.*, 1993; Sinigaglia *et al.*, 1994; Barth et Gaillardin 1997; Zinjarde *et al.*, 1998; Larroude *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2022). Mais son utilisation dans des applications environnementales et industrielles (Bankar *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2010; Zinjarde *et al.*, 2014) et utilisations liées à l'alimentation (Adams et Moss 2008; Zinjarde 2014b; Ben Akacha et Gargouri 2015b; Sekova *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2018; Małajowicz *et al.*, 2020) est un domaine relativement nouveau qui offre de plus en plus d'attention à différents niveaux avec l'augmentation annuelle des besoins en nouvelles graisses et l'arome. Cette section représente un moyen de combiner les connaissances générales de cette levure avec l'exposition de divers métabolites d'intérêt dans les traitements environnementaux et industriels liés à la production de graisses et d'arômes. Les propriétés qui rendent *Y. lipolytica* adapté sont décrites dans cette section.

A.2. Taxonomie

Yarrowia lipolytica est une levure oléagineuse dont la taxonomie est présentée sur la figure 1 (van der Walt and von Arx 1980). Il s'agit d'un champignon ascomycète qui était classifié initialement comme une espèce du genre *Candida* car aucun stade sexué n'a été observé, et plus spécifiquement caractérisée comme *Candida lipolytica* due à sa capacité d'utiliser des *n*-paraffines et des huiles comme seule source de carbone. A la fin des années 1960 par Wickerham *et al.* (1970) il a été déterminé sous la forme parfait *C. lipolytica*. Il a également été observé que cette levure était capable de produire de grandes quantités d'acides organiques lorsqu'ils sont cultivés sur ces substrats. Au début des années 70 suggéré David Yarrow (Yarrow, 1972) un nouveau nom est connu comme le genre « *Yarrowia* ». En 1980 le nom de l'espèce « *lipolytica* » a été nommé en se basant sur sa capacité à hydrolyser les lipides (Walt *et al.*, 1980), devenir connue sous le nom de *Yarrowia lipolytica* (Barth et Gaillardin 1996, 1997; Nicaud *et al.*, 1998; Suzzi *et al.*, 2001; Nicaud, 2012).

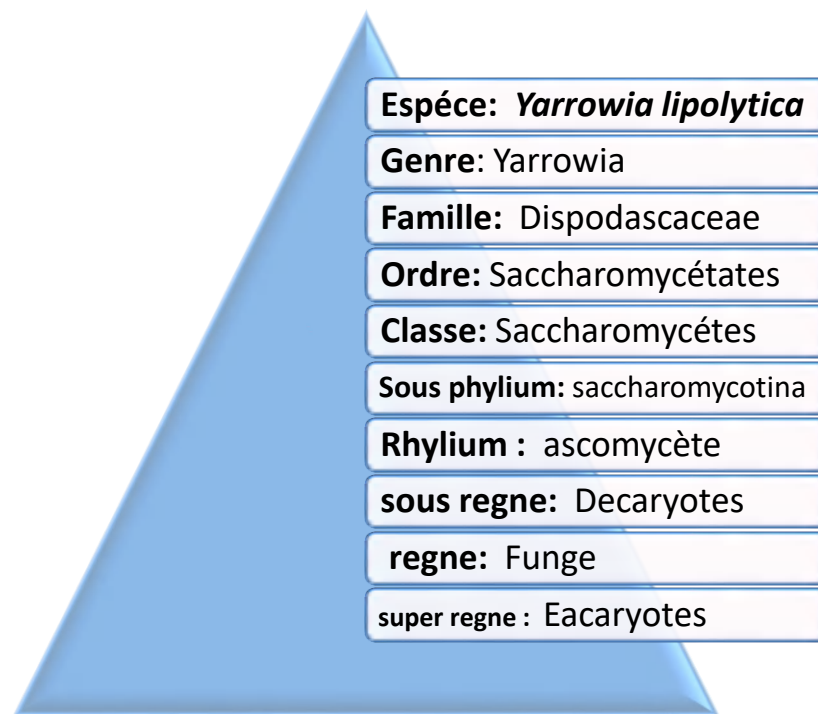


Figure 1: Schéma décrivant la taxonomie de *Y. lipolytica*

A.3. Morphologie

Malgré ses diverses, pour utilisations des applications biotechnologiques et aussi ses différences en termes de génétique, physiologie ou biomoléculaire (Barth et Gaillardin 1996; Nicaud *et al.*, 1998; Beopoulos *et al.*, 2009c; Bankar *et al.*, 2009; Fickers *et al.*, 2011b; Barth,

2013), la levure *Yarrowia lipolytica* par rapport les autres levures tels que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schzosaccharomyces pombes* a particularité de présenter une double forme ((Barth et Gaillardin 1997; Nicaud, 2012). *Yarrowia lipolytica* est un champignon dimorphique de la famille des Saccharomycetaceae naturel qui forme des cellules de levure, selon les conditions environnementales, est capable de se développer sous différentes formes soit des cellules de levure, soit pseudo-mycélium et mycélium. De plus, les souches de *Y. lipolytica* présentent diverses colonies formes, allant de lisse et brillant à fortement alambiqué et matles qu'st déterminée à la fois par les conditions de croissance et le fond génétique des souches(Zinjarde *et al.*,1998; Szabo 1999; Cruz *et al.*, 2000; Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002; LobÃ£o *et al.*, 2007; Zinjarde *et al.*, 2008; Bellou *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2015a; de Andrade *et al.*, 2017; Try *et al.*, 2018; Bankar *et al.*, 2018; Małajowicz *et al.*, 2020). Les conditions de croissance (aération, sources de carbone et d'azote, pH, concentration en oxygène dissous dans le milieu, etc.) et par les caractéristiques génétiques de la souche(Barth et Gaillardin 1997; Szabo 1999; Richard *et al.*, 2001; Kawasse *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2012; Palande *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2015a; Timoumi *et al.*, 2017; de Andrade *et al.*, 2017; Bouchedja *et al.*, 2017; Try *et al.*, 2018; Timoumi *et al.*, 2018; Bankar *et al.*, 2018; Bouchedja *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020)

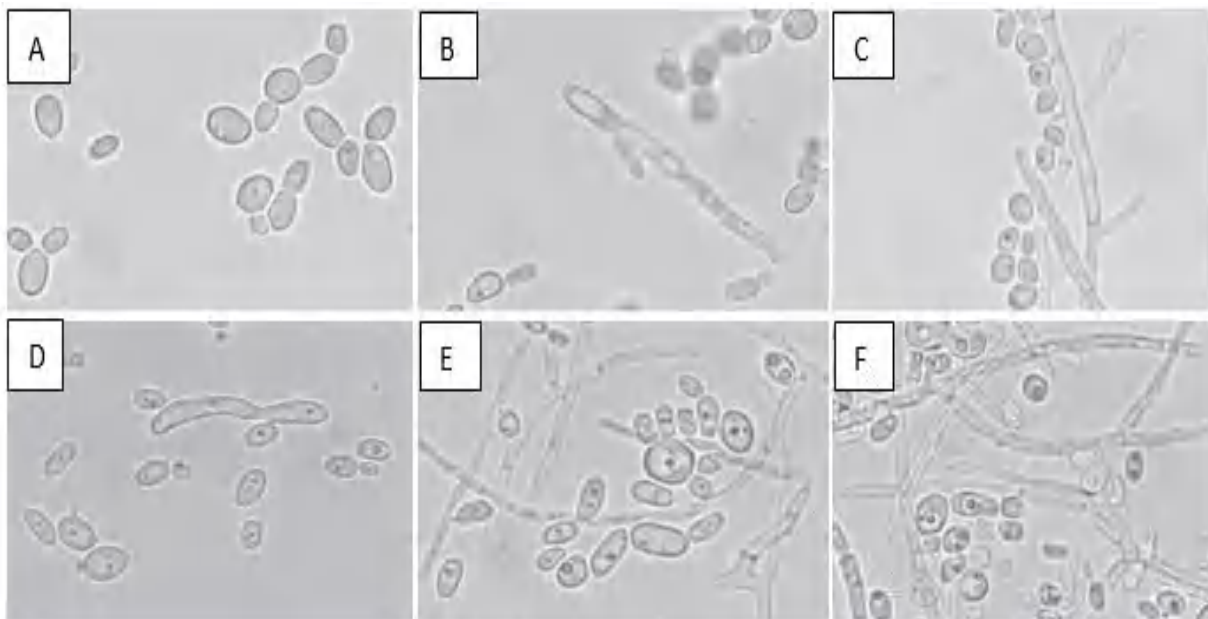


Figure 2: la morphologie de la levure *Y. lipolytica* au cours de la croissance : *Y. lipolytica* a été Cultivée dans des flacons contenant du (ABC) glucose (D EF) l'huile d'olive comme seule source de carbone et changements dans le DOC. A,d) Cellules individuelles; (b,e) pseudomycelia et cellules uniques; (c,f) mycélium véritable et cellules uniques. Conditions de culture : pH $6 \pm 0,5$; température, 28 ± 1 6C; agitation, 50 tr / min (Bellou *et al.*, 2014).

A.4.Habitat et Caractérisations physiologie

Yarrowia lipolytica est une levure aérobie, principalement trouvée dans les sols et les effluents (dans des environnements marins et hypersalins) ou certains environnements pollués par (pétrole ou des huiles et des eaux résiduelles agro-industrielles) ((Nahabieh et Schmid 1990; Beopoulos 2006; Kim 2010; Nicaud 2012; Bataiche *et al.*, 2014; Zinjarde *et al.*, 2014), ainsi que on peut également l'isoler d'aliments (p.ex. le fromage, le yaourt, la charcuterie, le shoyu (sauce de soja), l'huile d'olive, etc.)(Barth et Gaillardin 1997; Gardini *et al.*, 2001; Guerzoni *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2001; Vasdinyei 2003; Chaillan *et al.*, 2004; Bankar *et al.*, 2009; Mafakher *et al.*, 2010; Bataiche *et al.*, 2014; Darvishi Harzevili 2014b), elle est particulièrement adaptée aux substrats hydrophobes (Fickers *et al.*, 2005; Escamilla-García 2008; Beopoulos *et al.*, 2010; Thevenieau *et al.*, 2010). La levure non conventionnelle *Y. lipolytica* a été développée en tant que outil polyvalent et attrayant pour une grande variété d'applications biotechnologiques(Barth 2013; Csutak *et al.*, 2015; Sekova *et al.*, 2015). Cette levure a plusieurs propriétés physiologiques ayant une signification industrielle par rapport aux levures *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* au niveau physiologique, ont un métabolisme aérobie stress. Elle est considérée comme un levure mésophile et non pathogène, croît sous des températures allant de 10 à 32-34 °C ((Sinigaglia *et al.*, 1994; Barth et Gaillardin 1997; Beopoulos *et al.*, 2010; Bellou *et al.*, 2014) mais exceptionnellement jusqu'à 37°C. Pour toutes ces propriétés qui permettent de multiples opérations par utilisation cette levure, notamment pour l'industrie agroalimentaire (Bankar *et al.* 2009; Coelho *et al.*, 2010; Leiva-Candia *et al.*, 2014; Zinjarde 2014b; Madzak 2021; Cao *et al.*, 2022) et pharmaceutiques (Aloulou *et al.*, 2007a, b; Madzak 2021), *Y. lipolytica* est un organisme approuvé comme GRAS (de l'Anglais « Generally Recognized As Safe ») par la FDA (« American Food and Drug Administration ») (Groenewald *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Dans les différents endroits où il vit et ses activités, tout cela indique son métabolisme varié et sa capacité à survivre dans des conditions environnementales difficiles. Cette levur a attiré l'intérêt industriel de produire plusieurs métabolites (c.t.d. son capacité à qui pousse sur une variété de substrats hydrophobes(Fickers *et al.*, 2005; Papanikolaou *et al.*, 2006; Bankar *et al.*, 2009; Beopoulos *et al.*, 2010, 2011), comme seule source de carbone tels que les alcanes (hexadécane, décane) et les n-paraffines, des lipides tels que les acides gras (acide ricinoléique, acide palmitique, acide laurique, acide oléique) et des triglycérides (trinoléine, tripalmitine)) comme les lipides(Papanikolaou *et al.*, 2003; Papanikolaou et Aggelis 2003b; Beopoulos *et al.*, 2009a),les protéines hétérologues (Nicaud *et al.*, 2002; Madzak *et al.*, 2004; Gasmi *et al.*, 2011; Madzak et Beckerich 2013; Madzak, 2015; Soudier *et al.*, 2019) ou de l'acide citrique(Abou-Zeid et Khoja 1993; Papanikolaou *et al.*, 2006; Rymowicz *et al.*, 2010; Cavallo *et al.*, 2017).

Ainsi que, elle peut utiliser les sucres comme source carbonés tels : le glucose, le galactose et le mannitol (Papanikolaou *et al.* 2006; Yalcin *et al.* 2009; Moeller *et al.*, 2012; Lazar *et al.*, 2014), Par contre elle ne peut pas assimiler le saccharose car elle ne possède pas d'invertase(Papanikolaou *et al.*, 2007; Lazar *et al.*, 2011). D'autres sources de carbone utilisées par *Y. lipolytica* sont les acides organiques tels que acétate, lactate, propionate, malate, succinate ou citrate(Venter *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2008; Bashir *et al.*, 2019; Do *et al.*, 2019), les acides aminés (la méthionine)(Cernat Bondar *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2008; Fathi *et al.*, 2019), ainsi que le glycérol(Papanikolaou et Aggelis 2003a; Rymowicz *et al.*, 2010; Dobrowolski *et al.*, 2020) et l'éthanol, ce dernier à une concentration inférieure à 3% (Barth et Gaillardin 1997; T. *et al.*, 2002; Thliveros *et al.*, 2014). En moyenne, la levure *Y. lipolytica* peut accumuler des lipides intracellulaire à quantité 40% de son poids sec cellulaire, mais dans des conditions de limitation des nutriments, ils peuvent accumuler des lipides à quantité dépassant 70% de leur biomasse(Beopoulos *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2022). Triacylglycérols (TAG), représentée plus de 80% en masse de la matière grasse totale), composés d'acides gras C16 et C18 et d'une petite fraction d'esters de stéryle (SE), appelés collectivement lipides neutres. Ces lipides de stockage s'accumulent dans un compartiment spécialisé de la cellule appelé corps lipidique (LB)(Beopoulos *et al.*, 2009a, 2011). D'autre part, la teneur en lipides et le profil des LB diffèrent selon les espèces, mais la composition en acides gras reste similaire(Saygün et al. 2014; Tzirita *et al.*, 2018; Fabiszewska *et al.*, 2022b). On peut cependant reconnaître que les principaux acides gras produits par la levure oléagineuse *yarrowia lipolytica* sont palmitique (C16: 0), stéarique (C18: 0), oléique (C18: 1) et linoléique (C18: 2)(Saygün *et al.*, 2014; Katre *et al.*, 2017; Sarris *et al.*, 2019). Il a été suggéré que de telles huiles de levure pourraient être utilisées comme matières premières pour la production de biodiesel nécessitant des acides gras en C16-C18(Steen *et al.*, 2010; Katre *et al.*, 2012, 2017, 2018; Martínez *et al.*, 2015; Darvishi *et al.*, 2017) ou comm huiles fonctionnelles d'alimentation(Lopes *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2022). En complément, Il a la capacité de synthétiser des lipides saturées telles que la stéarine et d'obtenir sa production d'acides polyinsaturés après manipulation génétique(Beopoulos *et al.*, 2009b; Papanikolaou et Aggelis 2011b; Ji et Huang 2019; Gemperlein *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2021; Palyzová *et al.*, 2022)

A.5.Applications de *Yarrowia lipolytica*

La levure non conventionnelle *Y. lipolytica* a été développée en tant que outil polyvalent et attrayant vers la production de divers produits d'application biologiques et biotechnologiques (Markham et Alper 2018; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018; Madzak, 2021).

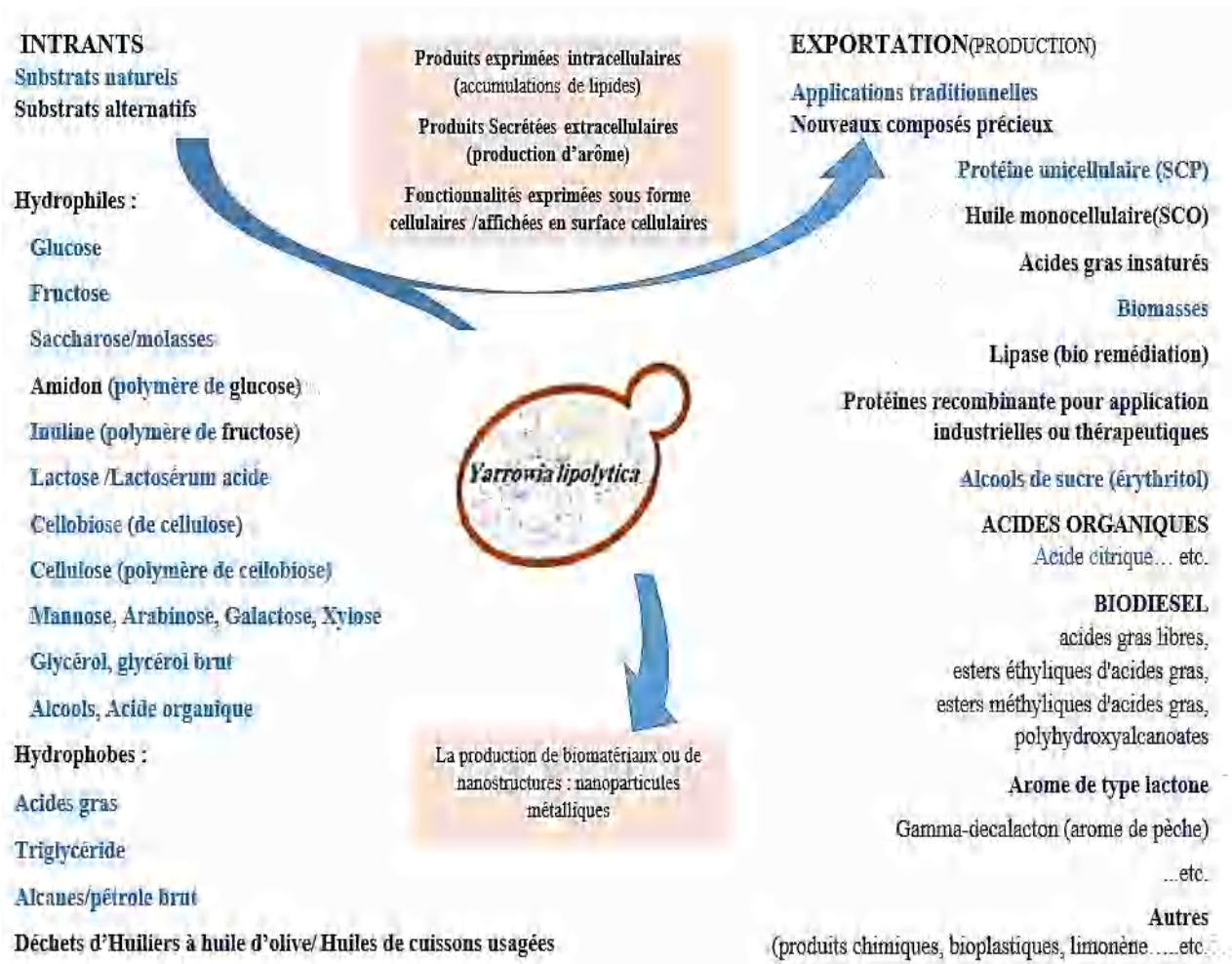


Figure 3 : Applications biotechnologiques de *Yarrowia lipolytica*

Les principales de ces applications sont la production de protéines(Vandermies and Fickers 2019), de lipases(Moftah *et al.*, 2013), de lipides (Beopoulos *et al.* 2009a; Arous *et al.* 2016) , d'arômes(Braga *et Belo* 2016) et d'acides organiques ((Morgunov *et al.* 2018a; Carsanba *et al.* 2019). Ainsi que pour l'industrielles et environnementales (Bankar *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2010; Rymowicz *et al.*, 2010; Rywińska *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2020). Selon les facteurs influencer directement le comportement métabolique de la levure (T° d'incubation, pH, source de carbone, source d'azote, oligoéléments et l'intensité de l'oxygénation)(Alchihab *et al.*,2010a; Saygün *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2015b; Ferreira *et al.*, 2016; de Andrade *et al.*, 2017; Gorczyca *et al.*, 2020; Fabiszewska *et al.*, 2022b), avec possibilité modifiées génétique(Groguenin 2004; Braga *et al.* 2015a; Sagnak *et al.* 2018; Abdel-Mawgoud *et al.* 2018; Ji *et Huang* 2019; Liu *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2022) Les souches *Yarrowia lipolytica* se distingue par sa capacité à produire :

A.5.1. Production de protéases

Les levures sont appropriées pour l'expression (pour des raisons de qualité : étant des organismes unicellulaires, facilité de manipulation et sa capacité à sécréter naturellement) d'une grande variété des protéines complexes et d'enzymes homologues et hétérologues dans le milieu de culture, utilisez-le (comme produit fini et comme catalyseur) dans différentes applications dans les domaines de la pharmaceutique, de la chimie, des cosmétiques (l'interféron, l'insuline, les antigènes d'interleukines ou de virus), de l'alimentation humaine et animale, et du traitement des déchets (les amylases pour l'industrie alimentaire et papetière et les laccases pour le blanchiment ou la chymosine pour la fabrication du fromage) (Ogrydziak 1988, 2013; Nicaud *et al.*, 2002; Madzak *et al.*, 2004; Yuzbasheva *et al.*, 2011; Gasmi *et al.*, 2011; De Pourcq *et al.*, 2012; Madzak et Beckerich, 2013; Tavano, 2013; Madzak, 2015; Theerachat *et al.*, 2017, 2019). Sachant que, le dégradé des substrats hydrophobes est très efficacement dans *Yarrowia lipolytica* (Fickers *et al.* 2005; Thevenieau *et al.* 2010), Ce dernier représente une usine cellulaire prometteuse pour la production de protéines (Nicaud *et al.* 2002; Madzak et Beckerich 2013; Soudier *et al.* 2019; Vanderbies et Fickers 2019). Vraiment, elle peut produire les enzymes dans des conditions d'induction commodes telles que la protéase, la RNase, la phosphatase (Ogrydziak 1988), la lipase (Hadeball 1991; Fickers *et al.* 2003b, 2011b), avec un rendement élevé ((1–2 g l⁻¹) de protéase extracellulaire alcaline (AEP) (Plus de 99% de l'activité AEP se situe dans le milieu extracellulaire et moins de 1% est associé à l'enveloppe cellulaire) (Young *et al.* 1996; Ogrydziak 2013), pour des applications industrielles (Madzak *et al.* 2004), De plus, elle est représentée une alternative reconnue, pour potentiel la production de protéines hétérologues telles que la laccase (EC 1.10.3.2) (Madzak *et al.* 2004; Theerachat *et al.* 2017, 2019; Darvishi *et al.* 2017) et l'époxyde hydrolase (Thevenieau *et al.* 2007), et chacune dans des conditions spécifiques (Thevenieau *et al.* 2007, 2010; Domínguez *et al.* 2010; Madzak and Beckerich 2013). Divers promoteurs, ont été développés au fil des ans (Madzak *et al.* 2004). Les plus couramment utilisés de nos jours sont hp4d et POX2 et aussi le promoteur ICL1. ces séquences d'activation (ou dérivé) du promoteur du gène de la protéase alcaline de 4 copies et du gène codant pour l'acyl-CoA oxydase et aussi du gène de l'isocitrate lyase, respectivement (Madzak *et al.* 2004), plus détaillée pour ces promoteurs ont été publiés (Förster *et al.* 2007). *Yarrowia lipolytica* sécrète des protéases alcalines (AEP) et acides (AXP) qui codée par les gènes XPR2 et AXP1 respectivement, ont été séquencées pour plusieurs souches (Ogrydziak 2013), dont la sécrétion dépend du pH du milieu de croissance ((Barth and Gaillardin 1996; Young *et al.* 1996; Madzak *et al.* 2004; Barth 2013). Ainsi que dépend la quantité de carbone, d'azote, de sulfure qu'est également contrôlée par sa privation dans le milieu de culture (Darvishi Harzevili 2014). Les

deux protéases (AEP, AXP) sont également induites à la fin de la phase exponentielle sur des milieux complexes contenant des protéines (Madzak et al. 2004). Les conditions d'induction de les deux sont similaires à l'exception du pH (Young et al. 1996). Les premiers éléments utilisés au début de la production hétérologue à *Y. lipolytica* voir (Madzak and Beckerich 2013; Darvishi Harzevili 2014).

A.5.2. Production de lipases

Les lipases sont définies comme (triacylglycérol acylhydrolase E.C. 3.1.1.3), et ces sont les enzymes les plus importantes qui catalysent de nombreuses réactions tels que hydrolyses partielle ou complète des triacylglycérols. ainsi que, inversement, réactions d'estérification, interestérification et transestérification de lipides (Hadeball 1991; Fickers et al. 2011, 2013; Brígida et al. 2014). Par conséquent leur entrant dans diverses industries, y compris l'application de la transformation des composés hydrophobes (les synthèses organiques de spécialité, la résolution des mélanges racémiques et les analyses chimiques), en particulier dans la biotechnologie des graisses et des huiles (l'hydrolyse des graisses et des huiles, la modification des graisses, l'amélioration du goût dans la transformation des aliments ((Hadeball 1991; Sharma et al. 2001; De Pourcq et al. 2012). Ces applications sont plutôt pour les lipases microbiennes (levure *Y. lipolytica*) étant l'outil le plus polyvalent (produire des lipases extracellulaires, intracellulaires et liées à la membrane) (Hadeball 1991; Corzo and Revah 1999; Fickers et al. 2004, 2011; Papanikolaou et al. 2007; Salihu et al. 2012; Fraga et al. 2018; Domínguez et al., 2003). *Yarrowia lipolytica* est très efficace pour dégradée les substrats (c.t.d. synthèse et élimination efficaces des enzymes protéolytiques et dégradant les lipides), qui dépendent de son utilisation comme source de carbone pour la synthèse des lipases par des rendements plus élevés (Yadav et al. 2011, 2020), Contrairement au glucose, il semble inhiber la production de lipase (Corzo et Revah 1999; Fickers et al. 2003, 2004; Beopoulos et al. 2009). En général, concernant l'effet de la productivité et l'activité des lipases (affectées par les gènes de codage génétique et divers facteurs environnementaux (Lopes et al. 2007, 2009; Brígida et al. 2014b; Zhou et al. 2019). Parmi 16 paralogues de gènes codant pour la lipase chez *Yarrowia lipolytica*, dont seulement trois isoenzymes (Lip2p, Lip7p et Lip8p) sont connu(c.t.d. Ont été partiellement caractérisées), les enzymes intracellulaires (Lip1p, Lip3p et Lip6) et une Lip2p est extracellulaire (Pignède et al. 2000; Fickers et al. 2004). De plus, Il existe deux lipases, Lip7p et Lip8p, sont des enzymes liées aux cellules qui sont très stables sous pH les variations (et T°) (Fickers et al. 2011). principalement, et en raison de leurs applications potentielles la levure *Y. lipolytica* a la capacité de synthétisée la lipase Lip2 (responsable de toute l'activité de lipase extracellulaire de

la souche *Y.lipolytica*)(Pignède et al. 2000; Fickers et al. 2003b; Aloulou et al. 2007a; Bordes et al. 2010) qu'il est très intéressant dans diverses applications biotechnologiques (il peut être utilisé sous leur forme libre ou immobilisée) ((Sharma et al. 2001; Imandi et al. 2010; Fickers et al. 2011b; Salihu et al. 2012; Pereira de Andrade et al. 2017; Fraga et al. 2018). L'intérêt récent pour la la production de lipases est associée à leurs applications dans : (1) La bioconversion des résidus agricoles(en tant que matière première renouvelable abondante et peu coûteuse pour produire des produits à valeur ajoutée), plus précisément traitement des eaux usées huileuses ou de déchets solide (p.e. OMW; POME; WCO à réduction de la DCO et/ou DBO polyphenol et aussi déchets de mangue (pelure, tégument et noyau) et PKC , ; par décomposition et élimination des substances huile uses)(Scioli and Vollaro 1997; Lopes et al. 2009; Gonçalves et al. 2009; Mafakher et al. 2010; Moftah et al. 2013; Yan et al. 2018), (2) La synthèse de médicaments ou la thérapeutique humaine (Fickers et al. 2003b; Guieysse et al. 2004; Liu et al. 2015). (3) les industries alimentaires et cosmétiques, ainsi que pour nettoyeurs et transformation du cuir ((Sharma et al. 2001; Salihu et al. 2012; Fraga et al. 2018), de plus, la lipase *Y. lipolytica* peut également être utilisé dans le domaine de la bioénergie (pour la production de biocarburants) et dans la biodégradation des plastiques (PHA ; PCL) (Sharma et al. 2001; Meng et al. 2009). Plus récemment, Note que la stabilité thermique limitée de *Y. lipolytica* lipase 2 (Lip2) entrave son application industrielle(Li et al. 2019). Pour améliorer sa sensibilité à la chaleur, diverses liaisons disulfures simples qui avaient été précédemment identifiées ont été collectées et combinées Li et al. (2019) qu'il a montrez a indiqué dans ses résultats une augmentation de l'endurance thermique qui offre un plus grand potentiel d'application industrielle.

A.5.3.Production de lactones

Avec augmentation la demande d'arômes et d'additifs alimentaires et et les défauts de leur synthèse chimique (dont le principal problème de utiliser des moyens chimiques est l'obtention sélective de molécules chirales, car elle suspecte des effets toxiques ou nuisibles pour la santé) Ainsi que l'intérêt de consommer des produits dits naturels a augmenté considérablement (Alchihab *et al.*, 2010b). Il a été observé que la production d'odeurs à l'aide de micro-organismes(*Yarrowia lipolytica*) est un domaine relativement nouveau ainsi qu'une méthode alternative d'extraction des plantes ou de synthèse chimique (qui n'est plus efficace et satisfaisante pour répondre à la demande croissante pour diverses industries) parce que les composés aromatiques qu'ils produisent sont "identifié naturels", ce qui explique le grand intérêt pour leur production en biotechnologie(Braga et Belo 2016). L'organisme le mieux adapté à la production ce l'arômes(γ -décalactone) est la levur *Y. lipolytica* ((Waché et al. 2003; Schrader et

al. 2004; Braga et al. 2012), à partir d'acide ricinoléique et d'huile de ricin ((Pagot et al. 1998; Aguedo et al. 2004; Moradi et al. 2013, 2016), à rendement élevées (Waché et al. 2003), avec une consommation qui s'élève à quelques centaines de tonnes par an ((Schrader et al. 2004). Les molécules (γ -décylactone) possède un arôme fruité et huileux utilisé dans la formulation d'arômes de fruits comme la fraise, l'abricot ou la pêche qui a été approuvée comme additif alimentaire par la FDA (Braga et Belo 2016). Par contre, elle est utilisée aussi dans des produits fermentés comme le Whisky (Romero-Guido et al. 2011a), ainsi que son effet positif sur les propriétés volatiles et sensorielles des saucisses fermentées séchées, dans le développement des arômes des fromages Cantalet (petit Cantal) ou dans des fromages de type Feta fabriqués à partir de lait de vache (Braga et Belo 2016). L'acide ricinoléique est un acide gras hydroxylé (C18) et, sous sa forme estérifiée, est le constituant principal de l'huile de ricin. Cet acide gras est le précurseur de γ -décylactone qu'est après les étapes de biotransformation par la β -oxydation jusqu'à la production de l'acide 4-hydroxydécanoïque (C10), qui se lactonise tout de suite pour donner la γ -décylactone (Groguenin 2004; Coelho et al. 2010; Gonçalves et al. 2014). Pour augmenter la disponibilité de l'acide ricinoléique dans les cellules, l'huile de ricin peut être hydrolysée par des lipases (Braga et al. 2012; Gomes et al. 2013), générant des esters tels que le ricinoléate de méthyle (Coelho et al. 2010). Le procédé sera décrit en détail dans le chapitre 4 (Production de γ -décylactone par *Yarrowia lipolytica*).

A5.4. Production d'acide citrique

Les acides organiques sont extrêmement utiles comme matières premières pour l'industrie chimique, Cela est dû à son groupe fonctionnel. En règle générale, les acides organiques ayant des applications potentielles peuvent être produits par différents microorganismes (est une approche prometteuse pour obtenir des produits chimiques de base à partir de sources de carbone renouvelables) ((Kamzolova et al. 2015; Liu et al. 2015; Morgunov et al. 2018a). Parmi les micro-organismes les plus modernes, la levure *Y. lipolytica* qu'a la capacité de produire et de sécréter une grande variété d'acides organiques (sous une limitation nutritionnelle) ((Abou-Zeid et Khoja 1993; Papanikolaou et al. 2009) tels que l'acide citrique (C₆H₈O₇.H₂O, 2-hydroxy-1.2.3-propanetricarboxylic acid) (Venter et al. 2004; Morgunov et al. 2018a), ainsi que l'acide isocitrique ((T. et al. 2002; Rzechonek et al. 2019; Kamzolova et al. 2020), l'acide α -cétoglutarique (Guo et al. 2003; Yu et al. 2011) et l'acide pyruvique ((Morgunov et al. 2018; Cybulski et al. 2019), succinique (Yuzbasheva et al. 2011; Li et al. 2018, 2021). ainsi qu'il a été généralement reconnues comme organisme prometteur sûres (GRAS) pour production d'acide citrique (Rymowicz et al. 2010). Cependant, le principal défaut de la levure est sa production

(+ICA: sous-produit indésirable) (Timoumi et al. 2018a). L'acide citrique (C₆H₈O₇) est un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) pendant le métabolisme aérobie (comme 1^{rem} source de carbone pour la synthèse AG et participe à la régulation du métabolisme du glucose des cellules microbiennes) (Morgunov et al. 2018; Timoumi et al. 2018). En raison de ses caractéristiques (a)biochimiques spéciales biodégradables et son goût acide agréable, tamponnantes et chélatantes), (b)écologiques(non toxiques classé comme GRAS), (c)économique (sa produira de résidus agro-industriels) polyvalent (Soccol *et al.*, 2006 ; Apelblat 2014), il s'agit d'un produit de valeur commerciale et industriel biotechnologique important avec la plus grande croissance du marché au monde(dépassant 2millions t par an), de leur 90% est produit par fermentation avec des micro-organismes(Singh Dhillon et al. 2011; Ciriminna et al. 2017; Soong et al. 2019), le plus couramment utilisé dans les industries des boissons et des aliments (70%) comme agent additifs important(aromatisant et stockage temporaire et les antioxydants, émulsifiant, texturant et stabilisant), pharmaceutiques(Médicaments, cosmétiques, articles de toilette)(12%) et et autres 18% (Soccol et al. 2006; Ciriminna et al. 2017). L'intérêt accru pour *Y. lipolytica* comme un producteur prometteur d'acide citrique pour divers les industries est expliqué en raison de sa capacité infinie(Papanikolaou and Aggelis 2002; Rymowicz et al. 2009; Kamzolova et al. 2015; Cavallo et al. 2017; Morgunov et al. 2018a) avec la possibilité modifier génétique pour optimisation sa productivité(CA)(Rymowicz et al. 2009; Rzechonek et al. 2019), Sans oublier que taux sa production est fortement affecté par les conditions de culture (des sources de carbone et la disponibilité en oxygène.. ect)(Rywińska et al. 2011; Tomaszewska et al. 2014; Ferreira et al. 2016; Arslan et al. 2016; Timoumi et al. 2018a). D'un autre côté, dans ses récents rapports en ce qui concerne des sources de carbone montré que le glycérol brut, de l'éthanol, des déchets agricoles sont des substrat approprié(nutritif à faible coût) pour la production d'acides organiques(CA) à quantité élevée avec des souche *y. lipolytica* (Papanikolaou et al. 2009; Rywińska et al. 2011; Sarris et al. 2011; Egermeier et al. 2017, 2019; Cavallo et al. 2017), ainsi que de lactosérum (Taskin et al. 2015).

A5.5.Production d'huiles

La production commerciale des huiles a commencé à partir de micro-organismes au cours des deux ou trois dernières décennies. actuellement, appelées lipides microbiens, sont produites pour répondre aux demandes de deux branches très différentes de l'industrie huiles(Papanikolaou and Aggelis 2011b): Les huiles unicellulaires (SCO) pour la consommation humaine avec des applications potentielles en raison de leurs compositions similaires aux huiles et graisses végétales (Alternatives reconnues (GRAS))(Liu et al. 2015). Ainsi que, les huiles pour

biocarburants (SCOs), dont le concept principal est la possibilité de le produire (AG) à un prix suffisamment bas pour être utilisé comme biocarburant (Esters d'acide gras)(Bialy et al. 2011; Ratledge 2013). C'est-à-dire, Les coûts du substrat par rapport des coûts des produits, utilisez-le substrats les moins chères (par ex : acide acétique, éthanol, mannitol, , 1,3-propanediol, 2,3-butanediol etc..) (Rupčić et al. 1996; Papanikolaou and Aggelis 2002, 2003b, 2011b; Papanikolaou et al. 2003; Sarris et al. 2011; Lazar et al. 2014; Munch et al. 2015; Rakicka et al. 2015), par ex glycérine «brute» (Papanikolaou et al. 2003; Papanikolaou et Aggelis 2011a). Par conséquent, SCO a un grand potentiel pour être utilisé en tant que de biodiesel ((Katre et al. 2018). Parmi les levures oléagineuses *Y. lipolytica* qui devient une plateforme acceptée pour la production de biodiesel (soit par sa production divers types de lipases comme biocatalyseur pour la bioconversion d'huiles, soit d'accumuler une grande quantité de lipides à quantité dépassant 20% de leur biomasse) (Coelho et al. 2010; Bialy et al. 2011; Darvishi et al. 2017). Ainsi que, il est une des espèces les plus prometteuses pour l'utilisation de matières lignocellulosiques(les déchets des industries du bois, du papier et de l'agriculture)(Poli et al. 2013, 2014), cette levure en règle générale sont capable de utilisant une grande variété de substrats et /ou stratégies(soit en optimisant les conditions de culture, soit par modification génétique)pour produire et accumuler des lipides (en moyenne 40% P.S) (Al Mualad et al. 2022), qui peut atteindre 36% de la biomasse cellulaire sèche (Ratledge 2002, 2013), 43 % (Papanikolaou et al. 2009), (58,5%) (Tsigie et al. 2011), 35% (Katre et al. 2017), selon des conditions de limitation des nutriments, ils peuvent dépassant 70% de leur biomasse (Coelho et al. 2010; Tzirita et al. 2018a; Marks et al. 2020). Le profile de acides gras produits par la levure oléagineuse *Y. lipolytica* sont palmitique (C16: 0= 11 %), stéarique (C18: 0= 28 %), linoléique (C18: 2= 51 %) (Beopoulos et al. 2009c; Papanikolaou and Aggelis 2011; Dobrowolski et al. 2016, 2019, 2020; Katre et al. 2017). Les lipides peuvent s'accumuler par deux voies différentes (*ex novo* et *de novo*)(Bouchedja et al. 2017), détaillée à chapitre 3 accumulation lipidique.

A.5.6. Autres application

- Bioremédiation(Bankar et al. 2009) : utilise biotechnologie de *yarrowia lipolytica* pour l'élimination des pollutions de l'environnement et l'ajoute valeur des dechets
- Dans diverses industries en croissance(Cescut 2009). Parmi les micro-organismes les plus importants, *Y. lipolytica*, a été étudié dans de nombreuses recherches comme dans l'industrie alimentaire en raison de leurs caractéristiques particulières et son rôle dans la production et la fabrication de produits laitiers (fromage et yaourt) (Tvan den Tempe et

Jakobsen 2000 ; Lanciotti *et al.*, 2005)), ainsi que de produits viande (Carreira *et al.*, 2001, 2002) .Sachant que la levure *Y.lipolytica* dans des conditions anaérobies ne peut pas survivre, contrairement à *Kluyveromyces marxianus*. Nouvellement, Ferriera et Viljoen (2003) ont proposé d'ajouter *Y. lipolytica* à *Debaryomyces hansenii* pour la production de fromage cheddar affiné. Le choix de la souche être très importante pour applications l'industrie agroalimentaire. Discuter Guerzoni et al. (2001), la volatilité de l'activité lipolytique des souches de *Y.lipolytica*, la réponse aux changements des variables physico-chimiques (telles que le pH, le NaCl et la teneur en lipides). Les différences d'activité de lipase et de protéase d'une souche à l'autre rendent importante le choix de la souche *Y. lipolytica* l'utiliser(Guerzoni et al. 1993; Suzzi et al. 2001) . Les souches testées d'origine environnementale différente ont montré différents modèles d'acides gras libres libérés. les propriétés physico-chimiques du système entraînaient des différences marquées dans l'activité de lipolyse avec des changements dans les acides gras individuels libérés. En ce qui concerne à l'industrie agroalimentaire, utiliser des souches de *Y.lipolytica* dan le développement des arômes, montré Lucci *et al.* (2007) dans Partie deux de Évaluation de les effets de quelque souches de *Y. lipolytica* sur la qualité sensorielle dans la fabrication de saucisses fermentées séchées afin de comprendre leurs effets sur le profil volatil, un effet positif dans les profils volatils et propriétés sensorielles des saucisses séchées fermentées. ainsi que dans développement des arômes des fromages Cantalet (petit Cantal) (De Freitas et al. 2009) ou dan des fromages de type Feta fabriqués à partir de lait de vache (Bintsis et Robinson, 2004). En générale, Le métabolisme du lipide joue un rôle important dans le développement des arômes des fromages (du fait de la libération d'acides gras), mais aussi de méthylcétones, d'alcools, de lactones et d'esters à chaînes courtes et moyennes (Lenoir *et al.*, 1985 ; Wyder et Puhan, 1999 ; Guerzoni *et al.*, 1993 ; Fickers *et al.*, 2005). Les réactions de transamination des acides aminés permettent de produire des α -cétoacides, qui eux-mêmes subissent par la suite plusieurs réactions pour former des composés qui contribuent également au développement de l'arôme des fromages (Najjar, 2010).

- Les polyalcools, en raison de leurs caractéristiques particulières, ont des applications potentielles. Récemment, en utilisant *Y. lipolytica*, des polyalcools tels que l'érythritol (Tomaszewska et al. 2014; Liu et al. 2015, 2017, 2019, 2021; Guo et al. 2020) pourraient également être produits au cours du processus de fermentation ainsi que mannitol (André *et al.*, 2009). En utilisant *Y. lipolytica*, l'érythritol peut être synthétisé naturellement par la voie du pentose phosphate lorsque cette levure se développe sur le glucose en tant que

source de carbone(Rywińska et al. 2013 ; Ghezelbash *et al.*, 2014). Parmi les groupes de recherche, le groupe Rymowicz a beaucoup progressé dans la production de polyalcool à partir de *Y. lipolytica* (Rymowicz et al. 2009, 2010; Rywińska et al. 2011; Liu et al. 2015; Rakicka et al. 2015; Janek et al. 2020).

B.LIPIDES

B.1.Définition générale

Outre les protides, les glucides et les acides nucléiques, les lipides sont l'un des quatre piliers de base des biomolécules, où elles forment aussi la troisième grande classe de nutriments après les glucides et les protéines. Il comprend la plupart des composés hydrophobes présents dans le monde vivant dans les micro-organismes, les plantes supérieures et les animaux. Contrairement aux glucides, les lipides constituent une groupe chimiquement très hétérogène de composés, c.à.d. des substances hydrocarbonées sont portant des fonctionnalités très différentes, malgré leurs structure sont très différentes, elles peuvent s'unir en raison de leur propriétés communes à insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène, le chloroforme et l'éther. Cependant, ces critères de solubilité ne sont pas absolus, c.à.d. et en une gamme plus large, peuvent être presque aussi solubles dans l'eau que dans les solvants organiques. Par conséquent, mis à part le concept général du terme lipide, il n'a pas de définition largement acceptée par la communauté scientifique, comme ces molécules complexes sont également appelées amphipolaires (phospholipides, les glycolipides) c'est-à-dire à la fois hydrophobe et hydrophile, s'ils groupements polaires et non polaires, cela (amphipolarité) permet aux lipides membranaires de s'organiser spontanément en milieu aqueux(Gurr and James 1980; Fahy et al. 2005, 2009, 2011; Beopoulos 2006; Christie and Han 2010; Quentin et al. 2015).

Les lipides sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène dits lipides simple ou que ce dernière est liés au des molécules de sucre, d'acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore ou du soufre dits lipides complexes, dont ces des molécules organiques ont une densité inférieure à celle de l'eau. Cela signifie d'au moins un acide gras à chaîne moyenne, longue ou très longue est présent dans la molécule (Fahy *et al.*, 2005; Touitou 2005).D'un point de vue biologique, les lipides se trouvent biologiquement dans tous les types de cellules, et peuvent former des structures lamellaires ou micellaires, constituants des membranes biologiques (les phospholipides, les glycolipides et stéroïdes) et des particules lipidiques, c.à.d. Impliqués dans des processus vitaux tels que la signalisation et le métabolisme (hormones, stéroïdes, médiateurs extracellulaires et messagers intracellulaires, vitamines liposolubles...). Ils sont aussi, bien sûr, des éléments de réserve de l'énergie sous forme de graisses ou d'huiles à long terme des organismes, Chez les microorganismes oléagineux des lipides stockées représentent plus que 20% de la masse sèche de la cellule(Gurr and James 1980; Ratledge 1993, 2013; Gunstone 1996; Sorger and Daum 2003; Eyster 2007; Daum et al. 2007; Nolan et al. 2014; Quentin et al. 2015).

B.2. Classification des lipides

Du fait de la grande diversité des lipides et de la difficulté à adopter une définition universelle, Il n'existe pas une seule classification des lipides mais plusieurs classifications peuvent être rencontrées, elles peuvent être relatives à leur polarité (solubilité dans l'eau), à leur structure ou encore à leur nature chimique (Bouchedja, 2017).

B.2.1. En fonction de leur polarité.

En se basant sur leurs propriétés physico-chimiques en présence d'eau, les lipides sont classés en deux groupes « polaires » ou « apolaires » (Bouchedja, 2017).

a) Lipides apolaires

Les lipides apolaires sont totalement insolubles dans l'eau et ne s'étalent pas pour former des couches monomoléculaires stables à la surface de l'eau. On trouve dans cette catégorie les hydrocarbures, en particulier ceux à chaînes ramifiées ou insaturées ainsi que les composés terpéniques (comme par exemple le carotène, le limonène ou encore le squalène).

b) Lipides polaires

Les lipides polaires s'étalent à la surface de l'eau et forment des couches monomoléculaires.

Small a subdivisé ce groupe en trois classes (Bouchedja, 2017) :

- **Lipides de classe I**

Il s'agit des lipides qui forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau/air, mais ne présentent pas de phénomène de gonflement « swelling » (triglycérides, diglycérides, phytols, rétinols, vitamines A, K, et E, les cires et les stérols). Parce qu'ils ne sont pas chargés électriquement, les glycérides ainsi que le cholestérol et ses esters sont appelés lipides neutres.

- **Lipides de classe II**

Ce sont les lipides qui forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau/air mais qui s'hydratent et gonflent pour former des phases lyotropes (cristallines liquides) bien définies (phospholipides, monoglycérides, acides gras). Ils peuvent former des bicouches lipidiques closes, sphériques concentriques séparées les unes des autres par des couches d'eau, appelées liposomes. Ces liposomes sont visibles au microscope électronique (Bangham et Horne, 1964 et Najjar, 2010 ; Bouchedja, 2017).

- **Lipides de classe III**

Il s'agit des lipides polaires qui sont partiellement solubles dans l'eau et qui forment des films monomoléculaires instables à l'interface air/eau en équilibre avec des molécules à

l'état monomérique dans la phase aqueuse. Lorsque leur concentration dépasse la concentration micellaire critique (CMC), ils s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux, formant des micelles. On trouve dans cette catégorie les détergents cationiques, anioniques, non ioniques, ainsi que les lysophospholipides, les acides gras ionisés et les sels biliaires (Bouchedja, 2017).

B.2.2.En fonction de leur structure

Une autre classification des lipides basée sur leurs structures divise les lipides en lipides simples, complexes (Weil *et al.*, 1990). La distinction entre les lipides :

- Les lipides simples dont l'hydrolyse livre un alcool et un ou plusieurs acides gras . Ils donnent (les acylglycérols, les éthers de glycérols, les stérols, les esters de stérols et les esters de cire).
- Les lipides complexes dont l'hydrolyse libère non seulement un alcool et des acides gras mais en outre de l'acide phosphorique, des ose, etc. Où Ils donnent trois produits (phospholipides, glycolipides, et sphingolipides) ou plus quand ils sont hydrolysés.

B.2.3.En fonction de leur nature chimique

Une classification plus récente des lipides basée sur leurs natures chimiques a été proposée par le groupe d'Edward Dennis. «lipide» composés organiques insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques(Fahy *et al.* 2011). Ces caractéristiques chimiques sont présentes chez une large gamme de molécules telles que les acides gras, les phospholipides, les stérols, les sphingolipides, Terpènes et autres. Compte tenu que les lipides soient extrêmement hétérogènes, il n'est pas surprenant qu'il existe des différences importantes des Schémas de classification. Ainsi, si certaines sources telles que la Lipid Library(LL) et Cyberlipids(CL) répartissent les lipides en groupes «simples : » et «complexes» , d'autres comme la base de données japonaise LipidBank définit un troisième groupe majeur appelé lipides "dérivés" (alcools et Acides gras dérivés de l'hydrolyse des lipides simples). En 2005, le Comité international de classification et de nomenclature des lipides à l'initiative de la LIPID MAPS Consortium a élaboré et établi un système de classification complet Pour les lipides basés sur des propriétés chimiques et biochimiques bien définis et en utilisant un cadre Conçu pour être extensible, flexible, évolutif et compatible avec la technologie informatique moderne (Fahy *et al.*, 2011). Cette classification basée sur leurs natures chimiques a été proposée par le groupe d'Edward Dennis(Fahy *et al.* 2005, 2009, 2011), en huit catégories. chaque catégorie est divisée en classes puis sous-classes(Fahy *et al.* 2011). Ainsi, les lipides sont répertoriés dans la banque de données LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) : les acides gras (FA), les glycérolipides

(GL), les glycérophospholipides (GP), les sphingolipides (SP), les stéroïdes (ST), les prénoïdes (PR) les saccharolipides (SL) et les polyketides (PK). Les objectifs des LIPID MAPS sont de caractériser les lipides connus et d'en identifier de nouveaux, de quantifier les changements temporels et spatiaux des lipides liés au métabolisme cellulaire et de développer des approches bioinformatiques établissant des réseaux de lipides dynamiques ; la Lipid Bank (Japon) a pour objectif d'annoter et de gérer les structures lipidiques et la littérature qui leur est associée; et les objectifs de l'Initiative européenne en lipidomique sont de coordonner et d'organiser des interactions scientifiques et des ateliers associés à la recherche sur les lipides (Bouchedja, 2017).

B.3. Lipides levuriens

Les lipides produits par les micro-organismes (levures, bactéries....) sont appelés lipides microbiens ou huiles unicellulaires (SCO), dont ses molécules constituées principalement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène mais peuvent aussi contenir du phosphore, du soufre et de l'azote (papanikolaou 1996 ; Ochoa, 2012 ; Ochsenreitheri *et al.*, 2016 ; Qin *et al.*, 2017).

Les lipides pour la cellule levurienne comprennent :

- **Lipides intracellulaires** : ils sont comprennent les lipides neutres (TAG et esters stéryliques) et non neutres lipides (acides gras libres (AGF), glycolipides et phospholipides). En général, les premiers, Ils sont une réserve énergétique mobilisable, dont Les triacylglycérols sont la forme principale de stockage des lipides chez les levures oléagineuses et en représentent 90%. Ils ont une valeur énergétique élevée d'environ 39 kJ/g (9 kcal/g) dit réserves caloriques. Ainsi que, ils sont comme réserves d'acides gras et de composants stérols pour la biogenèse membranaire. tandis que les seconds remplissent des fonctions physiologiques particulières. Chez les micro-organismes (levures oléagineux), Environ 95% des lipides intracellulaires de *Y. lipolytica* sont stockés dans des corps lipidiques (LB) sous forme de TAG (Figure 4.A). En fait, Les lipides levuriens sont composés d'acides gras dont 80% sont des acides gras à chaîne carbonée de longueur de 16 et 18 carbones et principalement monoinsaturés. Les autres restants sont très peu rencontrés (à longueur de chaine de 14 et 26 carbones). Dans la plupart des cas, les lipides microbiens présentent des similitudes de composition avec les huiles végétales courantes (par exemple huile de colza)(Ratledge 1994; Sorger and Daum 2003; Beopoulos 2006; Tehlivets et al. 2007; Fahy et al. 2009; Darvishi et al. 2017; Kumar et al. 2018; Casares et al. 2019; Wang et al. 2020).

Le vaste domaine accumulation des lipides est couvert dans le chapitre 03.

• **lipides membranaire** : ils sont présents dans les membranes sous la forme d'ensembles, environ 30 à 50 % de la masse membranaire (glycolipides, phospholipides et stéroles), ces molécules complexes sont également appelées amphipolaires (comprenant à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile (Figure 4B)), dont cette amphipolarité permet aux lipides membranaires de s'organiser spontanément en milieu aqueux. Par leur organisation, ils constituent diverses structures dans la cellule et ils forment une matrice continue dans laquelle vont s'insérer d'autres composants chimiques, c.à.d. servent comme barrière entre l'intérieur de la cellule et son environnement extérieur, ainsi comme barrière entre le lumen des organelles et le cytosol grâce à son caractère hydrophobe et modulent le transport des acides aminés. Du plus, ils abritent des protéines qui catalysent certaines réactions des voies métaboliques ou de régulation (signalisation). les lipides ont ainsi un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie de la cellule (processus de nutrition, et de sécrétion de la cellule, c.à.d. les échanges bidirectionnels) et la reproduction biologique et la division cellulaire (bourgeoisement, de tubulation, de fission et de fusion)(Bloom et al. 1991; Fenske et al. 1995; Daum et al. 1998, 2007; Sorger and Daum 2003; Eyster 2007; Mitchell et al. 2007; van Meer et al. 2008; Shevchenko and Simons 2010; Grillitsch and Daum 2011; Slotte 2013; Holthuis and Menon 2014; Dowhan et al. 2016; Gould 2018; Ernst et al. 2018; Casares et al. 2019).

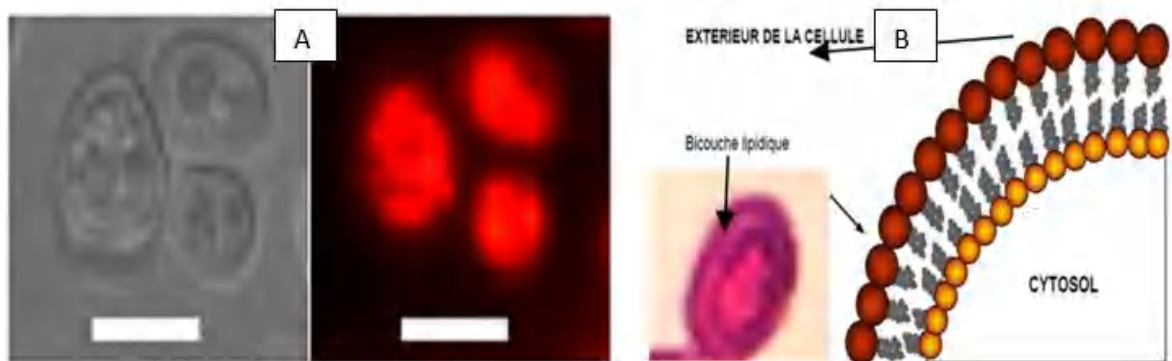


Figure 4: Les lipides pour la cellule levurienne. A) Accumulation de lipides intracellulaires dans une cellule de *Y. lipolytica* (Katre et al. 2012) ; B) Lipides membranaires et Fonction structurale chez une cellule levurienne.(Ochoa 2012, modifie).

B.3.1.Principaux lipides biologiques

D'un point de vue biologique, les lipides comme mentionné précédemment se trouvent biologiquement dans tous les types de cellules, et caractérisée par la présence dans la molécule d'au moins un acide gras. Les principaux lipides biologiques sont dans les sections suivantes.

B.3.1.1. Acides gras

Les acides gras sont molécules trouve en petites quantités sous forme libre, mais en plus grands quantité engagés dans de liaison ester(ou parfois amide) où ils sont les lipides les plus simples, que l'on retrouve comme constituants de nombreux types de lipides plus complexes. Dont ces acides gras se représente par les acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe (R-COOH), saturés (C16 et C18) ou insaturés (C18 pourvus de 1, 2 ou 3 doubles liaisons), a savoir l'existence ou l'absence de double laissons(Beopoulos 2006; Fahy et al. 2009).

Ces acide sont monocarboxylique, à chaîne linéaire non ramifiée comprenant un nombre pair d'atome de carbone(entre 4 et 36) (Weil *et al.*, 1990), On note deux caractères importants (Figure 5) : Le groupement carboxylique ou tête (COOH) à une extrémité, qui donne le caractère acide Il est dissocié à pH 7, et de caractère hydrophile, alors que le radical (R) ou queue est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (Quentin et al. 2015).

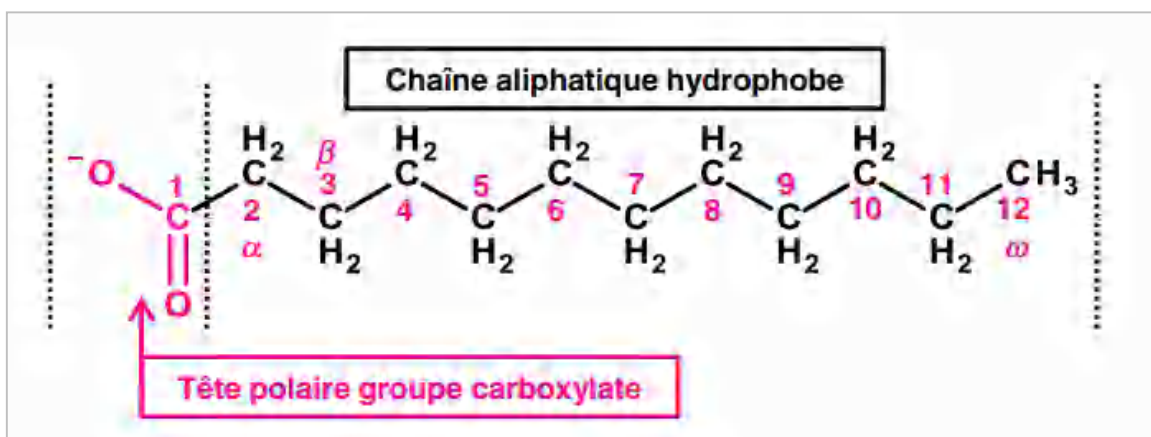


Figure 5: Exemple de la nature d'un acide gras saturé (acide laurique)(Quentin et al. 2015).

Les acides gras diffèrent donc entre eux non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre (Δ), la position et la structure spatiale (cis, trans respectivement stéréodescripteurs Z et E) des doubles liaisons (Figure 6). Dont la double liaison dans tous les acides gras insaturés biologiques peut prendre une position *cis* ou plus rarement *trans* (Weil *et al.*, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Beopoulose, 2009 ; Nacir, 2015). Une autre identification attribue la lettre α au C2 et β au C3, le C terminal est noté oméga ω (Beopoulos 2006; Quentin et al. 2015; Nacir, 2015)

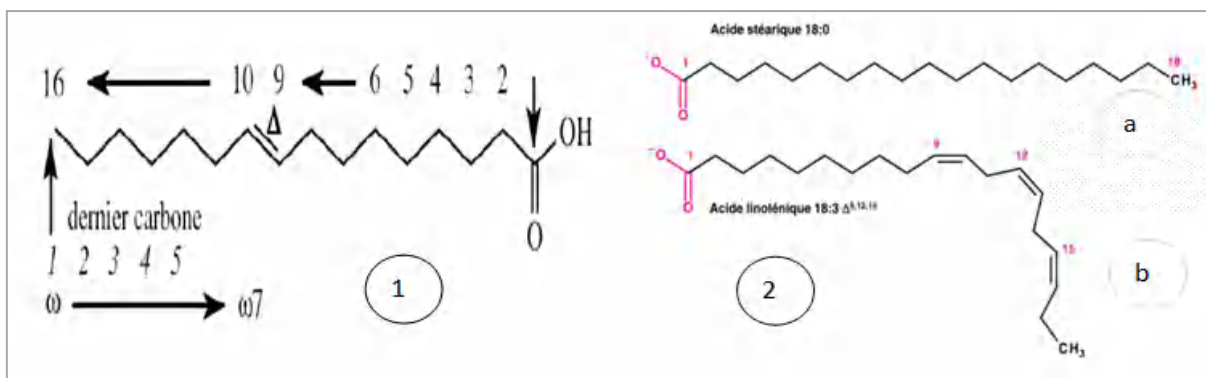


Figure 6: 1) Exemple de numérotation des carbones et de doubles liaisons de l'acide palmitique. Il peut s'écrire comme C16:1 Δ9, ω7 ou n-7. 2) Conformation préféré (a) d'une acide gras saturé (acide stéarique) et (b) d'un acide gras polyinsaturé (acide l'acide linoléique 18 :3Δ^{9,12,15}, conformation *cis*)(Beopoulos et al. 2009c; Quentin et al. 2015).

Une des caractéristiques physique les plus importantes des acides gras est leur point de fusion (PF), celui-ci est augmenté avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée et diminue avec le nombre de doubles liaisons présentes. Le point de fusion (PF) dépend à la fois de la longueur et du degré d'insaturation de la chaîne.

Dans les acides gras saturés le point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne, c.à.d, les associations inter-chaînes, par interactions de Van-der-Waals, sont d'autant plus nombreuses que la chaîne est longue et l'énergie nécessaire à la fusion sera alors plus élevée. Par contre, les acides gras insaturés ont des points de fusion plus bas que leurs formes saturées est de l'ordre de 50°C (l'acide stéarique (18 :0) saturé, a un PF proche de 70 °C alors que celui de l'acide oléique (18 :1 Δ9) est de 13,4 °C pour une même longueur de chaîne), dont la longueur de la chaîne des acides gras saturés diminue la concentration minimum critique et augmente la température de fusion. La méthylation et l'insaturation diminuent la température de fusion de la chaîne carbonée (Weil *et al.*, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Beopoulose, 2009 ; Quentin *et al.*, 2015). (Tableau 1).

Du fait d'une stabilité thermodynamique moins importante de la configuration *cis*, les acides gras insaturés *cis* ont des points de fusion plus bas que leurs formes insaturées *trans*. Ainsi la différence de température de fusion entre les C18 :1 *trans* et C18 :1 *cis* est de l'ordre de 30°C. Dans la nature, la longueur de la chaîne carbonée d'un acide gras insaturé peut aller

de 2 à 30 atomes de carbone et entre 12 et 22 atomes de carbone pour les plus courants (Beopoulos 2006)

Tableau 1. Les acides gras de chaîne constituée de 12 à 20 atomes de carbone (Quentin et al. 2015).

n	d.l.	Nom commun	P.F. (°C)	Formule moléculaire	Symbole
12	0	laurique	44,2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$	C12:0
14	0	myristique	53,9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$	C14:0
16	0	palmitique	63,1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$	C16:0
18	0	stéarique	69,6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$	C18:0
20	0	arachidique	76,5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$	C20:0
22	0	béhénique	80,0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$	C22:0
16	1	palmitoléique	-0,5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$	16:1 Δ^9
18	1	oléique	13,4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$	18:1 Δ^9
18	2	linoléique	-5,0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$	18:2 $\Delta^{9,12} \omega_6$
18	3	α linoléique	-11,0	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$	18:3 $\Delta^{9,12,15} \omega_3$
18	3	γ linoléique	-11,0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$	18:3 $\Delta^{6,9,12} \omega_6$
20	4	arachidonique	-49,5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$	20:4 $\Delta^{5,8,11,14} \omega_6$

Col. 1 = Nombre de carbones ; Col. 2 = nombre de doubles liaisons

De plus, plus de 300 types d'acides gras différents connu chez les végétaux (Voelker et Kinney, 2001), ils peuvent être parfois hydroxylés (comme par exemple l'acide ricinoléique synthétisés chez les plantes) ou ramifiés comme acid 15 methylhexadécaénoïque particulièrement chez les bactéries Gram⁺. Ainsi Eicosanoïdes dérivent des gras polydésaturés à 20 carbones ω_6 et ω_3 (Weil *et al.*, 1990 ; Jung *et al.* 2017).

Les acides gras les plus abondants des lipides eucaryotes (levuriens) sont des acides gras à nombre pair de carbone, majoritairement des acides gras à 16 et 18 atomes de carbone avec des insaturations allant de 0 à 3 doubles liaisons, ce qui confère une spécificité à chaque AG, avec acide oléique des pourcentages parfois supérieures à 70% des lipides totaux alors que l'acide linoléique (C 18:2) vient en deuxième position chez les levures oléagineuses (pourcentages jusqu'à 30% en masse) (Ratledge 1993, 1994; Cescut 2009; Nacir, .2015). En particulier, les profils d'acides gras généralement identifiés chez quelques levures oléagineuses sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2. Composition en acides gras de quelques levures et champignons oléagineux (Ratledge 1994; Meng et al. 2009; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Moigradean et al. 2013; Babau et al. 2013)

Levures oléagineuses	Lipides (%DCW)	Composition en acides gras					
		C16 :0	C16 :1	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	25	1	10	57	7	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	7	3	47	8	0
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	31	13.3	3.9	10.5	43.6	21.6	2.3

DCW : Biomasse sèche cellulaire

Les acides gras chez les organismes vivants sont présent très rarement sous forme libre (RCOO-, acides gras libres) car ils sont susceptibles d’avoir des effets toxiques sur les membranes, mais en plus grande quantité engagés dans de liaison ester(ou parfois amide), c.à.d. ils sont souvent associés à une autre molécule pour former de nombreux types de lipides plus complexes tels phospholipides, les sphingolipides et les triacylglycérols. c’est ainsi qu’ils participent à la structure des membranes biologiques, ils sont précurseurs d’hormones et fournisseurs d’énergie (Weil *et al.*, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Quentin *et al.*, 2015).

B.3.1.2.Triacylglycérols

Ce sont des esters d’Acides Gras et de Glycérol, appelés aussi glycérides ou plus exactement acylglycérols, ne contiennent pratiquement pas d’acides gras à l’état libre, regroupent les monoacylglycérols, les diacylglycérols et les triacylglycérols, sont constitués par un glycérol estérifié respectivement par un, deux ou trois acides gras(triacylglycérols), le glycérol est formé d’une chaîne de trois atomes de carbone comportant chacun un groupement hydroxyle(-OH).ces groupement entrent en réaction avec le groupement carboxyle(-COOH)des AG pour former des esters. On obtient alors des molécules dont le schéma apparaît à la Figure 7. Il s’agit de molécules très hydrophobes très courante chez les eucaryotes , généralement

présent dans les cellules à l'état liquide sous d'inclusions cytoplasmiques (Brisson 1982 ; Weil, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Quentin *et al.*, 2015).

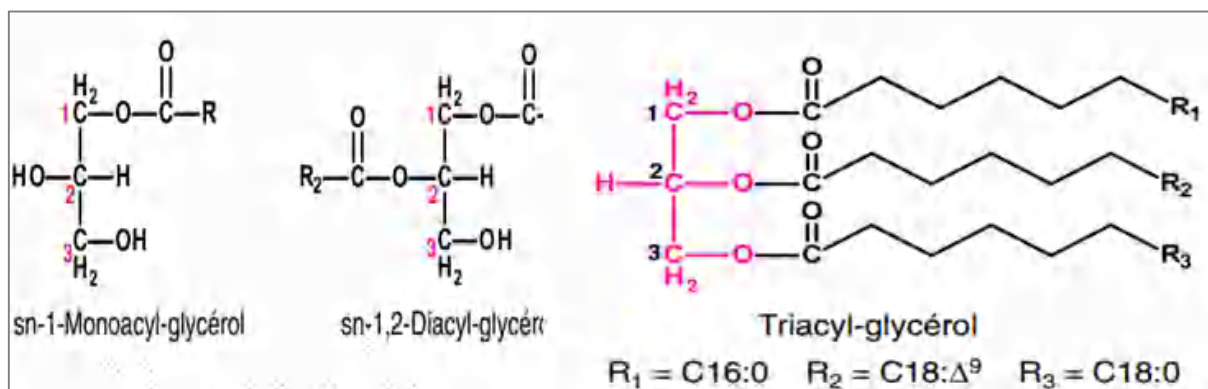


Figure 7 : Structure d'une molécule mono, di et triacylglycérols (Quentin *et al.*, 2015).

les lipides neutres (réserve), encore dénommés graisses ou huiles, sont essentiellement des triacylglycérols, si les trois acides gras sont identiques, le triacylglycérol est homogène (simples) par exemple, tripalmitine, tristéarine ou trioléine, c.à.d., ont le même acide gras sur les trois carbones du glycérol pour les triacylglycérols contenant trois palmitates, trois stéarates ou trois oléates, respectivement ; s'ils sont différents, il est hétérogène (mixtes : on trouve 2 ou 3 acides gras différents), ces sont les plus habituellement rencontrés dans les graisses naturelles. La majorité des triacylglycérols naturels sont des isomères II, l'acide gras en position 2 est le plus souvent insaturé. La nature et la position de chaque acide gras sont indiquées, par exemple 1-stéaryl, 2-linoléyl, 3-palmityl glycérol (Weil, 1990 ; Quentin *et al.*, 2015).

Les graisses extraites des milieux biologiques contiennent habituellement un mélange complexe de triacylglycérols qui sont des lipides neutres, non polaires donc hydrophobes et de densité inférieure à celle de l'eau. Présentant fréquemment un acide gras insaturé au niveau du C2 du glycérol. Ils sont capables de former des membranes (Glycérolphospholipides, Esphingolipides, Glucoesphingolipides et Glucoesphingolipides). Toutefois ils sont présentés dans des cellules (comme les précurseurs de la biosynthèse des phospholipides), ils n'ont pas ce rôle, son rôle principal sont le stockage et la balance d'énergie chez les eucaryotes pour une utilisation ultérieure, quand la source d'énergie venant de l'alimentation diminue, Grâce à sa faible toxicité pour la cellule ils peuvent libérer des acides gras des triacylglycérols stockés dans les adipocytes est une réponse que la synthèse des acides gras est bloquée (immédiate à une l'alimentation) (Beopoulos 2006; Quentin *et al.* 2015).

Chez la levure ont été détectées de petites quantités de diacyl- et monoacylglycérols, qu'est estimée entre 0 à 5% des lipides totaux. Par contre les triacylglycérols représentent plus de 15% des lipides totaux de la levure hors phénomène d'accumulation (Beopoulos et al. 2009a; Babau et al. 2013).

B.3.1.3. Phospholipides

Ils sont les principaux lipides des membranes des eucaryotes et des bactéries, appartiennent aux lipides complexes car ils comportent un atome de phosphore, c.à.d. Ils dérivent de l'acide phosphatidique. Ces lipides sont parmi groupes glycérolipides (glycérophospholipides), dont le glycérol dans laquelle les hydroxyles des carbones en positions sn-1, sn-2 et sn-3. Les hydroxyles en sn-1, sn-2 sont estérifiés par des acides gras saturés ou insaturés et de longueur de chaîne variable qui peuvent être très divers de 16 à 20 atomes de carbone, où l'acide gras en position 2 est toujours insaturée environ 60%. L'hydroxyle en sn-3 est estérifié par l'acide phosphorique (Daum et al. 1998; van Meer et al. 2008; Quentin et al. 2015; Casares et al. 2019).

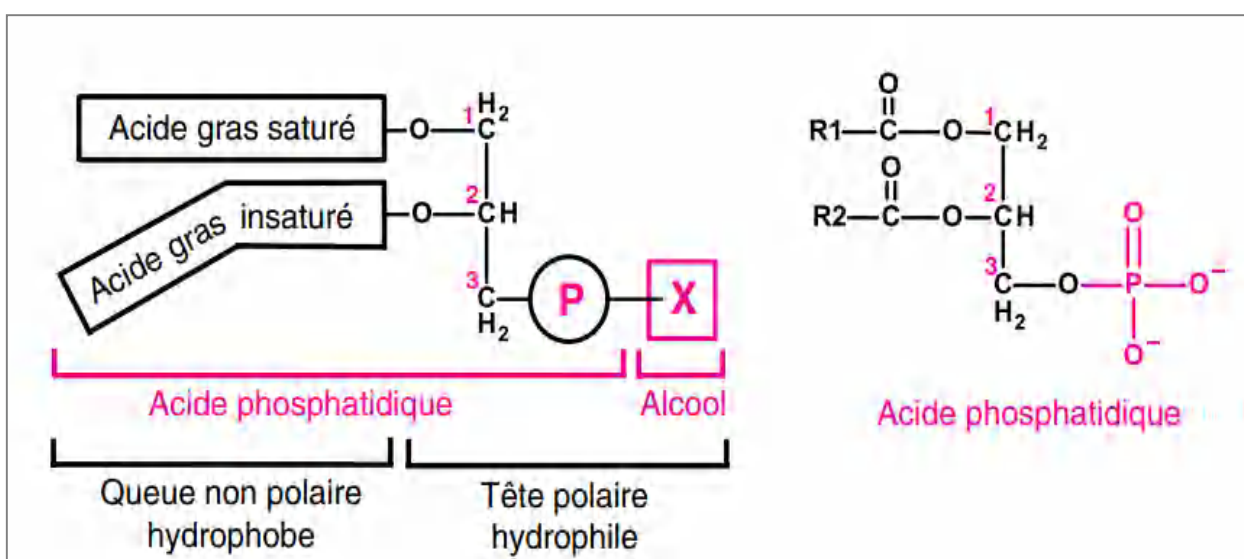


Figure 8 : Représentation de la structure générale des phospholipides (Quentin *et al.*, 2015).

Les phospholipides sont des lipides complexes, dont les molécules complexées sont au groupement phosphate en position sn-3 estérifié une seconde fonction alcool appartenant à un substituant polaire de nature variée (substituant X) comme la sérine, l'éthanol amine, le glycérol ou l'inositol et donnée divers phospholipides, dont la pourcentage dans la membrane de *S. cerevisiae* présentes ci-dessous. La nature du substituant X définit le phospholipide (Weil *et al.*, 1990 ; Zinser *et al.*, 1991 ; Vance, 2002 ; Buchanan *et al.*, 2015 . Quentin *et al.*, 2015) :

• Sérine : Phosphatidyl sérine (PS)	33,6%
• Choline : Phosphatidyl choline (PC)	16,8%
• Myo-Inositol : Phosphatidyl inositol (PI)	17,7%
• Glycérol : Phosphatidyl glycérol (PG)	3,9%
• Ethanolamine : Phosphatidyléthanol amine (PE)	20,3%
• Phosphatidyl glycérol : Diphosphatidyl-glycérol ou Cardiolipide (CL)	0,2 %

La différenciation entre les classes se fait par la nature du squelette de base qui peut-être soit de glycérol, soit de la sphingosine. Le groupement phosphoryl des phospholipides est ionisé. Son pKa est compris entre 1 et 2 et il porte donc une charge négative aux pH physiologiques pH 7. La charge globale de chaque phospholipide dépend de la nature du substituant X. donc si le groupement X est neutre, la molécule de phospholipide est chargée négativement comme pour (PG, PS, PI). Si le substituant X porte une charge positive, le phospholipide est électriquement neutre comme dans le cas de la PC et de la PE ; cet alcool constitue une tête polaire (Beopoulos 2006; Quentin et al. 2015).

Les glycérophospholipides ou phospholipides sont les plus nombreux de tous les phospholipides dans des membranes biologiques, dont La phosphatidylcholine (PC) est le plus abondant dans les membranes des cellules eucaryotes à plus de 50 % et subcellulaires de tous les organismes vivants. Il est aussi un précurseur essentiel dans la biosynthèse des triacylglycérols. Dans son ensemble la molécule des phospholipides sont des espèces amphiphile (une partie apolaire des AG et groupement de tête polaire hydrophile), qu'a la capacité de s'assembler en bicouche fluide. Ces deux parties sont spatialement bien distinctes, cependant cet assemblage de phospholipides est essentiel au maintien des différents rôles de la membrane plasmique. En effet, glycérophospholipides jouent un rôle important dans la constitution des membranes, le métabolisme, en la synthèse des lipoprotéines plasmatiques et des eicosanoïdes, comme ils assurent les échanges passifs ou actifs des molécules entre le cytoplasme et l'environnement cellulaire. De plus, dans la signalisation moléculaire (la transduction des messages entre les récepteurs cellulaires et les seconds messagers qui contrôlent les processus cellulaires)(Fahy et al. 2005; Quentin et al. 2015; Ernst et al. 2018).

Chez des levures, les phospholipides plutôt des chaînes acyles saturées en position sn-1 (ex. p. Palmitate) et des acyles insaturées (ex. Oléate) en position sn-2. les phospholipides les plus connus dans les levures sont PC, PE, PI, PS, CL. Par exemple chez *S. cerevisiae*, La fraction massique des lipides totaux chez les levures varie entre 15-40 % de la (PE), 10 - 25 % du (PI) et 20- 50 % (PC) Ce le dernière est l'un des phospholipides les plus présents chez la levure, de meme chez *C. lipolytica* et *Y. lipolytica* sont PE32%, PC 42% sont les plus abondants et PI. PS et SL sont disponibles en faible quantité, mais dans *R. glutinis*, les phospholipides sont composés de 38,6% de PC et 43% de PS (Daum et al. 1998; Beopoulos 2006; Cescut 2009; Babau et al. 2013). Dans *Y. lipolytica*, Kirkhoven *et al.* (2016), rapportent que la quantité phospholipides à la quantité totale de lipides des corps lipidiques est comprise entre 1,6 et 2%.

B.3.1.4.Sphingolipides

Les lipides sphingolipides est similaire à celle des glycérophospholipides, sauf que le glycérol est remplacé par une molécule de sphingosine, qui sont des lipides structuraux trouvés principalement dans les membranes (deuxième groupe) qui représentent environ 5% des lipides membranaires totaux. Certains sont d'importants constituants des membranes plasmiques et beaucoup sont des sites de reconnaissance de la surface cellulaire. où ils représentent jusqu'à 26% Ces sont parmi des lipides complexes, dont l'acide gras est fixation au groupe amino de la sphingosine formant une céramide (Cer) (Weil *et al.*, 1990 ; Vance 1996 ; Chesworth *et al.*, 1998 Weinman et Méhul 2004 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Ven Meer *et al.*, 2008 ; Buchanan *et al.*, 2015 ; Escribá *et al.*, 2015 ; Quentin *et al.*, 2015).

La sphingosine sont le composé le plus fréquent, il est un alcool aminé à longue chaîne qui possédant 18 atomes de carbones et une double liaison (trans en C4-C5), un groupe aminé en C2 et deux hydroxyles en C1 et C3. L'addition d'une chaîne acyle sur la fonction amine (liaison amide au NH₂ du C2) permet de former la céramide, Où tous les sphingolipides sont construits sur cette unité de base (Weil *et al.*, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Weinman et Méhul 2004 ; Quentin *et al.*, 2015).

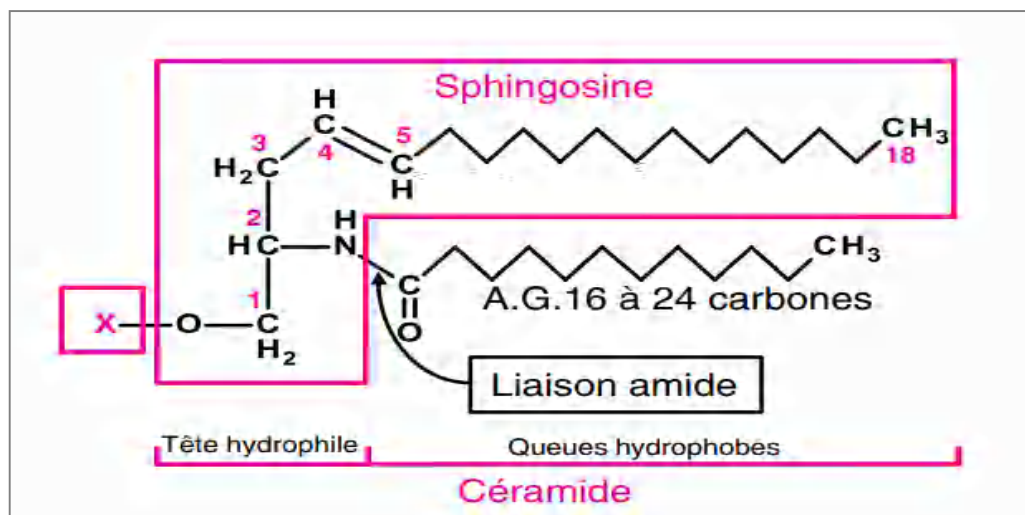


Figure 9: Structure générale des sphingolipides (Quentin *et al.*, 2015).

C'est le substituant X lié sur l'alcool primaire du carbone C1 qui distingue les familles des sphingolipides, dont la sphingomyéline est représenté jusqu'à 20 % des lipides membranaires (Daum 1985 ; Weil *et al.*, 1990 ; Chesworth *et al.*, 1998 ; Munro, 2003 ; Ledeen et Wu, 2008 ; Slotte, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Quentin *et al.*, 2015):

- Phosphoryl-choline : Sphingomyéline (sphingophospholipides)
- Glucose : cérebrosides,
- Dis, tri, tetraaccharide : Gangliosides
- Saccharide complexe : Ganglioside GM1

Ces les classes de glycolipides sont en général localisées dans les membranes des cellules eucaryotes, où leurs têtes polaires constituées d'oligosides plus ou moins complexes apparaissent au niveau de la surface externe. C.à.d. ils possèdent un rôle structurel dans la cellule, d'autre part, être des surfactants ou des agents émulsifiant extracellulaires comme chez levures, telle *Y. lipolytica*, lors de l'utilisation des n-alcanes comme substrat. c.à.d. ces molécules possèdent un rôle clé dans le fonctionnement de la cellule (Van Meer et Lisman 2002 ; Weinman et Méhul, 2004 ; Touitou 2005 ; Cescut, 2009 Montefusco *et al.*, 2014; Spincemaille *et al.*, 2014).

Chez les levures, les sphingolipides sont présents dans la membrane plasmique, les membranes d'organelles et les parois. En plus des fonctions structurelles importantes des sphingolipides complexes, ils interviennent aussi dans signalisation vitaux chez *S. cerevisiae*, dans la régulation de l'endocytose, protéolyse, la dynamique du cytosquelette et contrôle du

cycle cellulaire, la traduction, la modification des protéines post-traductionnelles et la réponse au stress thermique (Holthuis et al. 2001; Cescut 2009; Nielsen 2009; Slotte 2013). Ces composés sont présents à des concentrations très faibles, à hauteur de 0,4 % (glip/g biomasse) (Ochoa, 2012).

Bal et al. (2013) ont rapporté que les dérivés GlcCer ou GlcCer peuvent être impliqués dans la morphogénèse hyphale chez *Y. lipolytica*, en affectant la polarisation des radeaux lipidiques et la morphogénèse des vacuoles.

De plus, Chez la levure, Il y a deux types de sphingolipides : la dihydrosphingosine et la phytosphingosine. Les sphingolipides de la levure contiennent majoritairement la phytosphingosine. Sa similarité de structure avec la PC lui confère des propriétés analogues (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009).

B.3.1.5. Stérols et stéroïdes

Ce sont des composés dérivant d'un noyau (gonane) polycyclique avec une ou plusieurs fonctions alcool, appelé noyau du cyclopentanophénanthrène. Dont le cholestérol, terpènes, l'ergostérol sont le plus important chez les animaux, les végétaux, les levures respectivement, qu'ils appellent les stérols (libres : non estérifiés), Par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae* plus de 90% des stérols sont sous forme libres. Mais Les stérols peuvent être « conjugués » estérifiés par acide gras (SE) ou glucose pour former glycosides d'acyl-stéryle (ASG) et glycosides de stéryle (SG), respectivement, Ces les deux dernière sont les principaux dérivés de stérols trouvés dans les plantes, où des stérols typiques du règne végétal, sont appelés phytostérols (p.ex. sitostérol) (C29) (Beopoulos 2006; Quentin et al. 2015).

Ce sont des lipides classe parmi les lipides simples (neutres) qui sont retrouvés dans la membrane cellulaire principalement dans la couche extérieure de la membrane plasmique, où sont responsables de certaines caractéristiques physiques, la fluidité et la perméabilité de la bicouche membranaire, où peuvent aussi affecter l'utilisation de la source énergétique et l'activité des ATPases membranaires. Ainsi que ; les stérols aussi est le précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et de la vitamine D. Les stérols supérieurs sont représentés (à partir de 20% à 40% mol) en eucaryote, dont tous les stérols, leurs dérivés, sont synthétisés à partir d'unités isopréniques à cinq carbones (Subczynski et al. 1994; Czub and Baginski 2006; Grossmann et al. 2007; Hanzal-Bayer and Hancock 2007; Dufourc 2008; Cacas et al. 2012;

Quentin et al. 2015). Les stérols sont des composés essentiels dans toutes les levures. Dont l'ergostérol le lanostérol le squalène sont plus connus et qui présentent entre 0,03 % et 4,6 % de la masse sèche de la cellule, c.à.d. soit 1 à 10 % des lipides totaux (Arnezeder et Hampel 1990).

Chez les levures, l'ergostérol est la forme majoritaire de stérol et peut représenter 90% du total stérol, retrouvée dans la membrane cellulaire des levures (à la place du cholestérol chez les mammifères) qui possède deux doubles liaisons supplémentaires, la première en 7, conjuguée avec la liaison en 5 dans le cycle B et la seconde en 22 sur la chaîne flexible qui en outre porte un groupe méthyle en C24. Parmi ses rôles dans la structure membranaire et l'endocytose, ils sont intermédiaires de biosynthèse qui sont estérifiés et localisés dans des particules lipidiques. ainsi que dans la formation des radeaux ou rafts qui sont impliqués dans le trafic membranaire et la signalisation cellulaire (Arnezeder and Hampel 1990; Quentin et al. 2015).

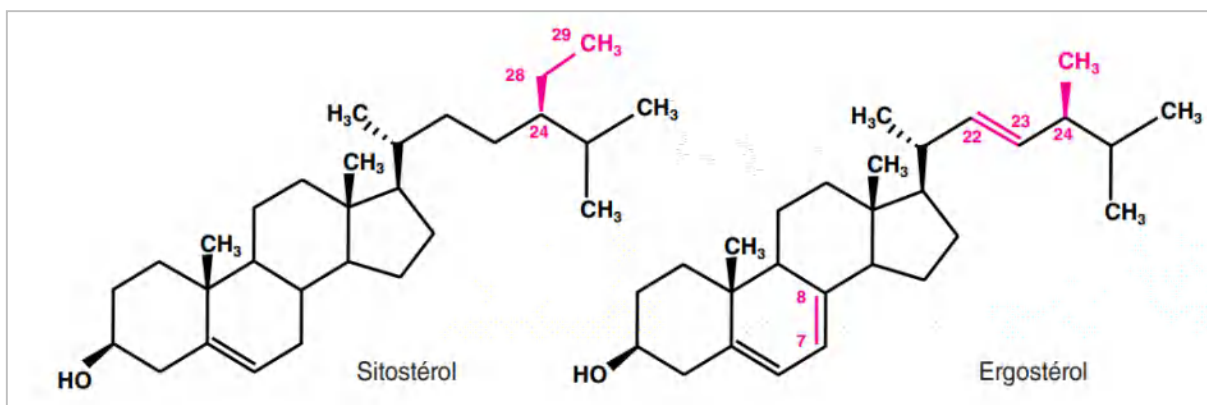


Figure 10 : Formule squelettique de Sitostérol et d'Ergostérol (Quentin et al. 2015) .

De plus, et parmi les lipides neutres qui sont estérifiés d'alcools et d'acides gras composés uniquement d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, en fonction de la nature de l'alcool estérifié sur l'AG, les cérides et les phytylesters d'acides gras (FAPE) dont ce dernier est présent uniquement chez les plantes. Cependant la majeure partie des cérides sont présentes uniquement chez les plantes. Cependant la majeure partie des cérides sont présentes chez les animaux, végétales, bactériennes, où elles constituent des réserves énergétiques chez le plancton et les microorganismes (Beopoulos 2006; Quentin et al. 2015; Nacir, 2015).

C. Accumulation lipidique chez *Yarrowia lipolytica*

C.1. Généralité

Les lipides produits par les micro-organismes sont appelés lipides microbiens ou huiles unicellulaires (SCO), comprennent les lipides neutres (TAG et esters stéryliques) et les lipides non neutres (acides gras libres (FFA), glycolipides et phospholipides). En général, les premiers servent de réserve d'énergie pour la cellule, tandis que les seconds remplissent des fonctions physiologiques particulières (Darvishi et al. 2017; Wang et al. 2020). En effet, Le métabolisme des lipides est présent chez tous les microorganismes. Du fait de la toxicité des acides gras libres et du potentiel de stockage des triglycérides et des esters de stérols, c'est sous cette forme qu'ils sont principalement accumulés chez les eucaryotes (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009). Certains microorganismes accumulent des quantités significatives supérieures à 20 % de lipides dans leurs biomasses, ils sont dits « oléagineux » peuvent être des bactéries, des moisissures et les algues ; les levures (Beopoulos 2006; Papanikolaou and Aggelis 2011). Les levures oléagineuses dans des conductions de limitation des nutriments, sont capables de synthétiser et d'accumuler des lipides jusqu'à hauteur de 72% de la masse sèche de la cellule (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2008; Cescut 2009). La grande vitesse de croissances des levures oléagineuses, leur capacité d'accumulation élevée en lipides ainsi que leur indépendance des conditions saisonnières représentent les principaux avantages de production de lipides levuriens par rapport aux autres microorganismes oléagineux. Ces lipides sont accumulés dans des organes spécifiques, à l'intérieur de la cellule, appelées corps lipidiques, dont les TAG constituent le principal composant synthétisé à l'intérieur les cellules microbiennes environ 90%, dont le profil lipidique est semblable à celui des huiles végétales courantes (par exemple huile de colza), ce sont les acides palmitique (C16:0) et oléique (C18:1) qui prédominent chez les levures (Carsanba et al. 2020; Wang et al. 2020). Parmi plus de 600 espèces de levures, seules 30 sont connues pour être oléagineuses (Bouchedja et al. 2017) et elles appartiennent principalement aux genres *Lipomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Endomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* et *Yarrowia* (Bouchedja et al. 2017). La souche *Yarrowia lipolytica* accumule une quantité de lipides inférieure à certaines levures comme *R. toruloides* CBS14 et *C. curvatus* mais elle la seule levure connue qui présente la particularité de synthétiser des triacylglycérols composés de plus que la moitié d'acide linoléique C16:0 = 11 %, C18:1 = 28 % et C18:2 = 51 % (Ratledge 1994; Papanikolaou and Aggelis 2003b, 2011b; Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009).

C.2. Accumulation lipidique et métabolisme

L'accumulation microbienne de lipides a lieu dans la cellule de levure en raison d'un métabolisme instable, qui, peut conduire à la production de lipides et au stockage dans la cellule de levure, environ 95% des lipides intracellulaires de *Y. lipolytica* sont stockés dans des corps lipidiques (LB) (Figure 11) sous forme de triacylglycérol (TAG - 80%) et de d'ester de stérol (SE - 20%) (Beopoulos et al. 2009; Bouchedja et al. 2017; Carsanba et al. 2020), Ces lipides peuvent s'accumuler chez *Y. lipolytica* par deux voies distinctes(Papanikolaou and Aggelis 2011b; Bouchedja et al. 2017; Wang et al. 2020): La première est la biosynthèse de novo des acides gras qui correspond à la production dans des conditions définies des précurseurs des acides gras comme l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA et leur intégration dans la voie de biosynthèse de lipides (voie de Kennedy)(Beopoulos 2006). La deuxième, appelé la voie d'accumulation ex novo correspond à l'incorporation des acides gras, des huiles et des triglycérides du milieu de culture et leur accumulation dans un état inchangé ou modifié dans la cellule. Cette voie nécessite l'hydrolyse des substrats hydrophobes, le transport et l'incorporation des acides gras libérés à l'intérieur de la cellule et le réassemblage de ces acides gras en TAG et ES pour leur stockage dans les corps lipidiques(Bouchedja et al. 2017).

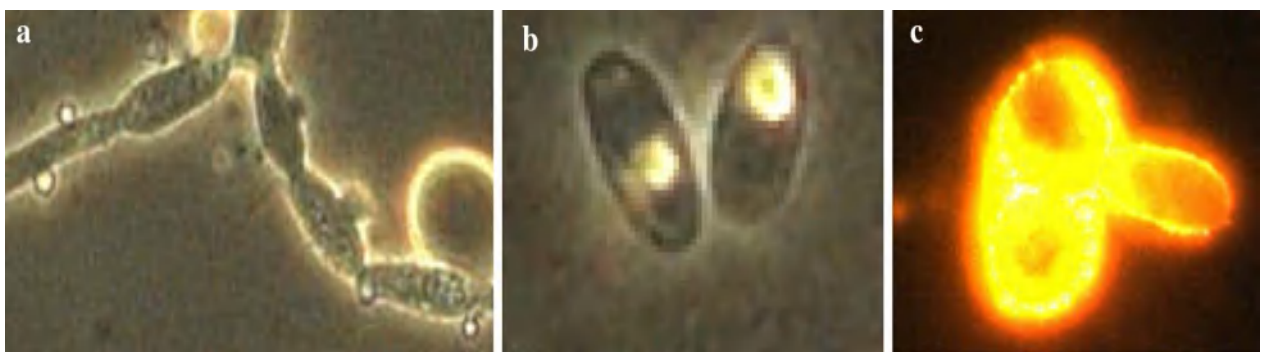


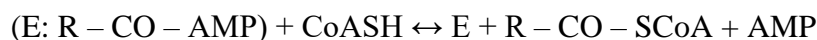
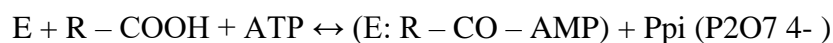
Figure 11: Formation des corps lipidiques. a) Images de microscopie optique (100 ×) après 48 h de culture, montrant la présence de Bosse à la surface de la cellule de *Y. lipolytica*. La culture a été réalisée dans un bioréacteur contenant un milieu YPD enrichi en acide oléique (YPDOA), à 28 ° C, pH 6,0 et limitation en oxygène dissous. b) Image en microscopie optique (100 ×) montrant les corps lipidiques dans les cellules de *Y. lipolytica*, après 24 h de culture dans YPDOA. La culture a été réalisée dans un bioréacteur, à 28 ° C, pH 6,0, sans limitation en oxygène dissous. c) Image en microscopie à fluorescence (100 ×) montrant une forte accumulation de lipides intracellulaires dans une cellule de *Y. lipolytica*. Les lipides intracellulaires ont été révélés avec une coloration rouge du Nil; de même, le lipide assimilé intracellulaire présentait une fluorescence rouge. L'échantillonnage a été effectué après 30 h de culture en bioréacteur à 28 ° C, pH 6(Bouchedja et al. 2017).

Néanmoins, les voies d'accumulation de novo et ex novo sont plutôt antagonistes que complémentaires, car les enzymes de biosynthèse de lipides sont régulées par la composition des lipides extracellulaires. Si le milieu apporte aux organismes la source de lipide nécessaire, la synthèse et les modifications, tels que l'élongation et la désaturation, sont réprimées. Les levures sont capables d'accumuler directement des acides gras du milieu et de les stocker en forme de TAG ou d'ES dans les corps lipidiques. Les TAG sont la forme la plus importante de stockage chez les eucaryotes (Papanikolaou and Aggelis 2011b). Cependant, la composition lipidique d'un microorganisme peut varier considérablement par rapport au milieu de culture (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009). Les mécanismes de la synthèse « de novo » et « ex novo » sont décrits dans cette section.

C.2.1. Accumulation lipidique de novo

Yarrowia lipolytica sont capables de synthétiser *de novo* tous les acides gras dont elles ont besoin à partir d'une source de carbone, qu'il est nécessaire des substrats hydrophiles tels que des sucres, des acides organiques ou des alcools pour produire des précurseurs les acides gras, principalement l'acétyl-CoA, et le malonyl-CoA, le NADPH et les intègre dans la voie Kennedy pour synthétiser les TAG (Daum et al. 1998; Ratledge 2002, 2004; Beopoulos et al. 2008, 2009c; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Tsigie et al. 2011; Soong et al. 2019). Le processus est schématisé dans la figure 12.

Pour que les acides gras ou leurs précurseurs participent à une réaction métabolique, leur activation est nécessaire (Les deux réactions à la bas). Où L'acétyl-CoA (AcCoA) joue un rôle central dans la synthèse des acides gras (FA) dans le cytosol, où celui-ci est converti par l'acides gras synthèse en acyl-CoA à chaînes longues (généralement C16 :0 et C18 :0) par l'ajout d'unité de malonyl-CoA. Ces molécules peuvent ensuite être utilisées par des élongases et désaturases afin de former différents acides gras. Ces acides gras sont ensuite convertis en TAG par la voie Kennedy impliquant la conversion de diacylglycérol (DAG) en TAG par les gènes DGA1 et DGA2 ou le gène LRO1, tandis que les SEs sont produits à partir des acyl-CoA et du stérol par le gène ARE1. Ce processus de synthèse requiert d'importantes quantités de composés réducteurs, avec la consommation de deux molécules de NADPH par cycle d'élongation. Chez *Y. lipolytica*, la voie des pentoses phosphates (PP) est la source principale de composés réducteur tandis que l'importance de l'enzyme malique, autre source de NADPH, reste sujet à débat chez cet organisme (Cescut 2009; Beopoulos et al. 2009c; Rakicka et al. 2015; Dourou et al. 2018).



Les deux réactions sont réversibles, mais la cinétique favorise la production d'acyl-CoA, car le pyrophosphate est rapidement hydrolysé (Beopoulos 2006; Cescut 2009).

C.2.1.1. Événements de l'accumulation lipidique

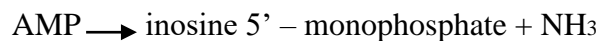
Les événements intervenant dans l'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica* allant de l'assimilation de la source du carbone, glycérol, jusqu'à la formation des triacylglycérols sont présentés dans le schéma qui suit (Figure 3). Lorsque la concentration en AMP intracellulaire est significativement réduite, le passage de l'étape de production de biomasse à l'étape de synthèse lipidique est stimulé, fournissant ainsi un précurseur pour l'accumulation lipidique. Les plus importants sont l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA et le NADPH comme cofacteur, où peut être divisée en deux étapes principales: la génération d'acétyl-CoA et la conversion de l'acétyl-CoA en acide gras (Beopoulos 2006).

a) Production d'acétyl-CoA

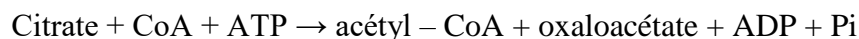
Le produit clé intermédiaire de l'accumulation lipidique de novo est l'acétyl CoA qui est un sous-produit de la synthèse des acides gras, plusieurs méthodes existent pour induire la génération d'AcCoA et l'accumulation lipidique, Après la glycolyse, l'acide pyruvique passe à travers les mitochondries où l'acétyl-CoA est produit à partir de l'acide pyruvique par l'enzyme catalytique pyruvate déshydrogénase (Soit il rejoint le cycle de Krebs, soit il repasse dans le cytoplasme où se produit la biosynthèse des acides gras), et sa transformé en l'acétyl-carnitine (étant donné que l'acétyl-CoA ne peut pas traverser la membrane mitochondriale), puisse être transportée dans le cytosol (Papanikolaou and Aggelis 2011b; Carsanba et al. 2018, 2020).

Cependant, dans le cas des microorganismes oléagineux existe différentes manières de générer de l'acétyl-CoA, La méthode la plus courante consiste à épuiser un nutriment dans le milieu, généralement l'azote et que le carbone est abondant dans le milieu. Sachant que la limitation en azote provoque un ralentissement du taux de croissance des cellules, et de la production de biomasse catalytique durant la phase transitoire d'accumulation lipidique dû à la répression de certaines voies métaboliques tels que la synthèse des acides nucléiques et des protéines entraînées par la limitation nutritionnelle. Le processus d'épuisement de l'azote

implique une série d'événements régulateurs liés au métabolisme central. Initialement, l'épuisement de l'azote conduit à une activité accrue de AMP-désaminase, qui convertit l'AMP en inosine monophosphate (IMP) et en ammoniac tout en diminuant la concentration en AMP dans la mitochondrie. Cette diminution va bloquer le cycle de Krebs au niveau de l'isocitrate, une réaction spécifique aux organismes oléagineux (Cescut 2009; Fakas et al. 2009; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Portelli 2011; Carsamba et al. 2018; Wang et al. 2020).



L'isocitrate va donc s'accumuler dans la mitochondrie et créer un équilibre avec le citrate sous l'action de l'enzyme aconitase. L'acide citrique se décompose en acétyl-CoA dans les mêmes conditions et l'acétyl-CoA peut s'accumuler dans les mitochondries. A la suite, le citrate est transporté via le complexe la malate / citrate transférase (dans la membrane mitochondriale) de nouveau vers le cytosol où l'acétyl-CoA est libéré par l'ATP citrate lyase (ACL) (Ratledge 2002, 2004; Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009c; Papanikolaou and Aggelis 2011b).



L'acétyl-CoA disponible dans le cytosol sera utilisé comme précurseur pour la biosynthèse des acides gras et la mise en place du métabolisme d'accumulation des lipides pour aboutir à la synthèse des triglycérides (sous forme de gouttelettes lipidiques) qui fusionnent et s'accumulent dans des organelles spécifiques, à l'intérieur de la cellule, nommées corps lipidiques (Beopoulos 2006; Athenstaedt et al. 2006).

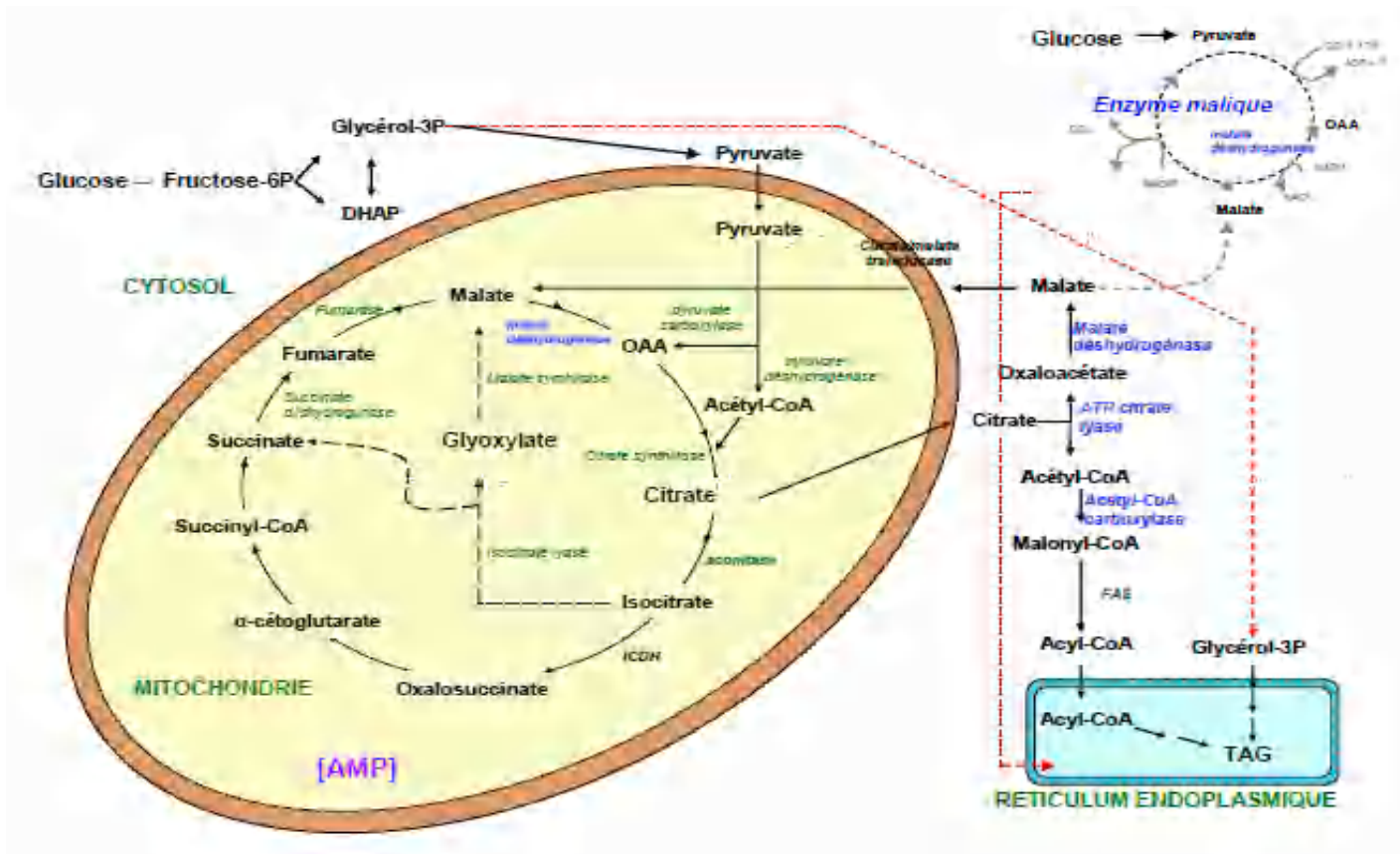


Figure 12: Schéma des voies impliquées dans la biosynthèse des lipides (Ochoa, 2012).

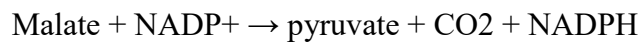
b) Conversions d'Acetyl-CoA

L'ATP citrate lyase est l'enzyme clé pour l'accumulation de lipides dans les microorganismes oléagineux (Ratledge, 2002). Dont le citrate est clivé par l'ATP citrate lyase (ACL1 et ACL2) pour produire de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate. De cette manière, *Y. lipolytica* peut produire de l'acétyl-CoA cytosolique en abondance *ACL1* (YALI0E34793g) et *ACL2* (YALI0D24431g), qui est le précurseur direct de la biosynthèse de l'AF (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009c; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Dourou et al. 2018; Wang et al. 2020).

La biosynthèse de l'AF dans le cytosol implique une série de réactions qui convertissent le précurseur acétyl-CoA en acides gras à longue chaîne. Premièrement, le malonyl-CoA est généré par carboxylation de l'acétyl-CoA avec l'acétyl-CoA carboxylase (ACC1), qui est catalysé par le magnésium (Beopoulos 2006; Papanikolaou and Aggelis 2011b).



Ensuite, l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA sont condensés en acyl-CoA sous l'action du complexe FA synthase (FAS1 et FAS2)(Papanikolaou and Aggelis 2011b; Wang et al. 2020).



La FA synthase utilise le NADPH comme cofacteur réducteur, et chaque étape de l'élongation de la chaîne acyl-CoA nécessite deux molécules de NADPH. La longueur de chaîne des acyl-CoAs naturellement synthétisés est typiquement de 16 ou 18 atomes de carbone. Dans l'étape suivante, ces molécules C16: 0 et C18: 0 sont délivrées au réticulum endoplasmique (ER) pour un allongement et une désaturation supplémentaires(Tehlivets et al. 2007; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Carsanba et al. 2018; Wang et al. 2020).

c) Voie de Kennedy

Chez les levures oléagineuses, la majorité des lipides se trouve sous la forme des triacylglycérols, dont leur synthèse suit généralement la voie Kennedy, qui utilise l'acyl-CoA et le glycérol-3-phosphate (G3P) comme substrats directs, qu'est complémentaire la synthèse de novo des TAG (Papanikolaou and Aggelis 2003a; Beopoulos 2006). Les différentes réactions menant à la formation des triacylglycérol : l'assemblage du TAG commence par l'action de la G3P acyltransférase (SCT1), qui catalyse la conversion de la G3P en acide lysophosphatidique (LPA) Le LPA est ensuite encore acylé par la LPA acyltransférase (SLC1) pour générer de l'acide phosphatidique (PA). Le PA est ensuite déphosphorylé en diacylglycérol (DAG) par la phosphatase d'acide phosphatidique (PAP). Dans la dernière étape de l'assemblage du TAG, le DAG est acylé en position sn-3, soit par une réaction dépendante de l'acyl-CoA, soit indépendante de l'acyl-CoA, pour former le TAG dans des organelles spécifiques, à l'intérieur de la cellule, appelées corps lipidiques (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2008, 2009c; Tai and Stephanopoulos 2013; Wang et al. 2020). La réaction acyl-CoA dépendante est catalysée par les acyltransférases DAG (DGA1 ou DGA2), avec l'acyl-CoA comme donneur de groupe acyle final. La réaction indépendante de l'acyl-CoA est catalysée par la phospholipide DAG acyltransférase (LRO1), qui utilise le glycérophospholipide comme donneur de groupe acyle. De plus, il a été démontré que la stéryl ester synthétase codée par ARE1 favorise l'acylation du DAG en agissant comme acyltransférase dans une réaction acyl-CoAdépendante (Athenstaedt et al. 2006; van Meer et al. 2008; Babau et al. 2013; Wang et al. 2020).

C.2.2. Accumulation lipidique *ex novo*

Les levures sont capables de synthétiser de novo tous les acides gras dont elles ont besoin à partir d'une source de carbone. Mais, dans le cas où des nutriments proches de la structure des acides gras nécessaires sont disponibles dans leur milieu de croissance elles peuvent les utiliser directement pour leurs fonctions biologiques. C'est le cas des acides gras ou de leur dérivé présent dans l'environnement. Même en présence de sources de carbone facilement assimilables / utilisables, leur capacité à importer des acides gras constitue un avantage, en terme d'énergie (Ratledge 1994; Daum et al. 1998; Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009c; Papanikolaou and Aggelis 2011b).

Lorsque des substances hydrophobes (acides gras, les huiles ou les triacylglycérols) sont utilisées comme substrats microbiens du milieu de culture et leur accumulation dans un état inchangé ou modifié à l'intérieur de la cellule, cette voie de synthèse de lipides est appelé voie « *ex-novo* ». Les phases intervenant dans la synthèse de lipides « *ex novo* » ou dégradation chez *Y. lipolytica* sont présentés dans le schéma qui suit (Figure 13). Cette voie demande : a) les huiles et les graisses sont d'abord transformées en acides gras libres à l'extérieur de la cellule par un processus d'hydrolyse catalysé par lipase ; b) Incorporation des chaînes aliphatiques extracellulaires libérées à l'intérieur des cellules ou des culots fongiques et des mycéliums (le taux d'incorporation des différents FA extracellulaires peut être différent et est lié à la composition en AG du mélange gras utilisé); c) Réactions potentielles de biomodification des AG préalablement incorporées à l'intérieur des cellules microbiennes (c'est-à-dire réactions d'élongation et / ou de désaturation); d) Réactions d'incorporation de plusieurs chaînes FA à l'intérieur des TAG microbiens stockés ; e) Assimilation partielle ou totale des unités acyl-CoA, via la voie de la β -oxydation; f) Catabolisme de l'acétyl-CoA généré à travers le cycle de Krebs (création d'ATP et d'énergie); g) Anabolisme d'une partie des acétyl CoAs générés après β -oxydation par le by-pass d'acide glyoxylique (réactions de glyconéogenèse ou de synthèse d'acides aminés); h) Biodégradation des TAG précédemment stockés lorsque la source de carbone extracellulaire n'est plus disponible, aboutissant à la synthèse d'acétyl-CoA, qui sera ensuite catabolisé par le cycle de Krebs ou sera utilisé pour des réactions anaboliques par le by-pass d'acide glyoxylique (Beopoulos 2006; Thevenieau et al. 2007; Cescut 2009; Papanikolaou and Aggelis 2011b; Carsanba et al. 2018; Tzirita et al. 2018a; Soong et al. 2019; Wang et al. 2020).

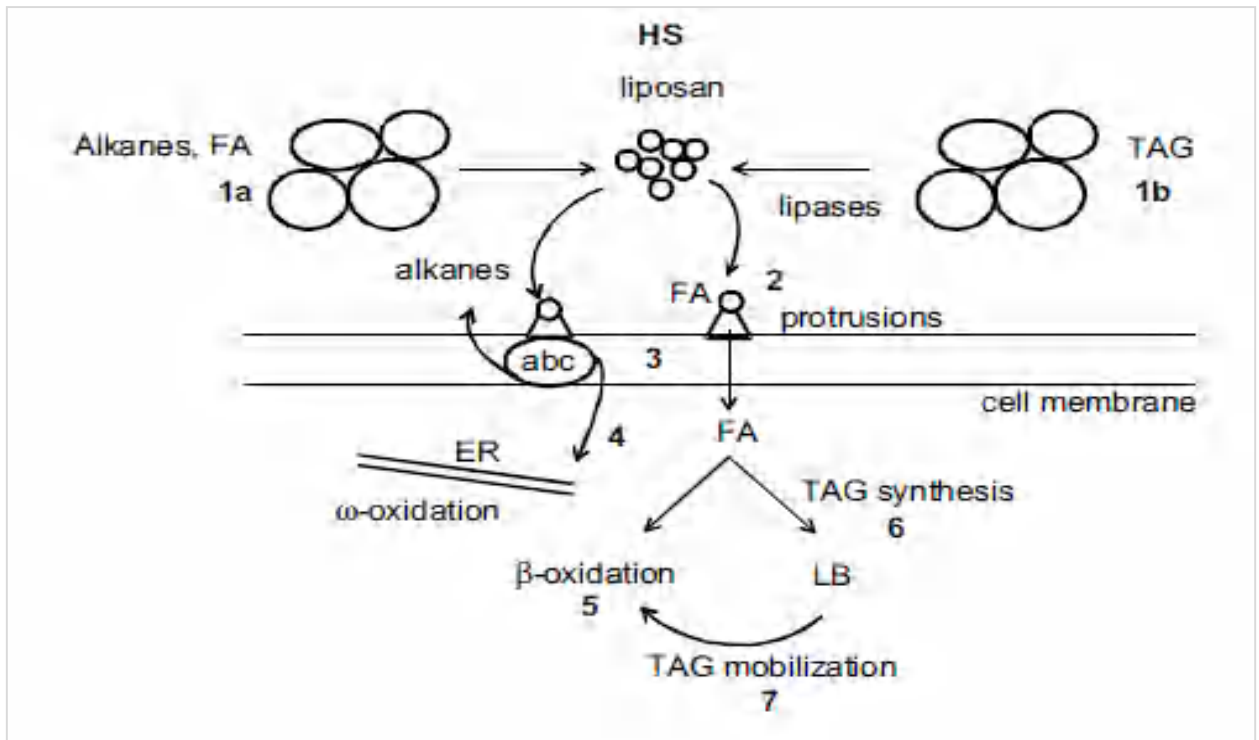


Figure 13: Représentation schématique de l'assimilation du substrat hydrophobe (SH) par *Y. lipolytica*. (1a, 1b) Les SH forment des émulsions et la taille des gouttelettes est réduite par le liposon sécrété. (1b) les TAG sont clivés par la lipase extracellulaire afin de libérer les acides gras. (2) Les gouttelettes de substrat s'accrochent aux protrusions cellulaires. (3) L'incorporation se fait par les mécanismes de transport (i.e. transporteurs ABC). (4) La modification du substrat se fait par des différentes voies (i.e. ω -oxydation pour les alcanes au RE, et le système monoxygénase P450). (5) Dégradation par la voie de la β -oxydation où (6) accumulation des lipides en forme de TAG (Beopoulos 2006; Thevenieau et al. 2007; Beopoulos et al. 2009c)

Yarrowia lipolytica est l'une des levures les mieux caractérisées qui peut également utiliser des substrats hydrophobes grâce à des activités lipolytiques existantes (et dans certains cas importantes) dont elle peut se débarrasser. En effet, *Y. lipolytica* contient plusieurs familles multi-géniques impliquées dans les voies métaboliques des substrats hydrophobes. La multiplicité de ces familles donne à cette levure un grand potentiel d'utilisation de ces hydrophobes. pour ça cet organisme a été récemment utilisé comme un modèle d'étude des mécanismes impliqués dans l'assimilation et dégradation des substrats hydrophobes (Barth and Gaillardin 1997; Beopoulos et al. 2010; Thevenieau et al. 2010; Papanikolaou and Aggelis 2011b).

C.2.2.1. Assimilation du substrat

Pour assimiler les substrats hydrophobes (les alcanes, les acides gras ou les triglycérides) et leur incorporés par le milieu, il faut ils subissent plusieurs modifications pour améliorer leur accessibilité c.à.d, pour modifier leur solubilité ou possède plusieurs remodeler sa propre surface cellulaire. été *Y. lipolytica* la levure plus connue pour ces activités lipolytiques et protéolytiques extracellulaires, c.à.d, il possède plusieurs remodeler sa propre surface cellulaire (Beopoulos 2006; Thevenieau et al. 2010).

- Au travers du transport indirect par la surface, réalisé par des surfactants tels que le liposan, et une lipase extracellulaire, Lip2p et émulsifiants extracellulaire permettant l'hydrolyse des TAG et ainsi une réduction de la taille des gouttes lipidiques en augmentant ainsi la surface du contact entre la cellule et le substrat(Barth and Gaillardin 1996; Mlíčková et al. 2004; Carsanba et al. 2018).



Figure 14: Interactions entre les cellules de *Y. lipolytica* et les substrats hydrophobes. Adhérence des cellules aux gouttelettes d'hexadécane pendant la croissance de *Y. lipolytica*. Les cellules sont incubées 5 heures sur un milieu minimum en présence de 1 % d'hexadécane comme unique source de carbone. Les cellules absorbent des petites (a) puis de larges (b) gouttelettes d'alcano. (c) Adhérence des cellules de la souche W29 de *Y. lipolytica* aux gouttelettes d'acide ricinoleique utilisé comme substrat. *Y. lipolytica* est capable de fixer des mini-gouttelettes d'acides gras émulsifiées à sa surface (Mlíčková et al. 2004; Fickers et al. 2005; Thevenieau et al. 2007; Beopoulos et al. 2010).

- Alternativement, au travers du transport interfaciale direct vers le RE via la membrane plasmique, qui implique la formation de protubérances permettant la fixation des substrats hydrophobes à la surface cellulaire(Fickers et al. 2005; Beopoulos 2006; Carsanba et al. 2018), à partir de ce moment ils peuvent être hydroxylés par le système de P450 monooxygénase (ω -oxydation)(Mlíčková et al. 2004; Beopoulos 2006).

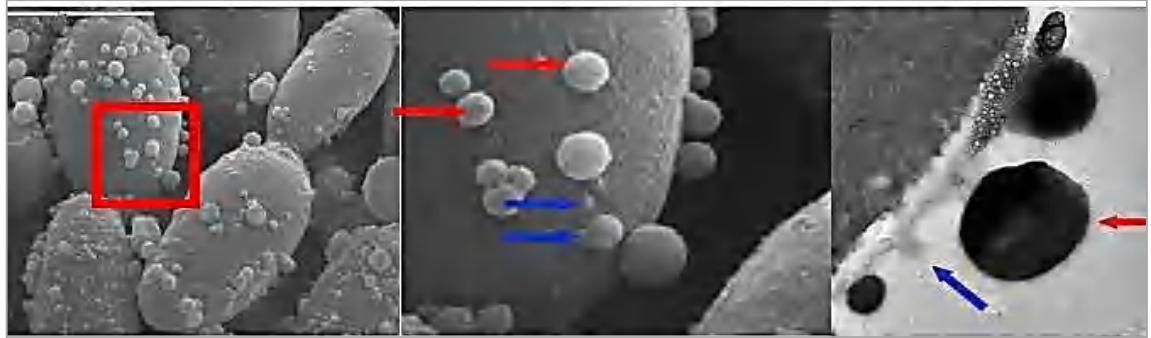


Figure 15: Analyse de la surface cellulaire de *Y. lipolytica* en présence d'acide oléique. Photographies en microscopie électronique de cellules de *Y. lipolytica* en culture sur milieu minimum en présence d'acide oléique. Des gouttelettes lipidiques (flèche rouge) et des protubérances (flèches bleues) sont observées (Mlíčková et al. 2004).

C.2.2.2. Transport des acide gras

L'incorporation se fait par les mécanismes de transport tels que les protéines de liaison des acides gras (FABPs), les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) ou les systèmes PXA et PEX11. Ces protéines présentent une remarquable conservation dans leur architecture moléculaire et leur organisation structurale c.à.d. L'import des acides gras réalisé par diffusion à travers la membrane cellulaire. Le transport n'est pas uniquement dépendant de ces protéines mais aussi de lipides membranaires comme le cholestérol et les sphingolipide. *S. cerevisiae* comme modèle en concernant par étudier le transport des substrats hydrophobes. Leur fixation et leur transport à travers la membrane plasmique sont des processus rapides, particulièrement pour les acides gras libres, qui se produisent quand la concentration extracellulaire des acides gras est 10-20 fois plus importante que la concentration intracellulaire. *Y. lipolytica* possède deux transporteurs différents, l'un spécifique des acides gras en C12 et C14, l'autre facilitant l'entrée des acides gras en C16 et C18 (saturés ou insaturés), sans pour autant les identifier (Beopoulos 2006; Thevenieau et al. 2007, 2009, 2010; Cescut 2009).

Une fois les substrats sont incorporés dans la cellule, il existe plusieurs voies facilitant leur dégradation, telles que l'oxydation mono-terminale des alcanes, la β -oxydation le cycle de glyoxylate et du citrate. Où La synthèse de l'acétyl-CoA pourrait également provenir de la β -oxydation de par la dégradation d'acides gras et des lipides membranaires dans un processus d'autophagie propre aux organismes oléagineux. Dans le cas des alcanes, ils doivent suivre des autres modifications au travers de la ω -oxydation avant de pouvoir être utilisés comme source d'énergie (Thevenieau et al. 2007, 2010; Zhu and Jackson 2015). Ces voies sont localisées dans des différents compartiments cellulaires comme le RE, les peroxysomes et la mitochondrie. La

dégradation des substrats hydrophobes s'achève par la voie de la β -oxydation située dans les peroxyosomes. Néanmoins, en présence d'excès de substrat hydrophobe, les substrats sont accumulés dans les corps lipidiques (CL) sous forme de TAG et d'ES. Les lipides accumulés peuvent alors être mobilisés après une étape d'hydrolyse catalysée par les lipases, codés par les gènes TGL. Chez *Y. lipolytica* il existe deux orthologues de TGL, mais leur fonction est encore inconnue (Beopoulos 2006). En effet, comme indiqué précédemment, Biodégradation («renouvellement») des TAG précédemment stockés sont lorsque la source de carbone extracellulaire n'est plus disponible, aboutissant à la synthèse d'acétyl-CoA, qui sera ensuite catabolisé par le cycle de Krebs ou sera utilisé pour des réactions anaboliques par le by-pass d'acide glyoxylique (Cescut 2009; Tziriti et al. 2018a).

C.3. Facteurs influençant l'accumulation lipidique

Selon la souche étudiées, plusieurs facteurs peuvent influencer l'accumulation lipidique comme le choix des sources de carbone et d'azote et le ratio entre ces deux sources (ratio C/N). En plus de ces facteurs, bien sûr, la température, le pH et le taux d'oxygène dissous. En particulier, le ratio C/N est un facteur souche dépendant (Coelho et al. 2010; Bouchedja et al. 2017, 2018; Carsanba et al. 2020; Al Mualad et al. 2022).

C.4. Approches d'amélioration de l'accumulation de lipides.

La faisabilité économique du procédé de production de lipides n'est pas seulement déterminée par les conditions opératoires de la fermentation et les espèces, mais également par le coût des matières premières (Lopes et al. 2007, 2009, 2018, 2019; Fabiszewska et al. 2019, 2021, 2022b; Al Mualad et al. 2022; Cao et al. 2022).

D. Intérêts de *Y. lipolytica* à des fins environnementales

D.1. Préambule

De nos jours, l'augmentation des déchets résultant de l'industrie alimentaire ou les résidus obligatoires des processus industriels constituent un problème grave pour de nombreux écosystèmes en raison des déversements dans l'eau, de son stockage dans le sol et de la difficulté de le traiter (Scioli et Vollaro 1997; Sarris et al. 2013; Martínez et al. 2015; Tzirita et al. 2018b; Lopes et al. 2019). En particulier, les déchets hydrophobes sont considérés comme les déchets gênants qui constituent le plus grand défi dans leur gestion. Leur élimination par des traitements physiques et chimiques, et des traitements thermiques par osmose, techniques membranaires ou évaporation n'est pas économique, écologique et saine (Lanciotti 2005; Sarris et al. 2019b; Fabiszewska et al. 2021, 2022b; Karim et al. 2021). Par conséquent, les scientifiques ont recherché des stratégies qui permettraient la protection, restauration et mise en valeur des milieux naturels et renouvelant ces ressources pour assurer un développement durable. De plus, en raison des besoins du marché vraisemblablement plus faibles et du manque d'options technologiques de traitement rentables, les huiles ont été considérées comme un déchet et est généralement éliminée sans autre traitement et est utilisée comme matière première pour la production de composés à valeur ajoutée (lipides microbiens) (Papanikolaou and Aggelis 2002; Sarris et al. 2013; Katre et al. 2017; Karim et al. 2021; Al Mualad et al. 2022). En fait, le principal défi économique pour une production réussie de bio-produits est le coût élevé de la matière première. L'utilisation des déchets industriels et domestiques comme substrats par les champignons oléagineux pour la production de bio-produits ne concernera pas seulement la gestion des déchets, mais constitue également une approche durable et potentiellement peu coûteuse pour améliorer l'économie des bioprocédés (Lopes et al. 2019; Kim et al. 2021; Fabiszewska et al. 2022b).

L'une des routes les plus importantes et les plus efficaces permettant de protéger et de réduire les problèmes environnementaux est la bioremédiation par des micro-organismes oléagineux, qui ont la capacité de produire plus de 20% de leur poids sous forme de lipides, attirent un intérêt croissant en tant que source potentielle de TAG à partir de matières organiques résiduelles (Lopes et al. 2019; Sarris et al. 2019b; Fabiszewska et al. 2022b). Par conséquent, pour optimiser le coût du procédé, ainsi que pour augmenter son bénéfice environnemental, des matières résiduelles ont été testées comme nutriments possibles pour les micro-organismes oléagineux, telles que les boues d'épuration, les matières lignocellulosiques, les déchets de tomates hydrolysées et les eaux usées des huileries à huile d'olive (Margine), et des déchets

résultant de l'industrie alimentaire (Huiles usée)(Lopes et al. 2009; Dobrowolski et al. 2016; Tzirita et al. 2018b; Ali et al. 2020, 2021b; Fabiszewska et al. 2022b; Al Mualad et al. 2022).

L'un des microorganismes typique utilisés dans le domaine de l'environnement en traitement ou mise à valeur de déchets est la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*, dont le système enzymatique lui permet de s'adapter à une large gamme d'environnements, qu'il peut être exploité à diverses fins environnementales ou pour les développements futurs dans les domaines liés aux applications industrielles pour produire des acides gras bénéfiques (Kim et al. 2021; Fabiszewska et al. 2022b; Al Mualad et al. 2022). Plus important encore, les levures *Y. lipolytica* sont des micro-organismes intéressants qui tolèrent le milieu de culture complexes, elles se développent, traitent et produisent des produits bénéfiques où elles peuvent s'accumuler jusqu'à 50%.(Papanikolaou and Aggelis 2011b; Groenewald et al. 2014; Bouchedja et al. 2017).

Les différentes approches pour améliorer l'accumulation des acides gras dans les levures (Figure 16) : a) Construction de voies désaturase/élongase et PKS hétérologues. b) Modification de la biosynthèse des acides gras par régulation combinée des gènes endogènes, inhibition des voies concurrentes et ingénierie de la voie d'édition des acyles. c). Différentes stratégies incluant l'expression multicopie, la régulation dynamique, la fusion de protéines et l'évolution dirigée. d) Optimisation du processus de fermentation grâce à l'utilisation de matières premières bon marché ou de déchets, de conditions de culture et de méthodes de fermentation appropriées(Cao et al. 2022).

Par conséquent, l'application réussie des déchets dans la culture de *Y. lipolytica* à l'aide d'huiles moyennes peut être considérée comme la solution proposée et moyen de réutiliser les flux d'eaux usées et les huiles usées, par exemple les huiles résiduelles, réduisant ainsi les composés toxiques et productifs à valeur ajoutée (lipides microbiens) par un procédé biotechnologique(Al Mualad et al. 2022).

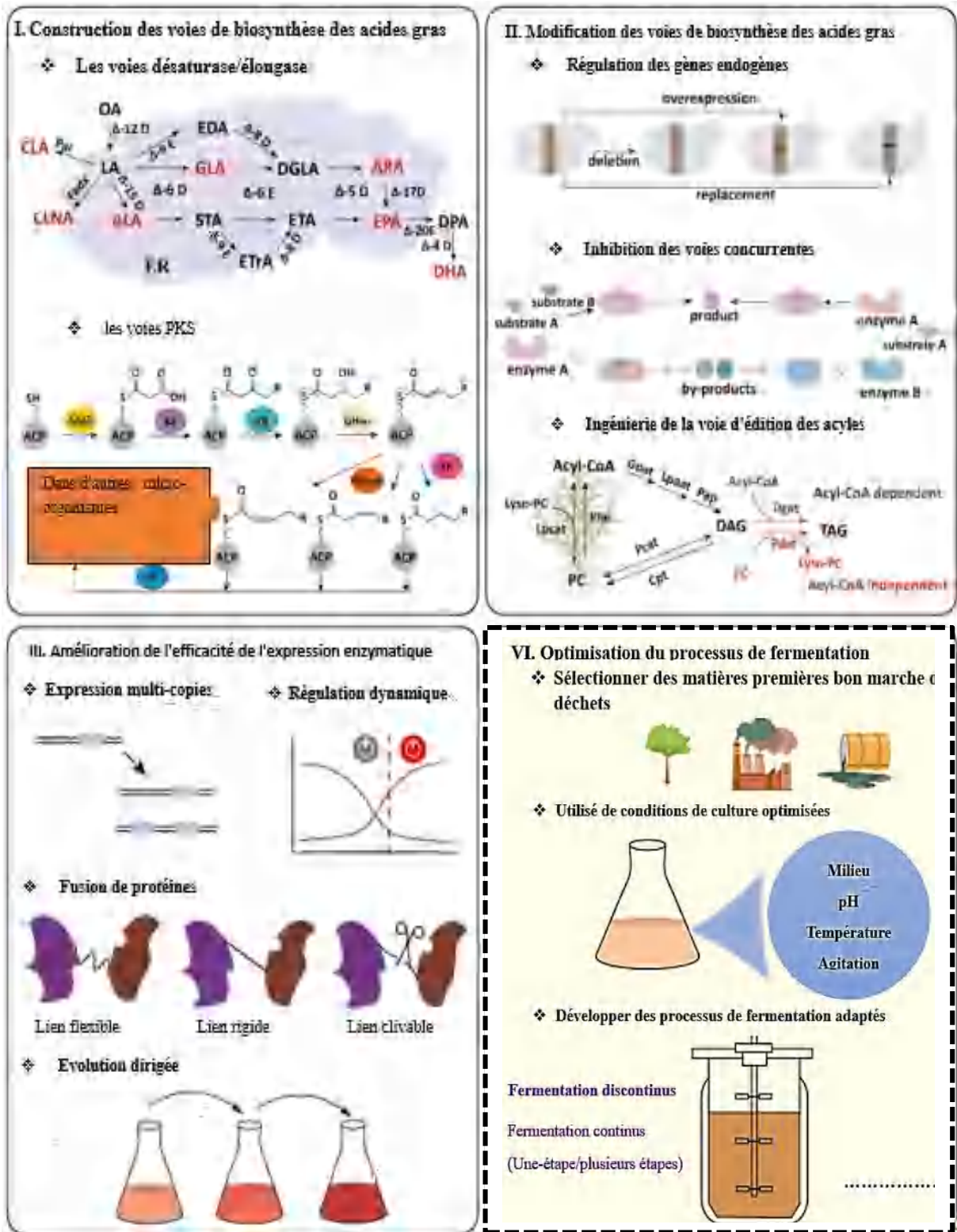


Figure 16: Les différentes approches pour améliorer l'accumulation des acides gras dans les levures (Cao et al. 2022).

D. 2. Déchets résultant de l'industrie

Les pratiques industrielles et domestiques actuelles conduisent à une génération excessive de divers sous-produits et/ou déchets bruts de faible valeur ou à coût négatif, qui peuvent avoir un impact négatif sur nombreux écosystèmes et la santé humaine en raison rejetés dans les environnements terrestres, marins et d'eau douce sans traitement préalable des substances indésirables (Bankar et al. 2009b; Liu et al. 2015; Dunoyer et al. 2020; Fabiszewska et al. 2022b). Parmi diverses industries : les produits laitiers, la viande, les huiles végétales et des huiles de cuisson usagées ont entraîné (Bankar et al. 2009b; Katre et al. 2017; Al Mualad et al. 2022). Les principaux composants présents dans les eaux usées sont les huiles, les graisses et les acides gras à longue chaîne..ect (Dunoyer et al. 2020; Al Mualad et al. 2022), donc, le traitement des effluents est une exigence économique et hygiénique.

D.2.1. Déchets résultant de l'industrie alimentaire

L'industrie alimentaire est un secteur où l'incidence de la pollution de l'environnement est élevée. parmi des déchets résultant de l'industrie alimentaire qui sont éliminés par les humains dans leurs activités quotidiennes tell que déchets alimentaires et Eaux usées municipales, eaux usées alimentaires, Gaspillage alimentaire hydrolysé les deux, Déchets de fruits et légumes, Gaspillage alimentaire, ainsi que des huiles de cuisson usagées (Bankar et al. 2009b; Baltrėnas and Baltrėnaitė 2020; Kim et al. 2021).

D.2.1.1. Huiles de cuisson usagées

Les huiles de cuisson usagées (WCO : Waste cooking oils) sont générées à partir d'huiles végétales (coco, tournesol, soja, palmier, coton, colza, olive, etc.) utilisées pour la friture des aliments dans les segments ménage et industries, les restaurants, les établissements de restauration rapide (en particulier ceux de poulet et de hamburger) et ne sont plus propre à la consommation humaine (Lopes et al. 2019). Parmi les nombreuses méthodes de cuisson des aliments, la friture est peut-être la plus exploitée, à la fois dans les cuisines domestiques et commerciales (par exemple, les restaurants de restauration rapide). Au cours du processus de friture, qui se produit à des températures élevées (160°C - 200°C), les huiles végétales (composées de triacylglycérols, TAG) subissent de nombreuses modifications physiques et chimiques et des composés toxiques se forment par des réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de polymérisation des TAG (Katre et al. 2017; Lopes et al. 2019; Fabiszewska et al. 2021, 2022b).

En effet, un processus de friture à l'air libre, la structure des huiles de cuisson est modifiée par réaction d'oxydation et de l'hydroperoxyde est produit, qui peut être encore oxydé en

produits toxiques, à savoir les 4-hydroxy-2-alcénals. Entre-temps, Les molécules d'eau des aliments peuvent attaquer la liaison ester des TAG, produisant des acides gras libres (FFA), du glycérol, des diacylglycérols (DAG) et des monoacylglycérols (MAG). Ces réactions d'hydrolyse se produisent plus facilement dans les huiles végétales avec les acides gras à chaîne courte et insaturés car ces composés sont plus solubles dans l'eau que les acides gras à longue chaîne et saturés (Gill et al. 1977). en complément, Les produits d'hydrolyse présentent une réactivité et une prédisposition plus élevées pour les réactions d'oxydation que les TAG des huiles végétales, et les FFA contribuent à la formation de fumée, d'odeurs indésirables et de saveurs désagréables, qui entravent l'utilisation ultérieure du WCO (Frega et al. 1999).

De plus, La polymérisation des TAG conduit à la formation de dimères non polaires et d'autres oligomères et l'extension de cette réaction dépend de la composition en acides gras de l'huile végétale, de la température de friture et du nombre de friture (Tompkins and Perkins 2000; Tsoutsos et al. 2016).

En particulier, l'oxydation des huiles riches en acide oléique produit une grande quantité d'aldéhydes insaturés, tels que le 2-décénal et le 2-undécénal, mais des quantités moindres d'aldéhydes saturés (nonanal et octanal) et d'hydrocarbures. D'autre part, l'oxydation de l'acide linoléique génère du 2,4-décadiénal, du 2,4-nonadiénal, du 2,4-octadiénal, du 2-hepténal, du 2-octénal, de l'hexanal, du 2,4-heptadiénal, du 2,4-hexadiénal, buténal, propanal et 2-propénal (également connu sous le nom d'acroléine)(Zhang et al. 2017, 2021; Chang et al. 2022). Significativement, tous ces composés générés par la dégradation des huiles de cuisson ont des effets nocifs sur la santé humaine et sont reconnus comme ayant des effets mutagènes, cancérigènes, neurotoxiques et hépatotoxiques, entre autres (Tsoutsos et al. 2016). Précisément, plusieurs paramètres sont utilisés pour évaluer l'extension des réactions chimiques et la dégradation des huiles de friture répétées, tels que l'indice de saponification (mesure la masse moléculaire moyenne des acides gras), l'indice d'acide (quantifie le pourcentage de FFA), l'indice d'iode (mesure le degré d'insaturation de l'huile), indice de peroxyde (indicateur de l'oxydation initiale), indice de p-anisidine (mesure l'oxydation de l'huile), indice d'oxydation totale (estime la détérioration oxydative des lipides de l'huile), indice d'acide 2-thiobarbiturique (estime l'oxydation des graisses polyinsaturées acides) et composés polaires totaux (mesure la dégradation thermo-oxydative de l'huile de friture) (Katre et al. 2017; Lopes et al. 2019; Fabiszewska et al. 2021, 2022b).

Alors, dans l'industrie alimentaire, la valeur maximale de chaque paramètre autorisée jusqu'au rejet de l'huile de friture dépend du type d'aliment frit. Les paramètres physiques des huiles végétales, tels que la couleur, la viscosité, la densité et la tension superficielle, sont également affectés par les processus de friture. Certains des changements physiques peuvent être rapidement évalués par inspection visuelle et sont des indicateurs de la qualité de l'huile usée. L'augmentation de la noirceur de l'huile de cuisson est attribuée au développement de pigments lors de l'oxydation des acides gras, des réactions de Maillard et de l'oxydation des composés phénoliques des huiles végétales. La viscosité des huiles usées augmente avec le nombre de cycles de friture en raison des dimères non polaires et des composés polymères de haut poids moléculaire produits lors de la polymérisation des TAG (Ahmad Tarmizi et al. 2013). Malgré les substances indésirables produites lors de la friture des aliments, qui peuvent avoir un impact négatif sur l'environnement et la santé humaine, ce processus de cuisson est de plus en plus populaire, car la friture améliore les propriétés sensorielles (saveur frite unique, couleur brun doré et texture croustillante), et comme l'utilisation d'huiles végétales sur la friture des aliments ne doit pas être prolongée, une accumulation de huiles usées est inévitable (Lopes et al. 2019).

Au cours des dernières décennies, la quantité d'huile de cuisson usagée (HCU) a été augmentée, avec un taux allant jusqu'à 2 % par an, en raison de l'augmentation de l'alimentation et, surtout, la consommation de fast-food par la population humaine (Mannu et al. 2019, 2020). La production mondiale annuelle d'huile usée est de 41 à 67 millions de tonnes. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture estime que la consommation annuelle moyenne d'huile végétale à usage alimentaire atteindra 23,5 kg par habitant, avec une prévision croissante de 0,9 % par an jusqu'en 2025 (Lopes et al. 2019). On estime qu'environ 1 à 2,5 millions de tonnes métriques par an d'huiles usées sont générées dans les pays de l'Union européenne (UE) (Mannu et al. 2020). Cependant, le niveau actuel de collecte est très faible puisqu'il varie entre 0,7 et 1 million de tonnes métriques par an (De Feo et al. 2020).

D'une part, l'élimination finale des huiles usées est une lourde charge en raison de son volume élevé, et l'évacuation irrationnelle des huiles de cuisson usagées dans les égouts entraîne des problèmes d'exploitation et de maintenance dans les stations d'épuration municipales qui augmentent considérablement leurs coûts de traitement (Kulkarni and Dalai 2006). ou un litre d'huile de cuisson usagée déversé dans l'environnement peut polluer 0,5 million de litres d'eau, entraînant ainsi de graves problèmes économiques et environnementaux (De Feo et al. 2020). L'huile usée a des composés qui persistent dans

l'environnement pendant de nombreuses années, augmentent la charge organique sur les sources d'eau et forment une fine couche à la surface de l'eau qui réduit la concentration d'oxygène dissous requise pour les espèces subaquatiques, modifiant l'écosystème (Guerrero et al. 2011). Ces déchets riches en lipides peuvent entraver le traitement des eaux usées en raison de l'adsorption d'acides gras à longue chaîne (LCFA) sur la biomasse (qui cause des problèmes de flottation des boues et de transfert de masse), de la formation de mousse (résultant de l'accumulation de LCFA non dégradés) et de l'inhibition des communautés microbiennes anaérobies (suite à une augmentation des LCFA) (Appels et al. 2011). D'autre part, lorsque huiles sont mélangées ou jetées avec les déchets ménagers et incinérées à l'air libre, ce qu'il peut engendrer des rejets atmosphériques polluants. Ainsi que Lorsque elles sont déversées dans la nature elles influencent le sol en modifiant sa composition chimique ce qui peut rendre ce sol non fertile à long terme. Pour réduire les impacts négatifs sur les écosystèmes, il devient urgent la gestion, le recyclage et la valorisation des huiles usée et pour améliorer leur disponibilité en vue de leur réutilisation dans différents processus industriels, tels que les biolubrifiants, le biodiesel, les additifs pour les asphaltes, les aliments pour animaux, entre autres (Manu et al. 2020).

Dans de telles circonstances, les autorités gouvernementales en matière de préservation de l'environnement à travers le monde ont fortement encouragé éviter la pratique illégale de décharge de l'huile de vidange par le système d'égout public et la collecte huiles usée ainsi que le bon transport et traitement des huiles usée par les opérateurs agréés et leur valorisation potentielle en produits à valeur ajoutée. Cependant, de nombreux pays n'ont pas de législation spécifique pour l'huiles usée et les pratiques de gestion adoptées ne sont pas identifiées, en particulier dans les pays très peuplés et sous-développés. Le recyclage et la réutilisation des huiles usée peuvent minimiser les impacts environnementaux et technologiques tout en contribuant à une efficacité économique, selon le concept d'économie circulaire (Lopes et al. 2018, 2019). Traditionnellement, les huiles usée étaient utilisées comme composant de l'alimentation animale. Cependant, en 2002, cette application a été strictement interdite dans l'Union européenne pour éviter le transfert de composés cancérigènes au corps humain via la chaîne alimentaire (Lam et al. 2016).

Alors, la transformation de huiles usée en biodiesel domine la réutilisation de ces déchets huileux car, parmi les biocarburants, le biodiesel produit à partir de huiles usée a les émissions de gaz à effet de serre les plus faibles (Wallace et al. 2017a, b) ce qui a conduit à la mise en place de stratégies mondiales et à l'augmentation des subventions à la production (allégements

ou exonérations fiscales ou prix avantageux) (Rincón et al. 2019). Cependant, les coûts de transformation sont encore élevés et les conditions utilisées dans les méthodes de friture, ainsi que le matériau frit (légumes, viande, poisson), provoquent des modifications physiques et chimiques de l'huile usée qui affectent la production de biodiesel. La teneur élevée en acides gras libres et en eau (qui rendent difficile la séparation des esters du glycérol et forment du savon) et la présence d'acides dimères et polymères et de glycérides dans l'huile usée (qui augmentent sa viscosité) pourraient interférer dans les réactions de transestérification et affecter le résultat final qualité du biodiesel. De plus, la quantité de huiles usées disponible pour la production de biodiesel ne peut pas répondre à la demande croissante de ce carburant renouvelable dans un avenir proche et seulement 1,5 % de la consommation de diesel de l'UE28 pourrait être remplacée par du biodiesel obtenu à partir de huiles usées (Wallace et al. 2017b; Lopes et al. 2019).

Bien que le principal concept de bioraffinerie autour de l'huile usée soit axé sur le biodiesel, d'autres options de valorisation ont été exploitées, notamment son utilisation comme matière première pour la production de savons, de résines, de polymères, de graisses lubrifiantes et de polyuréthane. L'huile usée peut également être utilisée comme source de production d'énergie, telle que le biohydrogène, l'huile pyrolytique, l'électricité (par combustion directe), les hydrocarbures (par gazéification et liquéfaction) ou mélangée à des combustibles solides (Lopes et al. 2019).

Certains de ces processus ne sont pas respectueux de l'environnement, il convient donc de rechercher des solutions plus éco-efficaces, comme les approches biotechnologiques qui utilisent des micro-organismes pour la conversion de l'huile usée en produits utiles, huiles fonctionnelles et compléments nutritionnels (Katre et al. 2017; Al Mualad et al. 2022).

D.2.2. Résidus obligatoires des processus industriels

Les résidus obligatoires des processus industriels telles que l'industrie pétrolière, les raffineries de pétrole, les bains de rinçage de la transformation des métaux, l'industrie de fabrication de lubrifiants. Ainsi que l'industrie agroalimentaire comme l'effluent de l'huilerie de huile olive (Margine) ; effluent de l'huilerie de palme ; des effluents laitiers (Cas de lactosérum)...ect. Ils génèrent de grandes quantités d'effluents contenant des graisses, des fractions pétrolières telles que le diesel, des hydrocarbures hydrophobes et des tensioactifs. De nombreux déchets industriels contiennent des mélanges de différents produits chimiques organiques et inorganiques (Bankar et al. 2009b; Kim et al. 2021).

D.2.2.1. Déchets de l'huilerie de l'huile olive (Margine)

La production d'huile d'olive est une industrie agricole traditionnelle, Les pays méditerranéens produisent à eux seuls 97% de la production totale d'huile d'olive, tandis que les pays de l'Union européenne (UE) en produisent 80 à 84%. Le premier pays producteur d'huile d'olive est l'Espagne (890 100 t en 2002), puis l'Italie (614 950 t), la Grèce (402 703 t) et la Turquie (168 700 t), suivis de la Tunisie, du Portugal, du Maroc et de l'Algérie. Les eaux usées résultant du processus de broyage s'élèvent à 0,5–1,5 m³ pour 1000 kg d'olives selon le processus. Une grande quantité de déchets liquides résulte de l'extraction de l'huile d'olive. ils rejetées soit dans des cours d'eau, soit épanchées sur le sol (Kachouri *et al.*, 2005 ; Paraskeva and Diamadopoulo,s 2006). Donc, Il représente l'un des effluents industriels les plus polluants pour les écosystèmes terrestres et aquatiques, et il peut constituer un grave problème environnemental s'il est déversé à grande échelle dans la nature (Berndt *et al.* 1996). Cet effluent se caractérise par des valeurs élevées de demande biologique en oxygène (DBO) (100 kg/m³) et de demande chimique en oxygène (DCO) (220 kg/m³)(Ben Sassi et al. 2006; Lopes et al. 2009; Yousuf et al. 2010; Sarris et al. 2013).

Sa composition varie considérablement selon le procédé utilisé pour la production d'huile,le type et la maturité des olives, la région d'origine, les conditions climatiques et les méthodes de culture/transformation associées, mais il contient généralement de fortes concentrations de polluants organiques : pectines, sucres, lipides et composés aromatiques dont les phénols monomères tels que le tyrosol, l'hydroxytyrosol, les acides hydroxybenzoïque et cinnamique, et les polyphénols tels que comme flavonoïdes, tanins hydrolysables et condensés (Hamdi 1993a, b; Hamdi et Garcia 1993; Hamdi et Ellouz 1993).

Alors que certains des phénols monomères présentent des activités phytotoxiques et antimicrobiennes(Capasso et al. 1992), les phénols polymères, tels que les tanins condensés, ont de forts effets toxiques sur les animaux et les micro-organismes(Bhat et al. 1998) (Bhat *et al.* 1998), et sont également responsables de la couleur noire récalcitrante des OMW stockées (Pérez et al. 1992; Aggelis et al. 2003; Rahmanian et al. 2014).

Les charges polluantes élevées de composants trouvés dans les margines (glucides, polysaccharides, sucres, lipides et composés phénoliques) qui provoquent une décoloration et une réduction de l'oxygène dissous dans la rivière, en font l'un des effluents les plus polluants produits par les industries agroalimentaires(Rahmanian et al. 2014).

Par conséquent, les déchets industriels doivent être traités avant d'être rejetés, sinon les effluents non traités causeraient de graves dommages au système aquatique. La forte odeur nauséabonde de l' margines causerait également un problème environnemental aux populations environnantes(Frascari et al. 2016; Reis et al. 2018).

La grande variété des composantes trouvées dans les margines nécessitent des technologies différentes de traitement pour éliminer les agents polluants ayant des effets nocifs sur l'environnement. Plusieurs méthodes sont applicables tels que traitements physico-chimiques (coagulation/floculation, filtration sur membrane...) et traitements thermiques (incinération, évaporation,...) . Ainsi que Le traitement par des bassins d'évaporation naturelle, la technique la plus usitée en raison de sa simplicité. Néanmoins, elle permet une évaporation partielle et lente de ces eaux et elle provoque des effets néfastes sur le sol et peut même atteindre la nappe phréatique par filtration de ces eaux usées, mais la bioremédiation reste en fait la méthode la plus simple, la moins chère et la plus naturelle pour le traitement des margines (Bankar et al. 2009).

En effet, le sol comprend de nombreux micro-organismes, notamment filamenteux champignons, capables de se développer en présence d'OMW et caractérisés par une synthèse efficace d'enzymes hydrolytiques (Tardioli et al. 1997; Sarris et al. 2017) ; d'autre part, certains chercheurs ont découvert que la quantité importante de substances organiques dans l' margines en faisait un excellent candidat de la biomasse pour la production d'énergie avec le processus de récupération approprié (Kıpçak and Akgün 2013).

D.3. Bioprocessus pour environnementales et industrielles

L'élimination d'huiles non traitées dans les éviers peut causer de graves problèmes environnementaux tels que la contamination de l'eau, le lessivage et la propagation d'odeurs putrides lorsqu'elles sont éliminées dans le milieu environnants. Le large éventail de composants présents dans les margines nécessite différentes techniques de traitement pour éliminer les polluants ayant des effets nocifs sur l'environnement. Différents procédés sont applicables tels que les traitements physiques et chimiques (coagulation/floculation, filtration membranaire, etc.), et les traitements thermiques (incinération, évaporation, etc.)(Martínez et al. 2015; Fabiszewska et al. 2022b). Cependant, il provoque des effets néfastes sur les terres et peut même atteindre la nappe phréatique en filtrant ces eaux usées.

Les méthodes physiques, chimiques et biologiques actuelles de traitement des eaux usées contenant de l'huile sont incapables d'assimiler complètement les hydrocarbures hydrophobes présents dans le flux de déchets. Les traitements biologiques (par levures) sont la technologie la plus sûre (Fabiszewska et al. 2021, 2022b; Kim et al. 2021). Tous ces substrats hydrophobes sont internalisés dans le compartiment cellulaire de la levure oléagineuse en créant certaines modifications à la surface comme des saillies qui contribuent à augmenter la surface de contact entre le substrat hydrophobe et la levure (Bankar et al. 2009b; Lopes et al. 2019; Patel 2020). Une autre considération est la transformation de ces composés à faible coût ou à coût négatif en une gamme de composés à valeur ajoutée utilisant des technologies enzymatiques et microbiennes. Les micro-organismes oléagineux sont étudiés depuis de nombreuses années en raison de leurs propriétés et de leur application potentielle dans l'industrie et le traitement des eaux usées (Al Mualad et al. 2022).

La conception de stratégies impliquant des micro-organismes pour simultanément dégrader les déchets et obtenir des produits à haute valeur ajoutée a été développée par plusieurs chercheurs tableau 3.

Concernant la préservation de l'environnement et les coûts de la bio-production ont fait de la biodégradabilité un critère de conception critique en termes de sélection des matières premières. Donc, avec la génération accrue d'huiles dechets, elles peuvent être considérées comme des matières premières pour les processus microbiens et une application durable afin environnementales et industrielles (Bankar et al. 2009b; Lopes et al. 2019; Cao et al. 2022).

Donc, des sources de carbone pour des bioprocessus (milieux de culture), doivent répondre notamment pour le développement durable dans la mesure du possible par les critères suivants: (a) provenir de substrats bon marché, (b) être économiquement disponibles tout au long de l'année, (c) être facilement désinfectables, (d) permettre un rendement maximal de la biomasse et de la formation de produits, (e) être compatibles avec différents modes de culture (par lots, par lots alimentés ou en continu), (f) ne pas générer de déchets nocifs et en quantité supérieure au résidu initial et (g) être faciles à manipuler à toutes les étapes de la culture (production, extraction, purification et traitement des déchets) (Lopes et al. 2019; Cao et al. 2022). En complément, Les matériaux hydrophobes utilisés comme matière première pour la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse peuvent être des acides gras libres obtenus à partir d'un flux de déchets industriels, des huiles de cuisson usagées, des

effluents d'industries laitières et productrices de beurre et des huiles de poisson usages(Santos et al. 2013; Katre et al. 2017; Dourou et al. 2018; Cao et al. 2022).

D. 3.1. Utilisation des huileux Déchets dans les cultures de levure

Concernant la préservation de l'environnement et les coûts de la bio-production ont fait de la biodégradabilité un critère de conception critique en termes de sélection des matières premières. Donc, avec la génération accrue d'huiles dechetes, elles peuvent être considérées comme des matières premières pour les processus microbiens et une application durable afin environnementales et industrielles. Actuellement, les déchets huileux ont le potentiel d'être un substrat peu coûteux et abondant pour la croissance microbienne et la production de metabolites tels que lipases, carotènes, acide citrique, érythritol ou pour l'accumulation de lipides microbiens(Bankar et al. 2009b; Lopes et al. 2019; Cao et al. 2022), répondant aux critères ci-dessus. L'utilisation les déchets huileux directement comme matière première pour les processus microbiens est une excellente occasion de réduire les coûts de production de composés précieux et également d'augmenter la valeur économique de ces déchets, car ils sont considérés comme dangereux pour l'environnement et ont des processus de dégradation exigeants en énergie , par exemple, Au lieu d'utiliser de l'huile végétale pure pour la production de biodiesel par des levures oléagineuses, les substrats huileux obtenus à partir du flux de déchets peuvent servir de moyen pour réduire la production totale coût(Bankar et al. 2009b; Katre et al. 2012; Al Mualad et al. 2022).

Donc, Le recyclage et la valorisation des déchets huileux ont été recommandés pour réduire les effets négatifs des déchets huileux sur les écosystèmes. Par exemple ,la biomasse (lipides fonctionnelles et/ou biodiesel), du savon, de la graisse lubrifiante, du polyuréthane, du polyhydroxybutyrate, du biohydrogène, de l'huile pyrolytique et de l'électricité peuvent être produits à partir de les déchets huileux(Lopes et al. 2019). En complement, La production de biosurfactants à partir des déchets huileux peut être un procédé à forte valeur ajoutée (Sarris et al. 2019b).

Les biosurfactants, les composés tensioactifs produits par les bactéries, les levures et les champignons, ont reçu une attention considérable en raison de propriétés uniques telles qu'une biodégradabilité élevée , une écotoxicité minimale ou nulle, excellente activité tensioactive, et bonne biocompatibilité, par rapport aux tensioactifs classiques issus de la pétrochimie.Parmi divers biosurfactants, les sophorolipides (SL) ont été largement étudiés pour des utilisations

académiques et industrielles, et ont été largement appliqués aux industries de la cosmétique, de la biomédecine, de la bioremédiation, du nettoyage, de l'alimentation, de l'agriculture et du pétrole. Dans plusieurs cas, ces micro-organismes ont été utilisés à la fois pour dégrader les graisses et consommer les acides gras (AG) libérés pour la croissance, transformant à la fois les matières grasses intra-cellulaires et extra-cellulaires en « nouveaux » lipides présentant une composition différente en AG par rapport au substrates initial. L'incorporation d'un substrat lipidique dans la cellule microbienne et les modifications intracellulaires des AG sont définies par les capacités enzymatiques des micro-organismes (Bankar et al. 2009b; Tzirita et al. 2018a; Karim et al. 2021).

Divers micro-organismes tels que les champignons filamenteux, les bactéries et les levures sont bien connus en tant que micro-organismes *lipolytiques*. Parmi des micro-organismes pour simultanément dégrader les déchets huileux et obtenir des produits à haute valeur ajoutée est levure oliageneuse telles que *Starmerella bombicola* (*Candida bombicola*), *Rhodotorula bogoriensis*, *Candida stellata* et *Candida batistae* produisent des bioproduits (Bankar et al. 2009). Ils ont la capacité d'utiliser l'huile de carbone comme source de carbone et d'énergie et de les convertir en métabolites à valeur ajoutée et respectueuses de l'environnement (Sarris et al. 2019). En particulier, levures non pathogènes *Yarrowia lipolytica* ont été largement étendues pour des utilisations académiques et industrielles, et ont été largement appliquées aux industries de la cosmétique, de la biomédecine, de la bioremédiation, du nettoyage, de l'alimentation, de l'agriculture et du pétrole (Braga and Belo 2016a; Katre et al. 2017; Lopes et al. 2019). En complément, la levure *Yarrowia lipolytica* est mise en évidence en raison de son activité extracellulaire et intracellulaire (Darvishi et al. 2017). Ici, l'utilisation des déchets huileux (margine et huiles usée) comme matière première pour les processus microbiens sera discutée par levure oliageneuse *Yarrowia lipolytica*, et des données récentes illustrant la diversité de la capacité *Yarrowia lipolytica* et des métabolites produits à partir des déchets huileux seront présentées.

D.3.2. Potentiels de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est un agent biologique très efficace pour se développer sur différents types de substrats renouvelables et de déchets issus du secteur industriel et agricole. Ils sont capables de consommer des sources de carbone sucrées (pentoses et hexoses) ainsi que des sources de carbone non sucrées (telles que l'éthanol, le lactate, le glycérol et l'acétate) quelle que soit leur origine, ces en raison de son activité extracellulaire et intracellulaire, elle possède

plusieurs familles multigéniques qui participent aux voies cataboliques et métaboliques pour la dégradation d'une large gamme de substrats hydrophobes et leur assimilation ultérieure en acides gras, triacylglycérols et alcanes dans leur compartiment cellulaire et convertir le déchets en un composé à haute valeur ajoutée tels que lipases, carotènes, acide citrique, érythritol ou pour l'accumulation de lipides microbiens(Bankar et al. 2009; Katre et al. 2017; Lopes et al. 2019).

En complément, *Yarrowia lipolytica* est un outil biologique adéquat pour la biodégradation des substrats à haute teneur en matières grasses, c'est en raison de son activité de lipase extracellulaire et en créant certaines modifications à la surface comme des saillies qui contribuent à augmenter la surface de contact entre le substrat hydrophobe et la levure (Lopes et al. 2018). *Y. lipolytica* sécrète une large batterie de lipases extracellulaires pour hydrolyser le substrat gras (Lopes et al. 2019). Donc, Ces acides gras peuvent être utilisés pour soutenir la croissance de micro-organismes ou stockés sous forme de gouttelettes lipidiques avec une composition en acides gras similaire ou différente par rapport au substrat hydrophobe initial, entraînant des changements de composition et souvent une amélioration du profil des acides gras (Lopes et al. 2018). *Y. lipolytica* a été approuvé comme GRAS (Generally Recognized As Safe) dans plusieurs procédés industriels(Coelho et al. 2010).

D.3.3. Application environnemental de *Y.lipolytica*

Avec la population mondiale en constante augmentation et avec le développement économique industriel et la consommation excessive d'énergie provenant du pétrole et des hydrocarbures, les environnements soit l'air, le sol ou l'eau devient pollués par divers matériaux tels que les composés de carbone lourds et xénobiotiques et autres sont l'une des principales causes des catastrophes environnementales. La pollution de l'environnement est désormais plus grave(Thevenieau et al. 2009; Bankar et al. 2009b; Darvishi Harzevili 2014). Carrément, on a besoin à une stratégie de restauration de l'environnement qui respecte l'environnement, permet de convertir des matières toxiques en matières non toxiques ou en petites molécules chimiques utilisées pour l'assimilation, Et c'est par utilisée biotechnologique des microbiens pour l'élimination des pollution de l'environnement par micro-fermentation(Bankar et al. 2009).

Tableau 3. Base biotechnologie de *Yarrowia lipolytica* pour l'élimination des pollutions de l'environnement et valorisation simultanés.

Souches <i>Y. lipolytica</i>	Sources carbone	Trématent /réduction / production	Référence
Polluant (Différents flux de déchets industriels-agricoles-alimentaire ; Produits toxiques) et sous-produits			
NCIM 3589	WCO	Accumuler des lipides 60% (0,062, g L ⁻¹ h ⁻¹) Accumuler des lipides > 20%, (0,43 g g ⁻¹) Productivité lipidique de 0,042 g L ⁻¹ h ⁻¹	Katre et al. 2017 Katre et al. 2012 Katre et al., 2018
M53	WCO	Erythritol 21,8 g/L ; CA 12,6 g / L Erythritol 22,1 g/L ; lipase 12,7 U / mL Erythritol 114,3 ± 1,8 g / L ; Erythritol 185,4 mg / g	Liu et al.2018 liu et al.2017b liu et al.2019a,b
Polg (YL6) YB 423-12	VCOs (WCO) Différentes sources d'huile Résidus de l'industrie pétrolière	produit des FAEE à 37,6 mg / L production 5,34 ± 0,94 g / L CA de l'huile de bourrache produit 12,32 ± 1,54 U / mL lipase de THN Production lipidique (% , g/g) 61.67 ± 0.26 % de l'huile de lin	Tee-Kheang et al., 2019 Saygun et al., 2014
W29 (ATCC 20460) MUCL 28849	WCO Glycerol + VFA Glucose + VFA	Production lipides 53% P.S. lipase activity (12 000U.L ⁻¹) production en lipides 34.59 % production en lipides 40,22 %	Lopes et al., 2018 Fontanille et al., 2012
ATCC 9773	Déchets laitiers	Elimination des graisses (88 %) Réduction 43,32% de DBO5 ; 44,30% de DCO	Dunoyer et al., 2019
NC-D, NC-I SWJ-1b	WCO WCO	Teneur en lipides ≥ 57,89% ; ≥ 61.64% Production lipidique 42,1 g / 100g P.S ; 31.7 g/L CA ; 6,5 g / 1 ICA Elimination WCO (93,3 %)	Bialy et al., 2011 Liu et al.2015b
YLY	WCO et mélasse, glycérol brut	production de lipase 16420 U / ml et de SCP151,2 g / L	Yan et al., 2012,2018
CECT 1240	WCO	Réduction 97% COD avec la production de lipase	Dominguez, 2010
Polg ATCC 20460 LFMB 20	WCO DLWSH WCO	D-limonène et le L-limonène 2,514 et 2,723 mg / L. Production de lipides 4.4 % Elimination des graisses 90%WCO et 88% beurre Accumuler des lipides 1.06 g/L d'huile ; 0.86 g/L de beurre	Pang,et al., 2019 Yu XC et al., 2011 Tzirita et al., 2018
Polg CICC 31596 ATCC 20460	WCO VFAs FWHB	Production du bisabolène Production de lipides 29.91 ± 0.66% Teneur totale en acides gras (%) 11.5±5.2 Réduction COD 207.3±21.0 mg / L	Zhao et al., 2020 Gao et al., 2017 Chi et al., 2011
NCYC 2904	Okara (résidu de soja)	Augmenté les quantités de lipides, de succinate et d'acides aminés libres, et a amélioré la capacité antioxydante. augmentation marquée des goûters umami importants.	Vong et al., 2016
DSM 8218 IMUFRJ 50682	FW Déchets de mangue	Production de lipides de 49,0 ± 2% sur la base du poids sec Production -lipase 68,03 U / (g de résidu)	Johnravindar et al., 2017 Pereira et al., 2019
PSA02004 YSC	FVW Xylose	Production d'acide succinique (SA) 43,1 g L ⁻¹ α-linolenic acid (ALA) 0.52 g L ⁻¹ ; riboflavin 96.6 mg L ⁻¹ ; triactic acid lactone (TAL)	Li et al., 2018
A-101-1.22	Glycérol brut	Production des acide citrique 112 g L ⁻¹	Li et Alper 2019 Rymowicz et al, 2010
ACA-DC 50109	OMW / Glucose Glycérol brut	Production des acide citrique 28.9 g/L ; polyphène 15% Production des acide citrique 62.5 g/L	Papanikolaou et al., 2008 a,b
ACA-YC 5031	OMW / Glycerol	Production des acide citrique 54.0 g/L , de lipides35.1% réduction de couleur (≈40,0%), phénoliques entre 52,0 et 62,0%	Tzirita et al., 2019
NCIM 3589 ACA - YC 5033	Déchets PKC OMW/glucose	Production de lipase 18,58 et 26.42 (U / g ds) Décoloration 58% et - phénoliques 51 % ; Production 15.8 g/LCA , 52.0 g/L CA ; 48% de lipides	Imandi et al., 2010a, b Sarris et al., 2011 , 2017
ACA-DC 5029	OMW + Glycérol	Production 37.0 g/L et 79.0 g/L CA, 20% de lipides Décoloration (~ 30%) ; phénoliques 10 % ; 66.0 g/L Erythritol	Sarris et al., 2019
Y. lipolytica S11 Y. lipolytica A6 LGAM S (7) CLIB40	OMW OMW + Glycérol OMW + Glucose OMW	Accumuler des lipides (15-25%, p / p) produit du mannitol 13.4 g/L produced CA 30.3 g/L	Dourou et al., 2016
LFMB 19, LFMB 20 ACA-YC 5033	Déchets (glycérol brut)	Réduction COD (73%) ; 3,2 g / L de la biomasse Production polyol mannitol 6,0 g / L ; Production CA 50,1 g / L ; Accumuler des lipides 2,0 g / L	Hamimed et al.2020 André et al., 2009
CECT 1240 W29	Noix triturées ; son d'orge OMW	Production lipase (23 kU l ⁻¹) ; (21 kU l ⁻¹) Production lipase 6 g / L Réduction DCO 80% ; des phénols 70%	Domínguez et al., 2003 Araujo et al.,2005
62 dif-strains ATCC 9773.	OMW (dilué ou non) Fww (SW)	Réduction 1.47- 41% COD ; ≤ 78.2% polyphenol Réduction DBO5 43,07% et DCO 44,35% Dégradation 83% d'huile	Lanciotti et al., 2005 Mendoza et al., 2019
QU21 AWG7 Y.L. (M1 and M2)	Déchets industriels (CrGly) Effluent(glycérol brut) AIWW	Rendement lipidique 1,27 g / L Production de CA 1,3 g dm ⁻³ h ⁻¹ . produit lipase (11 et 8,3 U / ml) ; CA 27 et 8 g / l	Poli et al., 2014 Rywinska et al.2011 Mafakher et al.2010

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Souches <i>Y. lipolytica</i>	Sources carbone	Tréatment /réduction / production	Référence
Polluant (Différents flux de déchets industriels-agricoles-alimentaire ; Produits toxiques) et sous-produits			
MBRC-10073	DS (déchets de poisson)	Réduction 46% COD	Yano <i>et al.</i> , 2008
NCIM 3589	Déchets d'ananas	Production 202.35 g/kg de CA	Imandi <i>et al.</i> 2008
VKM Y-2373	Déchets l'huile de colza	Production 77.1 g/l de CA avec + lipase	Kamzolova <i>et al.</i> 2007
	Déchets de biodiesel	Production 79–82 g/L de citrate trisodique	Kamzolova <i>et al.</i> 2011
A-10	Déchets l'huile de colza	Production (KGA) 72.0 g/L, (PA) 48.1 g/L	Krzysztof <i>et al.</i> , 2018
W29 (ATCC 20460)	OMW	Production lipides 55 % ; Réduction COD 50 % ; Phénoliques 1 %	Goncalves <i>et al.</i> , 2012
W29	OMW	Réduction 54 - 79% COD ; 43 - 72 % polyphenol	Lopes 2009
IMUFRT 50682		Réduction 75 à 80% COD ; 39 à 68% polyphenol	
CBS6303	VORW	Réduction DCO 16%, DBO 27% (26% , 3 7 % avec + Lips)	Darvishi <i>et al.</i> , 2019
W29 ATCC 20460		Réduction 21.6 - 52,6% COD ; 19.2 - 31.3 % polyphenol	
CBS 2073	OMW	Réduction 23.5 - 51.3% COD ; 25.3% polyphenol	Goncalves <i>et al.</i> , 2009
IMUFRT 50682		Réduction 23.1 - 50.9% COD ; 20% polyphenol	
CBS 6303	POME	Réduction DCO 16%, DBO 27% (26% , 3 7 % avec + Lips)	Mireille <i>et al.</i> , 2015
rM-4A	POME	Réduction phénolique (36%) ; triglycérides (98,5%) ; DCO (60,3%)	Theerachat <i>et al.</i> , 2017
NCIM 3589	POME	Réduction 99 % COD ; 80% BOD	Oswal 2002 et Lam2011
TISTR 5151	POME	Accumulées lipide 33% 1,64 ± 0,03 g / L ; 40,9% FAME	Louhasakul <i>et al.</i> , 2016
		Activité de lipase (3353 ± 27 U / L,)	
		Réduction 81.2 ± 7.6 % COD	
NRRL Y-1095	OMW-OOC	Produit la lipase 40 UI g-1 ; le traitement alcalin de l'OOC	Moftah <i>et al.</i> , 2013
ATCC 20255	OMW	Réduction 80% COD ; Production (lipase) 770 U/L	Scioli etVallaro 1997
ATCC 20255	OMW	Réduction 80% COD	De Felice <i>et al.</i> , 1997
Y (SSA1642) YSR-19	Lignocellulolytic (xylose)	Production lipides 52,17 ± 1,09% p / p ; lipases et xylanase	Ali <i>et al.</i> , 2020a
Y-BC-SH		Décoloration azoïque 94.3%	
IMUFRT 50682	TSGC	Réduction 79% COD	Farias <i>et al.</i> , 2014
OYC-Y.BC.SH	LC-TDWW	Production (lipase) 139 ± 3 U / g ; 102 ± 6 U / g en (SSF)	Ali <i>et al.</i> , 2020b
		productivité lipidique (1,56 g / L / jour) et lipase (170,3 U / mL)	
		Décoloration Red HE3B 82% ; Désintoxication	
Po1g	DSCBH	Production de lipides 58.5 %	Tsigie <i>et al.</i> , 2011
LGAM (7)1	TPL . aqueous extrac	Production de lipides 33%	Aggelis et Komaitis 1999
	Graisses industrielles	Production de lipides 44.0%	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2001
IMUFRT 50862	Huile brute	Dégrader 90% des n-alcanes, 97% des naphtalènes et 95% des phénanthrènes	Martins <i>et al.</i> , 2012
NCIM 3589	Pétrole brut	78% de la fraction aliphatique du pétrole brut(c-libre) ; 92% de la F-A- de l'huile fournie (immob)	Zinjarde et Pant, 2000
W29	OWW	Réduction 67-82% COD	Wu <i>et al.</i> , 2009
IMUFRT 50682	TPOMW	Production (lipase) 7.8 U/g*h	Lopes <i>et al.</i> , 2016
A101	Divers déchets industriels.	Accumulation de lipides dans jusqu'à 21% du poids des cellules sèches par la souche modifiée (+ de C16 , 18) ; SCO	Dobrowolski <i>et al.</i> , 2016, 2019
AJD pAD-DGA1	déchets (SW-CG)	Elimination Cu 2 des eaux usées de l'industrie céramique	El-Sayed, 2018
AUMC 9256	Eaux usées	Production lipides de 58% ; 9,2 g · L ⁻¹ CA ; 192 mg · L ⁻¹ · h ⁻¹ lipase	Lopes <i>et al.</i> , 2018
W29 (ATCC 20460)	porc lard	Dégradation de la zone de contamination	Zogala <i>et al.</i> , 2005,2009
A - 101	Sols contaminés par l'essence.	Décoloration de 97% de 50 mg / L	Aracagoh 2013
NBRC 1658	Black5	Réduction 68% ; 40% .35% COD	Margesin <i>et al.</i> , 2003
RM7/11	Gas-oil; n_hexa et n_dodecane		
SM7	Glycérol brut ; Déchs- crustacés	Surproduire l'enzyme lipase jusqu'à 25 à 40 g L ⁻¹	Magdoui <i>et al.</i> ; 2017
NCIM 3589	Pétrole ; n_hexadecane	Réduction 10–15% COD ; 40–60% COD	Zinjarde <i>et al.</i> , 1998
LPSC605	Dibenzofuran	Produire 2-hydroxydibenzofurane	Romero <i>et al.</i> , 2002
	Diphényle	Produire 4 hydroxydiphényle et 3,4 dihydroxydiphényle	Oh <i>et al.</i> , 2000
Y103	Phénol, 4 chlorophénol	Produire du catéchol (semialdéhyde 2-hydroxymuconique)	Lee <i>et al.</i> , 2001
NCIM 3589	TNT	Formation du complexe (H-TNT) et la formation de dérivés aminés.	Jain <i>et al.</i> , 2004
M53	Glycérol	Erythritol 169.3 g/L	liu <i>et al.</i> 2017a
LFMB 19	Glycérol brut	Production Mannitol 19,4 g / L ; AA 29,2 g / L ; CA (9.4 g / L	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2011
NCIM 3589. 3590	Métaux lourds Cr (VI) ;	Biosorption Cr (VI) de 63,73 et 46,09 mg / g - 1	Bankar <i>et al.</i> , 2009a
NCIM 3589. 3590	Ni(II)	Accumulation intracellulaire Ni (II) 95,33 et 85,44 mg / g-1	Shinde <i>et al.</i> , 2012

WCO: waste cooking oil ; **OMW:** olive mill wastewaters ; **OWW :** oil wastewater ; **POME:** palm oil mill effluent ; **DSCBH :** detoxified sugarcane bagasse hydrolysate ; **TSGC :** Tourteau de soja et grines de coton ; **VORW :** vegetable oil refinery wastewater ; **LC-TDWW :** lignin-like Dyes and textile dyeing wastewaters ; **AIWW:** agro-industrial wastewater ; **PWMWW :** Food Waste and Municipal Wastewater **VCos :** vegetable cooking oils ; **COD :** chemical oxygen demand ; **DBO :** demande biochimique en oxygène ; **BOD :** biological oxygen demand ; **FWW (SW) :** Food wastewater ; **DLWSH :** Detoxified liquid wheat straw hydrolysate ; **FWHB :** Food wasts hydrolyzsd both ; **FWV:** Fruit and vegetable waste ; **FW :** Food wasts ; **TNT :** trinitrotoluène ; **TPOMW:** two-phase olive mill waste ; **OOC:** olive oil cake.

Pour ca, la levure *Y. lipolytica* a été suggéré comme un agent très prometteur pour le traitement de la pollution pour ce que l'on sait de son potentiel infini (Selon ce qui a été mentionné dans la littérature et ce qui a été observé dans notre étude précédente (bouchedja *et al.*, 2017)) soit dans l'étendue de son assimilation de grande variété de substrats comme sources de carbone tels que les substrats osidiques, lipidiques ou paraffines (Barth and Gaillardin 1997; Fickers *et al.* 2005; Bankar *et al.* 2009b; Beopoulos *et al.* 2010; Groenewald *et al.* 2014), soit dans processus de fermentation (de déchets liquide et/ou solide), Soit dans sa traitement des milieux polluants et xénobiotiques, En particulier, le glycérol brut, les n-alcanes ou les résidus agro-industriels-alimentair comme sources de carbone atypiques (sous-produits de faible valeur ou nocifs) (Bankar *et al.* 2009). Toutes ces caractéristiques font que *Y. lipolytica* est un hôte attrayant pour les applications industrielles et dans plusieurs applications en bioremédiation environnementale (p.e. dans biorestauration des sols ou des milieux aquatiques contaminés par des hydrocarbures, la détoxification du 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), le métathathion, les aflatoxines ou les composés organiques bromés), En particulier remédiation et la valorisation des flux de déchets (WCO ; OMW ; POME ; DLWSH ; VCOs ; FWHB ; DSCBH ; FW ; PWW ; CrGly .etc.) et sous-produits (moins chers) et leur transformation en produits à valeur ajoutée avec une efficacité et une rentabilité élevées (Bankar *et al.* 2009). Tableau 3 présentée différentes souches de *Y. lipolytica* ont été utilisées pour le traitement ou la valorisation de divers déchets.

Parmi les applications et les capacités les plus importantes de la levure présentées dans le tableau, l'utilisation de substrats bon marché et de déchets comme matière première pour la production de composés à valeur ajoutée, tels que la lipase, le carotène, l'acide citrique et l'érythritol; cette levure est typique pour l'accumulation de lipides microbiens (Beopoulos *et al.* 2008; Sarris *et al.* 2011; Liu *et al.* 2017; Katre *et al.* 2017).

D. 3.4. Composés à valeur ajoutée (lipides microbiens)

Jusqu'à présent, les huiles usagées sont considérées comme les déchets gênants qui constituent le plus grand défi dans leur gestion. Leur élimination par des traitements physiques et chimiques, et des traitements thermiques par osmose, techniques membranaires ou évaporation n'est pas économique. De plus, en raison des besoins du marché vraisemblablement plus faibles et du manque d'options technologiques de traitement rentables, les huiles a été considérée comme un déchet et est généralement éliminée sans autre traitement et est utilisés

comme matière première pour la production Composés à valeur ajoutée (lipides microbiens)(Tableau 3).

D.3.5.Intérêt des lipides de levures et de *Y. lipolytica*

Le grand avantage des levures par rapport aux autres microorganismes pour l'obtention d'huiles est la facilité de les cultiver, la température de culture, un temps de doublement rapide, l'espace requis pour la culture et des méthodes d'extraction de lipides existantes(Beopoulos 2006).

Chez *Y.lipolytica* l'accumulation de lipides est plus faible que pour les autres microorganismes oléagineux, mais c'est la seule levure connue capable d'accumuler de l'acide linoléique en grands proportions (plus de 50% des acides gras). Cette particularité de *Y.lipolytica* a attiré l'attention, car les acides gras longs et insaturés, présentent un grand intérêt alimentaire et biotechnologique. Ils constituent des lipides essentiels de l'alimentation, comme les oméga-3 et les acides gras polyinsaturés, ils sont utilisés comme biocarburants ou comme précurseurs de la synthèse des plusieurs produits de la pétrochimie (plastiques, peintures, adhésifs, etc) (Beopoulos et al. 2011). Sa présence dans une vaste variété d'environnements pollués par le pétrole témoigne de sa capacité à dégrader des composés organiques. Elle est déjà considérée comme un modèle pour la production de protéines, des enzymes et de bioconversion de dérivés de lipides à partir de substrats hydrophobes. *Y. lipolytica* est également présente dans des environnements marins, hyper-salins, ce qui en fait un modèle pour des études du stress osmotique (Beopoulos and Nicaud 2012).

D.4. Développement durable par *yarrowia lipolytica*

De nos jours, les déchets alimentaires et industrielles représentent une part importante de la production totale de déchets. Ainsi que, le traitement efficace et éventuellement la réutilisation de matériaux est d'une importance primordiale pour développement durable. La durabilité de la production de bioproduits à partir d'huiles dechets s'agit d'une solution prometteuse à avantages multiples pour renforcer la sécurité énergétique, promouvoir une économie circulaire, minimiser les déchets et la pollution de l'environnement et préserver la sécurité alimentaire (Lopes et al. 2018, 2019) . De plus, la production de biodiesel à partir de cultures traditionnelles riches en huile de deuxième génération, telles que le tournesol, le soja, le colza et la moutarde, est limitée par la disponibilité des terres et la région géographique de culture, ainsi que par les problèmes environnementaux et sociaux concernant l'utilisation des cultures

fourragères et vivrières pour la production. de carburants. Pour obtenir des graisses animales, il est nécessaire de nourrir le bétail pendant plusieurs années, ce qui rend cette option inadaptée aux processus de mise à l'échelle. ainsi que le biodiesel produit à partir d'huiles végétales vierges coûte beaucoup plus cher que le pétrodiesel, c'est un inconvénient majeur à la commercialisation du biodiesel sur le marché. Par conséquent, les chercheurs se concentrent sur la recherche de sources alternatives et renouvelables d'huiles. Les huiles obtenues à partir de micro-organismes sont considérées comme appropriées pour remplacer la source conventionnelle d'huiles pour la production de biocarburants (Katre et al. 2017; Lopes et al. 2019).

Au cours des dernières décennies, Ce domaine de recherche a attiré plus d'attention en raison de problèmes environnementaux et de durabilité critiques tels que les émissions de gaz à effet de serre, l'épuisement rapide des approvisionnements en combustibles fossiles et le coût élevé de l'énergie. Parmi les différentes classes de microorganismes oléagineux, à savoir les microalgues, les levures, les bactéries et les champignons, les levures sont très efficaces pour se développer sur différents types de substrats renouvelables et de déchets issus du secteur industriel et agricole (Cao et al. 2022)

Les matériaux hydrophobes utilisés comme matière première pour la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse peuvent être des acides gras libres obtenus à partir d'un flux de déchets industriels, des huiles de cuisson usagées, des effluents d'industries laitières et productrices de beurre et des huiles de poisson usagées (Papanikolaou et al. 2003; Fabiszewska et al. 2021). Réponse des souches de levure et de leurs récepteurs énumérés ci-dessus dans le tableau, *Yarrowia lipolytica* peuvent avoir des applications industrielles et peuvent aider à réduire la pollution à des coûts raisonnables (Bankar et al. 2009). Ainsi, parvenir à la développement durable (tableau ci-dessus).

D.5. Conclusion

L'intégration bio-process des substrats à valeur faible ou négative dans la formulation de milieux pour la production de composés à valeur ajoutée et bioremediation par de *Yarrowia lipolytica* pourrait être une approche biotechnologique prometteuse pourrait améliorer son économie de production et atteindre la durabilité de environnementales et industrielles.

E. Production de γ -décylactone par levure *Y.lipolytica*

E.1. Généralités

Les aliments sont composés de (glucides, lipides, sels minéraux, protéines), cependant, aucun de ces composants ne donnent de goût. C'est pourquoi la saveur des aliments est le résultat d'une combinaison de composés volatils odorants vitales «arômes ». Les arômes sont des produits ou substances non destinés à être consommés en l'état, qui sont ajoutés dans ou sur des produits pour leur donner une odeur et / ou un goût ou modifier ceux-ci. Aussi elle peut être des produits issus ou constitués des substances aromatisants, préparations aromatisants, arômes obtenus par traitement thermique, arômes de fumée, précurseurs d'arôme ou autres arômes ou leurs mélanges. Les fruits, légumes, épices, viandes, poissons, produits laitiers, ont des arômes que les industries agro-alimentaires ont reproduire, standardiser et renforcer par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques (Alchihab et al. 2010b; Braga and Belo 2016a).

La plupart des arômes sont produits par des moyens chimiques ou extraits de plantes. Ces sources classiques de production et de synthèse ne s'avèrent plus performants et satisfaisants face à la demande croissante des diverses industries. à cause des contraintes du sol liées à l'utilisation de plantes de grandes cultures. l'extraction à partir de matières premières naturelles présente de nombreux inconvénients : tels que la production agricole est saisonnière et limitée, leurs qualités varient en fonction de facteurs incontrôlables (conditions climatiques et géographiques) et le prix revient est très élevé (Gopinath et al. 2008; Gomes et al. 2011a). De plus, les climats, les variations saisonnières, les facteurs politiques et socio-économiques conduisent souvent à un déficit constant d'approvisionnement en produits de parfums naturels à partir de plantes. En ce qui concerne la synthèse chimique (ou synthèse organique), les chimistes rencontrent des problèmes de sélectivité, dont le principal problème est l'obtention sélective de molécules chirales. Or, cette voie de synthèse conduit systématiquement à un mélange racémique de deux dérivés énantiomères. depuis quelques années, le développement d'une crainte chez le consommateur de composés chimiques synthétiques, il y a une suspicion des effets toxiques ou nuisibles pour sa santé. Toutes ces raisons ont fait que la synthèse chimique perd de son attrait (Alchihab et al. 2009).

Les voies classiques de synthèse chimique ou d'isolation à partir de plantes sont toujours viables, mais la génération biotechnologique de composés aromatiques devient plus attrayante. Les arômes (identique au naturel) ont l'avantage d'avoir une composition constante. L'utilisation des micro-organismes est considérée comme une solution alternative de produire des composés

aromatiques classés comme «naturels» par la législation alimentaire européenne et américaine. Ce label représente un avantage marketing important raison pour laquelle cette technologie a suscité un vif intérêt aux niveaux scientifique, économique et industriel, Avec une augmentation annuelle de besoins nouveaux de l'arome et dans des conditions adéquates, cela peut entraîner la production d'arômes de l'ordre de g/kg au lieu de mg/kg rencontrées dans les matières premières. Tout cela explique l'intérêt montré par les industriels à l'égard des arômes obtenus par la biotechnologie (Abrahão et al. 2013; Braga and Belo 2016a).

L'utilisation des micro-organismes oléagineux est un domaine relativement nouveau. Durant ces dernières années plusieurs recherches effectuées par des chercheurs d'une vingtaine de pays dont la France, l'Allemagne et la Serbie, réunis pour créer des arômes naturels à partir des matières premières végétales en utilisant des microorganismes comme usine cellulaire, exactement en 1960, la possibilité de production de lactones par voie biotechnologique a été découverte par une équipe Japonaise (Okui et al. 1963a, b) à l'utilisation la levure *Candida tropicalis*. Par la suite, des efforts ont été consacrés à l'utilisation de souches de levure (*Sporidiobolus salmonicolor* et *Yarrowia lipolytica*..) qui possèdent capacité de produire des quantités importantes des arômes de type lactone (Braga and Belo 2016a).

La lactone la plus largement produite biotechnologiquement est la γ décalactone, un arôme semblable à la pêche qui peut être obtenu à partir de la biotransformation de l'acide ricinoléique, catalysée par divers microorganismes. La γ -décalactone est alors considérée comme un additif alimentaire GRAS (généralement considéré comme sûr) par la US Food and Drug Administration (Coelho et al. 2010). La levure aérobie *Yarrowia lipolytica* a été utilisée pour produire de la γ -décalactone à partir d'une source de carbone: l'huile de ricin (Małajowicz et al. 2020). Cette partie se concentre sur l'arome de type lactones et tout particulièrement la γ -décalactone et leurs productions par la levure *Y. Lipolytica*. Les voies métaboliques de la production et de la dégradation de la γ -décalactone sont également discutées. Un bref aperçu du processus de biotransformation et certains aspects pertinents de l'huile de ricin, le substrat utilisé dans le processus de production d'arômes, sont également rapportés.

E.2. Arôme de type lactone

Les « arômes » de type lactone sont des composants d'huiles essentielles et de substances volatiles non destinés à être consommés en l'état, qui sont ajoutés aux denrées alimentaires pour leur conférer une odeur et/ou un goût ou modifier ceux-ci, est très intéressantes pour l'industrie alimentaire car elles ont un arôme «fruité» caractéristique et se retrouvent naturellement dans une grande variété d'aliments et de boissons. Le beurre, par exemple, renferme 26 lactones

différentes. Certains fruits comme la pêche, l'abricot, la papaye, la fraise renferment une dizaine de lactones. Elles sont également présentes dans différentes boissons comme le thé, le café et le vin (Maga and Katz 1976). Les lactones sont des esters cycliques d'un acide hydroxycarboxylique ayant une structure de 1-oxacycloalcan-2-one, ou analogues comportant une insaturation ou des hétéroatomes remplaçant un ou plusieurs atomes de carbone du cycle. Les γ -lactone (4-alcanolide, lorsque la fonction hydroxyle se trouve sur un carbone en position C4) et δ -lactone (5-alcanolide, lorsque l'hydroxyle est en C5) représentent les deux structures les plus fréquemment identifiées dans la composition des arômes. Elles proviennent respectivement de la cyclisation des hydroxyles en position 4 ou 5 avec celui du groupe carboxylique (Figure 17) (Endrizzi et al. 1996; Dufossé et al. 1998; Alchihab et al. 2010b).

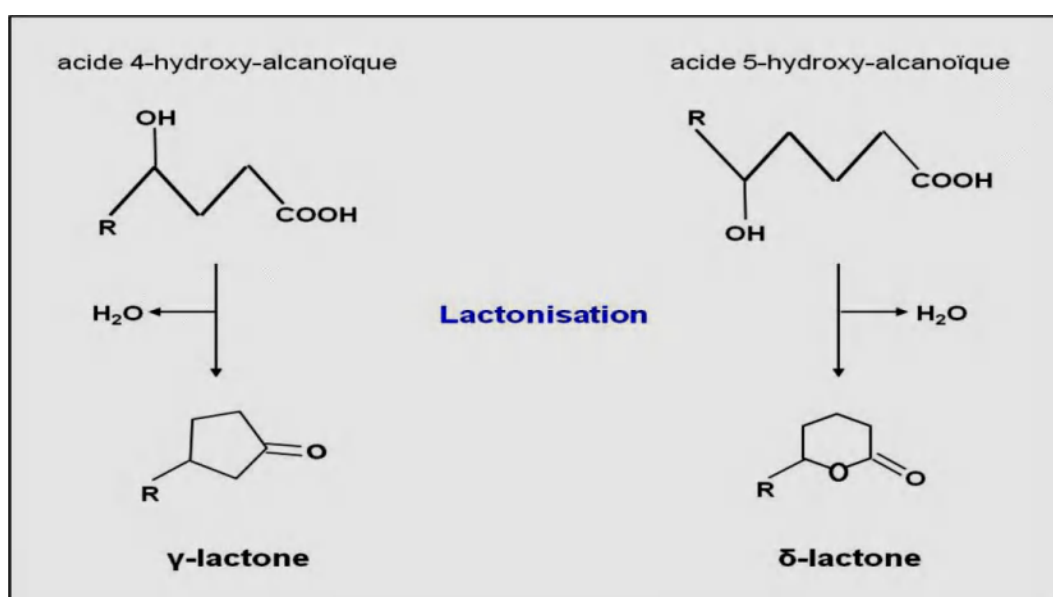


Figure 17: Structure et formation de la γ -lactone et la δ -lactone (Dufossé *et al.*, 1994 ; Pagot *et al.* 1998 ; Waché *et al.*, 2002)

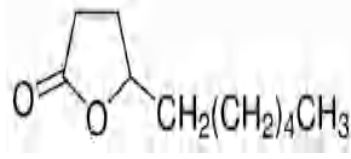
Les lactones dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 4 (butyrolactone) et 12 (dodécalactone) sont des composés volatiles. La diversité des lactones est liée aux substituants présents sur les chaînes latérales, au nombre de doubles liaisons et à la configuration spatiale des molécules (formes énantiomériques R et S). Ils sont omniprésents dans les aliments et contribuent au goût et aux nuances gustatives, qui possèdent, le plus souvent, une odeur fruitée tels que la pêche, l'abricot, la mangue, l'orange, la prune, etc., à des concentrations de l'ordre du mg/kg, dans le lait et ses dérivés et dans certains produits fermentés (Alchihab et al. 2010b; Romero-Guido et al. 2011). Les propriétés sensorielles des lactones sont influencées par la forme du cycle, la longueur de la chaîne carbonée latérale, la présence de doubles liaisons, la présence de substituant sur le cycle ou sur la chaîne (Dufossé, *et al.*, 1994).

La lactone la plus largement produite biotechnologiquement est la γ décalactone.(Braga and Belo 2016a)

E.2.1. γ -décalactone

La γ -décalactone ($C_{10} H_{18} O_2$) est un ester cyclique résultant de la condensation du groupe alcool -OH et d'un groupe acide carboxylique -COOH de la même molécule. Il est caractérisé par un cycle fermé constitué de quatre atomes de carbone et d'un seul atome d'oxygène endocyclique, couplé à une cétone adjacente ; son poids moléculaire est de 170 g / mol⁻¹ (Aguedo et al. 2002). Les propriétés physicochimiques des lactones sont importantes pour expliquer leur comportement lors des procédés de production et d'extraction. Certaines propriétés physico-chimiques de la γ -décalactone sont présentées dans le tableau 4 (Souchon, 1994; Braga et al. 2016; Soares et al. 2017).

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques de l' γ -décalactone (Souchon, 1994)

Propriétés physico-chimiques	Valeur	Structure
• Indice de volatilité	0.103	
• Solubilité dans l'eau	0.6 g / L	
• Hydrophobicité constante à 25 ° C	3,35	
• Estimation de la pression de vapeur à saturation à 25 ° C	0,754 Pa	
• Point d'ébullition	281 °C	
• Coefficient de diffusion:		
- dans l'eau	6,6. 10 ¹⁰ m ² /s	
- dans le ricinoléate de méthyle	0,11. 10 ¹⁰ m ² /s	

En raison des propriétés organoleptiques la γ -décalactone est la plus remarquable, Il est un composé aromatique important, largement utilisé dans les aliments et les boissons (Ben Akacha and Gargouri 2015b; Braga and Belo 2016a; Sales et al. 2018; Braga et al. 2018; Felipe et al. 2019), qui est plus exigeant de nos jours, elle présente un arôme et une saveur de pêche extrêmement persistants qui déplacent des centaines de tonnes de produit par an sur le marché mondial (Schrader et al. 2004; Moradi et al. 2013, 2016).

Gamma-décalactone, peuvent être obtenus directement à partir de produits naturels (comme des fruits, des légumes, des produits laitiers) ou par synthèse chimique, mais de tels procédés impliquent un coût en produit plus élevé (10 000 kg) et des inconvénients (Schrader et al. 2004). Ainsi, la production de γ -décalactone par des processus microbiens constitue une alternative biotechnologique très intéressante car, en plus de réduire considérablement son prix (300 kg US), elle est considérée comme un additif alimentaire GRAS (généralement reconnu comme sûr) par l'organisation américaine. Food and Drug Administration (Schrader et al. 2004; Coelho et al. 2010). Ces facteurs corroborent la demande croissante de composés aromatisants naturels chez les consommateurs, car la production microbienne de lactones donne la même configuration énantiomérique des lactones que l'on trouve dans les pêches et autres fruits (Schrader et al. 2004; Alchihab et al. 2010b; Braga et al. 2018; Małajowicz et al. 2020).

La production biotechnologique de γ -décalactone utilise principalement l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxyoctadéc-9-énoïque) comme substrat, un acide gras hydroxylé (C18) qui, sous forme estérifiée, est le constituant principal (environ 80%), d'huile de ricin. Ceci peut être obtenu par biotransformation de cet acide hydroxylé via le peroxysomal (voie 3-oxydation) par plusieurs espèces de micro-organismes, principalement par des levures (Braga et Belo 2016).

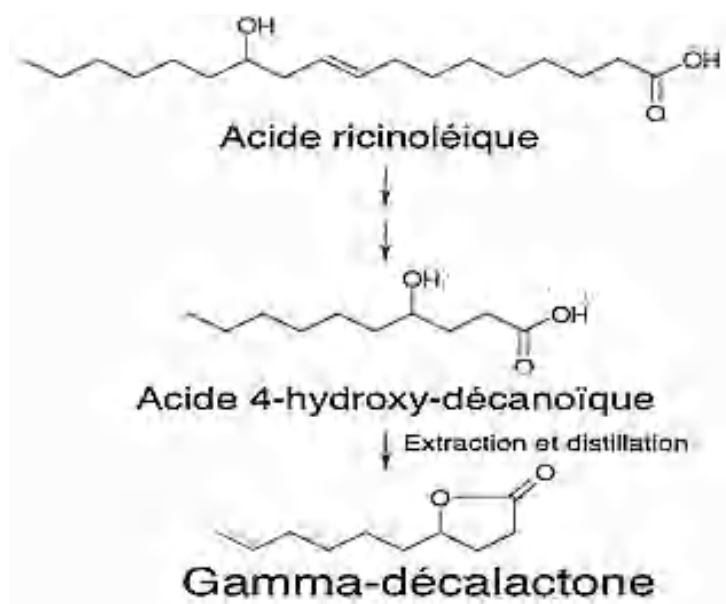


Figure 18 : Biotransformation de l'acide ricinoléique en γ -décalactone (Pinheiro, 2004).

Le processus implique la biodégradation du substrat de l'acide ricinoléique pour former de l'acide 4-hydroxy-décanoïque, qui se cyclise lactoniser en formant de la décalactone (Figure 18) (Pagot et al. 1998; Braga et Belo 2016). De nombreuses souches de levure sont capables de

produire plusieurs milligrammes par litre de γ -décalactone, mais seules quelques-unes produisent des quantités en grammes par litre. Les processus impliquant la levure *Yarrowia lipolytica* sont ceux qui permettent d'obtenir des concentrations plus élevées de produit (γ -décalactone)(Braga and Belo 2016; Soares et al. 2017).

E.2.1.1.Voie de production de γ -décalactone : B-oxydation peroxysomale.

Peu d'études ont été décrites sur la voie métabolique impliquée dans la formation de lactones insaturées dérivées d'acides gras. Au début, la production de γ -décalactone à partir d'acide ricinoléique a été observée par Okui *et al.* (1963) chez des levures du genre *Candida*, lorsque le groupe Okui (Okuyi, Mizugak, 1963) étudiait le catabolisme des acides hydroxy dans divers organismes(Schrader et al. 2004; Soares et al. 2017).

Ils ont proposé la voie métabolique de la levure impliquée dans le processus de biotransformation (*Candida*), en identifiant la présence d'intermédiaires contenant 8 à 18 atomes de carbone, dérivés du catabolisme de l'acide ricinoléique. Les hydroxyacides sont des précurseurs directs des lactones et peuvent être synthétisés par des microorganismes à partir d'acides gras (Braga et Belo 2016). Les hydroxyacides naturels tels que l'acide ricinoléique peuvent être transformés et transformés en γ -décalactone par des micro-organismes via la voie de la B-oxydation (Braga et Belo 2016).

De cette façon, la levure métabolise l'acide ricinoléique libérant de l'huile de ricin, puis elle est métabolisée et convertie en acide 4-hydroxydécanoïque, qui est lactonisé en γ -décalactone (Figure 19) (Krzyczkowska 2012). La dégradation de l'acide ricinoléique par la levure se produit par l'action d'enzymes impliquées dans la voie de la β -oxydation peroxysomale (Braga et Belo 2016).

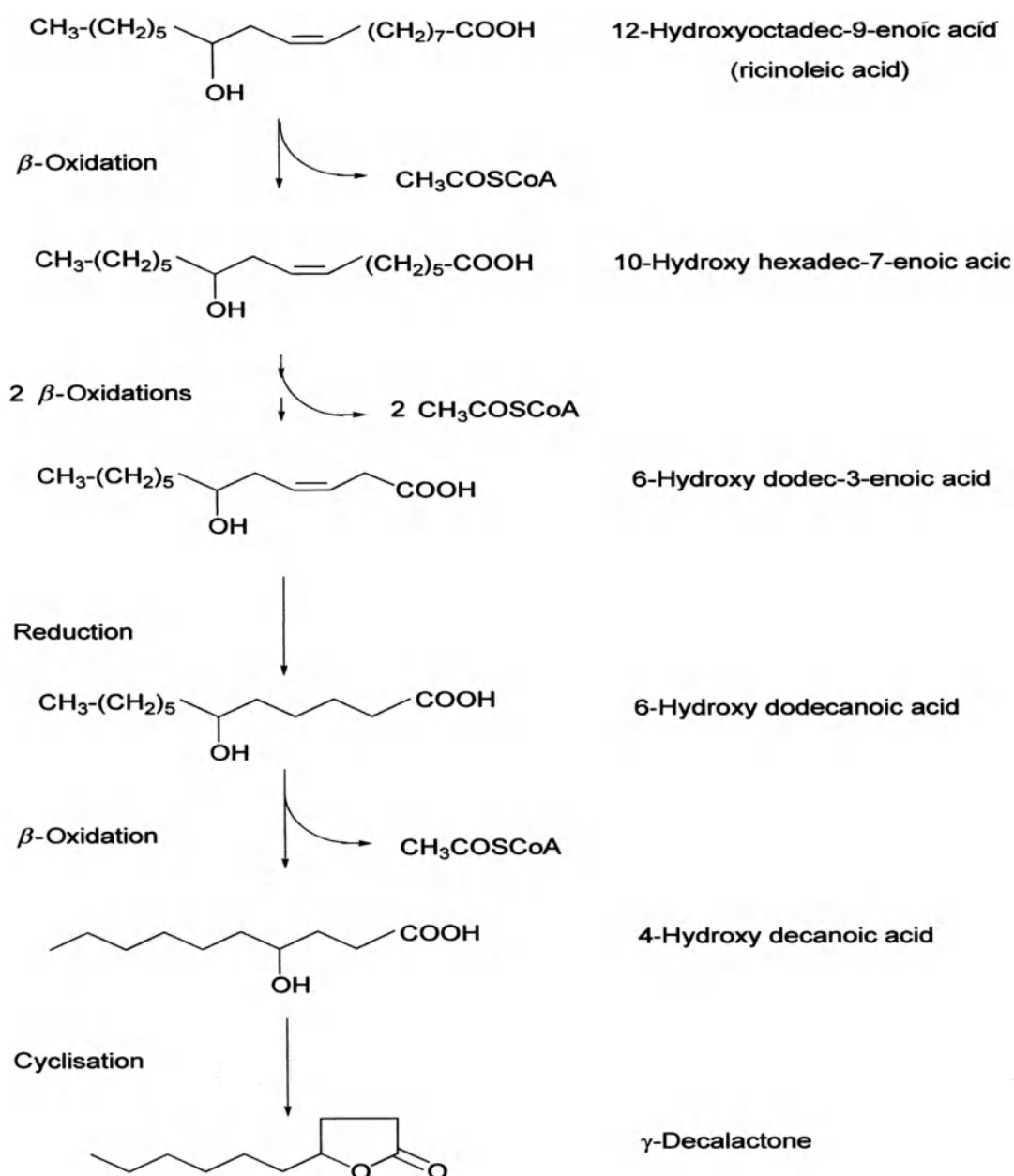


Figure 19: Bioconversion de l'acide ricinoléique en de γ -déalactone(Okui et al. 1963a; Schrader et al. 2004; Alchihab et al. 2010b).

Chez les levures *Y.lipolytica* la voie de dégradation principale des acides gras et de la bioconversion de lactone est La β -oxydation peroxysomale (Braga et Belo 2016). Ce système d'oxydation cyclique d'acides gras consistant en une séquence de quatre étapes : une déshydrogénation, une hydratation, une deuxième déshydrogénation et enfin une rupture de liaison entre les carbones α et β , répétées plusieurs fois, généralement jusqu'à la dégradation du substrat en acyl-CoA. Chaque cycle se termine par la diminution de 2 atomes de carbone en position β de la molécule et la libération d'un acyl-CoA(Alchihab et al. 2010b). Les acyl-CoA oxydases qui catalysent la première étape de la β -oxydation peroxysomale(Nicaud et al. 1998).

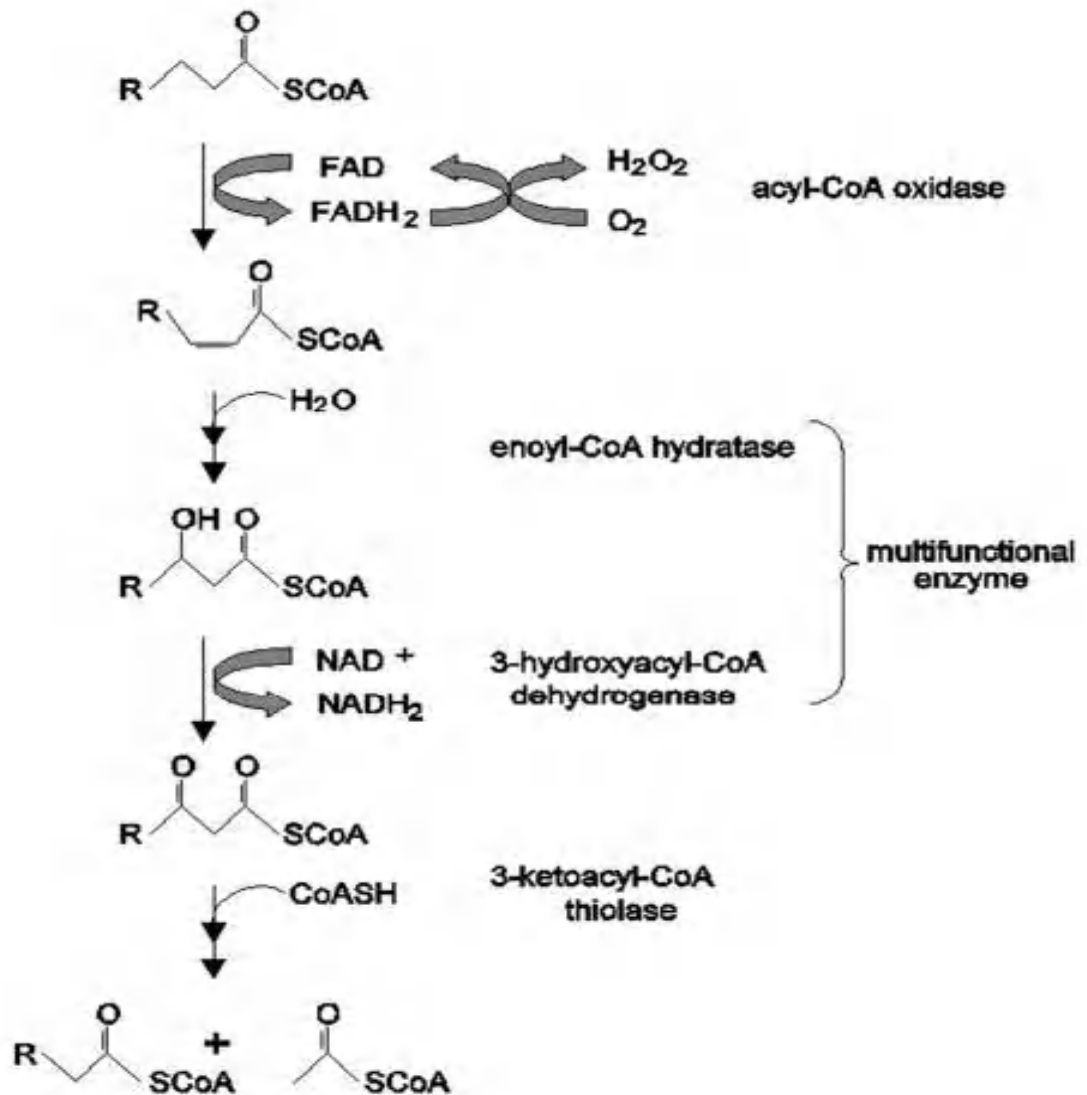


Figure 20: Enzymes impliquées dans la β-oxydation peroxisomal de levure(Waché et al. 1998).

Avant d'entrer dans les peroxysomes, les acides gras sont activés dans le cytoplasme en esters de la coenzyme A, par action d'une acyl-CoA synthetase. La β-oxydation est catalysée dans les peroxysomes de levure par l'acyl-CoA oxydase, puis par deux activités d'une enzyme multifonctionnelle, la 2-énoyl-CoA hydratase et la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, et par la 3-cétoacyl-CoA thiolase (Figure 20)(Waché et al. 1998; García et al. 2007; Soares et al. 2017). Deux carbones de la chaîne carbonée sont raccourcis à chaque cycle de β-oxydation jusqu'à l'obtention d'acétyl-CoA qui va ensuite entrer dans le cycle du glyoxylate ou être exporté vers la mitochondrie pour intégrer le cycle du citrate (Wache et al. 2001a; Groguenin 2004; García et al. 2007).

Yarrowia lipolytica est une levure qui présente un rendement de production élevé en γ -décylactone, en raison de la particularité de posséder un grand nombre de gènes codant pour la production d'enzymes spécialisées dans la dégradation de substrats hydrophobes. Cette espèce a une famille de cinq acyl-CoA oxydases (Aox1p à Aox5p, codées par les gènes *POX1* à *POX5*), l'enzyme qui catalyse la première réaction de β -oxydation (Aguedo et al. 2004; Guo et al. 2011a, 2012; Braga et al. 2015a).

E.2.1.2. Voie de dégradation de γ -décylactone

Certains microorganismes sont capables de former des molécules aromatiques de γ -décylactone par biotransformation de l'acide ricinoléique, sa concentration dans le milieu atteint un maximum puis diminue progressivement, du fait d'une ré-consommation comme source de carbone (Krzyckowska 2012). Cette diminution de la concentration en composé aromatique peut être extrêmement préjudiciable aux rendements du processus et a été observée avec différentes souches de levure, parmi lesquelles : *Candida guilliermondii* (Okui et al. 1963a), *Y. lipolytica* (Krzyckowska 2012). La capacité des levures à ré-consommer la γ -décylactone existe pendant toute la biotransformation et sa concentration dans le milieu est la différence entre ce qui est produit et ce qui est dégradé. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la re-consommation, toutes impliquant la β -oxydation et certaines incluant l'oxydation ou la délactonisation. La voie de β -oxydation n'est pas encore bien comprise. Dans la β -oxydation peroxysomale, utilisée par les levures, des intermédiaires peuvent s'accumuler en fonction du substrat et des concentrations de CoA (Figure 21) (Endrizzi et al. 1993; Wache et al. 2001a; Swizdor et al. 2012). La levure *Yarrowia lipolytica* la disparition concomitante de la γ -décylactone et l'accumulation de 3-hydroxy- γ -décylactone et de décén-4-olides, diminuant les rendements. l'acide 4-hydroxydécanoïque subit une oxydation suivie d'une hydratation, se terminant par l'acide 3,4-dihydroxydécanoïque, qui se lactonise dans la 3-hydroxy- γ -décylactone (composé sans propriétés sensorielles). La déshydratation de ce dernier composé permet la formation de deux décénolides, le dec-2-en-4-olide (composé d'arôme fongique) et le dec-3-en-4-olide (composé d'arôme de fruit)(GATFIELD 1993; Gomes et al. 2010, 2011b; Try et al. 2018). En raison de leurs propriétés aromatisantes, ces deux molécules se présentent comme des composés intéressants à produire et à utiliser dans l'industrie des aromatisants (García et al. 2009).

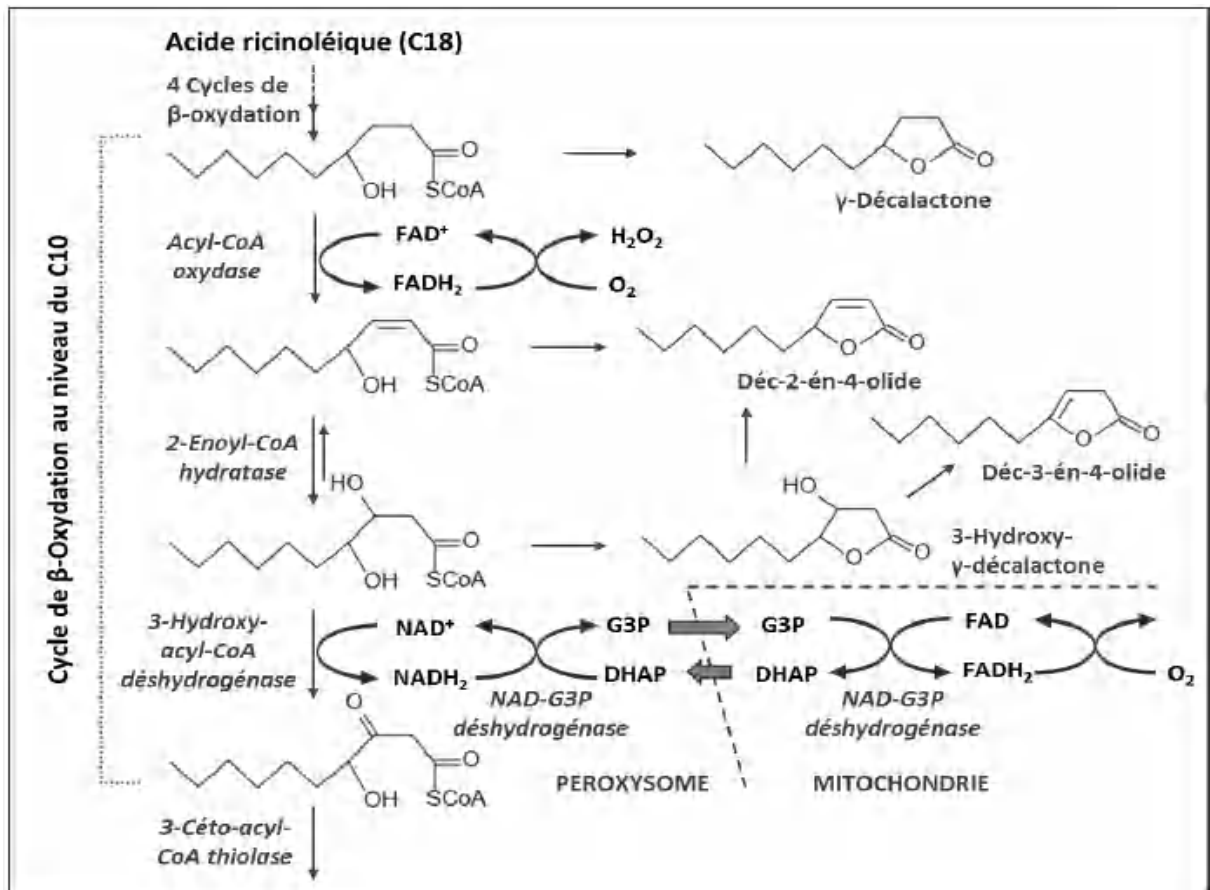


Figure 21: Voie de dégradation par la β -oxydation peroxysomale, de composés en C10 issus de l'acide ricinoléique(Wache et al. 2001b; Gomes et al. 2010; Waché 2013; Try et al. 2018)

Les concentrations de ces composés dans le milieu varient principalement en fonction de l'activité de l'acyl-CoA oxydase et de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Ainsi, lorsque l'une de ces enzymes a une faible activité, elle limitera le flux de la voie de la β -oxydation en la contrôlant. Par conséquent, il se produira une accumulation de composés directement liés à leur activité, à savoir la γ -déalactone, dont l'accumulation est liée à l'activité de l'acyl-CoA oxydase et de la 3-hydroxy- γ décalactone, dont l'accumulation est liée à la activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. La formation de déc-2-énolide peut même résulter de l'action directe de l'énoyl-CoA hydratase (Figure 20). De même, si cette enzyme a une faible activité, elle contrôlera le flux de la voie à ce niveau, devenant ainsi l'enzyme limitante de la voie, ce qui permettra l'accumulation de déc-2-énolide (Wache et al. 2001b; Try et al. 2018).

Lors de la biotransformation des acides gras hydroxylés en lactones, la concentration de γ -déalactone atteint sa valeur maximale puis diminue progressivement car ce composé est dégradé par les levures. La dégradation de lactones peut dépendre de différents facteurs comme

l'aération, l'agitation, le pH, le transfert d'oxygène dans le milieu, et l'activité enzymatique du microorganisme (Wache et al. 2001a; Aguedo et al. 2005; Escamilla-García 2008; García et al. 2009).

E.2.1.3. Huile de ricin

L'huile de ricin est une huile naturelle dérivée des graines de *Ricinus communis* L. La teneur en huile des graines de ricin varie de 35 à 55%, le triacylglycérol de l'acide ricinoléique (Figure 22) étant le constituant principal, environ 90% du total des acides gras de la fraction lipidique de l'huile (Rocha *et al.*, 2008, Gomes et al. 2010; Braga and Belo 2016; Soares et al. 2017a).

Les autres acides gras présents sont les acides linoléique (4,2%), oléique (3,0%), stéarique (1%), l'acide palmitique (1%) et d'autres (Cangemi et al. 2008).

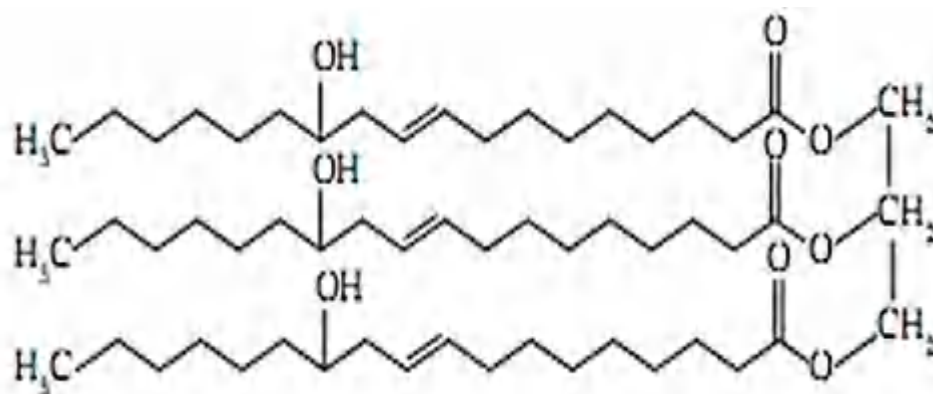


Figure 22: Molécule de triacylglycérol d'acide ricinoléique (Azevedo *et al.*, 2009).

L'acide ricinoléique est un acide gras inhabituel, qui présente une structure de 18 atomes de carbone, une insaturation en carbone 9 et un hydroxyle en carbone 12. Contrairement à la plupart des huiles végétales, trois sites peuvent être modifiés : hydroxyle, l'insaturation et le groupe carboxyle. De par sa composition et sa structure privilégiée, l'huile de ricin est la meilleure huile à usage industriel. L'huile de ricin a des caractéristiques particulières telles qu'une viscosité élevée, ainsi qu'un sérum liquide stable, non toxique et qui ne sèche pas. Il présente une coloration jaune pâle ou presque incolore, avec un goût et une odeur caractéristiques, faibles et doux (Ogunniyi 2006; Mutlu et Meier 2010).

L'acide ricinoléique est le précurseur utilisé dans la production de γ -décalactone. Dans certains cas, des hydrolysats d'huile de ricin, d'acides gras ou d'esters de ces composés (Schrader

et al. 2004; Braga et Belo 2016), comme le ricinoléate de méthyle (MR), sont utilisés comme substrats (Endrizzi et al. 1993; Alchihab et al. 2009, 2010a; Gomes et al. 2010; Braga et Belo 2016; Soares et al. 2017). Dans ce travail, l'huile de ricin a été utilisée comme substrat du processus pour la production de γ -décalactone.

E.2.2. Chiralité des lactones

Pour tous les procédés mentionnés ci-dessus, les lactones peuvent être obtenues sous une forme racémique ou enrichie en énantiomère, en fonction des matériaux de départ et du microorganisme / enzyme utilisé dans la transformation, la chiralité des molécules volatiles peut induire des différences au niveau de la perception olfactive (Dufossé *et al.*, 1994).

Les γ -lactones à 5 atomes de carbone et plus, et les δ -lactones à 6 atomes de carbone et plus possèdent au moins un carbone asymétrique. Par conséquent, elles peuvent exister sous les deux formes énantiomériques R et S (Dufossé *et al.*, 1994). Les propriétés des deux formes énantiomériques peuvent être très différentes selon la lactone.

Mossandel et Günter, (1989) ont étudié cet effet avec des synthèses d'énantiomères purs des γ -lactones et des δ -lactones, a été réalisée afin d'étudier leurs propriétés sensorielles. Les formes R sont décrites comme ayant des odeurs plus intenses que celles de leurs homologues S. Quant à la qualité de l'odeur, il n'y a pas de différences importantes, bien que certains descripteurs soient utilisés pour un seul énantiomère. Il faut savoir que la forme R de la γ -décalactone est prédominante dans la nature, ce qui permet d'ailleurs de différencier différentes sources du composé (Alchihab et al. 2009, 2010b; Try et al. 2018)

E.2.3. Toxicité des lactones

La plupart des lactones naturelles ont une activité biologique, antimicrobienne, antifongique ou anti-inflammatoire. Les propriétés antimicrobiennes de quelques lactones ont été rapportées, par exemple, la 2-décéno- δ -lactone à une concentration de 100 mg/L inhibe la croissance de bactéries (Alchihab et al. 2010b, a)

Selon Endrizzi et al. (1993, 1994) en milieu solide contenant du glucose comme source de carbone, montré que inhibe la croissance dans plusieurs espèces de levures incapables de produire ce composé. Ce même phénomène a été également rapporté par (Feron et al. 1996a).

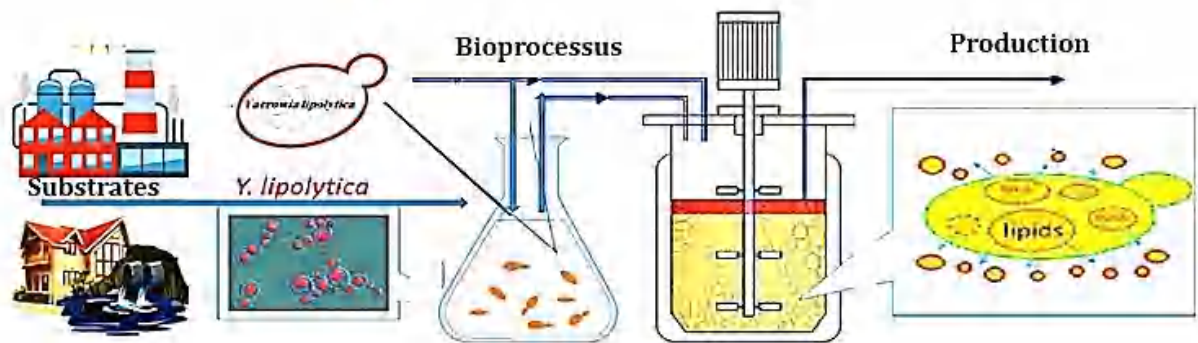
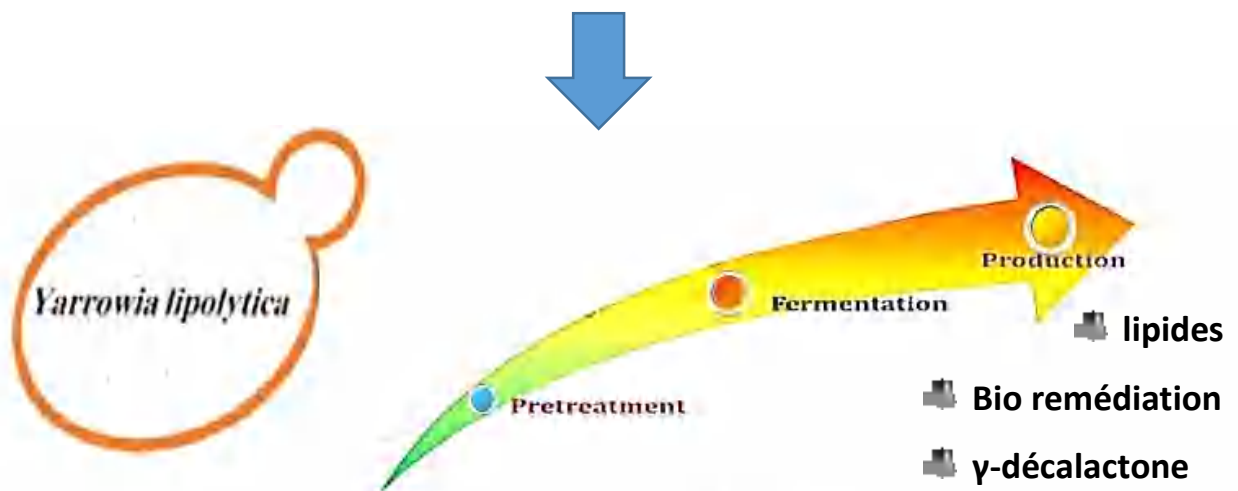
Aguedo et al. (2002), ont étudié l'effet de 4 lactones (γ -butyrolactone, γ -décalactone, δ -décalactone et γ -dodécalactone) sur la croissance de *Y. lipolytica* ; la γ -dodécalactone s'est avérée la plus inhibitrice, devant la γ -décalactone, la δ -décalactone tandis que la γ -

butyrolactone ne montre aucun effet sur sa croissance. La longueur de la chaîne latérale est probablement impliquée dans l'inhibition de la croissance de *Y. lipolytica*.

Aguedo et al. (2003) ont également montré que la γ -décalactone interagit fortement avec des phospholipides membranaires modèles, qu'elle conduit chez *Y. lipolytica* à une augmentation de la fluidité des membranes et à une diminution de l'activité H⁺-ATPase, enzyme membranaire essentielle au maintien de la viabilité cellulaire.

OBJECTIF DE RECHERCHE

Objectif de recherche



La cultures microbiennes en fioles en bioréacteur

MATERIELS ET METHODES

Matériel et Méthodes

En raison des propriétés spécifiques de *Y. lipolytica*, telles que l'utilisation très efficace des substrats hydrophobes et sa capacité élevée de sécrétion de métabolites et de protéines, plusieurs projets impliquant cette levure ont rapidement été développés, principalement des procédés de bioconversion pour les industries alimentaires et chimiques. Dans notre étude nous nous sommes particulièrement intéressés la faculté qu'a la levure *Y.lipolytica* à incorporer et/ou à accumuler les lipides et aussi production d'arôme de type gamma décalactone.

Les différentes analyses ont été réalisées au niveau des : laboratoires du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.B.T) ; Laboratoires pédagogiques et laboratoire de recherche Biotechnologie et qualité des Aliments (BioQuAl) de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A/Université Frères Mentouri-Constantine 1), Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST/ Université des frères Mentouri-Constantine 1) et au niveau du Centre de Recherche Scientifique et d'Analyses Physico-Chimiques(CRAPC- Algeria).

A. Matériel et Milieux de cultures

A.1. Matériel biologique

A.1.1. Souche microbienne

La souche utilisée est est *Yarrowia lipolytica* JMY775, il s'agit d'une souche surproductrice de lipase (LgX64.81), obtenue par manipulation génétique et modification du gène rapporteur LIP2 - LacZ (Kar *et al.*, 2008 ; Bouchedja *et al.*, 2018).

A.1.2. Réactifs

Le chloroforme, le méthanol, l'acétone, l'extrait de levure, le glucose, le peptone de caséine et le Nile red(19123-10MG : *BioReagent, suitable for fluorescence, ≥98.0% (HPLC)* Sigma-Aldrich, Inc., États-Unis) ont été fournis par l'INATAA./Universitaire Constantine1. BF3 a été obtenu auprès du laboratoire LOST/Universitaire Constantine 01. Le NoirSoudan B a été obtenu auprès du laboratoire de Mycologie d'Enzymologie et de l'Activité microbienne/Universitaire Constantine 01. L'huile de ricin provient des commerces (Société Castor Oil EL CAPTAIN pour l'extraction des huiles naturelles).

A.1.3. Déchets alimentaires et agro-industriels

Les huiles usées (WCO : waste cooking oil) ont été collectées au Restaurant de la Résidence Universitaire Zouaghi Sliman 01, à Constantine, Algérie. Elles sont constituées d'huiles usagées issues de la friture des aliments, lors de la préparation des repas quotidiens proposés au restaurant de la résidence universitaire.

La margine (OMW : olive mill wastewaters) a été obtenue à partir d'un moulin d'huile d'olive à Béjaia (Algérie).

Les échantillons de déchets lipidiques ont été collectés dans des bouteilles hermétiques et congelés à - 20 °C jusqu'à leur utilisation. Avant chaque test expérimental, les particules solides des échantillons (OMW) ont été éliminées par centrifugation à 10.000 rpm, 20°C pendant 30 min. Le pH du OMW était de 4,74. Quand aux échantillons de l'OMD, ils étaient purifiés par filtration pour éliminer les impuretés solides (résidus alimentaires) à travers le papier Whatman no. 4. Le pH des l'huiles OMD utilisées était de 4,24. Les échantillons (OMW-WCO) ont été conservés à une température de 4 °C jusqu'à une utilisation ultérieure au cours des expériences.

A.2. Milieux de cultures

A.2.1. Milieu de conservation

La souche étudiée a été conservée dans des cryotube à -20 °C sur milieu YPD après l'ajout de 30 % (v.v⁻¹) glycérol pur stérile. La congélation à -20°C permet la préservation d'une fraction riche en cellules viables pendant 1 à 2 ans (Larpen, 1997). Elle devait donc subir une réactivation au préalable avant d'être mise en culture (Bouchedja et al. 2017).

Tableau 5. Composition du milieu YPD, plus 30 % glycérol pur stérile.

Composants	Concentration finale (g/L)
Extrait de levure	5
Peptone de caséine	10
Glucose	15

YPD : Yeast extract – Peptone-Dextrose (Glucose) plus 30 % glycérol pur stérile.

A.2.2. Milieu d'activation de la souche

Tableau 6. Composition du milieu solide YPDA, de réveil de la souche.

Composants	Concentration finale (g/L)
Extrait de levure	5
Peptone de caséine	20
Glucose	15
Agar agar	18

YPDA : Yeast extract – Peptone-Dextrose-Agar agar.

A.2.3. Milieu de pré-culture

Tableau 7. Composition du milieu YPD (Pré-cultures).

Composants	Concentration finale (g/L)
Extrait de levure	5
Peptone de caséine	10
Glucose	15

YPD : Yeast extract – Peptone-Dextrose (Glucose).

A.2.4. Milieu d'accumulation des lipides intracellulaires

Tableau 8. Composition des milieux de cultures l'accumulation des lipides intracellulaires

Composants	YPDOA	YPDO MW	YPDWCO	YPDAL A
Extrait de levure (g/L)	5	5	5	5
Peptone de caséine (g/l)	5	5	5	5
Glucose (g/L)	10	10	10	10
Tween 80 (g/l)	0.8 - 1	0.8 - 1	0.8 – 1.0	0.8 – 1.0
Acide oléique (ml)	20	-	-	-
Margine (ml) (OMW)	-	20	-	-
Huil usée (ml) (WCO)	-	-	20	-
Acide Linoléique	-	-	-	20

YPDOA : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Oleic Acid.

YPDO MW : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Olive Mill Wastewater

YPDWCO: Yeast extract – Peptone-Dextrose- Waste Cooking Oil.

YPDLA : Yeast extract – Peptone-Dextrose- Linoleic Acid.

A.2.5. Milieux production de γ -décalactone

Tableau 9. Composition du milieu PCO pour production de γ -décalactone

Composants	Concentration finale (g /L)
Peptone	20
Huile de ricin	10
Tween 80	0.8 – 1.0

PCO : Peptone – Castro-oil.

A.3. Mise en œuvre des expérimentations

Six types de milieux ont été utilisés, à savoir, deux milieux ne contenant pas de lipides, YPDA et YPD pour l'activation de souche et quatre milieux expérimentaux contenant des lipides dont trois sont pour induire une accumulation lipidique YPDOA, YPOMW, YPDWCO, et le dernier pour la production de γ -décalactone PCO.

Les milieux YPDOMW et YPDWCO, ont également servie à étudier le potentiel que possède la levure *Y.lipolytica* de croître sur un milieu polluant (contenant des déchets lipidiques) en plus de sa capacité à accumuler la lipides à partir de ces déchets. Le milieu YPDOA déjà étudié préalablement (Bouchedja et al., 2017), a servi à induire une accumulation lipidique intracellulaire de type *ex novo*. Le milieu PCO a servi à l'étude de la production d'arôme de type lactone. Après leur préparation les milieux de culture stériliser ses milieux dans un autoclave à 120°C pendant 2 heures.

A.3.1. Activation des souches

Une goutte provenant d'un cryotube de souche est étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu gélosé YPDA (milieu YPD additionné de 18g/l d'agar). La mise en culture est réalisée pendant 48 heures à 30°C. Les colonies isolées peuvent alors être utilisées pour ensemercer les pré-cultures.

A.3.2. Pré-culture

La pré-culture se fait par un ensemencement de la levure dans 50 ml de milieu YPD dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml et incubation à 30°C pendant 24 heures.

A.3.3. Mise en culture

Pour étudier la croissance cellulaire et l'accumulation des lipides intracellulaires par voie *ex novo* chez la levure *Y. lipolytica* nous avons utilisé cinq milieux de culture différents. Les milieux de culture ont été préparés avec des composants spécifiques pour chaque milieu dans des proportions prédéfinies dont la composition est citée ci-dessous dans les tableaux 8 et 9.

A.3.3.1. Culture en fiole

La culture a été réalisée dans des erlenmeyers de 500 ml et 1000ml contenant 200 ml, 400 ml respectivement de milieu de culture. Pour la culture cellulaire, une quantité de 2-5 ml prélevé de la pré-culture secoués sont inoculée dans 200 ml et de 400 ml de milieux de culture contenus dans des fioles d'Erlenmeyer de 400 ml, 1000 ml respectivement. La culture cellulaire s'étalait sur une durée de 72 heures à 30°C pour les milieux YPDOA, YPDLA, YPDOMW et YPDWCO, 5 jours pour le milieu PCO et sous agitation verticale de 150rpm. Dans cette étude, plusieurs cultures en même condition de fermentation ont été réalisées, afin d'effectuer des analyses à différents temps (6h, 24h, 48h, 72h, 120h). De plus, le processus de biotransformation a été réalisé en cinq exemplaires différents pour tester l'effet de la concentration en huile de ricin : cette série vise à évaluer l'effet de la concentration en huile de ricin sur la croissance cellulaire sachant que la cinétique de croissance est associée à la production de gamma-décalactone. Pour vérifier l'effet de la concentration d'huile de ricin, une analyse de croissance des cellules de levure a été réalisée en utilisant la même source de carbone et cinq tailles différentes (1, 25, 6, 10 et 30 %), dans les mêmes conditions que la pré-milieu de culture. La fermentation a été réalisée en fermentations (en une seule fois) dans 1000 ml contenant 400 ml en neuf jours.

A.3.3.2. Bioréacteur autoclavable

La culture a été réalisée dans un bioréacteur autoclavable de 5L (Dasgip, 4 Unit Technology) et/ou 20 L «industriel, APPLIKON BIOTECHNOLOGY», remplis (4 et 9L respectivement) de milieux de culture (YPDOA, YPDOMW et YPDWCO, PCO),ensemencé de 0.2×10^8 cellules. Les fermentations ont été initiées avec 50-100 ml de pré-culture après 24h, c'est-à-dire d'une pré-culture préparée comme décrit ci-dessus. L'agitation est faite par l'action de trois turbines équi-réparties sur leur axe.



Figure 23. Modèle d'un bioréacteur autoclavable de 1-20 L « APPLICON ».

- **Instrumentation**

Le bioréacteur est équipé d'une sonde température, d'une sonde à oxygène dissous, d'une sonde pH, d'un capteur de pression et d'une sonde de niveau de mousse. La sonde à oxygène dissous permet de mesurer la concentration en oxygène dissous du moût de fermentation et indique ainsi la nécessité de l'ajustement manuel des conditions d'agitation et d'aération de manière à maintenir la teneur en oxygène dissous au-dessus de 20% de la valeur saturante. Pour permettre un échantillonnage régulier du milieu à 24 heures et 48 heures, un collecteur de fraction est installé sur une boucle de dérivation comprenant un module de filtration tangentielle (0,2 μ) à l'intérieur duquel le moût circule grâce à une pompe péristaltique.

- **Actionneurs**

La fermentation est réalisée à température constante. Ainsi, la régulation de la température est assurée par l'intermédiaire d'un échangeur de chaleur. Ce dispositif rend possible la régulation de température même aux fortes exo-thermicités propres aux cultures à hautes densités cellulaire. La régulation du pH se fait via deux pompes péristaltiques situées sur le module de régulation apportant respectivement une solution basique (NaOH) et une solution acide (HCL).

Une troisième pompe péristaltique permet l'adjonction séquentielle d'un anti- mousse suivant une détection par la sonde anti-mousse dont la position est ajustée manuellement en fonction de l'évolution du volume du moût de fermentation.

- **Conditions opératoires**

Les différents paramètres contrôlés au cours de fermentation citée selon Bouchedja *et al.* (2017)(des milieux d' l'accumulation des lipides intracellulaires) et Moradi *et al.* (2013) (pour milieu production de γ -décylactone). Quel que soit le type de bioreacteur et le temps de la fermentation. Les conditions de fonctionnement de la fermentation ont été à $28 \pm 0,2$ °C et 300 rpm/5pv ; l'OD a été fixé au-dessus de 30% de la saturation de l'air, et le pH a été ajusté à $6 \pm 0,05$ selon les études précédentes (Lee *et al.*, 1995 ; Aguedo *et al.*, 2004 ; Wache *et al.*, 2002 ; Wache *et al.*, 2003 ; Moradi *et al.*, 2013 ; Bouchedja *et al.*, 2017; Małajowicz *et al.*, 2020) comme un pH optimal pour l'accumulation intracellulaire de lipides et la production de γ -DL.

B. Méthodes analytiques

Lors du suivi des cultures, des prélèvements de la phase liquide sont régulièrement réalisés afin de vérifier cinétique des cultures ainsi que l'état morphologique des levures (accumulation de gouttelettes lipidiques intracellulaires). Une partie de chaque prélèvement est utilisée pour mesurer la croissance cellulaire et le pH ainsi que l'accumulation de lipides.

B.1. Etude de la croissance cellulaire

La croissance cellulaire était évaluée à partir de comptage sur cellule de Malassez l'échantillon doit être suffisamment dilué de sorte à ce que le nombre par champ ne doit pas dépasser les 200 cellules. De même qu'il faut s'assurer de l'homogénéité sur l'ensemble des grilles en dénombrement. Il faut amener dans le champ microscopique un rectangle composé de 20 carrés et compter les cellules qui s'y trouvent, opérer ainsi pour 5 rectangles déposés en diagonale dans la cellule de Malassez, et prendre la moyenne des résultats. L'un des deux axes diagonaux est mis en évidence. Les résultats sont calculés comme suit :

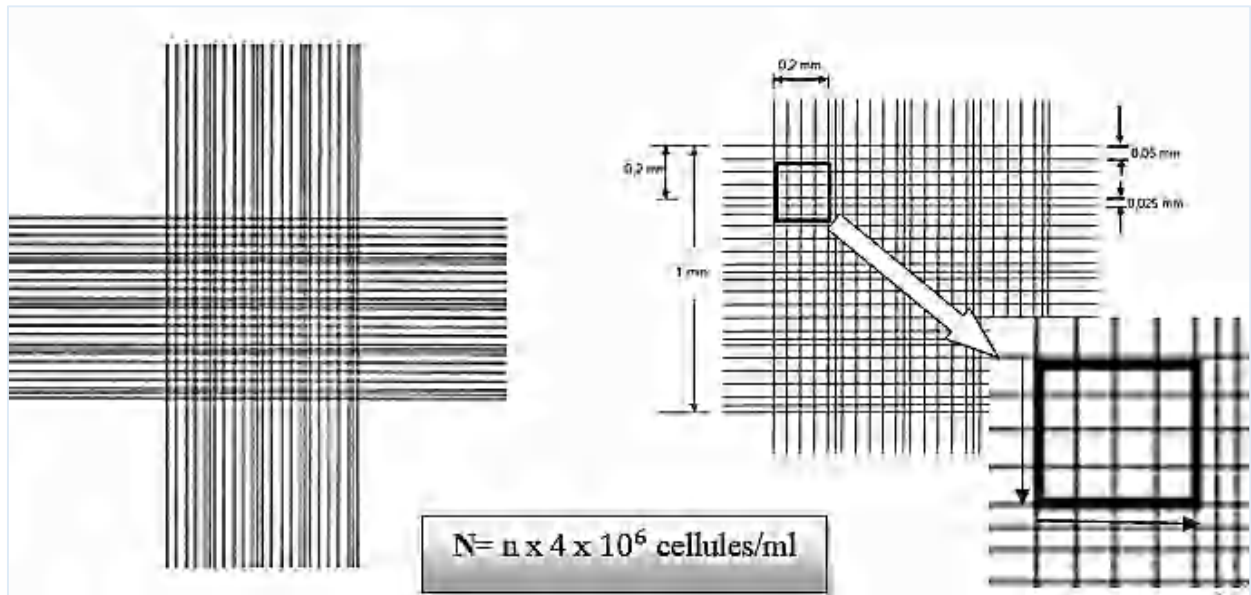


Figure 24: Cellule de Thoma et la formule suivante pour calculer la croissance cellulaire sur la cellule.

On applique de cellule à l'intérieur et celle qui touchent les bords en bas et à droite sont comptées ; Tandis que :

N: nombre des cellules /mL

n: nombre de la somme des cellules dans les 5 rectangles déposés en diagonale.

Afin de suivre la croissance cellulaire de *Y.lipolytica* dans des milieux de culture des compositions différents (YPD, YPDOA, YPDLA, YPDOMW, YPDWCO et PCO) nous avons fait une observation microscopique et une mesure de la densité optique. Ainsi que le comptage sur les cellules Toma.

B.1.1. Mesure de la densité optique

L'évolution de la densité cellulaire est suivie par spectrophotomètre. La mesure est effectuée à 600 nm (spectrophotomètre SHIMADZU UV-1800). La suspension cellulaire est préalablement homogénéisée à l'aide d'un vortex et, si nécessaire, diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,5 unités d'absorbance (Beopoulos, 2009).

B.1.2. Analyse morphologique

Afin de confirmer que l'orientation de la forme de la cellule de la levure *Y.lipolytica* lorsqu'elle est cultivée dans différents médias (en particulier quand elle est cultivée dans des

milieux hydrophobes), des observations microscopiques ont été effectuées. Où cette levure peut se présenter sous plusieurs formes selon plusieurs facteurs, dont le milieu de culture utilisé.

L'observation de la forme de la cellule est exposée par microscopie optique. on prélève quelques gouttes des cultures de levure en croissance après 48h d'incubation dans les différents milieux de culture (YPD, YPDOA, YPDLA, YPDOMW, YPDWCO et PCO) et les observées sous microscope. Le microscope utilisé est un microscope Binoculaire MOTIC (Elite B1-220 E-SP), avec grossissement ($\times 100$) à immersion d'huile.

B.1.3. Essais de décoloration de la margine

Eaux usées des huileries à huile d'olive a été collectée dans une usine domestique après une coulée normale à température ambiante et dans des conditions aérobies, centrifugée à 27 000 g pendant 10 min pour se débarrasser des solides et stockée à 20 ° C. Dans ce travail, la biomasse a été utilisée pour l'analyse des lipides, les surnageants obtenus après centrifugation ont été utilisés pour déterminer le pourcentage de décoloration noire des eaux usées des huileries à huile d'olive a été suivi en mesurant l'analyse spectrale. L'absorbance du surnageant retiré à différents intervalles de temps a été mesurée à la longueur d'onde d'absorption maximale pour l'effluent ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$) en utilisant un spectrophotomètre (Ayed et al, 2019). Le pourcentage de décoloration a été calculé selon l'équation (Hamimed et al. 2020).

$$\text{Décoloration (\%)} = (Ab_{si} - Ab_{sf}) / Ab_{si} \times 100.$$

Ab_{si} fait référence à l'absorbance initiale (avant incubation) et Ab_{sf} fait référence à l'absorbance finale (après incubation pendant 24, 48, 72h).

B.2. Etude de l'accumulation lipidique intracellulaire

Afin de confirmer que la levure *Y. lipolytica* a la capacité d'accumuler des quantités importantes de graisses intracellulaires, quand elle est cultivée dans des milieux soit hydrophobes ou hydrophiles (YPD, YPDOA, YPDLA, YPDOMW, YPDWCO), l'analyse microscopique est effectuée à l'aide des deux Microscopie optique et Microscopie à fluorescence avec coloration de cellules au Noir soudan et au rouge Nil, respectivement; et détermination de la biomasse

B.2.1. Observation de l'accumulation lipidique intracellulaire

L'observation de l'accumulation lipidique intracellulaire est exposée par microscopie optique avec au Noir soudan et par microscopie fluorescence au rouge Nil, au colorant Noir soudan. Pour la microscopie optique, on prélève quelques gouttes des cultures de levure en

croissance après 48h d'incubation dans les différents milieux de culture (YPD, YPDOA, YPDOMW, YPDWCO et YPDLA) et les observées sous microscope. Le microscope utilisé est un microscope Binoculaire MOTIC (Elite B1-220 E-SP), avec grossissement ($\times 100$) à immersion d'huile.

C.2.1.1. Coloration de cellules au Noir soudan / Microscopie optique

Le Noir de Soudan est un colorant très employé en microscopie optique à contraste de phase. Il permet de mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des microorganismes (<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752507/document>). Après avoir préparé les frottis, les lames ont été séchées à une température ambiante, puis quelques gouttes du colorant noir de soudan B ont été déposées pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de xylène pendant 10 secondes ce qui mène à une décoloration complète. La contre coloration est effectuée à la solution en fuchsine pendant 15 secondes. Les lames enfin ont subies un lavage à l'eau courante puis égouttées sur papier absorbant. Les cellules colorées sont observées à l'objectif $\times 100$ (Ravikumar et al. 2012). Les lames sont observées en microscopie optique en contraste de phase avec de l'huile à immersion au grandissement $\gamma : 100X$.

B.2.1.2. Coloration de cellules au rouge Nil / Microscopie à fluorescence

Concernant la microscopie à fluorescence, avec la coloration des cellules par le rouge Nil nous avons suivi la méthode décrite par (Beopoulos *et al.*, 2008 ; Bouchedja *et al.*, 2017) qui consiste à rajouter 100 μ l d'une solution de rouge Nil dilué dans de l'acétone à 1mg/ml pour 1 ml de culture de cellules et incubée 30 min à la température ambiante à l'obscurité. La suspension cellulaire est ensuite lavée trois fois avec une solution éthanol/ eau distillé et ré-suspendu en tampon sodium phosphate (pH 6,8 ; DO= 2,5 unités à A 600 nm). Les cellules sont alors observées sous le microscope équipé d'un émetteur de fluorescence (LEICA) avec un objectif ($\times 100$) et lentille bleu sous immersion.

B.2.2. Détermination de la biomasse

Pendant la période de fermentation, 100 ml ont été prélevés toutes les 24 heures (dans les phases de croissance exponentielle moyenne, exponentielle tardive et stationnaire) du bioréacteur contenant un volume de travail de 4 L et les cellules ont été récoltées par centrifugation (10000 \times g/20 min à T=10 °C ; centrifugation réalisée dans un SIGMA Laborzentrifugen D-37520 Osterode am Haarz, Allemagne) pour suivre la cinétique de la

biomasse. la teneur en biomasse (g L^{-1}) a été récupérée, puis lavée avec de l'eau distillée froide et avec de l'hexane et du méthanol ou de l'éthanol également pour éliminer la forme lipidique extracellulaire à la surface des cellules, en appliquant à chaque fois une centrifugation (8500 rpm pendant 20 min à $T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$) comme décrit précédemment (Katre et al. 2017; Tzirita et al. 2018b). Enfin, elle a été estimée par gravimétrie en tant que poids sec cellulaire (PSC) après incubation pendant une nuit à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Parallèlement au calcul du taux de croissance des cellules par la cellule de Thomas, la biomasse sèche a été calculée et exprimée (X , g/L). Comme chaque mesure est rapportée comme une moyenne de trois mesures indépendantes.

B.3. Dosage des lipides

Le dosage des lipides accumulés est effectué selon la méthode développée au sein de l'équipe FAME par Julien Cescut (Cescut 2009). L'analyse des lipides intracellulaires nécessite les étapes de préparation de l'échantillon, extraction, purification (évaporation) et analyse. Il est à noter que du fait de l'utilisation de solvant organique, tous les contenants utilisés sont résistants aux solvants et leur manipulation se fait sous une hotte chimique. Par ailleurs toute la verrerie utilisée pour l'extraction de lipides est préalablement rincée à l'acide nitrique à 10%, pour laver d'éventuels lipides contaminants.

B.3.1. Préparation des échantillons

Pour la préparation des échantillons, la suspension cellulaire est centrifugée 10 min à 8500 tr/min. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée 3 fois, puis on fait une 2^{ème} centrifugation pendant 5 min. Les culots sont congelés à -20°C puis subissent une lyophilisation pendant une nuit à -40°C et sous vide. La biomasse sèche peut alors être pesée et caractérisée. Cette préparation a pour avantage de travailler directement sur la biomasse sèche, assurant un accès des solvants aux cellules plus facile. Les lyophilisats peuvent être conservés plusieurs jours. Cette masse est utilisée pour l'extraction.

B.3.2. Extraction

Extraction par Soxhlet : le Soxhlet est une méthode de laboratoire souvent utilisée pour extraire des huiles, l'appareillage se compose selon la figure 25. L'extraction s'effectue par un entraînement des composés à extraire par un solvant liquide. Le solvant d'extraction est porté à ébullition 40°C . Les vapeurs de solvant traversant le Soxhlet sont condensées au niveau du réfrigérant et s'écoulent au travers de l'échantillon dans la cartouche. Ce système de distillation-condensation assure au solvant une circulation en continu dans l'échantillon. Un siphon permet

au solvant de s'écouler de la cartouche pour retourner dans le ballon. Le solvant peut donc recommencer un nouveau cycle d'évaporation/condensation. De nombreux cycles d'extraction peuvent ainsi se succéder. Son principal avantage est que l'échantillon est continuellement extrait avec du solvant renouvelé. Ses inconvénients sont un temps d'extraction 2 heures, la masse d'échantillon introduite 1g un volume de solvant important 100 ml. Différents solvants ou mélanges de solvants sont utilisés, la meilleure combinaison choisie étant le mélange iso-volumique chloroforme/méthanol 2/1 (v/v).

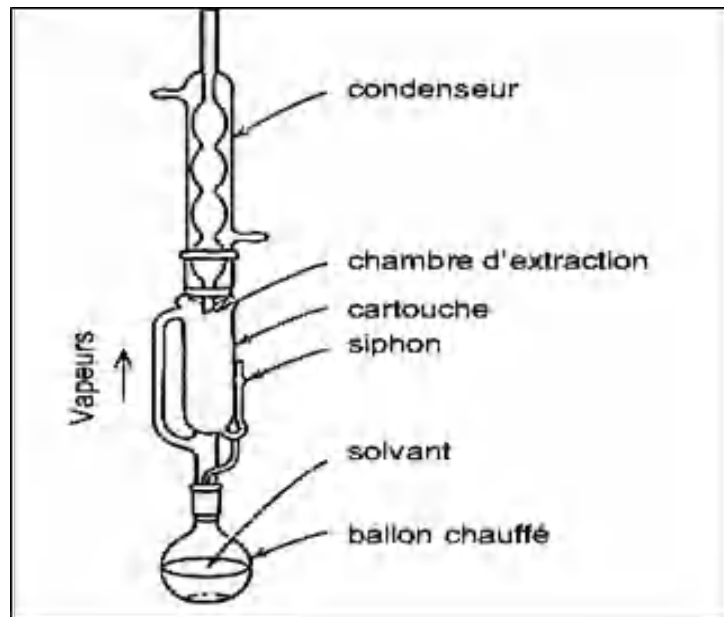


Figure 25: Schéma d'un montage Soxhlet (Cescut., 2009).

B.3.3.Purification (évaporation)

Afin de pouvoir procéder à quantification massique des extraits lipidiques, les solvants sont éliminés par évaporation de la phase organique par évaporation sous vide. L'appareillage utilisé est un Rotavapor constitué d'une pompe à vide, du montage (Rotavapor) et d'un bain-marie. Le principe de la séparation repose sur l'écart entre les températures d'ébullition du solvant et de l'extrait lipidique. Le ballon rodé contenant l'extrait est fixé à l'axe du Rotavapor et porté à 50°C dans le bain-marie pendant 1 heure. Enfin, le poids des lipides extraits a été mesuré à l'aide d'une balance analytique (Shimadzu AY220).

B.4. Analyse des lipides extraits

B.4.1. Gravimétrie

La teneur en lipide est calculée par différence de masse entre le ballon de rotavapor vide et le ballon de rotavapor avec l'extrait lipidique pur. Cette masse est rapportée à la masse de lyophilisat utilisé pour l'extraction. Nous avons exprimé le rendement lipidique en concentration (g / L de milieu), la teneur en lipides en pourcentage du poids lipidique par rapport au poids de la biomasse sèche (% w / w) et la productivité en g lipide / (g biomasse × h). Les mesures doivent être le plus précises possible : à 0,2 mg.

B.4.2. Chromatographie en couche mince (C.C.M.)

La matière grasse, qu'il s'agisse des lipides extra- ou intracellulaires, peut être analysée par la chromatographie en couche mince. Concernant les lipides intracellulaires, à part l'analyse totale des acides gras (qui nous montre le profil général des acides gras des lipides) il est intéressant de connaître de différencier les classes lipidiques qui les contiennent (triglycérides, acides gras libres...). Pour cela, une analyse des lipides s'effectue par la chromatographie en couche mince, une microquantité des lipides (quelques mg) dissoute dans le réactif Folch est déposée sur une plaque d'aluminium en gel de silice 60G. Le mélange des solvants utilisé pour la migration de la matière grasse, est de l'éther du pétrole (70), de l'éther diéthylique (30) et de l'acide acétique (1/1) (v/v). La visualisation des fractions lipidiques est réalisée après pulvérisation avec le réactif d'acétate de cuivre (acétate de cuivre/acide phosphorique 1/1 v/v) suivi d'un séchage de la plaque (180°C-10 min). Alternativement, les plaques peuvent être visualisées sous ultra- violet (UV). Un produit pur acide oléique est la référence pour les différentes classes lipidiques des lipides intracellulaires.

B.4.3. Caractérisation des acides gras totaux

Afin d'analyser la composition en acides gras présents dans l'huile, il est nécessaire de réaliser une transestérification.

B.4.3.1. Transestérification en esters méthyliques d'acides gras

La composition en lipides de la biomasse est déterminée et quantifiée par chromatographie en phase gazeuse. Les lipides extraits doivent être préalablement estérifiés. Pour cela, un protocole adapté de (Beligon, 2016) a été utilisé. La transestérification s'effectue en présence de MeOH/BF₃ 14% (Méthanol/Boron trifluoride, FLUKA/CAS 373-57-9). 100 µL d'échantillon sont ajoutés à 800 µL de MeOH/BF₃ et incubés pendant 15 minutes dans un bain-

marie à 100°C. Après refroidissement à température ambiante, 1,5 mL d'eau distillée et 750 µL d'hexane sont ajoutés. Après homogénéisation au vortex pendant 2 minutes et décantation, la phase organique est récupérée dans un Vial afin d'être injectée en GC.

B.4.3.2. Conditions opératoires de la caractérisation des acides gras par GC-MS

L'analyse des méthyles esters des acides gras est employée sur une chromatographie en phase gazeuse (Agilent, HP 5890 série II) munie d'une colonne capillaire SOB-S (0,25 cm x 30 m x 0,25 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est l'azote. L'injecteur et le détecteur sont tous deux définis à 260°C. Le split ratio est de 1:20 (v/v). Les paramètres de la méthode sont : une température initiale de 140°C pendant 5 minutes puis une augmentation de température de 4°C/min jusqu'à 240°C et maintien de cette température jusqu'à la fin de cette méthode qui dure 35 minutes. Les acides gras sont identifiés en comparaison avec des standards des méthyles esters commerciaux (FAME 32, FAME mix C16-C18, FAME C4-C24, Supelco, France ; C16 :1 n-9, Cayman, France) et quantifiés grâce à la méthode d'étalon interne. L'acide gras qui a servi comme étalon interne s'agit de l'acide heptadecanoïc (C17 :0, Sigma), ajouté dans la solution de acides gras, avant transestérification, en concentration 50 µg/ mL.

B.5. Etude de la production d'arôme de type lactone

Pour dire que la levure *Yarrowia lipolytica* cultivé dans l'acide ricinoléique arrivait à produire le γ -décylactone qui donne l'arôme spécifique de la pêche. Afin de vérifier la capacité de la levure de produire cet arôme dans un milieu formulé à base d'acide ricinoléique, des observations microscopiques suivies d'extraction des lactones ont été effectuées.

B.5.1. Extraction de γ -décylactone

L'extraction de la lactone a été réalisée par extraction liquide-liquide en utilisant de l'éther diéthylique au 6^{ème} jour de la mise en culture de *Y. lipolytica* ont été centrifugés à 8500tr/min pendant 10 minute. Les composés d'arômes ont été extraits du surnageant avec 10 ml de surnageant et 6 ml de solvant à température ambiante par une forte agitation pendant 5 min dans un vial de 4 mL (Waché *et al.* 2001). Après 30 min de repos pour séparer les différentes phases, La couche d'éther a été récupéré et déshydratée par Na₂S₀₄ anhydre, puis le solvant a été éliminé par évaporation rotative et peut être injectée directement dans le chromatographe.

B.5.2. Analyse des γ -décalactone extraits

B.5.2.1. Gravimétrie

Production globale de γ -décalactone est calculée par différence de masse entre le ballon de rotavapor vide et le ballon de rotavapor avec l'extrait γ -décalactone pur. Nous avons exprimé le rendement γ -décalactone en concentration (g / L de milieu).

B.5.2.2. Caractérisation γ -décalactone

L'analyse de γ -décalactone est par utiliser une chromatographie en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les analyses ont été réalisées dans les conditions suivantes: température injecteur 200 °C, température détecteur 250°C, température initiale de la colonne 60°C, programmation de la température 60°C à 195°C, dans une plage de 20°C/m puis jusqu'à 270°C, à une vitesse de 10°C/m. Le débit de gaz vecteur dans la colonne était de 1ml/ min, rapport de division de 1:30. Les données ont été analysées à l'aide du programme d'acquisition et d'intégration, classe GC, version 2.5 de SHIMADZU et comparées à la courbe standard précédemment obtenue pour le composé γ -décalactone.

B.6. Montage expérimentale utilise dans cette étude

La figure 26 représente une vue schématique des expériences utilisées dans cette étude. Au début, la levure est activée et les différents substrats carbonés sont inhibés (1a, b et 2). Ensuite la culture se fait dans les flacons d'abord uniformément de la taille du substrat et des conditions de culture (3a). Après cela, les expériences sont transférées à l'aide de bioréacteurs vers les substrats qui ont obtenu un meilleur comportement de la levure et des performances plus efficaces (3b et 4a, b). Après cette étape, les produits accumulés sont extraits(5) conservez-le (6a, b). Enfin, les particules extraites sont identifiées (7a, b).

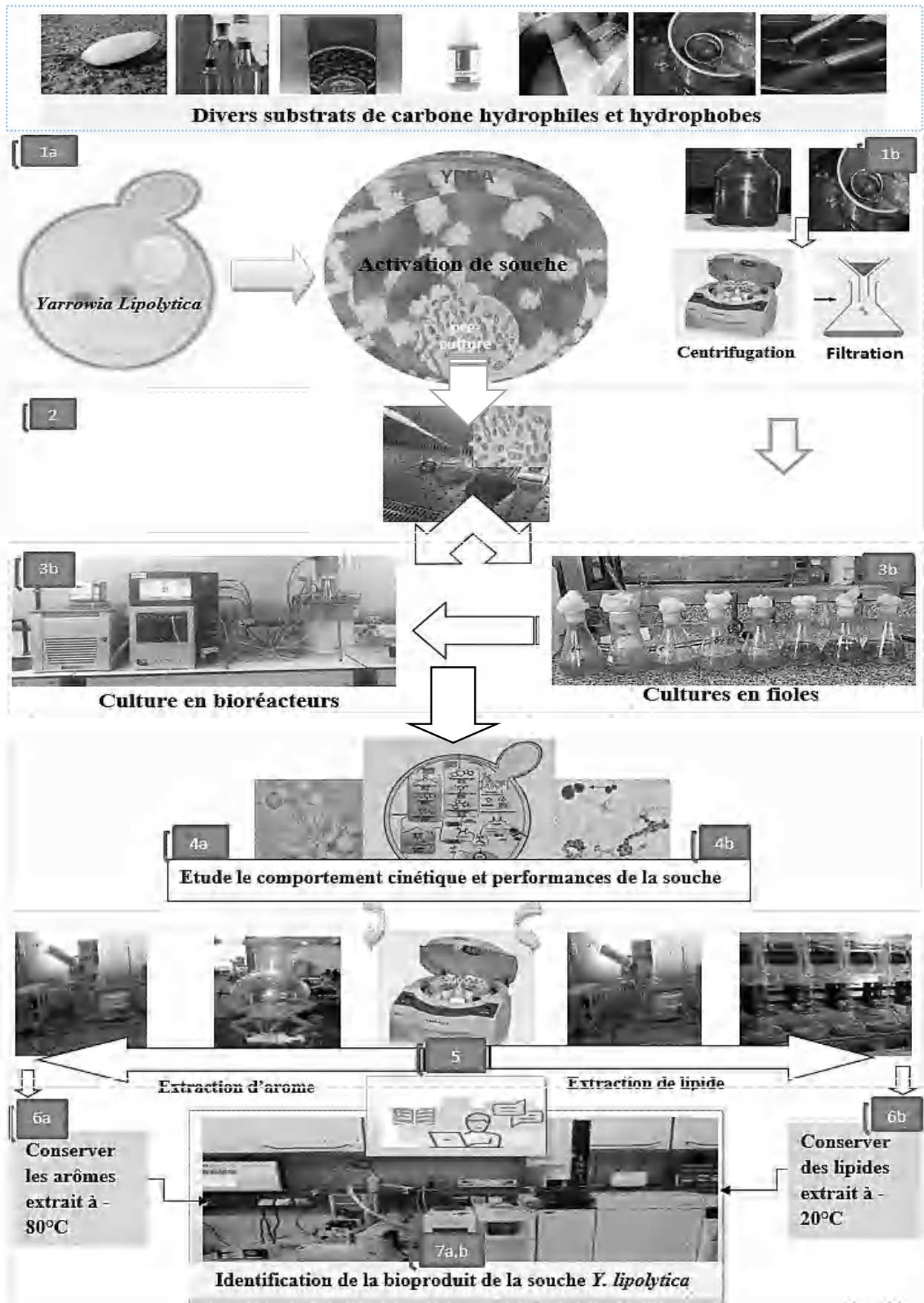


Figure 26: Schéma du montage expérimental.

B.7. Étude comparative des données expérimentales

B.7.1. Levure *Yarrowia lipolytica* : comme une modèle d'étude

La levure atypique *Y.lipolytica* est l'une des rares levures oléagineuses, aérobies et non pathogènes qui ont été largement étudiées approfondies concernant les changements et les applications physiologiques, génétiques et métaboliques dans l'environnement et l'industrie. la nouvelle tendance apparue récemment dans des outils de génie microbiologique était plus adaptée pour tenter d'améliorer l'accumulation de lipides en s'appuyant sur tout le potentiel du génie génétique des souches, qu'il conduit à des performances réalistes en termes de production des acides gras requis et de comportement de production d'arômes biotechnologiques (c'est-à-dire de confrontation aux réactions métaboliques qui se produisent au cours d'une période de conversion, par exemple en accélérant la période de décomposition des substrats gras et en arrêtant la détérioration de l'odeur produite). on sait que la levure *Y. lipolytica* a été associée à ce domaine, car c'est la levure la plus adaptée pour le séquençage du génome dans ses outils de génie génétique (Cescut 2009), bien que sa capacité à accumuler dans la littérature soit moindre (Papanikolaou, 1998), sa capacité à accumuler les acides gras en particulier est plus élevée que les autres levures. la souche utilisée dans ce travail *Yarrowia lipolytica* est producteur de lipase, Elle a une surproduction de lipase (LgX64.81) modifiée avec un rapporteur de gène LIP2 - LacZ (Bouchedja et al. 2017), elle est certainement adaptée à l'accumulation de lipides et sa capacité à dégrader rapidement les substrats lipidique complexe par la lipase sécrétée.

B.7.2. Culture de *Yarrowia lipolytica* : le mode de conduite

La composition du milieu de cultures présente ci-après et le mode de fermentations sont très importants. selon (Cescut 2009) aux modes de culture peuvent affecter sur comportement cinétique et performances de la levures, ils permettent d'induire des changements de métabolisme. Nous avons établi les conditions expérimentales pour suivre la croissance des cellules, forme et orienter de pH et l'accumulation de lipides intracellulaires en mode culture en batch. Beopoulos 2009 confirmée qu'avec ce mode de culture on obtient des niveaux d'accumulation réduits par rapport des modes de culture en continu et culture en 'fed-batch'(Papanikolaou et Aggelis, 2003), Toutefois c'est en revanche un outil efficace et rapide pour comparer des comportements nombreuses souches tout en gardant des conditions expérimentales identiques, où les conditions ce mode 'batch' sont fixées en début de culture (choix des substrats, volume de substrats et et just de source d'azot pour tout culture, T°). contrairement aux deux modes précédentes, dans lesquelles l'obtention d'une culture stable est délicate et longue à obtenir, et ce mode n'est pas adapté pour l'étude des nombreuses souches

génétiqnement modifiées. Les chapitres de ce travail détailleront donc les résultats obtenus avec cette souche en culture en mode batch. Ces travaux ont été effectués au niveau des laboratoires BioQAL-INATAA.

B.7.3. Culture de *Yarrowia lipolytica*: les phases

Les phases de croissance lié directement à la production d'arôme et accumulation de lipides, elle permet l'obtention d'une concentration élevée en biomasse et d'arôme dans un état physiologique imposant des taux de croissance proches des valeurs maximales. Afin de déterminer les différents flux (accumulation de lipide intracellulaires et production d'arôme) sur la base des paramètres cinétiques mesurable selon de source de carbone, avec également tenant compte de l'énergétique(milieux dépendant glucose), aussi la dégradations substrats lipides complexe comme margine et huile usée aux voies anaboliques et de production des acide gras et transformation de huile de ricin à gamma décalactone et ré-consommation. C'est pourquoi une description le comportement cinétique et performances de *Y. lipolytica* des différentes phases de culture a été développée , En réalisant des étudié le comportement à différentes étapes de la culture en y mesurant les valeurs du taux de croissance et de la teneur en lipides, pH lors de la culture. Ces informations sont très utiles lors de l'élaboration de scénario de culture car il est possible de connu l'enchaînement des phases de accumulation des lipide et production de arome ,découvrir un décalage temporel et limitation et inhibition possible de certains milieux de cultivation , limitation de re-consommation l'arôme produit et accumulation de lipides par arrêté de la réactions à ce point. Elle permet également de suivi la forme cellules pendant tout la période de culture en fonction de certains comportements qui expliquent l'apparition de processus d'accumulation de lipide ou de production d'arôme, par exemple, la forme cellulaire allongée et formes mycéliale a était associée à l'état de production d'arômes.

B.7.4. Culture de *Yarrowia lipolytica*: les substrats

Les conditions de culture, comprenant la composition des milieux (substrats) peuvent affecter fortement comportement cinétiques de levure qui est attribué au fine la production de biotech arome, ou orienter le métabolisme vers la production d'acides gras ou de métabolites secondaires (par exemple le citrate), selon le milieu stimulant. Le travail a démarré par la mise en place de groupe de culture permettant de suivi comportement cinétique et performances de la levure *Y. lipolytica* sur large des substrats soit hydrophobe (comme acide

oléique acide linoléique, margine, huile usée et lactosérums) ou hydrophiles (glucose et datte sirupe) avec mémé gamme de ratio azote en milieux. Notamment, aux milieux constitués d'effluents et des déchets. aussi l'arôme produit et le rendement en lipides peut être affect en volume de substrats et fonction de la quantité de des acide gras formés dans substrats, respectivement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussions

Le travail a démarré par la mise en place de groupe de culture permettant de balayer une large gamme de sources carbone dans fioles par des analyse cinétique multi-niveau a été réalisée à partir du suivi des variables du comportement levure, afin de déterminer bon milieu qu'induisant l'accumulation de lipides et l'induction de production d'arôme. Une fois les résultats obtenus à partir de la souche à la ferme sont étudiés en flacons et validés sur la souche.

L'étude a été développée en sélectionnant des sources de carbone dans lesquelles les performances de la souche étaient meilleures et en les cultivant dans des bioréacteurs puis d'analyser et de déterminer les lipides accumulés à l'intérieur des cellules et l'arôme produits à partir de ces substrats. Les parties suivantes détailleront donc les résultats obtenus avec cette souche en culture en mode discontinu, comme suit :

- **Étude comparative et caractérisation du comportement et performée de levure *Yarrowia lipolytica* sur diverses sources carbonées : Comportement et performance de *Yarrowia lipolytica* en réponse aux substrats.** Dans cette première partie de résultats, nous avons étudié le comportement cinétique et performances de la souche sur différents milieux en fioles (glucose, acide oléique, acide linoléique, margine, huile usé et huile de ricin). Le travail s'intéresse en particulier dans cette première partie à des aspects comme la viabilité (croissances et morphologique cellulaire), le pH, la Variation global lipidiques accumulée selon les milieux et réponse de la souche aux substrats.
- **Etude et identification des lipides accumulées intracellulaire à partir de diverses sources carbonées par levur aérobie *Yarrowia lipolytica*.** Dans cette deuxièmes partie de résultats, nous avons concentrée étude et Identification des lipides cellulaires de *Yarrowia Lipolytica* cultivée sur différents milieux des cultures qui favorise l'accumulation de lipide (YPD, YPDOA, YPDWCO et YPDOMW) en fioles puis en un bioréacteur: effets des déchets hydrophobe de culture (huile de cuisson, margine) sur leur comportement et la production de lipides cellulaires.
- **Production de γ -décalactone (arome de pêche) par la levure non pathogene *Y. lipolytica*.** Dans cette troisièmes partie de résultats, *Y. lipolytica* a été utilisée pour production d'arôme de type lactone (Gamma décalactone) en présence de huile de ricin

dans le milieu de culture (PCO) en fioles puis en un bioréacteur , après extraction, séparation, elles sont identification et caractérisation par chromatographie à GC-MS : effets des différentes concentrations huile de ricin de culture sur leur comportement et la production de Gamma décalactone.

A. Étude comparative et caractérisation du comportement et performée de levure *Yarrowia lipolytica* sur diverses sources carbonées

La levure *Yarrowia lipolytica* recèle un vaste potentiel pour répondre à la demande croissante de bioproduits, notamment d'aliments et de carburants durables. De plus, la tendance l'économie circulaire vise à utiliser les déchets des industries agricoles et alimentaires, y compris ceux non commercialisables en raison de dommages ou d'utilisation après récolte, comme substrats carbonés pour la croissance des micro-organismes. Le produit final microbien peut à son tour être utilisé comme source d'arôme ou de lipides microbiennes (acides gras), selon le substrat, pour la production en aval de bioproduits appropriés. Dans le but d'étendre le modèle piloté sur la levure cultivée sur les substrats de carbone, cette partie de l'étude étudie le comportement de la levure *Y. lipolytica* sur sept substrats différents et l'évaluation du type de produits finaux. Dans cette partie, nous démontrons la faisabilité de la croissance de *Y. lipolytica* sur tous les substrats de carbone grâce à l'évaluation de la composition immédiate des produits finaux (c'est-à-dire arôme, lipide). De plus, les résultats de cette partie soutiennent davantage la faisabilité du développement d'un modèle zéro déchet et l'optimisation des conditions de culture pour identifier les bioproduits les plus viables pour une future mise à l'échelle à l'échelle industrielle de la croissance de micro-organismes sur un substrat de déchets, et plus largement.

Les résultats expérimentaux obtenus lors de plusieurs substrats en mode cultures batch alimenté par fioles, sont décrits ci-après et ils sont parfaitement reproductibles en utilisation bioréacteurs contrôlée en la partie II et III.

A.1. Variables cellulaires

A.1.1. Croissance cellulaire de la levure

Les résultats obtenus de l'étude de la croissance cellulaire de la levure cultivée dans des milieux de composition différente (glucose, acide oléique, acide linoléique, margine, huile usé et huile de ricin) sont présentés sur la figure 26.

Sur la figure 27 on observe la même tendance a été observée qui amorce une croissance exponentielle jusqu'à 24 h de culture en milieu glucose et acide oléique. . Après ce point (c'est-à-dire lorsque les cellules entrent dans la phase de croissance stable), le nombre de cellules de levure a été maintenu tout au long de la période de culture restante. Mais il a doublé le nombre total de cellules pour le milieu contenant glucose comme source de carbone, qui pourrait être

due au fait que l'inoculum ont été cultivés dans le milieu de composition similaire comparée d'autre milieux (une période d'adaptation peut être requise par la souche lors du transfert sur le nouveau support), aussi, l'utilisation du glucose, quelle que soit son origine, est intéressante car elle a une teneur élevée et facile en énergie par rapport à d'autres substrats (Boyle and Morgan 2009). Alors que dans le milieu qui dépend de l'huile de ricin, une diminution du taux de croissance total a été observée, et un temps de culture plus long a été observé jusqu'à 120 heures. Alors qu'il n'y avait pas de croissance dans le milieu dépendant de l'acide linoléique (probablement en raison de l'effet antimicrobien de l'acide linoléique (Lin et al. 1996; Saygün et al. 2014; Lin and Wu 2015), qui a montré un effet antimicrobien de l'acide linoléique sur différentes bactéries G (+). Ainsi, ce résultat indique que cette souche est incapable de métaboliser l'acide linoléique.

D'autre part, dans les milieux qui dépendaient des déchets lipidiques (OMW, WCO), La courbe de croissance était basse et sur lignes convergentes dans les premières heures de culture (0-20 h). Après 24 h de culture, les affichages ont montré une augmentation marquée du nombre de cellules pour les deux milieux, mais ont doublé le nombre de cellules pour le milieu contenant l'huile usagée comme source de carbone (figure 27). Où la margine avait un effet sur la physiologie de la souche étudiée par rapport à l'huile usée, Cela peut être dû à la concentration des composés phénoliques et à la toxicité de la margine (Dourou et al. 2016; Sarris et al. 2017, 2019). Les niveaux de croissance varient entre les milieux dans les tests effectués. significativement, La présence des déchets lipidiques (OMW, WCO) a légèrement inhibé la croissance cellulaire, et un temps de culture plus long a été observé d'environ 48-72 heures pour cette souche avant que les levures n'entrent dans le stade de croissance stable (due l'effet antimicrobien : la composée phénolique qu'est présent dans OMW, et aldéhydes, semialdéhydes, hydrocarbures, radicaux alcoxy et acides dans WCO) (Dourou et al. 2016; Sarris et al. 2017, 2019a; Katre et al. 2017; Tzirita et al. 2019). Cependant, mais ils étaient plus magistraux à la fin de la fermentation que les cellules des autres milieux. Par conséquent, elles semblaient encore en croissance (une accrues des concentrations cellulaires finales jusqu'à $(1,2 \times 10^8$ et $0,9 \times 10^8)$ a été observée sur l'huile usée et la margine, respectivement (Figure 27). Raison de sa capacité à s'adapter à des conditions environnementales difficiles, Banker *et al.*, (2009) a cité que cette levure est un bon candidat dans le traitement des déchets agricoles industriels.

In général, Les résultats montrent que quel que soit le milieu de culture, les cellules présentent une croissance normale (Comme prévu). Néanmoins, Les données préliminaires obtenues dans cette étude indiquent que les vitesses et les taux de croissance diffèrent pour différents milieux de culture. De même, Fontanille et al. (2012); Zhao et al. (2012); Lin et Wu (2015); Kolouchová et al. (2016); Johnravindar et al. (2018) ont rapporté que cela peut être dû à des différences dans la composition des VFAs des milieux de culture. Ces courbes permettent-nous dans la plupart des cas d'observer trois stades; Une période de retard a été observée dans la croissance des milieux contenant des substrats hydrophobe par rapport glucose, qui pourrait être due au fait que les inoculum n'ont pas été cultivés dans le milieu de composition similaire au milieu de pré-culture, et donc une période d'adaptation peut être requise par la souche Lors du transfert sur le nouveau support (le temps nécessaire à la levure pour synthétiser les enzymes adaptées au substrat (lipases, glucokinases))(Mlíčková et al. 2004; Thevenieau et al. 2007) , durant cette phase la croissance est nulle jusqu'à 6 heures de temps, et la phase exponentielle (qu'est allongée selon substrates) et la phase de croissance stable.

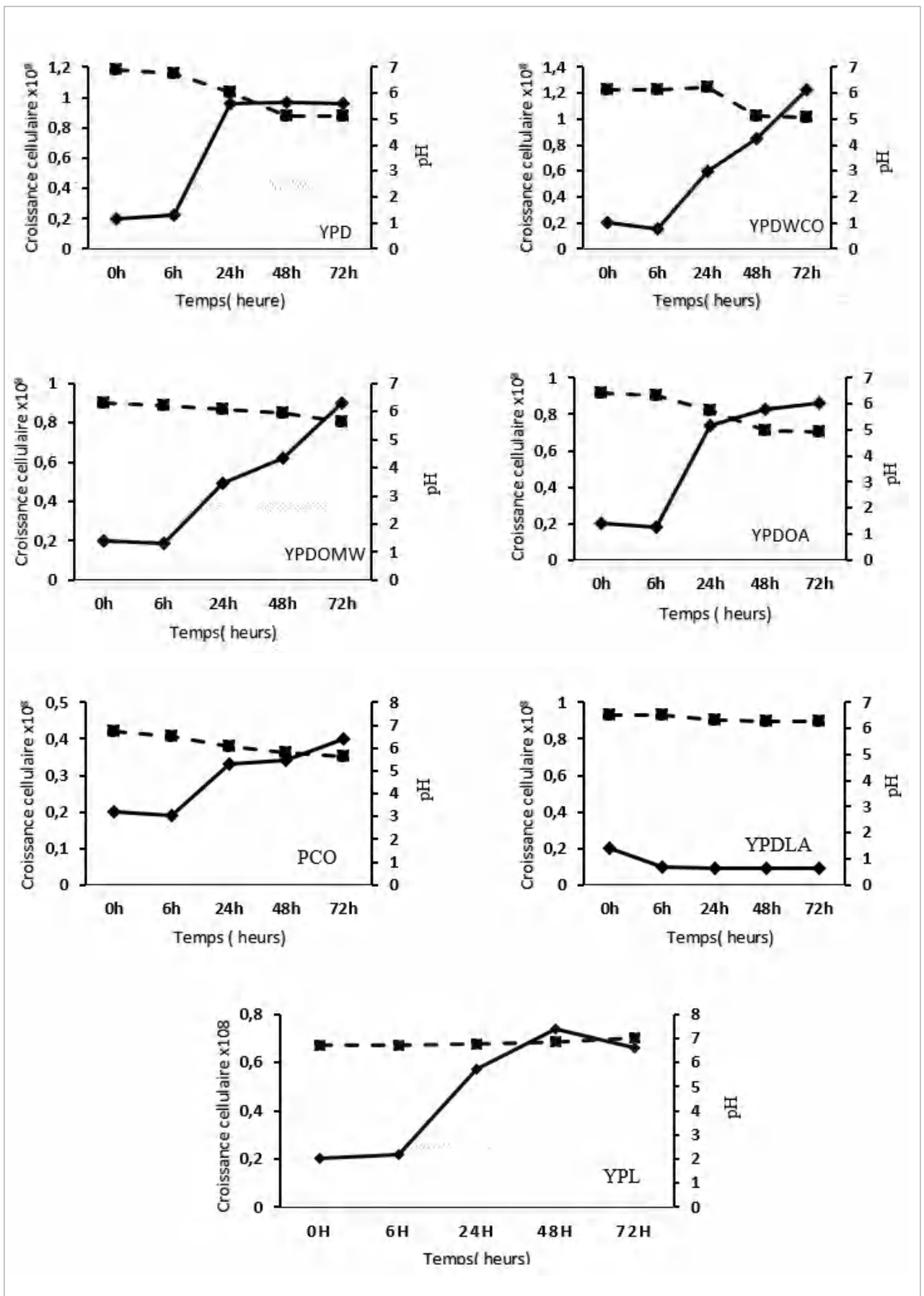


Figure 27: Comportement *Y. lipolytica* concernant par la centique croissance cellulaire (DCW g/L) (◆—) et pH (—■—) de cultivée en fiole dans différents milieux de cultures.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par (Lin *et al.*, 1996; Beopoulos, 2009; Katre *et al.*, 2017; Malajowicz *et al.*, 2018), quelle que soit la source de carbone. *Y. lipolytica* pousse aussi bien sur glucose $\mu_{max} = 0.26 \text{ h}^{-1}$ (Cescut, 2009), que sur de l'acide oléique $\mu_{max} = 0.33 \text{ h}^{-1}$ (Papanikolaou et Aggelis, 2003; Beopoulos *et al.*, 2011). D'autres milieux (déchets huileux : WCO, OMW), une tendance similaire a été indiquée par Katre *et al.* (2017) ont déterminé que 72h était le temps minimum nécessaire pour atteindre la phase stationnaire avec *Y. lipolytica* CECT 1240 et Mutants de *Y. lipolytica* NCIM 3589 sur des déchets d'huile de cuisson. De même, Patelet Matsakas (2018) par *C. curvatus* cultivée sur huile de cuisson usagée, aussi dans les autres milieux (POME) à *Y. lipolytica* TISTR 5151 la phase exponentielle s'étend jusqu'à 72 heures (Louhasakul *et al.* 2016). Tel que à Tzirital *et al.* (2018) et Xiaoyan *et al.* (2017) rapporté que 72 heures était la fin de la phase exponentielle par *Y. lipolytica* LMBF 20 et M53 respectivement, qu'est cultivé sur milieu huile usagée. La concentration en biomasse de la fermentation du glycérol pur et purifié de WCO a atteint son maximum à 72h (Chen *et al.* 2018). De même Rymowicz *et al.* (2010) et Chatzifragkou *et al.* (2011) sur déchets contenant du glycérol de l'industrie du biodiesel. Concernant les milieux de substrats hydrophobes, la composition en acides gras du substrat gras peut jouer un rôle majeur dans l'absorption des lipides par *Y. lipolytica*, expliquant ainsi les pourcentages de dégradation plus faibles des lipidiques (Papanikolaou *et al.*, 2001, 2002, 2003). Ce qui, à son tour, peut également affecter la croissance cellulaire. La croissance cellulaire légèrement plus élevée basé sur huile usée que le margine pourrait s'expliquer par le fait que certaines quantités d'acides gras libres présents dans l'huile usée ont favorisé la croissance des levures plus efficacement, en raison d'une efficacité d'utilisation plus facile, que margine composée principalement de triacylglycérol, conformément à plusieurs rapports de la littérature (Lin *et al.* 1996; Fontanille *et al.* 2012; Yan *et al.* 2012, 2018; Liu *et al.* 2015), De plus, ils sont similaires à celles obtenues par Lanciotti (2005); Domínguez *et al.* (2010); Katre *et al.* (2012, 2017); Liu *et al.* (2019). Où Papanikolaou *et al.* (2010) ont rapporté que plus la teneur en graisses saturées est élevée, plus le défi de la biodégradation est grand. *Y. Lipolytica* présente la particularité de synthétiser un biosurfactant (liposan) qui facilite cette étape (Kar *et al.* 2008) Donc, Nous pouvons émettre l'hypothèse que les composants des milieux de culture ont un rôle principal d'augmenter la durée de vie des cellules.

A.1.2.Morphologique de *Y. lipolytica*

• *Observation microscopique*

Yarrowia lipolytica a très bien poussé dans les tous processus (Figure 27), sauf pour le milieu qui dépend d'YPDAcL. En général, les cellules sont apparues sous des formes de type levure, de type levure allongée, pseudo-mycélien et mycélien également dans des flacons (Figure 28), comme nous pouvons également voir que toutes les formes de levure peuvent coexister dans la même culture (PCO).

En effet, Le polymorphisme n'est pas surprenant pour ce type de levure car il s'agit d'un champignon dimorphe, capable de se développer sous différentes formes en fonction des conditions environnementales telles que les sources de carbone et d'azote ou des facteurs externes (systèmes de mélange, stress aérien, pH moyen)(Cescut 2009; Krzyczkowska 2012; Braga et al. 2016; Try et al. 2018; Timoumi et al. 2018b; Bouchedja et al. 2018; Małajowicz et al. 2020).

Comme prévu, il est possible d'observer le dimorphisme des levures dans une même culture. Comme dans le milieu de fermentation qui dépend de l'huile de ricin comme substrat gras pour produire l'arôme, on peut observer que des formes rondes et filamenteuses coexistent dans une même culture. (Avec de l'huile de ricin), où la forme des cellules de levure s'est développée tout au long de la période de culture. En effet, krzyczkowska, (2012) et Małajowicz *et al.* (2020), ont rapporté qu'au de la phase de croissance où la synthèse de la gamma decalactone est importante, les formes mycéliennes et pseudo- mycéliennes sont prédominantes. Concernant les milieux de culture hydrophobe (YPDOA, YPDLA et YPDWCO, YPDOMW et PCO), les cellules adhérentes à la surface du substrat lipidique et certain des gouttelettes d'huile sont adsorbées à la surface de la cellule, il est également possible de constater que les cellules forment une forte agrégation et ont une tendance à s'agglomérer autour des gouttelettes lipidique.

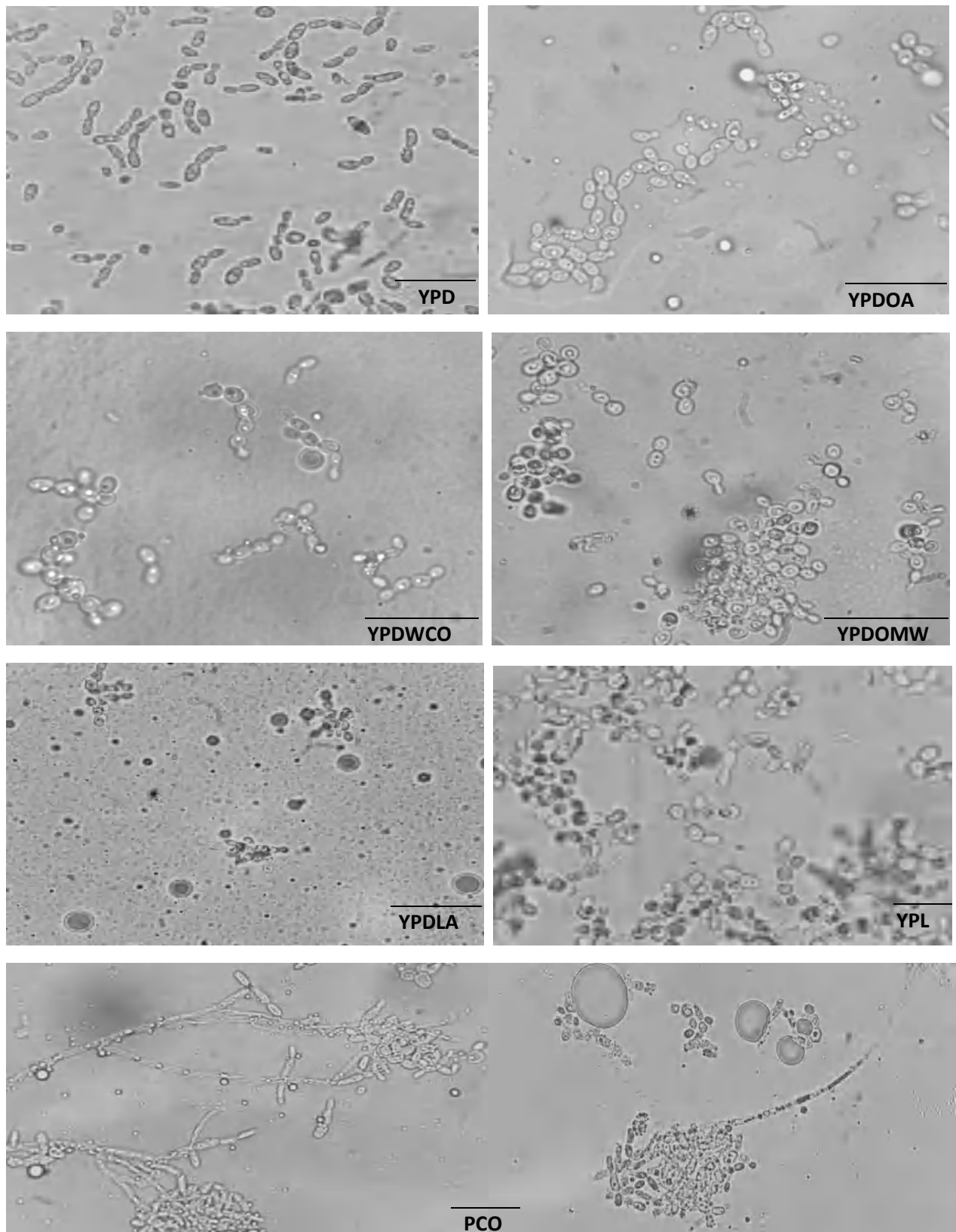


Figure 28: Image microscopique ($\times 100$) montrant la croissance cellulaire à 48h de la levure *Y. lipolytica* cultivée dans différents milieux (YPD, YPDOA, YPDLA et YPDWCO, YPDOMW, YPL) et à 48h de la levure cultivée dans (PCO).

Le contacte directe entre la surface des cellules et les petites gouttelettes lipidiques est due à la présence des protéines ou des glycoprotéines sur la paroi cellulaire, qui permet l'adhésion des substrats hydrophobes, et aussi les propriétés de la surface cellulaire sont intentionnellement modifiées afin d'améliorer l'adhésion cellule-substrat, la cellule produit également du liposan, qui est un surfactant tensio-actif émulsifié rapidement le milieu de culture et améliorer le contacte cellule-acide gras, ceci peut expliquer le passage à la forme mycélienne allongée (Aguedo et al. 2004, 2005; Thevenieau et al. 2007, 2010; Gomes et al. 2011a; Try et al. 2018). En effet, Ben Sassi et al. (2006); Makri et al. (2010); Bouchedja et al. (2017) ont rapporté qu'au fur et à mesure que la phase de croissance avance (et la production de la biomasse) des cellules de type rondes apparaissent dans le milieu de culture et la quantité de lipides accumulés durant les différentes phases de croissance se traduit notamment par la grande taille des cellules. On pouvait s'attendre à de tels résultats dans cette étude, les cellules a été apparues à 48 heure (stade attendu de l'accumulation de lipide) ovales ou sous des formes ressemblant à des levures et homogène.

A.2. Variables extracellulaires

Caractérisation du milieu extracellulaires et des surnageant de culture tell que l'assimilation du substrat, pH et arôme sont parmi les paramètres biologiques de ce type de culture. Concernant pH, Les résultats obtenus de la mesure du pH des milieux de cultures durant la période de culture de la souche sont illustrés sur la figure (27). pH du milieu a été surveillé régulièrement et il a été observé que la croissance cellulaire sur des tous milieux n'était pas accompagnée d'une chute de pH significative tout au long de la culture, indiquant une libération mineure d'acides organiques dans le milieu, comme décrit par Beopoulos *et al.*(2009), Santos *et al.* (2013), et Soares *et al.* (2017), affirment les modifications du pH peuvent orienter le métabolisme vers la production d'acides gras ou de métabolites secondaires (par exemple le citrate). A savoir que la diminution du pH est un indicateur important de la production d'acide acétique par la levure. Quant à l'influence du pH semblait avoir un effet crucial sur la croissance cellulaire et sur l'accumulation lipidique (et la composition de lipidique cellulaire), et aussi la production l'arôme (Barth and Gaillardin 1997; Gopinath et al. 2008; Alchihab et al. 2009; Gomes et al. 2013) Précisément, la réponse aux variations du pH dépend de chaque espèce de levure (Endrizzi and Belin 1995; Soares et al. 2017). Moeller et al. (2012) ont rapporté que *Y.lipolytica* est capable de pousser aux pH faibles, aux alentours de 4, sa croissance et ralenti à un pH de 7 et inhibée à un pH supérieur à 8. Ainsi Bouchedja *et al.* (2018) ont montré que les résultats cytométriques en ligne montrant qu'à pH= 5, la croissance cellulaire de même que

l'assimilation lipidique étaient nettement moins importante qu'à pH= 6. Papanikolaou *et al.* (2002) ont rapporté que chez *Y.lipolytica* l'accumulation de graisse était favorisée à pH =6, et que la croissance cellulaire était complètement réduite à des pH 5 et 7. Ce qui concorde avec les résultats obtenus dans cette étude dans des conditions de pH non régulé, quand le pH atteint le pH 6 (Figure 27) la croissance cellulaire été observer la meilleur (Figure 26).

Comme prévu, en les résultats obtenus dans tous les milieux dans cette étude et dans des conditions de pH non régulé, Le pH du milieu est donc toujours resté dans la plage de 6,5 à 5, ce qui représente la valeur de pH optimale la plus couramment utilisée pour la croissance des levures (Moradi *et al.* 2013, 2016; Pereira de Andrade *et al.* 2017; Tzirita *et al.* 2018b, 2019).

Concernant la caractérisation des milieux substrats hydrophobes de culture, on peut remarquer que les cellules subirent une forte agrégation et ont à une tendance à s'agglomérer autour des gouttelettes d'huile dans les milieux (Figure 28 : observation microscopique), c'est à dire se contacte entre la surface extérieure de levure et les gouttelettes lipidiques.

Selon Mlickova *et al.* (2004), Aguedo *et al.* (2005) ; Gomes *et al.* (2011), la surface de contact des gouttelettes lipidiques avec les cellules et la surface entre deux phases liquides sont des facteurs attribuables à la dégradation d'un substrat hydrophobe et donc croissance des cellules et production du bioproduits (lipides ou arôme) par les cellules de levure. *Y. lipolytica* est bien connue pour ces activités lipolytiques et protéolytiques extracellulaires, elle produit des surfactants qui réduisent la taille des gouttelettes en augmentant ainsi la surface du contact entre la cellule et le substrat, de plus elle secrète de plus un émulsifiant extracellulaire, le liposan, et une lipase extracellulaire, Lip2p, permettant l'hydrolyse des TAG par les lipases, et assimiler à partir du milieu (Barth *et al.*, 2003 ; Mlickova *et al.*, 2004; Beopoulos, 2009).

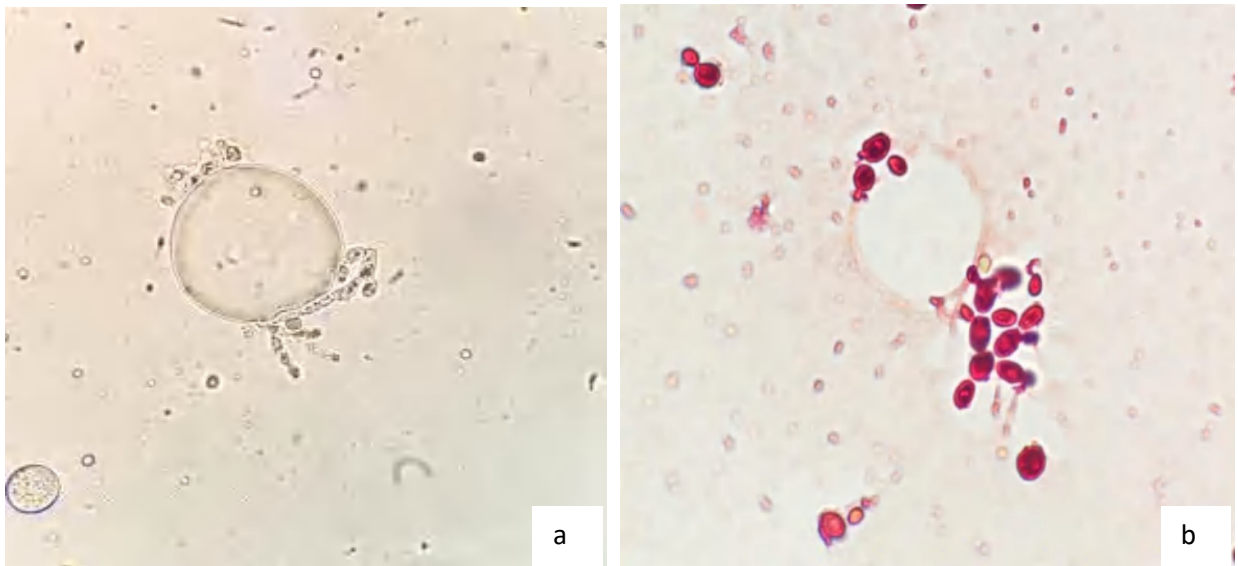


Figure 29: observation microscopique ($\times 100$) de *Y. Lipolytica* sur milieu des substrats hydrophobes (YPDM) sans (a) et sous une coloration de noir soudan(b).

A.3. Variables intracellulaires

A.3.1. Coloration au noir Soudan B des cellules

Concernant analyse qualitative des lipides, les résultats comprenaient le comportement des LBs par l'observation microscopique, suivie de l'observation microscopique avec du Noir Soudan pour des milieux de fermentation qui visent à l'accumulation intracellulaire de lipides. L'accumulation de lipides de la levure *Y. lipolytica* sur différents milieux a été montrée sur les images (figure 29). Au travers de teste préliminaire de la souche par coloration au noir Soudan (c'est un colorant qui colore les lipides)(Duarte et al. 2013 ; Schulze *et al.*, 2014 ; Lindquist *et al.*, 2015) dans des expériences en fioles agités (Figure 30). Il a été observé que la levure était capable d'accumuler des lipides dans tous les milieux. Généralités, Au cours de la fermentation (72 h), les lipides se sont accumulés dans les cellules et la teneur maximale en lipides a été observée à 48h(en phase de croissance exponentielle) . Cependant, les cellules qui se sont développées sur des substrats lipidiques présentaient une couleur violet foncé intense par rapport au milieu glucose-dépendant, qui apparaissait légèrement intracellulaire, l'aspect plus foncé était principalement sur la paroi cellulaire (en raison de la présence de graisse dans la composition de cette paroi), car il est oléagineux, où l'accumulation de lipides était le plus basse (avec glucose).

En générale (et quel que soit le milieu de cultures), Lorsque le processus de fermentation continue en mode batch utilisé dans cette étude (selon la figure 30), il y a eu une diminution de l'accumulation de lipides au dernier stade de la fermentation, Ceci est vraisemblablement dû à la dégradation des lipides par β -oxydation peroxysomale, cette observation soutien les confirmations de Aggelis *et al.* (1995), stipulant que les microorganismes oléagineux qui poussent sur les graisses consomment généralement leurs propres lipides de stockage, lorsque le débit des acides gras ex-cellulaires est considérablement diminué dans le milieu de culture et qu'il ne plus peut pas couvrir les besoins métaboliques microbiens. Beopoulos, (2009), qui affirme que dans un milieu contenant l'acide oléique le contenu maximal des souches en lipides atteint le 15 % du poids sec après 11heures de culture. Ce dernier reste constant pendant la première partie de la phase stationnaire (jusqu'à 24 heures) et puis diminuer. De même, Papanikolaou *et al.* (2006), qui montre que l'accumulation de lipides est toujours dépendante de l'influx de carbone. Une fois le réservoir de carbone extracellulaire épuisé, les lipides stockés peuvent être mobilisés.

Pour cette raison, les cultures en batch ne permettent pas l'accumulation de taux élevés de lipides, de même à Zhao *et al.* (2012). Selon Papanikolaou *et al.* (2002), Zhu et Jackson (2015), la culture en mode continu peut aussi permettre d'obtenir des concentrations élevées en biomasse et des teneurs en lipides importantes. Toutefois l'obtention d'une culture stable est délicate et longue à obtenir, et ce mode n'est pas adapté pour l'étude des nombreuses souches génétiquement modifiées. Les conditions de culture en mode 'batch' sont fixées en début de culture (substrats, rapport C/N, pH).Généralement, la culture en mode 'batch' ne permet pas d'intervenir facilement au cours de la culture. Il est donc évident qu'avec ce mode de culture on obtient des niveaux d'accumulation réduits, mais c'est en revanche un outil efficace et rapide pour comparer les capacités d'accumulation et de ré-consommation des nombreuses souches tout en gardant des conditions expérimentales identiques.

D'autre part, Au point de fermentation où l'accumulation de lipides a été observée était moins d'éclat entre 48 et 72 heures une stabilisation de la croissance a été observée à milieu d'abord (acide oléique)et une croissance continue pour certains milieux(comme l'huile usée et margine), e qui serait dû au fait que les lipides ont été dégradés par les cellules en tant qu'énergie pour maintenir leurs activités (Katre *et al.*, 2012, Louhasakul *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018; Tzirita *et al.*, 2018), même si des quantités de substrates sont restées dans les milieux.

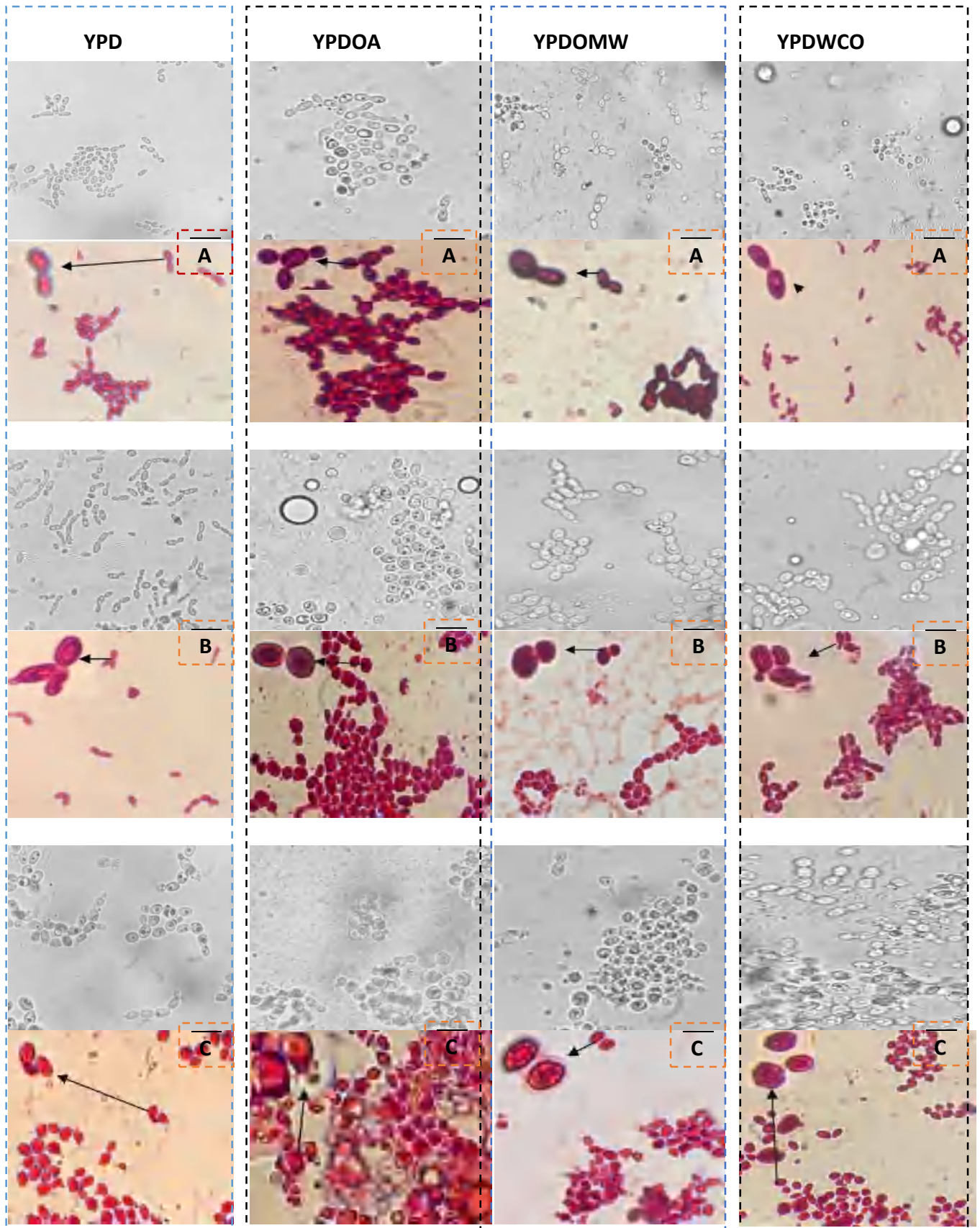


Figure 30 : Images microscopiques (optique : 100×) sans et avec Noir Sudan respectivement, pour des milieux de fermentation qui visent à l'accumulation intracellulaire de lipides (YPD, YPDOA, YPDOMW et YPDWCO) après 24h (A), 48h (B) et 72 (C) de mise en culture en fiole.

Ces résultats sont similaires à ceux de Tzirita *et al.* (2018) qui rapporte que pendant la fermentation, les lipides se sont rapidement accumulés dans les cellules en phase de croissance exponentielle (jusqu'à 72 h) et la teneur maximale en lipides a été observée à 48 h, d'huile de cuisson usagée (FOGs) par *Y. lipolytica* strain LFMB 20. Dans les autres milieux (POME) par *Y. lipolytica* TISTR 5151 la teneur maximale en lipides a été observée à 48h et dure jusqu'à 72 heures avant d'être utilisé comme source d'énergie par levure (Louhasakul *et al.* 2016). Ce qui suggère que la fermentation pourrait être arrêtée à 48 h afin d'éviter la consommation de lipides stockage. La souche a présenté une manifestation différente de l'accumulation de lipides lorsqu'elle était cultivée dans différent hydrophobe, et aussi à rapport au glucose, ce qui se reflétait dans ses caractéristiques de croissance sur les substrats hydrophile et hydrophobe. en accord avec la littérature pertinente le rendement des lipides est varier selon le type de substrat utilisé dans le milieu de culture (Cescut, 2009).

Concernant substrats hydrophobe, l'accumulation de lipides par la levure est considéré un processus anabolique primaire ((synthèse lipidique *ex novo* : les substrats externes tels que les huiles sont d'abord dégradés et hydrolysés en surface, puis incorporés tels quels ou avec modification (Beopoulos *et al.*, 2011)), qui se produit simultanément avec la croissance cellulaire (Chi *et al.* 2011; Magdouli *et al.* 2014, 2017), comme dans notre étude, les chercheurs ont rapporté que le processus d'accumulation de lipides à partir de substrats hydrophobes est influencé de manière critique par la composition en FA de la graisse utilisée (Papanikolaou and Aggelis 2003b, 2011a; Papanikolaou *et al.* 2006, 2011; Bialy *et al.* 2011; Katre *et al.* 2012; Saygün *et al.* 2014; Carsamba *et al.* 2018; Chang *et al.* 2022). En outre, aucune inhibition du substrat de lipide (C.à.d., déchets de huile et margine) sur l'accumulation de lipide n'a été notée, cela indique la capacité de la souche à tolérer des composés toxiques et à accumuler des lipidiques. comme prévu, *Y. lipolytica*, un organisme modèle connu pour avoir la capacité d'assimiler des variété substrats hydrophobes (TRG, les graisses et les huiles), et d'accumulation de lipides (Papanikolaou 1996 ; Fickers *et al.*, 2005; Papanikolaou et Aggelis 2011). En plus de ce qui précède (l'accumulation de lipides le plus basse), le coût de la fermentation avec des concentrations élevées de glucose limite son utilisation pour la production (SCO), une manière possible de surmonter ce problème est d'utiliser des milieux de fermentation lipidique peu coûteux. Par conséquent, Ces résultats confirment l'utilisation potentielle de déchets (de huile usée et margine) comme aux bonne substrat «lipogène».

A.4. Utilité de la souche productrice de lipase à travers les résultats l'étude

L'analyse des cultures réalisées nous a permis de montrer que les substrats huileux sont plus performants en milieu de fermentation avec la souche productrice de lipase. la lipase, peut stimuler la production d'huiles monocellulaires et biotech arôme à partir dégradation de substrats hydrophobes. Où le développement rapide d'une surexpression efficace des enzymes microbiennes dans les souches, un processus de catalyse des lipases microbiennes peut être associé à l'utilisation du large spectre de réactions catalytiques dans les milieux hydrophiles et hydrophobes. Où l'utilité de la surexpression efficace des lipases microbiennes est concernée par les bioproduits potentiels et bio remédiation des déchets riches en lipides. L'un des outils utilisés pour ce type d'opération était la levure oléagineuses *Y.lipolytica* qui surproduit de la lipase. La flexibilité métabolique de la souche étudiée a été mise en évidence.

A.4.1. Réponse du *Y. lipolytica* aux déchets lipides

Les composés complexes d'hydrophobes des déchets organiques sont connus comme des sources de carbone qui peuvent être utilisées par les levures comme *Y.lipolytica* pour de nombreuses applications. Bien que ces composés causent parfois des perturbations aux micro-organismes (en particulier aux levures), mais sont aussi rapportés comme donner aux cellules de levure une certaine résistance contre les stress environnementaux. Alors, nous avons étudié devenir du carbone dans des conditions de croissance *Y.lipolytica* sur OMW et WCO en tant que substrats et co-substrats avec du glucose. Significativement, sur la réponse métabolique (la résistance de la levure *Y. lipolytica* à réponse au choc d'un composé complexe en milieu amphiphile), et le temps d'adaptation. Bien que le retard de croissance qui sont perceptible initialement dès le premier jour de culture, les résultats obtenus montrent que :

- Les cellules ayant poussé sur huile usé et margine a permis l'obtention de hautes densités cellulaires.
- La possibilité de la souche à consommer substrats dans des conditions de croissance.
- La flexibilité métabolique de la souche étudiée a été mise en évidence: une très rapide adaptation a été observée sur les des substrats étudiés.
- Il a également été démontré qu'un élevée de lipides intracellulaires lors de l'utilisation du ces substrats comme source carbonée, les cellules ayant poussé sur huile usé et margine sont plus brillant que les cellules ayant poussé sur glucose.

Principalement, ce travail met en évidence le rôle d'accumulation des lipides dans la réponse cellulaire qui se manifeste de différentes manières en réponse à ces stress.

L'accumulation de graisse à l'intérieur de la cellule (sous le nom de corps gras) est considéré importante pour la résistance de la cellule aux milieux. En générale, les cellules ayant poussé sur glucose et aussi des substrats hydrophobes a été formée des corps lipidiques. Mais les cellules ayant poussé sur des substrats hydrophobes a été plus fluorescences. Donc des substrats lipidiques sont liée à la présence de corps lipidiques intracellulaires, semble donc jouer un rôle clé dans la résistance cellulaire à ces milieux. Ce travail relève aussi que la présence de lipides modifie le processus de mort cellulaire programmée de *Y. lipolytica* en réponse à aux milieux complexe, Où les cellules a été apparence encore en croissance après le troisième jour de fermentation. La surexpression efficace d'enzymes pourrait-elle être la cause de ces constatations ? Les résultats précédents ont démontré l'avantage d'utiliser des souches qui surexpriment efficacement les enzymes, telles que les lipases, pour la bioremédiation par adsorption et biodégradation de l'effluent. De plus, démontrer la réactivité et la flexibilité métabolique de la souche dans les nouvelles conditions de croissance est un bon pas vers l'utilisation de matières premières (sous-produits industriels) et de déchets pour produire des lipides microbiens.

B.5. Influence du substrat carboné sur la performance de *Y. lipolytica*

Dans le cadre de cette thèse, nous avons argumenté des perspectives intéressantes sur la diversification de substrats carbonés pour la production de lipides. Alor nous avons étudié l'influence du substrat carboné sur la comportant de la souche lors de cultures en mode batch à partir de glucose et de acide oléique et linoléique , et margine, huiles usée et lactosérum comme substrat. Significativement, on a concentrée sur la caractérisation du comportement dynamique de *Y. lipolytica*, la réponse métabolique (la résistance de la levure *Y. lipolytica* à réponse au choc d'un composé complexe en milieux amphiphile), et le temps d'adaptation lors le changement dans des substrats carboné. Alors La confrontation des résultats obtenus à partir de groupes de substrat de carbone permet de dégager similitudes et divergences de comportements lors cultures. L'évolution du phases soit de croissances de cellulaires ou accumulation de lipides et caractérisation de milieu au cours des cultures sur des substrats carbone montré ci-dessus(en tableaux et les figures) est une variable représentative du devenir du carbone en milieu, permet les observations suivantes :

- Jusqu'à 24 heures de culture (phase I), la croissance de souche et l'accumulation des lipides ne est pas constant, cette phase caractéristique de la croissance comme le reporte Bouchedja *et al.* (2017).
- A partir de 30 heures de culture (phase II), le comportement varie et il atteint tope à

48 heures de culture.

- D'autre milieux, durant cette phase (II), les analyses n'ont révélé aucune constante le comportement in milieu lipides et la croissance reste élevée jusqu'à 72 heures de culture.
- Production intracellulaire varie et il atteint son pic à 48 heures de culture.
- Production extracellulaire de produits aromatiques pourrait expliquer l'importance de la levure qui surproduit la lipase en fournissant le substrat de biotransformation primaire de l'huile de ricin.
- En fonction des sources carbonées et selon temps de culture, Lors de la phase III, la diminution de la concentration en production soit intracellulaire ou dans le surnageant indique qu'il est consommé comme le reporte Bouchedja *et al.* (2017).

En fine, La croissance de la levure *Y.lipolytica* a été montrée la préférence des milieux à base de glucose et des milieux à base d'acide oléique, tandis qu'il a été montré l'impact négatif des autres sources de carbone en termes de cinétique de croissance. Concernant l'accumulation de lipides, à quelques exceptions près les résultats obtenus montrent que les cellules ayant poussé sur substrats huile sont plus brillantes que les cellules ayant poussé sur glucose.

B.6.Conclusion

Ces travaux ont permis de études de cinétique de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* à partir de aux groupes de substrat de carbone et connaissance de ses performance en définir les niveaux de croissances et lipides accumulées de la levure en fonction des sources carbonées apportées, par paliers successifs sont particulièrement bien adaptées pour les objectifs de l'étude. L'investigation de ces cultures a permis de détecter une forte densité cellulaire et la possibilité de la souche à utiliser substrats complexes et accumulation de lipides. Les résultats qui viennent d'être présentés montrent l'effet de la source carbone sur le comportement cinétique de la levure *Y. lipolytica*. Les cellules ayant poussé sur déchets hydrophobes ont une bonne résistance et réponse cellulaire pour ces milieux complexes. Dans cette partie aussi, nous avons observé des changements au niveau des LB chez *Y. lipolytica* selon source carbone. Donc l'accumulation de lipides en ayant poussé sur substrats lipides (*ex novo*) ont un meilleur résultat à déchets hydrophobes par rapport aux cellules ayant poussé sur glucose (*de novo*). L'explication peut s'appuyer sur le rôle des acides gras présents en milieu de culture, c'est typique pour ces levures. Les résultats expérimentaux obtenus lors de plusieurs cultures en mode batch d'alimentation décrites ci-dessus, peuvent idéalement être appliqués en

les utilisant dans des bioréacteurs dans la deuxième et troisième partie. La conduite de la culture doit permettre de maximiser utilisation des substrats et le conversion ces substrats (d'huile monocellulaire(SCO) et la productivité d'arôme). Dans la deuxième partie, nous allons approfondir les aspects dès l'accumulation de lipides intracellulaires dont les différentes formes processus fermentation : fiole et bioréacteurs ; et les corps lipidiques (LB) par colorant Nile Red. Cette étude étend avec succès le modèle zéro déchet proposé de la culture de *Y.lipolytica* sur les déchets pour confirmer la faisabilité de cette croissance de levure sur les déchets. Une découverte clé de l'étude actuelle est le taux de croissance élevé et la concentration cellulaire dans toutes les cultures, la production d'arôme biotechnologique (dans un milieu d'huile de ricin) et l'accumulation de lipides lorsqu'ils sont cultivés sur des cultures qui l'attribuent. Ce constat met en évidence le grand potentiel d'utilisation des déchets.

B. Etude et identification des lipides accumulées intracellulaire à partir de diverses sources carbonées par levur aérobie *Yarrowia lipolytica*

B.1. Appliquer de la culture d'accumulation de lipides à partir de substrats l'intérêt en les bioréacteurs

Le partie précédent s'est attaché à décrire une état de culture de la levure oléagineuse *Y.lipolytica* à partir de diverses substrats carbonées, selon un mode de culture en batch en fioles. Comme reporté dans le partie 1 (partie I : Étude comparative et caractérisation du comportement et performée de levure *Y.lipolytica* sur diverses sources carbonées en fioles agités. page 75), levure *Y.lipolytica* est capable bien adapté à l'utilisation de substrats lipidiques différents, en raison la souche utilisée dans ce travail est modifiée génétiquement pour surproduction de lipase. C'est à dire, la flexibilité de la souche a été démontrée pour s'adapter aux substrats étudiés et accumuler de lipides, où elle a été capacité à stimulus de la dégradation rapidement les substrats huiles par la lipase, et accumuler de lipides. Cependant, le comportement et performée de levure en lipides a été effet selon le type de la substrats de carbone, alors dans ce second partie, l'étude consiste d'application de la culture d'accumulation de lipides à partir de substrats l'intérêt en les bioréacteurs en conditions parfaitement maitrisées afin optimisation du performance qu'est dirigée vers bon conversion des substrats en lipides en maximisant la concentration en biomasse et la teneur en lipides finale de diverses sources carbonées l'intérêt.

Initialement, le comportement cinétique de *Y. lipolytica* cultivée sur différents milieux dans le bioréacteur en conditions parfaitement maitrisées a été étudié, ainsi qu'une courte étude et comparaison sur le comportement et performances de la souche entre fiole et bioréacteurs. La quantification de la biomasse, détermination des lipides totaux et de la teneur en lipides est réalisée lors de cultures en bioréacteurs afin de l'analyse et identifiée des lipides cellulaires de la souche. En complément, connaissance quel serait l'impact de la différente des sources de carbone sur le profil lipidique.

N.B. : Les cultures en mode de conduite par bioréacteurs permettent d'atteindre de hautes densités cellulaires et éviter la formation de coproduits indésirables, de plus une exploration rationnelle de la phase d'accumulation.

B.2. Accumulation de Lipides à partir de diverses sources carbonées : Résultats

Les principaux résultats obtenus dans la culture en mode discontinu entre les fioles et le bioréacteur. Comme prévu, L'organisme typique de l'accumulation lipidique *Y. lipolytica* était capable de accumuler du SCO (TAG) et était son métabolisme peut être bien adapté à l'utilisation de substrats lipidiques différents. Fickers *et al.* (2005) ont rapporté que l'accumulation de lipides dans les levures oléagineuses se produit sous forme de LBs, et les rendements en lipides et la composition en acides gras et le degré d'insaturations sont affectés selon le type et la concentration de la source de carbone (Granger *et al.* 1993 ; Ratledge et Wynn 2002 ; Amaretti *et al.*, 2010), son rendement est également affecté par le type de culture et ses conditions, Par conséquent, la capacité de la souche de levure à croître et à accumuler des lipides sur différents substrats lipidiques tels que l'acide oléique et les déchets huileux (WCO, OMW) a été évaluée dans des cultures en bioréacteur.

cette étude a principalement permis également une enquête rapide et une courte comparaison sur le comportement de cette souche(en fioles et bioréacteurs) et d'analyser ses performances par observation microscopique de l'accumulation de lipides à l'aide du microscope à fluorescence Nile Red (l'observation la plus précise des lipides intracellulaire), mesure de la biomasse, détermination du rendement en lipides totaux et de la teneur en lipides sur les différents lipides substrats lorsqu'il est cultivé dans des cultures de bioréacteur . Les résultats obtenus sont illustrés aux figures (31 et 32).

B.2.1.Comportement du *Y. lipolytica*

Préliminaire, la figure 31 a présenté les résultats cinétiques et le comportement de *Y. lipolytica* cultivée dans des flacons agitateurs, car elle comprenait la cinétique de croissance et le pH de la souche, suivis d'une observation microscopique avec et sans Soudan noir en milieu de fermentation sur tous les milieux mentionnés ci-dessus à 48h de fermentation (étant le point le plus fluorescent pour les cellules de la souche, sur la base de l'analyse préliminaire). Principalement, les résultats comprenaient également la cinétique de croissance de la souche dans le bioréacteur avec mesure de la biomasse ainsi que l'observation de l'accumulation de lipides à l'aide du microscope à fluorescence Nile Red(LB) (Bouchedja *et al.*, 2017), et le pH a été ajusté à 6 comme le meilleur nombre de pH pour l'accumulation de lipides (Bouchedja *et al.*, 2018).

B.2.1.1. Croissance de *Y. lipolytica*

En regardant la figure 30 concernant les résultats cinétiques (croissance cellulaire), la même tendance a été observée qui amorce une croissance exponentielle jusqu'à 24 h de culture en milieu glucose et acide oléique. tandis que dans les milieux de déchets (WCO, OMW) (Figure 31 (c,d)) , la croissance des cellules était plus lente par rapport aux deux premiers médias (Fig 31 (a,b)). Dans ces conditions et au début de la fermentation (la phase de latence est observée), et les taux de croissance des cellules et aussi d'accumulation de lipides étaient lents (peut-être en raison des activités antimicrobiennes de ces déchets), mais ils étaient plus magistraux en fin de fermentation que les cellules des autres milieux. Par conséquent, elles semblaient encore en croissance (Figure 31 (a, b)). De plus, le pH du milieu a été surveillé régulièrement et il a été observé que la croissance cellulaire sur les deux graisses n'était pas accompagnée d'une chute de pH significative tout au long de la culture, indiquant une libération mineure d'acides organiques dans le milieu. Le pH du milieu est donc toujours resté dans la plage de 6,5 à 5, ce qui représente la valeur de pH optimale la plus couramment utilisée pour la croissance des levures, lorsqu'elles sont cultivées sur des matières huile (Papanikolaou *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2007; Tzirita *et al.*, 2018; Tzirita *et al.*, 2019).

En revanche, cette souche a montré un meilleur comportement et de meilleures performances dans le bioréacteur principalement en raison des conditions de fermentation dans le bioréacteur de contrôles tels que (O₂, ph, agitation et ses systèmes), la ventilation et l'agitation étaient les plus faibles, et le pH non ajusté en fiole. De plus, la phase de latence qui se trouvait dans les flacons n'a pas été remarquée au début de la fermentation dans le bioréacteur.

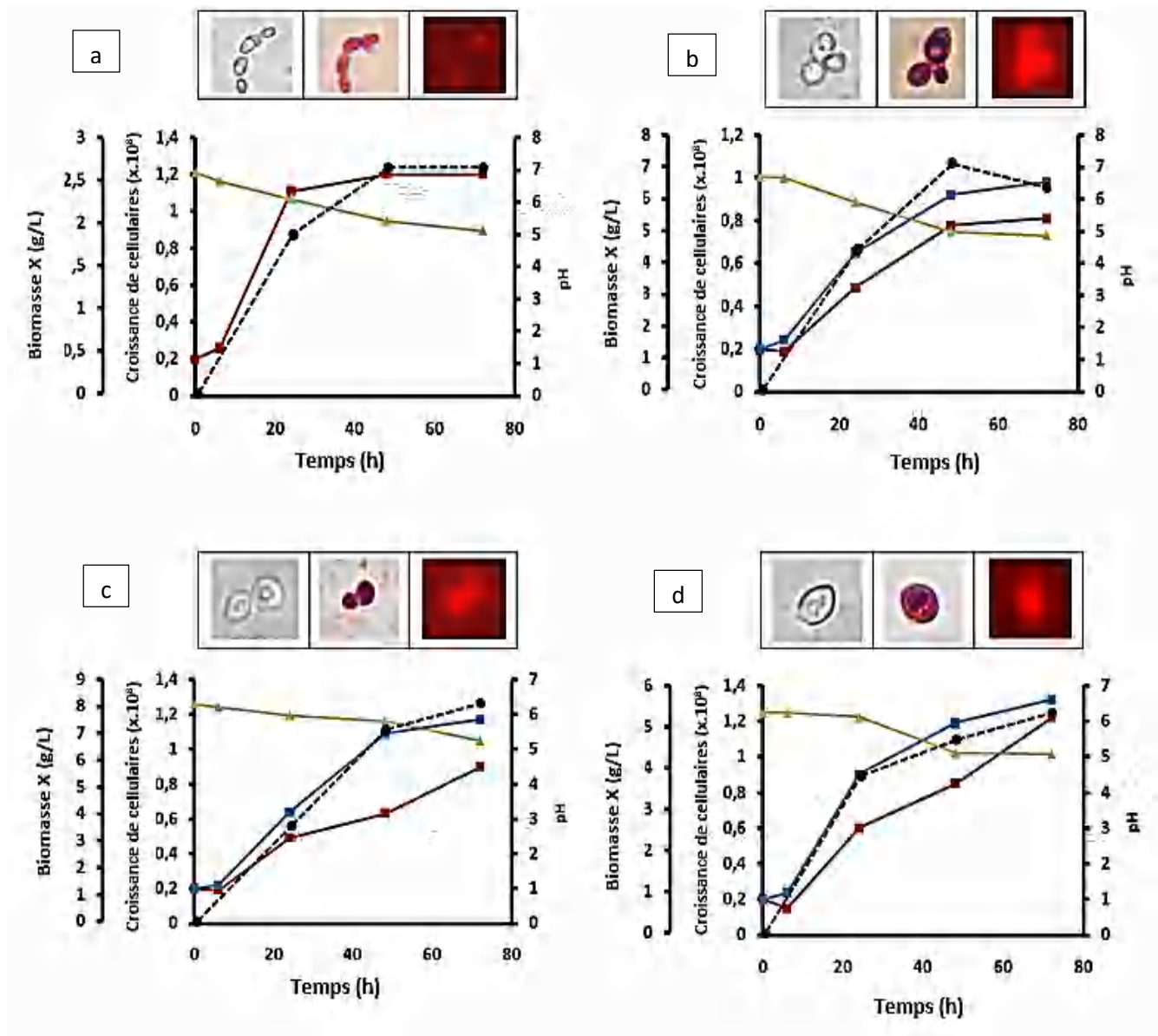


Figure 31: Cinétique de croissance cellulaire, pH, biomasse de *Yarrowia lipolytica*. Ce dernier a été cultivé sur 25 g L⁻¹ de glucose (a) , d'acide oléique (b) , OMW (d) et WCO (c) comme mentionné dans « Méthodes » . Croissance des cellules (g . L⁻¹) en fiole et bioréacteur carré pointant rouge et bleu, respectivement ; pH - triangle vert pointant vers le bas, biomasse (g L⁻¹) - cercle noir. Encart : dans chaque graphique microscopie optique (panneau de gauche), Noir Soudan (panneau du milieu) et images de microscopie à fluorescence rouge du Nile red (panneau de droite) de de *Y. lipolytica*, respectivement.

Jusqu'à présent, la levure *Y. lipolytica* était capable de se développer sur différents milieux, y compris les milieux de déchets les plus complexes. En accord avec la littérature pertinente qui indique que lors de la croissance sur des matériaux hydrophobes (le processus

d'accumulation de lipides dit "*ex novo*"), la production de lipides est un processus associé à la production de biomasse, se produisant indépendamment de l'épuisement de l'azote du milieu de croissance (Papanikolaou *et al.*, 2001 ; Papanikolaou et Aggelis 2010 ; Papanikolaou et Aggelis 2011 ; Tzirita *et al.*, 2018). L'accumulation de lipides dans *Y. lipolytica* se produit également via une voie appelée (voie *de novo*) qui se produit en présence de substrats hydrophiles (Bouchedja *et al.*, 2017 ; Carsanba *et al.*, 2020).

Quel que soit le type de fermentation (fiolle ou bioréacteur), les niveaux d'accumulation variaient considérablement entre les expériences, selon le substrat utilisé. Où la levure a réalisé une accumulation remarquable (Figure 31) dans les milieux à base d'huile, et il y avait une augmentation marquée de l'accumulation de lipides cellulaires proportionnellement au temps de fermentation selon le type de substrat lipidique utilisé. En revanche, l'accumulation de lipides de réserve sur le glucose était la plus faible.

B.2.1.2. Evaluation de la biomasse et des lipides intracellulaires (LBs)

La levure *Y. lipolytica* a présenté une croissance satisfaisante dans le bioréacteur. Concernant la biomasse, une tendance similaire a été observée avec la croissance des cellules, c'est-à-dire que l'augmentation de la biomasse s'accompagnait du niveau de croissance cellulaire dans le bioréacteur, ce qui est certainement lié au niveau d'assimilation du substrat dans les milieux. La cinétique de production de biomasse de *Y. lipolytica* (X , g.L⁻¹) est montrée dans (Figure 31). Ils représentent l'évolution dans le temps de la production de biomasse (temps de fermentation de 72 heures dans un milieu d'accumulation de lipides contenant 25 g.L⁻¹ du lipide du substrat). Dans les conditions de fermentation décrites ci-dessus, les mêmes tendances ont été observées concernant le développement de la biomasse intracellulaire de la souche *Y. lipolytica* avec une accumulation de lipides (Lbs) qui a augmenté de façon exponentielle jusqu'à 48 h de culture pour l'acide oléique et les déchets lipidiques (WCO, OMW).

Y. lipolytica a montré une augmentation de la biomasse au cours des deux premiers jours du stade de croissance exponentielle sur un milieu à base d'acide oléique, ainsi la production maximale de biomasse (X_{max}) variait entre $4,46-7,23 \pm 0,1$ g.L⁻¹, alors qu'avec les déchets lipidiques (WCO, OMW) une persistance de l'augmentation de la biomasse a été observée jusqu'au troisième jour de fermentation ainsi la production maximale de biomasse (X_{max}) variait entre $3,51-8,11 \pm 0,1$ g.L⁻¹ pour OMW et $3,87-5,40 \pm 0,1$ g.L⁻¹ pour OMW. Jusqu'à présent, les cellules semblaient encore en croissance, c'est également que le substrat appliqué n'était pas totalement assimilé dans les milieux de déchets lipidiques. A ce moment, sur le

substrat lipidique dépendant de l'acide oléique (troisième jour), une diminution de la biomasse était évidente de 7,23 à $6,5 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, c'est-à-dire que les cellules ont montré une tendance à dégrader les lipides stockés.

Concernant l'évolution des lipides intracellulaires (LBs) de *Y. lipolytica*, et dépendance à l'examen initial à l'aide de Noir Soudan, les cellules étaient plus fluorescentes à 48 h de fermentation pour l'acide oléique et les déchets lipidiques (WCO, OMW). Ainsi, à ce stade de la fermentation du bioréacteurs, un colorant fluorescent, le Nile Red, a été utilisé, il s'agit d'une détermination plus précise des lipides intracellulaires (Mlickova *et al.*, 2004; Beopoulos *et al.*, 2008 ; Bouchedja *et al.*, 2017). Dont, une gouttelette lipidique intracellulaire a été observée en utilisant la microscopie à fluorescence. Par la figure 29, une variation du degré de brillance(fluorescentes)et de la taille des LB dans tous les milieux peut être observée, il a été constaté que les cellules qui se sont développées sur des substrats lipidiques étaient plus fluorescentes que les cellules en milieu glucose (YPD) dans lesquelles les cellules semblaient moins fluorescentes (Figure 30: la troisième image est pour chaque courbe), c'est-à-dire le niveau d'accumulation intracellulaire de lipides (taille des LB) était plus élevé dans les milieux qui dépendent des lipides comme substrat. Ce qui explique qu'une accumulation de type ex novo s'est produite lors de la culture dans ce milieu (Fickers *et al.*, 2005). Comme prévu, Dans ce travail la production de biomasse de *Y. lipolytica* a été fortement induite lors de l'incubation sur les substrats lipidiques par rapport au milieu glucose YPD. Par conséquent, les lipides accumulés ont été extraits et évalués pour la teneur totale en lipides cellulaires pour différents substrats lipidiques (Acide Oléique, WCO, OMW) cultivés en bioréacteur.

B.2.2.Lipides cellulaires selon substrats

B.2.2.1. Détermination des lipides cellulaires

Les lipides microbiens totaux ont été extraits des cellules sèches à la phase dans laquelle les cellules de levure étaient plus fluorescentes (le meilleur point pour l'accumulation de lipides à 48 h) dans tous les milieux pour the bioréacteur contrôlée.

La biogenèse des lipides cellulaires était différente selon les lipides substrats utilisés pour la fermentation, ainsi, Les résultats des valeurs maximales des composants obtenus dans les fermentations réalisées en bioréacteur sont présentés sur la figure 32. Le rendement maximum en lipides intracellulaires ($L, \text{ max g.L}^{-1}$). Jusqu'à présent, les valeurs maximales (L_{max}) étaient

de l'ordre de 1,24, 0,76 et 1, 17 et g.L⁻¹ avec des valeurs de lipides totaux dans la biomasse sèche (YL/X) de 17, 14 et 14, 44 % de l'acide oléique, WCO et OMW, respectivement Figure 29a. Milieu de l'oléique acide représente le plus haut niveau de rendement lipidique intracellulaire à 48 heures. Essentiellement, cette levure a également fourni une production élevée de biomasse en plus de la teneur totale en lipides lors de sa culture sur ces déchets lipidiques. Bien que les déchets lipidiques (OMW, WCO) soient considérés comme un facteur d'inhibition des cellules (et donc affectent négativement l'accumulation de lipides) (Papanikolaou *et al.*, 2008; Katre *et al.* 2017; Sarris *et al.*, 2017 ; Tzirita *et al.*, 2019), mais ces substrats Lipides-Déchets dans le milieu ont stimulé la production totale de lipides. Ainsi, les résultats indiquent que Lipides-Déchets peut agir comme un milieu « lipogénique » naturel, et ils sont en accord avec les résultats publiés dans la littérature, car il a été rapporté que la présence de Lipides-Déchets améliore l'accumulation de lipides non seulement dans *Y. lipolytica* mais aussi dans d'autres genres (Martínez *et al.*, 2015 ; Lopes *et al.*, 2019 ; Fabiszewska *et al.*, 2022).

D'après ce qui précède, la concentration lipidique intracellulaire était dans la plupart des cas régulièrement augmentée au cours de toutes les fermentations. Plus précisément, concernant milieu YPDOA (l'acide oléique) la masse des lipides L_{max} a augmenté avec le temps de fermentation (c'est-à-dire pendant la phase de croissance exponentielle qui a duré jusqu'à 48 heures) après ce point (c'est-à-dire lorsque les cellules sont entrées dans la phase de croissance stable qui a duré jusqu'à 72 h), la masse lipidique accumulée a diminué (Figure 29 b). De même, la même tendance a été observée pour le reste des milieux lors de la détection initiale en utilisant Noir Soudan (Figure 32).

D'autre part, la valeur YL/X_{max} a augmenté avec OMW dans le milieu de culture de 18,14 %, par rapport à la WCO de 17.59 %. L'accumulation de lipides a continué à devenir fluorescente avec une augmentation de la décoloration dans le milieu de culture. Apparemment, la levure a favorisé l'augmentation de la production de lipides dans sa biomasse (YL/X en % w/w) avec OMW (et les composés phénoliques dans le milieu).

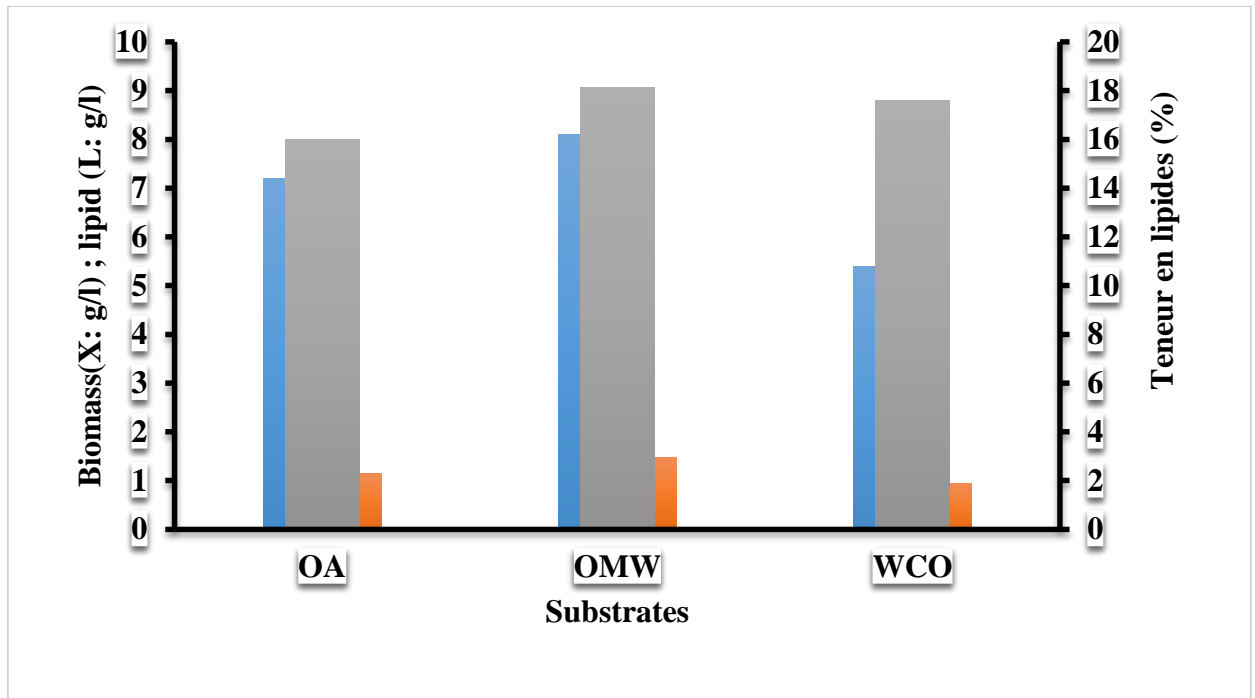


Figure 32: Biomasse, rendement lipidique et teneur en lipides de *Y.lipolytica* cultivé sur différents supports des substrats lipidiques : Bar (bleu) Biomasse (X, g L⁻¹), Bar (écorce rouge) Lipide (L, g L⁻¹), Barre (verte) Teneur en lipides (YL/X) (%). N. B: OA: oleic acid; OMW: olive-mill-wastewater; WCO: Waste cooking oil.

B.2.2.2. variation global de performance souche en condition de croissance

D'une manière globale, les résultats obtenus permettent de souligner l'importance de condition des cultures et générations des lipides, de leur distribution intracellulaire et leur impact sur le rendement, dont la diminution supposée au fur et à mesure de l'apport progressif en substrats pourrait expliquer la diminution des cinétiques et des rendements de conversion de substrat en biomasse observés à partir des substrats carbonés en fioles (Figure 31).

Afin de évalue lipides cellulaires pendant la période d'incubation, nous avons fait une mesure de poids des lipides extraits du milieu en présence d'acide oléique YPDOA à 24h, 48h et 72h de mise en culture en fiole et en bioréacteur (Figure 33). D'après les résultats obtenus et à titre comparatif, la souche accumulent les lipides de manière très semblable, on note une augmentation remarquable de la teneur en lipides accumulés par la levure *Y.lipolytica* durant les premières heures de la mise en culture, avec un maximum d'accumulation après 48 h de culture. Où s'arrive jusqu'à 12% à 48 heures et 16 % en bioréacteur. Ce qui explique l'influence des conditions de cultures sur le rendement. Par la suite, la teneur en lipides présente une diminution à 72 heures.

Ceci est vraisemblablement dû à la dégradation des lipides par β -oxydation peroxysomale, cette observation soutient les confirmations d'Aggelis *et al.* (1995), stipulant que les microorganismes oléagineux qui poussent sur les graisses consomment généralement leurs propres lipides de stockage, lorsque le débit des acides gras extracellulaires est considérablement diminué dans le milieu de culture et qu'il ne peut plus couvrir les besoins métaboliques microbiens.

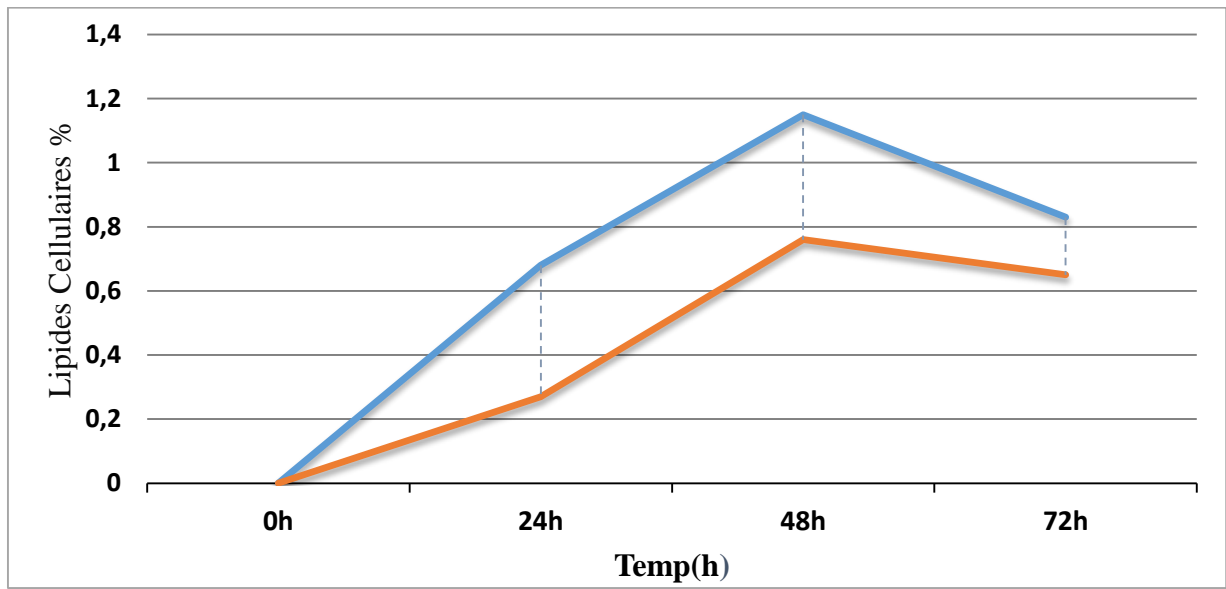


Figure 33: Lipides cellulaires pendant la période d'incubation *Y. lipolytica* du milieu YPDOA à 24h, 48h et 72h.

Ces résultats sont différents à ceux rapportés par Beopoulos, (2009), qui affirme que dans un milieu contenant l'acide oléique le contenu maximal des souches en lipides atteint le 15 % du poids sec après 11 heures de culture. Ce dernier reste constant pendant la première partie de la phase stationnaire (jusqu'à 24 heures) et puis diminuer. Des valeurs très similaires ont été obtenues en mode batch par différentes équipes (Papanikolaou *et al.*, 2002). Où le contenu maximal en lipides obtenu est nettement inférieur à ce qui peut être obtenu en mode fed-batch. En effet, dans la bibliographie, l'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica* peut atteindre de taux proches de 40 % (Cescut, 2009). Selon Papanikolaou *et al.* (2006), qui montre que l'accumulation de lipides est toujours dépendante de l'influx de carbone. Une fois le réservoir de carbone extracellulaire épuisé, les lipides stockés peuvent être mobilisés. Pour cette raison, les cultures en batch ne permettent pas l'accumulation de taux élevés de lipides. Beopoulos, (2009), qui révèle que la dégradation des lipides par β -oxydation peroxysomale, induite par la limitation des ressources de carbone dans le milieu, est notable dans le cas où les levures sont cultivées en présence d'acide oléique. Comme dans ce travail, On peut remarquer que la souche

a tendance à dégrader vite ses réserves lipidiques, ce qui est très marqué dans le cas de la culture en acide oléique.

B.3. Analyse de la composition en acide gras

L'un des objectifs de l'étude est la comparaison la composition en acide gras des lipides accumulés de différents substrats lipidique. Le profil en acide gras visé est centré sur le insaturé. Mode de culture en ce travail durant la phase de croissance ne permet pas une analyse cinétique comparative des vitesses de synthèse des différents acides gras. Donc après quantifications du total lipide cellules en fin culture (chez la valeur maximale d'accumulation), des acides gras estérifiés (TG) sont réalisés et comparés avec les profils en acides gras selon substrats utilisés. Parmi types des levures utilisées, différents paramètres opérationnels (pression, concentration en oxygène dissous, température, agitation) et le paramètre de composition du milieu de culture (substrats) (Granger et al. 1992) est important dans l'accumulation d'acides gras microbiennes. Il est bien connu que les profils d'acides gras des lipides produits sont affectés par la teneur en acides gras des huiles dans le substrat (Saygün et al. 2014; Daskalaki et al. 2018, 2019). Ceci est typique des levures, selon Cescut (2009), les constitutifs acides gras par levures sont répartis en deux hypothèses de répartition, soit tous les acides gras synthétisés sont répartis uniformément selon substrats en milieu soit il y a une sélectivité dans la modification des acides gras de la souche. Selon les recherches, l'absorption sélective d'acides gras de *Y. lipolytica* peut s'expliquer par deux systèmes de transport sélectifs de longueur de chaîne différents : un système de support est spécifique aux acides gras C12 et C14, tandis que le second est spécifique aux acides gras C16 et C18 (Darvishi *et al.* 2009). Les acides gras de C12, 14 et 16 sont utilisés pour la croissance, tandis que C18 est accumulé comme lipide de réserve et stocké (Papanikolaou *et al.*, 2000, 2002). Généralement, les souches de *Y. lipolytica* ont tendance à accumuler des acides gras mono-insaturés et saturés lorsqu'elles sont cultivées sur des matières grasses (Papanikolaou *et al.*, 2002, 2003, 2007). La croissance et l'accumulation de lipides par *Y. lipolytica* s'est avérée augmentée dans les milieux contenant des acides gras saturés (C16 :0 et C18 :0), et le lipide microbien s'est avéré contenir des quantités élevées d'acide stéarique (Papanikolaou *et al.*, 2003 ; Ackman 2005). Le lipide microbien a été affecté par la composition en acides gras de la substrat utilisé (Saygun *et al.*, 2014), il a donc été possible de produire des substituts de graisse avec la composition en acides gras souhaitée en utilisant des souches sélectionnées de *Y. lipolytica*, *sp Rhodotorula*, *sp Mucor*, *spp Candida*, et *Rhodosporidium toruloides* (Beopoulos 2006; Papanikolaou and Aggelis 2011)

B.3.1. Profils acide gras rencontrés chez *Y. lipolytica*

Yarrowia lipolytica est connu pour incorporer directement les substrats gras d'une manière inchangée ou pour accumuler le substrat sous une forme modifiée (Beopoulos *et al.* 2009). La composition en acides gras (AG) des lipides intracellulaires de la souche a été évaluée sur différents milieux (OA, WCO et OMW) pour le bioréacteur-contrôlée.

Y lipolytica possède un profil d'acide gras différent selon substrat (Figur34, 35 et 36), Où son degré d'instaurations est différent. Ses acides gras majoritaires sont le C18 :2 et le C16 :0 puis C16 :1, On notera également un taux élevé d'acide oléique. La présente étude a montré l'impact des sources de carbone et de leurs concentrations sur l'accumulation de lipides par la souche. Il apparait une différence notable de profil entre les acides gras de la biomasse catalytique (croissance) selon substrats :

B.3.1.1. Profils d'acides gras de *Y lipolytica* cultivés sur margine (YPDOMW)

Figure 34 et tableau 11 montré des acide gras de lipide accumulée (SCO) par *Y lipolytica* d'un milieu qui dépend du margine (OMW) comme source de carbone. L'analyse GC-MS a montré que le total des esters d'acides gras produits était de 99.55 %. La composition en acides gras comprend l'acide linoléique C18 :2, l'acide oléique C18 :1, l'acide palmitique C16 :0, l'acide stéarique C18 :0 et acide palmitoléique C16 :1. Les acides gras saturés sont présentés par l'acide palmitique et l'acide stéarique tandis que les acides gras insaturés sont présentés par l'acide oléique et palmitoléique en tant qu'acides gras monoinsaturés (MUFA) et l'acide linoléique en tant qu'acides gras polyinsaturés (PUFA). L'acide oléique et linoléique était l'acide gras largement abondant dans le SCO produit de *Y lipolytica*.

Tableau 10. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par *Y. lipolytica* avec margine (OMW) comme substrats de carbone

Acide gras	Formule moléculaire	Nombre de lipides	Pourcentage (%)	acides gras (%)
Aaid Palmitoléique	C 16 H 30 O 2	C16:1	0,89	
Acide palmitique	C 16 H 32 O 2	C16:0	8,47	
Acide Linoléique	C 18 H 32 O 2	C18:2	25,01	
Acide Oléique	C 18 H 34 O 2	C18:1	60,49	
Acide Stéarique	C 18 H 36 O 2	C18:0	1,99	
Autre			2.7	
Acides Gras : Saturés				10.46
Acides Gras: Monoinsaturés				25,9
Acides Gras : polyinsaturés				60,49
Total des acides gras				99.55

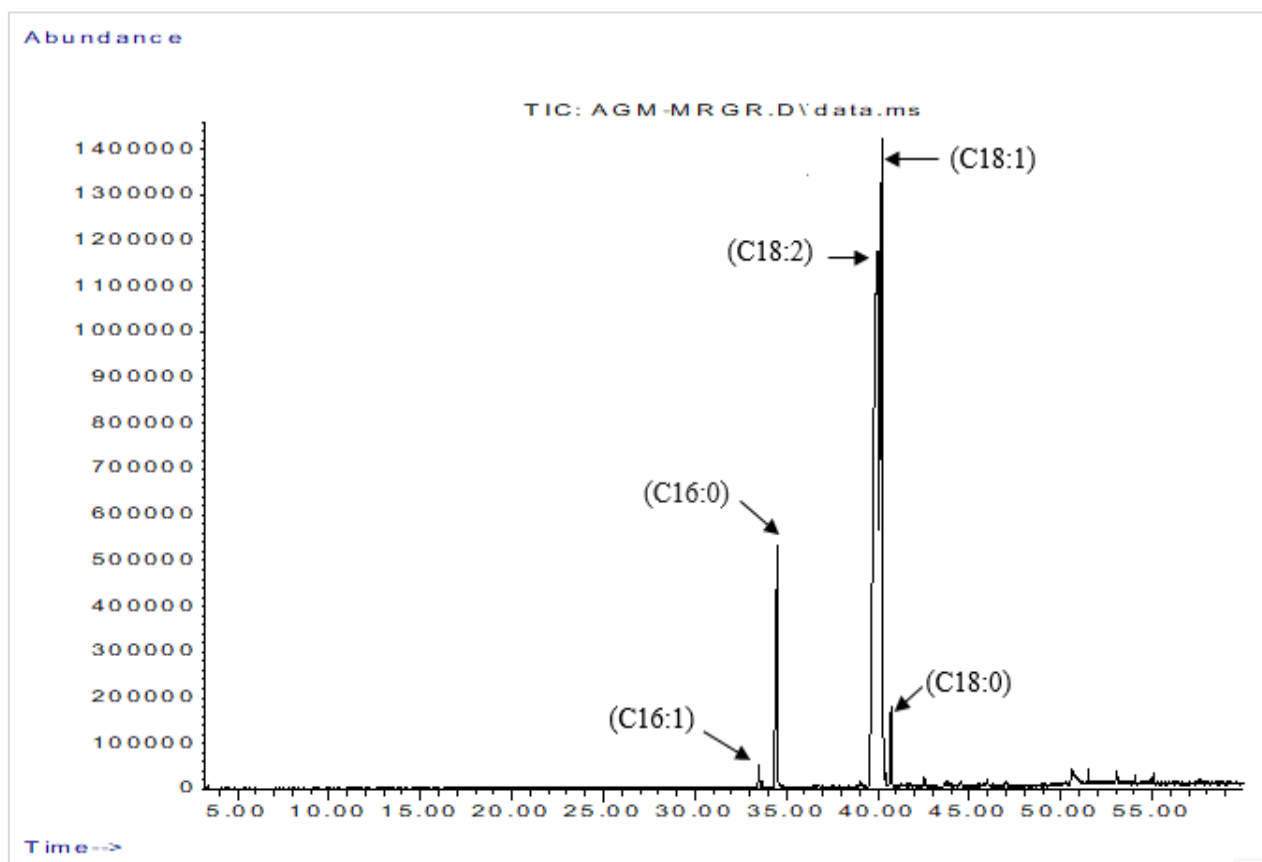


Figure 34: Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de *Y. lipolytica* avec margine (OMW) comme substrats de carbone

B.3.1.2. Profils d'acides gras de *Y lipolytica* cultivés sur Huile usée (YPDWCO)

Figure 35 et tableau 12 montrés des acides gras de lipide accumulée (SCO) par *Y lipolytica* d'un milieu qui dépend de l'huile usée (WCO) comme source de carbone.

L'analyse GC-MS a montré que le total des esters d'acides gras produits était de 99,82 %. La composition en acides gras comprend l'acide linoléique C18 :2, l'acide oléique C18 :1, l'acide palmitique C16 :0, l'acide stéarique C18 :0 et l'acide palmitoléique C16 :1. Les acides gras saturés sont présentés par l'acide palmitique et l'acide stéarique tandis que les acides gras insaturés sont présentés par l'acide oléique et palmitoléique en tant qu'acides gras monoinsaturés (MUFA) et l'acide linoléique en tant qu'acides gras polyinsaturés (PUFA). Des acides oléique et linoléique étaient des acides gras largement abondants dans le SCO produit de *Y lipolytica*.

Tableau 11. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par *Y. lipolytica* avec huile usée (WCO) comme substrats de carbone

Acide gras	Formule moléculaire	Nombre de lipides	Pourcentage (%)	Acides Gras (%)
Acide Palmitoléique	C 16 H 30 O 2	C16:1	3,21	
Acide Palmitique	C 16 H 32 O 2	C16:0	14,28	
Acide Linoléique	C 18 H 32 O 2	C18:2	36,58	
Acide Oléique	C 18 H 34 O 2	C18:1	42,43	
Acide Stéarique	C 18 H 36 O 2	C18:0	2,05	
Autre			1,45	
Acides Gras : Saturés				16.33
Acides Gras: Monoinsaturés				45.46
Acides Gras : polyinsaturés				36.58
Total des acides gras				99.82

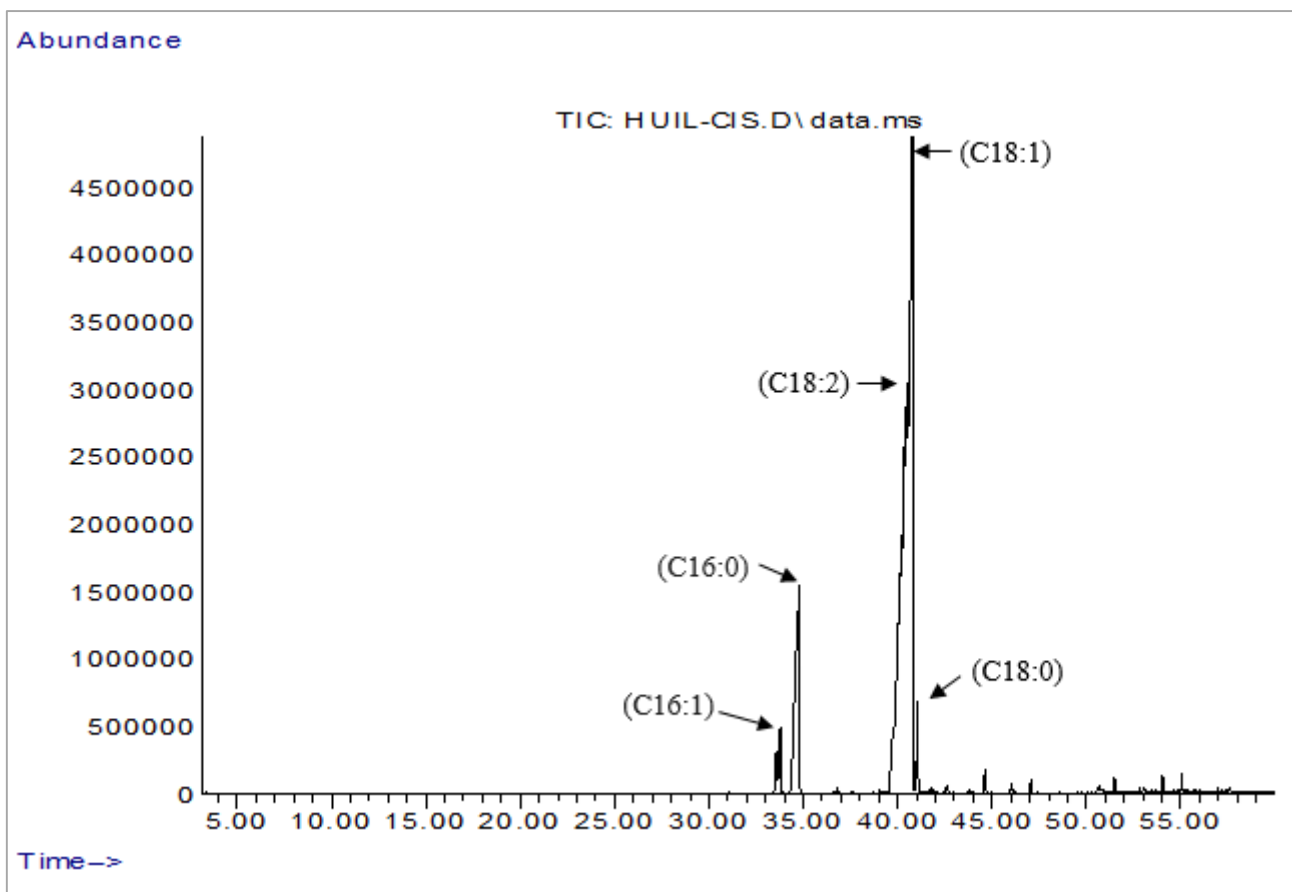


Figure 35 : Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de *Y. lipolytica* avec huile usée (WCO) comme substrats de carbone

B.3.1.3. Profils d'acides gras de *Y lipolytica* cultivés sur l'acide oléique (YPDOA)

Figure 36 et tableau 13 montrés des acides gras de lipide accumulés (SCO) par *Y lipolytica* d'un milieu qui dépend de l'acide oléique comme source de carbone. L'analyse GC-MS a montré que le total des esters d'acides gras produits était de 100 %. La composition en acides gras comprend l'acide linoléique C18 :2, l'acide oléique C18 :1, l'acide palmitique C16 :0, l'acide stéarique C18 :0 et l'acide palmitoléique C16 :1. Les acides gras saturés sont présentés par l'acide palmitique et l'acide stéarique tandis que les acides gras insaturés sont présentés par l'acide oléique et palmitoléique en tant qu'acides gras monoinsaturés (MUFA) et l'acide linoléique en tant qu'acides gras polyinsaturés (PUFA). L'acide oléique C18 :1 était l'acide gras largement abondant dans le SCO produit de *Y lipolytica*.

Tableau 12. Profil des acides gras de la biomasse catalytique par *Y. lipolytica* avec l'acide oléique comme substrats de carbone

Acide Gras	Formule moléculaire	Nombre de lipides	Pourcentage (%)	Acides Gras (%)
Acide Palmitoléique	C 16 H 30 O 2	C16:1	0,58	
Acide palmitique	C 16 H 32 O 2	C16:0	6,96	
Acide Linoléique	C 18 H 32 O 2	C18:2	36,29	
Acide Oléique	C 18 H 34 O 2	C18:1	48,42	
Acide Stéarique	C 18 H 36 O 2	C18:0	3,77	
Autre			3.99	
Acides Gras : Saturés				10.73
Acides Gras: Monoinsaturés				49
Acides Gras : polyinsaturés				36.87
Total des acides gras				100

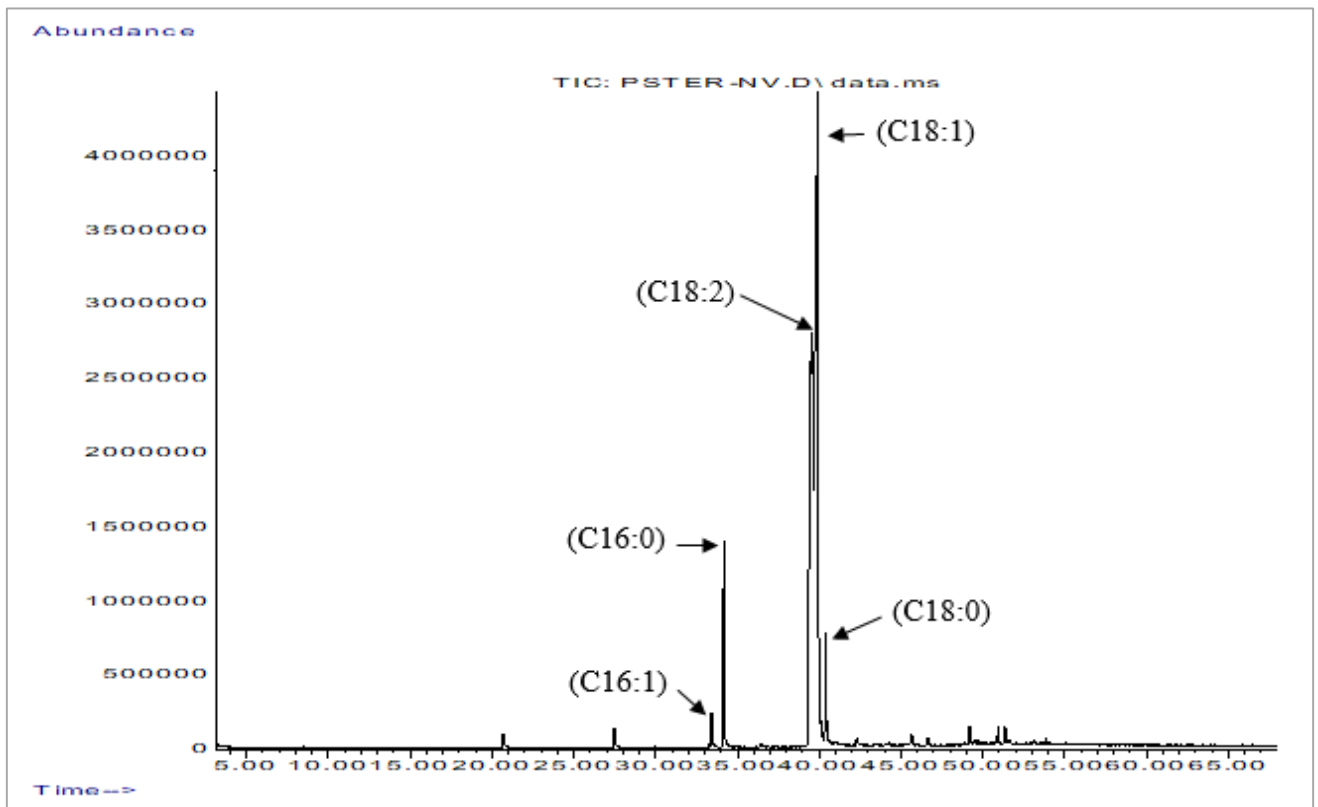


Figure 36: Analyse GC-MS du mélange d'esters méthyliques d'acides gras de *Y. lipolytica* avec l'acide oléique comme substrats de carbone

B.3.2. Impact global de substrats

Comme vu précédemment, Les effets des différentes sources de carbone, glucose, acide oléique, acide linoléique, huile de ricin et huile usée et margine sur la comportement cinétique et performances de la levure *Y. lipolytica* qui a été présentée en partie une (B) en résultats initiaux expérimentaux d'analyse et caractérisation du comportement de levure *Y.lipolytica* montré que la différence dans le comportement cinétiques, soit croissances et forme cellule soit performances de la souche d'accumulation de lipide était devrait. Les cellules se sont multipliées rapidement sur le milieu qui dépend de glucose par rapport aux autres des milieux lipides (notamment les déchets lipidique), dans lesquels un ralentissement de croissances a été observé en début de culture, la différence comprenait également les niveaux d'accumulation de lipides et la forme des cellules. Dans cette partie les effets des différentes sources de carbone sur la biomasse et la teneur en lipides de *Y. lipolytica* sont présentés. En générale, la culture par le bioréacteur l'utilisation en cette partie de travaile a amélioré le comportement cinétique (croissances) et aussi performances de la souche d'accumulation de lipide.

Des études antérieures ont indiqué que la composition en acides gras du substrat hydrophobe affectait l'accumulation de lipides dans les cellules et que l'accumulation de lipides augmentait se développait également mieux en présence de mélanges d'acides gras (Papanikolaou et al. 2003; Papanikolaou and Aggelis 2003b, 2011b; Athenstaedt et al. 2006). Comme dans ce travail, *Y. lipolytica* a produit des quantités détectables de biomasse et de lipides très différents variant dans une large gamme. De plus, Il est bien connu aussi que les profils d'acides gras des lipides produits sont affectés par la teneur en acides gras des huiles dans le substrat, ce qui est cohérent avec les observations de cette étude (Saygun *et al.*, 2014 ; Daskalaki *et al.*, 2018). Selon Chatzifragkou *et al.* (2011), l'ajout d'huile au milieu affectait la composition lipidique cellulaire et augmentait la saturation en acides gras, les résultats ont indiqué que le milieu contenant du acide linoléique favorisait la production d'huile microbienne contenant du acide linoléique.

Les tableaux 11,12et 13 liste les profils d'acides gras de SCO produit par *Y.lipolytica* de trois substrats (margine, huile usée et acide oléique, respectivement). Le profil des acides gras a présence d'acides gras saturés (AGS) en C16 et C18 et d'acides gras mono insaturés (AGMI). Le profil des acides gras a montré avait une différence notable dans le pourcentage d'accumulation d'acides gras dans les cellules de levure selon les milieux utilisée dans la culture, ceci est typique des levures, *Y. lipolytica* est connu pour incorporer directement les substrats

gras d'une manière inchangée ou pour accumuler le substrat sous une forme modifiée (Beopoulos *et al.*, 2009). C'est-à-dire la différence dans le profil des acides gras des lipides cellulaires de *Y. lipolytica* peut être attribuée aux substrats lipidiques utilisés dans le milieu. Selon Papanikolaou et Aggelis (2003, 2010), qui ont rapporté pour d'autres souches de *Y. lipolytica* cultivées sur des mélanges d'acides gras saturés et insaturés que le profil des lipides cellulaires de *Y. lipolytica* ressemblait à la composition en acides gras du milieu. De même, la composition en AG des lipides intracellulaires de la levure cultivée sur des matières grasses ressemble à celle du milieu de culture (Papanikolaou and Aggelis 2011, 2020; Saygün *et al.* 2014; Lopes *et al.* 2018; Fabiszewska *et al.* 2022).

B.3.3. Données sur des profils en acides gras microbiens

Conformément aux travaux mentionnés dans la donnée bibliographique, le profil en acides gras intrinsèques ou accumulés chez les levures peut varier d'une souche à l'autre. Il en est de même pour les champignons, bactéries et algues. Même si acides gras palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) sont en général majoritaires chez la levure, mais, l'ensemble du profil peut être variable tableau 014. Cette la différence peut être attribuée aux substrats lipidiques utilisés dans le milieu. Ceci est typique des levures, selon Saygun *et al.* (2014) les profils d'acides gras des lipides produits sont affectés par la teneur en acides gras des huiles dans le substrat, ce qui est cohérent avec les observations de cette étude. *Y. lipolytica* est connu pour incorporer directement les substrats gras d'une manière inchangée ou pour accumuler le substrat sous une forme modifiée (Beopoulos *et al.* 2009). Dans majoritaires les expériences Tableau 15, l'acide gras C18 :1 était notablement plus élevé que les autres AG dans le lipide accumulé. Les compositions en acides gras des huiles sont conformes à la littérature, et la composition des acides gras de SCO correspondent à ceux de l'huile végétale et de l'huile de soja .suggérant ainsi que le lipide microbien pourrait être utilisé comme matière première pour la production de biodiesel. Selon Hoekman *et al.* (2012); Gao *et al.* (2017); Katre *et al.* (2017); Fabiszewska *et al.* (2021, 2022b) pour obtenir le meilleur compromis entre les propriétés d'écoulement à froid, c'est-à-dire la tendance du carburant à se solidifier à des températures plus basses, la matière première optimale pour le biodiesel devrait avoir des niveaux relativement faibles de graisses saturées et des niveaux élevés de graisses insaturées. Comme le montre le tableau 1 dans nos résultats, les acides gras des lipides obtenus à partir de *Y. lipolytica* étaient pour la plupart insaturés, ce qui convient parfaitement à la production de biodiesel.

Tableau 13. Composition en acides gras des lipides accumulés chez *Yarrowia lipolytica* cultivés sur diverses des substrats.

Souche	Substrats	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Autres	Référence
<i>Y. lipolytica</i>	acide oléique	6-8	1-3	0-1	65-70	12-20			Cescut, 2009
JMY330	acide oléique	6.5	3	0.5	64	26			Beopoulos 2009
YB 423-12	Sésame	13.2	0.0	5.1	54.5	27.2			Saygun <i>et al.</i> 2014
YB 423-12	Colza	18.8	0.0	10.7	49.9	14.7	5.9		Saygun <i>et al.</i> 2014
YB 423-12	Graine de lin	6.7	2.8	10.2	28.6	15.6	35.9		Saygun <i>et al.</i> 2014
A6	OMW Glycerol	+ 12.1	5.6	6.7	60.1	13.6			Dourou <i>et al.</i> 2016
S11	OMW Glycerol	+ 12.4	11.4	8.2	57.6	9.7			Dourou <i>et al.</i> 2016
LGAM S (7)	OMW	16.4	7.2	5.2	52.1	20.1			Dourou <i>et al.</i> 2016
CICC 31596	Acide acétique	13.3	3.9	10.5	43.6	21.6	2.3		Gao <i>et al.</i> 2017
ACA-DC 50109	Suif de boeuf	13.9	7.1	40.3	30.6	4.9		3.2	Daskalaki <i>et al.</i> 2018
ACA-DC 50109	Huile de tournesol	5.2	1.9	2.8	30.9	55.7		3.4	Daskalaki <i>et al.</i> 2018
ACA-DC 50109	Huile de palme	23.8	1.9	3.8	39.1	15.8		15.6	Daskalaki <i>et al.</i> 2018
ACA-DC 50109	Huile de lin	5.5	1.6	2.0	21.2	17.9	36.3	15.6	Daskalaki <i>et al.</i> 2018
ACA-DC 50109	Huile d'olive	9.2	5.4	2.7	65.9	15.2		0.6	Daskalaki <i>et al.</i> 2018
ACA-DC 5029	OMW Glycerol	+ 11.5	4.5	5.4	61.3	17.3		1.01	Sarris <i>et al.</i> 2019
ATCC 20460	Huil usé	12.5	0.01	3.3	21.9	62.2			Lopes <i>et al.</i> 2018
ACA-YC 5033	OMW Glycerol	+ 11.5	5.1	3.7	62.7	17.0		1.01	Tzirita <i>et al.</i> 2017
LFMB 20	Huile d'olive	10.7	5.8	2.8	60.7	19.9			Tzirita <i>et al.</i> 2018
LFMB 20	Beurre	38.4	1.3	6.1	37.4	16.5			Tzirita <i>et al.</i> 2018
ACA-YC 5031	OMW Glycerol	+ 11.7	10.6	6.5	62.9	8.4			Tzirita <i>et al.</i> 2019
NCIM3589 YIB6	Huil usé	29.1	0.0	6.3	33.6	12.3			Katre <i>et al.</i> 2017
NCIM3589 YIC7	Huil usé	28.1	4.1	6.1	40.1	16.0			Katre <i>et al.</i> 2017
JMY 775	Acide oléique	6.96	0.58	3.77	48.42	36.29		3.99	Al Mualad <i>et al.</i> 2022
JMY 775	Margine	8.47	0.89	1.99	60.94	25.01		2.7	AlMualad <i>et al.</i> 2022
JMY 775	Huil usé	14.28	3.21	2.05	42.43	36.58		1.45	AlMualad <i>et al.</i> 2022

B.4. Gestion des déchets huileux dans la culture de *Y. lipolytica*

Les solutions de gestion des déchets, y compris la valorisation des déchets dans les procédés biotechnologiques, sont une question importante qui doit être explorée. Parmi les méthodes créées ci-dessus, l'application réussie des déchets dans la culture de nouvelle souche *Y. lipolytica* peut être considérée comme la solution proposée et moyen de réutiliser les flux d'eaux usées et les huiles usées, par exemple les huiles résiduelles, ainsi réduction coûts de fermentation et les composés toxiques et aussi production de la valeur ajoutée (lipides microbiens) par un procédé biotechnologique décrit dans figure 37.

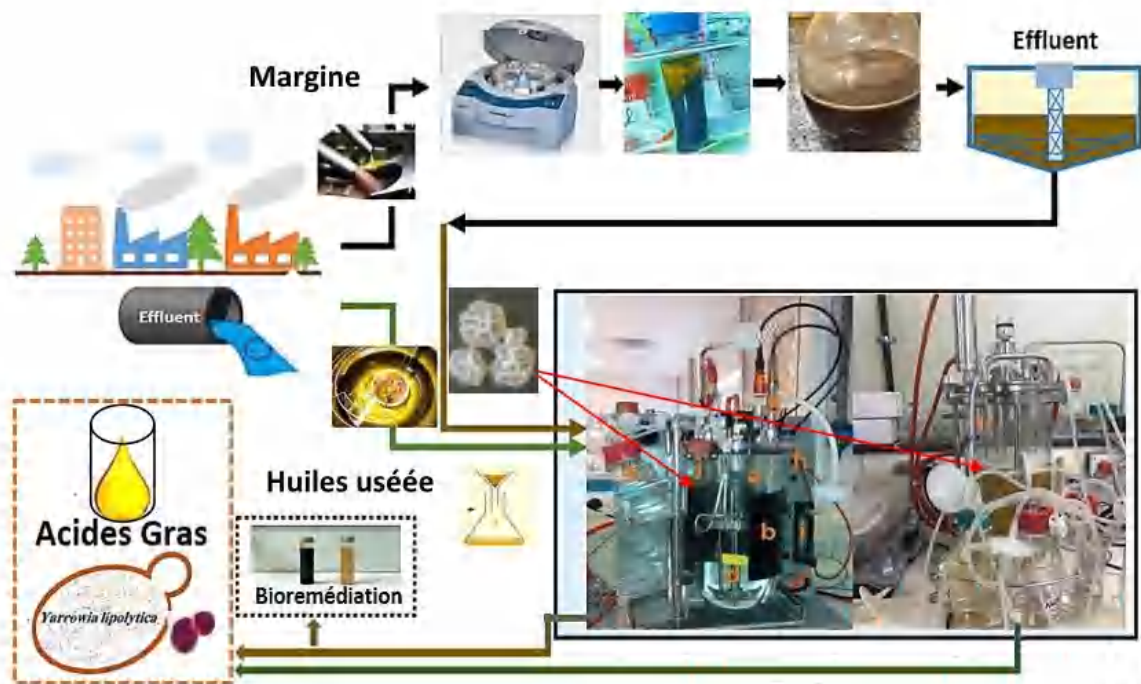


Figure 37: Procédé biotechnologique dans la gestion des déchets huileux dans la culture de *Y. Lipolytica*.

Concernant la préservation de l'environnement et les coûts de la bio-production ont fait de la biodégradabilité un critère de conception critique en termes de sélection des matières premières. Donc, avec la génération accrue d'huiles déchets, elles peuvent être considérées comme des matières premières pour les processus microbiens et une application durable afin environnementales et industrielles (Bankar et al. 2009a; Gao et al. 2017; Lopes et al. 2018, 2019; Liu et al. 2021).

B.4.1. Bioremédiation

Concernant la préservation de l'environnement ont fait de la biodégradabilité un critère de conception critique en termes de la remédiations. La culture de levure a été réalisées dans des cultures en fioles pour étudier la croissance et l'adaptation de *Y. lipolytica* sur divers substrats (Partie I) ; et en bioréacteur pour étudier la croissance de la biomasse et comparer les performances de *Y. lipolytica* avec les conditions de fermentation améliorées telles que la régulation de l'oxygène et du pH dans le milieu de fermentation (première et deuxième partie). En complément, la biodégradation de l'huile de cuisson usagée et des déchets des huileries à huile et son application comme matières première et inducteur (de lipase) de la production de lipides dans les cultures de *Y. lipolytica* ont été étudiées, à la fois dans des flacons agités et à l'échelle du bioréacteur. La capacité de cette souche à dégrader l'huile usée a été évaluée par le suivi du comportement et les performances de la souche tout au long des cultures. L'ajout d'huile de cuisson usée ou des déchets des huileries à huile au milieu a entraîné une augmentation significative de la performance de la souche liée à la croissance et à l'accumulation de lipides, qui est probablement attribué à production de lipase extracellulaire par la levure, par rapport aux cultures sans huile. Ceci confirme la pertinence du des déchets huileux étudié comme inducteur de la biosynthèse des lipases au milieu, ensuit production de lipides, ce qui est un fait très intéressant, d'un point de vue économique. Ces résultats ont été confirmés lorsqu'une stratégie fed-batch en bioréacteurs a été proposée. Où l'une des résultats de l'étude actuelle a été la bio remédiation des déchets dans des conditions de culture optimisées ; notamment les effluents des huileries. Ils sont le principal produit résiduel de la transformation des olives et leur élimination représente un problème environnemental important dans les pays méditerranéens, en particulier en Alegria où la production d'huile d'olive est largement reçue sous une forme révisée et concentrée sur une courte période. L'effluent se caractérise non seulement par sa charge polluante élevée, sa salinité et ses niveaux phytotoxiques de polyphénols, mais également par une quantité élevée de composés organiques et de minéraux végétaux (Bankar et al. 2009). En complément, il est difficile à traiter par les méthodes conventionnelles et les approches biotechnologiques sont généralement considérées comme plus respectueuses de l'environnement. Par conséquent, le processus d'optimisation a été analysé à l'aide de la méthodologie de surface de réponse dans la décoloration (Assas et al. 2002; Dourou et al. 2016; Tzirita et al. 2018).

B.4.1.1. Décoloration des déchets des huileries à huile

L'étape limitante de bio remédiation des OMW est la dégradation de ses composés phénoliques (et donc l'élimination de la couleur sombre des OMW), ainsi que l'élimination de la DCO est corrélée à l'élimination de la couleur (Aggelis et al. 2003; Lanciotti 2005; Papanikolaou and Aggelis 2009b; Sarris et al. 2019a; Tzirita et al. 2019; Papanikolaou and Aggelis 2020a). Dans ce travail, la souche de levure *Y. lipolytica* a été testée pour sa capacité à décolorer les colorants noirs. Où la décoloration a été évaluée par spectrophotométrie pendant la temps de cultures 72 h. Dans le présent travail concernant les eaux usées des moulins à olives (OMW), la bioremédiation du milieu a sans aucun doute eu lieu, où la décoloration du OMW brut est illustrée avant et après la fermentation avec *Y. lipolytica* à la Figure 38.

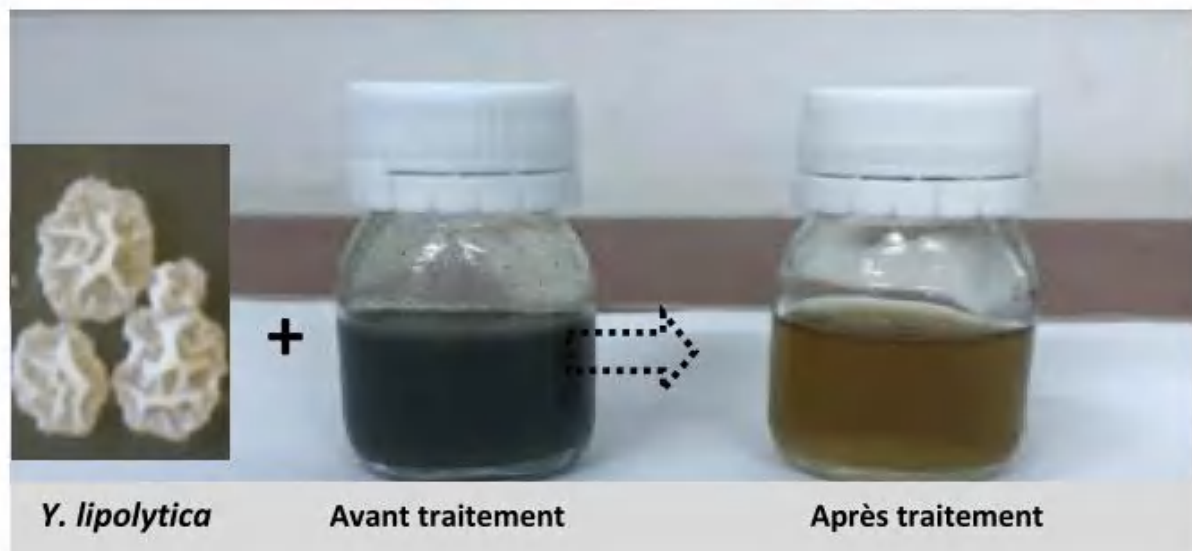


Figure 38: Décoloration des eaux usées des huileries à huile après traitement par *Y. lipolytica*.

Dans ce cas (en présence de 25 g/L du OMW), et dans des conditions optimales pour évaluer la couleur et éliminer la DCO lors de la croissance de la *Y. lipolytica*, connaissant sa capacité à s'adapter à des conditions environnementales strictes. L'analyse par spectroscopie UV-vis a confirmé la biodégradabilité des déchets des huileries à huile par la levure. La cinétique de décoloration exposée de la souche a permis une décoloration complète (90 %) du OMW à 3 jours. Là où l'efficacité d'élimination était variable, la couleur a été éliminée de manière significative (> 89 %) en seulement 48 heures de traitement dans la phase exponentielle de croissance, puis le changement de couleur est devenu plus lent après cette période d'incubation, c'est-à-dire dans la phase de croissance stationnaire, dont le changement de couleur était d'environ 90 %, à 72 heures (Figure 39). Dans des conditions aérobies, la

décoloration pourrait être due à des réactions métaboliques et/ou à un phénomène de biosorption (Sarris et al., 2019, Tzirita et al., 2019). Tandis que dans l'étude de Sarris et al. (2019), la décoloration (couleur foncée due à la présence d'OMW) était partiellement d'environ 30 % du milieu par la souche *Y. lipolytica* ACA-DC 5029. Comme Sarris et al. (2017) ont signalé une décoloration de 55,9 % par la souche *Y. lipolytica* ACA-YC 5033 dans des milieux OMW et enrichis en glucose. Ainsi, la réduction de la couleur du OMW et de son niveau par les levures semble être un processus dépendant de la souche.

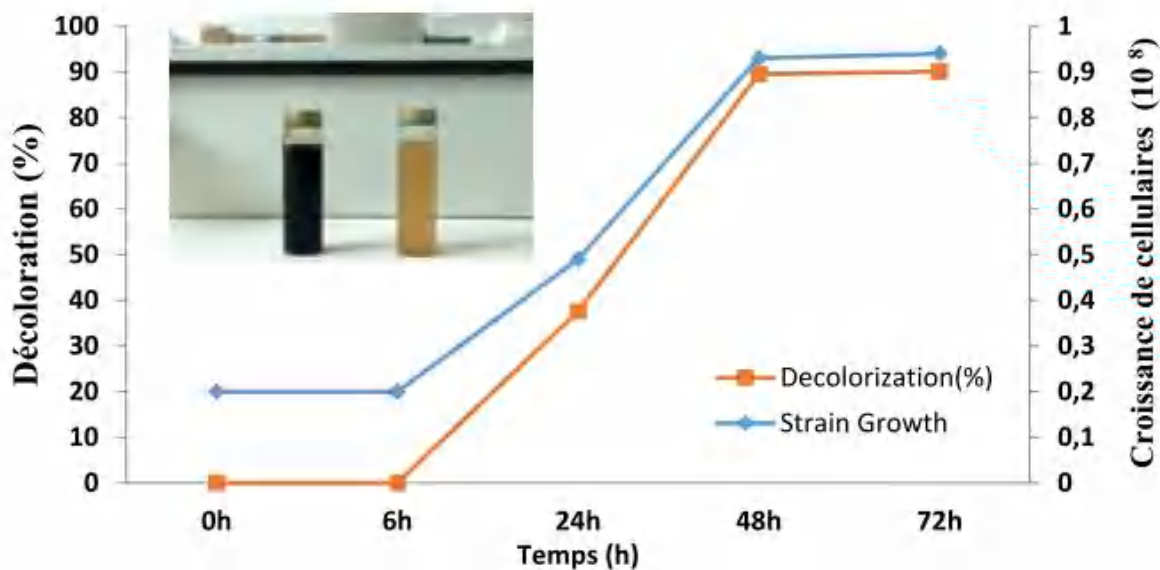


Figure 39: Cinétique de décoloration lors de la croissance de *Y. lipolytica* sur les eaux usées brutes des huileries à huile avec une concentration de ~25 g/L. Culture en bioréacteur contrôlée comme décrit ci-dessus.

Yarrowia lipolytica a été un outil biotechnologique potentiel pour la dégradation des colorants dans les eaux usées huileux, en particulier celles contenant des colorants réactifs et un outil prometteur à intégrer dans les solutions de bio remédiation, contribuant à l'économie circulaire et à l'éco-durabilité.

B.5. Discussion

Chez *Y. lipolytica*, l'accumulation des lipides se fait par deux voies : la voie de novo qui se produit en présence de substrats non hydrophobes et la voie ex novo qui se produit en présence de substrats hydrophobes (Beopoulos 2009 ; Bouchedja *et al.*, 2017 ; Katre *et al.*, 2017

; Carsanba *et al.*, 2020). Dans cette étude, le comportement de la levure *Y. lipolytica* a été évalué et ses performances (biomasse, accumulation de lipides, rendement et teneur en lipides intracellulaires maximum, La composition en acides gras (AG)) analysées lorsque cet organisme modèle connu pour accumuler des lipides a été cultivé sur différents milieux de culture dans un fiole (Comme premier test), puis en bioréacteur (procédé principal).

Initialement, les souches ont été cultivées sur glucose, puis sur un substrat hydrophobe (acide oléique et déchets lipidiques). Les niveaux de croissance variaient de manière significative entre les expériences, en fonction du substrat utilisé, principalement les déchets lipidiques des OMW et WCO ont eu un impact marqué sur le comportement de la souche étudiée. Comme prévu, la présence de OMW (composés phénoliques trouvés dans les OMW) (tzirita *et al.*, 2019) et de WCO (aldéhydes, semi-aldéhydes, hydrocarbures, radicaux alcoxy et acides) (Katre *et al.*, 2017), a légèrement entravé la croissance cellulaire (au début de la culture), ce qui a réduit la croissance comme indiqué précédemment en raison de l'effet toxique élevé des huiles usagées (Dourou *et al.*, 2016; Sarris *et al.*, 2017, 2019). Mais comme le processus de fermentation s'est poursuivi jusqu'au troisième jour, la souche est apparue plus fourmillée (à la fin de la fermentation). De manière distinctive, La souche est également capable d'utiliser efficacement les déchets lipidiques comme substrat peu coûteux pour la production de SCO.

La levure a connu une croissance remarquable ($\geq 1.12 \times 10^8 \text{ g.L}^{-1}$) dans des milieux à base de déchets, et on a observé une augmentation marquée de l'accumulation de lipides cellulaires proportionnellement au temps de fermentation, selon le type de substrat lipidique utilisé. En revanche, Comme prévu la souche de *Y. lipolytica* était capable d'accumuler de lipide par les deux voies (*de novo* et *ex novo*), significativement, cette souche a stimulé une accumulation notable de lipides de réserve lorsqu'elles sont cultivées sur des substrats lipidiques (*ex novo*) de lui dans glucose (*de novo*) (d'après le teste par coloration au noir Soudan B in fiole), où l'accumulation de lipides de réserve sur le glucose était la plus faible. Auparavant, il a été démontré que le glucose moyen affecte la graisse totale produite (Gill et al. 1977; Zhu and Jackson 2015; Bouchedja et al. 2017, 2018), , puisqu'il peut être attribué à la synthèse d'acides organiques (acide citrique) au même moment (Sarris *et al.*, 2011; Dobrowolski *et al.*, 2016; Tzirita *et al.*, 2019).

De même, des recherches antérieures ont rapporté que pendant la croissance sur le glucose et/ou le glycérol qui favorisent la synthèse de novo de lipides microbiens ou la synthèse d'acides organiques, les souches de *Y. lipolytica* ont produit des quantités notables d'acide citrique,

indiquant que l'acide citrique a peut-être inhibé l'accumulation de lipides (Papanikolaou et al. 2002; Beopoulos 2006; Rymowicz et al. 2009, 2010; Santos et al. 2013; Tomaszewska et al. 2014). La biosynthèse du SCO et de l'acide citrique à partir de sources de carbone similaires chez *Y. lipolytica* sont des processus qui présentent des similitudes remarquables dans leurs premières étapes (c'est-à-dire par l'épuisement d'un nutriment essentiel, et en particulier de l'azote, dans le milieu de fermentation) (Ratledge 1994; Papanikolaou and Aggelis 2009a; Papanikolaou et al. 2009; Papanikolaou and Aggelis 2010; Chatzifragkou et al. 2011; Abghari and Chen 2014; Tzirita et al. 2019; Papanikolaou and Aggelis 2020a), donc potentiellement, ce fait était la raison pour laquelle (faible accumulation de lipides).

En général, les réglementations complexes susmentionnées rendent difficile dans de nombreux cas d'obtenir des taux élevés d'accumulation de lipides, car dans de telles conditions, l'accumulation de lipides et la production d'acide citrique se produisent simultanément, ce qui entraîne qu'une accumulation de lipides modérée, et aussi le coût élevé de la fermentation avec du glucose qui peut être limitée son utilisation pour la production (SCO), tout ceci ne se compare certainement pas favorablement pour l'accumulation de lipides avec les substrats lipidiques, en particulier avec déchets lipidiques (huile usée) et les sous-produits bon marché (margine). Où les premiers résultats obtenus relatifs aux substrats lipidiques semblaient prometteurs, significativement, ils ont démontré la capacité de la levure à l'accumulation de lipides.

Concernant la performance de la souche utilisée, observée lors de la croissance dans des expériences fioles, la croissance de *Y. lipolytica* avec tous les milieux dépendants des lipides a déclenché une accumulation de lipides (le maximum d'accumulation des lipides) à 48h, et ensuite, la teneur en lipides a diminué avec le temps, bien qu'une quantité de substrat (non spécifiée) reste dans le milieu. En ce qui concerne ce qui précède, des recherches dans la littérature ont expliqué que la période de dégradation des lipides intracellulaires (turnover) coïncide principalement avec la sécrétion d'acide citrique en quantités non négligeables dans le milieu de fermentation (Beopoulos 2006; Beopoulos et al. 2009; Papanikolaou et al. 2009; Makri et al. 2010; Sarris et al. 2011; Papanikolaou and Aggelis 2020).

Jusqu'à présent, la production de lipides à partir de substrats lipidiques (et de déchets lipidiques) est courante pour les souches de *Y. lipolytica* et sans aucun doute très intéressante pour la technologie alimentaire. *Y. lipolytica* est un micro-organisme producteur de lipides bien connu utilisé dans la littérature pour la production d'acides gras courants et non courants en

raison de sa capacité à accumuler plus de 20 % (Beopoulos 2006; Barth 2013; Liu et al. 2015), de plus, par une même souche, son rendement varie également avec les différents processus de fermentation. Ainsi, tous les milieux dépendants des lipides par la souche *Y. lipolytica* ont été testés, et évaluée pour sa capacité à biogénérer des lipides cellulaires sur les différents milieux de culture (substrats lipidiques) dans des cultures en bioréacteur submergé contenant de l'acide oléique et également sur un flux de déchets de l'industrie alimentaire (sous forme de WCO et OMW) avec des volumes constants ~25 g/L pour toutes les cultures, et détermination du profil des acides gras par la levure *Y. lipolytica* de tous les milieux. En plus d'étudier l'impact des conditions de culture des déchets de l'industrie alimentaire sur le comportement cinétique de la souche et d'évaluer le potentiel de valorisation des déchets de l'industrie alimentaire comme milieu "lipogénique" naturel.

En général, dans ces cas où des essais de *Y. lipolytica* cultivée dans des expériences de bioréacteur ont été effectués, des quantités de croissance significativement plus élevées (dans tous les cas) ont été enregistrées par rapport aux fioles, en particulier dans les substrats de déchets lipidiques (OMW, WCO). où il n'a pas affecté sur la croissance des cellules bien que le contenu phénolique du milieu de OMW et les composés toxiques tels que les aldéhydes, les semi-aldéhydes, les hydrocarbures, les radicaux alcoxy et les acides sont générés pendant le processus de réchauffage WCO qui peut être inhibiteur pour la croissance microbienne (Kulkarni et Dalai, 2006 ; Dourou *et al.*, 2016 ; Katre *et al.*, 2017 ; Sarris *et al.*, 2017 , 2019 ; Tzirita *et al.*, 2018, 2019). En accord avec les résultats du présent travail, la souche de levure utilisée dans cette étude a présenté une évolution de son métabolisme vers l'accumulation de lipides (selon la microscopie fluorescente avec coloration au rouge du Nil), car les cellules étaient plus fluorescentes à 48 heures de la fermentation pour tous les milieux dépendants des lipides. Cependant, aucune différence significative dans la production de lipides totaux n'a été notée lorsque *Y. lipolytica* a été cultivée sur des milieux à base de OA, OMW et WCO (enrichis en glucose commercial). Ainsi, elle a été capable d'accumuler leur biomasse ($X_{max} \sim 7.3; 8.1$ et 5.62 g.L^{-1} , respectivement), dans le rendement lipidique total obtenu globalement 16,19% ; 18,14%; 17,59 % respectivement.

L'accumulation optimale a été observée avec la biomasse la plus élevée produite pour presque chaque substrat de fermentation. Jusqu'à présent, les données globales indiquent que la souche a été capable d'utiliser un flux de déchets de l'industrie alimentaire (WCO , OMW), ce qui est finalement attribué à l'accumulation de lipides, qui pendant la phase exponentielle a été observée dans tous les médias. Ce résultat est en accord avec la littérature pertinente qui indique

que par la croissance sur un substrat lipidique (le processus d'accumulation de lipides dit "*ex novo*"), la production de lipides est un processus lié à la production de biomasse, se produisant indépendamment de l'épuisement de l'azote du milieu de croissance (Papanikolaou, Aggelis, 2010, 2011 ; Trizita *et al.* 2018) comme dans l'étude actuelle. Les valeurs globales des lipides dans la biomasse pour la souche étaient différentes, significativement avec l'acide oléique comme milieu de culture le rendement était plus élevé.

Tandis que, dans des milieux de déchets lipidiques (La valeur globale des lipides était également OMW que WCO). Apparemment, la levure (avec des OMW et des composés phénoliques au milieu) favorise une production accrue de lipides de la biomasse. Dans un nombre limité de cas similaires, il a été révélé que l'ajout de plusieurs types de substances naturelles (comme les composés phénoliques, les huiles essentielles, etc.) sont capables d'augmenter la teneur en acides gras cellulaires (AG) au sein de *Y. lipolytica* (Aggelis *et al.*, 2003; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Sarris *et al.*, 2017; Tziraita *et al.*, 2019), Similaire à le travail actuelle, où la valeur maximale de lipide, 1.29 g.L⁻¹, a été observée avec la biomasse la plus élevée produite en OMW 8.1 g.L⁻¹. Dans d'autres études (dans la littérature), comme dans la présente recherche, les différences de rendement sur les différents substrats indiquent que le processus d'accumulation de lipides à partir de substrats hydrophobes est influencé de manière critique par la composition en acides gras du lipide utilisé (Papanikolaou *et al.*, 2001 ; Papanikolaou, Aggelis, 2003, 2010, 2011).

Ces résultats sont tout à fait cohérents avec la littérature sur la même souche de *Y. lipolytica* qui se développe sur des milieux à base de glucose (YPD) et d'acide oléique (YPDOA) dans lesquels la présence d'acide oléique favorisait notamment le processus de production des lipides de stockage (Bouchedja *et al.*, 2017), de même que d'autres souches *Y. lipolytica* se développant sur des milieux à base OMW et d'WCO où la présence de déchets lipidiques a favorisé notamment le processus de production de lipides de stockage (Ben Sassi *et al.* 2008; Sarris *et al.* 2011, 2019a; Katre *et al.* 2012, 2017, 2018; Tzirita *et al.* 2019). Outre les souches de *Y. lipolytica*, des microorganismes appartenant à d'autres genres oléagineux (par exemple, les Zygomycetes) ont présenté un comportement physiologique similaire (Bellou *et al.* 2014) . Par conséquent, les déchets lipidiques pourraient être considérés comme un milieu alternatif pour production des huiles utiles.

En revanche, la décoloration du milieu des eaux usées du huilières à huile d'olive (couleur sombre due à la présence de margine) s'est produite, ce qui signifie que l'élimination des

composés phénoliques était certaine dans le milieu (Sarris *et al.*, 2011, 2019). Dans cet essai, la levure *Y. lipolytica* a présenté la capacité d'éliminer la couleur, par rapport à la composition du milieu avant la fermentation. Dans l'étude de Sarri *et al.* 2019, la décoloration (couleur foncée due à la présence du margine) a été partiellement du milieu par la souche ACA-DC 5029 de *Y. lipolytica*, tandis que Sarris *et al.* (2017) ont signalé une décoloration plus élevée par la souche ACA-YC 5033 de *Y. lipolytica* dans des milieux enrichis en margine et en glucose. Ainsi, la réduction de la couleur de l'OMW et son niveau par les levures semblent être un processus dépendant de la souche. Bien que certaines souches (des genres *Saccharomyces* et *Yarrowia*) aient la capacité de réduire significativement la couleur lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu YPDOMW (Lanciotti *et al.*, 2005 ; D'Annibale *et al.*, 2006 ; Papanikolaou *et al.*, 2008 ; Sarris *et al.*, 2011 ; 2013 ; 2014 ; 2017 ; 2019), d'autres souches étaient impuissantes à le faire (De Felice *et al.* 1997; Scioli and Vollaro 1997; Dourou *et al.* 2016). La bio remédiation des milieux à base du margine en présence de microorganismes a été résumée dans de nombreux articles scientifiques antérieurs rapportés à (Sarris *et al.*, 2019), car ils ont indiqué que les champignons ont la plus grande capacité à produire des enzymes qui décomposent les composés phénoliques et éliminent ainsi la couleur noire foncée dans le milieu. En revanche, les levures ne produisent pas ces enzymes, à l'exception des souches d'achillée génétiquement modifiées, qui sont capables de produire des lacases (Jolival *et al.* 2005).

Bien que la souche de levure utilisée dans cette étude a été producteur de lipase, toute la décoloration du margine ne doit pas être attribuée uniquement aux mécanismes d'oxydation des phénols, mais ce fait peut être attribué à des réactions métaboliques et/ou au phénomène de biosorption (Chtourou *et al.* 2004; Hamimed *et al.* 2020), c'est-à-dire son utilisation peut-être partielle de ces composés (phénoliques) comme source de carbone et d'énergie. On peut s'attendre à de tels résultats dans notre étude, puisque dans les expériences avec margine, la croissance des cellules, la biomasse ne diminuait pas lorsque les cellules étaient moins fluorescentes (la production de biomasse n'a pas été affectée), il est apparu que les cellules sont toujours en croissance et étaient plus fluorescentes à 72 heures de la fermentation. A ce moment de la fermentation sur l'acide oléique, la biomasse était moins fluorescente. De tels résultats étaient prévisibles, dans cette étude dans les cultures avec OA ~25 g/L, lorsque l'OA a été épuisé de la culture, le lipide de réserve a été reconstitué ~72 h après le début de la fermentation (Figure 6) La concentration de lipide microbien a chuté à ~0.83 g/L de ~1,24 g/L. L'huile microbienne a peut-être été consommée pour la production d'acide citrique (à faible pH) (Sarris *et al.* 2011; Tchakouteu *et al.* 2015), de même citée Makri *et al.* (2010), Tchakouteu *et al.* (2015)

et Papanikolaou et al. (2002, 2006, 2009); Papanikolaou and Aggelis (2020b) que La période de dégradation lipidique intracellulaire (turnover) a coïncidé avec la sécrétion d'acide citrique en quantités non négligeables dans le milieu de culture. Où Sarris *et al.* (2019) ont supposé, la production d'acide citrique peut se faire avec un faible pH. Une autre question qui devrait être soulignée est que malgré le fait que le pH du milieu reste 6, aucune faveur de la production d'acide citrique. Ce qui suggère que cette dégradation a été effectuée en faveur de l'énergie des besoins de maintenance des cellules de levure.

Cette étude a principalement montré un profil des acides gras lors de la culture sur les trois milieux lipidiques, OA, OMW et WCO. A travers le tableau 15, le profil des acides gras est apparu différent pour tous les milieux (en fonction des substrats). Comme prévu, puisque *Y. lipolytica* est connu pour incorporer directement les substrats gras d'une manière inchangée ou pour accumuler le substrat sous une forme modifiée (Beopoulos *et al.*, 2009 ; Tzirita *et al.*, 2017, 2019). Dans ce cas, avec cette souche, malgré les effets du substrat sur les niveaux de saturation dans les lipides accumulés pour chaque milieu, qui peuvent être attribués à l'incorporation de lipides du substrat directement, la souche a travaillé sur une modification et une promotion nettes des acides gras à travers notre observation du profil de la formation des acides gras avec le milieu qui dépend de l'acide oléique (tableau 14 dans la porte résultats). Selon (Papanikolaou and Aggelis 2003b, 2020b; Papanikolaou et al. 2011; Saygün et al. 2014; Tzirita et al. 2019; Fabiszewska et al. 2022b) qui ont rapporté pour d'autres souches de *Y. lipolytica* cultivées sur des mélanges d'acides gras saturés et insaturés que le profil des lipides cellulaires de *Y. lipolytica* ressemblait à la composition en acides gras du milieu. De même, la composition en AG des lipides intracellulaires de la levure cultivée sur des matières grasses ressemble à celle du milieu de culture (Papanikolaou and Aggelis 2011b; Saygün et al. 2014). De tels résultats pourraient être attendus dans cette étude ; de manière significative, cette différence dans le profil des acides gras des lipides cellulaires de *Y. lipolytica* peut être attribuée aux substrats lipidiques utilisés dans le milieu. Les recherches de Montet *et al.* (1985), Papanikolaou *et al.* (2001), Papanikolaou and Aggelis (2003) et Lopez *et al.* (2018) ont noté l'assimilation sélective et rapide de l'AF C18:1 Δ^9 par rapport à l'acide gra C18:0 par les souches de la levure *Y. lipolytica*, un fait qui a également été validé dans cette étude.

L'activité désaturase des acides gras dans l'ensemble des lipides cellulaires a été estimée en comparant la désaturase produite au substrat utilisé (C16 :1/C16 :0 ; C18 :1/C18 :0 ; C18 :2/C18 :1), de manière significative, l'acide oléique étant l'acide gras dominant en toutes circonstances. De même, il est également en accord avec les rapports précédents de Rymowicz

et al. (2010), Chatzifragkou *et al.* (2011), Sarris *et al.* (2011), Xu *et al.* (2012), Tchakouteu *et al.* (2015), Dourou *et al.* (2016), Katre *et al.* (2017) ; Sarris *et al.* (2019) et Tzirita *et al.* (2019). Comme pour cette souche, des résultats similaires ont également été rapportés dans des études antérieures réalisées par plusieurs souches mutantes de type sauvage de *Y. lipolytica* testées par Rymowicz *et al.* (2010), Chatzifragkou *et al.* (2011) ; Xu *et al.* (2012) et Sarris *et al.* (2019) indiquant une importante activité $\Delta 9$ -désaturase dans les cellules de levure. Egalement pour *A. curvatum* et *Starmerella bombicola* (Lee *et al.* 1993; Wadekar *et al.* 2012), en ce qui concerne OMW dans le milieu de culture, rapporté Rymowicz *et al.* (2010), Sarris *et al.* (2011) et Sarris *et al.* (2019) que l'ajout de OMW dans le milieu de culture a augmenté la quantité d'acide oléique (C18 :1) plus de 60,0% dans le temps, tandis qu'il a réduit celle de C18 :0. De même avec WCO, la teneur en acide oléique souhaitable (C18 :1) était également plus élevée dans les trois mutants utilisés dans (Katre *et al.*, 2017) car les trois mutants possédaient des quantités plus élevées de total par rapport au type sauvage, et aussi dans le profil d'acides gras du mutant XR-2 de *Rhodosporidium toruloides* était l'acide oléique (36,4%) le plus élevé (Katre *et al.*, 2017).

Comme prévue, dans cette étude, de manière significative, l'acide oléique étant l'acide gras dominant dans les circonstances utilisées OMW et WCO, tandis que OA a légèrement réduit la quantité d'acide oléique au détriment de la production d'acide linoléique souhaitable. Quel que soit le milieu utilisé, le SCO de la levure *Y. lipolytica* semble être une biocatalyseur potentielle pour la production de quantités plus élevées d'acides gras saturés et monoinsaturés en C16 et C18 et une concentration plus faible de d'acides gras saturés et polyinsaturés. De plus, les déchets lipidiques pourraient être considérés comme une matière première non coûts. De toute évidence, ce type d'études présente un intérêt académique et économique. Les valeurs obtenues en utilisant les deux milieux indiquent le potentiel considérable de ces microorganismes pour produire des composés à valeur ajoutée(SCO).

B.6. Conclusion

Nous avons pu démontrer que : Grâce à la fermentation des huiles dirigée par *Y. lipolytica*, et aux profils acide gars de lipides de réserve, la levure peuvent être exploités pour développer des procédés durables, « verts » et respectueux de l'environnement et pilotent la recherche des industries biotechnologies. La dégradation observée des déchets huileux « OMW » et « WCO » par *Y. lipolytica* indique leur capacité à utiliser efficacement la biorestauration des huiles de

cuisson usagées et des eaux usées dans les huilières à olives (OMW). D'un intérêt particulier est le fait que bien que la culture dans les flacons ait connu un ralentissement de la croissance au début de la fermentation, l'élimination des graisses a continué à être réussie, Ce qui indique le potentiel de cette souche dans les processus environnementaux malgré l'autolyse cellulaire des lipides pour tous les milieux de fermentation batch aux stades ultérieurs de croissance (de ce côté le processus batch n'était pas favorable et l'une des solutions proposées est le processus de culture en continu). En fin, les valeurs de rendement en lipides pour tous les substrats utilisés révèlent la capacité de *Y. lipolytica* à produire des lipides avec une teneur en acides d'une grande importance nutritionnelle, industrielle, environnementale et biotechnologique, car les lipides à faible coût ou passifs peuvent être «mis à niveau» avec succès.

C. Etude de la Production de γ -décalactone (arôme de pêche) par la levure non pathogène *Yarrowia lipolytica*

C.1. Introduction

Dans cette partie, La levure *Y. lipolytica* a été utilisée pour production d'arôme de type lactone (Gamma décalactone) en présence de huile de ricin dans le milieu de culture, après extraction, séparation, elles sont identification et caractérisation par chromatographie à GC-MS. Cette étude a principalement permis une investigation rapide et une brève comparaison sur la croissance et la forme des cellules dans le milieu de biotransformation ainsi que les stades de croissance et leur corrélation avec la production de ces molécules par culture en batch dans des flacons, et un bioréacteur. En plus de tester différentes concentrations d'huile de ricin sur les performances de cette souche. Comme c'est la première fois qu'une étude vise à comprendre le comportement de cette souche et à analyser ses performances et sa production dans un milieu d'huile de ricin. Dans ce travail, la levure était un bon producteur potentiel de γ -DL à partir de l'huile de ricin, car c'est une souche de lipase surexprimée, qui fait l'hydrolyse de l'huile de ricin pour la biotransformation de l'acide ricinoléique en γ -DL, d'où l'importance des lipases extracellulaires de cette souche.

C.2. Analyse du comportement du dans *Y. lipolytica* le milieu de biotransformation.

Pour évaluer la capacité de la levure *Y. lipolytica* à biotransformer l'acide ricinoléique pour produire de γ -DL, son comportement a été vérifié dans un substrat lipidique (huile de ricin) pendant sept jours de culture en flacons agités et en bioréacteur, en tenant compte du fait que la synthèse d'un odorant de type lactone (γ -DL) est liée à la phase de croissance du microorganisme (Soares *et al.*, 2017 ; Małajowicz *et al.*, 2020).

C.2.1. Croissance cellulaire de la levure

La figure (40) présente des données sur la culture en batch réalisée dans des fiole à secousses et un bioréacteur pour la levure *Y. lipolytica*, avec l'application de 2 % d'additif d'huile de ricin (CO) dans le milieu (20 g/L). Sur la base de la courbe de croissance, une tendance similaire pour la croissance de la souche a été principalement observée dans les premiers jours de fermentation, après quoi il a été observé que la croissance en flacons se déroule lentement par rapport à la culture en bioréacteur avec un retard des cellules de l'arrivée à la phase de croissance stationnaire avec une différence d'un jour lors de la culture dans le bioréacteur. Le taux de croissance des cellules a augmenté pendant cette période (c'est-à-dire pendant la phase

de croissance exponentielle) de 0,2 à 0,6 et 0,72, respectivement. Cette prolifération moins intense des cellules de levure dans les flacons à secousses est supposée être due à des conditions de culture légèrement différentes. Bien que la quantité d'huile de ricin ajoutée dans les deux flacons et dans le bioréacteur était la même (20 g/L). Par conséquent, avec la poursuite du processus de fermentation, après 5 jours, a commencé une lente diminution du nombre de cellules. Ainsi, l'efficacité maximale de la réaction (biotransformation) dans cette culture s'est très probablement produite au moment où le nombre de cellules a atteint le maximum dans la phase finale de la croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire. Selon Groguenin *et al.* (2004) la synthèse de γ -DL se produit dans la phase de croissance exponentielle avec un léger retard après la croissance, qui l'a interprété comme le temps nécessaire pour que les acides gras subissent quatre cycles de β -oxydation. De même, Moradi *et al.* (2016) ont signalé que la production de γ -DL se produit dans la phase de croissance exponentielle, qui était concomitante presque avec la croissance de la biomasse, comme atteint son rendement maximal à la fin de la phase de croissance exponentielle. Également la recherche de Małajowicz *et al.* (2020) sur la biosynthèse γ -DL par la levure *Y. lipolytica* dans des cultures discontinues confirme que lorsque le nombre de cellules a atteint le maximum dans la fin de la phase de croissance logarithmique, la production maximale de γ -DL s'est produite (dans la phase finale de la croissance logarithmique et le début du stade stationnaire).

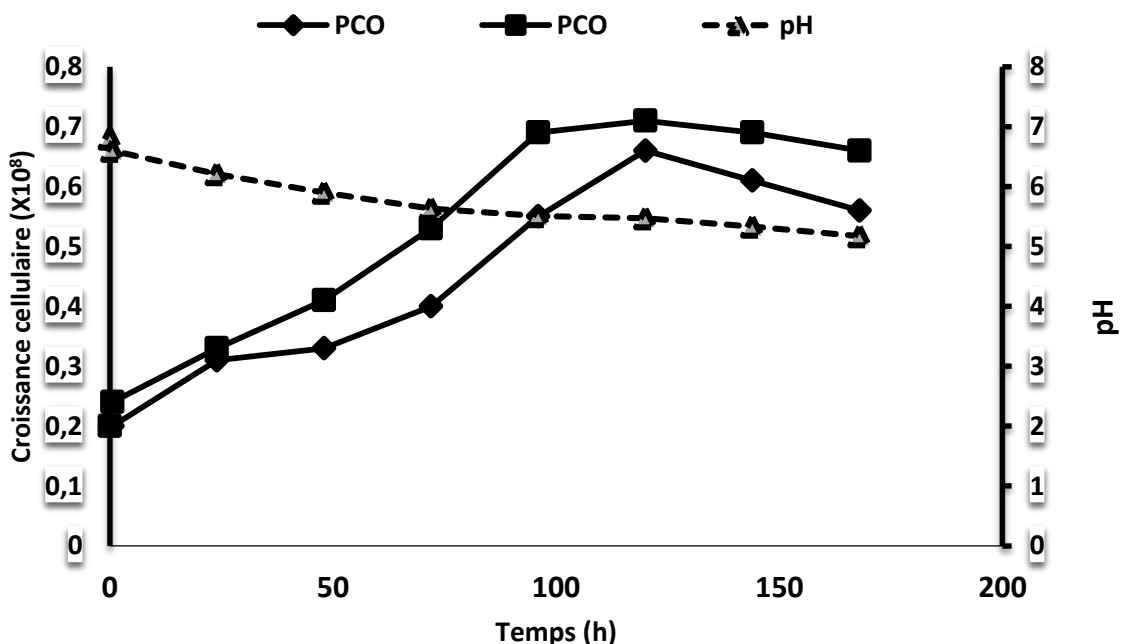


Figure 40: Cinétique de croissance de *Y. lipolytica* en milieu de biotransformation lors de la culture en fiole (◆) sans ajustement du pH (▲), et dans le bioréacteur (■) après ajustement des valeurs de pH à 6.

Un résultat similaire a été obtenu dans nos expériences, lorsque le nombre de cellules a atteint le maximum en fin de phase de croissance exponentielle, la production maximale de γ -DL s'est produite, et avec la poursuite du processus de fermentation, après le jour 5, une lente diminution du nombre de cellules a été observée en même temps que la diminution de l'arôme de lactones produit à la fin de la culture, cette typique pour cette levure dans les cultures discontinues. Selon Groguenin *et al.* (2004), on a observé une diminution de l'arôme dans le milieu en phase finale de fermentation (diminution de 7,5 fois). De même, Gomez *et al.* (2010) ont rapporté qu'après avoir atteint la plus forte concentration de γ -DL au cinquième jour de culture, une diminution d'un facteur 10 a été observée dans la culture du jour suivant. Aussi, Braga *et al.* (2015) ont rapporté que la production maximale d'odeur était suivie d'un ré-consumer rapide de l'odeur, où une diminution de 30% pour la souche MTYL40-2P. Lors de la fermentation à l'état solide de Try *et al.* (2017) également, il a été constaté une diminution de la γ -DL dans le milieu après 90 heures de fermentation. Plusieurs théories ont été citées dans (Okui et al. 1963a; GATFIELD 1993; Pagot et al. 1998; Wache et al. 2000, 2001b; Aguedo et al. 2003; Guo et al. 2011b; Waché 2013) pour expliquer cette baisse, et qui indiquaient que les cellules de levure sont capables d'hydrolyser (ré-consommer) les lactones produites. Ainsi, un lent processus de mort cellulaire s'enclenche progressivement, appelé phase de régression, Jusqu'à présent, la forte concentration de composés aromatiques qui sont produits dans le milieu de conversion peut entraîner des effets toxiques envers les microorganismes (Feron et al. 1996; Dufosse et al. 1999; Aguedo et al. 2002, 2003, 2004). Dans le même ordre d'idées, ce déclin a été discuté ces dernières années chez Krzykowska (2012), Escamilla-García et al. (2014), Braga et Bello (2014, 2016) ; Soares *et al.* (2017) et Try *et al.* (2017), mais il reste encore mystérieux, car il n'a pas encore été déterminé avec précision (Małajowicz *et al.*, 2020). Un aspect lié à cette détérioration est celui rapporté par Waché *et al.* (2002), où il a indiqué que les valeurs de pH pourraient jouer un rôle majeur dans la re-consommation de l'odorant de type lactone, c'est-à-dire sa pénétration dans les cellules de levure et son hydrolyse à faible pH, qui se produit au dernier stade de la culture. En ce qui concerne cette différence de taux de croissance et de productivité, le pH est un facteur important, et sa modification peut également altérer les concentrations de croissance cellulaire, la productivité et la ré-consommation de γ -DL comme mentionné ci-dessus. Par conséquent, nous avons également surveillé ce facteur (pH) tout au long de la période de culture en flacon.

C.2.2. Analyse du pH

La figure (40) présente également les données de pH dans le milieu de biotransformation tout au long de la période de fermentation par lots réalisée dans des flacons de *Y.lipolytica*. Les résultats montrent que le pH au début du processus de fermentation dans les flacons était de 6,8 (sans ajustement), car il est considéré comme le pH optimal pour la production d'arômes selon les études précédentes de Alchihabi *et al.* (2009), sur la production de lactones. Cependant, la valeur du pH a diminué de 6,8 à 5,47 (au cinquième jour) pendant la bioconversion dans le milieu avec 20 g/L d'huile de ricin (Figure 40). Cette baisse s'est poursuivie jusqu'à atteindre 5,17 à la fin de la fermentation (7 jours). Donc la valeur du pH dans le bioréacteur a été ajustée à 6 pendant toute la période de fermentation (être la valeur optimale pour la production d'arôme). Ainsi, un changement dans le comportement de cette souche a été observé avec des différences statistiquement significatives dans le taux de croissance des cellules et dans sa phase dans le milieu d'huile de ricin dans des flacons et un bioréacteur. Jusqu'à présent, les chercheurs ont constaté dans des études antérieures sur cette levure que la diminution des valeurs de pH coïncide avec l'augmentation de la biomasse de la levure, qui était probablement causée par la production d'acides gras ou de métabolites secondaires (acide citrique) (Papanikolaou *et al.*, 2002 ; Beopoulos *et al.*, 2009 ; Santos *et al.*, 2013 ; Bouchedja *et al.*, 2018), ce qui affecte également la synthèse de γ -DL (Puthli *et al.* 2006; Krzyczkowska 2012; Gomes *et al.* 2013; Soares *et al.* 2017). C'est-à-dire que le pH joue un rôle dans l'assemblage et l'adhésion des cellules entre elles, et aussi pour le temps de contact entre le substrat et les cellules (enzyme), c'est-à-dire qu'il est un facteur important dans l'absorption des surfaces par les cellules et donc sur l'activité lipolytique, qui favorise la synthèse de γ -DL (Aguedo *et al.*, 2005 ; Gomes *et al.*, 2011 ; Braga *et al.*, 2013 ; Gomes *et al.*, 2013 ; Bouchedja *et al.*, 2018). En 2006 et 2008, Gopinath *et al.*, lors de l'étude de l'effet du pH en utilisant les deux levures *S. salmonicolor* et *R. aurantiaca* sur la production d'odeur et la biomasse ont observé que la production plus élevée de γ -DL était due au pH initial de 6,5 pour *S. salmonicolor*.

Alors que la croissance et la production de γ -DL étaient bonnes et à une concentration élevée (5,3 g/l) par la levure *R.aurantiaca* dans un milieu de biotransformation avec des valeurs de pH proches de la neutralité (pH 6,8), des résultats similaires ont également été observés chez Alchihab *et al.* (2009). Alors que Maume et Cheetham (1991) ont observé que la croissance cellulaire était optimale à un pH de 6,5-7,0, mais que la production optimale de γ -DL se produisait à un pH alcalin (pH 7,5-8,5). Selon Endrizzi *et al.* (1995) et Barth et Gaillardin, (1997), la réponse aux variations du pH et la capacité de la levure à produire un arôme de type lactone dans les pH acides dépendent également de l'espèce. Ainsi, Endrizzi *et al* (1995) ont

rapporté que l'acidification du milieu de biotransformation par les levures favorisait la production de lactones d'acide 4-hydroxy-décanoïque comme précurseur pour produire du γ -DL, mais que l'acidification n'est pas un facteur nécessaire, car la levure *P. guilliermondii* a produit la même quantité de γ -DL que celle produite par *Candida* dans un milieu avec ou sans acidification, en tenant compte du fait que ces dernières ne produisent pas de γ -DL dans un milieu non acide.

C.2.3. Caractérisation morphologique cellules et milieu de biotransformation

La figure 41 présente des images de la culture en batch réalisée dans des flacons à secousses et dans un bioréacteur pour *Y. lipolytica*, avec l'application de 25 g/L d'huile de ricin et l'ajout de 1ml de Tween 80, sous forme d'émulsion huile dans l'eau dans le milieu de biotransformation. Par des observations microscopiques, un changement dans la forme des cellules de levure a été observé tout au long de la période de culture dans les flacons ou lorsqu'on les compare aux cellules du bioréacteur également. Le polymorphisme n'est pas surprenant pour cette espèce de levure car il s'agit d'un champignon dimorphe, capable de se développer sous différentes formes en fonction des conditions environnementales telles que le carbone, les sources d'azote et les facteurs externes (systèmes de mélange, stress aérobie et pH moyen) (Bouchedja et al. 2017, 2018; Try et al. 2018; Timoumi et al. 2018b; Małajowicz et al. 2020).

En outre, dans la biotransformation de ce type de culture, la surface de contact des gouttelettes lipidiques avec les cellules et la surface entre deux phases liquides sont des facteurs attribuables à la dégradation d'un substrat hydrophobe et donc pour les cellules, la croissance et la production d'arôme par les cellules de levure (Aguedo *et al.*, 2005 ; Gomes *et al.* 2011). Alors que ce dernier a également rapporté que l'arrivée des cellules sur le substrat lipidique se fait par leur adhésion autour de gouttelettes lipidiques plus grandes, c'est-à-dire que les gouttelettes d'huile plus grandes produisent l'arôme. C'est la croissance des cellules dans un milieu contenant des lipides se produit directement sur les gouttelettes car leur solubilité dans l'eau est limitée et elle est donc influencée par la taille des gouttelettes d'huile. En effet, la taille des gouttelettes lipidiques est comptée sur des nombreux paramètres qui peuvent être liés à des caractéristiques physiques et chimiques du milieu (pH, force ionique, présence de tensioactifs, etc.), ou à la présence de microorganismes (concentration d'inoculum, propriétés de surface des cellules, etc...)(Gomes *et al.*, 2010, Gomes *et al.*, 2011). Il n'a pas été facile de prouver cette dépendance dans notre travail, pour confirmer cela, nous avons fait des

observations microscopiques des deux processus pendant la biotransformation.

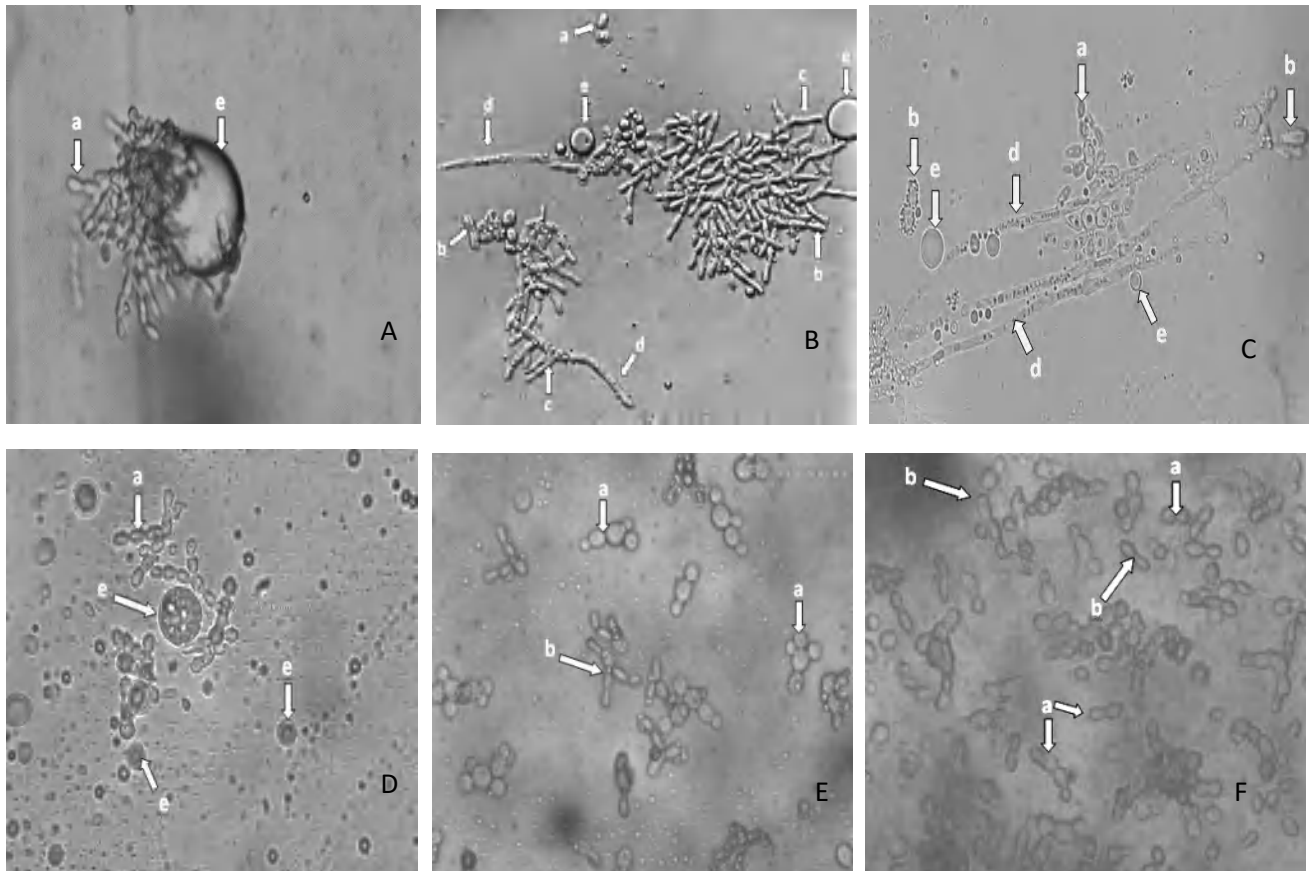


Figure 41 : Observation au microscope de *Y. lipolytica* de culture sur huile de ricin dans des flacons et un bioréacteur. Image réelle des cellules de levure du milieu de biotransformation pendant 1, 3 et 5 jours A, B, C (flacons), D, E, F(bioréacteur), respectivement : (a) forme de levure, (b) forme de levure allongée, (c) formes pseudo-mycéliales, (d) formes mycéliales et (e) gouttelettes d'huile.

Yarrowia lipolytica a très bien poussé dans les deux procédés (Figure 41), sous des formes de type levure, levure allongée, pseudo-mycélienne et mycélienne également dans les flacons (Figure 41(A, B, C)). Mais dans les tests en bioréacteur, les filaments de levure ont été endommagés et les cellules sont apparues éparpillées, ovales ou sous des formes de type levure et homogènes (Figure 41(D, E, F)), comme la dispersion de la phase lipidique était évidente dans le bioréacteur par rapport aux flacons agités dans lesquels l'huile était principalement observée à la surface du milieu. Cette différence était très probablement due aux différents systèmes de mélange et au taux d'agitation dans le bioréacteur. Jusqu'à présent, cela pourrait influencer les propriétés des émulsions et par conséquent l'efficacité de la biotransformation. Selon de Andrade et al. (2017), dans ce cas, le bioréacteur et les taux d'agitation plus élevés qui lui sont associés peuvent provoquer des changements métaboliques chez les levures et donc des

changements dans la morphologie des cellules et le métabolisme. En outre, dans les images microscopiques des cellules de levure dans notre travail, les cellules ont montré un contact direct avec le substrat hydrophobe (CO) dans les premiers jours de culture, puis les gouttes ont disparu ou diminué au fur et à mesure que la fermentation se poursuit. Il est évident que les gouttelettes lipidiques sont adsorbées à la surface des cellules de levure qui apparaissent à la fois sous forme de levure au début de la fermentation, comme on peut également voir que les cellules de cette souche subissent une forte agglomération et ont tendance à s'agglutiner autour de grosses gouttelettes lipidiques (Figure 41(A, E)). Selon Gomes *et al.* (2011), dans ce cas, l'arôme est produit, c'est-à-dire avec les plus grosses gouttelettes d'huile.

Selon la figure (41), nous pouvons également voir que toutes les formes de levure peuvent coexister dans la même culture (Figure 41 (B, C)). Mais la production de lactones est souvent associée à la présence de formes allongées dans les flacons (Figure 41(C)). Ces résultats sont cohérents avec les données sur la forme des cellules, rapportées par (Barth and Gaillardin 1997; Chen et al. 1997; Fickers et al. 2005; Makri et al. 2010; Gomes et al. 2011b; Nicaud 2012; Krzyczkowska 2012; Escamilla-García et al. 2014; Try et al. 2018; Małajowicz et al. 2020). En revanche, Aguedo et al. (2002) indiquent dans son étude que la morphologie cellulaire n'affecte pas la production de γ -DL. En revanche, la concentration et type du substrat lipidique dans le milieu affecte la croissance, la performance et la productivité des cellules (Alchihab et al. 2010a, c; An et al. 2013; Braga et al. 2015b, a; Soares et al. 2017a).

C.2.4. Impact des concentrations en huile de ricin

Effet des concentrations en huile de ricin sur le comportement et les performances de *Y. lipolytica*. La figure 45 montre l'effet de la concentration d'huile de ricin sur la croissance de *Y. lipolytica* réalisée dans des flacons agités, car on peut distinguer les différents comportements de cette croissance de levure face à différents volumes de CO. En observant les courbes de croissance, au début de la biotransformation, *Y. lipolytica* n'a pas montré le même nombre de cellules aux cinq concentrations (Figure 42). La souche cultivée dans un milieu contenant de faibles concentrations d'huile de ricin (1 et 2%) a montré une augmentation similaire du nombre de cellules dans les premiers jours de fermentation, atteignant 0,3 après seulement 48 heures d'incubation, mais la croissance cellulaire a augmenté de manière significative avec 25 g/l de CO, le nombre de cellules atteignant 0,66 après 5 jours d'incubation.

En revanche, cette souche cultivée avec concentration 1, 6, 10 et 30 % (w/v) de CO a montré un nombre de cellules généralement plus faible, inférieur à la population initiale de cette souche. Ainsi, les taux de croissance étaient inversement proportionnels aux concentrations élevées de dioxyde de carbone dans le milieu, mais après 120 heures d'incubation, les cellules ont montré une augmentation graduelle et limitée de la croissance cellulaire. Ce retard dans les taux de croissance au cours des premiers jours de la fermentation s'explique par le temps nécessaire aux cellules de levure pour se remettre des concentrations élevées de CO (c'est-à-dire de la toxicité de l'acide ricinoléique) et des acides gras. D'après Lin et al. (1996); Aguedo et al. (2003), les acides gras présentent des activités anti-fongicides et conviennent également. De plus, la concentration élevée de CO dans le milieu n'a pas seulement affecté le taux de croissance des cellules, mais aussi la production de composés aromatiques. Ce qui peut également être lié à l'activité de la lipase extracellulaire (production de lipase de faible puissance) qui à son tour hydrolyse l'huile de ricin pour libérer l'acide ricinoléique présent dans l'huile, produisant ainsi un arôme de type lactones (Maume and Cheetham 1991; Gomes et al. 2013; Soares et al. 2017a). En outre, la baisse de la croissance et des rendements était peut-être due aux conditions de culture utilisées, c'est-à-dire à une disponibilité insuffisante d'oxygène dans le milieu, car on a observé qu'il y avait une couche d'huile à la surface, ce qui pouvait empêcher l'oxygène d'atteindre les cellules. Selon ces résultats, la souche de levure utilisée dans cette étude a montré que le taux de croissance et les stades de croissance différaient avec la concentration du substrat. De même, la production de γ -DL était liée à la croissance des cellules et à ses phases. Ainsi, parmi les possibilités évaluées, l'utilisation du CO comme substrat avec un volume de 1 et 2% était la meilleure pour la croissance et la performance de cette réaction, ainsi, le rendement était inversement proportionnel à la concentration en huile de ricin dans le milieu (Figure 46).

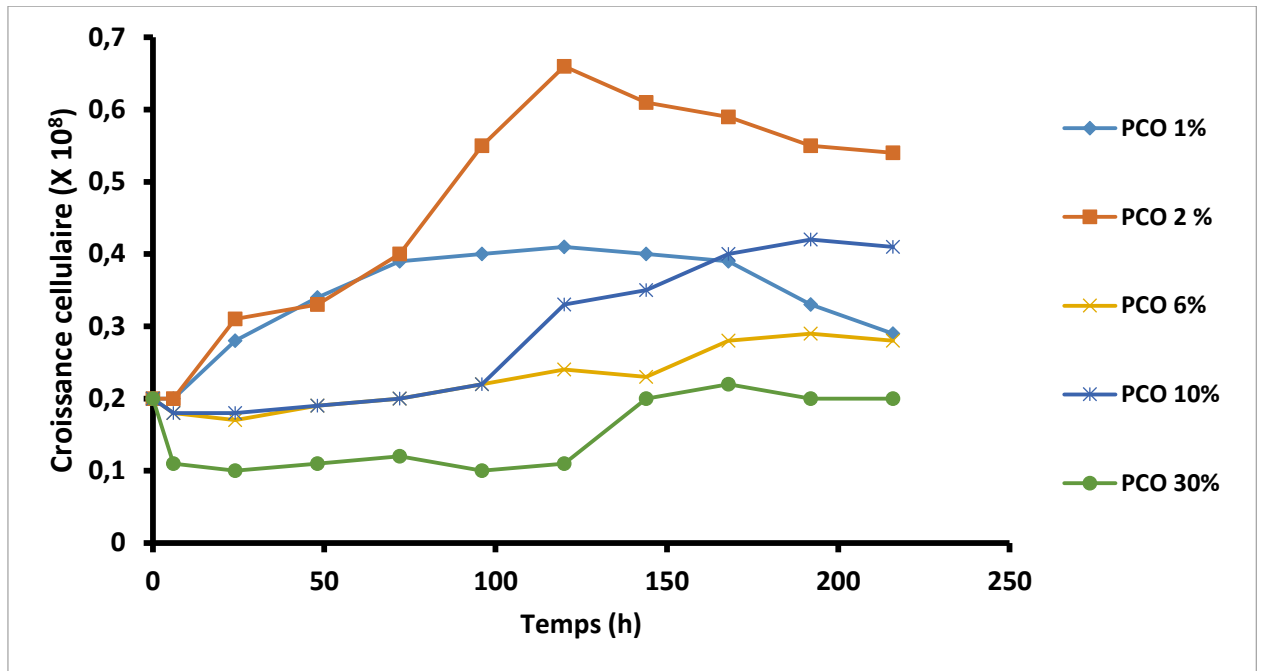


Figure 42 : Evolution de la croissance cellulaire dans le milieu de bioconversion de *Y. lipolytica* lors de la culture en flacons sur des volumes de concentration d'huile de ricin différents.

En dehors de la période d'incubation et du délai, ces résultats ont montré que cette souche est résistante c'est-à-dire qu'elle a été capable de se développer dans différents volumes de CO, ce qui signifie qu'elle a un comportement spécifique vis-à-vis de chaque concentration dans le milieu de conversion. Par conséquent, elle peut être cultivée dans des concentrations élevées de CO avec une amélioration des conditions de fermentation telles que le taux de transfert d'oxygène. García et al. (2009), Try *et al.* (2018) ont indiqué que la disponibilité de l'oxygène dans le milieu de bioconversion est le principal facteur conduisant à l'étendue de l'oxydation dans la production de lactones. De même, l'agitation, le pH, la T°, la forme de culture, la disposition du substrat et le temps de culture ont également un effet sur la croissance et la productivité (Alchihab et al. 2009, 2010a, c; Waché 2013; Braga et al. 2015b; de Andrade et al. 2017; Małajowicz et al. 2020). Ces résultats sont quelque peu similaires à ceux de (Maume and Cheetham 1991; Endrizzi et al. 1996; Lin et al. 1996; Alchihab et al. 2009; Gomes et al. 2013) qui notent qu'avec de fortes concentrations lipidiques d'huile de ricin ou de méthylricinol, cela réduit la production d'odeur produite par certaines levures. Cependant, nos résultats étaient en contradiction avec d'autres études qui ont trouvé que la production d'arôme se produit plus élevée à des concentrations plus élevées du substrat lipidique (Gomes *et al.*, 2013 ; Braga and Belo 2016 ; Braga *et al.*, 2015, Andrade *et al.*, 2017). Ainsi, cette différence dans la littérature

concernant la meilleure concentration d'huile de ricin pour produire γ -DL peut être attribuée peut être liée aux facteurs ci-dessus.

C.3. Expériences et extraction de lactone

Jusqu'à présent, parmi les possibilités évaluées dans notre expérience en fiole et en bioréacteur (détails au-dessus), l'utilisation du d'huile de ricin comme substrat avec une concentration de 1 et 2.5 % en fiole a été la meilleure pour la croissance et la performance de cette réaction (dont l'arôme fruité était active dans le milieu de biotransformation). Sur cette base, l'arôme fruité a été extrait, extraction de γ -décalactone a été par deux méthodes : micro-ondes cleverger rapide et liquide/liquide par solvant (Ether diéthylique et chloroforme et ethyl acetat). Jusqu'à présent, parmi les possibilités évaluées dans notre expérience d'extraction arôme, l'extraction liquide/liquide via le solvant acétate d'éthyle a été la meilleure.

C.4. Production de gamma décalactone (γ -DL)

Puisque la synthèse de γ -DL est liée à la phase de croissance du microorganisme. Jusqu'à présent, les résultats obtenus lors de l'analyse du comportement et des performances de la souche dans la première partie (résultats et discussion) ont montré qu'une concentration d'huile de ricin de 25 g/L était la condition la plus adéquate pour la production de γ -DL dans des cultures en batch. De plus, la production maximale de γ -DL dans cette culture s'est très probablement produite à la dernière phase de croissance exponentielle et au début de la phase stationnaire avec des formes allongées présentes dans les flacons agités. Ainsi, à ce moment-là, le processus de fermentation s'est arrêté, puis les lactones produites ont été extraites, car après ce point, le processus de mort cellulaire lente a commencé avec un arôme diminué des lactones produites. Ainsi, le profil de production de γ -DL d'une souche était de 0.22 g/L avec (10 g d'huile de ricin). Une réelle augmentation par rapport au taux de production d'odeur a également été obtenue avec le premier concentré, qui a été capable de produire jusqu'à 1.34 g/L - environ deux fois la production de la souche KKP 379 (Krzyczkowska, 2012), tandis qu'il était environ deux trois plus qu'avec la souche CCMA 0242 (Andrade *et al.*, 2017), et plus qu'avec les souches utilisées par Khattab *et al.* (2012) et Moradi *et al.*, (2016). En tenant compte des différences entre les souches et les conditions de culture, nos résultats sont très prometteurs en utilisant cette souche de levure génétiquement modifiée dans le milieu de transformation (huile de ricin). Selon les résultats mentionnés dans la littérature, la production de γ -DL avec CO varie de 0,4 à 12,5 g / L selon l'espèce (Soares *et al.*, 2017).

En revanche, nous avons également effectué une comparaison supplémentaire pour la performance et sa production de la souche de levure aérobie dans le bioréacteur pendant la biotransformation par *Y. lipolytica* avec les fioles en fonction du comportement de la souche dans les médias.

Malgré l'accélération de la croissance dans le bioréacteur et la dispersion évidente de la phase lipidique qui est attribuée à une augmentation de la surface de contact du substrat avec l'enzyme et donc à la dégradation d'un substrat hydrophobe et à la croissance cellulaire, ce qui conduit finalement à la production d'arôme par les cellules des micro-organismes. Cependant, elle n'était pas liée à la formation de la réaction conduisant à la synthèse de γ -DL, car il n'y avait pas de production d'arôme dans le milieu. Selon les recherches de Andrade *et al* en 2017 sur la production de γ -DL par des souches de levure dans différentes conditions, la fermentation dans un bioréacteur et les taux d'agitation plus élevés qui y sont associés peuvent provoquer des changements métaboliques dans la levure et donc des changements dans la morphologie et le métabolisme des cellules. De même, les recherches de Małajowicz *et al.* (2020) sur la biosynthèse de γ -DL par la levure *Yarrowia lipolytica* en cultures discontinues confirment que l'aération et le mélange intensif du milieu de biotransformation dans le bioréacteur ne facilitent pas la synthèse efficace de γ -DL. Un résultat similaire a été obtenu dans nos expériences, on suppose qu'une telle différence dans la performance et sa production entre les bioréacteurs et les flacons peut revenir aux conditions de culture. Principalement, l'aération élevée des milieux avec un mélange intensif utilisé dans notre étude dans le bioréacteur a eu un effet négatif sur la synthèse de γ -DL. Selon Gomes *et al.* (2007) et Andrade *et al.* (2017) l'oxygène est un facteur intervenant dans la voie métabolique de la β -oxydation et participe également aux réactions biologiques de production et de ré-consommation de γ -DL, mais trop de O₂ peut inhiber la synthèse et affecter négativement la production de γ -DL (Aguedo *et al.*, 2005), c'est-à-dire qu'il peut éviter la formation de γ -DL ou la suppression de l'arôme après sa production. Parallèlement aux niveaux élevés d'oxygène dans le milieu de biotransformation, Aguedo (2004) a également signalé que l'environnement redox global peut influencer l'étape cruciale menant à la formation d'autres C10-lactones à partir de l'acide 4-hydroxydécanoïque, le précurseur direct du γ -DL. En conséquence, les rapports précédents de Aguedo *et al.* (2005), Garcia *et al.* (2007), ont indiqué que sous une faible aération, la concentration de γ -DL est beaucoup plus élevée que dans les milieux avec une aération intensive, ce qui a favorisé l'accumulation de 3-hydroxy- γ -décylactone et de composés décénolides (dec-2-en-4-olide et dec-3-en-4-olide) dans la voie métabolique (García *et al.* 2007, 2009; Romero-Guido *et al.* 2011b; Try *et al.* 2018)

Par conséquent, nous supposons que le taux d'aération et d'agitation est une étape essentielle dans toute installation de biotechnologie qui conduirait à une amélioration du processus de biotransformation et donc l'accumulation du produit désiré ainsi que de réduire d'autres produits potentiels dans le milieu de biotransformation.

C.5. Identification de la γ -Décalactone

Yarrowia lipolytica était un bon producteur potentiel de γ -DL. En bref, le processus implique une hydrolyse du CO par les lipases pour donner de l'acide ricinoléique libre, l'absorption de l'acide par les cellules et la fermentation aérobie pour réaliser une oxydation B abrégée de l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxyoctadec-9-énoïque) en acide 4-hydroxydécanoïque (4HDA), lactonisation de l'acide en γ -DL, suivie d'une extraction par solvant et de sa purification. Après cela, les extraits concentrés ont été soumis à l'analyse, ils ont été identifiés par GC-MS. Des concentrations en γ -DL de 460 mg.L⁻¹ ont été obtenues après 5 jours à partir de milieux de fermentation contenant 25 g/L d'huile de ricin(Figure 43). Ainsi, le milieu de biotransformation de la souche *y. lipolytica* contenait un fort arôme fruité principalement dû aux lactones produites (γ -DL), ce qui a été déterminé par GC-MS en comparant les données de rétention et les odeurs avec celles des échantillons authentiques. On peut certainement dire que la γ -DL est la plus abondante et qu'elle est également responsable de l'arôme prédominant qui ressemble à celui des pêches.

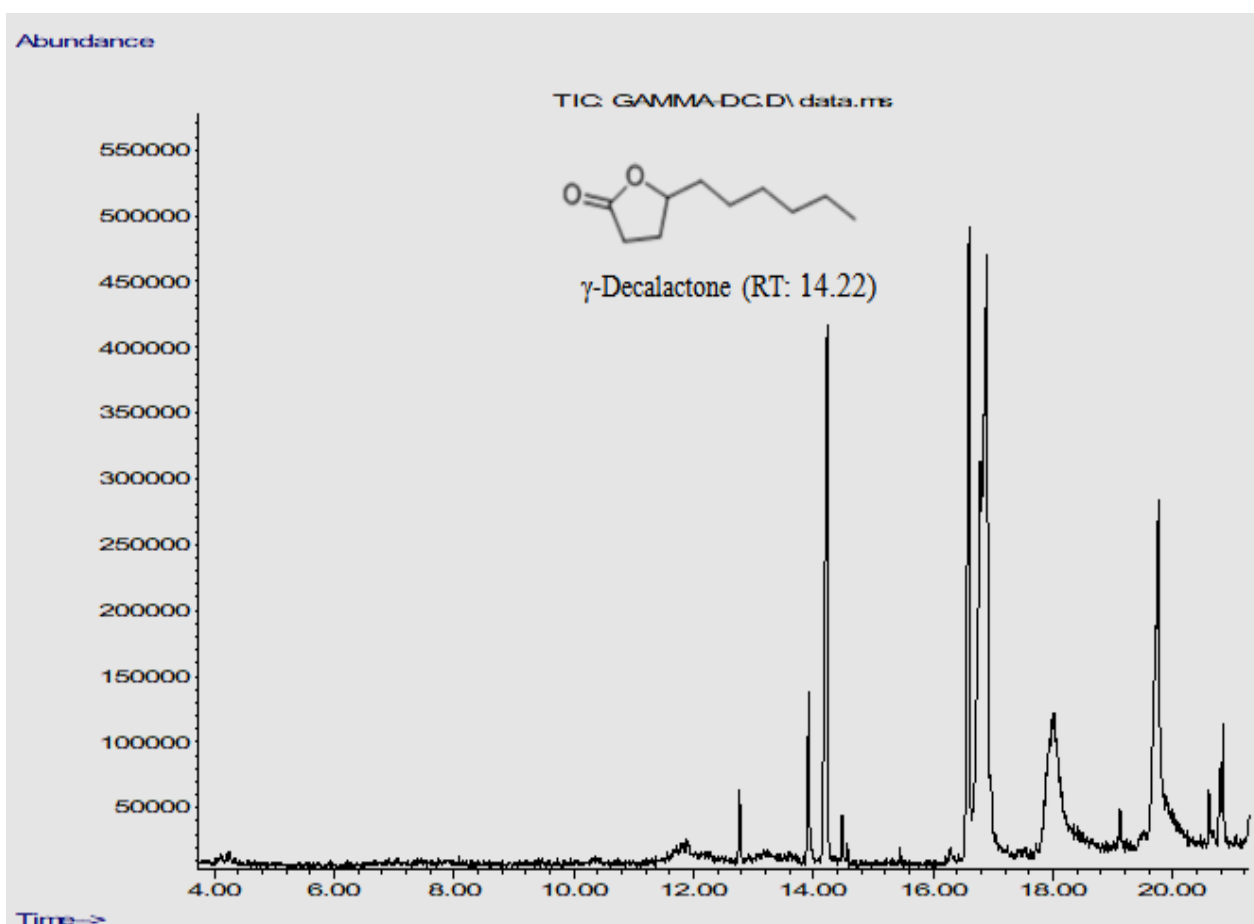


Figure 43 : Chromatogramme obtenu avec la souche *Y.lipolytica* de culture à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ sur huile de ricin. Le temps est exprimé en minute.

C.6. Intermediaires de la bioconversion à γ -DL

Yarrowia lipolytica testée dans un milieu constitué de 2 % de peptone et 2,5% d'huile de ricin à $29 \pm 1^\circ\text{C}$. *Yarrowia lipolytica* était un bon producteur potentiel de γ -DL. En bref, le processus implique une hydrolyse du Huile de ricin médiée par les lipases pour donner de l'acide ricinoléique libre, l'absorption de l'acide par les cellules et la fermentation aérobie pour réaliser une oxydation B abrégée de l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxyoctadec-9-énoïque) en acide 4-hydroxydécanoïque (4HDA), lactonisation de l'acide en γ -DL

C.6.1. Mise en évidence de la présence de précurseurs d'arômes

Jusqu'à présent, l'acide ricinoléique (12-hydroxy-C18:1), le constituant principal de l'huile de ricin était métabolisé de manière particulière (montré ci-dessus), ce qui donnait au final un arôme fruité γ -Déalactone(Figure 48) à la fin du cinquième jour , à ce moment de la fermentation, par GC-MS les «intermediaires métaboliques» : 12 acides hydroxy -9-

octadécénoïque, 10-hydroxy-7-hexadécénoïque, 4-hydroxy décénoïque et 2-hydroxy octénoïque ont été détectés dans le milieu de culture (Figure 44).

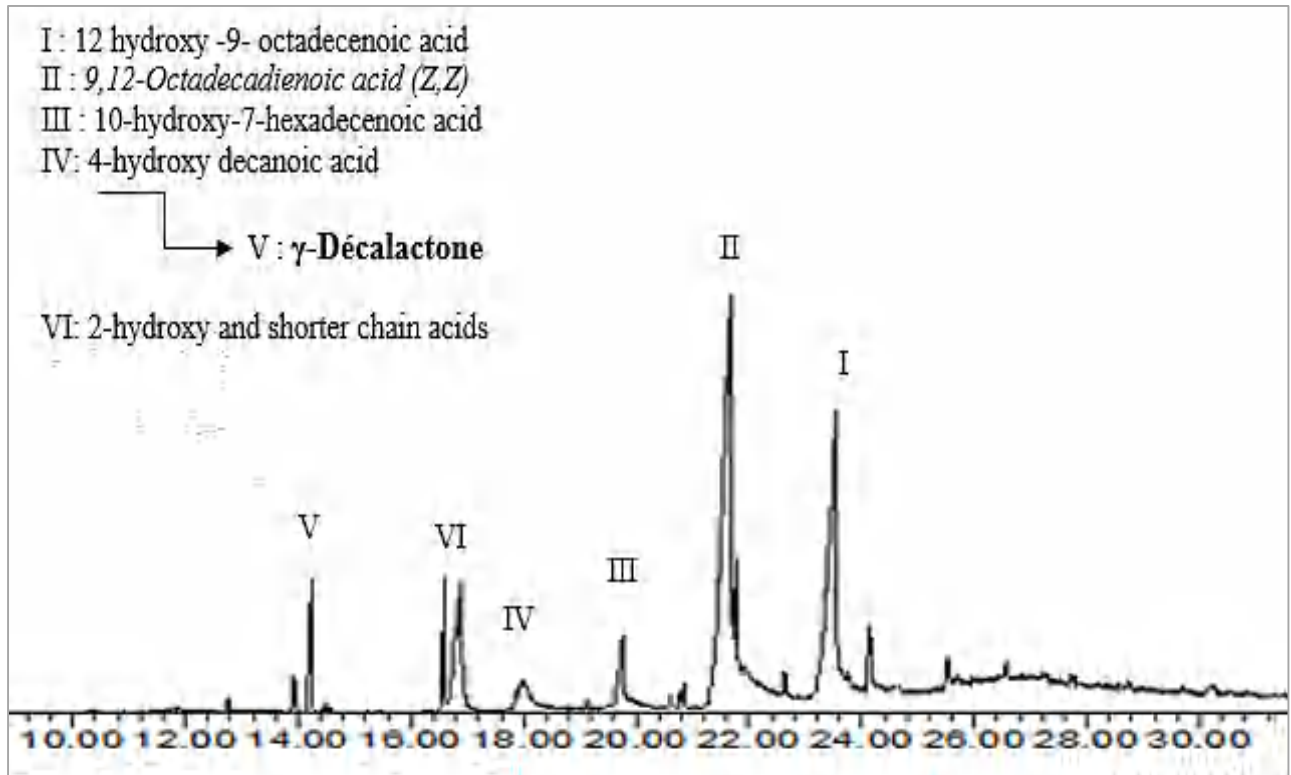


Figure 44: GC-MS des métabolites de l'acide ricinoléique produits par *Yarrowia lipolytica*.

De plus, un pic notable (II) d'acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) a été enregistré dans le milieu de la biotransformation. Comme prévu, Maume and Cheetham 1990, rapporté que Le processus implique l'hydrolyse de l'huile de ricin par la lipase pour donner de l'acide ricinoléique libre (le composant principal de l'huile de ricin, presque 90 %) en un milieu de biotransformation. précisément, Les profils d'acides gras présents dans l'huile de ricin sont les acides oléique (3.0 %), stéarique (1.0 %), palmitique (1.0 %), linoléique (4.2 %), linoléique et entre autres. Parmi eux, l'acide ricinoléique, un acide gras monoinsaturé est l'acide dominant constituant environ 75 à 90 % de la composition totale de l'huile (Lin et al. 1996; Yeboah et al. 2021), donc, leur présences au le milieu de biotransformation est normal. En le processus de bioconversion, comme le montre la figure 44, les concentrations d'acide ricinoléique ont diminué dans le milieu de culture dans lequel la levure a été cultivée après 120 heures, ce qui a conduit à l'apparition du métabolisme intermédiaires (Figure 44 : I, III, IV, V) à l'absorption de l'acide par les cellules et la fermentation aérobie pour obtenir une B-oxydation abrégée de l'acide ricinoléique (acide 12hydroxyoléique) en acide 4-hydroxydécénoïque (4HDA), puis

lactonisation de l'acide en γ -DL. Alors que la concentration d'acide 9,12-octadécadiénoïque (précurseur de lactone pour former la delta-decalactone à partir d'acide linoléique (Figure 44 : II)) a été observée au milieu à ce point (pendant la période de culture de 120 heures au cours de laquelle le composé aromatisant a été produit d'acide ricinoléique).

Ce résultat indique que *Y.lipolytica* est incapable de métaboliser complètement l'acide linoléique. Comme attendu, lors de l'étude du comportement de cette souche dans la première partie des résultats, une diminution du taux de croissance des cellules a été observée, car les cellules de levure apparaissaient dans le milieu dépendant de l'acide linoléique moins que la population d'origine du milieu de pré-culture. L'effet antimicrobien observé de l'acide linoléique était en accord avec les résultats de (Lin *et al.*, 1996) qui ont montré un effet antimicrobien de l'acide linoléique sur *Sporobolomyces odorus*. Selon Waché, (2013) et Braga et Belo, (2016), les levures sont d'excellents biocatalyseurs dans le domaine de la transformation des acides gras en acides dicarboxyliques et lactones. Concernant ce dernier *Y. lipolytica* a été capable d'hydrolyser l'huile de ricin en acide ricinoléique et de l'utiliser progressivement, car une concentration élevée de cet acide et aussi avec la présence d'une quantité insignifiante d'acide au milieu de la biotransformation a un effet inhibiteur sur la croissance des cellules de levure. Ainsi, la production de γ -DL peut être améliorée par la densité cellulaire, et, ajoute l'extrait de levure (comme sources d'azote pour augmenter la croissance cellulaire et la biotransformation), et aussi des cultures fed-batch, selon ce qui est mentionné dans la littérature en Maume et Cheetham, (1991), Feron *et al.* (2006) et Moradi *et al.* (2013, 2016), La présence d'huile de ricin au début de la fermentation puis son ajout à un stade ultérieur pourraient augmenter le niveau de production de γ -décalactone par *Y. lipolytica* car la production de γ -décalactone nécessite une induction continue des voies de β -oxydation ou une absorption d'acides gras et les systèmes d'exportation.

C.7.Conclusions

En conclusion, nous pouvons dire que la bioproduction de l'arôme de type lactone γ -DL par *Y. lipolytica* était particulièrement adaptée à cette biotransformation, étant une souche de lipase de surexpression. Ainsi, dans les cinq jours de réaction, *Y. lipolytica* a réussi à bioconvertir l'huile de ricin (acide ricinoléique) en γ -DL, car ce dernier était le plus abondant et est également responsable de l'arôme prédominant qui ressemble à celui de la pêche selon le GC-MS. Par conséquent, cette souche peut être considérée comme une source alternative pour la production

de γ -DL. En revanche, le bioréacteur n'a pas été efficace pour la production de γ -DL ; de plus, la croissance cellulaire et la performance de la souche ont été affectées par une teneur élevée en huile de ricin dans le milieu des flacons agités. Ainsi, la tentative de faire progresser le processus nécessite d'améliorer les conditions de culture. Jusqu'à présent, nous avons émis l'hypothèse que l'aération et le taux d'agitation sont des points clés inhérents à tout environnement biotechnologique, et qu'un réglage fin de ces deux éléments (dans des flacons à haut CO, ou dans un bioréacteur) permettrait d'améliorer le processus de biotransformation, et par conséquent l'accumulation du produit souhaité. Dans les études ultérieures sur la synthèse biotechnologique du γ -DL, il est également nécessaire de vérifier en permanence la concentration de γ -DL dans le milieu et d'arrêter la biotransformation avant sa phase de dégradation.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

Actuellement, avec le développement continu des économies et conséquemment à une limitation des ressources naturelles et l'augmentation des niveaux moyens de consommation, une attention croissante est accordée à la santé physique et mentale des consommateurs. Dans ce contexte, la plupart des microorganismes, et particulièrement les levures, possèdent la capacité d'une assimilation large des substrats carbonés et assurant une production des produits biologiques utiles et surs.

Dans cette étude, *Y. lipolytica* a été utilisée comme modèle pour l'accumulation de lipides et la production d'arôme. Pour la plupart des cultures, on peut dire que la bio production microbiennes par la levure *Y. lipolytica* étaient particulièrement adaptées aux bioprocédés qui présentent un intérêt biotechnologique sain, économiques, industriels et environnemental important.

Concernant les biotechnologies, la souche étudiée a montré une bonne bio activité dans le métabolisme des lipides, plus précisément, l'hydrolyse des huiles par ses enzymes et l'accumulation de lipides intracellulaires, ainsi que la survie dans des conditions difficiles (avec des substrats de déchets complexes), une adhérence adéquate et raisonnable et la production de bioproduits utiles avec une valeur nutritionnelle élevée ont été réalisées et surs. Un large éventail d'acides gras nutritionnels a été exploré et caractérisés en raison de leurs diverses activités bénéfiques, notamment les acides gras insaturés, ainsi que, gamma-décalactone, indiquant sa faisabilité, son aptitude aux processus de biotransformation.

Économiquement, la levure *Y. lipolytica* pour produire des acides gras nutritionnels contourne les limitations traditionnelles de la synthèse chimique ou de l'extraction à partir d'animaux et de plantes et ainsi que réduction des coûts de fermentation grâce à l'utilisation de déchets ; car détourner l'utilisation de substrats tels que le sucre et l'acide oléique vers d'autres procédés industriels peut affecter le prix de marché des produits destinés à la consommation humaine. De ce fait, la biodégradabilité des déchets huileux par les levures en a fait un critère de conception critique en termes de coûts. En complément, l'hydrolyse des huiles en particulier dans milieu de biotransformation en l'arôme prédominant qui ressemble à la pêche (gamma décalactone) par ses enzymes sans frais supplémentaires, qui rendent la levure précieuse sur le plan nutritionnel.

Au niveau de l'industrie et de l'environnement, la levure *Y. lipolytica* était particulièrement adaptée aux bioprocédés qui présentent un intérêt industriel et environnemental important. Compte tenu des attributs favorables de *Y. lipolytica* et des données de cette recherche, le potentiel de cette souche peut être exploité pour améliorer la production à l'échelle industrielle. Étant donné que la souche de cette étude a montré une bonne bio activité dans le métabolisme des lipides et amélioré les processus de fermentation en utilisant des substrats à faible coût tels que les huiles usées et leur bio remédiation, offrant une méthode durable, respectueuse de l'environnement et efficace pour la production industrielle.

Par conséquent, la souche peut être considérée comme un catalyseur (bio) approprié pour ce type de bioprocédé et une source potentielle, utile à la « prochaine génération » de l'industrie des bioproduits microbiens. Elle pourrait donc également être considérée comme une levure oléagineuse prometteuse, un bon outil d'intégration dans des solutions de bio remédiation qui répondent aux exigences de l'économie circulaire et de la durabilité environnementale.

Perspectives

Les futures études visant à améliorer davantage et à élargir la production de bioproduits, et ainsi qu'à augmenter le niveau nutritionnel de la levure *Y. lipolytica* peuvent tirer parti de mécanismes métaboliques plus détaillés et de nombreux outils de recherche innovants, ce qui favorisera davantage la production commerciale de suppléments nutritionnels utilisant *Y. lipolytica*. Ce travail a soulevé plusieurs points qui mériteraient des études complémentaires et autres approches pour améliorer l'accumulation de l'acide gras and production d'arôme dans les levures.

- Production de métabolites à valeur ajoutée par *Y. lipolytica* cultivée sur déchets dans la mode de cultures en continu
- Etudier le potentiel de production de γ -décalactone à partir de déchets comme substrat alternatif
- Production de γ -décalactone par *Y.lipolytica* : étude des conditions expérimentales et optimisation du mode opératoire en bioréacteur
- Construction de voies désaturase/élongase et PKS hétérologues.
- Modification de la biosynthèse des acides gras par régulation combinée des gènes endogènes, inhibition des voies concurrentes et ingénierie de la voie d'édition des acyles.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

- Différentes stratégies incluant l'expression multicopie, la régulation dynamique, la fusion de protéines et l'évolution dirigée.
- Optimisation du processus de fermentation grâce à de conditions de culture et de méthodes de fermentation plus appropriées et selection nouvelles substrates ou/et intégrer un groupe de substrates dans une même culture. En complément, essayer de faire avancer le processus nécessite d'améliorer les conditions de culture et type de fermentation. Jusqu'à présent, nous émettons l'hypothèse que type de fermentation (discontinu) et le taux d'aération et d'agitation et la concentration des substrats, ainsi que la concentration des cellules, sont des points clés inhérents à l'environnement biotechnique, ainsi, Il est à considérer dans la méthode de cultures futuriste et à contrôler son (en flacons, ou dans un bioréacteur), serait amélioré le processus de biotransformation, et l'accumulation du produit désiré.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- Abad S, Turon X (2012) Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances* 30:733–741. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.002>
- Abdel-Mawgoud AM, Markham KA, Palmer CM, et al (2018) Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 50:192–208. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.016>
- Abghari A, Chen S (2014) *Yarrowia lipolytica* as an Oleaginous Cell Factory Platform for Production of Fatty Acid-Based Biofuel and Bioproducts. *Front Energy Res* 2:. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00021>
- Abou-Zeid AA, Khoja SM (1993) Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 148:213–221. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80093-4](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80093-4)
- Abrahão MRE, Molina G, Pastore GM (2013) Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Research International* 52:367–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.007>
- Adams MR, Moss MO (2008) *Food microbiology*, 3rd ed. RSC Publishing, Cambridge, UK
- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1219–1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>
- Aggelis G, Iconomou D, Christou M, et al (2003) Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 37:3897–3904. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00313-0)
- Aguedo M, Beney L, Waché Y, et al (2002) Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnology Letters* 24:1975–1979. <https://doi.org/10.1023/A:1021129800080>
- Aguedo M, Gomes N, Garcia EE, et al (2005) Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica* under increased O₂ Transfer Rates. *Biotechnol Lett* 27:1617–1621. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2517-z>
- Aguedo M, Ly MH, Belo I, et al (2004) The Use of Enzymes and Microorganisms for the Production of Aroma Compounds from Lipids. 10
- Aguedo M, Waché Y, Mazoyer V, et al (2003) Increased Electron Donor and Electron Acceptor Characters Enhance the Adhesion between Oil Droplets and Cells of *Yarrowia lipolytica* As Evaluated by a New Cytometric Assay. *J Agric Food Chem* 51:3007–3011. <https://doi.org/10.1021/jf020901m>
- Ahmad Tarmizi AH, Niranjana K, Gordon M (2013) Physico-chemical changes occurring in oil when atmospheric frying is combined with post-frying vacuum application. *Food Chemistry* 136:902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.001>
- Al Mualad WAN, Bouchedja DN, Selmania A, et al (2022) Recycling Pollutants and Used Oils as Substrates for Producing Useful Lipids in the form of Single-Cell Oil by the Aerobic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int J Environ Res* 16:97. <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00480-z>
- Alchihab M, Aldric J-M, Aguedo M, et al (2010a) The use of Macronet resins to recover gamma-decalactone produced by *Rhodotorula aurantiaca* from the culture broth. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:167–172. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0659-z>
- Alchihab M, Destain J, Aguedo M, et al (2009) Production of gamma-decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *Appl Biochem Biotechnol* 158:41–50. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8297-x>
- Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Thonart P (2010b) Production d'arômes de type lactone par des levures. *Biotechnol Agron Soc Environ*
- Alchihab M, Dubois-Dauphin R, Aguedo M, et al (2010c) Peroxisomal β -oxidation and Production of γ -decalactone by the Yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38:68–72. <https://doi.org/10.15835/nbha3824881>

- Ali SS, Al-Tohamy R, Koutra E, et al (2021a) Valorizing lignin-like dyes and textile dyeing wastewater by a newly constructed lipid-producing and lignin modifying oleaginous yeast consortium valued for biodiesel and bioremediation. *Journal of Hazardous Materials* 403:123575. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123575>
- Ali SS, Al-Tohamy R, Xie R, et al (2020) Construction of a new lipase- and xylanase-producing oleaginous yeast consortium capable of reactive azo dye degradation and detoxification. *Bioresource Technology* 313:123631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123631>
- Aloulou A, Puccinelli D, De Caro A, et al (2007a) A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:1446–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.10.006>
- Aloulou A, Rodriguez JA, Puccinelli D, et al (2007b) Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:228–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.12.006>
- An J-U, Joo Y-C, Oh D-K (2013) New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound γ -Dodecalactone from 10-Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 79:2636–2641. <https://doi.org/10.1128/AEM.02602-12>
- Appels L, Lauwers J, Degrève J, et al (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:4295–4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>
- Arnezeder C, Hampel WA (1990) Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells. *Biotechnol Lett* 12:277–282. <https://doi.org/10.1007/BF01093521>
- Arous F, Azabou S, Jaouani A, et al (2016) Biosynthesis of single-cell biomass from olive mill wastewater by newly isolated yeasts. *Environ Sci Pollut Res* 23:6783–6792. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5924-2>
- Arslan NP, Aydogan MN, Taskin M (2016) Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose—positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of Biotechnology* 231:32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.033>
- Assas N, Ayed L, Marouani L, Hamdi M (2002) Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38:361–365. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00091-2)
- Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, et al (2006) Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* 6:1450–1459. <https://doi.org/10.1002/pmhc.200500339>
- Babau M, Cescut J, Allouche Y, et al (2013) Towards a Microbial Production of Fatty Acids as Precursors of Biokerosene from Glucose and Xylose. *Oil Gas Sci Technol – Rev IFP Energies nouvelles* 68:899–911. <https://doi.org/10.2516/ogst/2013148>
- Bal J, Lee H-J, Cheon SA, et al (2013) Ylpex5 mutation partially suppresses the defective hyphal growth of a *Yarrowia lipolytica* ceramide synthase mutant, Yllac1, by recovering lipid raft polarization and vacuole morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 50:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.003>
- Baltrėnas P, Baltrėnaitė E (2020) Sustainable Environmental Protection Technologies: Contaminant Biofiltration, Adsorption and Stabilization. Springer International Publishing, Cham
- Bankar A, Zinjarde S, Telmore A, et al (2018) Morphological response of *Yarrowia lipolytica* under stress of heavy metals. *Can J Microbiol* 64:559–566. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0050>
- Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:847–865. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2156-8>
- Barth G (ed) (2013) *Yarrowia lipolytica: Biotechnological Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19:219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>

- Barth G, Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica*. Nonconventional Yeasts in Biotechnology 313–388. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_10
- Bashir KMI, Mansoor S, Kim N-R, et al (2019) Effect of organic carbon sources and environmental factors on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Ann Microbiol* 69:353–368. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1423-2>
- Bataiche I, Kacem-chaouche N, Destain J, et al (2014) Screening of *Candida boidinii* from Chemlal spent olive characterized by higher alkaline-cold adapted lipase production. *African Journal of Biotechnology* 13:. <https://doi.org/10.4314/ajb.v13i11>
- Beligon V Valorisation d'acides gras volatils issus de fermentation anaérobie par la production de lipides microbiens, précurseurs de biodiesel. 299
- Bellou S, Makri A, Triantaphyllidou I-E, et al (2014) Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology* 160:807–817. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074302-0>
- Ben Akacha N, Gargouri M (2015a) Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocess Processing* 94:675–706. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>
- Ben Akacha N, Gargouri M (2015b) Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocess Processing* 94:675–706. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>
- Ben Sassi A, Boularbah A, Jaouad A, et al (2006) A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry* 41:74–78. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.074>
- Ben Sassi A, Ouazzani N, Walker GM, et al (2008) Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates. *Biodegradation* 19:337–346. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9140-8>
- Beopoulos A (2006) Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides. 185
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, et al (2009a) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48:375–387. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>
- Beopoulos A, Chardot T, Nicaud J-M (2009b) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91:692–696. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.004>
- Beopoulos A, Desfougeres T, Sabirova J, et al (2010) The Hydrocarbon-Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Timmis KN (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 2111–2121
- Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, et al (2008) Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 74:7779–7789. <https://doi.org/10.1128/AEM.01412-08>
- Beopoulos A, Nicaud J-M (2012) Yeast: A new oil producer? *OCL* 19:22–28. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0426>
- Beopoulos A, Nicaud J-M, Gaillardin C (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1193–1206. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>
- Bhat TK, Singh B, Sharma OP (1998) Microbial degradation of tannins – A current perspective. *Biodegradation* 9:343–357. <https://doi.org/10.1023/A:1008397506963>
- Bialy HE, Gomaa OM, Azab KS (2011) Conversion of oil waste to valuable fatty acids using Oleaginous yeast. *World J Microbiol Biotechnol* 27:2791–2798. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0755-x>
- Bloom M, Evans E, Mouritsen OG (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Quart Rev Biophys* 24:293–397. <https://doi.org/10.1017/S0033583500003735>
- Bordes F, Barbe S, Escalier P, et al (2010) Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical Journal* 99:2225–2234. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.040>

- Bouchedja DN, Danthine S, Kar T, et al (2017) Online flow cytometry, an interesting investigation process for monitoring lipid accumulation, dimorphism, and cells' growth in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* JMY 775. *Bioresour Bioprocess* 4:3. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0132-6>
- Bouchedja DN, Danthine S, Kar T, et al (2018) pH level has a strong impact on population dynamics of the yeast *Yarrowia lipolytica* and oil micro-droplets in multiphasic bioreactor. *FEMS Microbiology Letters* 365:. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny173>
- Boyle NR, Morgan JA (2009) Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Syst Biol* 3:4. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-4>
- Braga A, Belo I (2016) Biotechnological production of γ -decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica*. *World J Microbiol Biotechnol* 32:169. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2116-2>
- Braga A, Crutz-Le Coq AM, Dulermo R, et al (2015a) Effect of POX genotype and Lip2p overexpression on lactone production and reconsumption by *Yarrowia lipolytica* using castor oil as substrate. *Process Biochemistry* 50:1357–1362. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.019>
- Braga A, Gomes N, Belo I (2012) Lipase Induction in *Yarrowia lipolytica* for Castor Oil Hydrolysis and Its Effect on γ -Decalactone Production. *J Am Oil Chem Soc* 89:1041–1047. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1987-5>
- Braga A, Guerreiro C, Belo I (2018) Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. *Food Bioprocess Technol* 11:2217–2228. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2180-8>
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, et al (2015b) Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, et al (2016) Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. *Journal of Biotechnology* 217:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.023>
- Brígida AIS, Amaral PFF, Coelho MAZ, Gonçalves LRB (2014a) Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101:148–158. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.016>
- Brozzoli V, Crognale S, Sampedro I, et al (2009) Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology* 100:3395–3402. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.022>
- Cacas J-L, Furt F, Le Guédard M, et al (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research* 51:272–299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
- Cangemi JM, Santos AM dos, C. Neto S, Chierice GO (2008) Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. *Polímeros* 18:201–206. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282008000300004>
- Cao L, Yin M, Shi T-Q, et al (2022) Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce nutritional fatty acids: Current status and future perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology* 7:1024–1033. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.06.002>
- Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, Scognamiglio F (1992) Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry* 31:4125–4128. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80426-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80426-F)
- Caporusso A, Capece A, De Bari I (2021) Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes. *Fermentation* 7:50. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020050>
- Carota E, Crognale S, D'Annibale A, et al (2017) A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Science of The Total Environment* 584–585:554–560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>
- Carsanba E, Papanikolaou S, Erten H (2018) Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology* 38:1230–1243. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
- Carsanba E, Papanikolaou S, Fickers P, et al (2019) Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. In: Sibirny A (ed) *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer International Publishing, Cham, pp 91–117

- Carsanba E, Papanikolaou S, Fickers P, Erten H (2020) Lipids by *Yarrowia lipolytica* Strains Cultivated on Glucose in Batch Cultures. *Microorganisms* 8:1054. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071054>
- Carvalho T, Pereira A da S, Bonomo RCF, et al (2020) Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach. *International Journal of Biological Macromolecules* 160:889–902. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.174>
- Casares D, Escribá PV, Rosselló CA (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *IJMS* 20:2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Casas-Godoy L, Meunchan M, Cot M, et al (2014) *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2: An efficient enzyme for the production of concentrates of docosahexaenoic acid ethyl ester. *Journal of Biotechnology* 180:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.018>
- Cavallo E, Charreau H, Cerrutti P, Foresti ML (2017) *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Research* 17:. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>
- Cernat Bondar D, Beckerich J-M, Bonnarme P (2005) Involvement of a Branched-Chain Aminotransferase in Production of Volatile Sulfur Compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 71:4585–4591. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4585-4591.2005>
- Cescut J (2009) Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés
- Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, et al (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155:587–595. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.006>
- Chang L, Lu H, Chen H, et al (2022) Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: Current progress and future prospects. *Biotechnology Advances* 54:107794. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107794>
- Chatzifragkou A, Makri A, Belka A, et al (2011) Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36:1097–1108. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.11.040>
- Chen D-C, Beckerich J-M, Gaillardin C (1997) One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:232–235. <https://doi.org/10.1007/s002530051043>
- Chen J, Yan S, Zhang X, et al (2018) Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel. *Waste Management* 71:164–175. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.044>
- Chi Z, Zheng Y, Jiang A, Chen S (2011) Lipid Production by Culturing Oleaginous Yeast and Algae with Food Waste and Municipal Wastewater in an Integrated Process. *Appl Biochem Biotechnol* 165:442–453. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9263-6>
- Christie WW, Han X (2010) *Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis*, 4th ed. The Oily press, PJ Barnes & associates, Bridgwater
- Chtourou M, Ammar E, Nasri M, Medhioub K (2004) Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 79:869–878. <https://doi.org/10.1002/jctb.1062>
- Ciriminna R, Meneguzzo F, Delisi R, Pagliaro M (2017) Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chemistry Central Journal* 11:22. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>
- Coelho MAZ, Amaral PFF, Belo I (2010) *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. 15
- Corzo G, Revah S (1999) Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology* 70:173–180. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00024-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00024-3)
- Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajó JC (2000) Dimorphic behaviour of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. *Biotechnology Letters* 22:605–610. <https://doi.org/10.1023/A:1005677618040>

- Csutak O, Corbu V, Stoica I, et al (2015) Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 6:545–553. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.083>
- Cybulski K, Tomaszewska-Hetman L, Rakicka M, et al (2019) Production of pyruvic acid from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Folia Microbiol* 64:809–820. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00695-2>
- Czub J, Baginski M (2006) Comparative Molecular Dynamics Study of Lipid Membranes Containing Cholesterol and Ergosterol. *Biophysical Journal* 90:2368–2382. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072801>
- Darvishi F, Ariana M, Marella ER, Borodina I (2018) Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:5925–5938. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>
- Darvishi F, Faraji N, Shamsi F (2019) Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Biological Macromolecules* 125:955–961. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.162>
- Darvishi F, Fathi Z, Ariana M, Moradi H (2017) *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* 127:87–96. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.013>
- Darvishi Harzevili F (2014a) *Yarrowia lipolytica* in Biotechnological Applications. In: *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer International Publishing, Cham, pp 17–74
- Darvishi Harzevili F (2014b) *Yarrowia lipolytica*: An Overview. In: *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–16
- Darvishi Harzevili F (2014c) *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer International Publishing, Cham
- Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, Aggelis G (2019) Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:8585–8596. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10088-7>
- Daskalaki A, Vasiliadou IA, Bellou S, et al (2018) Data on cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* grown on fatty substrates. *Data in Brief* 21:1037–1044. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.116>
- Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1471–1510. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y)
- Daum G, Wagner A, Czabany T, Athenstaedt K (2007) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 89:243–248. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.018>
- de Andrade P, Bf C, Rf S, Dr D (2017) Production of γ -Decalactone by Yeast Strains under Different Conditions. *Food technology and biotechnology* 55:. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.5009>
- De Felice B, Pontecorvo G, Carfagna M (1997) Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol* 17:231–239. <https://doi.org/10.1002/abio.370170306>
- De Feo G, Di Domenico A, Ferrara C, et al (2020) Evolution of Waste Cooking Oil Collection in an Area with Long-Standing Waste Management Problems. *Sustainability* 12:8578. <https://doi.org/10.3390/su12208578>
- De Pourcq K, Vervecken W, Dewerte I, et al (2012) Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of therapeutic proteins homogeneously glycosylated with Man8GlcNAc2 and Man5GlcNAc2. *Microbial Cell Factories* 11:53. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-53>
- Do DTH, Theron CW, Fickers P (2019) Organic Wastes as Feedstocks for Non-Conventional Yeast-Based Bioprocesses. *Microorganisms* 7:229. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080229>
- Dobrowolski A, Drzymala K, Mitula P, Mironczuk AM (2020) Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 314:123746. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123746>
- Dobrowolski A, Drzymala K, Rzechonek DA, et al (2019) Lipid Production From Waste Materials in Seawater-Based Medium by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Front Microbiol* 10:547. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00547>

- Dobrowolski A, Mituła P, Rymowicz W, Mirończuk AM (2016) Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 207:237–243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.039>
- Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A A novel application of solid state culture: production of lipases by 5
- Domínguez A, Deive FJ, Angeles Sanromán M, Longo MA (2010) Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:1200–1208. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000049>
- Domínguez MT, Aponte C, Pérez-Ramos IM, et al (2012) Relationships between leaf morphological traits, nutrient concentrations and isotopic signatures for Mediterranean woody plant species and communities. *Plant Soil* 357:407–424. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1214-7>
- Dourou M, Aggeli D, Papanikolaou S, Aggelis G (2018) Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:2509–2523. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8813-z>
- Dourou M, Kancelista A, Juszczak P, et al (2016) Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production* 139:957–969. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.133>
- Dowhan W, Bogdanov M, Mileykovskaya E (2016) Functional Roles of Lipids in Membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, pp 1–40
- Duarte SH, de Andrade CCP, Ghiselli G, Maugeri F (2013) Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresource Technology* 138:377–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.004>
- Dufossé L, Feron G, Mauvais G, et al (1998) Production of γ -decalactone and 4-hydroxy-decanoic acid in the genus *Sporidiobolus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86:169–173. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80056-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80056-1)
- Dufosse L, Souchon I, Feron G, et al (1999) In Situ Detoxification of the Fermentation Medium during γ -Decalactone Production with the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Prog* 15:135–139. <https://doi.org/10.1021/bp980113a>
- Dufourc EJ (2008) Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* 1:63–77. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>
- Dunoyer AT, Cuello REG, Salinas RP (2020) Biodegradation of dairy wastes using crude enzymatic extract of *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773. *Rev ambiente água* 15:1. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2448>
- Economou ChN, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV (2011) Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresource Technology* 102:9737–9742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.025>
- Egermeier M, Russmayer H, Sauer M, Marx H (2017) Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol. *Front Microbiol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00049>
- Egermeier M, Sauer M, Marx H (2019) Golden Gate-based metabolic engineering strategy for wild-type strains of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters* 366:. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz022>
- Eitzen GA, Titorenko VI, Smith JJ, et al (1996) The *Yarrowia lipolytica* Gene PAY5 Encodes a Peroxisomal Integral Membrane Protein Homologous to the Mammalian Peroxisome Assembly Factor PAF-1. *Journal of Biological Chemistry* 271:20300–20306. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20300>
- Endrizzi A, Awadé AC, Belin J-M (1993) Presumptive involvement of methyl ricinoleate β -oxidation in the production of γ -decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. *FEMS Microbiology Letters* 114:153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06566.x>
- Endrizzi A, Belin J-M (1995) Bioconversion of methyl ricinoleate to 4-hydroxy-decanoic acid and to γ -decalactone by yeasts of the genus *Candida*. *Journal of Basic Microbiology* 35:285–292. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350503>
- Endrizzi A, Pagot Y, Clainche AL, et al (1996) Production of Lactones and Peroxisomal Beta-Oxidation in Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 16:301–329. <https://doi.org/10.3109/07388559609147424>

- Ernst R, Ballweg S, Levental I (2018) Cellular mechanisms of physicochemical membrane homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 53:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.013>
- Escamilla-García E, O’Riordan S, Gomes N, et al (2014) An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 49:1377–1382. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.011>
- Escamilla-García EEG (2008) Aspects de la dégradation de substances hydrophobes en composés d’arômes par la levure *Yarrowia lipolytica* / Aspects of the degradation of hydrophobic substances in aroma compounds by the yeast *Yarrowia lipolytica*
- Eyster KM (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advances in Physiology Education* 31:5–16. <https://doi.org/10.1152/advan.00088.2006>
- Fabiszewska A, Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, et al (2022a) Expression Profile of Selected Genes Involved in Storage Lipid Synthesis in a Model Oleaginous Yeast Species *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Molecular Sciences* 23:1041. <https://doi.org/10.3390/ijms23031041>
- Fabiszewska A, Wierzchowska K, Nowak D, et al (2022b) Brine and Post-Frying Oil Management in the Fish Processing Industry—A Concept Based on Oleaginous Yeast Culture. *Processes* 10:294. <https://doi.org/10.3390/pr10020294>
- Fabiszewska AU, Zieniuk B, Kozłowska M, et al (2021) Studies on Upgradation of Waste Fish Oil to Lipid-Rich Yeast Biomass in *Yarrowia lipolytica* Batch Cultures. *Foods* 10:436. <https://doi.org/10.3390/foods10020436>
- Fabiszewska, Misiukiewicz-Stępień, Paplińska-Goryca, et al (2019) An Insight into Storage Lipid Synthesis by *Yarrowia lipolytica* Yeast Relating to Lipid and Sugar Substrates Metabolism. *Biomolecules* 9:685. <https://doi.org/10.3390/biom9110685>
- Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811:637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46:839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al (2009) Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 50:S9–S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Fakas S, Makri A, Mavromati M, et al (2009) Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology* 100:6118–6120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.015>
- Fathi Z, Doustkhah E, Ebrahimipour G, Darvishi F (2019) Noncovalent Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase on Dendritic-Like Amino Acid-Functionalized Silica Nanoparticles. *Biomolecules* 9:502. <https://doi.org/10.3390/biom9090502>
- Federici F, Fava F, Kalogerakis N, Mantzavinos D (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters: Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste. *J Chem Technol Biotechnol* 84:895–900. <https://doi.org/10.1002/jctb.2165>
- Felipe L de O, Paulino BN, Sales A, et al (2019) Production of Food Aroma Compounds (Microbial and Enzymatic Methodologies). In: Bordiga M, Nollet LML (eds) *Food Aroma Evolution*, 1st edn. CRC Press, 1st edition. | Boca Raton : CRC Press, 2019. | Series: Food analysis & properties, 2475-7551, pp 293–306
- Fenske DB, Monck MA, Cullis PR, Hope MJ (1995) The functional roles of lipids in biological membranes. In: *Biomembranes: A Multi-Volume Treatise*. Elsevier, pp 1–28
- Feron G, Dufossé L, Mauvais G, et al (2006) Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of γ -decalactone. *FEMS Microbiology Letters* 149:17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10302.x>
- Feron G, Dufosse L, Pierard E, et al (1996a) Production, Identification, and Toxicity of γ -Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus* spp. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 62:6
- Ferreira DM, Silva JAS, Sérvulo EFC, et al (2020) Valorization of solid waste from oil refining and biodiesel industries for the biorecovery of rare earth elements. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00819-6>

- Ferreira P, Lopes M, Mota M, Belo I (2016) Oxygen transfer rate and pH as major operating parameters of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* W29 and CBS 2073. *Chemical Papers* 70:. <https://doi.org/10.1515/chempap-2016-0024>
- Fickers P, Benetti P-H, Waché Y, et al (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5:527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Fickers P, Marty A, Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 29:632–644. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
- Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:136–142. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1342-3>
- Fickers P, Nicaud JM, Gaillardin C, et al (2004) Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 96:742–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x>
- Fickers P, Sauveplane V, Nicaud J-M (2013) The Lipases from *Y. lipolytica*: Genetics, Production, Regulation, and Biochemical Characterization. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 99–119
- Fontanille P, Kumar V, Christophe G, et al (2012) Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 114:443–449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.091>
- Förster A, Jacobs K, Juretzek T, et al (2007) Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:861–869. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1205-4>
- Fraga J, Penha A, da S. Pereira A, et al (2018) Use of *Yarrowia lipolytica* Lipase Immobilized in Cell Debris for the Production of Lipolyzed Milk Fat (LMF). *IJMS* 19:3413. <https://doi.org/10.3390/ijms19113413>
- Frandsen GI, Mundy J, Tzen JTC (2001) Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum* 112:301–307. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120301.x>
- Frascardi D, Bacca AEM, Zama F, et al (2016) Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column. *Chemical Engineering Journal* 283:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.048>
- Frega N, Mozzon M, Lercker G (1999) Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *J Amer Oil Chem Soc* 76:325–329. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0239-4>
- Fukuda R (2013) Metabolism of Hydrophobic Carbon Sources and Regulation of It in *n*-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77:1149–1154. <https://doi.org/10.1271/bbb.130164>
- Gao R, Li Z, Zhou X, et al (2017) Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. *Biotechnol Biofuels* 10:247. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0942-6>
- García EE, Aguedo M, Gomes N, et al (2009) Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57:22–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.06.010>
- García EE, Nicaud J-M, Belin J-M, Waché Y (2007) Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A factorial approach. *Biotechnol J* 2:1280–1285. <https://doi.org/10.1002/biot.200700085>
- Gardini F, Suzzi G, Lombardi A, et al (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research* 1:161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2001.tb00027.x>
- Gasmi N, Ayed A, Nicaud J-M, Kallel H (2011) Design of an efficient medium for heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica*: case of human interferon alpha 2b. *Microb Cell Fact* 10:38. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-38>
- GATFIELD IL (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particular reference to γ -decalactone. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 15:165–170
- Gemperlein K, Dietrich D, Kohlstedt M, et al (2019) Polyunsaturated fatty acid production by *Yarrowia lipolytica* employing designed myxobacterial PUFA synthases. *Nat Commun* 10:4055. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12025-8>

- Gill CO, Hall MJ, Ratledge C (1977) Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 33:231–239. <https://doi.org/10.1128/aem.33.2.231-239.1977>
- Gomes N, Braga A, Teixeira JA, Belo I (2013) Impact of Lipase-Mediated Hydrolysis of Castor Oil on γ -Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*. *J Am Oil Chem Soc* 90:1131–1137. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2231-2>
- Gomes N, Teixeira JA, Belo I (2011a) Empirical modelling as an experimental approach to optimize lactone production. *Catal Sci Technol* 1:86. <https://doi.org/10.1039/c0cy00017e>
- Gomes N, Teixeira JA, Belo I (2010) The use of methyl ricinoleate in lactone production by *Yarrowia lipolytica*: Aspects of bioprocess operation that influence the overall performance. *Biocatalysis and Biotransformation* 28:227–234. <https://doi.org/10.3109/10242422.2010.493208>
- Gomes N, Waché Y, Teixeira JA, Belo I (2011b) Oil-in-water emulsions characterization by laser granulometry and impact on γ -decalactone production in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 33:1601–1606. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0593-9>
- Gonçalves C, Lopes M, Ferreira JP, Belo I (2009) Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology* 100:3759–3763. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.004>
- Goncalves C, Pereira C, Alves M, Belo I (2010) OLIVE MILL WASTEWATER AS A RENEWABLE RESOURCE. *Environ Eng Manag J* 9:319–325. <https://doi.org/10.30638/eemj.2010.045>
- Gonçalves F a. G, Colen G, Takahashi JA (2014) *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal* 2014:e476207. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
- Gopinath M, Ramasamy D, Thangavelu V, Gurunathan DrB (2008) Optimization of Environmental conditions and Kinetics modeling for the Production of γ -decalactone using *Sporidiobolus salmonicolor*. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*
- Gorczyca M, Kaźmierczak J, Steels S, et al (2020) Impact of oxygen availability on heterologous geneexpression and polypeptide secretion dynamics in *Yarrowia lipolytica* -based protein production platforms. *Yeast* 37:559–568. <https://doi.org/10.1002/yea.3499>
- Gould SB (2018) Membranes and evolution. *Current Biology* 28:R381–R385. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.086>
- Granger L-M, Perlot P, Goma G, Pareilleux A (1992) Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:13–17. <https://doi.org/10.1007/BF00174195>
- Grillitsch K, Daum G (2011) Triacylglycerol lipases of the yeast. *Front Biol* 6:219–230. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1142-6>
- Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, et al (2014) *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* 40:187–206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>
- Groguenin A (2004) Genetic engineering of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28:75–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.01.006>
- Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, et al (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26:1–8. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601466>
- Guerrero P, Nur Hanani ZA, Kerry JP, de la Caba K (2011) Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. *Journal of Food Engineering* 107:41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.003>
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Marchetti R (1993) Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 17:329–341. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90203-S](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90203-S)
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Vannini L, et al (2001) Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 69:79–89. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00575-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00575-X)

- Guieysse D, Sandoval G, Faure L, et al (2004) New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 15:3539–3543. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.09.008>
- Gunstone FD (1996) *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Springer US, Boston, MA
- Guo L, Pang Z, Gao C, et al (2020) Engineering microbial cell morphology and membrane homeostasis toward industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology* 66:18–26. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.05.004>
- Guo T, Kit YY, Nicaud J-M, et al (2003) Peroxisome division in the yeast *Yarrowia lipolytica* is regulated by a signal from inside the peroxisome. *Journal of Cell Biology* 162:1255–1266. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305055>
- Guo Y, Feng C, Song H, et al (2011a) Effect of POX3 gene disruption using self-cloning CRF1 cassette in *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production. *World J Microbiol Biotechnol* 27:2807–2812. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0758-7>
- Guo Y, Song H, Wang Z, Ding Y (2012) Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production. *Microbiological Research* 167:246–252. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.003>
- Gurr MI, James AT (1980) *Lipid Biochemistry: an Introduction*. Springer Netherlands, Dordrecht
- Hadeball W (1991) Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from Yeasts (Review). *Acta Biotechnol* 11:159–167. <https://doi.org/10.1002/abio.370110217>
- Hamdi M (1993a) Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: A review. *Bioprocess Engineering* 8:209–214. <https://doi.org/10.1007/BF00369831>
- Hamdi M (1993b) Thermoacidic precipitation of darkly coloured polyphenols of olive mill wastewaters. *Environmental Technology* 14:495–500. <https://doi.org/10.1080/09593339309385318>
- Hamdi M, Ellouz R (1993) Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology* 14:183–188. <https://doi.org/10.1080/09593339309385278>
- Hamdi M, Garcia JL (1993) Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 28:155–159. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(93\)80002-X](https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)80002-X)
- Hamimed S, Jebli N, Sellami H, et al (2020) Dual Valorization of Olive Mill Wastewater by Bio-Nanosynthesis of Magnesium Oxide and *Yarrowia lipolytica* Biomass Production. *C&B* 17:. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900608>
- Hanzal-Bayer MF, Hancock JF (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Letters* 581:2098–2104. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.019>
- Hoekman SK, Broch A, Robbins C, et al (2012) Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:143–169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.143>
- Holthuis JCM, Menon AK (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510:48–57. <https://doi.org/10.1038/nature13474>
- Holthuis JCM, Pomorski T, Riggers RJ, et al (2001) The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport. *Physiological Reviews* 81:1689–1723. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1689>
- Imandi SB, Karanam SK, Garapati HR (2010) Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). *ABB* 01:115–121. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.12016>
- Janek T, Mirończuk AM, Rymowicz W, Dobrowolski A (2020) High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: A biophysical approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 689:108475. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108475>
- Ji X-J, Huang H (2019) Engineering Microbes to Produce Polyunsaturated Fatty Acids. *Trends in Biotechnology* 37:344–346. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.002>

- Jia Y-L, Wang L-R, Zhang Z-X, et al (2021) Recent advances in biotechnological production of polyunsaturated fatty acids by *Yarrowia lipolytica*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0:1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1937041>
- Johnravindar D, Karthikeyan OP, Selvam A, et al (2018) Lipid accumulation potential of oleaginous yeasts: A comparative evaluation using food waste leachate as a substrate. *Bioresource Technology* 248:221–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.151>
- Jolivalt C, Madzak C, Brault A, et al (2005) Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:450–456. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1717-0>
- Jung J-L, Simon G, Alfonsi E, et al (2017) Qualitative and quantitative study of the highly specialized lipid tissues of cetaceans using HR-MAS NMR and classical GC. *PLoS ONE* 12:e0180597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180597>
- Kamzolova SV, Samoilenko VA, Lunina JN, Morgunov IG (2020) Effects of Medium Components on Isocitric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast. *Fermentation* 6:112. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040112>
- Kamzolova SV, Vinokurova NG, Lunina JN, et al (2015) Production of technical-grade sodium citrate from glycerol-containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 193:250–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.092>
- Kar T, Delvigne F, Masson M, et al (2008) Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1053. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0382-1>
- Karim A, Islam MA, Khalid ZB, et al (2021) Microbial lipid accumulation through bioremediation of palm oil mill effluent using a yeast-bacteria co-culture. *Renewable Energy* 176:106–114. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.05.055>
- Katre G, Ajmera N, Zinjarde S, RaviKumar A (2017) Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production. *Microb Cell Fact* 16:176. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0790-x>
- Katre G, Joshi C, Khot M, et al (2012) Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Expr* 2:36. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-36>
- Katre G, Raskar S, Zinjarde S, et al (2018) Optimization of the in situ transesterification step for biodiesel production using biomass of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil. *Energy* 142:944–952. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.10.082>
- Kavadia A, Komaitis M, Chevalot I, et al (2001) Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *J Amer Oil Chem Soc* 78:341–346. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0266-3>
- Kavšček M, Bhutada G, Madl T, Natter K (2015) Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Syst Biol* 9:72. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0217-4>
- Kawasse FM, Amaral PF, Rocha MHM, et al (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bio and Biosystems Engineering* 25:371–375. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0319-z>
- Khattab A, Ibrahim GE, Talkhan FN, et al (2012) Genetic improvement of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of γ -decalactone. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 6:206–214
- Kim J-H, Oh Y-R, Hwang J, et al (2021) Valorization of waste-cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics. *Waste Management* 124:195–202. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.02.003>
- Kim JY (2010) Isolation of Protease-producing Yeast, *Pichia farinose* CO-2 and Characterization of Its Extracellular Enzyme. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53:133–141. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.023>
- Kıpçak E, Akgün M (2013) In situ gas fuel production during the treatment of textile wastewater at supercritical conditions. *Water Sci Technol* 67:1058–1067. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.668>

- Kolouchová I, Maťátková O, Sigler K, et al (2016) Production of Palmitoleic and Linoleic Acid in Oleaginous and Nonoleaginous Yeast Biomass. *International Journal of Analytical Chemistry* 2016:1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/7583684>
- Kreger-Van Rij NJW (ed) (1984) *The Yeasts: a taxonomic study*, 3rd rev. and enl. ed. Elsevier Science Publishers; sole distributors for the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co, Amsterdam: New York, N.Y
- Krzyczkowska J (2012) The use of castor oil in the production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica* KKP 379. *ChemTech* 61:58–61. <https://doi.org/10.5755/j01.ct.61.3.2717>
- Kulkarni MG, Dalai AK (2006) Waste Cooking Oil An Economical Source for Biodiesel: A Review. *Ind Eng Chem Res* 45:2901–2913. <https://doi.org/10.1021/ie0510526>
- Kumar S, Dheeran P, Taherzadeh M, Khanal S (eds) (2018) *Fungal Biorefineries*. Springer International Publishing, Cham
- Lam SS, Liew RK, Jusoh A, et al (2016) Progress in waste oil to sustainable energy, with emphasis on pyrolysis techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53:741–753. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.005>
- Lanciotti R (2005) Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 96:317–322. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.009>
- Lanciotti R, Vannini L, Lopez CC, et al (2005) Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology* 58:89–99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00197.x>
- Larroude M, Rossignol T, Nicaud J-M, Ledesma-Amaro R (2018) Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances* 36:2150–2164. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.004>
- Lazar Z, Dulermo T, Neuvéglise C, et al (2014) Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 26:89–99. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.09.008>
- Lazar Z, Walczak E, Robak M (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresource Technology* 102:6982–6989. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.032>
- Lee I, Hammond EG, Cornette JL, Glatz BA (1993) Triacylglycerol assembly from binary mixtures of fatty acids by *Apiotrichum curvatum*. *Lipids* 28:1055–1061. <https://doi.org/10.1007/BF02537070>
- Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macías MD, et al (2014) The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* 123:33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.054>
- Li C, Gao S, Yang X, Lin CSK (2018) Green and sustainable succinic acid production from crude glycerol by engineered *Yarrowia lipolytica* via agricultural residue based in situ fibrous bed bioreactor. *Bioresource Technology* 249:612–619. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.011>
- Li C, Ong KL, Cui Z, et al (2021) Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. *Journal of Hazardous Materials* 401:123414. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123414>
- Li L, Zhang S, Wu W, et al (2019) Enhancing thermostability of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 through engineering multiple disulfide bonds and mitigating reduced lipase production associated with disulfide bonds. *Enzyme and Microbial Technology* 126:41–49. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.008>
- Lin S-J, Lee S-L, Chou C-C (1996) Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odorus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82:42–45. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89452-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89452-9)
- Lin T-S, Wu J-Y (2015) Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology* 184:100–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.005>
- Liu H, Marsafari M, Wang F, et al (2019) Engineering acetyl-CoA metabolic shortcut for eco-friendly production of polyketides triacetic acid lactone in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng* 56:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.017>
- Liu H, Song Y, Fan X, et al (2021) *Yarrowia lipolytica* as an Oleaginous Platform for the Production of Value-Added Fatty Acid-Based Bioproducts. *Front Microbiol* 11:608662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608662>

- Liu H-H, Ji X-J, Huang H (2015) Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances* 33:1522–1546. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
- Liu X, Lv J, Xu J, et al (2017) Erythritol production by *Yarrowia lipolytica* mutant strain M53 generated through atmospheric and room temperature plasma mutagenesis. *Food Sci Biotechnol* 26:979–986. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0116-0>
- LobÃ£o FA, FaÃ§anha AR, Okorokov LA, et al (2007) Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport mediated by the plasma membrane ATPase of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters* 274:17–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00811.x>
- Lopes M, Araújo C, Aguedo M, et al (2009) The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *J Chem Technol Biotechnol* 84:533–537. <https://doi.org/10.1002/jctb.2075>
- Lopes M, Gomes AS, Silva CM, Belo I (2018) Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. *Journal of Biotechnology* 265:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.007>
- Lopes M, Gomes N, Gonçalves C, et al (2007) *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure: *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by pressure. *Letters in Applied Microbiology* 46:255–260. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02299.x>
- Lopes M, Miranda SM, Alves JM, et al (2019) Waste Cooking Oils as Feedstock for Lipase and Lipid-Rich Biomass Production. *Eur J Lipid Sci Technol* 121:1800188. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800188>
- Louhasakul Y, Cheirsilp B, Prasertsan P (2016) Valorization of Palm Oil Mill Effluent into Lipid and Cell-Bound Lipase by Marine Yeast *Yarrowia lipolytica* and Their Application in Biodiesel Production. *Waste Biomass Valor* 7:417–426. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9451-7>
- Madzak C (2021) *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: how natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *BIOLOGY*
- Madzak C (2015) *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4559–4577. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>
- Madzak C, Beckerich J-M (2013) Heterologous Protein Expression and Secretion in *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–76
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich J-M (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109:63–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>
- Mafakher L, Mirbagheri M, Darvishi F, et al (2010) Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology* 27:4
- Maga JA, Katz I (1976) Lactones in foods. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 8:1–56. <https://doi.org/10.1080/10408397609527216>
- Magdouli S, Guedri T, Tarek R, et al (2017) Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 243:57–68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.074>
- Magdouli S, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY (2014) Heterotrophic Microorganisms: A Promising Source for Biodiesel Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44:416–453. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.728523>
- Makri A, Fakas S, Aggelis G (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology* 101:2351–2358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.024>
- Małajowicz J, Nowak D, Fabiszewska A, Iuliano A (2020) Comparison of gamma-decalactone biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* MTLY40-2p and W29 in batch-cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 34:330–340. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1749528>
- Mannu A, Garroni S, Ibanez Porras J, Mele A (2020) Available Technologies and Materials for Waste Cooking Oil Recycling. *Processes* 8:366. <https://doi.org/10.3390/pr8030366>

- Mannu A, Vlahopoulou G, Urgeghe P, et al (2019) Variation of the Chemical Composition of Waste Cooking Oils upon Bentonite Filtration. *Resources* 8:108. <https://doi.org/10.3390/resources8020108>
- Mansour S, Beckerich JM, Bonnarne P (2008) Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 74:6505–6512. <https://doi.org/10.1128/AEM.01519-08>
- Markham KA, Alper HS (2018) Synthetic Biology Expands the Industrial Potential of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology* 36:1085–1095. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.004>
- Marks EAN, Kinigopoulou V, Akrouit H, et al (2020) Potential for Production of Biochar-Based Fertilizers from Olive Mill Waste in Mediterranean Basin Countries: An Initial Assessment for Spain, Tunisia, and Greece. *Sustainability* 12:6081. <https://doi.org/10.3390/su12156081>
- Martínez EJ, Raghavan V, González-Andrés F, Gómez X (2015) New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. *International Journal of Molecular Sciences* 16:9385–9405. <https://doi.org/10.3390/ijms16059385>
- Maume KA, Cheetham PSJ (1991) The Production of γ -Decalactone by Fermentation of Castor Oil. *Biocatalysis* 5:79–97. <https://doi.org/10.3109/10242429109014857>
- McNeil BA, Stuart DT (2018a) Optimization of C16 and C18 fatty alcohol production by an engineered strain of *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 45:1–14. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1985-1>
- McNeil BA, Stuart DT (2018b) *Lipomyces starkeyi*: an emerging cell factory for production of lipids, oleochemicals and biotechnology applications. *World J Microbiol Biotechnol* 34:147. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2532-6>
- Meng X, Yang J, Xu X, et al (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Mitchell TW, Buffenstein R, Hulbert AJ (2007) Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): A comparative study using shotgun lipidomics. *Experimental Gerontology* 42:1053–1062. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.09.004>
- Mlíčková K, Roux E, Athenstaedt K, et al (2004) Lipid Accumulation, Lipid Body Formation, and Acyl Coenzyme A Oxidases of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 70:3918–3924. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3918-3924.2004>
- Moeller L, Zehnsdorf A, Aurich A, et al (2012) Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1695–1702. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3681-9>
- Moftah O, Grbavcic S, Moftah W, et al (2013) Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. *J Serb Chem Soc* 78:781–794. <https://doi.org/10.2298/JSC120905005M>
- Moigradean D, Poiana M-A, Alda L-M, Gogoasa I (2013) Quantitative identification of fatty acids from walnut and coconut oils using GC-MS method. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 5
- Moradi H, Asadollahi MA, Nahvi I (2013) Improved γ -decalactone production from castor oil by fed-batch cultivation of *Yarrowia lipolytica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2:64–68. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.11.001>
- Moradi H, Asadollahi MA, Nahvi I (2016) OPTIMAZTION OF GAMMA-DECALACTONE PRODUCTION BY YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA* USING THE TAGUCHI METHOD. *JMBFS* 6:685–688. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.1.685-688>
- Morgunov I, Kamzolova S, Lunina J (2018a) Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast on Different Renewable Raw Materials. *Fermentation* 4:36. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020036>
- Morgunov IG, Kamzolova SV, Lunina JN (2018b) Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast on Different Renewable Raw Materials. 7
- Munch G, Sestric R, Sparling R, et al (2015) Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology* 185:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.051>

- Mutlu H, Meier MAR (2010) Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112:10–30. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900138>
- Nacir H Nature et origine des lipides des plastoglobules. 231
- Nahabieh F, Schmid JL (1990) Contribution à l'étude de la flore levure de quelques grands types de fromages de chèvre. *Lait* 70:325–343. <https://doi.org/10.1051/lait:1990425>
- Ng T-K, Yu A-Q, Ling H, et al (2020) Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: Production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 129:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.009>
- Nicaud J-M (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29:409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>
- Nicaud J-M, Le Clainche A, Le Dall M-T, et al (1998) *Yarrowia lipolytica*, a yeast model for the genetic studies of hydroxy fatty acids biotransformation into lactones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5:175–181. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00029-0)
- Nicaud J-M, Madzak C, Broek P, et al (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2:371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00106.x>
- Nielsen J (2009) Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. *FEBS Letters* 583:3905–3913. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.054>
- Nolan JV, Leng RA, Dobos RC, Boston RC (2014) The production of acetate, propionate and butyrate in the rumen of sheep: fitting models to 14C- or 13C-labelled tracer data to determine synthesis rates and interconversions. *Anim Prod Sci* 54:2082. <https://doi.org/10.1071/AN14539>
- Ogrydziak D (2013) Acid and Alkaline Extracellular Proteases of *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 77–97
- Ogrydziak DM (1988) Production of Alkaline Extracellular Protease by *Yarrowia Lipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology* 8:177–187. <https://doi.org/10.3109/07388558809147555>
- Ogunniyi DS (2006) Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresource Technology* 97:1086–1091. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.028>
- Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M (1963a) Metabolism of hydroxy fatty acids. I. Metabolic conversion of ricinoleic acid by a certain microorganism to 8-D-hydroxy tetradec-cis-5-enoic acid. *J Biochem* 53:265–270
- Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M (1963b) METABOLISM OF HYDROXY FATTY ACIDS. II. INTERMEDIATES OF THE OXIDATIVE BREAKDOWN OF RICINOLEIC ACID BY GENUS CANDIDA. *J Biochem* 54:536–540. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127827>
- Okui Se, Uchtvama M, Mizugaki M Metabolism of Hydroxy Fatty Adds. 5
- Pagot Y, Clainche AL, Nicaud J, et al (1998) Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied microbiology and biotechnology*
- Palande AS, Kulkarni SV, León-Ramirez C, et al (2014) Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. *Arch Microbiol* 196:545–556. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0990-2>
- Palyzová A, Spížek J, Vítová M, Řezanka T (2022) Chapter 6 - Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids by metabolic engineering of yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Atta-ur-Rahman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp 197–223
- Pang Y, Zhao Y, Li S, et al (2019) Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil. *Biotechnol Biofuels* 12:241. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1580-y>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003a) Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 78:542–547. <https://doi.org/10.1002/jctb.831>

- Papanikolaou S, Aggelis G (2009a) Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology* 21:83–87. <https://doi.org/10.1002/lite.200900017>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003b) Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:651–655. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300858>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2011a) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1031–1051. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology* 82:43–49. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00149-3)
- Papanikolaou S, Aggelis G (2010) *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:639–654. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900197>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2020) Microbial products from wastes and residues. *FEMS Microbiology Letters* 367:fnaa156. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa156>
- Papanikolaou S, Aggelis G (2009b) Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology* 21:83–87. <https://doi.org/10.1002/lite.200900017>
- Papanikolaou S, Chatzifragkou A, Fakas S, et al (2009) Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:1221–1232. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900055>
- Papanikolaou S, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, et al (2007) Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electron J Biotechnol* 10:0–0. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-8>
- Papanikolaou S, Dimou A, Fakas S, et al (2011) Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains: Waste oil valorization by higher fungi. *Journal of Applied Microbiology* 110:1138–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04961.x>
- Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Chevalot I, et al (2006) Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol* 52:134–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0223-7>
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, et al (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92:737–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x>
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, et al (2003) Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues. *Current Microbiology* 46:124–130. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3833-3>
- Patel K (2020) Screening of biosurfactant producing yeasts isolated from mangrove ecosystem of Surat region of Gujarat, India. *IJST* 13:1927–1934. <https://doi.org/10.17485/IJST/v13i19.204>
- Pereira de Andrade D, Carvalho BF, Schwan RF, Dias DR (2017) Production of γ -Decalactone by Yeast Strains under Different Conditions. *Food Technol Biotechnol* 55:225–230. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.5009>
- Pérez J, Dela Rubia T, Moreno J, Martínez J (1992) Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:489–495. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110406>
- Pignède G, Wang H, Fudalej F, et al (2000) Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182:2802–2810. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2802-2810.2000>
- Poli JS, da Silva MAN, Siqueira EP, et al (2014) Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology* 161:320–326. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>
- Poli JS, Dallé P, Senter L, et al (2013) Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. 11:6

- Portelli B (2011) Biologie systémique et intégrative pour l'amélioration de l'accumulation et de la sélectivité des acides gras accumulés dans les espèces levuriennes. These de doctorat, Toulouse, INSA
- Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB (2006) Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies. *Biochemical Engineering Journal* 31:31–41. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.017>
- Quentin F, Gallet P-F, Guilloton M, Quintard B (2015) *Biochimie en 84 fiches*
- Rahmanian N, Jafari SM, Galanakis CM (2014) Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *J Am Oil Chem Soc* 91:1–18. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2350-9>
- Rakicka M, Lazar Z, Dulermo T, et al (2015) Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofuels* 8:104. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0286-z>
- Ratledge C (1991) Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnol* 11:429–438. <https://doi.org/10.1002/abio.370110506>
- Ratledge C (1994) Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel BS, Kakuda Y (eds) *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*. Springer US, Boston, MA, pp 235–291
- Ratledge C (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* 30:4
- Ratledge C (1993) Single cell oils — have they a biotechnological future? *Trends in Biotechnology* 11:278–284. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90015-2)
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86:807–815. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>
- Ratledge C (2013) Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *OCL* 20:D602. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013029>
- Ravikumar K, Dakshayini J, Girisha S (2012) Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. *Int J Life Sci* 6:43–49. <https://doi.org/10.3126/ijls.v6i1.5721>
- Reis J, Amorim M, Melão N, Matos P (2018) Digital Transformation: A Literature Review and Guidelines for Future Research. In: Rocha Á, Adeli H, Reis LP, Costanzo S (eds) *Trends and Advances in Information Systems and Technologies*. Springer International Publishing, Cham, pp 411–421
- Richard M, Quijano RR, Bezzate S, et al (2001) Tagging Morphogenetic Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 183:3098–3107. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3098-3107.2001>
- Rincón CA, De Guardia A, Couvert A, et al (2019) Odor generation patterns during different operational composting stages of anaerobically digested sewage sludge. *Waste Management* 95:661–673. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.006>
- Romero-Guido C, Belo I, Ta TMN, et al (2011a) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:535–547. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2945-0>
- Romero-Guido C, Belo I, Ta TMN, et al (2011b) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:535–547. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2945-0>
- Roostita R (1996) The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 28:393–404. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00018-6)
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* 178:477–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0478-3>
- Rupčić J, Blagović B, Marić V (1996) Cell lipids of the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol. *Journal of Chromatography A* 755:75–80. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00579-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00579-1)
- Rymowicz W, A R, M M (2009) High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters* 31:. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9884-1>

- Rymowicz W, Fatykhova AR, Kamzolova SV, et al (2010) Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:971–979. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2561-z>
- Rywińska A, Juszczak P, Wojtatowicz M, et al (2013) Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy* 48:148–166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.11.021>
- Rywińska A, Juszczak P, Wojtatowicz M, Rymowicz W (2011) Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 152:54–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.007>
- Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, Mirończuk AM (2019) Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 271:340–344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.118>
- Sagnak R, Cochot S, Molina-Jouve C, et al (2018) Modulation of the Glycerol Phosphate availability led to concomitant reduction in the citric acid excretion and increase in lipid content and yield in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 265:40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.001>
- Sales A, Paulino BN, Pastore GM, Bicas JL (2018) Biogenesis of aroma compounds. *Current Opinion in Food Science* 19:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.005>
- Salihu A, Alam MdZ, AbdulKarim MI, Salleh HM (2012) Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling* 58:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.10.007>
- Santos EO, Michelon M, Gallas JA, et al (2013) Raw Glycerol as Substrate for the Production of Yeast Biomass. *International Journal of Food Engineering* 9:413–420. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2012-0248>
- Sarris D, Galiotou-Panayotou M, Koutinas AA, et al (2011) Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol* 86:1439–1448. <https://doi.org/10.1002/jctb.2658>
- Sarris D, Giannakis M, Philippoussis A, et al (2013) Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses: Bioconversions of olive-mill wastewaters by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 88:958–969. <https://doi.org/10.1002/jctb.3931>
- Sarris D, Rapti A, Papafotis N, et al (2019) Production of Added-Value Chemical Compounds through Bioconversions of Olive-Mill Wastewaters Blended with Crude Glycerol by a *Yarrowia lipolytica* Strain. *Molecules* 24:222. <https://doi.org/10.3390/molecules24020222>
- Sarris D, Stoforos NG, Mallouchos A, et al (2017) Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. *Eng Life Sci* 17:695–709. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600225>
- Saygün A, Şahin-Yeşilçubuk N, Aran N (2014) Effects of Different Oil Sources and Residues on Biomass and Metabolite Production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. *J Am Oil Chem Soc* 91:1521–1530. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2506-2>
- Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, et al (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters* 26:463–472. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019576.80594.0e>
- Scioli C, Vollaro L (1997) The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* 31:2520–2524. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00083-3)
- Sekova VYu, Isakova EP, Deryabina YuI (2015) Biotechnological applications of the extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* (review). *Appl Biochem Microbiol* 51:278–291. <https://doi.org/10.1134/S0003683815030151>
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19:627–662. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)
- Shevchenko A, Simons K (2010) Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:593–598. <https://doi.org/10.1038/nrm2934>

- Singh Dhillon G, Kaur Brar S, Verma M, Tyagi RD (2011) Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. *Food Bioprocess Technol* 4:505–529. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0399-0>
- Sinigaglia M, Di Benedetto N, Bevilacqua A, et al (2010) Yeasts isolated from olive mill wastewaters from southern Italy: technological characterization and potential use for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2345–2354. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2684-2>
- Sinigaglia M, Lanciotti R, Guerzonil ME (1994) Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can J Microbiol* 40:54–59. <https://doi.org/10.1139/m94-008>
- Slotte JP (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Progress in Lipid Research* 52:424–437. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.05.001>
- Soares GPA, Souza KST, Vilela LF, et al (2017) γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera saturnus* in crude glycerol. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 47:633–637. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1286601>
- Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A (2006) New Perspectives for Citric Acid Production and Application. 9
- Soong YV, Liu N, Yoon S, et al (2019) Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high-value products. *Eng Life Sci* 19:423–443. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800147>
- Sorger D, Daum G (2003) Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:289–299. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1212-4>
- Soudier P, Larroude M, Celińska E, et al (2019) Selection of Heterologous Protein-Producing Strains in *Yarrowia lipolytica*. In: Gasser B, Mattanovich D (eds) *Recombinant Protein Production in Yeast*. Springer New York, New York, NY, pp 153–168
- Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al (2010) Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463:559–562. <https://doi.org/10.1038/nature08721>
- Subczynski WK, Wisniewska A, Yin J-J, et al (1994) Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol. *Biochemistry* 33:7670–7681. <https://doi.org/10.1021/bi00190a022>
- Suzzi G, Lanorte MT, Galgano F, et al (2001) Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69:69–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00574-8)
- Swizdor A, Panek A, Milecka-Tronina N, Kołek T (2012) Biotransformations utilizing β -oxidation cycle reactions in the synthesis of natural compounds and medicines. *Int J Mol Sci* 13:16514–16543. <https://doi.org/10.3390/ijms131216514>
- Szabo R (1999) Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol* 44:19–24. <https://doi.org/10.1007/BF02816215>
- T. F. S. K. E. D, et al (2002) Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:493–500. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1022-8>
- Tai M, Stephanopoulos G (2013) Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering* 15:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>
- Tardioli S, Bannè ETG, Santori F (1997) Species-specific selection on soil fungal population after olive mill waste-water treatment. *Chemosphere* 34:2329–2336. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00044-1)
- Taskin M, Saghafian A, Aydogan MN, Arslan NP (2015) Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioprod Bioref* 9:595–605. <https://doi.org/10.1002/bbb.1560>
- Tavano OL (2013) Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Tchakouteu S s., Kalantzi O, Gardeli Chr, et al (2015) Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology* 118:911–927. <https://doi.org/10.1111/jam.12736>

- Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:255–270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
- Theerachat M, Guieysse D, Morel S, et al (2019) Laccases from Marine Organisms and Their Applications in the Biodegradation of Toxic and Environmental Pollutants: a Review. *Appl Biochem Biotechnol* 187:583–611. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2829-9>
- Theerachat M, Tanapong P, Chulalaksananukul W (2017) The culture or co-culture of *Candida rugosa* and *Yarrowia lipolytica* strain rM-4A, or incubation with their crude extracellular lipase and laccase preparations, for the biodegradation of palm oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 121:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.002>
- Thevenieau F, Beopoulos A, Desfougeres T, et al (2010) Uptake and Assimilation of Hydrophobic Substrates by the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Timmis KN (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1513–1527
- Thevenieau F, Le Dall M-T, Nthangeni B, et al (2007) Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization. *Fungal Genetics and Biology* 44:531–542. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.001>
- Thevenieau F, Nicaud J-M, Gaillardin C (2009) Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 589–613
- Thliveros P, Uçkun Kiran E, Webb C (2014) Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresource Technology* 157:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.111>
- Timoumi A, Cléret M, Bideaux C, et al (2017) Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:351–366. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7856-2>
- Timoumi A, Guillouet SE, Molina- C, et al (2018) Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3831–3848. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8870-3>
- Titorenko VI, Rachubinski RA (2000) Peroxisomal Membrane Fusion Requires Two Aaa Family Atpases, Pex1p and Pex6p. *Journal of Cell Biology* 150:881–886. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.4.881>
- Titorenko VI, Smith JJ, Szilard RK, Rachubinski RA (2000) Peroxisome Biogenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *CBB* 32:21–26. <https://doi.org/10.1385/CBB:32:1-3:21>
- Tomaszewska L, Rakicka M, Rymowicz W, Rywińska A (2014) A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Res* 14:966–976. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12184>
- Tompkins C, Perkins EG (2000) Frying performance of low-linolenic acid soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:223–229. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0036-2>
- Try S, De-Coninck J, Voilley A, et al (2018) Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 64:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.004>
- Tsigie YA, Wang C-Y, Truong C-T, Ju Y-H (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology* 102:9216–9222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.047>
- Tsoutsos TD, Tournaki S, Paraíba O, Kaminaris SD (2016) The Used Cooking Oil-to-biodiesel chain in Europe assessment of best practices and environmental performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.039>
- Tziritza M, Kremmyda M, Sarris D, et al (2019) Effect of Salt Addition upon the Production of Metabolic Compounds by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Biodiesel-Derived Glycerol Diluted with Olive-Mill Wastewaters. *Energies* 12:3649. <https://doi.org/10.3390/en12193649>
- Tziritza M, Papanikolaou S, Chatzifragkou A, Quilty B (2018a) Waste fat biodegradation and biomodification by *Yarrowia lipolytica* and a bacterial consortium composed of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida*. *Eng Life Sci* 18:932–942. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800067>

- van der Walt JP, von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 46:517–521. <https://doi.org/10.1007/BF00394008>
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vandermies M, Fickers P (2019) Strategies at Bioreactor Scale for the Production of Recombinant Proteins in *Yarrowia lipolytica*. In: Sibirny A (ed) *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer International Publishing, Cham, pp 539–568
- Vasdinyei R (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* 86:123–130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00251-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00251-4)
- Venter T, Kock JLF, Botes PJ, et al (2004) Acetate Enhances Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* When Grown on Sunflower Oil. *Systematic and Applied Microbiology* 27:135–138. <https://doi.org/10.1078/072320204322881736>
- Waché Y (2013) Production of Dicarboxylic Acids and Fragrances by *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica: Biotechnological Applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 151–170
- Wache Y, Aguedo M, Choquet A, et al (2001) Role of B-Oxidation Enzymes in G-Decalactone Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 67:5
- Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:393–404. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1207-1>
- Wache Y, Bergmark K, Courthaudon J-L, et al (2000) Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Lett Appl Microbiol* 30:183–187.
- Waché Y, Pagot Y, Nicaud J-M, Belin J-M (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5:165–169. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00027-7)
- Wadekar S, Kale S, Lali A, et al (2012) Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from Virgin and Waste Frying Oils, and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89:1029–1039. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1986-6>
- Wallace BP, Brosnan T, McLamb D, et al (2017a) Effects of the Deepwater Horizon oil spill on protected marine species. *Endangered Species Research* 33:1–7. <https://doi.org/10.3354/esr00789>
- Wallace T, Gibbons D, O'Dwyer M, Curran TP (2017b) International evolution of fat, oil and grease (FOG) waste management – A review. *Journal of Environmental Management* 187:424–435. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.003>
- Wang H, Le Clainche A, Le Dall M-T, et al (1998) Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14:1373–1386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199811\)14:15<1373::AID-YEA332>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1373::AID-YEA332>3.0.CO;2-1)
- Wang J, Ledesma-Amaro R, Wei Y, et al (2020) Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* – A Review. *Bioresource Technology* 313:123707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123707>
- Wickerham LJ, Kurtzman CP, Herman AI (1970) Sexual Reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167:1141–1141. <https://doi.org/10.1126/science.167.3921.1141.a>
- Xiaoyan L, Yu X, Lv J, et al (2017) A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food and Bioprocess Processing* 103:86–94. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.002>
- Xie D (2017) Integrating Cellular and Bioprocess Engineering in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* for Biodiesel Production: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* 5:65. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00065>
- Xu J, Zhao X, Wang W, et al (2012) Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal* 65:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.003>

- Yadav AN, Rastegari AA, Gupta VK, Yadav N (eds) (2020) *Microbial Biotechnology Approaches to Monuments of Cultural Heritage*. Springer Singapore, Singapore
- Yalcin SK, Bozdemir MT, Ozbas ZY (2009) A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media. *INDIAN J BIOTECHNOL* 10
- Yan J, Han B, Gui X, et al (2018) Engineering *Yarrowia lipolytica* to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. *Sci Rep* 8:758. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19238-9>
- Yan J, Li A, Xu Y, et al (2012) Efficient production of biodiesel from waste grease: One-pot esterification and transesterification with tandem lipases. *Bioresource Technology* 123:332–337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.103>
- Yeboah A, Ying S, Lu J, et al (2021) Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties. *Food Sci Technol* 41:399–413. <https://doi.org/10.1590/fst.19620>
- Young TW, Wadeson A, Glover DJ, et al (1996) The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology* 142:2913–2921. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2913>
- Yousuf A, Sannino F, Addorisio V, Pirozzi D (2010) Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production. *J Agric Food Chem* 58:8630–8635. <https://doi.org/10.1021/jf101282t>
- Yu X, Zheng Y, Dorgan KM, Chen S (2011) Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology* 102:6134–6140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.081>
- Yuzbasheva EY, Yuzbashev TV, Laptev IA, et al (2011) Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:645–654. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3265-8>
- Zhang L, Loh K-C, Kuroki A, et al (2021) Microbial biodiesel production from industrial organic wastes by oleaginous microorganisms: Current status and prospects. *Journal of Hazardous Materials* 402:123543. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123543>
- Zhang X, Chen J, Yan S, et al (2017) Lipid Production for Biodiesel from Sludge and Crude Glycerol. *water environ res* 89:424–439. <https://doi.org/10.2175/106143017X14839994523424>
- Zhao G, Yu J, Jiang F, et al (2012) The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. *Bioresource Technology* 114:466–471. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.129>
- Zhou Q, Jiao L, Qiao Y, et al (2019) Overexpression of GRAS *Rhizomucor miehei* lipase in *Yarrowia lipolytica* via optimizing promoter, gene dosage and fermentation parameters. *Journal of Biotechnology* 306:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.004>
- Zhu Q, Jackson EN (2015) Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology* 36:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.010>
- Zinjarde S, Apte M, Mohite P, Kumar AR (2014) *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances* 32:920–933. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.008>
- Zinjarde SS (2014) Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry* 152:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>
- Zinjarde SS, Kale BV, Vishwasrao PV, Kumar AR (2008) Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. *J Microbiol Biotechnol* 18:1522–1528
- Zinjarde SS, Pant A, Deshpande MV (1998) Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycological Research* 102:553–558. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005418>
- Zotta T, Solieri L, Iacumin L, et al (2020) Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:2749–2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>

ANNEXE



Yeast *Yarrowia lipolytica* as a biofactory for the production of lactone-type aroma gamma-decalactone using castor oil as substrate

Wadie Nabil Abdo AL Mualad¹ · Doria Naila Bouchedja¹ · Abderrahmen Selmania² · Ramzi Maadadi^{3,4} · Assia Ikhlef² · Zahia Kabouche⁴ · Lamia Elmechta¹ · Abdelgani Boudjellal¹

Received: 17 May 2022 / Accepted: 15 August 2022
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2022

Abstract

The Gamma-decalactone (γ -DL) molecule that gives foods the certified natural peach flavor can be produced by microbial biotechnology. This method, validated and approved by the US-Food and Drug Administration, has occupied an important place in research in recent years, due to the growing interest of consumers and industry in natural products. In the current study, we were interested in investigating the potential of yeast *Y. lipolytica* L2 KF156787 with its ability to produce γ -decalactone by biotransformation of castor oil through batch cultivation in flasks and a bioreactor. The strain showed a high ability to hydrolyze the carbon substrate and to grow in the fermentation medium. Meanwhile, the cells changed their morphological properties from the yeast-like shape to pseudo-mycelial and mycelial and tended to aggregate cells, suggesting its feasibility and suitability for biotransformation processes. On the same boat, the strain was able to accumulate flavor compound (γ -DL) in the biotransformation medium with an intense oily-peachy aroma in the amount of about 460 mg L⁻¹ extracted after 5 days of cultivation, making the *Y. lipolytica* L2 KF156787 strain valuable from a nutritional point of view. Strain L2 KF156787 can be used as a source for natural aroma γ -DL production as well as industrial-scale continuous production development of this flavor compound.

✉ Doria Naila Bouchedja
naila.bouchedja@umc.edu.dz

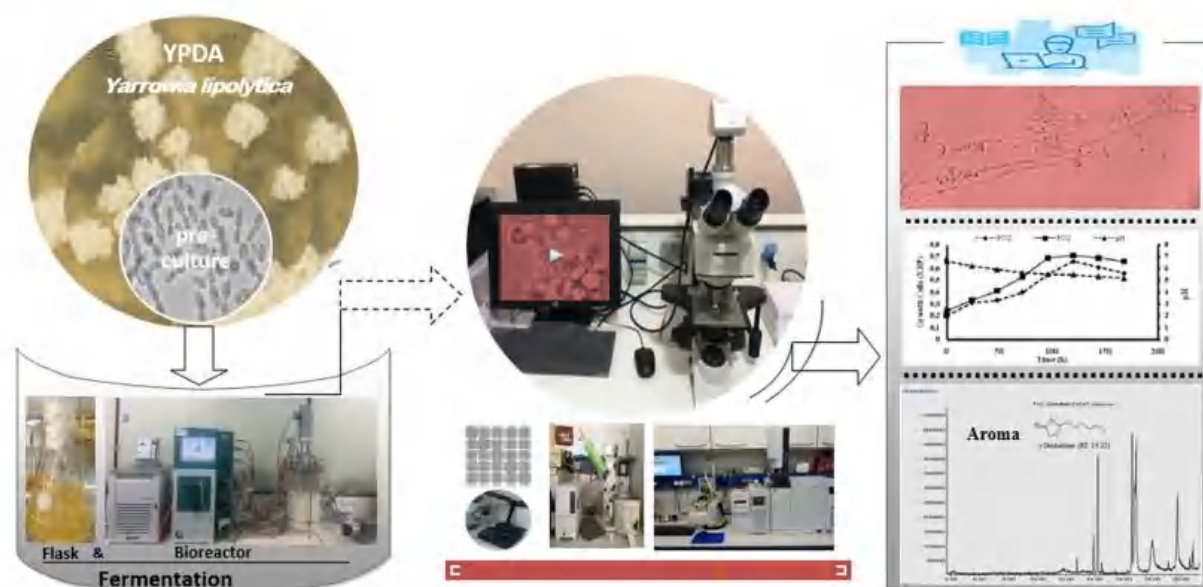
¹ Institut de La Nutrition de L'Alimentation Et Des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Biotechnology and Food Quality Laboratory (BioQual), Frères Mentouri University-Constantine 1, Route de Ain el Bey, 25000 Constantine, Algeria

² Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT), Nouvelle Ville Ali Mendjeli, 25000 Constantine, Algeria

³ Centre de Recherche Scientifique Et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), BP 38 Bou-Ismaïl, 42004 RP, Tipaza, Algeria

⁴ Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Frères Mentouri University-Constantine1, 25000 Constantine, Algeria

Graphical abstract



Keywords Biotechnology · *Yarrowia lipolytica* · Batch Fermentation · Biotransformation · Fruity flavor · Extraction-Identification

Abbreviations

γ -DL	γ -Decalactone
GRAS	Generally recognized as safe
U-FDA	U.S. food and drug administration
4HDA	4-Hydroxydecanoic acid
PCO	Peptone-castor oil
RA	Ricinoleic acid
YPD	Yeast extract-peptone-dextrose
LLE	Liquid-liquid extraction

Introduction

Aromas are highly valued raw materials by the industry as they greatly influence consumer decisions regarding the acceptability of all kinds of products. The aromatic lactone-type compounds, deriving from microbial biotechnology, also called « Biotech aroma », have been the subject of much research for years. So, these products would represent an excellent alternative for consumers who are increasingly on the lookout for natural products to replace synthetic chemical products. For industry, microbial lactones can also be an alternative of choice that is both economical and ecological, since they make it possible to reduce the costly exploitation of plant products and at the same time the intensive use of agricultural lands. Therefore, biotech

aroma is considered a sustainable way to supply many industrial products that give it its aroma and flavor such as in the contemporary food, cosmetics, and pharmaceutical industries (Ben Akacha and Gargouri, 2015; Braga et al. 2018; Braga and Belo, 2016; Felipe et al. 2019; Paulino et al. 2021; Sales et al. 2018). Among the aroma widely produced and used in food and related industrial products is gamma decalactone (γ -DL) due to its very characteristic fruity aroma with GRAS (Generally Recognized As Safe) status, approved by (FDA) USA. Precisely, γ -DL is an intramolecular 4-hydroxydecanoic acid ester, with an intense oily-peachy and apricot aroma (Alchahab et al. 2010a; Braga et al. 2018; Malajowicz et al. 2020). The microbial γ -DL (C10H18O2) production from the yeasts uses mostly ricinoleic acid (1,2-Hydroxyoctadec-9-enoic acid) as a substrate by biotransformation via the peroxisomal β -oxidation pathway, which occurs as a result of successive cycles from the hydroxylated fatty acid (C18) to the generation of 4-Hydroxydecanoic acid which deriving to γ -Decalactone by cyclizing (Fig. 1) (Alchahab et al. 2010b; Braga and Belo, 2016; Pagot et al. 1998).

In the group of microorganisms for γ -DL production, the following yeast genera were used: *Candida* (Endrizzi and Belin, 1995), *Rhodotorula* (Alchahab et al. 2010c, 2009), *Sporidiobolus* (Blou-Perrin et al. 2000), *Pichia* (Pagot and Belin, 1996), and *Yarrowia* (Pagot et al., 1998). However,



RESEARCH PAPER

Recycling Pollutants and Used Oils as Substrates for Producing Useful Lipids in the form of Single-Cell Oil by the Aerobic Yeast *Yarrowia lipolytica*

Wadie Abdo Nabil Al Mualad¹ · Doria Naila Bouchedja¹ · Abderrahmen Selmania² · Ramzi Maadadi^{3,4} · Assia Ikhlef² · Zahia Kabouche⁴ · Lamia Elmechta¹ · Abdelgani Boudjellal¹

Received: 8 June 2022 / Revised: 18 August 2022 / Accepted: 19 September 2022
© University of Tehran 2022

Abstract

Nowadays, the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* has become more useful in the field of biotechnology and its environmental applications, since it contains an excellent enzyme system that enables it to degrade and assimilate a wide range of substrates. Therefore, single-cell oil production that can potentially be used as a supplier of functional oils and/or biodiesel could be coupled with the use of hydrophobic waste, as a low-cost culture medium. In the current study, we were interested to investigate the potential of yeast *Y. lipolytica* L2 KP156787 with different carbon substrates, especially, to study its ability to degrade oils waste and single-cell oil production. The strain showed a high ability to grow on different carbon substrates, accumulate lipids, and efficiently decolorize the black dye (about 90%) in the presence of olive-mill waste, suggesting its feasibility and suitability for bioremediation of hydrophobic wastes with the simultaneous production of lipid-rich biomass. The profiles of fatty acids were not strictly dependent on carbon substrates but also on the strain, which it showed a clear biomodification effect on the substrates lipids used to a higher degree. Most of the fatty acids of the microbial lipid were unsaturated and corresponded mainly to oleic, and linoleic acids, making *Y. lipolytica* L2 KP156787 valuable from a nutritional point of view. Consequently, strain can be considered as a good tool for integration into bioremediation solutions that realize the requisites of the circular economy and of environmental sustainability.

Graphical abstract



The first two authors namely Wadie Abdo Nabil Al Mualad and Doria Naila Bouchedja contributed equally to this work.

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 07 October 2022

LIST DES PUBLICATION ET COMMUNICATION

LIST DES PUBLICATION ET COMMUNICATION

PUBLICATION

Wadie Nabil Abdo AL Mualad, Doria Naila Bouchedja, Abderrahmen Selmania, Ramzi Maadadi, Assia Ikhlef , Zahia Kabouche, Lamia Elmechta, Abdelgani Boudjellal. Yeast *Yarrowia lipolytica* as a biofactory for the production of lactone-type aroma gamma-decalactone using castor oil as substrate. Chemical Papers . <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02435-2>

Wadie Nabil Abdo AL Mualad, Doria Naila Bouchedja, Abderrahmen Selmania, Ramzi Maadadi, Assia Ikhlef, Zahia Kabouche, Lamia Elmechta, Abdelgani Boudjellal . **Recycling pollutants and used oils as substrates for producing useful lipids in the form of single-cell oil by the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica***. International Journal of Environmental Research. <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00480-z>

COMMUNICATION

1. Wadie Nabil Abdo AL Mualad, Doria Naila Bouchedja, Abderrahmen Selmania, Ramzi Maadadi, Assia Ikhlef , Zahia Kabouche, Lamia Elmechta, Abdelgani Boudjellal. «Lipase microbienne dans les technologies environnementales vertes et propres : le cas valorisation des résidus agro-industriels». Webinaire International sur les Biotechnologies au Service de l’Agriculture Durable (WIBSAD-2022) (Faculté S.N.V. – Université Blida 1), les 25 et 26 et Juin 2022
2. AL MUALAD Wadie Nabil Abdo, BOUCHEDJA DORIA NAILA , SELMANIA ABDERRAHMEN, MAADADI RAMZI, BADAoui CHRAF EDDDINE, GHORABE FARES DIA EDDINE, BOUDJELLAL ABDELGANI. Valorisation et traitement des déchets de l’industrie huilière à huile d’olive par levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica*. conférence nationale sur «Egalité des genres dans la préservation de l’environnement, économie verte et développement durable», Organisée le 18 et 19 janvier 2022, par (ANEADD) -UNESCO Université de Boumerdès (LRTA)en Algérie.
3. Wadie Nabil Abdo AL Mualad, Doria Naila Bouchedja, Abderrahmen Selmania, Ramzi Maadadi, Assia Ikhlef , Zahia Kabouche, Lamia Elmechta, Abdelgani Boudjellal. Souche *Yarrowia lipolytica* JMY 775 génétiquement modifiée comme Biofactory pour la production huiles monocellulaire (SCO) en utilisant déchet de l’industrie huilière comme substrat. 1st International Days of Natural and life Sciences (INDNS 2022) (webinaire) Held on 01 and 02 March 2022. Ecole normale supérieure de Ouargla , Algérie Department of Natural Sciences
4. AL MUALAD Wadie Nabil Abdo, Bouchedja Doria Naila , Mouzai Abdelghani , Selmania Abderrahmen , Maadadi Ramzi & Boudjellal Abdelghani. Voies biotechnologiques de levures oléagineuses à des fins environnementales : le cas de la levure *Yarrowia lipolytica*.

1st International Webinar of Animal Biodiversity , Protection and Environment " WIBAPE2022 " that has been held online from 26 to 27 May 2022 on National Higher School of Agronomy Algiers.

5. AL MUALAD Wadie Nabil Abdo, Selma BOUACIDA , Abderrahmen SELMANIA , Naila BOUCHEDJA , BOUDJELLAL Abdelgani. Etude de la production et de l'extraction de γ - décalactone (arôme pêche) par la levure *Yarrowia lipolytica*. 1ère journée nationale sur « < Analyse de Cycle de Vie , Eco - Conception , Eco - Education , Eco Innovation au service du développement durable » , Organisée le 11 Février 2020 , par l'Association nationale , Eco conception , Analyse de Cycle de Vie et Développement Durable (ANEADD) affiliée au Réseau des Clubs UNESCO en Algérie en partenariat avec le Conservatoire national des formations à l'environnement (CNFE).

6. AL MUALAD WADIE NABIL ABDO, Bouchedja Doria Naila , Selmania Abderrahmen , Maadadi Ramzi , Badaoui Chraf Eddine , Ghorabe Fares Dia Eddine , Boudjellal Abdelgani. BIOTECHNOLOGIE POUR PRODUCTION DES PRODUITS PLANTES NATURELS PAR LA LEVURE *YARROWIA LIPOLYTICA* . 1st National Seminar on Biotechnology of Medicinal Plants and their Involvement in the Pharmaceutical and Food Industries. Faculty Of Exacte Sciences And Nature And Life Sciences , Larbi Ben Mhidi University . Oum El Bouaghi , on December 13 & 14 , 2021.

Résumés

Abstract

In this study, *Yarrowia lipolytica* was used as a model for lipid accumulation and aroma production. The objective of our work was to study the behavior and performance of *Y. lipolytica* yeast on different substrates either hydrophobic or hydrophilic as carbon source, and to identify its products represented by lipids and accumulated gamma-decalactone aroma. The analysis of the cultures carried out allowed us to show that oily substrates are more efficient in the fermentation medium and thus to evolve the process towards controlled bioreactors. The results of the study showed the ability of the yeast to produce the aroma gamma decalactone of great importance for the food and pharmaceutical industries, in addition, a wide range of beneficial fatty acids was explored and characterized, especially unsaturated fatty acids, making the yeast nutritionally valuable. At the same time, the *Y. lipolytica* yeast for producing aroma and nutritional fatty acids has bypassed the traditional limitations of extraction from animals and plants or chemical synthesis and as well as reduced fermentation costs through the use of waste substrates, offering a sustainable, environmentally friendly, and efficient method for industrial production. Therefore, the strain can be considered as a suitable (bio)catalyst for this type of bioprocess and a potential source, useful for the "next generation" of the microbial bioproducts industry. It could therefore also be considered as a promising oleaginous yeast, a good tool for integration into bio-remediation solutions that meet the requirements of the circular economy and environmental sustainability.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, Lipid accumulation, Aroma production, Fatty acid, Gamma decalactone, Bioremediation.

الملخص

في هذه الدراسة، تم استخدام *Yarrowia lipolytica* كنموذج لتراكم الدهون وإنتاج الرائحة. كان الهدف من عملنا دراسة سلوك وأداء الخميره على ركائز مختلفة إما كارهة للماء أو محبة للماء كمصدر للكربون، وتحديد منتجاتها التي تمثلها الدهون ورائحة جاما ديكالكتون المتراكم. سمح لنا تحليل الثقافات التي تم إجراؤها بإظهار أن الركائز الزيتية أكثر كفاءة في وسط التخمر وبالتالي تطوير العملية نحو المفاعلات الحيوية الخاضعة للرقابة. أظهرت نتائج الدراسة قدرة *Y. lipolytica* على إنتاج رائحة جاما ديكالكتون ذات الأهمية الكبيرة للصناعات الغذائية والصيدلانية، بالإضافة إلى استكشاف وتمييز مجموعة واسعة من الأحماض الدهنية المفيدة، وخاصة الأحماض الدهنية غير المشبعة، مما يجعل الخميرة ذات قيمة غذائية. في الوقت نفسه، تجاوزت *Y. lipolytica* لإنتاج الروائح والأحماض الدهنية الغذائية القيود التقليدية لاستخراج من الحيوانات والنباتات أو التخليق الكيميائي وكذلك خفض تكاليف التخمر من خلال استخدام ركائز النفايات، مما يوفر طريقة مستدامة وصديقة للبيئة وفعالة للإنتاج الصناعي.

لذلك، يمكن اعتبار *Y. lipolytica* محفزًا (حيويًا) مناسبًا لهذا النوع من العمليات الحيوية ومصدرًا محتملاً، مفيدًا "للجيل القادم" من صناعة المنتجات الحيوية الميكروبية. لذلك يمكن اعتبار السلالة أيضًا خميرة زيتية واعدة، وأداة جيدة للاندماج في حلول المعالجة الحيوية التي تلبى متطلبات الاقتصاد الدائري والاستدامة البيئية.

الكلمات المفتاحية: *Yarrowia lipolytica* ، تراكم الدهون ، إنتاج النكهة ، الأحماض الدهنية ، جاما ديكالكتون ، المعالجة الحيوية.

Nom : AL MUALAD

Prénom : Wadie Nabil Abdo

Intitulé : Etude et caractérisation des lipides et γ -décalactone accumulés par la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*

RESUME

Dans cette étude, *Yarrowia lipolytica* a été utilisé comme modèle pour l'accumulation de lipides et la production d'arôme. L'objectif de notre travail était d'étudier les comportements et performances de la levure *Y. lipolytica* sur différents substrats soit hydrophobes ou hydrophiles comme source de carbone, et d'identifier ses produits représentés par les lipides et l'arôme de gamma-décalactone accumulé. L'analyse des cultures réalisées nous a permis de montrer que les substrats huileux sont plus performants en milieu de fermentation et donc de faire évoluer le procédé vers des bioréacteurs contrôlés. Les résultats de l'étude ont montré la capacité de la levure à produire l'arôme gamma décalactone de grande importance pour les industries alimentaires et pharmaceutiques, en complément, Un large éventail d'acides gras bénéfiques a été exploré et caractérisés, notamment les acides gras insaturés, rendant la levure précieuse sur le plan nutritionnel. Au même temps, la levure *Y. lipolytica* pour produire d'arôme et des acides gras nutritionnels contourne les limitations traditionnelles de l'extraction à partir d'animaux et de plantes ou de la synthèse chimique et ainsi que réduction des coûts de fermentation grâce à l'utilisation de déchets, offrant une méthode durable, respectueuse de l'environnement et efficace pour la production industrielle. Par conséquent, la souche peut être considérée comme un catalyseur (bio) approprié pour ce type de bioprocédé et une source potentielle, utile à la « prochaine génération » de l'industrie des bioproduits microbiens. Elle pourrait donc également être considérée comme une levure oléagineuse prometteuse, un bon outil d'intégration dans des solutions de bio remédiation qui répondent aux exigences de l'économie circulaire et de la durabilité environnementale.

Mots clés : *Yarrowia lipolytica*, Accumulation lipidique, Production d'arôme, Acide gras, Gama décalactone, Bioremediation.