



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé :

Etude de la production des lyases par la moisissure *Aspergillus niger* cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé: caractérisation des lyases.

Présenté et soutenu par : *KAASSIS Maroua*
KHANFAR Maram

Le : 03 / 10 /2019

Jury d'évaluation:

Présidente du jury : Mme DAKHMOUCHE S. M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.
Encadreur : Mme BENNAMOUN L. M.C.B, (UFM Constantine).
Examinatrice : Mme LABBANI F.Z.K. M. C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine

Année universitaire 2018 - 2019

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant *ALLAH* qui nous aide et nous donne
la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre
encadreur Madame *BENAMOUN Leïla* pour son savoir-faire, son
soutien moral, sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont elle fait
preuve.

Elle n'a pas cessé de nous guider et nous donner des conseils tout au long de
notre parcours. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de nos profondes
gratitudes et de l'estime que nous portons pour vous.

Nos remerciements s'adressent également à :

M.m DAKHMOUJHE S. Et Mme LABBANI F.Z.K

Nous vous offrons toute la gratitude pour vos sympathies. Nous sommes
particulièrement honorés de votre présence dans ce jury de mémoire.

Votre parfaite maîtrise du domaine de votre exercice n'a d'égal que votre
gentillesse et vos qualités humaines.

Veuillez trouver dans ce travail ; aussi modeste l'expression de notre
reconnaissances et nos vifs remerciements.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous nos enseignants qui nous ont aidés de près
ou de loin.

DÉDICACE

Je Dédie ce mémoire à mes chers parents, à qui je dois beaucoup d'amour et respect ; que dieu me les gardes.

À mes sœurs (Kaouter ET Safa), mes frères (Messabe ET Sohaïb) et toute ma famille; à mes amies pour l'encouragement et le soutien.

Et à tous les étudiants de ma promotion 2018/2019 de Master Biochimie de la Nutrition.

KAASSIS MAROUA

DÉDICACE

Tout d'abord, je remercie Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la santé ET la volonté d'entamer ET de terminer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à:

A mes chers parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler et pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour leur patience, leur amour et leur encouragement.

Que dieu leur procure bonne santé ET longue vie.

À mon cher frère, housseem ET mes soeurs hiba, malek ET à toute ma famille; À mes très chers amis pour leurs aide et soutiens moraux, et tous ceux qui nous ont inondés de courage d'estime et de patience.

KHANFAR MARAM

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

I. Les champignons filamenteux.....3

1	Généralités	3
2	Le genre <i>Aspergillus</i>	3
➤	Historique.....	3
3	<i>Aspergillus niger</i>	4
3.1.1	Caractères culturaux/ Aspect macroscopique	5
3.1.2	Morphologie microscopique	6
3.2.	Ecologie	6
3.3.	Le développement de l' <i>Aspergillus niger</i>	7
3.4.	Effet u pH.....	7
4.	Production d'enzymes par l' <i>Aspergillus niger</i>	7

II. Enzymes glycolytiques : Pectinases9

1	Substrats pectiques.....	9
1. 2.	Homogalacturonane (HG).....	9
1.3	. Ramnogalacturonane I (RGI).....	9
1.4	Rhamnogalacturonane II (RGII)	9
2.	Solubilité	10
3.	Structure chimique	10
4.	Enzymes pectinolytiques.....	12
4.1.	Protopectinases.....	13

4.2.	Pectine méthyl estérases (PME).....	13
4.3.	Pectine Acétyl Estérases (PAE)	13
4.4.	Polyméthylgalacturonases (PMG)	14
4.5.	Polygalacturonases (PG).....	14
4.6.	Les lyases	14
5.	Applications des enzymes pectinolytique	19
5.2.	Application des pectinases industrielles	20

III. Fermentation sur Milieu Solide :.....21

1.	Définition	21
2.	Le son de blé	21

Chapitre 2: Matériel et méthodes

1.	Réactivation de la souche	23
2.	Production des lyases en Erlen-meyers en FMS	23
2.1	Son de blé substrat de la fermentation	23
2.2	Préparation de l'inoculum	23
2.3	Dénombrement des spores	23
2.4	Fermentations.....	23
2.4.1	Préparation du milieu de production.....	23
2.4.2	L'extraction	24
2.4.3	Méthodes analytiques.....	24
•	Préparation du milieu réactionnel	24
3.	Caractérisation des lyases.....	26
3.1	Influence du pH.....	26
3.2	Effet de la température	26
3.3	Effet de stabilité de la température	26
3.4	Effet de stabilité au pH.....	26
3.5	Influence des ions métalliques et de l'EDTA	27
3.6	Détermination des paramètres cinétique (K_m et V_m) de la pectate et la pectine lyase	27

4.	Analyse statistique :	27
----	-----------------------------	----

Chapitre 3: Résultats et discussions

1.	L'influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la PNL et de la PEL par la moisissure <i>Aspergillus niger</i>	28
1.1.	L'effet de l'humidité.....	28
1.2.	L'effet de la température	30
1.3.	L'Effet de la période d'incubation	32
1.4.	L'effet de la concentration de l'inoculum	34
2.	Caractérisation des lyases	36
2.1.	Influence du pH sur l'activité des PNL et PEL.....	36
2.2.	Influence de la température sur l'activité de la PNL et de la PEL.....	38
2.3.	Etude de la stabilité vis-à-vis du pH	40
2.4.	Etude de la thermostabilité des (PNL, PEL)	42
2.5.	Effet des ions métalliques sur l'activité des PNL et PEL	44
2.6.	Etude des paramètres cinétiques des PNL et PEL	45
	Conclusion.....	47
	Référence bibliographique	49
	Annexe	
	Résumé	

Liste des abréviations

A. : Aspergillus	RGII: Rhamnogalacturonan II
AG : Acide galacturonique	UI: Unité internationale
APG : Acide polygalacturonique	µg : microgramme
C° : degré Celsius	Vmax : Vitesse maximale
DM : Degré de méthylation	IAA: industrie-agroalimentaire
DNS: 3,5-Acide Dénitrosalicilique	
DP : Degré de polymérisation	
EDTA: Ethylène diamine tétra acétique acide	
FMS: Fermentation sur milieu solide	
h : heure	
HG: Homogalacturonane	
HM : Pectine hautement méthylée (high methyl)	
Km : Constante de Michaelis.	
LM : Pectine faiblement méthylée (low methyl)	
mg : milligramme	
ml : millilitre	
min : minute	
PAE : Pectine Acétyl Estérases	
PDA: Potato Dextrose Agar	
PE : pectinestérase	
PEL : pectate lyase	
PG: Polygalacturonase	
PGL : polygalacturonate lyase	
Ph : potentiel d'hydrogène	
PME : Pectine méthyl estérases	
PMG : polyméthylgalacturonase	
PMGL : polyméthylgalacturonate lyase	
PNL : pectine lyase	
RGI: Ramnogalacturonan I	


Liste des figures

Figure 1 : Appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).....	4
Figure 2 : Aspect microscopique (a) et représentation schématique de la conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> (b) (Pasqualotto, 2010).....	6
Figure 3 : La structure de base de la pectine. (Willats <i>et al.</i> , 2006).....	10
Figure 4 : Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines.	11
Figure 5 : Mode d'action des pectinases (Combo <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figure 6 : Structure de pectine lyase (Kraulis, 1991). Pectine lyase (PLB).	16
Figure 7 : Vue stéréoscopique des ions Ca ²⁺ et du TetraGalpA superposés à la carte de densité d'électrons OMIT recuite simulée du PelC (Preston <i>et al.</i> , 1992).	16
Figure 8 : Action des pectines-lyases.....	17
Figure 9 : Action des pectates-lyases.....	19
Figure 10 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.	25
Figure 11 : Effet du taux d'humidité sur la production de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	29
Figure 12 : Effet du taux d'humidité sur la production de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	29
Figure 13 : Effet de la température sur l'activité de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	31
Figure 14 : Effet de la température sur l'activité de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	31
Figure 15 : Effet de la période d'incubation sur l'activité de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	33
Figure 16 : Effet de la période d'incubation sur l'activité de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	33
Figure 17 : Effet de concentration d'inoculum sur activité de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	35
Figure 18 : Effet de concentration d'inoculum sur activité de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	35
Figure 19 : Influence du pH sur l'activité enzymatique de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	37
Figure 20 : Influence du pH sur l'activité enzymatique de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	37
Figure 21 : Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques de PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	39
Figure 22 : Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques de PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	39
Figure 23 : Etude de la stabilité en fonction du pH de la PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	41
Figure 24 : Etude de la stabilité en fonction du pH de la PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	41
Figure 25 : Etude de la thermostabilité de la PNL à différentes températures par la moisissure <i>A.niger</i>	43
Figure 26 : Etude de la thermostabilité de la PEL à différentes températures par la moisissure <i>A.niger</i>	43

<u>Figure 27</u> : Effet de différents ions métalliques sur les activités de la PNL et PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	45
<u>Figure 28</u> : Représentation de Lineweaver-Burk de la PNL par la moisissure <i>A.niger</i>	46
<u>Figure 29</u> : Représentation de Lineweaver-Burk de la PEL par la moisissure <i>A.niger</i>	46

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Position systématique d' <i>Aspergillus niger</i> (Daiani <i>et al.</i> , 2011).	5
<u>Tableau 2</u> : production d'enzyme par <i>Aspergillus niger</i>	8
<u>Tableau 3</u> : teneur en pectine de différents fruits et légumes	12
<u>Tableau 4</u> : Classification des lyases (Jayani <i>et al.</i> , 2005).	18
<u>Tableau 5</u> : Applications des enzymes pectinolytiques microbiennes (Kumar et Suneetha, 2014).	20



Introduction

La biotechnologie industrielle est au cœur de la bioéconomie moderne, en ceci qu'elle procure des outils innovants pour produire et utiliser de façon durable des ressources biologiques et les transformer en denrées alimentaires, en aliments pour animaux, en bioproduits et en bioénergie (**Carlos, 2017**). Elle peut être définie comme l'utilisation directe ou indirecte d'organismes vivants via un large éventail de techniques issues de la microbiologie, de la biochimie, de la génétique et du génie biochimique et chimique (**Charest et Michel 1991**).

La production d'enzyme industrielle exige la préparation de milieux à moindre coût sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% du coût de production des enzymes industrielles (**Srinubabu et al., 2007**). Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agro industriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des paramètres nutritionnels et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont employés pour la production d'enzymes.

Les Pectinases sont l'une des enzymes les plus largement disséminées dans les bactéries, les champignons et les plantes (**Ahmed et al., 2016**). Des industries montrent un intérêt grandissant pour ces enzymes qui offrent de nombreuses possibilités d'utilisation dans différents secteurs industriels (IAA, textile, papeterie, ...) et dont les domaines d'application ne cessent de s'accroître. Les enzymes pectinolytiques occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes.

Les enzymes pectinolytiques sont un système complexe de protéines, comprenant des hydrolases, des lyases et des oxydases, jouent un rôle important dans la dégradation ou la modification des substances de pectines et sont favorables à des processus particuliers, tels que: l'extraction, la clarification des jus de fruits et la production de vins (**Kashyap et al., 2001; Ruiz et al., 2012**). Ces enzymes sont produites par plusieurs microorganismes; en particulier, les souches fongiques tels que: *l'Aspergillus* et le *Penicillium*. En revanche, la production de pectinases repose sur deux bioprocédés, la fermentation à l'état solide (SSF) et la fermentation immergée (SmF) (**Ruiz et al., 2017**).

Les *Aspergillus* constituent un groupe de moisissures qui a montré une diversité considérable et une dominance dans la production de métabolites bioactifs comme les antibiotiques et les enzymes. Ces composés ont témoigné d'un grand intérêt par leurs applications aux différents domaines biomédicaux et biotechnologiques (**Prakash et al., 2013**). En effet, ces microorganismes peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où

les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acide, représentent une importante source à exploiter pour développer des nouveaux procédés biotechnologiques (**Bhat, 2000 ; Peciulyte, 2007**).

Par ailleurs, le son de blé a été choisi comme substrat de fermentation en milieu solide, grâce à sa richesse en fibres insolubles comme la cellulose et la pectine. Il possède aussi une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (**Abdullah et al., 1985**).

Dans cette optique, la présente étude vise à identifier de nouvelles enzymes pectinolytiques répondant aux critères de l'industrie, à savoir la thermostabilité et la capacité à hydrolyser les substances pectiques en conditions alcalines et acides. Pour ce faire, on a procédé à une souche d'*Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma.

Les différentes étapes réalisées au cours de ce travail sont :

- ✚ Etude de l'effet des conditions qui influencent la production des lyases à savoir: taux d'humidité, effet de la température, effet de la période d'incubation et la concentration de l'inoculum.
- ✚ Caractérisation des lyases sur l'extrait brut : étude de l'influence du pH et de la température,
- ✚ Effet de stabilité du pH et de la température
- ✚ Influence des ions métalliques et de l'EDTA
- ✚ Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'enzyme.

Au terme de cette étude, d'autres perspectives seront abordées pour ouvrir de nouvelles pistes de recherches dans le domaine de la production des lyases.



Chapitre1

Synthèse bibliographique

I. Les champignons filamenteux

1 Généralités

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires qui étaient traditionnellement classés dans le règne végétal. Plus tard, ces organismes ont été exclus de ce vaste règne et constituent actuellement un groupe à part : « le règne des Mycètes » ou autrement dit le règne des « Fungi », car ils se différencient des plantes particulièrement par leur paroi renfermant de la cellulose et de la chitine (**Méheust, 2012**), par l'absence de la chlorophylle et en conséquence par leur incapacité à produire leurs propres aliments (**Berger et Guss, 2005**). Les champignons sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone ainsi qu'organotrophes, se nourrissant habituellement par décomposition de la matière organique, ce qui crée une excellente opportunité pour leur croissance dans les aliments. Le règne fongique est caractérisé par une grande diversité estimée à plus de 1,5 million d'espèces, bien que 70 000 espèces « uniquement » aient été nommées (**Paterson, 2006**). Ce règne regroupe entre autres des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) ayant un aspect filamenteux beaucoup plus connus par le terme trivial : « moisissures ». Ces derniers ne sont pas perceptibles par l'œil qu'une fois que leur développement devient important (**Tabuc, 2007**).

2 Le genre *Aspergillus*

➤ Historique

Aspergillus est un genre fongique asexué, décrit pour la première fois en 1729 par Michelli et qui consiste à plus de 180 espèces officiellement reconnues réparties en 18 groupes (essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur) morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches. Il se caractérise par des longs hyphes qui se terminent par la formation d'une structure globuleuse, contenant des spores ressemblant la forme d'un goupillon (*an aspergillum* latin) d'où le nom *Aspergillus* (**Brakhage et al., 1999; Pasqualotto, 2010 ; Masayuki et Katsuya, 2010**).

La richesse de l'arsenal enzymatique des espèces aspergillaires les fait utiliser notamment dans la production d'une large gamme des acides organiques (acide citrique, acide gluconique, acide acétique,...), des enzymes (protéases, lipases, amylases, ...) et des métabolites bioactives tels que les mycotoxines (**Abraca et al., 2004; Bouchet et al., 2005; Heitman et al., 2007**), dont la biosynthèse de ces produits naturels est habituellement associée au développement et différenciation du champignon (**Ward et al., 2006**).

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, ils sont septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* repose sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique. En effet, sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés appelés conidiophores. Ces conidiophores se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogénèse s'effectue sur le mode blastique-phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent collées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes. Les spores unicellulaires sont de forme variable, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Elles peuvent être lisses ou recouvertes d'aspérités plus ou moins marquées, et sont de pigmentations diverses. Les phialides sont soit directement insérées sur la vésicule (têtes unisériées), soit portées par des petits articles insérés sur la vésicule : les métules (têtes bisériées). (**Figure 1**).

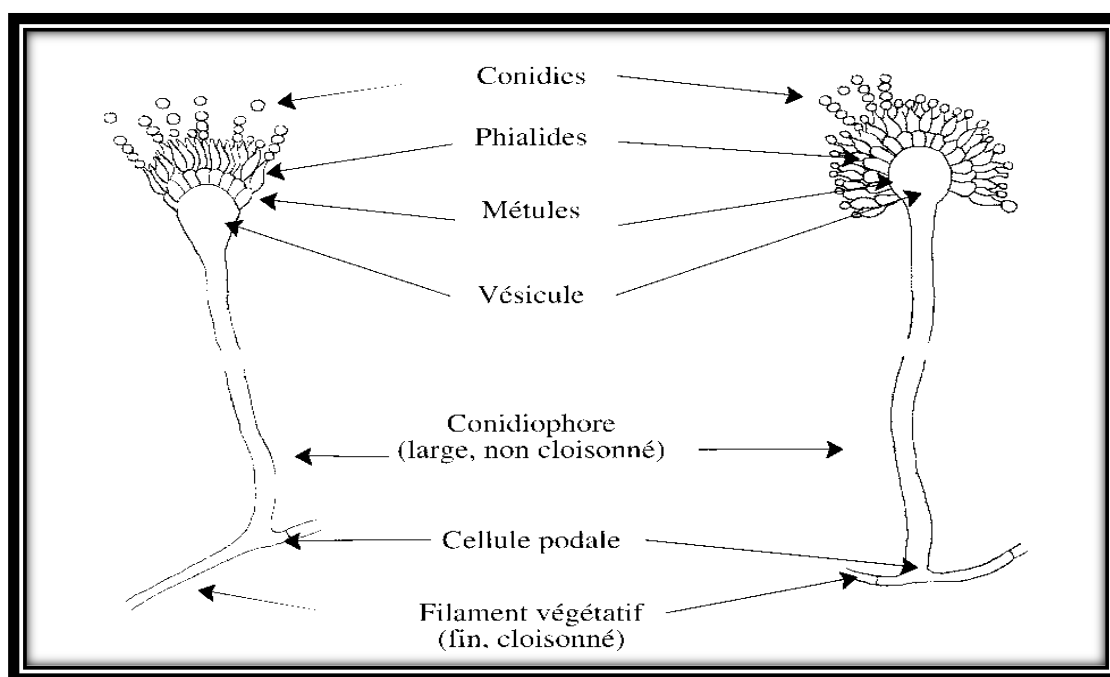


Figure 1 : Appareil reproducteur des *Aspergillus* (Chabasse *et al.*, 2002).

3 *Aspergillus niger*

L'Aspergillus niger, l'aspergille noire, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et les légumes (Raper et Fennel, 1977).

L'Aspergillus niger est l'un des microorganismes les plus importants utilisés en biotechnologie. Il est employé depuis plusieurs décennies déjà pour produire des enzymes extracellulaires (alimentaires). (Schuster *et al.*, 2002).

3.1 Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. Al-Musallam, (1980) a révisé la taxonomie du groupe *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte (Masayuki et Katsuya, 2010). Récemment, plusieurs méthodes ont été utilisées dans cette section. La classification des espèces dans le groupe varie selon les traitements taxonomiques.

La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant (Daiani *et al.*, 2011)

Règne	Mycètes
Embranchement	<i>Amastigomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Deutoromycètes</i>
Ordre	<i>Moniliales</i>
Famille	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>

Tableau 1: Position systématique d'*Aspergillus niger* (Daiani *et al.*, 2011).

3.1.1 Caractères cultureux/ Aspect macroscopique

Ce champignon croît facilement sur milieu de Czapek, une colonie peut atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, avec le mycélium extensif hyalin en grande partie immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques (Quatresous, 2011). L'*A.niger* est caractérisé par la production d'un grand nombre de spores en chaînes. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphe tubulaire,

donnant naissance à un réseau mycélien par ramification, qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (Meyer *et al.*, 2004 ; Ward *et al.*, 2006).

3.1.2 Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue. On observe alors des têtes conidiennes larges, brun-rouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 μm de diamètre) (Quatresous, 2011).

Les phialides (7-10 x 3-3,5 μm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables (10-15 μm). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3,5 à 4,5 μm ; parfois jusqu'à 6 μm de diamètre (Figure 2) (Abraca *et al.*, 2004; Pasqualotto, 2010).

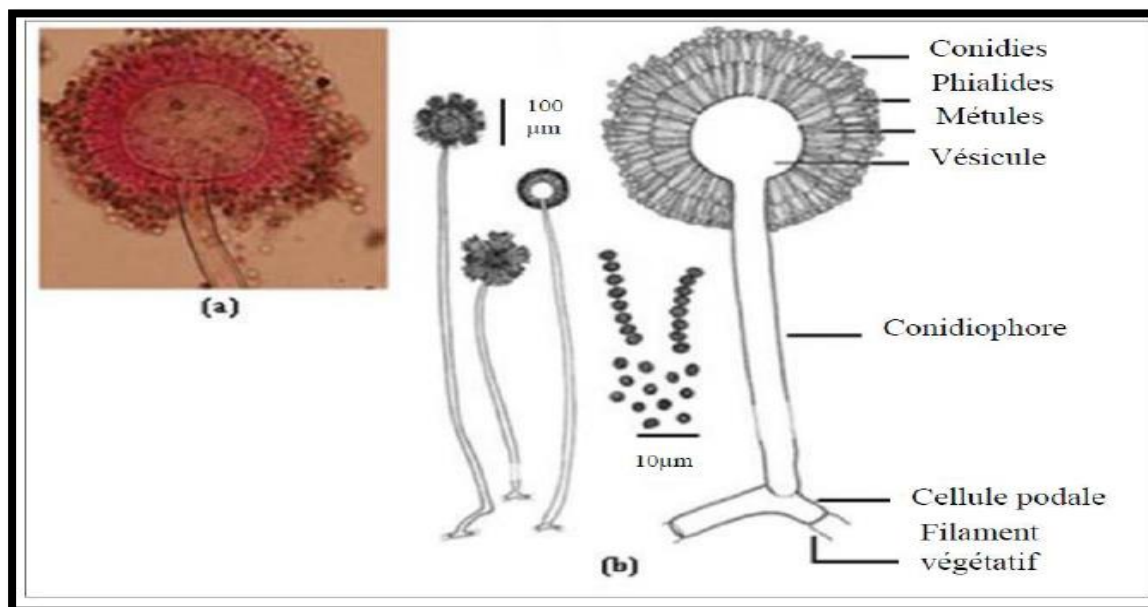


Figure 2 : Aspect microscopique (a) et représentation schématique de la conidiophore d'*Aspergillus niger* (b) (Pasqualotto, 2010).

3.2. Ecologie

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique (Dijksterhuis et Wösten, 2013). Ces capacités et l'abondante production de conidies, qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce, avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (Schuster *et al.*, 2002).

Distribué largement dans tous le sur-monde, *A. niger* est l'un des champignons les plus communs dans l'environnement humain, qui vive en saprobiose (Samson, 1994 ; Ward

et al., 2006). Il est très répandu dans les zones sombres et humides, les sols, le compost, pousse à la surface des matières organiques en décomposition, des denrées alimentaires, des sous-produits agricoles surtout les céréales et ses dérivés (son de blé, son de riz, bagasse...) et de nombreux autres substrats, où les acides aminés et les sucres sont initialement insuffisants. Ce qui a conduit l'organisme d'avoir un certain nombre d'enzymes hydrolytiques, qui lui permet d'utiliser efficacement les sources nutritionnelles externes pour sa croissance (Guillaume, 2006 ; Leyral et Vierling, 2007; Pasqualotto, 2010).

3.3. Le développement de l'*Aspergillus niger*

Aspergillus niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau. Elle peut germer dans un milieu ayant une activité de l'eau de $a_w=0,60$ à la température de 45 °C. C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. Elle peut aussi vivre dans un environnement très humide humidité relative de 90 à 100%) (John et Ailsa, 2013). La température de croissance se situe entre 20 et 48 °C avec un optimum de 25°C (Ayesha *et al.*, 2003).

3.4. Effet u pH

A côté de l' A_w et la température, le pH peut avoir un effet pour la croissance fongique, la plupart de ces moisissures se développent sur une plage de pH extrêmement large: 1,4–9,8 (Schuster *et al.*, 2002).

Entre pH 4,0 et 6,5, les variations de croissance sur les milieux NaCl sont minimales. La moisissure *A. niger* peut se développer à un pH aussi bas que 2,0 (acide) si l' a_w est élevé (John et Ailsa, 2013).

4. Production d'enzymes par l'*Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger* est très largement utilisé dans la production des enzymes Commerciales vues les hautes productivités enzymatiques qui peuvent être atteintes (Iwashita 2002 ; Bakhtiari *et al.*, 2006 ; Aftab *et al.*, 2007 ; Mhetras *et al.*, 2009) (Tableau 2).

Enzyme	Microorganisme	Substrat /Milieu	Références
protéase	<i>A. niger</i>	Son de blé	Villegaset <i>al.</i> , 1993. Demain et Davies, 1999. Ikram -Ul-Haq <i>et al.</i> , 2003.
protéase	<i>A. niger 91</i>	Grain de soja : son de riz (7:3 w/w)	Sanchez et Pilosof, 2000.
protéase	<i>A. niger</i>	Confits, graines de coton en poudre	Wang <i>et al.</i> , 2006.
protéase	<i>A. niger AB100</i>	Écaille de poissons	Barnaliet <i>al.</i> , 2008.
Glucoamylase	<i>A. niger</i>	Son de blé+son de riz+cellulose	Rajoka et Yasmeen, 2005.
α -amylase	<i>A. niger</i> ATCC 16404	Déchets d'orange en poudre	Djekrif-Dakhmoucheet <i>al.</i> , 2006.
Xylanase	<i>A. niger XY-1</i>	Son de blé	XU <i>et al.</i> , 2008.
Cellulase	<i>A. niger</i>	Son de blé	Demain et Davies, 1999.
Lipase	<i>A. niger</i>	L'huile d'olive + la gomme d'acacia (3%+1%)	Namboodiri et Chattopadhyaya, 2000.
Lipase	<i>A. niger</i>	Son de blé + l'huile d'olive	Mahadiket <i>al.</i> , 2002.
Polygalactorunase	<i>A. niger</i>	Son de blé	Fantanaet <i>al.</i> , 2005.
Pectinase	<i>A. niger</i> DMF 27, DMF 45	Tête de tournesol égrainée	Patil et Dayanand, 2006 (a,b,c)
Pectinase	<i>A. niger</i>	Son de blé +cosse de riz	Akhter et al, 2011

Tableau 2 : production d'enzyme par *Aspergillus niger*.

II. Enzymes glycolytiques : Pectinases

1 Substrats pectiques

Les substances pectiques sont des macromolécules glycosidiques complexes de masse moléculaire élevée trouvées dans les plantes supérieures. Les substances pectiques sont présentes dans la paroi cellulaire primaire et constituent les principaux composants des lamelles moyennes, une fine couche adhésive extracellulaire formée entre les parois des cellules jeunes adjacentes. En bref, Les substances pectiques sont largement responsables de l'intégrité structurelle et de la cohésion des tissus végétaux (**Rombouts *et al.*, 1980 ; Alkorta *et al.*, 1998**). On distingue trois groupes majeurs de polyssacharides pectiques, tous contenant de l'acide D-galacturonique dans une plus ou moins grande mesure.

1.2. Homogalacturonane (HG)

HG est un polymère linéaire formé par l'acide D-galacturonique qui peut être acétylé et où estérifié par un méthyle. On peut appeler cela des régions lisses de pectine. La molécule est classée en fonction de son niveau d'estérification: la pectine contient au moins 75% des groupes carboxyle méthylés; l'acide pectinique (acide polygalacturonique, partiellement ou entièrement estérifier) a moins de 75% des groupes carboxyle méthylés; l'acide pectique ou l'acide polygalacturonique n'a pas de groupes carboxyle estérifiés méthyliques (**Jayani *et al.*, 2005**).

1.3 . Rhamnogalacturonane I (RGI)

Le groupe RGI est composé du disaccharide répétitif acide rhamnose-galacturonique. Les résidus galacturoniques peuvent être acétylés et les deux résidus peuvent porter des chaînes latérales de sucres neutres tels que le galactose, l'arabinose et la xylose (**Willats *et al.*, 2006**).

1.4 Rhamnogalacturonane II (RGII)

Malgré son nom, RGII est une chaîne homogalacturonane avec des chaînes latérales complexes liées aux résidus galacturoniques (**Willats *et al.*, 2006**). Vincken et ses collaborateurs (**Vincken *et al.*, 2003**). Ont proposé un modèle de structure de molécule de pectine dans lequel HG et RGII sont de longues chaînes latérales du squelette de RGI (**Figure 3**). Les deux chaînes RG sont également appelées régions poilues de la molécule de pectine. Dans les fruits non mûrs, la pectine se trouve sous forme de substance pectique insoluble dans l'eau, la protopectine, liée à des microfibrilles de cellulose conférant une rigidité aux parois des cellules. Au cours de la maturation, les enzymes du fruit modifient la structure de la

pectine en brisant le squelette ou les chaînes latérales de la pectine, ce qui se traduit par une molécule plus soluble (Kashyap *et al.*, 2001).

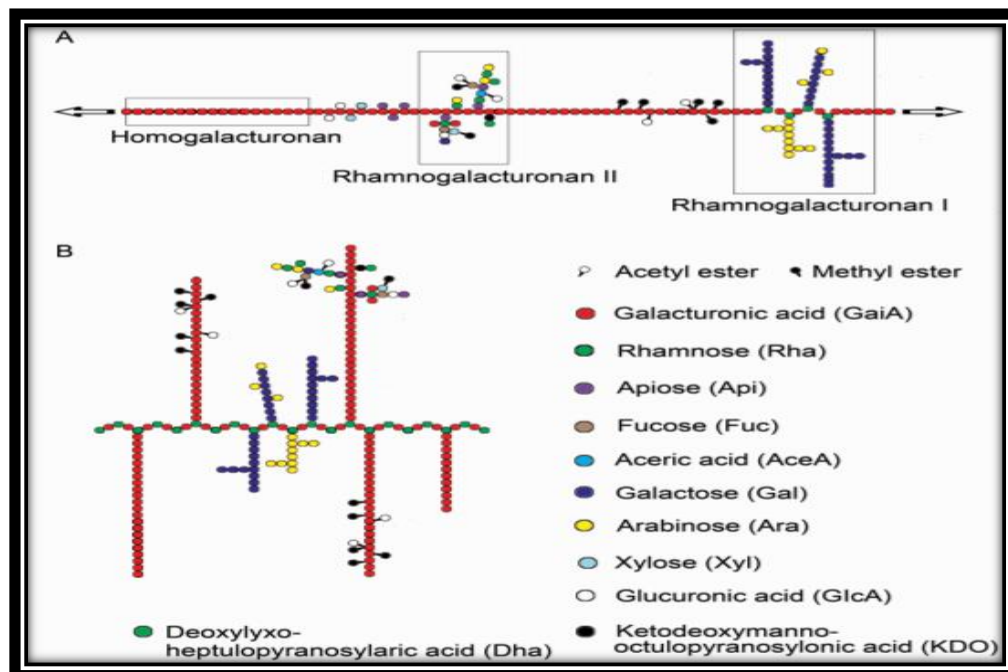


Figure 3 : La structure de base de la pectine. (Willats *et al.*, 2006).

Représentations schématisiques des conventionnelles (A) et récemment proposées (B) des structures de pectine. (Willats *et al.*, 2006).

2. Solubilité

Les pectines sont considérées comme des fibres solubles ayant une forte capacité de rétention d'eau. Plusieurs effets bénéfiques pour la santé ont été rapportés concernant l'élimination des métaux lourds et la diminution du taux de cholestérol plasmatique (Voragen *et al.*, 1995).

3. Structure chimique

La structure chimique des pectines est variable selon la source, la localisation et la méthode d'extraction (Thakur *et al.*, 1997). Une composition chimique et une structure génériques de la pectine ont toutefois été établies dans la littérature. Le modèle communément admis présente la pectine comme une chaîne principale d'acide galacturonique insérée par des résidus rhamnosyls auxquels se lie les chaînes latérales. L'insertion des unités rhamnose sur la chaîne principale forme les «coudes» pectiques. Une représentation schématisique de la

structure des pectines résume celles-ci en une région dite «lisse» homogalacturonique et des régions dites «chevelues» constituées par des régions rhamnogalacturoniques (**Figure 4**) (Voragen *et al.*, 1995).

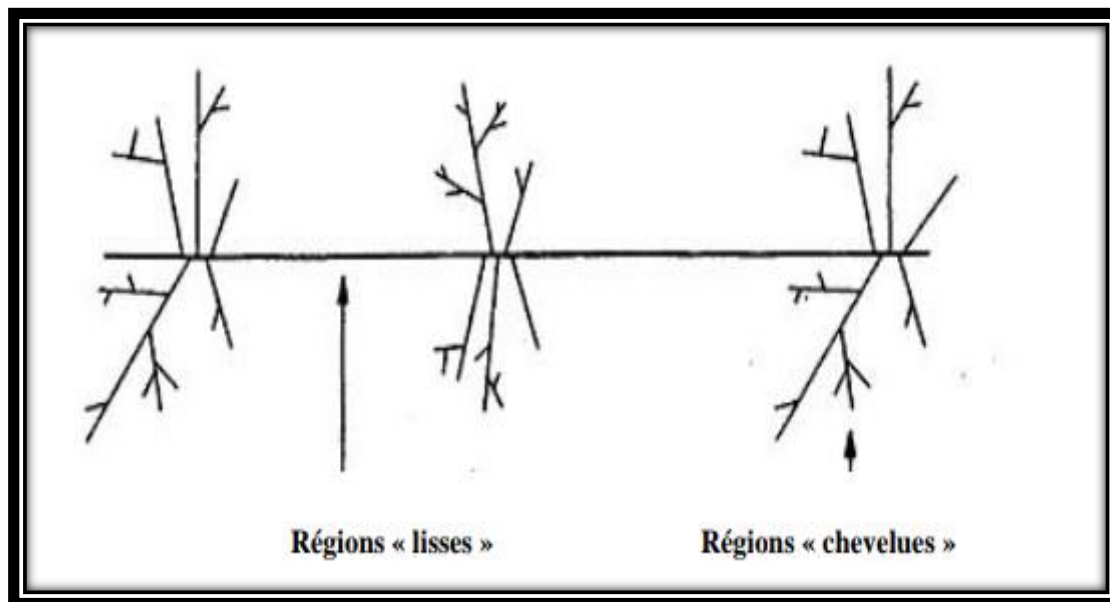


Figure 4 : Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines.

(Voragen *et al.*, 1995).

La chaîne principale est constituée des acides α -D-galacturoniques liés entre eux par des liaisons α (1-4). La fonction carboxylique en position O-6 peut être estérifiée par le méthanol, ou suite à une réaction chimique, par des groupements amides. Les fonctions hydroxyde secondaires (en position O-2 et O-3) peuvent être estérifiées par l'acide acétique.

- lespectines HM (hautement méthylées) : ce sont les pectines dont le degré d'estérification est supérieur à 50 %.
- les pectines LM (faiblement méthylées): ce sont les pectines dont le degré d'estérification est inférieur à 50 %.

Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes (**Tableau 3**) et évoluent avec la maturation des tissus. Bien qu'elles puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les principales sources industrielles de pectines sont les mares de pomme et les écorces de citron et d'orange.

Fruits/légumes	Teneur en pectine en %	Références
Pommes	0,5-1,6	Taper <i>et al.</i> , 2014
Mare de pomme	1,5-2,5	Hodgson et kerr, 1991
Ecorces de citron	2.5-4	Karr, 1976
Bananes	0,7-1,2	Taper <i>et al.</i> , 2014
Ecorces d'oranges	3,6-5,5	Renard et thibault, 1993
Pulpe de Betterave	1	Karr, 1976
Pois	0,5-0,8	Taper <i>et al.</i> , 2014
Tomates	0,2-0,5	Taper <i>et al.</i> , 2014
Carottes	0,2-0,5	Renard et thibault, 1993

Tableau 3 : teneur en pectine de différents fruits et légumes

4. Enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (**Combot *et al.*, 2011**). Les modes d'action des différentes classes de pectinases sont résumés dans la (Figure 5).

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-Torres *et al.*, 2006**).

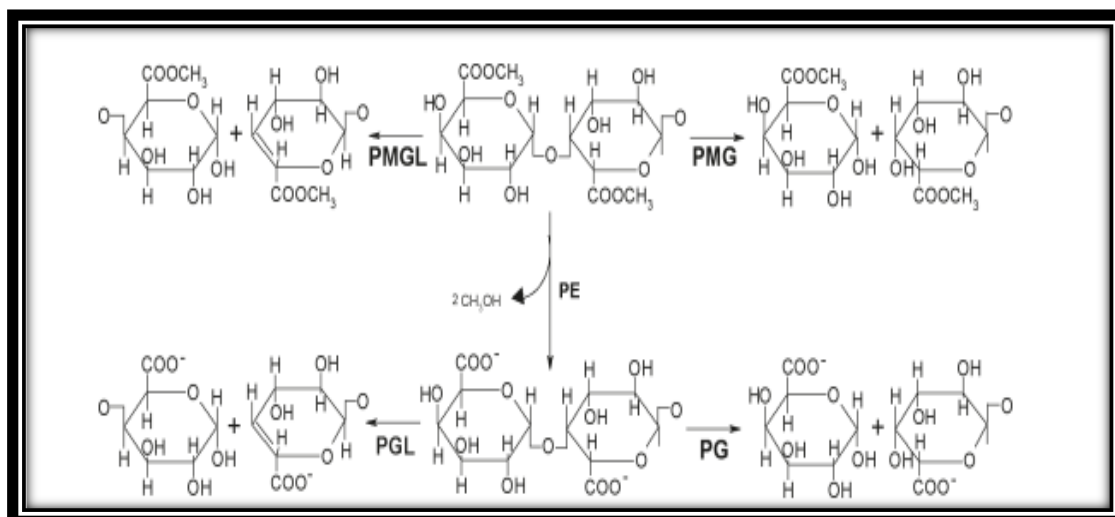


Figure 5 : Mode d'action des pectinases (Combo *et al.*, 2011).

4.1. Protopectinases

Les protopectinases (pectine insoluble dans l'eau) (EC 3.2.1.99) solubilisent la protopectine en formant une pectine soluble hautement polymérisée (Alkorta *et al.*, 1998 ; Kashyap *et al.*, 2001). Elles sont classés en deux types: on réagit avec la région de l'acide polygalacturonique de la protopectine, type A; l'autre avec les chaînes polysaccharidiques pouvant relier la chaîne d'acide polygalacturonique et les constituants de la paroi cellulaire, de type B (Sakai *et al.*, 1993).

4.2. Pectine méthyl estérases (PME)

La pectine méthyl esterase ou la pectinestérase (EC 3.1.1.11) catalyse la déstérification du groupe méthoxyle de la pectine formant de l'acide pectique et du méthanol. L'enzyme agit préférentiellement sur un groupe ester méthylique d'un motif galacturonate à côté d'un motifgalacturonate non estérifié. Elle agit avant les polygalacturonases et les pectate lyases qui nécessitent des substrats non estérifiés (Kashyap *et al.*, 2001). Elle est classé dans la famille des glucides estérases 8 (Coutinho *et al.*, 1999).

4.3. Pectine Acétyl Estérases (PAE)

La pectine acétyl estérase (EC 3.1.1.6) hydrolyse l'ester acétylique de pectine formant de l'acide pectique et de l'acétate (Shevchik *et al.*, 1997). Elle est classé dans les familles 12 et 13 des glucides estérases (Coutinho *et al.*, 1999).

4.4. Polyméthylgalacturonases (PMG)

La polyméthylgalacturonase catalyse le clivage hydrolytique des liaisons α -(1,4)-glycosidiques dans le squelette de la pectine, de préférence une pectine hautement estérifiée, formant ainsi le 6-méthyl-D-galacturonate (Jayani *et al.*, 2005).

4.5. Polygalacturonases (PG)

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani *et al.*, 2005). Les endo-PG coupent les liaisons d'acide α -1,4-D-galacturonique au hasard, alors que les exo-PG coupent les liaisons lien de fin non réducteur (Anand *et al.*, 2014). Les endo-PG se trouvent généralement dans un environnement extracellulaire et exo-PG dans le périplasme. Les polygalacturonases sont largement répandues parmi les champignons, bactéries, levures, plantes et certains nématodes parasites des plantes (Niture, 2008).

4.6. Les lyases

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique CO par un mécanisme de β -élimination. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturé et d'oligomères de petite taille. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent. Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo- et les exo-lyases (Jayani *et al.*, 2005).

4.6.1. L'origine des lyases

Les lyases sont produites par des bactéries et des champignons (Prade *et al.*, 1999). Elles sont aussi présentes dans les végétaux, principalement dans les fruits et les légumes où elles sont impliquées dans leur mûrissement.

- **Origine végétale**

Les lyases produites par les plantes au niveau intracellulaire fragilisent les membranes cellulaires, ce processus est nécessaire à la croissance de la plante ainsi qu'à la chute des feuilles et des fruits (**Hadfield et Bennett, 1998**). Le fruit produit aussi des lyases nécessaires à sa maturation (changement de couleur et de goût) et à son ramollissement (**Hadfield et al., 1998 ; Morgutti et al., 2006**).

- **Origine microbienne**

La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (**Meunier, 1999**). De plus, les lyases végétales sont produites en quantité faible, contrairement aux lyases microbiennes. A la suite de ce développement, un grand nombre de lyases furent produites par des bactéries, des moisissures et des champignons.

- **Origine bactérienne**

Les bactéries produisent principalement des lyases telles que *Bacillus spp.* (**Kashyap et al., 2000**), *Pseudomonas marginalis* (**Hayashi et al., 1997**), *Geobacillus pallidus* p26 (**Safinur et al., 2014**) et *Bacillus macerans* (**Morozova et al., 2006**).

En effet, les bactéries produisent plutôt des lyases alcalines et stables de point de vue thermique pendant que les champignons sont utilisés pour l'obtention des lyases acides (**Favela-Torres et al., 2006**).

- **Origine fongique**

Les moisissures sont les micro-organismes les plus importants pour la production des lyases tels que : *Aspergillus niger* (**Sidra et al., 2013**), *Aspergillus giganteus* (**Pedrolli et al., 2008**), *Penicillium citrinum* (**Yadav et al., 2009**). La plupart des produits commerciaux pectinolytiques sur le marché sont obtenus à partir d'*Aspergillus niger*.

4.6.2. Structurer des lyases

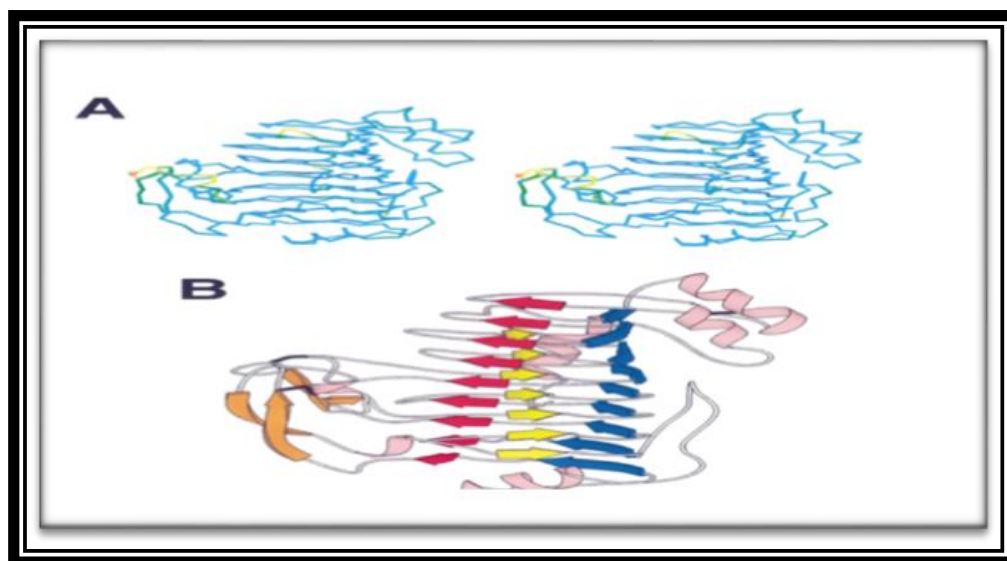


Figure 6 : Structure de pectine lyase (Kraulis, 1991). Pectine lyase (PLB).

La couleur représente le facteur de température et varie progressivement à partir de bleu à rouge lorsque le facteur de température augmente. B, Schéma en ruban schématisé du squelette PLB, illustrant la structure secondaire. Les hélices sont représentées par des spirales roses et la structure β par des flèches. La feuille β parallèle, PB1, est jaune; PB2 est bleu; et PB3 est rouge. La structure antiparallèle β dans le premier tour T3 et un brin β dans la troisième boucle T3 sont indiqués en orange. Les liaisons disulfures sont désignées par des lignes épaisses et noires. L'image en A a été générée avec le programme O et l'image en B a été réalisée avec MOLSCRIPT.

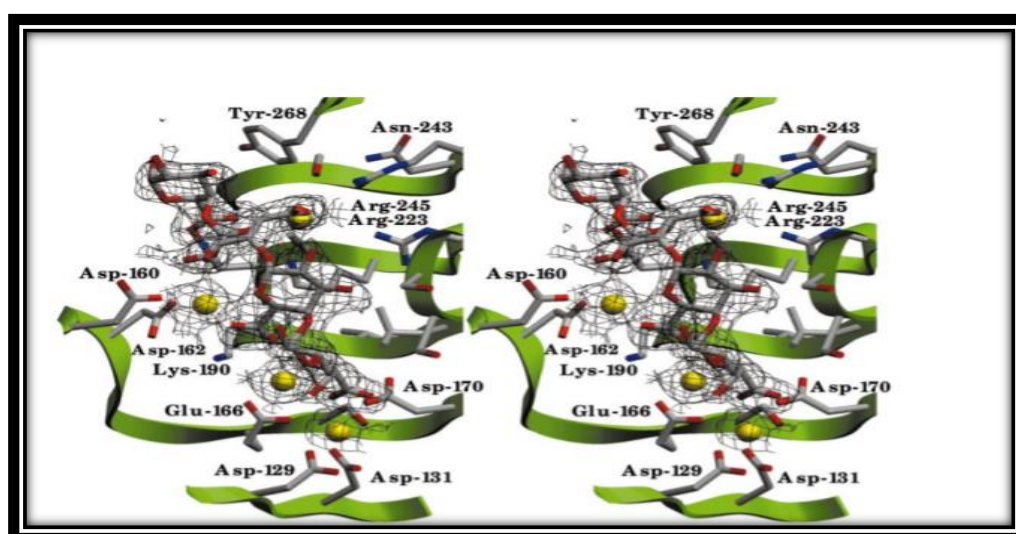


Figure 7 : Vue stéréoscopique des ions Ca^{2+} et du TetraGalpA superposés à la carte de densité d'électrons OMIT recuite simulée du PelC (Preston *et al.*, 1992).

4.6.3. Mode et mécanisme d'action de la pectine lyase

Elles ont pour substrat préférentiel la pectine et agissent selon deux modes :

- Les endopectines-lyases (**EC 4.2.2.10**) agissent par β -élimination et ont une préférence pour les pectines HM. Leur affinité pour les pectines diminue avec le DM du substrat et sont inactives sur l'acide polygalacturonique (APG). Elles coupent la liaison soit entre deux AG méthoxylés, ou entre un résidu AG libre et un résidu AG méthoxylé. Le plus petit substrat est un AG4 totalement méthoxylé (**Figure 7**) (**Iemberg et al., 2000a**).

- Les exopectines-lyases agissent sur les pectines fortement estérifiées, ont récemment été isolées d'*Aspergillus niger* (**Suherland, 1995**).

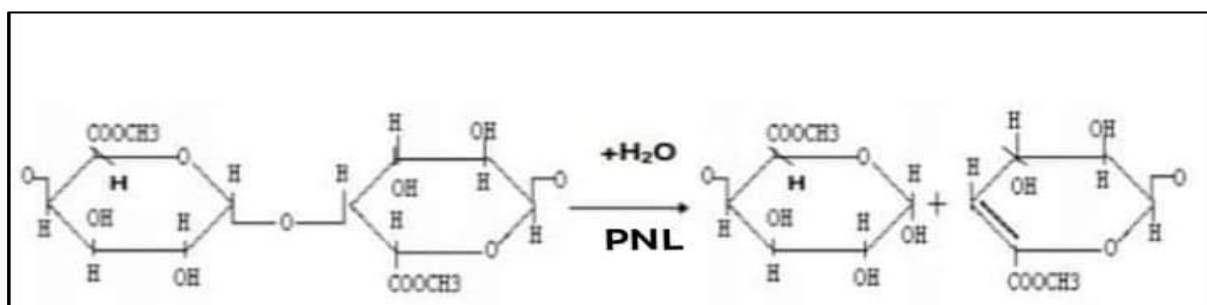


Figure 8 : Action des pectines-lyases

Les deux groupes lyase sont classés dans la famille de polysaccharidases 1. Comme le montre le (**Tableau 4**), les lyases de champignons présentent une activité optimale en milieu acide et neutre, alors que celles de bactéries sont plus actives en milieu alcalin.

La dégradation complète du substrat de la pectine nécessite toujours des enzymes qui coupent la chaîne du rhamnogalacturonane.

Enzyme	numéro EC	Mécanisme d'action	Modèle D'action	Premier Substrat	Produits
Endopolygalacturonase Lyase	4.2.2.2	Trans- élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates Insaturés
Exopolygalacturonase Lyase	4.2.2.9	Trans- élimination	Avant-dernière liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase	4.2.2.10	Trans- élimination	Aléatoire	Polyméthyl-D-digalacturonates Insaturés	Méthyloligogalacturonates Insaturés
Exopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase		Trans- élimination	Dernière liaison	Polyméthyl-D-digalacturonates Insaturés	Méthylmonogalacturonates Insaturés

Tableau 4 : Classification des lyases (Jayani *et al.*, 2005).

4.6.4. Mode et mécanisme d'action de la pectate lyase

La pectate lyase coupe les liaisons glycosidiques de préférence sur l'acide polygalacturonique en formant un produit insaturé (4,5-D-galacturonate) par réaction de transélimination. PEL a une exigence absolue d'ions Ca^{2+} . Il est donc fortement inhibé par les agents chélateurs comme l'EDTA (Jayani *et al.*, 2005). Les pectate lyases sont classées comme endo-PEL (EC 4.2.2.2) qui attaquent au hasard à l'intérieur de la chaîne polygalacturonique. Le substrat préférentiel est une pectine faiblement méthoxylé (LM) avec un degré de polymérisation (DP) plus élevé. Le plus petit substrat obtenu est un trimère (AG3). Les exopectate-lyases (EC 4.2.2.9) ont une action récurrente à partir de l'extrémité réductrice de l'acide galacturonique en libérant des dimères insaturés (AG2) (rexová-bencová et marcovic, 1976; baron et thibault, 1985). La présence de calcium serait nécessaire à l'action des endo et des exopectate-lyases (Figure 9) (jurnak *et al.*, 1996).

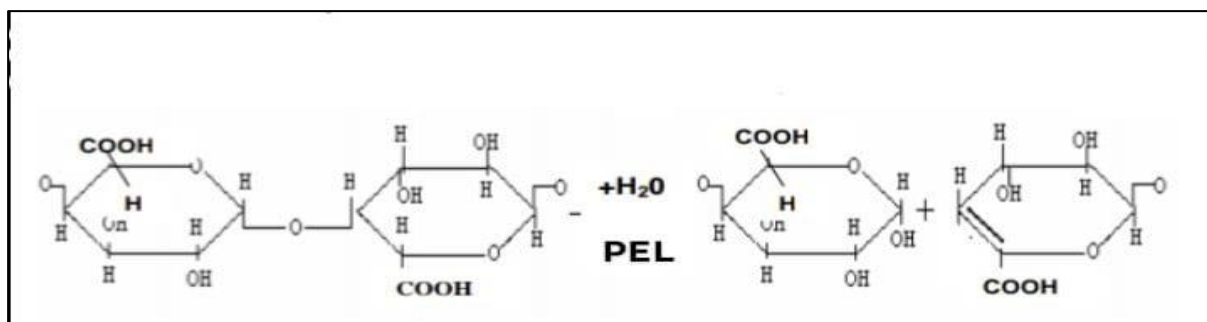


Figure 9 : Action des pectates-lyases

5. Applications des enzymes pectinolytique

L'utilisation des pectinases en association avec les amylases dans les industries agro-alimentaires à le pouvoir de clarifier les jus et ainsi réduire le temps de filtration de 50% (**Saxena *et al.*, 2008**). Elles sont utilisées également dans la clarification du vin, ou bien comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (**Rodriguez-Fernández *et al.*, 2011**). Les pectinases trouvent aussi des applications dans divers domaines tels que: le textile, industries du papier, fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et légumes, ainsi que le traitement des eaux usés (**Zeni1 *et al.*, 2015**), les applications des pectinases dans les divers domaines sont représentées dans le (Tableau 4).

Domaine	Processus
Production de jus de fruits	-Classification des jus.
Cornichons	-Favorise le ramollissement durant le processus de fermentation et de stockage
Production de Café et Thé	-Accélération du processus de fermentation et l'élimination de la mousse. -Élimination des couches mucilagineuses dans les grains de café.
Textiles	-Dégraissage des fibres végétales. -Utilisé dans l'élimination des impuretés non cellulosiques dans les fibres de cotons.
Traitement des eaux usées	-Élimination des pectines contenues dans les eaux usées des industries agroalimentaires
Papier et puple	-Dépolymérisation des pectines retrouvées dans le papier, et réduit la demande cationique des solutions de pectine.

Tableau 5: Applications des enzymes pectinolytiques microbiennes (**Kumar et Suneetha, 2014**).

5.2. Application des pectinases industrielles

Les pectinases industrielles peuvent être classées en deux types; pectinases acides et alcalines (**Gummadi et al., 2007**). Les pectinases acides jouent un rôle important dans l'industrie des jus de fruits. Les pectinases du commerce sont couramment utilisées dans les processus d'extraction et de clarification des jus clairs mousseux (jus de pomme, de poire et de raisin), jus jusques nuages (jus d'agrumes, jus de pruneaux, jus de tomates et nectars) et dans les produits unicellulaires dans le but de préserver l'intégrité des cellules végétales en hydrolysant sélectivement les polysaccharides de la lamelle moyenne (**Kashyap et al., 2001**). Par contre, les pectinases alcalines principalement produites à partir de *Bacillus* spp. sont principalement utilisés pour le dégomme et le rouissage des cultures de fibres et le prétraitement des eaux usées pectiques des industries des jus de fruits (**Kashyap et al., 2001**).

III . Fermentation sur Milieu Solide :

1. Définition

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (**Holker et al., 2005**). La fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (**Duchiron et al., 2011**). La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse. La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau (A_w) comprise entre 0,65 et 0,98 (**Assamoi et al., 2009**).

2. Le son de blé

Le son de blé est un co-produit de la semoulerie issu des parties externes du grain, il est riche en fibres alimentaires, composé principalement de cellulose, protéines, vitamines, et sels minéraux (calcium, magnésium, phosphore). Cette composition varie en fonction de ses variabilités génétiques et éco-physiologiques ainsi qu'en fonction du mode de fractionnement et de mouture (**Zeitoun, 2011**).

Beaucoup de co-produits issus de l'agriculture remplacent les substrats synthétiques généralement plus onéreux. Parmi ces résidus, le son de blé est un des substrats le plus attractif. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques. Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (**Abdullah et al., 1985**). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons. Le son de blé contient de la

cellulose (13%), de l'amidon (15-25%) et du xylane (12,65%) et de la pectine (20%) qui induisent une bonne production de cellulases, d'amylases, xylanases et de pectinases respectivement. Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des études actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée de son de blé qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol (**Javed *et al.*, 2012**). Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical. Les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du côlon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (**Javed *et al.*, 2012**). Il est aussi utilisé comme additif dans l'alimentation humaine pour l'apport de vitamine B. Le son de blé peut aussi être utilisé dans l'alimentation animale. Il a été montré que l'ajout quotidien de son de blé dans l'alimentation des vaches permet d'augmenter la production de lait de 14,65 litres par jour. Cependant, pour être efficace, le son de blé doit être préalablement « déphytisé » car les phytates sont d'importants facteurs antinutritionnels. De part l'abondance mondiale de ce co-produit, ses propriétés et ses nombreuses applications en fermentation mais aussi en médecine, le son de blé est considéré comme « l'or marron » du XXIème siècle (**Javed *et al.*, 2012**).



Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Réactivation de la souche

La souche utilisée dans ce travail est la moisissure *Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma, fournie par la Doctorante Bramki Amina, Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM) Université des Frères Mentouri Constantine. La réactivation est effectuée sur milieu PDA (**Annexe 1**). Elle se fait par dépôt de la souche au centre à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

2. Production des lyases en Erlen-meyers en FMS

2.1 Son de blé substrat de la fermentation

Le son de blé est la matière première principalement utilisée, comme substrat de fermentation, dans cette étude. Il nous a été gracieusement fourni par le groupe des Moulin sidi Rachad (Unité 312 Hamma Bouziane). Le substrat est conservé dans des boîtes en métal hermétiquement fermé à température ambiante.

2.2 Préparation de l'inoculum

La souche est maintenue sur milieu PDA incubée à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores, après sporulation de la souche les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau distillée stérile, la concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule de Thoma.

2.3 Dénombrement des spores

La détermination des nombres des spores est réalisée à partir d'une solution mère de spores à l'aide d'une cellule de comptage ou de numération (cellule de Thoma) (**Guiraud, 1998**). L'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40.

2.4 Fermentations

2.4.1 Préparation du milieu de production

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml, 10 g de son de blé sont mis dans chaque Erlenmeyer avec un volume de solution humidifiante qui est l'eau distillée, ensuite ils sontensemencés avec l'inoculum et homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre puis, Les Erlenmeyers sont bouchées avec du coton cardé enveloppé avec du papier d'aluminium (qui assure une bonne étanchéité et supporte les hautes températures)

(**Kumar et al., 2005**) et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes, les enzymes sont ensuite incubés à 45°C pendant 5 jours.

Dans ce travail plusieurs tests sont réalisés afin de déterminer l'effet des conditions influençant sur la production des lyases

- **L'effet de l'humidité:** la gamme de 40%,50%,60%,70% et 80% d'agent humidifiant qui est l'eau distillée a été utilisé pour tester l'humidité.
- **L'effet de la concentration en inoculum :** la gamme des taux d'inoculum étudiée est : 10^6 , 2×10^6 , 10^7 , 2×10^7
- **Effet de la période d'incubation:** On a testé 24h ,48h, 72h, 96h, 120h, 144h et 168h
- **L'effet de la température :** différentes température a été testé 30°C, 40°C, 45°C et 50°C.

2.4.2 L'extraction

Après fermentation, une quantité de (5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 50 ml de solution de Tween 80 (0,02%). Le mélange est mixé pendant 3 minutes et centrifugé à 10 000 tours/min à 4°C pendant 30 minutes (**Demir et Tari, 2014**). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut, il est conservé au congélateur et sert pour l'analyse des activités pectinolytiques.

2.4.3 Méthodes analytiques

- **Préparation du milieu réactionnel**

Le dosage est réalisé selon la méthode de (**Albersheim et Killias, 1962**). Un volume de 0.2ml de l'extrait enzymatique récupéré après la centrifugation est mélangé avec 1.3ml de substrat (tampon tris-HCl pour le pectate lyase et tampon phosphate citrate pour pectine lyase) sauf dans la pectate lyase on ajoute 15µl de CaCl_2 . Le mélange est incubé au bain marie à 40°C pendant 20 minutes.

La lecture au spectrophotomètre (**JENWAY., 7305 Spectrophotomètre**) à 232nm se fait directement sur le milieu réactionnel, avec ou sans dilution, contre le blanc, en utilisant une cuve en quartz. L'activité enzymatique est exprimée en UI et calculée selon la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire de $4600 \text{ M}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ d'après Albersheim (**Albersheim et Killias, 1962**).

- L'activité enzymatique est calculée en UI/g(Substrat) :

$$\text{Activité enzymatique UI/g(Substrat)} = \frac{\text{Activité } \frac{\text{UI}}{\text{ml}} * \text{volume de l'extraction}}{\text{matière sèche}}$$

➤ L'activité spécifique est calculée en UI/mg :

$$\text{Activité spécifique UI/mg} = \frac{\text{Activité totale UI/g(substrat)}}{\text{masse de protéine mg/ml}}$$

- **Dosage des protéines :**

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de (**Lowry et al., 1951**) qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques: La réaction de Biuret dans laquelle Cu^{2+} en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond et la chimie de Folin-Ciocalteu dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleue (**Annexe 2**), La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine (BSA) à des concentrations de 0 à 500 $\mu\text{g/ml}$.

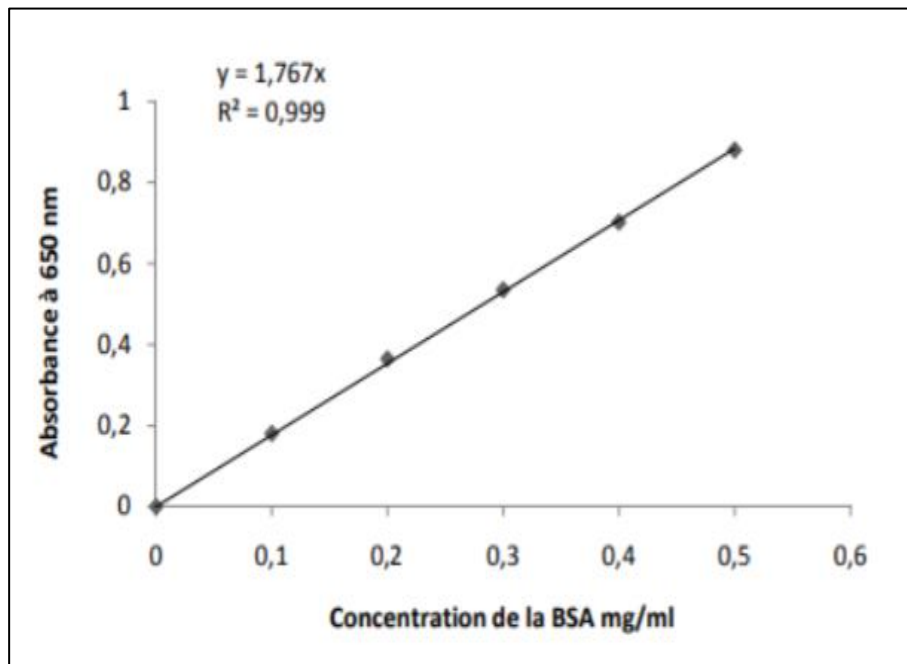


Figure 10 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.

3. Caractérisation des lyases

Les enzymes sont produites par la souche *A.niger* sont caractérisées par: le pH optimal, la température optimale, la stabilité thermique, la stabilité au pH. Cette caractérisation est réalisée de l'extrait brut obtenu après ensemencement de la souche des milieux optimisés.

3.1 Influence du pH

L'étude de la variation de l'activité des lyases en fonction du pH est menée à la température optimale de chaque enzyme active pour une gamme de pH de 3.0 à 12.0. Quatre types de solutions tampons sont utilisés: tampon phosphate citrate 100 mM pour les Ph de 3.0 à 5.0, le tampon phosphate 100 mM pour les pH de 6.0 à 8.0, le tampon Tris-HCl 100 mM pour pH 9.0 et 10.0, le tampon Na₂HPO₄-NaOH 100 mM pour les pH de 11.0 à 12.0. L'optimum est déterminé en traçant l'activité des lyases en fonction des pH pour chaque enzyme active.

3.2 Effet de la température

L'effet thermique sur l'activité de la pectate lyase est étudié à pH 10 et sur l'activité de la pectine lyase à pH 4. Une gamme de température variant de 40 à 100 °C avec un intervalle de 5°C, est utilisée afin de déterminer la température optimale des deux enzymes.

3.3 Effet de stabilité de la température

La thermostabilité des deux enzymes est menée au pH optimal de chaque enzyme, à différentes températures (60°C 70°C 80°C et 90°C) pour un intervalle de temps allant jusqu'à 3 heures, des prélèvements sont effectués chaque heure. L'activité enzymatique résiduelle (par rapport à l'activité de l'échantillon non traité) est déterminée.

3.4 Effet de stabilité au pH

La stabilité au pH est déterminée à 4°C. Les échantillons sont portés à des pH compris entre 3.0 et 12.0 avec des tampons préalablement préparés aux différents pH. Après stockage à 4°C pendant 24 heures, les échantillons sont remis à pH 9 pour Pectate lyase et à pH 5.2 pour pectine lyase. L'activité résiduelle par rapport à l'activité enzymatique initiale est calculée.

3.5 Influence des ions métalliques et de l'EDTA

Pour visualiser l'effet des ions sur l'activité des lyases, l'extrait enzymatique est pré-incubé pendant 30min à 50 °C en de différents ions à une concentration de 1 mM : CaCl₂, MnCl₂, BaCl₂, MgCl₂, CdCl₂, l'EDTA 10 Mm est également testé.

Les activités enzymatiques relatives sont déterminées selon les conditions standards après une incubation de l'enzyme avec le substrat spécifique pendant 20min.

3.6 Détermination des paramètres cinétique (K_m et V_m) de la pectate et la pectine lyase

Différentes concentrations du substrat (pectine pour PNL et l'acide polygalacturonique pour PEL), variant de 0.05%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% sont testées afin de déterminer les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) des deux enzymes, par représentation en coordonnées inverses de **Lineweaver et Burk, (1934)**.

L'activité résiduelle est calculée en % :

$$\text{Activité résiduelle} = \frac{\text{l'activité de l'échantillons} * 100}{\text{l'activité maximale}}$$

4. Analyse statistique :

L'analyse statistique est effectuée par les écarts types par l'Excel 2013.

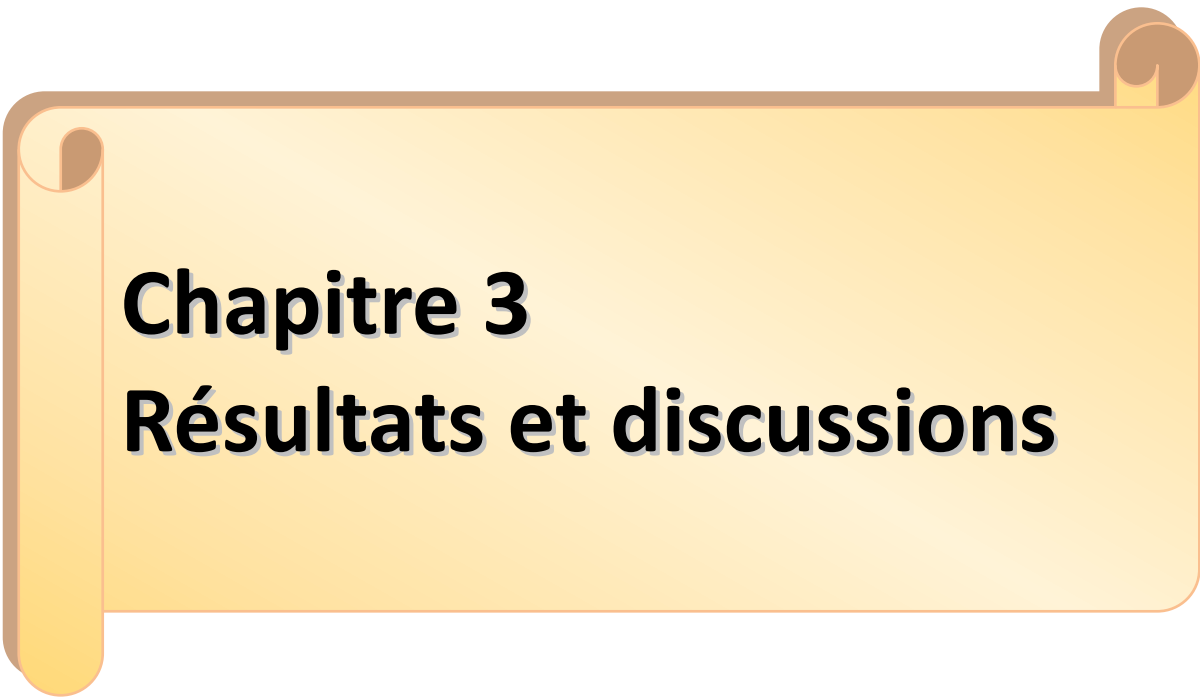
Les résultats descriptifs ont été présentés sous forme de pourcentage pour les variables qualitatives et d'écarts types pour les variables quantitatives.

- La formule utilisée:

L'écart types d'une variable est la racine carrée positive des variances et se définit comme suit:

$$\sigma x = \sqrt{\text{var}(x)}$$

- Var (x)= variance



Chapitre 3

Résultats et discussions

1. L'influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la PNL et de la PEL par la moisissure *Aspergillus niger*

Les facteurs testés (taux d'humidité, la température, la période d'incubation et la concentration de l'inoculum) montrent des effets significatifs sur la production des lyases.

1.1. L'effet de l'humidité

Les résultats de la production de la PNL et de la PEL en fonction du taux d'humidité sont présentés dans la (Figure 11) et la (Figure 12) respectivement.

Les résultats de la Figure 11 et 12 indiquent que le taux d'humidité optimal pour la production de la PNL et de la PEL est de 60% avec une activité spécifique maximale de 167437,601 U/mg et de 110654,4U/mg respectivement. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Sidra *et al.*, (2013) et Darah *et al.*, (2013) pour la production des deux enzymes par la moisissure *A. niger*. Cependant Koser *et al.*, (2019) montrent une production maximale de la PNL (875 U/mL) par la moisissure *Aspergillus oryzae* avec 70 % d'eau distillée comme agent humidifiant.

Selon Castilho *et al.*, (2000); Blandino *et al.*, (2002); Freitas *et al.*, (2006) , le taux d'humidité varie entre 40 à 70% pour la production de pectinases à partir de divers substrats solides avec différentes souches fongiques.

En effet, un taux d'humidité supérieur à 60% provoque une diminution des deux activités enzymatiques PNL (113775,618 U/mg), PEL (16616,3171 U/mg). Ceci est dû probablement à une diminution de la porosité du substrat qui entraîne une inhibition de la croissance fongique. Tandis que une faible humidité conduit à une sécrétion plus lente des enzymes microbiennes en raison de la faible solubilité des nutriments et le faible gonflement du substrat (Iqbal *et al.*, 2011).

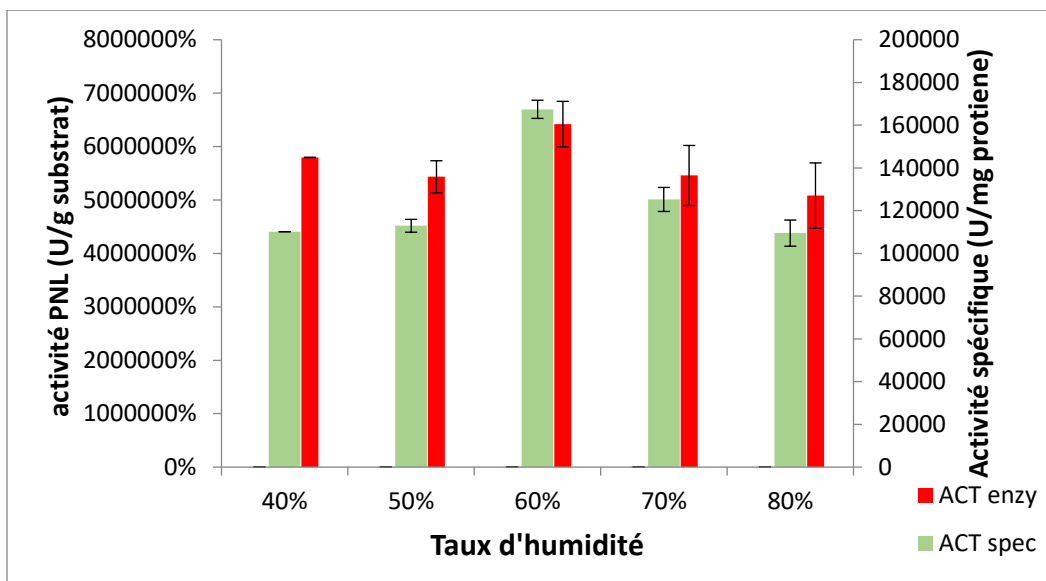


Figure 11 : Effet du taux d'humidité sur la production de PNL par la moisissure *A.niger*.

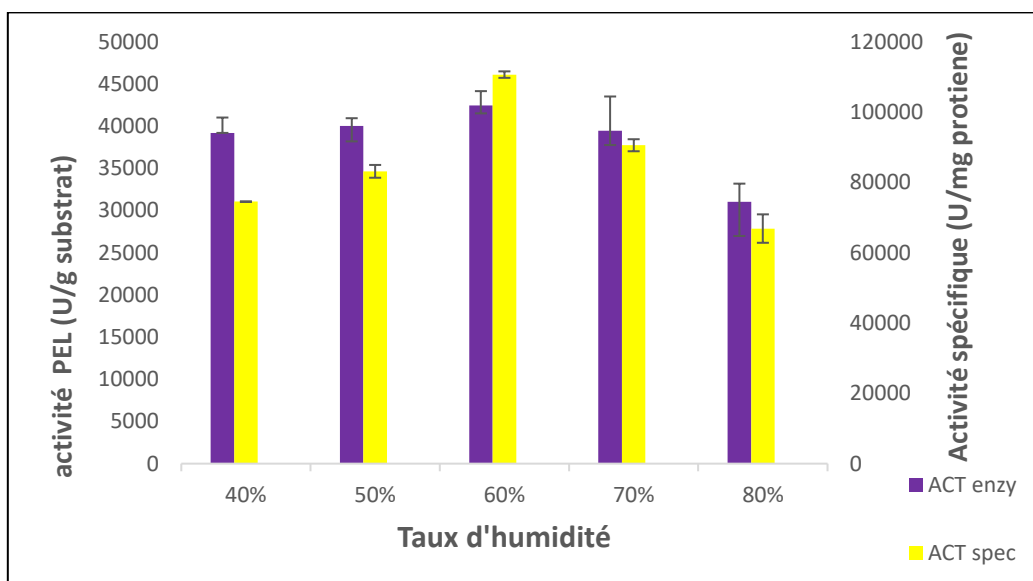


Figure 12 : Effet du taux d'humidité sur la production de PEL par la moisissure *A.niger*.

1.2. L'effet de la température

Les résultats de l'effet de la température sur les activités pectinolytiques d'*Aspergillus niger* sont représentés dans les (Figures 13 et 14).

Une activité spécifique maximale de 17061,2466 U/mg de la PNL est obtenue à 45°C de culture sur un milieu solide à base de son de blé (Figure12). Les résultats obtenus sont largement supérieur à ceux trouvés par Sidra *et al.*, (2013) ; Koser *et al.*, (2019) qui montrent une activité maximale de la PNL d'*Aspergillus niger* à 30°C et d'*Aspergillus oryzae* à 35°C.

Dans la Figure 13 les résultats montrent que l'activité spécifique maximale de la PEL21610,911 U/mg est obtenue à 45°C. Ces résultats sont largement supérieur à ceux trouvés par Maciel *et al.*, (2011) qui montrent une activité maximale à 30 °C. D'autres auteurs rapportent une température optimale de 40°C pour la production de la PEL (Patil *et al.*, 2012; Adeleke *et al.*, 2012 et Maller *et al.*, 2013).

D'autres auteurs rapportent une température optimale de 50°C pour la production des enzymes pectinolytique par *l'Aspergillus niger* Oyeleke *et al.*, (2012).

Les résultats de cette étude montrent que la souche *A. niger* isolée de sol thermal de Teleghma est un champignon thermophile modéré. En effet une température supérieure à 45°C entraîne une perte d'humidité du substrat qui affecte les activités métaboliques du microorganisme, entraînant une réduction de la croissance et la production des enzymes Koser *et al.*, (2019). La variation de la température optimale dépend, d'une part de l'espèce, et d'autre part de la niche écologique dans laquelle le micro-organisme vit.

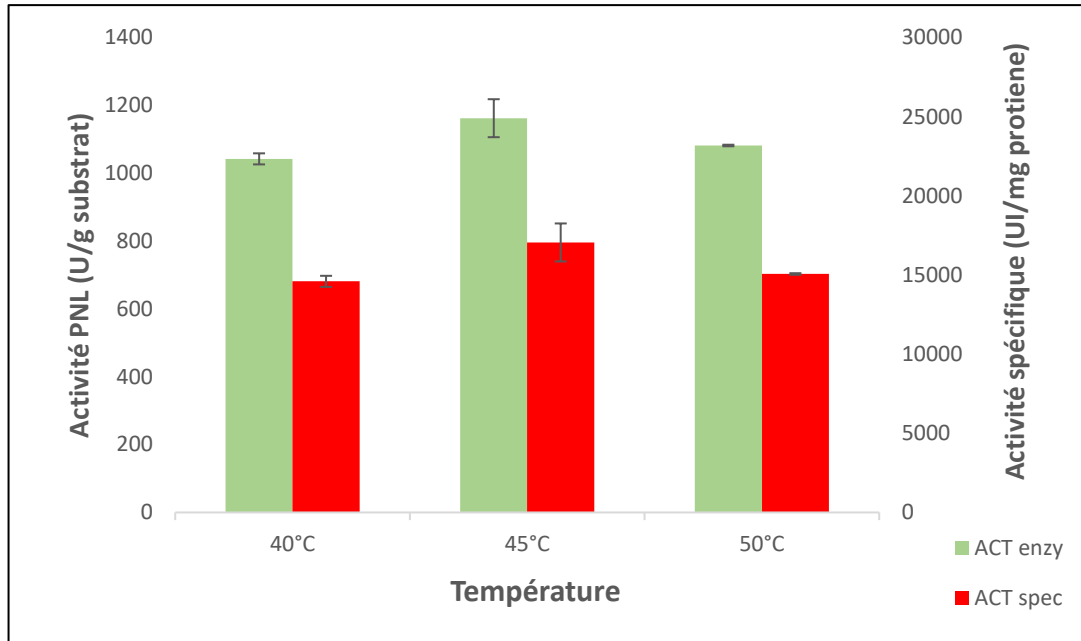


Figure 13 : Effet de la température sur l'activité de PNL par la moisissure *A.niger*.

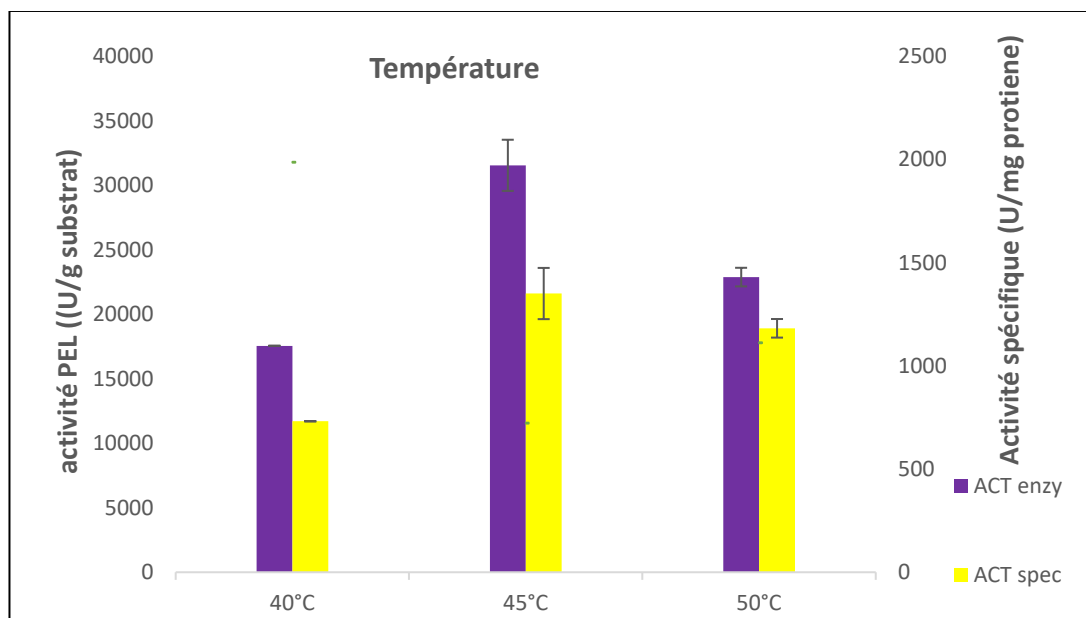


Figure 14 : Effet de la température sur l'activité de PEL par la moisissure *A.niger*.

1.3. L'Effet de la période d'incubation

Les résultats de l'influence du temps d'incubation sur la production de la PNL et de la PEL d'*Aspergillus niger* sont consignés dans les (**Figures 15 et 16**).

On remarque que l'activité spécifique de la PNL augmente et atteint son activité spécifique maximale de 136072,853 U/mg au bout de 96h de fermentation (**Figure 15**). Ces résultats ne sont pas identiques à ceux trouvés par **Koser *et al.*, (2019)** qui montrent une activité maximale de la PNL d'*Aspergillus niger* après 48h de culture.

On remarque aussi que l'activité spécifique de la PEL augmente et atteint son activité maximale de 28115,4122U/mg au bout de 96h de fermentation (**Figure 16**). Ces résultats corroborent avec ceux de **Maller *et al.*, (2011)** qui indiquent une production maximale de pectinases (PEL et PG) par la souche *A. niveus* après 96 h de culture. De même, **Mrudula et Anitharaj, (2011)** ont signalé une production optimale de la PEL et de la PG cultivés sur milieu à base de déchets d'oranges par l'*Aspergillus niger* (T: 50 °C, pH 5) après 96h de culture

La durée d'incubation est un facteur important dans la production de métabolites. Avec l'augmentation de la période d'incubation, la production d'enzymes diminue en raison de l'épuisement des éléments nutritifs du milieu de culture (**Akhter *et al.*, 2011; Singh et Mandal, 2012; Suman et Raju, 2017**).

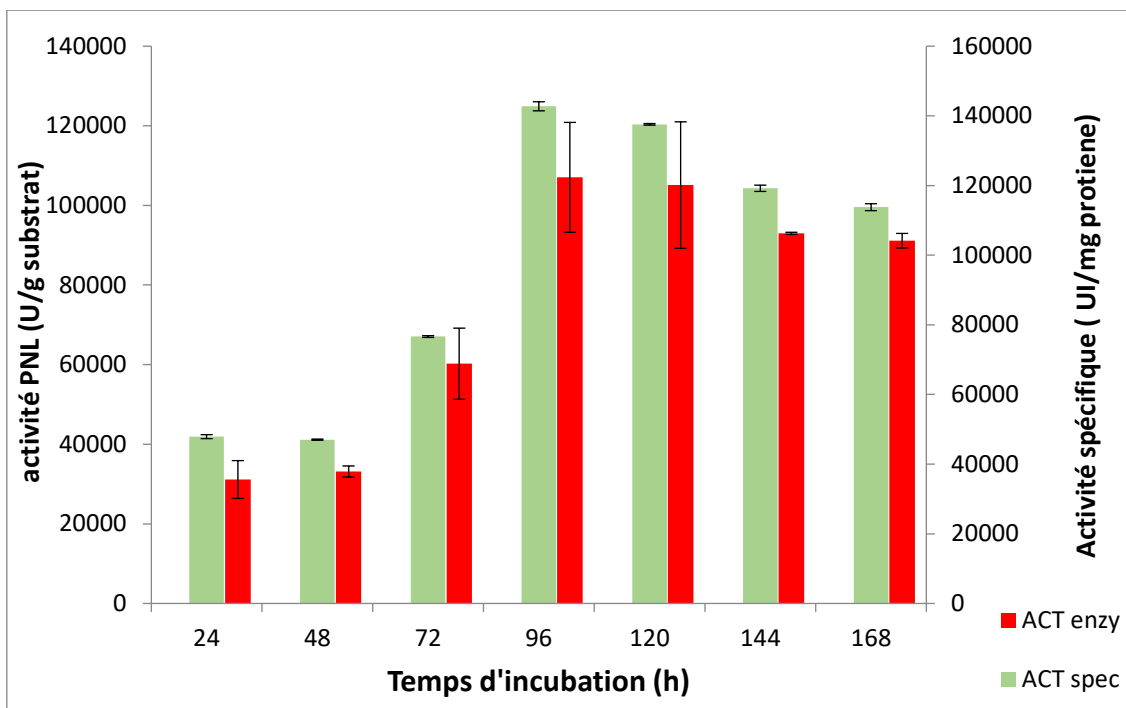


Figure 15 : Effet de la période d'incubation sur l'activité de PNL par la moisissure *A.niger*.

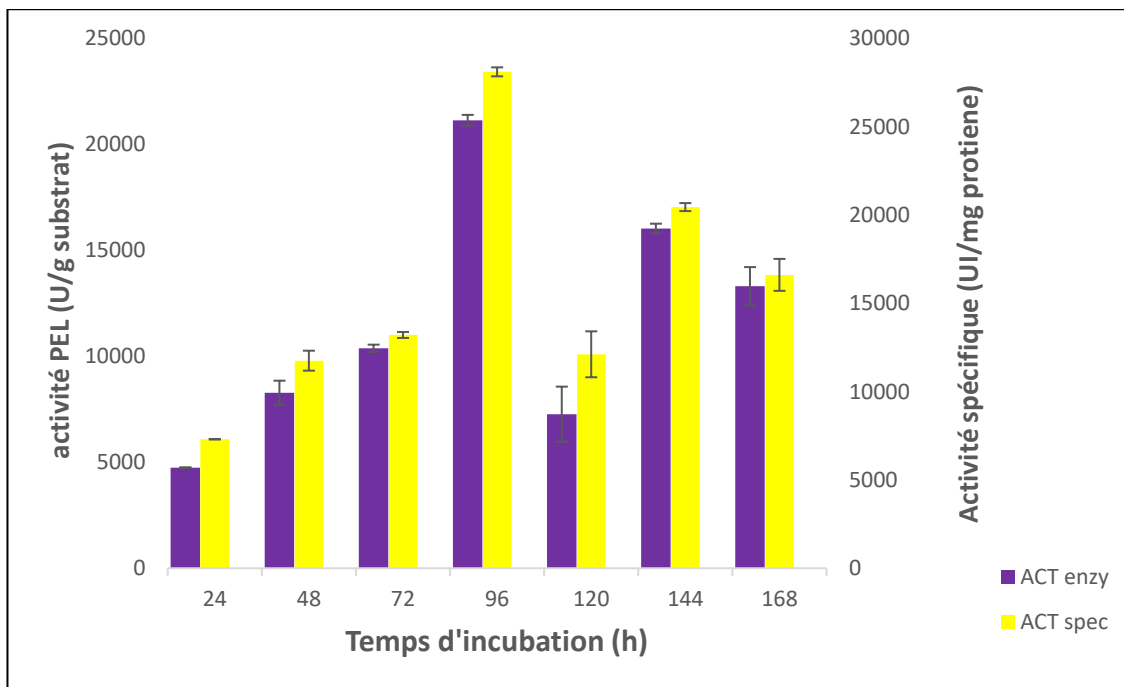


Figure 16 : Effet de la période d'incubation sur l'activité de PEL par la moisissure *A.niger*.

1.4. L'effet de la concentration de l'inoculum

Les résultats de l'effet de la concentration de l'inoculum sur les activités PNL et PEL sont représentés dans les (**Figures 17 et 18**).

Les résultats montrent que la production optimale de la PNL (31375,7198 U/ mg) et de la PEL (98333,61529 U/mg) sont obtenues avec une concentration de 10^7 spores/g de substrat.

Cette concentration d'inoculum est similaire à celle trouvée par **Abbasi et al., (2011)** qui montrent qu'une concentration de 10^7 spores/g est suffisante pour la croissance et la production de la PEL d '*Aspergillus niger*.

En effet, la concentration d'inoculum est un facteur primordial qui joue un rôle important dans la production des métabolites. Alors que la taille de l'inoculum est l'un des principaux facteurs influençant la croissance et la production de métabolique dans les cultures fongiques (**Buyukkileci et al., 2006**).

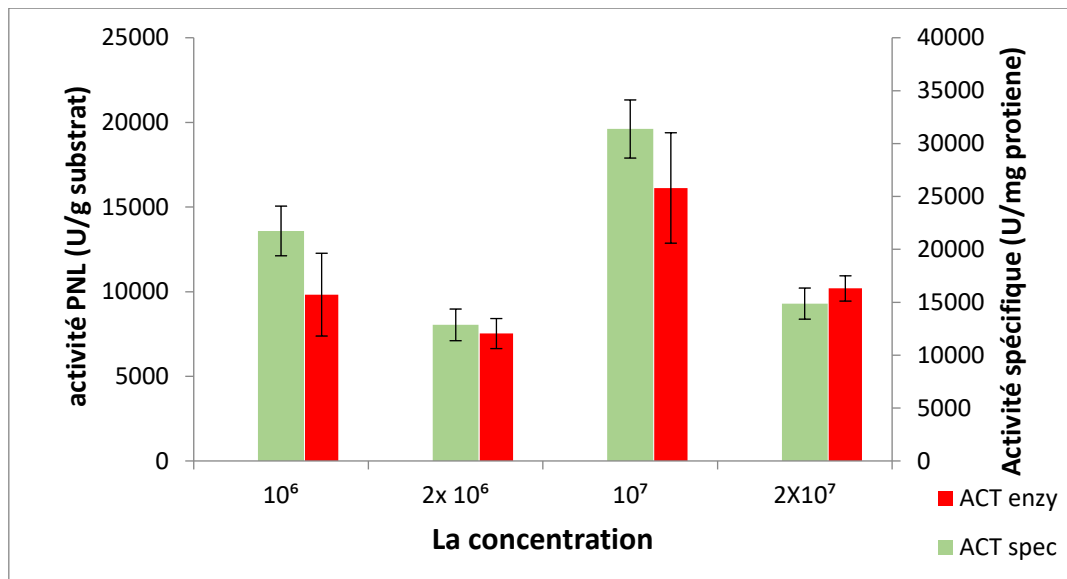


Figure 17 : Effet de concentration d'inoculum sur activité de PNL par la moisissure *A.niger*.

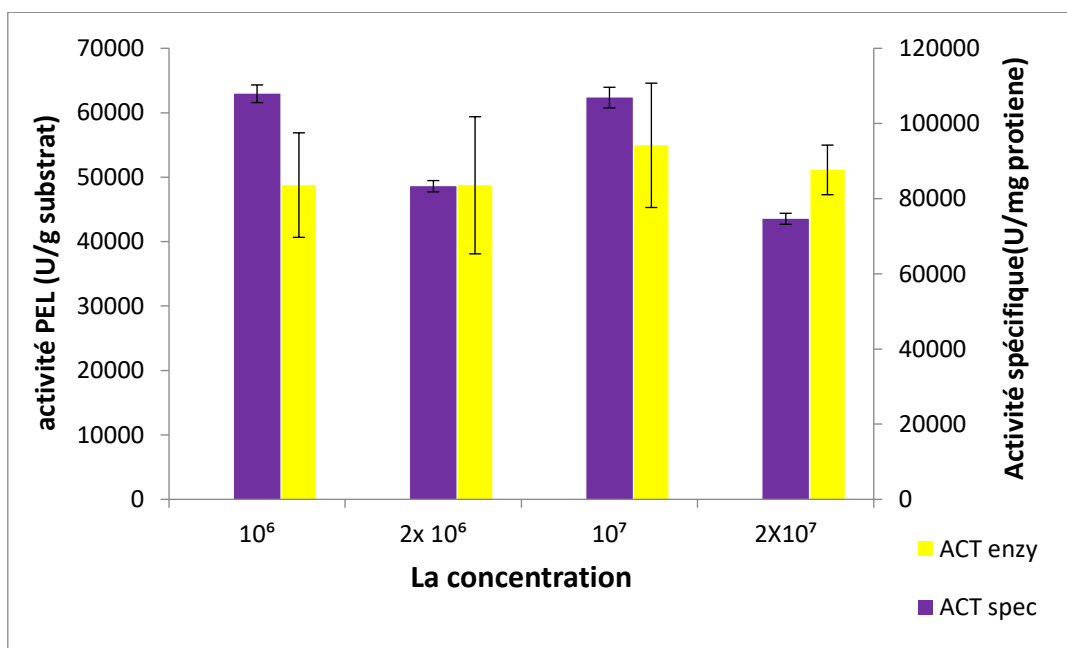


Figure 18 : Effet de concentration d'inoculum sur activité de PEL par la moisissure *A.niger*.

2. Caractérisation des lyases

2.1. Influence du pH sur l'activité des PNL et PEL

L'activité de la PNL et de la PEL est testée sur une gamme de pH comprise entre 3.0 et 12.0. Les activités relatives obtenues sont présentées dans les (**Figures 19 et 20**).

La PNL est hautement active dans une large gamme de pH, entre 4 et 12. En effet, les activités relatives dans cette zone de pH sont supérieures à 80%, avec un optimum d'activité à pH 4 où l'enzyme garde 100% de son activité relative, alors qu'elle garde 96% de son activité à pH 5 et 88% à pH 9 (**Figure 19**). Donc, la PNL est de nature acide peut être utilisé dans les applications industrielles avec une large gamme de pH où les conditions acides sont requises : industrie des jus de fruits et des vins. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus pour les PNL de *Pleurotus ostreatus* (pH 7.5), *Penicillium oxalicum* (pH 8.0) et *Aspergillus flavus* (pH 8.0) (**Mona et al., 2011 ; Yadav et Shastri, 2007; Yadav et al., 2008**).

Par ailleurs, la PEL est hautement actif dans une large gamme de pH, entre 6 et 12. En effet, les activités relatives dans cette zone de pH sont supérieures à 74%, avec un optimum d'activité à pH 10 où l'enzyme garde 100% de son activité relative (**Figure 20**). On peut donc conclure que la PEL est de nature alcaline et peut être appliquée dans divers procédés industriels : le dégommeage, le rouissage des cultures de fibres et le prétraitement des eaux usées pectiques des industries des jus de fruits, l'extraction d'huile végétale, le traitement des eaux usées de l'industrie alimentaire, la fermentation du café et du thé, la fabrication du papier et le textile (**Kashyap et al., 2001 ; Al balaa et al., 2014**) . Ces résultats sont similaires à ceux de (**Margarita et al., 2006 ; Al balaa et al., 2014**) qui montrent un pH optimum de la PEL de 10 et de 9.5 respectivement pour la souche *Bacillus subtilis*. Ces caractéristiques sont présentes dans les bactéries comme dans les champignons, ce qui augmente les domaines et les applications d'utilisés pour les pectates.

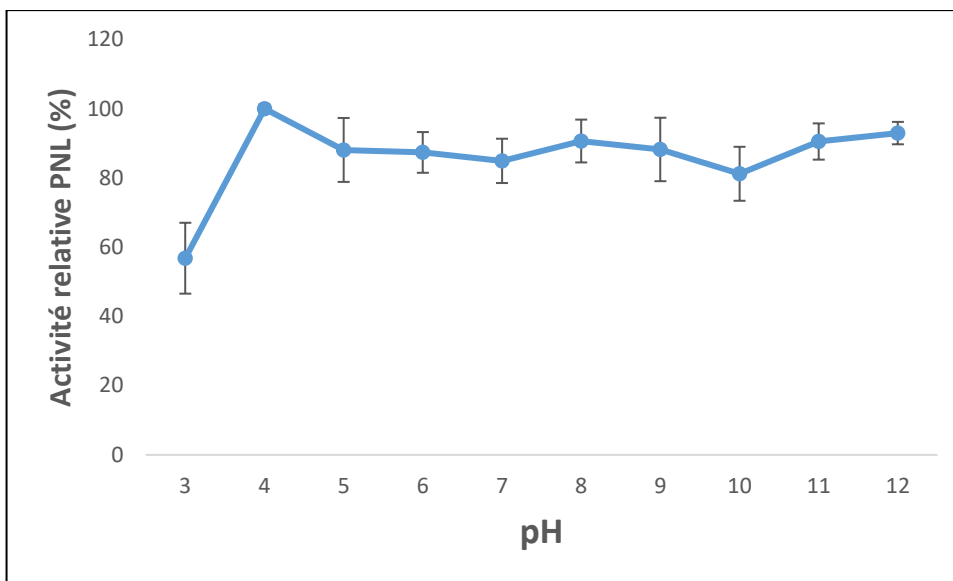


Figure 19 : Influence du pH sur l'activité enzymatique de PNL par la moisissure *A.niger*.

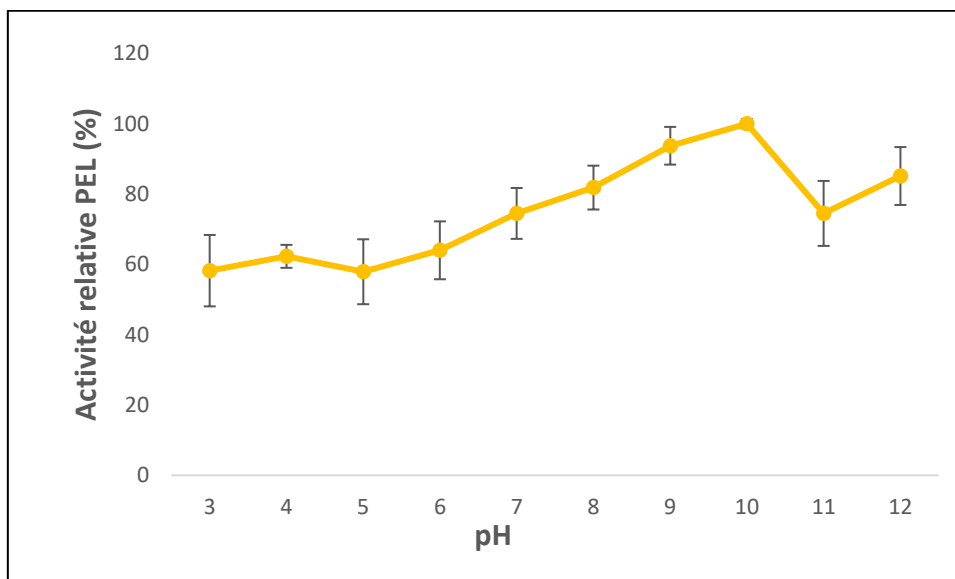


Figure 20 : Influence du pH sur l'activité enzymatique de PEL par la moisissure *A.niger*.

2.2. Influence de la température sur l'activité de la PNL et de la PEL

L'influence de la température sur les activités enzymatiques est déterminée à pH 4 pour la PNL et à pH 10 pour la PEL, à différentes températures (40°C – 100°C). Les (**Figures 21 et 22**) décrivent une augmentation importante d'activité en fonction de la température. Les activités relatives des deux enzymes (PNL et PEL) atteignent leur valeur maximale à 60°C et 80°C, respectivement. 80 à 100% de l'activité des lyases sont préservée aux températures situées entre 50 et 95°C pour la PNL et entre 70 et 90°C pour la PEL (**Figures 21 et 22**). La PNL maintient une forte activité sur une large gamme de température (de 50°C à 95°C) ou elle atteint des valeurs élevées (plus de 80% de l'activité originale est retenu), avec un pic à 60°C et elle garde 65% de son activité relative à 95°C. Ces résultats sont similaire à ceux trouvés par (**Mona et al., 2011**) qui montrent une activité maximale de la PNL à 60°C par la moisissure *Pleurotus ostreatus*. En effet, les résultats obtenus se situent dans la même plage de température de 40 à 60 ° C que celle rapportée dans la littérature pour *Penicillium italicum* *Aspergillus japonicus*, *Penicillium adamatezii*, *Bacillus subtilis* et *Aspergillus. flavus* (**Alana et al., 1991; Dinnella et al., 1994; Soriano et al., 2000 et Yadav et al., 2008**).

Cependant, l'activité PEL (**Figure 21**) a un pic à 80°C où plus de 85% de l'activité est conservée à 90°C. Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par (**Margarita et al., 2006 ; al balaa et al., 2014**) qui montrent une activité maximale de la PEL à 65°C, 60°C par la moisissure *Bacillus subtilis*.

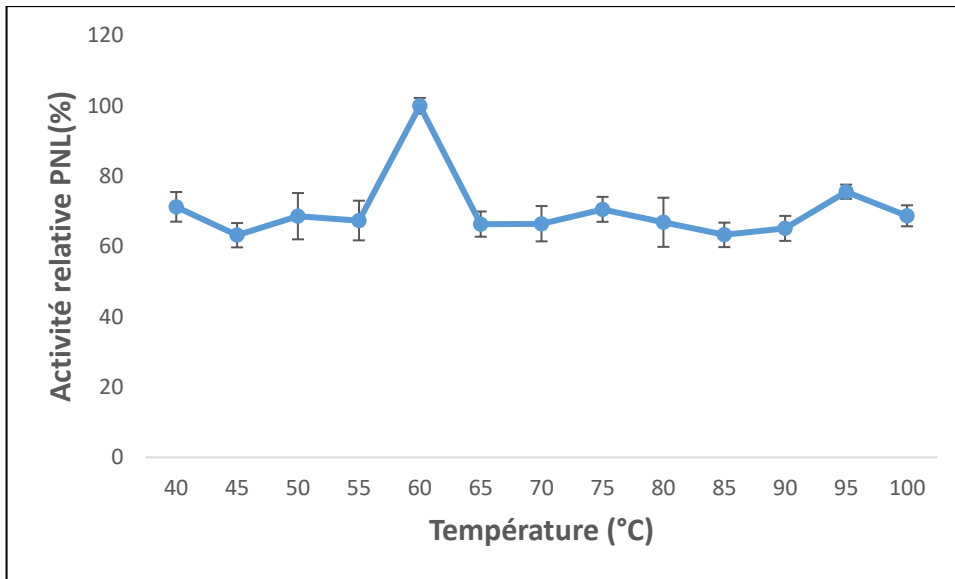


Figure 21 : Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques de PNL par la moisissure *A.niger*.

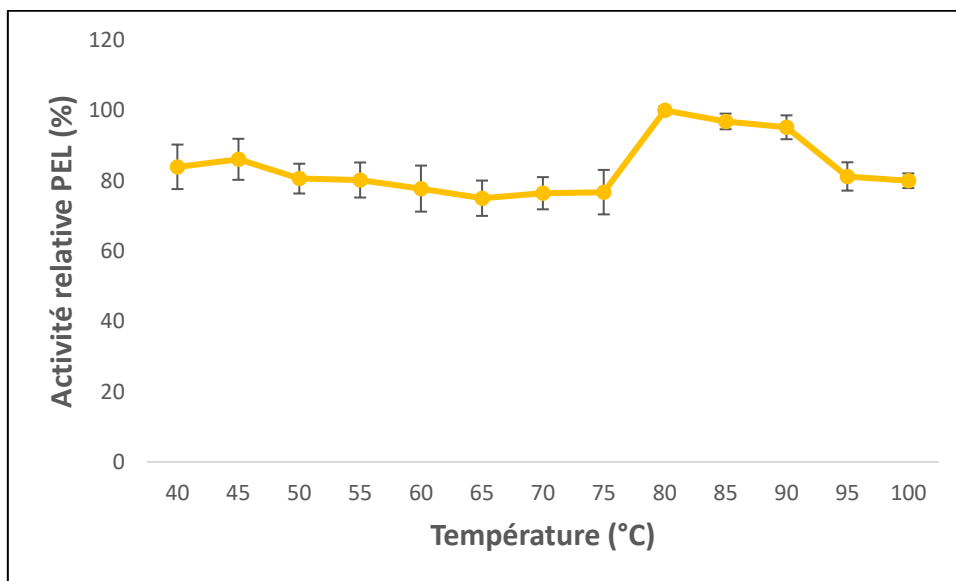


Figure 22 : Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques de PEL par la moisissure *A.niger*.

2.3. Etude de la stabilité vis-à-vis du pH

La stabilité de l'enzyme vis-à-vis du pH est une propriété biochimique très recherchée par les industriels. Pour cela, les activités pectinolytiques sont testées après l'incubation de tampons dans une gamme allant de pH 3 à 12 pendant 24 h à 4°C. Le profil de la stabilité du pH montre que les deux enzymes (PNL et PEL) sont stables sur un large intervalle de pH. PNL conserve environ 96% de son activité résiduelle à des valeurs comprises entre pH 4 et 11 (stable sur un intervalle plus large) (**Figure 23**). Le résultat obtenu dans cette étude est proche à celui trouvé par (**Mona et al., 2011**) qui montrent que la PNL produite par *Pleurotus ostreatus* conserve environ 90% de son activité à des valeurs comprises entre pH 6 et 8.5.

Par ailleurs, la PEL conservent environ 82% de son activité à des valeurs comprises entre pH 6 et 11 (stable sur un intervalle plus large) après 24 h d'incubation à 4°C (**Figure 24**). Ces résultats corroborent aux résultats de (**Israa et al., 2015 ; Zhangyong et al., 2010**) qu'indique que la PEL produite par *Fusarium oxysporum* conserve environ 85% de son activité à des valeurs comprises entre pH 6 et 10.

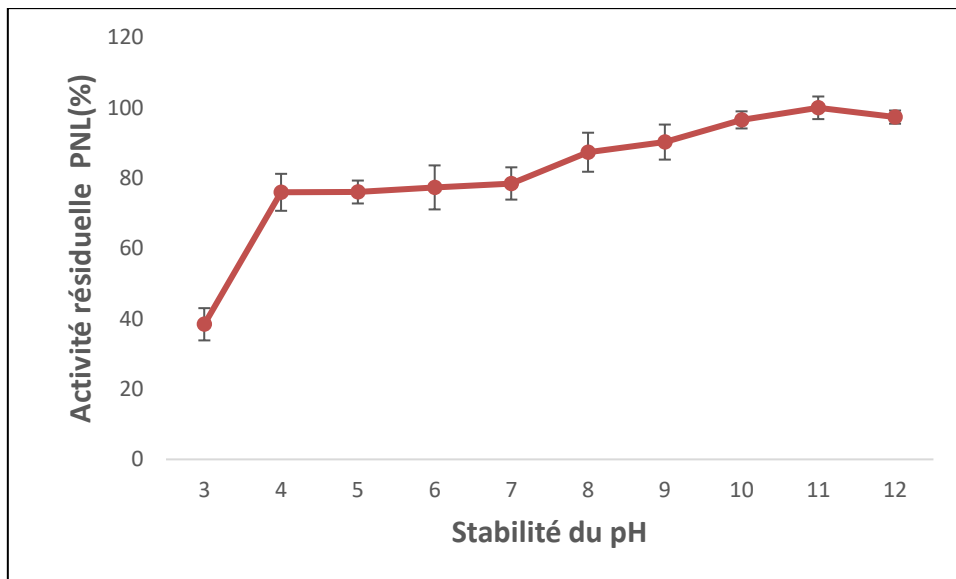


Figure 23 : Etude de la stabilité en fonction du pH de la PNL par la moisissure *A.niger*.

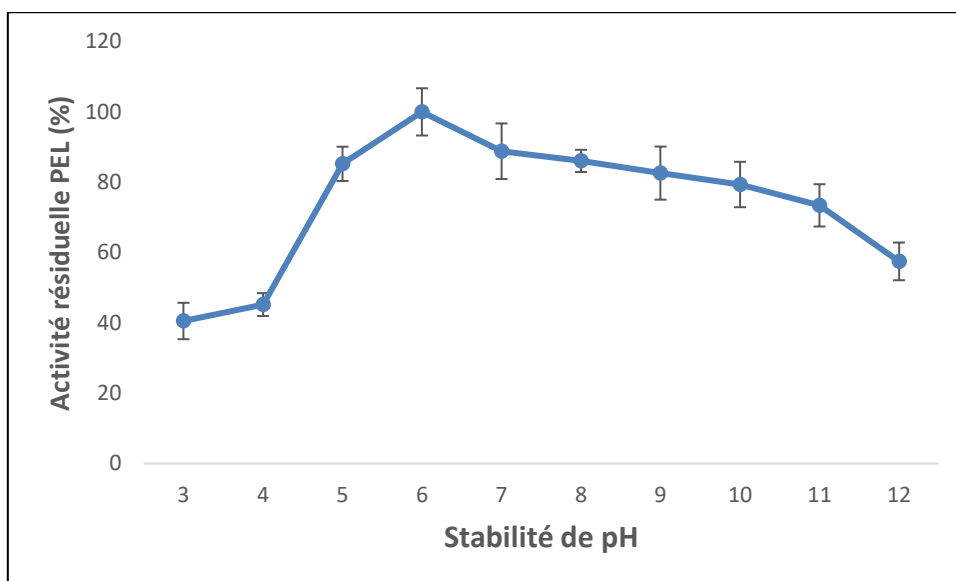


Figure 24 : Etude de la stabilité en fonction du pH de la PEL par la moisissure *A.niger*.

2.4. Etude de la thermostabilité des (PNL, PEL)

L'étude de la stabilité de la température des enzymes produites par la moisissure *Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma est testée après un traitement thermique d'une durée de 3 heures de l'extrait enzymatique à quatre températures différentes : 60, 70, 80 et 90°C.

La PNL est stable à 60, 70, 80 et 90°C après une heure et deux heures de traitement thermique avec une demi-vie de 170 min, 140 min, 130 min et 120 min respectivement. Cependant, Après trois heures d'incubations l'activité totale retenue de la PNL est de 27% à 60°C, 27.08% à 70°C, 24.9% à 80°C et 23.5% à 90°C (**Figure 25**). Ces résultats sont proche à ceux trouvés par (**Mona et al., 2011**) pour *Pleurotus ostreatus* montrant une stabilité de PNL à 60°C pendant 1 heure.

La PEL est aussi stable à 60 -70°C après 3h de traitement thermique, cependant elle ne retient que 31% de son activité totale à 80°C après 2h et 27% à 90°C après 1h d'incubation de son activité initiale avec une demi-vie de 80 min et 50 min respectivement (**Figure 26**). Ces résultats sont différents à ceux obtenus par (**Yan et al., 2018**), qui montrent la PEL produite par *Paenibacillus polymyxa* est stable à 40-60 °C, mais perdait 50% de son activité initiale après une incubation à 70 ° C après 1 h.

Il est a noté que les enzymes pectinolytiques thermostables ont un grand potentiel dans les processus industriels tels que l'industrie alimentaire, l'industrie de textile et la papeterie (**Garg et al., 2016**). Cependant, pour une utilisation industrielle, des températures modérément élevées s'avèrent avantageuses car, à des températures élevées, des mélanges d'oligomères insaturés peuvent être générés à partir de substrats de pectine (**Seyedarabi et al., 2010**). Ces différents résultats s'expliquent probablement par l'influence de la nature de l'habitat qui oblige le microorganisme de s'adapter aux conditions extrêmes et à l'enzyme qui doit acquérir sa stabilité structurale, soit à une glycosylation excessive (**Vieille et Zeikus, 2001**), soit à la présence de certaines liaisons dans leurs structures tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques et ponts disulfures) (**Kumar et al., 2000b ; Sedlak et al., 2001 ; Vieille et al., 2001 ; Mallick et al., 2002 ; Roovers et al., 2004**), de ponts salins et les cofacteurs (**Vieille et al., 2001**). Les éléments déterminés par des séquences particulières en acides aminés située à des endroits stratégiques, ont participé certainement au maintien de la structure spatiale de l'enzyme malgré les traitements thermiques subis.

Par ailleurs, il a été montré aussi que la richesse en paires de base CG des mRNA des protéines affecte énormément leur thermo stabilité (Farias et Bonato, 2003; Trivedi et al., 2006).

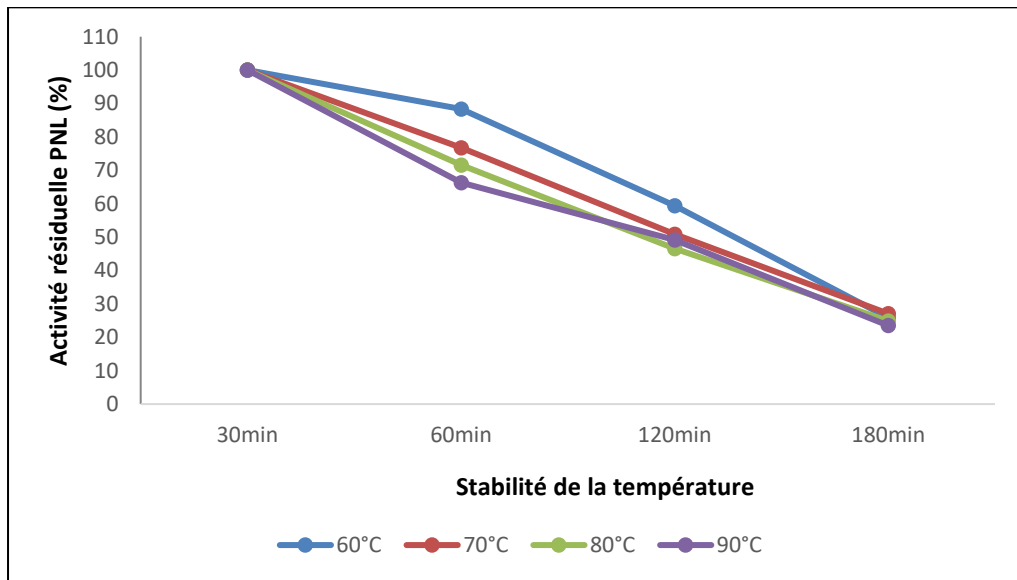


Figure 25 : Etude de la thermostabilité de la PNL à différentes températures par la moisissure *A.niger*.

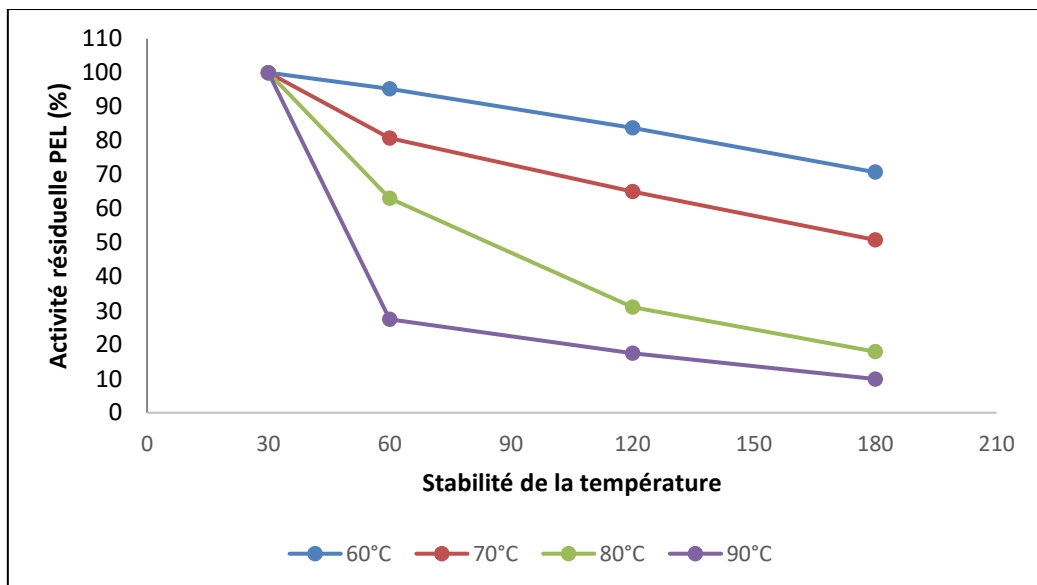


Figure 26 : Etude de la thermostabilité de la PEL à différentes températures par la moisissure *A.niger*.

2.5. Effet des ions métalliques sur l'activité des PNL et PEL

L'effet de différents cations permet entre autre de fournir des indices sur la structure de l'enzyme mais également sur les facteurs essentiels à son activité. L'étude de l'effet des ions métalliques bivalents sur les deux activités pectinolytiques est présentée dans la (**Figure 27**).

L'activité de la PNL n'est pas influencée par l'addition d'ions tels que le magnésium (Mg^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}). Ces résultats ne sont pas identiques à ceux obtenues par (**Mona *et al.*, 2011 ; Yadav *et al.*, 2009**) montrant l'effet inhibiteur de ces deux ions. Cependant une activation est constatée en présence des ions de calcium (Ca^{2+}), Baryum (Ba^{2+}), (Cd^{2+}) et en présence aussi de l'EDTA, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par (**Danielle *et al.*, 2014**).

De l'autre côté, l'activité de PEL est légèrement augmentée avec le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}), le Cadmium (Cd^{2+}), et le Baryum (Ba^{2+}), ce résultat est similaire à ce que obtenu par (**Yan *et al.*, 2018 ; Bijay *et al.*, 2016**). Tandis que, l'activité de PEL n'est pas influencée par (Mn^{2+}). Une inhibition de cette activité est obtenue avec l'EDTA. Cela est du même obtenu par (**Viviani *et al.*, 2010 ; Bijay *et al.*, 2016**).

Les ions métalliques affectent les résidus d'acides aminés sur le site actif et à l'extérieur induisant des altérations de la charge et une perte de l'activité catalytique (**Guimarães *et al.*, 2009**). L'augmentation de l'activité des pectinases en présence de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} et Cd^{2+} suggère que les ions métalliques exercent un effet protecteur sur l'enzyme, jouant ainsi un rôle vital dans le maintien de conformation active à des températures élevée (**Mukhopadhyay *et al.*, 2013**). En outre, l'EDTA, inhibe l'activité de la PEL, avec une perte de 41% de son activité résiduelle. Ce résultat indique que la PEL est une métallo enzyme à calcium (**Figure 26**).

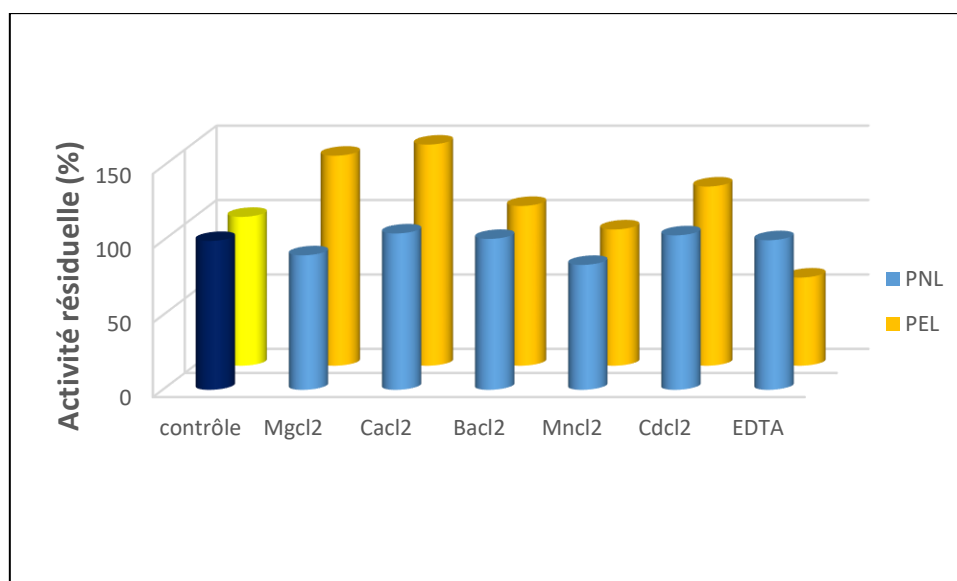


Figure 27 : Effet de différents ions métalliques sur les activités de la PNL et PEL par la moisissure *A.niger*.

2.6. Etude des paramètres cinétiques des PNL et PEL

Les deux enzymes PNL et PEL présentent une cinétique classique de Michaelis–Menten avec la pectine et l'acide polygalacturonique (APG) respectivement comme substrat. La représentation graphique de Lineweaver et Burk (**Figure 28 et 29**) permet de déterminer les paramètres cinétiques (K_m , V_{max}) pour les deux enzymes. Les valeurs de K_m et de V_m pour l'hydrolyse de l'APG sont respectivement de 5,10 mg/ml et de 1000 UI pour la PEL. Pour la pectine les valeurs de K_m et de V_m sont respectivement de 5,83 mg/ml et de 1428.5 UI pour la PNL. La faible valeur de K_m des deux enzymes suggère une meilleure affinité pour le substrat.

On remarque que La valeur de K_m 5,10 mg/ml pour la PEL qui trouvée dans cette étude est supérieure à celui obtenu par (**Li et al., 2010**) qui montre que la valeur de la PEL de *Bacillus licheniformis* est 3.32 mg/ml. D'autre part la valeur de K_m 5.83 mg/ml trouvée pour la PNL est proche aux PNL d'*A.niger* ($k_m= 5.2$ mg/ml) (**Poturcu et al., 2016**) et inférieur à celle trouvé par (**Safinur et al. 2014**) aux PNL de *Geobacillus pallidus* p26 ($k_m=24.8$ mg/ml).

En ce qui concerne la vitesse maximale (V_m) indicatrice sur l'état de l'activité catalytique d'une enzyme, il est souhaitable qu'elle soit la plus élevée possible. La valeur de v_m de la PEL qui trouvée dans cette étude (1000 UI) est supérieure aux PEL de (**Margarita et al., 2006**), qui indique que la $V_m=256,7$ UI. D'autre part la valeur de v_m de la PNL ($V_m=1428.5$ UI) est supérieur à celle trouvé par (**Poturcu et al., 2016**) montrant $V_m= 0.2$ UI.

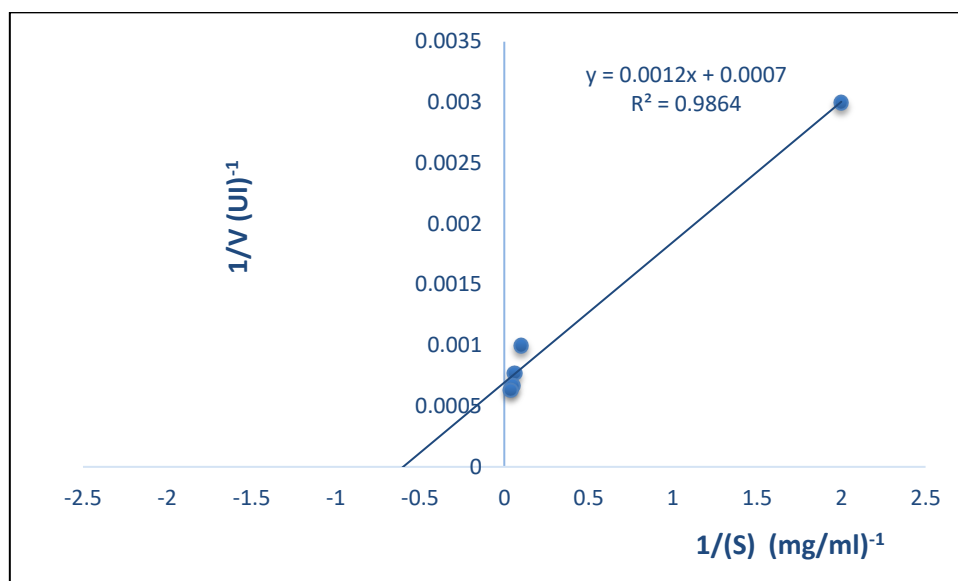


Figure 28 : Représentation de Lineweaver-Burk de la PNL par la moisissure *A.niger*.

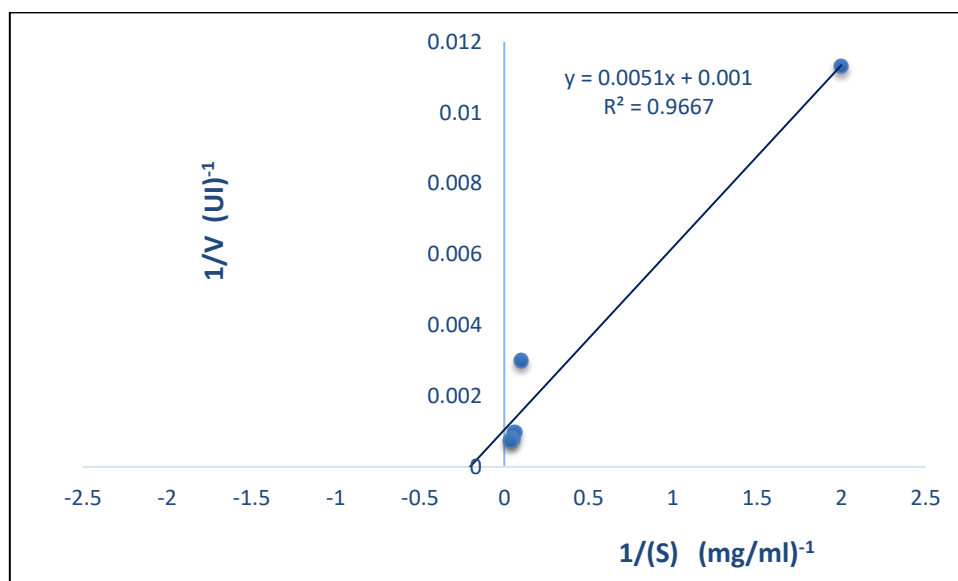


Figure 29 : Représentation de Lineweaver-Burk de la PEL par la moisissure *A.niger*.



Conclusion

L'objectif principal de cette étude est la recherche de nouvelles enzymes avec des propriétés différentes vis-à-vis du pH et de la température pour une utilisation éventuelle.

La moisissure *Aspergillus niger* a été cultivée sur un milieu de fermentation solide, ou on a utilisé le son de blé comme substrat naturel pour la croissance de la moisissure et la production des enzymes.

Un taux d'humidité de 60% donne la meilleure production des deux enzymes avec une activité spécifique de 167437,601 U/mg pour la PNL et 110654,4U/mg pour la PEL.

Un taux d'inoculum de 10^7 spores/g de substrat s'avère la meilleure concentration avec une activité spécifique de 31375,7198 U/ mg PNL et de 98333,61529 U/mg PEL.

Une période de 96h et une température de 45°C permettent une meilleure production des lyases avec une activité spécifique de 136072,853 U/mg PNL et 28115,4122 U/mg PEL ; 17061,2466 U/mg PNL 21610,911 U/mg PEL respectivement.

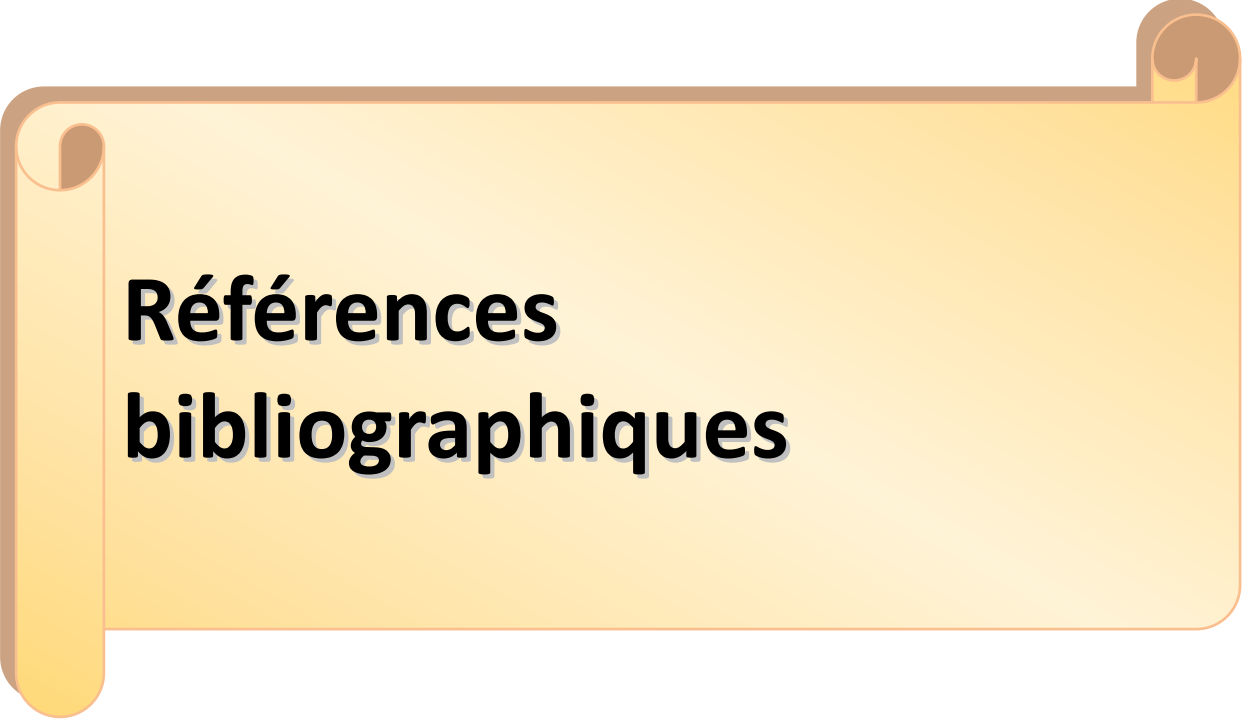
L'étude des propriétés physico-chimiques des deux enzymes (extrait brut) montre que la PNL a une activité optimale à 60°C et un pH optimum de 4.0 alors que la PEL possède une température optimale de 80°C et un pH optimum de 10.0. Ces deux paramètres sont favorables à l'utilisation de ces lyases dans plusieurs secteurs industriels: industrie agroalimentaire, procédés de fabrication du papier et du textile. L'étude de la stabilité des deux enzymes a montré une bonne stabilité entre pH 4-11 pour la PNL et entre pH 6-11 pour la PEL. Les traitements thermiques respectivement de 3 h à 60°C, 70°C, 80°C et 90°C indiquent que la PNL a montré une bonne stabilité thermique après 2h d'incubation, à 60 °C, 70°C, 80°C et 90°C avec des demi-vies de 170 min, 140 min, 130 min et 120 min respectivement. La PEL a montré une bonne stabilité thermique après 3h d'incubation, à 60 °C et 70°C avec une demi-vie de 80 min à 80°C et de 50 min à 90 °C après 3 h d'incubation aux mêmes températures.

Les cations Ba^{2+} , Ca^{2+} et Cd^{2+} stimulent les deux activités de PNL et PEL, alors que Mg^{2+} et ont un effet activateur uniquement sur PEL. Ces enzymes ne sont pas influencées par l'activité de Mn^{2+} . En revanche, l'EDTA a des effets diamétralement opposés. Celui-ci entraîne une perte de 41% de l'activité résiduelle de la PEL ; nous sommes donc en présence d'une métalloenzyme a calcium.

Les paramètres cinétiques des deux enzymes sont déterminés: les K_m respectives de la PNL et de la PEL sont 5.83 mg/ml et 5.10 mg/ml. Les V_{max} ont pour valeur de 1428.5 UI (PNL) et 1000 UI (PEL).

Finalement, les différents résultats obtenus au cours de ce travail sont très encourageants et méritent d'être approfondis par :

- ❖ L'optimisation par des plans d'expériences des paramètres de production de la PNL et de la PEL.
- ❖ Une séparation et purification de la PNL destinée à IAA.
- ❖ Tester d'autres déchets agro-alimentaires.
- ❖ Application des enzymes comme extraction d'huile d'olive.



Références bibliographiques

- Abarca L. M., Francesc A., José C., and Cabañes J. F. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek Kluwer, Academic Publisher*, 86: 33-49.
- Abbott DW., Boraston AB. (2008).** Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(2):301
- Abidi F., Limam F., Nejib M.M. (2008).** Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials : assay as biodetergent. *Process Biochem.* 43 : 1202-1208.
- Aftab A., Singh A., et Ward O.P. (2007).** Chymostatin can combine with pepstatin to eliminate extracellular protease activity in cultures of *Aspergillus niger* NRRL-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 34: 165-169.
- Aguilar C. N., Gerardo G.-S., PLilia A., Raul R.-H., José M.-H., and Juan C.-E. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (4): 354-366.
- Akhter N., Morshed M.A., Uddin A., Begum F., Sultan T. et Azad A.K. (2011).** Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state fermentation. *International Journal of Biosciences.* 1(1): 33-42.
- Alaña A., Alkorta I., Domínguez JB., Llama MJ., Serra JL. (1990).** Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl Environ Microbiol.* 56 (12): 3755-9.
- Alana A., Maria JL., Serra JL (1991).** Purification and some properties of pectin lyase from *Penicillium italicum*. *FEBS* 280:335–340 Albersheim P (1966) Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol* 8:628–631.
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse., A., Duchiron, F. (2011).** Yeasts: An Attractive Source of Pectinases—From Gene Expression to Potential Applications: A Review. *Process Biochemistry*, 46, 1525-1537.
- Alkorta I., Gabirsu C., Lhama MJ., Serra JL. (1998).** Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Proc Biochem.* 33: 21-8.
- Allah Antoine Assamoi., Jacqueline Destain., Philippe Thonart. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009 13(2), 281-294.

- Albersheim P., Killias U. (1962).** Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Arch Biochem Biophys.* 97:107–115.
- Anand G., Yadav S, Dubey A K., Yadav D. (2014).** Molecular biology of microbial polygalacturonases: A review. In *Recent developments in Biotechnology* (Guest Editor: Rupinder Tewari; Executive Editor: J.N Govil), Studium Press, USA, pp 1–29 (ISBN:1-62699-018-2)
- Antoine, C., Lullien Pellerin, V., Abecassis, J., & Rouau, X. (2002).** Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. *Sciences des Aliments.* 22, pp. 10.
- ASSAMOI, Allah. (2009).** Antoine, DESTAIN, Jacqueline, THONART, Philippe. Aspect microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* [en ligne], , vol. 13, n°2, p. 281-294.
- Bakhtiari M.R., Faezi M.G., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N. et Amidi Z. (2006).** Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011. *Process Biochemistry.* 41: 547-551.
- Barnali R. B., Ajit B. K. and Manas D. (2008).** Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:449–455.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., and Christen P. (2003).** Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38: 881-896.
- Benamrouche, S., Cronier, D., Debeire, P., & Chabbert, B. (2002).** A chemical and histological study on the effect of beta-endo-xylanase treatment on wheat bran. *Cereal Science.* 36 (2), pp. 7.
- Bleichrodt, R., Vinck, A., Krijghsheld, P., Van- Leeuwen, M.R., &Wösten, H. A. B. (2013).**Studies in mycology 74, cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymont P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson, Paris*
- Botton B., Breton A., Febre M., Goutier S., Gay Pl., Larent J., Reymont P.,Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissure utile et nuisibles, importance industrielles 2eme édition. P.419.35.
- Bouchet P., Guignard J. L., Pouchus Y. F. and Villard J. (2005).** Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée. 2ème Ed MASSON, Paris, P.191.

- Brakhage Axel A., Jahn B. and Schmidt A. (1999).** *Aspergillus fumigatus*: biology, clinical aspects, and molecular approaches to pathogenicity, Volume 2, Ed KARGER, P. 221.
- Bourdeau, A. and G. Ménard. (1992).** Le blé, éléments fondamentaux et transformation. Laval, Les Presses de l'Université de Laval.
- Bugbee, W. M. (1990).** Purification and characteristics of pectin lyase from *Rhizoctonia solani*. Mol. Plant Pathol., 36, 15-25.
- Buyukkileci AO., Hamamci H., Yucel M. (2006).** Lactate and ethanol productions by *Rhizopus oryzae* ATCC 9363 and activities of related pyruvate branch point enzymes. J Biosci Bioeng 102:464–466.
- Chabasse D., Guiguen C., and Contet-Audonneau N. (1999).** Mycologie médicale. Ed MASSON, Paris, P. 320.
- Chabasse D., Bouchara JP., De Gentile L., Cimon B., Brun S., Penn P. (2002)** .Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, , n°25, EGOPRIM éd., Paris, 189 p.
- Chen, W.C., H.J. Hsieh., and T.C. Tseng. (1998).** Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium splendens* infected cucumber fruits. Bot Bull ACad Sin., 38: 181-186.
- Combo M., Aguedo M., et Paquot M. (2011).** Les oligosaccharides pectiques : production et applications Possibles. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15, 153-164.
- Couto S. R., and Sanromán Á. M. (2006).** Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of food Engineering*, 76: 291-302.
- Darah Ibrahim., Nor-Hawani Salikin., Lim Sheh Hong., Rosma Ahmad., and Haritharan Weloosamy. (2013).** Pomelo peels as alternative substrate for extracellular pectinase production by *Aspergillus niger* HFM-8. Malaysian Journal of Microbiology. pp.308-316
- Demain A. L., and Davies J. E. (1999).** Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2ème Ed American Society for Microbiology Press, Washington, P.810.
- Demir H., Tari C. (2016).** Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agroindustrial waste, via solid-state fermentation. Journal of Science of Food and Agriculture. 96: 3575-3582.
- De Vries R.P., & Visser J. (2001).** *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65,497-522.

- Dinu D., Nechifor MT., Stoian G., Costache M., Dinischiotu A. (2007).** Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol.* 131: 128-37.
- Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z. et Bennamoun L. (2006).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering.* 73: 190-197.
- Dijksterhuis, J., Wösten, H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. Studies in mycology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, an institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- Durand A., (1983).** Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de micro-organismes filamenteux. Les antagonismes microbiens. 24ème colloque SFP. Ed. INRA Pub.
- E. Schuster N., Dunn-Coleman J. C., Frisvad P. W., M. van Dijck. (2002) :** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 59:426–435.
- Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu B. (2002).** Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* 38: 615-/620.
- Fantana C. R., Salvador S., and Monra da Silveira M. (2005).** Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 371-377.
- Fang Y. et al., (2008).** Calcium binding behavior of polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Polymeric Carbohydrates*, 72, 334-341.
- Farias S T., Bonato M C. (2003).** Preferred amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *J Mol Biol.* 309: 835-843.
- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. & VniegraGonzalez G. (2006).** Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 221-227.
- Feuillet., P. (2000).** Le grain de blé : composition et utilisation. 1st ed. Paris: INRA. Garceau, J. J. (1989). 'Blanchiment des pâtes à haut rendement'. In: Association canadienne des pâtes et papiers (ed), *Pâtes mécaniques et chimico-mécaniques*. Canada: pp. (201-236).
- Francis., COPINET., Estelle. (2011)** Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur* [en ligne]. 10 mai. Référence BIO620.

- Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R. (2016).** Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6:47. DOI 10.1007/s13205-0160371-4.
- Guevara, M. A., Gonzalez-Jaen, M. T., and Estevez, P. (1996)** *Prog. Biotechnol.*, 14, 747-760.
- Guimarães, L. H. S., Somera, A. F., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M., & Jorge, J. A. (2009).** *Process Biochemistry*, 44, 237–241.
- Gummadi, S.N., Manoj, N., Kumar, D.S. (2007).** Structural and Biochemical Properties of Pectinases. In *Industrial Enzymes*; Polaina, J., MacCabe, A.P., Eds.; Springer: Heidelberg, pp. 99-115.
- Gummadi SN., Kumar DS. (2006).** Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: a statistical approach. *Biochem Eng J* 30: 130-7.
- Gervais P., & Benssousan M. (1994).** Solid-state fermentation of the genus *Aspergillus*. *Plenum. Press, New Y.*
- Hayashi, K., Inoue, Y., Shiga, M., et al. (1997)** Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03±01173. *Phytochemistry* 45, 1359±1363.
- Heitman J., Kronstad J. W., John T. W. and Casselton L. A. (2007).** Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. Ed ASM Press (American Society for Microbiology), USA, P. 542.
- Hemery., Youna., Rouau., Xavier., Lullien-Pellerin., Valérie., Barron., Cécile., Abecassis., Joël. (2007).** Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science* [en ligne], novembre, vol. 46, n°3, p. 327- 347. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.008>.
- Herron .S.R., J.A. Benen., R.D. Scavetta., J. Visser, F., Journak. (2000),** Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 8762–8769.
- Holker., Udo., Lenz., Jürgen. (2005).** Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* [en ligne], juin 2005, vol. 8, n°3, p. 301-306.
- Hölker U., Höfer M. and Lenz J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 64: 175-186.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. (2002).** Microbial Alkaline Pectinases and their Industrial Applications: A Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 59, 409-418.

- Ikram-Ul-Haq., Hamid M., Sunila D., Sikander A., and Qadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology*, 2: 30-36.
- Iqbal, H. M. N., Asgher, M., & Bhatti, H. N. (2011).** Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *BioResources*, 6(2), 1273e1287.
- Iwashita K. (2002).** Recent studies of protein secretion by filamentous fungi review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 530-535.
- Ishii, S., and Yokotsuka., T. (1975)** *Agric. Biol. Chem.*, 39, 313-321.
- Jarai G., et Buxton F. (1994).** Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*. 26: 238-244.
- Javed, M. M., et al. (2012).** "Wheat Bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications." *African Journal of Microbiology Research* 6(4): 724-733.
- Javed, M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S.A.I., Aftab, M.N & Ul-Haq., I. (2012).** Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research*, 6, pp. 9
- Jayani RS., Saxena S., Gupta R., (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem* 40: 2931-44.
- Kashyap DR., Vohra PK., Tewari R. (2001).** Application of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol*; 77: 215-27.
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A. and Tewari, R. (2000)** Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 277±282.
- Klug-Santner BG., Schnitzhofer W., Vrsanská M., et al. (2006).** Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *J Biotechnol*; 121: 390-401.
- Kobayashi T., Hatada Y., Higaki N., et al (1999).** Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochim Biophys Acta*; 1427: 145-54.
- Koji, Y., Wang, L., Makoto, M., Kazuko, N. (2001).** Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters* .,(200),241-246.
- Kozakiewicz Z. and Smith D. (1994).** Physiology of *Aspergillus*, In: Smith J.E. (eds.) *Biotechnology Handbooks (Vol.7) Aspergillus, Plenum press, New York*, p 23-40.

- Kumar, P., & Suneetha, V.** Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme int. J. Drug Dev. Res, 6, 109-118.
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., Lugtenberg, B. J., and Bloemberg, G. V. (2002).** Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. Mol. Plant Microbe In. 15:172–179.
- Levigne S. et al., (2002).** Determination of methylation and acetylation levels of pectin using a C18 column and an internal standard. Food Hydrocolloids, 16, 547-550.
- Li G., Rao L., Xue Y., Zhou C., Zhang Y., Ma Y. (2010):** Cloning, expression, and characterization of a highly active alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. J Microbiol Biotechnol, 20(4):670–677.
- Lineweaver H., and Burk D. (1934).** The determination of enzyme dissociation constants. Journal of the American Chemical Society, 56:658–666.
- Mahadik N. D., Puntambekar U. S., Bastawde K. B., Khire J. M. and Gokhale D. V. (2002).** Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 38 (5): 715-721.
- Maller A., Dama'sio ARL., Silva TM., Jorge JA., Terenzi HF., Polizeli MLTM. (2011)** Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enz Res.* doi:10.4061/2011/ 289206.
- Maller A., da Silva TM., Dama'sio ARL, Hirata IY., Jorge JA., Terenzi HF., Polizeli MLTM. (2013)** Functional properties of a manganese- activated exo-polygalacturonase produced by a thermotolerant fungus *Aspergillus niveus*. *Folia Microbiol* 58:615–621. Doi:10.1007/s12223-013-0249-3.
- Mallick P., Broutz D R., Eisenberg D., Yeates T O. (2002).** Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99: 9679-9684.
- Margarita Soriano., Pilar Diaz and Francisco I., Javier Pastor. (2006).** Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin *Microbiology*, 152, 617–625.

- Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P., and Cooper, P. E. 1996.** Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis.* 80:1336–1342.
- Masayuki M., and Katsuya G. (2010).** *Aspergillus: molecular biology and genomics.* Ed Caister Academic Press, Norfolk (England), P. 238.
- McKevith., B. (2004).** Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin.* 29, pp. 31.
- Monsalve-Gonzalez, A., Lloyd, E.M, Prakash, A., Valanju, S., & Roufs, J.G. (2005).
- Meyer A., Deiana J. and Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed Doin, P. 430.
- Mhetras N.C., Bastawde K.B. et Gokhale D.V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology.* 100: 1486-1490.
- Mizunaga S., Kamiyama T., Fukuda Y., Takahata M., Mitsuyama J. (2005).** Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 56:91- 6.
- Mona M., Rashad., 1Hala M., Abdou., 2Wafaa GH., Shousha, 2Mona M., Ali and 1Neveen N., El-Sayed. (2011).** Purification and Characterization of the Pectin Lyase Produced by *Pleurotus ostreatus* Grown on Lemon Pulp Waste. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences,* 5(8): 1377-1384.
- Morozova VV., Semenova MV., Salanovich TN., et al. (2006).** Application of neutral-alkaline pectate lyase to cotton fabric boil off. *Appl Biochem Microbiol;* 42: 603-8.
- Mukhopadhyay .A., N. Dutta., D. Chattopadhyay., K. Chakrabarti. (2013),** Degumming of ramie fiber and the production of reducing sugars from waste peels using nanoparticle supplemented pectate lyase, *Bioresour. Technol.* 137 202–208.
- Nakagawa, T., T. Nagaoka., T. Miyaji and N. Tomizuka. (2005).** A cold active pectin lyase from psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain ppy-1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42: 193-196.
- Namoodiri V. M., and Chattopadhyaya R. (2000).** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids,* 35 (5): 495-502.
- Niture SK. (2008).** Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia* 63(1):1–19

- Ortega N., De Diego S., Rodriguez-Nogales JM., Perez-Mateos M., Busto MD. (2004).** Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectin lyase used in food processing. *Int J Food Sci Technol* b; 39: 631-9.
- Pasqualotto A. C. (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science & Business Media, New York, P. 1027.
- Patil S. R., and Dayanand A. (2006) b.** Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, 97 (18): 2340-2344.
- Papagianni M., Joshi M. and Moo-Young M. (2002).** Comparative studies on extracellular protease secretion and glucoamylase production by free and immobilized *Aspergillus niger* culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 259-263.
- Papagianni M., Moo-Young M. (2002).** Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochem* 37:1271–1278.
- Pazouki M., Panda T. (2000).** Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess Eng* 22:127–143.
- Pedrolli DB. (2008).** Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus*. M.Sc. Thesis, São Paulo State University, Rio Claro, São Paulo, Brazil.
- Pedrolli DB., Carmona EC. (2014)** Purification and characterization of a unique pectin lyase from *Aspergillus giganteus* able to release unsaturated monogalactouronate during pectin degradation. *Enzyme Research Article ID 353915:1–7*
- Pitt D.** Pectin Lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Methods Enzymol* (1988); 161: 350-4.
- Pitt, J.I. (1979).** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, U.K. p.324.
- Pilnik, W., & Rombouts, F.M. (1981).** Pectic enzymes. In *Enzymes and Food Processing*. (Birch, G.G., Blakebrough, N. & Parker, K.J., eds), pp. 105–128, Applied Science Publishers Ltd., London, UK.
- Pomeranz, Y. (1988).** Chemical composition of kernel structures. In: *Wheat: chemistry and technology*. 1st ed. pp. 97-158.
- Poturcu1, K., Ozmen1, I Biyik2, H.H. (2016).** Characterization of an Alkaline Thermostable Pectin Lyase from Newly Isolated *Aspergillus niger*_WHAK1 and Its Application on Fruit Juice Clarification. *Arab J Sci Eng*. DOI 10.1007/s13369-016-2041-6.

- Prade, R.A., Zhan, D., Ayoubi, P., and Mort, A.J. (1999)** Pectins, pectinases and plant±microbe interactions. *Biotechnology and General Engineering Review* 16, 361±391.
- Preston, J.F., Rice, J.D., Ingram, L.O., and Keen, N.T. (1992).** Differential depolymerization mechanisms of pectate lyases secreted by *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* 174, 2039–2042.
- Pyler, E.J. (1988).** *Baking Science and Technology*. Chicago, IL: Siebel Publishing Company.
- Quatresous Nicolas. (2011) :** Aspergillose humaine. Epidémiologie, diagnostique, contrôle. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie
- Rajoka I. M. and Yasmeen A. (2005).** Induction and production studies of novel glucoamylase of *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 179-187.
- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003).** Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 127e135.
- Rafnar, T., Griffith, I.J., Kuo, M.C., Bond, J.F., Rogers, B.L. & Klapper, D.G. (1991).** Cloning of Amb aI (antigen E), the major family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* 266, 1229–1236.
- Rhodes, D.I., Stone, B.A. (2002).** Proteins in walls of wheat aleurone cells. *Journal of Cereal Science*, 36, pp 18.
- Roovers M., Wouters J., Bujnicki J M., Tricot C., Stalon V., Grosjean H., Droogmans L. (2004).** A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m¹A) methyl transferase. *Nucleic Acids Res.* 32: 465-476.
- Romberg, M. K., and Davis, R. M. 2007.** Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Dis.* 91:585–592.
- Roquebert M.F. (1998),** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “*Moisissures des aliments peu hydratés*”, Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Roussos S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulase. Thèse d'Etat, Université de Provence, Marseille. 193p.
- Safia Koser., Zahid Anwar., Zafar Iqbal., Awais Anjum., Tahir Aqil., Sajid Mehmood & Muhammad Irshad. (2019).** Utilization of *Aspergillus-oryzae* to produce pectin lyase from

various agro-industrial residues, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7:3, 327-332.

Safinur Yildirim Çelika., Nazan Demirb., Yaşar Demirb., Ahmet Adiguzelc., Medine Gulluced. (2014). Production of pectin lyase from *Geobacillus pallidus* p26, purification, characterization and fruit juice application. *Acta Chimica Slovaca*, Vol. 7, No. 1, 2014, pp. 57—63.

Sanchez V. E., and Pilosof A. M. D. (2000). Protease – conidia relationships of *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 22: 1629-1633.

Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D. & Voragen A.G.J. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified.

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. et Van Dijck P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 426–435.

Sedlak E., Valusova E., Nesper-Brock M., Antalík M., Sprinzl M. (2001). Effect of the central disulfide bond on the unfolding behavior of elongation factor Ts homodimer from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry.* 40: 9579-9586.

Semenova MV., Grishutin SG., Gusakov AV., Okunev ON., Sinitsyn AP. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochem (Moscow)*; 68(5): 559-69.

Seyedarabi A., T.T. To., S. Ali., S. Hussain., M. Fries., R. Madsen, M.H. Clausen., S. Teixeira., K. Brocklehurst., R.W. Pickersgill. (2010). Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase, *Biochemistry* 49 539–546.

Shruti Singh., and Sudev K. Mandal. (2012). Optimization of Processing Parameters for Production of Pectinolytic Enzymes from Fermented Pineapple Residue of Mixed *Aspergillus* species. *Jordan Journal of Biological Sciences.* 314 : 310.

Sidra Batool¹., M. Javaid Asad¹., S. M. Saqlan Naqvi¹., Raja Tahir Mahmood¹., A. Guffar²., M. Gulfraz¹ and Saqib H. Hadri¹. (2013). Production and partial purification of pectin lyase by *Aspergillus niger* grown on orange peels. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(13), pp. 1144-1149.

- Silva, D. O., Attwod, M. M., and Tempest, D. W. (1993)** World J. Microbiol. Biotechnol., 9, 574-578.
- Sinitsyna OA., Fedorova EA., Semenova MV., et al. (2007).** Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. Biochem (Moscow); 72(5): 565-71.
- Singh A., Ghosh V. K and Ghosh P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 177-180.
- Singh S.K., Szakacs G., Socol C.R., Pandey A. (2008).** Production of enzymes. pp. 181-204. In : Pandey A., Socol C.R., Larroche C. (Eds), Current developments in solid-state fermentation. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi.
- Soriano M., Diaz P., Pastor FIJ. (2006).** Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Curr Microbiol*; 50: 114-8.
- Szajer, I., and Szajer, C. (1982).** Pectin lyase of *Penicillium paxilli*. *Biotechnol. Lett.*, 4, 549-552.
- Tabuc C. (2007) :** Flore fongique de différents Substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse.
- Thakur, B.R., Rakesh, K.S. & Handa, K.H. (1997).** "Chemistry and uses of pectin-A review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37(1): 47-73.
- Tho I., Kjonilsen A.-L., Knudsen K.D. & Nyström B., (2006).** Effect of solvent composition on pectin association behavior in methanol-water mixtures. *EUR. Polym. J.*, 42, 1164-1172.
- T. Sakai, T. Sakamoto, J. & Hallaert E.J. Vandamme, (1993).** Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 39, 213-279.
- Trivedi S., Gehlot H S., Rao S R. (2006).** Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet Mol Res.* 5 (4): 816-827.
- Van Alebeek GJWM., Christensen TMIE., Schols HE., Mikkelsen JD., Voragen AGJ. (2002).** Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem*; 277(29): 25929-36.

- Varga J., Juhász Á., Kevi F. and Kozakiewicz Z. (2004).** Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus species*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 627-640.
- Vieille C., Epting K L., Kelly R M., Zeikus J G. (2001).** Bivalent cations and amino acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *Eur J Biochem*. 268: 6291-6301.
- Vieille C., Zeikus J G. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol Mol Biol*. 65(1): 1- 43.
- Villegas E., Aubague S., Alcantara L., Auria R. and Revah S. (1993).** Solid-state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotechnology*, 11: 387-397.
- Vincken JP., Schols HA., Oomen RJFJ., et al. (2003).** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I: implications for cell wall architecture. *Plant Physiol*; 132: 1781-9.
- Voragen, A., Thibault, J.F., Pilnik, W., Axelos, M.A.V. & Renard, C.M.G.C. (1995).** Pectins. dans *Food polysaccharides and their applications*. Editeur: Stephen, A.M., New York, Marcel Dekker: 287-339.
- Wang X.-J., Bai J.-G. and Liang Y.-X. (2006).** Optimization of multi-enzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 73: 533-540.
- Wang L., and Yang S.-T. (2007).** Solid-state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, P: 465- 489.
- Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J. et Sing A. (2006).** Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.
- Wheeler, M. H., Stipanovic, R. D., and Puckhaber, L. S. (1999).** Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. *Mycol. Res*. 103:967–973.
- Willats WGT., Knox P., Mikkelsen JD. (2006).** Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol*; 17: 97-104.
- Xu Y., Li Y., Xu S., Liu Y., Wang X. and Tang J. (2008).** Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 (7): 558-566.

- Xu SX., Qin X., Liu B., Zhang DQ., Zhang W., Wu K., Zhang YH. (2015)** An acidic pectin lyase from *Aspergillus niger* with favourable efficiency in fruit juice clarification. *Lett Appl Microbiol* 60(2):181–187.
- Yadav, S., and N.V. Shastri. (2007).** Purification and properties of an extracellular pectin lyase produced by the strain of *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. *Indian J. Biochem Biophys.*, 44: 247-251.
- Yadav, S., P.K. Yadav, D. Yadav and K.D.S. Yadav. (2008).** Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process. Biochem.*, 43: 547-552.
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., and Yadav, K. D. S. (2008)** *Ann. Microbiol.*, 58, 61-65.
- Zeitoun R. (2011)** procédés de fractionnement de la matière végétale application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. Thèse Doctorat en science des agro-ressources, institut National polytechnique de l'université de Toulouse, 273p.
- Zhang, N., Geiser, D. M., and Smart, C. D. (2007).** Macroarray detection of solanaceous plant pathogens in the *Fusarium solani* species complex. *Plant Dis.* 91:1612–1620.

A yellow scroll graphic with a brown border and a shadow. The scroll is unrolled, showing the word "Annexes" in a bold, black, sans-serif font. The scroll has a small tab on the left side and a small loop on the right side.

Annexes

Annexe 1

Préparation milieu PDA

- ✓ Extrait de pomme de terre.....1000ml
- ✓ Glucose.....20g
- ✓ Agar.....20g
- ✓ Stérilisation à 100°C pendant 20 minutes

- Préparation de l'extrait pomme de terre

200g de pomme de terre non pelées sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée puis portés à l'ébullition pendant 1heure, ils sont enfin écrasés, filtrés et le volume est complété à 1 litre d'eau distillée

- Préparation de milieu de culture

Le glucose et l'agar dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1litre d'eau distillée.

Annexe 2

Dosage des protéines

Le dosage est effectué selon la méthode de Lowry, (1951). Les solutions nécessaires sont :

- _ Solution A : carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0,1N,
- _ Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée,
- _ Solution C : sulfate de cuivre, 5 H₂O à 1% (w/v) dans l'eau distillée,
- _ Solution D : 0,5 ml de C + 0,5 ml de B + 50 ml de A.

Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.

- _ Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 au moment de l'emploi.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit:

- _ Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml,
- _ Solution D : 5 ml.

Après une agitation et un repos de 10 minutes sur la paillasse, 0,5 ml de la solution E sont rajoutés. Après une deuxième agitation, le développement de la coloration est obtenu après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est réalisée à 650 nm.

Annexe 3

Préparation des solutions tampon

Dosage d'activité enzymatique

➤ **Solution tampon tris Hcl 100mM, 0,2%, Ph =9**

- ✓ Tris..... 3,028g
- ✓ Hcl..... 2,09ml
- ✓ Eau distillée..... 500ml

➤ **Préparation de Cacl₂**

- ✓ Cacl₂..... 1,4702g
- ✓ Eau distillée..... 100ml

➤ **Solution tampon phosphate citrate 100mM, 0,2%, Ph=5,2**

- ✓ Acide citrique..... 10,507g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

➤ **Préparation de Na₂Hpo₄**

- ✓ Na₂Hpo₄..... 7,098g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

Caractéristiques des lyases

➤ **Solution tampon phosphate 100mM, Ph= 6, 7, 8**

- ✓ Kh₂PO₄..... 6,8g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

➤ **Préparation de Na₂Hpo₄**

- ✓ Na₂Hpo₄..... 7,095g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

➤ **Solution tampon Na₂Hpo₄/ NaOH 100mM, Ph= 11, 12**

- ✓ Na₂Hpo₄..... 7,095g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

➤ **Préparation de NaOH**

- ✓ NaOH..... 2g
- ✓ Eau distillée..... 500ml

Annexe 4

Préparation des ions métalliques

Mgcl₂, 1mM

- ✓ Mgcl₂..... 0,01g
- ✓ Eau distillée..... 50ml

Cacl₂, 1mM

- ✓ Cacl₂..... 0,006g
- ✓ Eau distillée..... 50ml

Mncl₂, 1mM

- ✓ Mncl₂..... 0,009g
- ✓ Eau distillée..... 50ml

Bacl₂, 1mM

- ✓ Bacl₂..... 0,012g
- ✓ Eau distillée..... 50ml

Cdcl₂, 1mM

- ✓ Cdcl₂..... 0,03g
- ✓ Eau distillée..... 50ml



Résumé

Résumé

Ce travail s'intéresse à la production de pectinases par une souche d'*Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma et cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé. Après 96h de culture, la souche a montré une bonne croissance et a produit deux enzymes pectinolytiques (PNL et PEL) à 45°C. Un taux d'humidité de 60% donne la meilleure production des deux enzymes avec une activité spécifique de 167437,601 U/mg pour la PNL et 110654,4U/mg pour la PEL. Un taux d'inoculum de 10^7 spores/g de substrat s'avère la meilleure concentration avec une activité spécifique de 31375,7198 U/mg et de 98333,61529 U/mg pour la PNL et la PEL respectivement. L'étude des effets de la température et du pH sur les deux enzymes révèle que la PNL produite par *A. niger* est active à 60°C et la PEL à 80°C. Ces deux enzymes ont des charges électriques différentes avec des pH optimum de 4.0 pour la PNL et de 10.0 pour la PEL. La PEL a une bonne stabilité dans la zone de pH 6-11 alors que la PNL est stable dans une autre zone de pH variant de 4-11 avec des thermo stabilités de 2h à 60°C à 70°C à 80°C et à 90°C avec des demi-vies de 170 min, 140 min, 130 min et 120 min respectivement. Cependant la PEL a montré une bonne stabilité thermique après 3h d'incubation à 60 °C et à 70°C, la demi-vie est de 80 min à 80°C et 50 min à 90 °C. L'EDTA (10 mM), inhibe l'activité de la PEL (une métallo enzyme à calcium). Les cations divalents calcium (Ca^{2+}), cadmium (Cd^{2+}) et baryum (Ba^{2+}), provoquent une augmentation des activités enzymatiques. Les paramètres cinétiques des deux enzymes sont déterminés par l'utilisation de l'acide polygalacturonique et la pectine comme substrat: les Km respectives de la PNL et de la PEL sont 5.83 mg/ml et 5.10 mg/ml. Les Vmax ont pour valeur de 1428.5 UI (PNL) et 1000 UI (PEL). Du point de vue de ces propriétés physicochimiques et de thermostabilité, les deux enzymes PNL et PEL peuvent être appliquées industriellement pour la clarification du jus ou autres industries: industries alimentaires, textile, papeterie ainsi que le traitement des déchets.

Mots clés: Pectine lyase, Pectate lyase, *Aspergillus niger*, SSF, Son de blé, Thermostabilité.

Date de soutenance : 03 / 10 / 2019	Présenté et soutenu par : Kaassis Maroua Khanfar Maram
Thème: Etude de la production des lyases par la moisissure <i>Aspergillus niger</i> cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé: caractérisation des lyases.	
Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en BIOCHIMIE DE LA NUTRITION	
<p>Résumé : Ce travail s'intéresse à la production de pectinases par une souche d'<i>Aspergillus niger</i> isolée du sol de Teleghma et cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé. Après 96h de culture, la souche a montré une bonne croissance et a produit deux enzymes pectinolytiques (PNL et PEL) à 45°C. Un taux d'humidité de 60% donne la meilleure production des deux enzymes avec une activité spécifique de 167437,601 U/mg pour la PNL et de 110654.4U/mg pour la PEL. Un taux d'inoculum de 10⁷ spores/g de substrat s'avère la meilleure concentration avec une activité spécifique de 31375,7198 U/mg et de 98333,61529 U/mg pour la PNL et la PEL respectivement. L'étude des effets de la température et du pH sur les deux enzymes révèle que la PNL produite par <i>A. niger</i> est active à 60°C et la PEL à 80°C. Ces deux enzymes ont des charges électriques différentes avec des pH optimum de 4.0 pour la PNL et de 10.0 pour la PEL. La PEL a une bonne stabilité dans la zone de pH 6-11 alors que la PNL est stable dans une autre zone de pH variant de 4-11 avec des thermo stabilités de 2h à 60°C à 70°C à 80°C et à 90°C avec des demi-vies de 170 min, 140 min, 130 min et 120 min respectivement. Cependant la PEL a montré une bonne stabilité thermique après 3h d'incubation à 60 °C et à 70°C, la demi-vie est de 80 min à 80°C et 50 min à 90 °C. L'EDTA (10 mM), inhibe l'activité de la PEL (une métallo enzyme à calcium). Les cations divalents calcium (Ca²⁺), cadmium (Cd²⁺) et baryum (Ba²⁺), provoquent une augmentation des activités enzymatiques. Les paramètres cinétiques des deux enzymes sont déterminés par l'utilisation de l'acide polygalacturonique et la pectine comme substrat: les Km respectives de la PNL et de la PEL sont 5.83 mg/ml et 5.10 mg/ml. Les Vmax ont pour valeur de 1428.5 UI (PNL) et 1000 UI (PEL). Du point de vue de ces propriétés physicochimiques et de thermostabilité, les deux enzymes PNL et PEL peuvent être appliquées industriellement pour la clarification du jus ou autres industries: industries alimentaires, textile, papeterie ainsi que le traitement des déchets.</p> <p>Mots clés: Pectine lyase, Pectate lyase, <i>Aspergillus niger</i>, SSF, Son de blé, Thermostabilité.</p>	
<p>Jury d'évaluation : Présidente du jury : Mme DAKHMOUCHE S. M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine. Encadreur : Mme BENNAMOUN L. M.C.B, (UFM Constantine). Examinatrice : Mme LABBANI F.Z.K. M. C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.</p>	
Année universitaire : 2018-2019	

ملخص

يركز هذا العمل في إنتاج البكتيناز عن طريق سلالة *Aspergillus niger* المعزولة من تربة التلاغمة على وسط صلب (SSF) يرصد على وسط نخالة القمح. بعد 96 ساعة من الثقافة، أظهرت السلالة نموًا جيدًا وأنتجت إنزيمين للبكتين (PNL و PEL) عند 45 درجة مئوية. يعطي محتوى الرطوبة بنسبة 60٪ أفضل إنتاج لكل من الإنزيمات مع نشاط محدد قدره 167437.601 وحدة / ملغ لـ PNL و 110654.4 وحدة/ملغ لـ PEL. أثبت معدل اللقاح البالغ 10^7 ابواغ/غ من الركيزة ليكون أفضل تركيز مع نشاط محدد من 31375.7198 وحدة/ملغ و 98333.6152 وحدة/ ملغ لـ PNL و PEL على التوالي. كشفت دراسة آثار درجة الحرارة ودرجة الحموضة على كلا الإنزيمات التي تنتجها *A. niger* تنشط عند 60 درجة مئوية و PEL عند 80 درجة مئوية. هذان الإنزيمان لهما شحنة كهربائية مختلفة مع pH الأمثل 4.0 لـ PNL و 10.0 لـ PEL. يتمتع PEL باستقرار جيد في نطاق pH 6-11، في حين أن PNL مستقر في pH من 4 إلى 11 مع قابلية حرارية تبلغ ساعتين عند 60 درجة مئوية إلى 70 درجة مئوية عند 80 درجة مئوية وعند 90 درجة مئوية مع نصف عمر 170 دقيقة، 140 دقيقة، 130 دقيقة و 120 دقيقة على التوالي. في حين، أظهر PEL ثباتًا حراريًا جيدًا بعد 3 ساعات من الحضانة عند 60 درجة مئوية وعند 70 درجة مئوية، يبلغ عمر النصف 80 دقيقة عند 80 درجة مئوية و 50 دقيقة عند 90 درجة مئوية. EDTA (10 ملم) يحول دون نشاط PEL (metalloenzyme الكالسيوم). تتسبب الكالسيوم ثنائي التكافؤ (Ca^{2+}) والكاديوم (Cd^{2+}) والباريوم (Ba^{2+}) في زيادة الأنشطة الأنزيمية. يتم تحديد المعلمات الحركية للإنزيمين عن طريق استخدام حمض polygalacturonic والبكتين كركيزة: كم لكل منهما من PNL و PEL هي 5.83 ملغ / مل و 5.10 ملغ / مل. قيم V_{max} هي 1428.5 وحدة دولية (PNL) و 1000 وحدة دولية (PEL). من وجهة نظر هذه الخواص الفيزيائية والكيميائية الحرارية، يمكن للإنزيمين PNL و PEL تطبيقهما في المجال الصناعي من أجل توضيح العصير أو صناعات أخرى: صناعات الأغذية، النسيج، القرطاسية، وكذلك معالجة النفايات.

الكلمات المفتاحية: البكتين لياز، البكتات لياز، *Aspergillus niger*، SSF، نخالة القمح، الحرارة.

Abstract

This work investigates the production of pectinases by a strain of *Aspergillus niger* isolated from the soil of Teleghma and grown on solid area (SSF) based on wheat bran. After 96h of cultivation, the strain showed good growth and produced two pectinolytic enzymes (PNL and PEL) at 45 ° C. A humidity level of 60% gives the best production of both enzymes with a specific activity of 167437.601 U / mg for PNL and 110654.4U / mg for PEL respectively. The study of the effects of temperature and pH on both enzymes reveals that PNL produced by *A. niger* is active at 60 ° C and PEL at 80 ° C. These two enzymes have different electrical charges with optimum pHs of 4.0 for PNL and 10.0 for PEL. The PEL has good stability in the pH range 6-11 while PNL is stable in another pH range of 4-11 with thermostabilities of 2h at 60 ° C to 70 ° C at 80 ° C and at 90 ° C with half-lives of 170 min, 140 min, 130 min and 120 min respectively. However, PEL showed good thermal stability after 3 hours of incubation at 60 ° C. and at 70 ° C., the half-life is 80 minutes at 80 ° C. and 50 minutes at 90 ° C. EDTA (10 mm) inhibits the activity of PEL (a calcium metalloenzyme). The divalent calcium (Ca²⁺), cadmium (Cd²⁺) and barium (Ba²⁺) cations cause an increase in enzymatic activities. The kinetic parameters of the two enzymes are determined by the use of polygalacturonic acid and pectin as substrate: the respective Km of PNL and PEL are 5.83 mg / ml and 5.10 mg / ml. The Vmax values are 1428.5 UI (PNL) and 1000 IU (PEL). From the point of view of these physicochemical properties and thermostability, the two enzymes PNL and PEL can be applied industrially for the clarification of the juice or other industries: food industries, textile, stationery as well as the treatment of the waste.

Key words: Pectin lyase, Pectate lyase, *Aspergillus niger*, SSF, Wheat bran, Thermostability.

