



République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur  
Et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Science de la Nature et de la Vie  
Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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 :**

**La polygalacturonase d'Aspergillus niger : production, séparation et application industrielle.**

Présenté par : KIHÉL Abir et RAMDHANE Aya

**Devant le jury :**

Président du jury : Mr. NOUADRI T. MCA, UFM Constantine 1

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. MCB, UFM Constantine 1

Examinatrice : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS, Assia Djébar , Constantine

**Année Universitaire 2019-2020**

# Remerciements

Avant tout, nous remercions **Le BON DIEU** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à madame **BENNAMOUN Leila** qui a accepté de nous encadrer, on la remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, **Mr. NOUADRI T**, et **Mme DAKHMOUCHE S** ;

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude

# ***Dédicace***

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

À la personne la plus chère à mon cœur **Maman**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

À toi **Papa** rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin.

À mes sœurs **Meriem** et **Khadidja** et leur maries **Salah** et **Ammer**

À mon cher Frère **Haroune** et ma belle-sœur **Houda** et leur enfants **Baillasane** et **Wail**

À ma cher collègue dans ce travail **Abir** on a passé des bons moments ensemble que dieu garde notre amitié pour toujours.

À tous mes amis **Amina**, **Chaima**, **Khawla**, **Soumia**, **imene**, **Amine** pour la motivation et le soutien inconditionnel qu'elles m'ont offert durant toute la période du mémoire, sans elles ce travail n'aurait pas été accompli. Merci beaucoup.

Aya

# Dédicaces

À mes très chers parents, sources de vie, d'amour et affection.

À mes très chers frères Abd Al Ali, Ilyase, Faysal, Abd al wahabe et leur enfant, et mes belles sœurs soumia, Amel wissam, Sabrina, souhaila, sources de jouer et de bonheur.

À tous les cousines, en particulièrement Sara.

À tous mes amies, qu' j'ai connue jusque a maintenue en particulièrement Maissoune, Khadija merci pour leurs Amours et leurs encouragements.

À Aya, Chère Amie avent d'être le binôme pour sont

Soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Puisse Allah vous donnez santé, bonheur, courage et surtout réussit

Abir

## Résumé :

Les biotechnologies industrielles font partie des techniques essentielles pour le développement économique de demain. Elles consistent à mettre à profit la biotechnologie pour assurer la production et la transformation écoefficiente de produit chimique comme les enzymes. La capacité de ces enzymes à catalyser diverses réactions chimiques *in vivo* et *in vitro* conduit à des applications dans diverses industries, telles que l'alimentation humaine et animale, la pharmacie, les diagnostics, les détergents, le textile, le papier, et la bioénergie. Les micro-organismes sont la principale source d'enzymes, car ils sont cultivés en grande quantité sur une courte période et des manipulations plus faciles surtout avec le processus de la fermentation en milieu solide.

Les enzymes pectinolytiques font partie des enzymes glycolytiques connues par leurs applications industrielles multiples. Les polygalacturonases sont les plus connues de la famille des pectinases produites par l'*Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économiques majeurs.

Ce travail vise à la production de la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* selon le procédé de la fermentation solide (FMS) à base de résidus industriels comme un support tel que le son de blé et la bagasse d'orange. Ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Le premier chapitre relate des connaissances sur les champignons filamenteux et thermophiles parmi ces champignons l'*Aspergillus niger*. Il est défini en déterminant sa morphologie, sa classification, son habitat et son importance dans le domaine industriel. Ensuite, nous avons étudié la PGase famille des pectinases qui trouve une très large application dans l'IAA dont la principale utilisation est la clarification des jus de fruits. Le dernier chapitre met au point la FMS connue comme processus rentable pour la production des enzymes pectinolytiques. Une purification de l'extrait enzymatique brut est aussi envisagée par fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium ou l'utilisation des solvants organiques, des chromatographies gel filtration et échangeuses d'ions. Du point de vue économique, il est intéressant de tester ces enzymes dans le but de leur utilisation en industrie.

Mots clés : Polygalacturonase, *Aspergillus niger*, FMS, séparation, Application industriel

## ملخص:

تعد التقنيات الحيوية الصناعية إحدى التقنيات الأساسية للتنمية الاقتصادية في المستقبل. وتتمثل في استخدام التكنولوجيا الحيوية لضمان إنتاج مواد كيميائية والتي يمكن أيضا معالجتها بكفاءة بيئية مثل الإنزيمات. إن قدرة هذه الإنزيمات على تحفيز التفاعلات الكيميائية المختلفة في الجسم الحي وفي المختبر تؤدي إلى اعتمادها في تطبيقات لصناعات مختلفة، مثل الأغذية والأعلاف، والأدوية، والتشخيص، والمنظفات، والمنسوجات، والورق، والطاقة الحيوية. وتعد الكائنات الحية الدقيقة المصدر الرئيسي للإنزيمات لأنها تنمو بكميات كبيرة وذلك خلال فترة قصيرة أيضا فإنه يسهل التعامل معها خاصة باعتماد على عملية التخمير الصلب.

الإنزيمات المحللة للبروتين تنتمي أساسا للإنزيمات المحللة للجلوكوز المعروفة بتطبيقاتها الصناعية المتعددة. ويعد Polygalacturonases الأكثر شهرة في عائلة البكتيناز والذي تنتجه *Aspergillus niger*، وهي أكثر الأنواع الفطرية استجابة على نطاق واسع في مجال الصناعة حيث أنها قادرة على تصنيع العديد من المستقبلات ذات الأهمية الاقتصادية الكبرى.

يهدف هذا العمل إلى إنتاج polygalacturonase بواسطة *Aspergillus niger* وعن طريق عملية الصلبة (FMS) على أساس المخلفات الصناعية كحامل مثل نخالة القمح وتفل البرتقال. وذلك من أجل تقليل تكلفة إنتاج هذه الإنزيمات

يتعلق الفصل الأول بدراسة الفطريات الخيطية والمحبة للحرارة ومن بين هذه الفطريات *Aspergillus niger*، ويتم تعريفها من خلال تحديد شكلها وتصنيفها وبيئتها وأهميتها في المجال الصناعي. بعد ذلك، درسنا PGase من عائلة البكتينازات التي وجدت تطبيقًا واسعًا جدًا في IAA، والاستخدام الرئيسي لها هو توضيح عصائر الفاكهة. يناقش الفصل الأخير FMS المعروف كعملية فعالة من حيث التكلفة لإنتاج الإنزيمات المحللة للبروتين. يُنظر أيضًا في تنقية مستخلص الإنزيم الخام عن طريق تجزئة البروتينات بكبريتات الأمونيوم أو استخدام المذيبات العضوية، كروماتوجرافيا ترشيح الهلام والتبادل الأيوني. من وجهة نظر اقتصادية، من المثير للاهتمام اختبار هذه الإنزيمات لغرض استخدامها في الصناعة.

الكلمات المفتاحية: Polygalacturonase، *Aspergillus niger*، FMS، الفصل، التطبيقات الصناعية

## Summary:

Industrial biotechnologies are one of the essential techniques for the economic development of tomorrow. They consist in using biotechnology to ensure the production and eco-efficient production and processing of chemicals such as enzymes. The ability of these enzymes to catalyze various chemical reactions in vivo and in vitro leads to applications in various industries, such as food and feed, pharmaceuticals, diagnostics, detergents, textiles, paper, and bioenergy. . Microorganisms are the main source of enzymes because they are grown in large quantities over a short period and easier to handle especially with the solid-state fermentation process.

Pectinolytic enzymes are among the glycolytic enzymes known for their multiple industrial applications. Polygalacturonases are the best known of the pectinase family produced by *Aspergillus niger*, the most widely used fungal species in industry capable of synthesizing a multitude of metabolites of major economic interest.

This work aims at the production of *Aspergillus niger* polygalacturonase by the solid-state fermentation (SSF) based on industrial residues as a carrier such as wheat bran and orange bagasse. This is in order to decrease the cost of producing these enzymes.

The first chapter reports knowledge about filamentous and thermophilic fungi among these fungi *Aspergillus niger*. It is defined by determining its morphology, classification, habitat and importance in the industrial field. Then, we studied the PGase family of pectinases, which finds a very wide application in the IAA whose main use is the clarification of fruit juices. The last chapter develops the SSF known as a profitable process for the production of pectinolytic enzymes. Purification of the crude enzyme extract is also envisaged by fractionation of proteins with ammonium sulphate or the use of organic solvents, gel filtration and ion exchange chromatography. From an economic point of view, it is interesting to test these enzymes for their use in industry.

Key words: Polygalacturonase, *Aspergillus niger*, SSF, separation, Industrial application

## Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
Chapitre 01 Les champignons filamenteux .....	3
1 Champignons.....	3
1.1 Généralités .....	3
1.2 Champignons filamenteux .....	3
1.3 Classification classique des champignons .....	3
1.4 Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux.....	4
2 Champignons thermophiles.....	5
2.1 <i>Aspergillus</i> thermophiles.....	5
2.2 Importances des enzymes thermophiles .....	6
3 Genre <i>Aspergillus</i> .....	7
3.1 Définition et caractéristiques générales .....	7
3.2 Identification des <i>Aspergillus</i> .....	7
3.3 <i>Aspergillus niger</i> .....	7
4 Taxonomie.....	8
5 Ecologie.....	9
6 Morphologie.....	9
6.1 Aspect microscopique.....	9
6.2 Aspect macroscopique .....	10
7 Besoins nutritionnels .....	11
8 Facteurs physicochimiques .....	12
9 Importance industrielle d' <i>Aspergillus niger</i> .....	12
Chapitre 02 Enzymes glycolytiques "Pectinase".....	14
1 "Pectine".....	14
1.1. Homogalacturonane (HG) .....	15
1.2. Ramnogalacturonane I (RGI) .....	15
1.3. Rhamnogalacturonane II.....	16

2	Classification des pectines .....	17
3	Solubilité et précipitation .....	17
4	Source de la pectine .....	18
5	Structure des pectines.....	19
6	Enzymes pectinolytiques.....	19
6.1	Définition.....	19
6.2	Sources de la pectinase .....	19
6.3	Classification des enzymes pectinolytiques .....	21
6.4	Protopectinase .....	22
6.5	Pectine méthylestérases .....	22
6.6	Pectines acetyl estérases .....	23
6.7	Pectate lyase.....	23
6.8	Pectine lyases .....	23
6.9	Polygalacturonases (EC 3.2.1.15).....	23
6.9.1	Origine des polygalacturonases.....	24
6.9.2	Structure de la polygalacturonase .....	25
6.9.3	Mécanisme d'action .....	26
7	Applications des enzymes pectinolytiques.....	27
Chapitre 03 Production de la polygalacturonase en milieu solide .....		31
1	Fermentation en milieu solide .....	29
1.2	Définition.....	29
2	Résidus industriels utilisés dans la FMS .....	30
3	Préparation de l'inoculum.....	31
4	Conduite de la fermentation en milieu solide .....	32
5	Influence des différents paramètres sur la production de la Polygalacturonase par l' <i>Aspergillus niger</i> en milieu solide .....	32
6	Extraction de la PGase .....	36
7	Purification de la polygalacturonase .....	36
8	Dosage de l'activité enzymatique de la PGase .....	38
5.	Caractérisation de la polygalacturonase purifiée .....	38
6.	Applications industrielles de la polygalacturonase .....	40
Conclusion.....		42
Références bibliographiques.....		43

## Liste des abréviations

**Aw:** activity of water

**GalA:** acide galacturonique

**HG :** Homogalacturonane

**IAA :** Industrial agroalimentaire

**RG-I :** Rhamnogalacturonan- I

**RG-II :** Rhamnogalacturonan-II

**PGase :** Polygalacturonase

**PME :** Pectine méthyl estérases

**FMS :** Fermentation sur milieu solide

**U/g :** Unité Internationale par gramme

**KDa :** kilo dalton

## Liste des figures :

<b>Figure 1:</b> Structure de l'Aspergillus niger.....	8
<b>Figure 2:</b> Aspect microscopique (a) représentation schématique (b) de la conidiophore d'Aspergillus niger.....	10
<b>Figure 3:</b> Aspects macroscopiques d'Aspergillus niger.....	11
<b>Figure 4:</b> Molécule de pectine.....	14
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines.....	14
<b>Figure 6:</b> Structure primaire d'un Homogalacturonane (HG).....	15
<b>Figure 7:</b> Structure du rhamnogalacturonane I (RG I).....	16
<b>Figure 8:</b> Structure du rhamnogalacturonane II.....	17
<b>Figure 9:</b> Structure 3D de l'Endo PGase I d'Aspergillus niger.....	26
<b>Figure 10:</b> Action des exo- et endopolygalacturonases.....	27
<b>Figure 11:</b> Effet de la période d'incubation sur l'activité de la PGase.....	33
<b>Figure 12:</b> Effet de la concentration d'inoculum sur l'activité de la PGase.....	34
<b>Figure 14:</b> Effet du taux d'humidité sur la production de la PGase.....	36

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1:</b> Enzymes de dégradation la paroi cellulaire des plantes extraite d'Aspergillus thermophiles et thermotolérants. ....	6
<b>Tableau 2:</b> Position systématique d'Aspergillus niger. ....	8
<b>Tableau 3:</b> Utilisation industrielle et la production des enzymes par la moisissure Aspergillus niger.....	13
<b>Tableau 4:</b> Teneur en pectine de différents fruits et légumes. ....	18
<b>Tableau 5:</b> Sources de microorganismes pectinolytiques. ....	19
<b>Tableau 6:</b> Les différents types d'enzymes pectinolytiques, leur mode d'action et leurs produits de réaction. ....	21
<b>Tableau 7:</b> Classification de polygalacturonase.....	26
<b>Tableau 8:</b> Application industrielles des enzymes pectinolytiques. ....	27
<b>Tableau 9 :</b> Les différentes méthodes de purification pour l'extraction des différentes pectinases. ....	37

# **Introduction**

# Introduction

---

## Introduction

La biotechnologie industrielle ou la biotechnologie blanche englobe l'application des outils biotechnologiques aux processus industriels traditionnels et la fabrication de produits d'origine biologique à partir de matières premières renouvelables. Les micro-organismes, les enzymes et leur génie génétique constituent la base d'une série de technologies et de processus qu'un groupe diversifié d'entreprises. **(Buga et al., 2014).**

La production des enzymes industriels 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. Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agro-industriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physico-chimique du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes. **(Belmessikh, 2011)**

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases trouvent une très large application dans l'industrie agro-alimentaire dont la principale utilisation est la clarification des jus de fruits. Ils comptent environ 25 % de vente d'enzymes alimentaires dans le monde ; outre que l'industrie agro-alimentaire, elles sont appliquées dans diverses industries comme l'industrie du textile, du papier, dans la fermentation du café, du thé et dans l'extraction des huiles.

Par ailleurs, la plupart des préparations de pectinases sont d'origine fongique ; l'*Aspergillus* est le genre le plus communément utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques, particulièrement l'espèce *niger*. Les préparations enzymatiques de cette moisissure sont un groupe d'enzymes constitué d'estérases, de polygalacturonases et de lyases qui agissent sur les substrats pectiques. **(Mehrnouche et al., 2014)**

Pour cela, l'*Aspergillus niger* est l'un des micro-organismes les plus importants utilisés en biotechnologie. Il est déjà appliqué depuis de nombreuses décennies pour produire des enzymes extracellulaires (alimentaires) et de l'acide citrique. *A. niger* a été développé comme hôte de transformation importante pour sur exprimer les enzymes **(Schuster, 2002).**

Par ailleurs, la fermentation à l'état solide est définie comme la croissance de microbes sans phase aqueuse à écoulement libre. Les enzymes importants sur le plan industriel peuvent être produits par cette technique, en particulier en utilisant les métabolismes fongiques et les résidus agro-industriels comme substrats solides disponibles et peu coûteux.

# Introduction

---

Le son de blé est l'un des résidus agro-industriels les plus employés, pour produire des métabolites à valeur ajoutée à partir de divers micro-organismes en utilisant la FMS. Par sa richesse en glucose et en micronutriments (**Demir et Tari, 2014**).

Ainsi, notre manuscrit est scindé en trois parties :

- ✚ La première partie relate des connaissances sur les champignons filamenteux dont l'espèce *Aspergillus niger* : taxonomie, écologie, morphologie, et importance industrielle.
- ✚ Dans la deuxième partie nous avons abordé les connaissances les plus importantes sur la polygalacturonase : origine, structure et mécanisme d'action.
- ✚ Enfin, la troisième partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude de la production de la PGase : Etude des paramètres influençant la production de la PGase à savoir : l'humidité, la température, la période d'incubation et la concentration de l'inoculum. Décrire les différentes méthodes de purification, la caractérisation et les applications industrielles de l'enzyme visée.

# **Chapitre 01**

Les champignons filamenteux

# 1 Les champignons

## 1.1 Généralités

Les micro-organismes constituent la majorité de la biodiversité de la terre et font partie intégrante des processus de la biosphère. Le succès des macro-organismes peut être profondément influencé par divers micro-organismes (bactéries, virus, champignons et protozoaires) (**Amsellem et al., 2017**). Le groupe le plus important est les champignons. Ils sont classés en trois groupes par rapport à leur importance industrielle : les champignons filamenteux (moisissures), les levures et les champignons supérieurs (**Brock et al., 1994**).

## 1.2 Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux ou les moisissures sont définis comme des micro-organismes eucaryotes hétérotrophes et immobiles (**Redecker, 2002**) à mode de reproduction sexuée ou asexuée. C'est des organismes qui se caractérisent par une paroi cellulaire contenant la chitine ce qui les distingue des plantes, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine ainsi que la cellulose et le glucosane, leur appareil végétatif (thalle) est composé de filaments ramifiés « les hyphes » (**Alexopoulos, 1996 ; Petersen et Knudsen, 2005**).

La grande majorité des champignons sont des organismes aérobies et chimio-hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils utilisent le carbone organique comme source d'énergie (**Carlile et Watkinson, 1994**), leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu (**Le Calvez, 2009**). Ces organismes nécessitent beaucoup d'eau pour accomplir leur cycle biologique et ils ne vivent donc que sur des milieux terrestres très humides ou en parasitant d'autres êtres vivants. (**Gulis et al., 2009 ; McConnaughey, 2014**).

## 1.3 Classification classique des champignons

La classification des champignons a été basée principalement sur les différences de types de structures et de la reproduction. La capacité d'analyser et d'étudier les structures génétiques des champignons entraîne un changement radical et une nouvelle conception de leur classification (**Zabel et Morrell, 2020**).

Les principaux groupes des champignons sont :

- **Les Ascomycètes**

Les ascomycota sont des champignons septiques dont les filaments sont séparés par des parois cellulaires croisées appelées septa. Les ascomycètes produisent des spores sexuelles, appelées ascospores, formées dans des structures en forme de sac appelées asques, et aussi de petites spores asexuées appelées conidies. Certaines espèces d'ascomycota sont asexuées et ne forment pas d'asques ou d'ascospores (**Mcconnaughey, 2014**).

- **Les Basidiomycètes**

Les basidiomycètes sont des mycéliums septiques filamenteux constitués de chaînes séparées par des parois cellulaires entrecroisées appelées septa. Ces champignons se nourrissent généralement de matière organique en décomposition. Ils subissent souvent une méiose sporique et présentent une forme de reproduction sexuée connue sous le nom d'anisogamie. Cette dernière consiste en la fusion de deux gamètes sexuels qui diffèrent par leur forme. Le blastocladiomycota peut également produire des zoospores asexuées pour coloniser de nouveaux substrats (**Mcconnaughey, 2014**).

- **Les Zygomycètes**

Les zygomycètes sont un groupe de champignons inférieurs qui produisent des zygospores après la fusion des organes reproducteurs isogamies (gamétanges) (**Richardson, 2009**). Ils poussent souvent dans le sol et les plantes mortes. Les zygomycètes sont souvent nécessaires, car c'est des cultivateurs rapides qui consomment rapidement du carbone simple, alors ce sont des champignons qui contribuent à la préservation de l'environnement. (**Dijksterhuis et Samson, 2006**)

### 1.4 Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux

La structure des champignons repose sur leur appareil végétatif appelée thalle. C'est des cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ou d'hyphes qui comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium. Les hyphes puisent l'eau et les substances organiques dans les différents substrats qu'ils colonisent pour leur développement (**Boudih, 2011**).

### 2 Les champignons thermophiles

Parmi les eucaryotes, certains champignons possèdent la capacité de rester actifs et de se propager dans des environnements à températures élevées. Ces champignons peuvent être classés comme thermophiles par croissance situés entre 45 °C et plus de 80 °C. Alors qu'un champignon est considéré hyperthermophile lorsqu'il se développe au-dessus de 80 °C (**Turner et al., 2007**). Cette classification n'est pas applicable à tous les champignons. Par exemple, *Aspergillus fumigatus* est capable de se développer à des températures supérieures à 50 °C et inférieures à 20 °C (**D'Oliveira et al., 2014**).

#### 2.1 Les *Aspergillus* thermophiles

Parmi tous les *Aspergillus* thermotolérants les espèces les plus fréquentes sont :

##### ❖ *Aspergillus fumigatus*

Anamorphe (téléomorphe, Emericella, Ascomycota-Eurotiales), colonise principalement les environnements à haute température (panaches, nids et plumes d'oiseaux, déjections et granulés), tolérant à la chaleur, se développant à pH 3,8 à 7,8 exigeant pour les conditions de l'eau (aw) 0,9 à 0,95 (**Kornilowicz et Kitowski, 2012**).

##### ❖ *Aspergillus niger van Tieghem*

Anamorphe (téléomorphe, Emericella, Ascomycota-Eurotiales), champignon omniprésent, colonise le sol, le compost, les graines de plantes, les nids d'oiseaux, les plumes, thermotolérant (17-42°C), évoluant dans une large gamme de pH de 2 à 8 (**Kornilowicz et Kitowski, 2012**).

##### ❖ *Aspergillus terreus Thom*

Anamorphe (téléomorphe : Emericella ; Ascomycota-Eurotiales), apparaît dans le sol, les composts, les graines de plantes, les nids d'oiseaux, espèces omniprésentes, thermotolérant 35 et 40°C, évoluant dans une large gamme de pH de 2 à 8 (**Kornilowicz et Kitowski, 2012**).

##### ❖ *Aspergillus aculeatus*

Il appartient à la section nigri, et est étroitement *lié* à *A. niger* mais se distingue de celle-ci par des têtes portant uniquement des phialides. Il se développe entre 10 et 42°C avec un optimum de 30°C et possède une forte activité pectinolytique (**Hocking, 2006**).

## Chapitre 01 : Les Champignons filamenteux

Ces espèces et d'autres espèces d'*Aspergillus* sont responsables de la production de diverses enzymes à utilités agro-alimentaires à des températures élevées (**Tableau 1**).

**Tableau 1:** Enzymes de dégradation de la paroi cellulaire des plantes extraite d'*Aspergillus* thermophiles et thermotolérants (**Gomes et al., 2016**).

Organismes	Enzyme	Températures extrêmes de croissance	Références
<i>Aspergillus fumigatus M.7.1</i>	Xylanase	65	(Moretti et al., 2012)
<i>Aspergillus fumigatus M.7.1</i>	Endoglucanase	70	(Moretti et al., 2012)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo- PGase	55	(Devi et Appu, 1996)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo- PGase	50	(Devi et Appu, 1996)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo- PGase	55	(Anjana et Appu, 1996)
<i>Aspergillus niger HFD5A-1</i>	PGase	45	(Ibrahim et al., 2014)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Exo- PGase	55	(Pedrolli et al., 2008)
<i>Aspergillus awamori</i>	PGase	50	(Dey et al., 2014)

## 2.2 Importances des enzymes thermophiles

Les enzymes thermostables sont devenus le centre d'intérêt biotechnologique parce qu'elles sont plus tolérantes aux conditions des processus industriels et du stockage. Elles réduisent le risque de la contamination par des microorganismes mésophiles, diminuent la viscosité du milieu réactionnel, augmentent la biodisponibilité et la solubilité des composés organiques. Elles sont responsables aussi de l'augmentation des coefficients de diffusion des substrats et des produits, qui se traduisent par des taux de réaction plus élevés (**Gomes et al., 2016**).

*L.A. niger*, *L.A. oryzae*, *L.A. wentii* et *L.A. flavus* sont généralement les plus producteurs de pectinase. Elles jouent un rôle important dans de nombreuses industries alimentaires, sont largement utilisées dans les textiles pour la régénération des fibres végétales ainsi que pour la production biologique de tissus de coton. Il résout le problème de la rétention dans le

blanchiment mécanique de la pâte, ainsi qu'améliore la qualité du thé noir (**Satyanarayana et Kawarabayasi, 2013**).

### 3 Le genre *Aspergillus*

#### 3.1 Définition et caractéristiques générales

Les espèces d'*Aspergillus* sont des champignons filamenteux que l'on trouve couramment dans le sol, la végétation en décomposition, les graines et les grains, où ils se développent sous forme de saprophytes. Les espèces d'*Aspergillus* peuvent parfois être nuisibles pour l'homme. La plupart des espèces d'*Aspergillus* se trouvent dans une grande variété d'environnements et de substrats sur la terre tout au long de l'année. Seules quelques espèces bien connues sont considérées comme des agents pathogènes opportunistes importants chez l'homme. Certaines espèces d'*Aspergillus* sont connues pour être capables de produire des métabolites secondaires ou des mycotoxines (**Mousavi et al., 2016**).

#### 3.2 Identification des *Aspergillus*

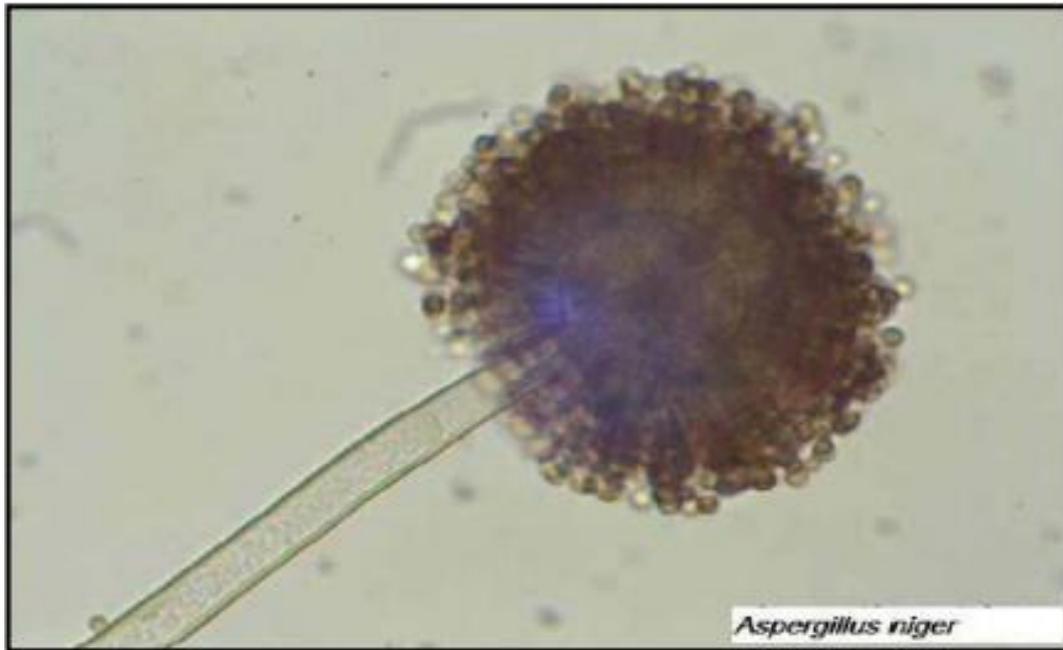
L'identification des *Aspergillus* en général se fait par la description morphologique des colonies sur la gélose et des têtes aspergillaires sous le microscope optique, les milieux les plus utilisés pour l'identification d'*Aspergillus* sont les milieux gélosés additionnés d'extraits de malt et le milieu Czapek contenant un ou plusieurs antibiotiques.

Les têtes aspergillaires sont produites après 48 h de croissance et leur aspect morphologique permet d'identifier les différentes espèces en fonction de la taille, la forme et la couleur des têtes aspergillaires, la forme et aussi la taille des vésicules, des phialides et des conidies (**Melloule, 2015**). Mais certains espaces sont très similaires et ne peuvent pas identifier les ascospores de plusieurs espèces étaient semblables au niveau de la forme et de la structure (microscopie électronique à balayage), les rendant impossibles à différencier l'utilisation d'outils moléculaires comme le séquençage partiel du gène est indispensable pour la caractérisation de certaines espèces (**Samson et al., 2007**).

#### 3.3 *Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger* a été décrit en 1867 par le botaniste français Philippe Edouard Léon van Tieghem. (**Dijksterhuis et Wösten, 2013**). C'est un champignon filamenteux, ascomycète de l'ordre des Eurotiales qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et les légumes (**Raper et Fennel, 1977**).

*Aspergillus niger* est caractérisé par des têtes conidiennes, bilatérales et radiées, disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires (Zulkifli et Zakaria, 2017) (Figure1). C'est un champignon important pour une utilisation dans la récolte post-fermentation des produits de la paroi cellulaire. En raison de sa stabilité génétique, de ses rendements élevés et de sa capacité à utiliser des matériaux peu coûteux (Botton et al., 1990).



**Figure 1:** Structure de l'*Aspergillus niger* (Kiran, 2016).

#### 4 Taxonomie

La taxonomie de la section nigri fait l'objet d'une nouvelle enquête en utilisant la taxonomie polyphasique, qui fait appel à différentes méthodes (morphologique, physiologique, production de métabolites et données moléculaires importantes) dans le but de simplifier et élucider la taxonomie confuse de cette section (Silva et al., 2011). La description taxonomique est la suivante :

**Tableau 2:** Position systématique d'*Aspergillus niger* (Abd Mallick, 2019).

Règne	Fungi (mycetes)
Division	Eumycota
Classes	Hyphomycètes
Order	Moniliales

<b>Famille</b>	Trichocomaceae
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Espèce</b>	<i>niger</i>

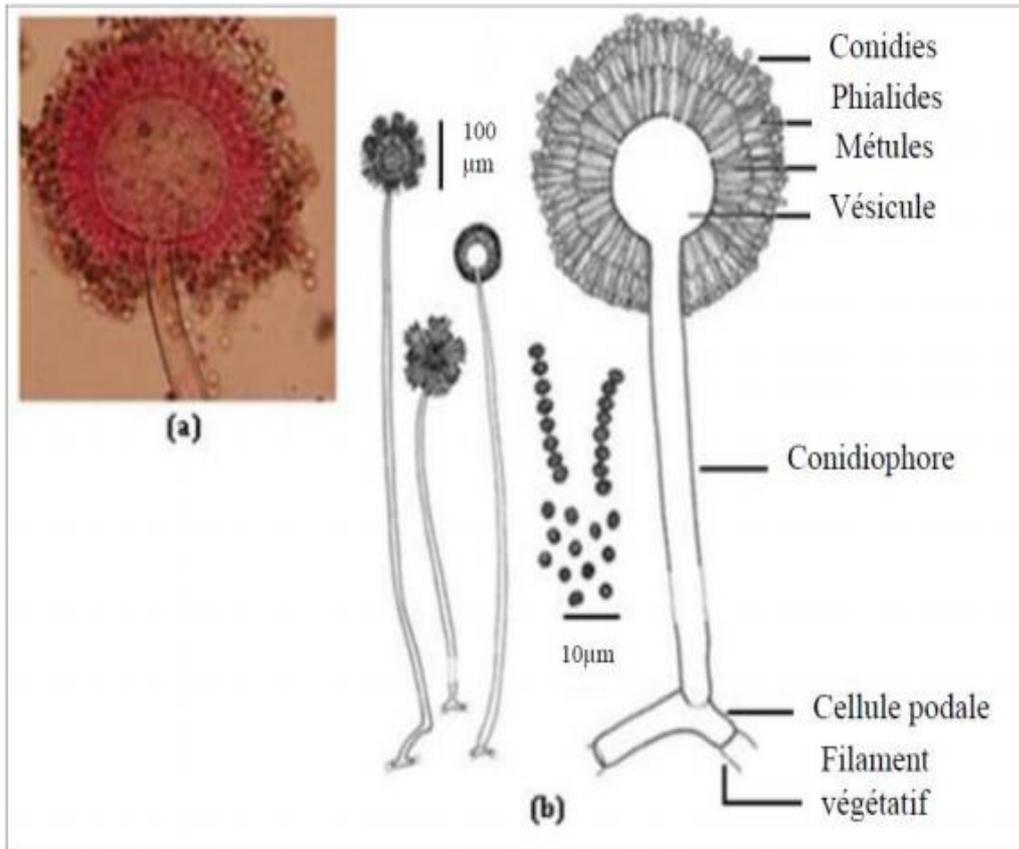
### 5 Ecologie

*L.A. niger* est commun dans de nombreux habitats tempérés et tropicaux, c'est une espèce très commune sur beaucoup de substrats organiques telles que les céréales et produits dérivés. Ces espèces se développent sur la matière organique en conditions aérobies et d'autres substrats tels que le sol cultivé ou pollué, dans les prairies. Ils peuvent même se trouver sur les sols glacés et dans les environnements marins, mais ils préfèrent habituellement les sols secs et chauds (Schuster et al., 2002).

### 6 Morphologie

#### 6.1 Aspect microscopique

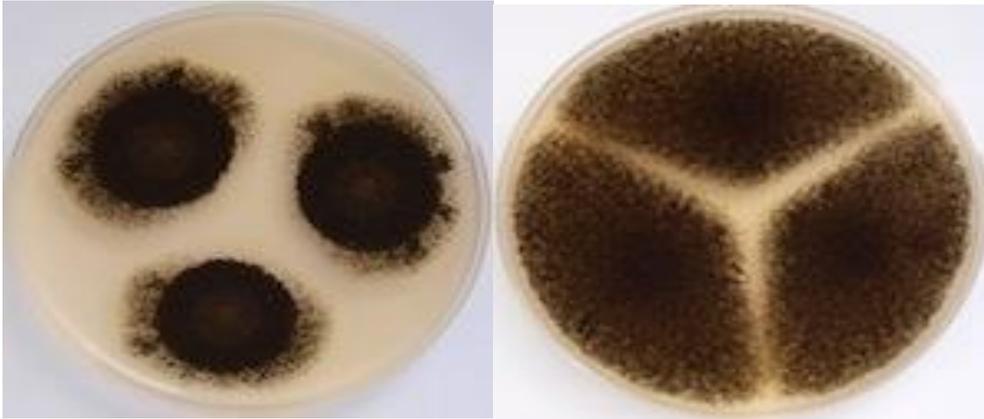
La morphologie microscopique de *l'A. niger* a montré de grandes têtes conidiennes noires, globulaires, qui deviennent rayonnantes, ayant tendance à se diviser en plusieurs colonnes libres ave ou devenant sombres vers la vésicule. Les têtes conidiennes sont biserials (disposés en deux cycles ou verticilles), avec les phialides nées sur des métules brunes, souvent septées. Les conidies sont globulaires a sous les globulaires, noires et a la paroi rugueuse (**Figure 2**). La capacité des conidies à produire des conidiophores après la germination dépend de la température et des nutriments fournis dans le milieu (George et Ramteke, 2019)



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

## 6.2 Aspect macroscopique

Macroscopiquement, des colonies blanches étaient visibles sur les surfaces de gélose et développaient parfois des teintes jaunes sur lesquelles se forment ensuite des conidiophores noirs (**figure 3**). Avec une binoculaire, on observe des tiges fines portant de petites vésicules sphériques blanches qui se transforment en tête spores pigmentées noires portant de nombreuses conidies sur des phialides et des métules. Les vésicules rondes et les métules prononcées peuvent être considérées comme une caractéristique de *A. niger* (George et Ramteke, 2019).



**Figure 3:** Aspects macroscopiques d'*Aspergillus niger* (Luisa et Correia, 2013).

### 7 Besoins nutritionnels

La croissance de *Aspergillus niger* dépend de la présence de nombreux nutriments essentiels, notamment la source de carbone, azote et minéraux, et elle est également liée aux conditions physiologiques du milieu

- **Source d'énergie et de carbone**

Presque tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures, Les *Aspergillus* peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés tels que l'amidon, sucres, glucose, glycérol, lactose et fructose ...etc. Les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucre simple. (Guettler et al., 1996 ; Pazouki et al., 2000).

- **Source azotée**

La moisissure *Aspergillus niger* peut utiliser une variété de source azotée, comme l'ammonium, les nitrates ou les acides aminés (histidine et proline). Elle utilise également des substrats complexes tels que le collagène et l'élastine (Krabmann et Bruce, 2005). L'azote est un élément essentiel pour la croissance et la synthèse de nombreuses macromolécules (Hayer et al., 2014). Il améliore également le processus de fermentation afin de produire des enzymes car l'azote augmente la croissance cellulaire et favorise la consommation de sucre (Mattey, 1992 ; Kristiansen et Sinclair, 1978)

- **Eléments minéraux**

Les sels minéraux jouent un rôle très important dans la maintenance du métabolisme cellulaire et de l'activité enzymatique (**Kubicek et Rohr, 1977 ; Papagianni, 2007**). Il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (**Uchicoba et al., 2001**).

### 8 Les facteurs physicochimiques

- **La température et humidité**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance de *Aspergillus niger* qui intervient également dans la sporulation et la germination des spores. La température optimale de croissance de cette moisissure est de 37°C, mais elle peut survivre aussi à 60°C (**John et Ailsa, 2013**). Quant à l'humidité, c'est une espèce xérophile qui peut vivre dans un milieu assez pauvre en eau. On sait qu'il peut s'adapter aux conditions environnementales, de sorte qu'il peut vivre dans un environnement extrêmement humide, où l'humidité relative se situe entre 90 et 100% (**John et Ailsa, 2013**).

- **pH**

Le pH optimal pour la croissance *d'Aspergillus niger* se situe entre 4 et 6,5, mais il peut tolérer et se reproduire en milieu acide jusqu'à pH 2 (**Cahagnier, 1997**).

### 9 Importance industrielle *d'Aspergillus niger*

L'*A. niger* est largement exploité à l'échelle commerciale (**Kimran, 2014**) et est devenu l'une des clés de la biotechnologie industrielle, car cette espèce est une source très efficace dans la production d'enzymes dégradant les polysaccharides (en particulier l'amylase, les pectinases et les xylanases) ou d'acides organiques (principalement l'acide citrique) (**Andersen et al., 2011**) (**Tableau 3**).

## Chapitre 01 : Les Champignons filamenteux

**Tableau 3:** Utilisation industrielle et la production des enzymes par la moisissure *Aspergillus niger*

Utilisation de l' <i>Aspergillus niger</i>	Espèce	Substrat/ milieu	Références
Production de protéines hétérologues	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Broekhuijsen et al., 1993)
Production de l'acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Kessas et al., 2012)
Dégradation du nylon 6	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Hassan et al., 2013)
la biosorption des métaux lourds	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Dursun, 2003)
L'analyse des sols	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Raper et Fennell, 1965)
Tester l'efficacité des traitements de préservation	<i>Aspergillus niger</i>	/	(Jong et Gantt, 1987)
Production de Cellulase	<i>A. niger</i> KK2.	Son de blé+ La paille de riz.	(Kang et al., 2004)
Production de Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Graines de coton en poudre	Wang et al., 2006.)
Production de xylanase	<i>A. niger</i> XY-1	Son de blé	(XU et al., 2008)
Production de xylanase	<i>A. niger</i> KK2	La paille de riz+ son de blé	(XU et al., 2008)
Production de hemicellulase et de protéases	<i>Aspergillus niger</i>	Confits, graines de coton en poudre	(Wang et al., 2006).
Production de lipase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé + l'huile d'olive	(Mahadik et al., 2002).
Production de Polygalaturonase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé	(Fantana et al., 2005).
Production de phytase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé + farine de soja	(Krishna et Nokes, 2001)
Production de glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	Confits, graines de coton en poudre	(Wang et al., 2006)
Production de protéase	<i>A. niger</i> Z1 <i>Aspergillus niger</i>	Milieu Czapek Dox. Son de blé	(Coral et al., 2003 ; Villegas et al., 1993 ; Demain et Davies, 1999)

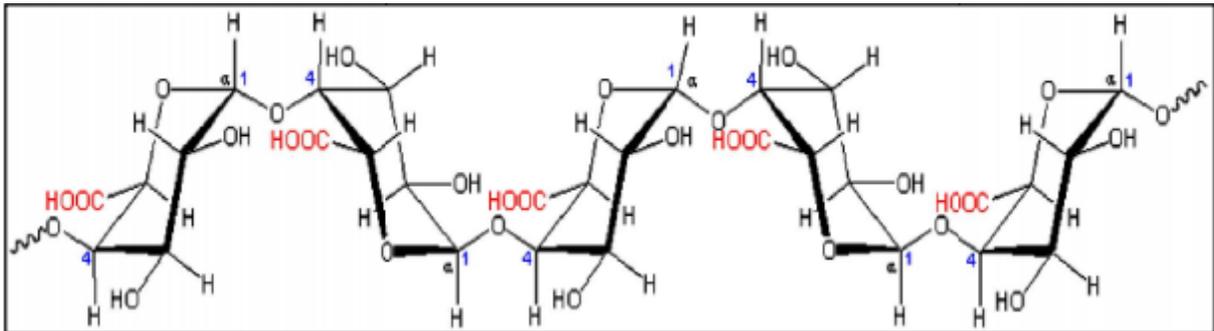
# **Chapitre 02**

Enzymes glycolytiques  
"Pectinases"

### 1 La pectine

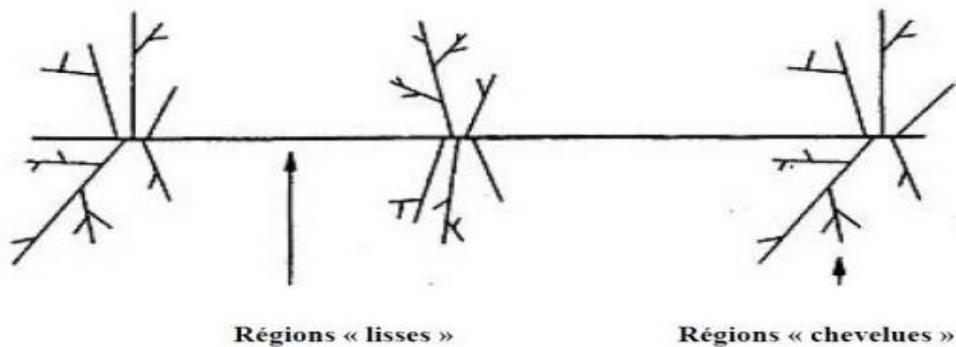
Les pectines sont des polysaccharides complexes que l'on trouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures. Ce sont des substances d'origine végétale (Chetouani, 2018). Elles sont caractérisées par un squelette d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique et de faibles quantités de  $\alpha$ -L-rhamnose plus ou moins ramifiés (Ridley et al., 2001) (Figure 4).

La pectine est définie aussi comme un polymère de l'acide galacturonique qui peut être estérifié par du méthanol ou amides (Mojsov et al., 2016).



**Figure 4:** Molécule de pectine (Fishman et Jen, 1986).

La pectine présente une chaîne principale homogalacturonique (zone lisse nommée HG) et une chaîne rhamnoglucuronique (zone hérissée nommée RG) et le rhamnoglucuronane II (RGII) (De Vries et al., 1982) (Figure 5).

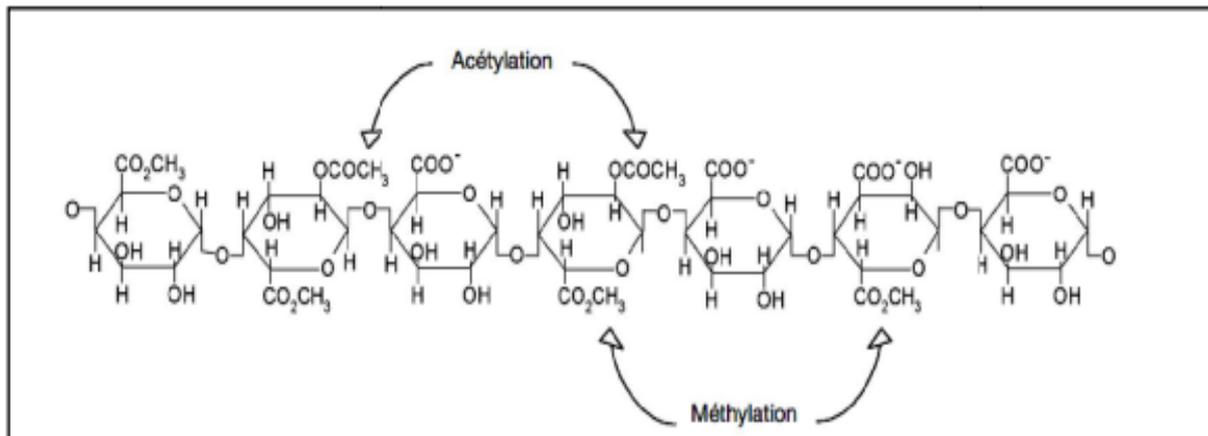


**Figure 5:** Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines.

(Voragen et al., 2003).

### 1.1. Homogalacturonane (HG)

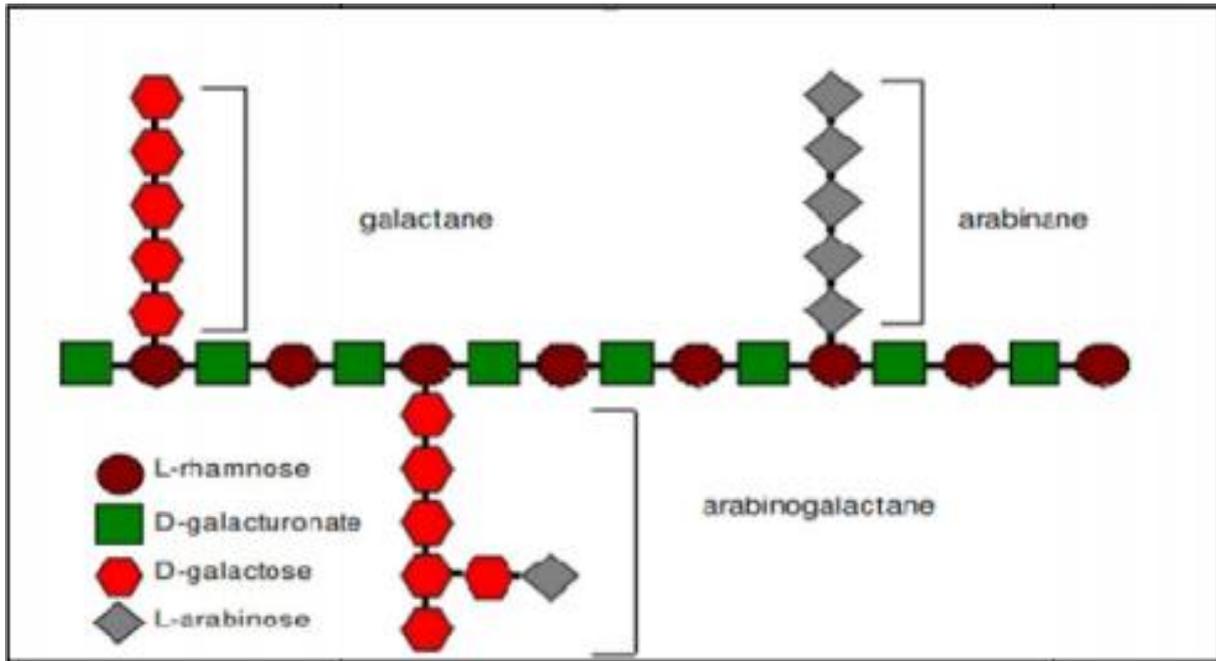
Les homogalacturonanes sont les principales chaînes qui composent les pectines (représentant plus de 60%) (WatreLOT, 2013). L'HG est un polymère linéaire de résidus d' $\alpha$  (1,4) Dgalacturonate (GalA). Les résidus de GalA peuvent être méthylestérifiés en C6 et être O-acétylé en O2 et O3 (Figure 6). La longueur de ces chaînes peut aller de 70 à 100 résidus d'acide galacturonique dans le citron, la betterave sucrière ou dans la pomme (Thibault et al., 1993), c'est-à-dire présentant des masses molaires 12 à 20 kDa. Ils forment la zone lisse des pectines (Sebaoui, 2018).



**Figure 6:** Structure primaire d'un Homogalacturonane (HG) (Sebaoui, 2018).

### 1.2. Ramnogalacturonane I (RGI)

Les ramnogalacturonanes de type I représentent de 20 à 30% des pectines de la paroi des plantes supérieures. Le RGI est composé de la répétition d'une unité disaccharide, leur squelette consiste en un enchaînement de résidus d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique liés en (1-4) et de résidus de  $\alpha$ -L-rhamnose liés en (1-2) (WatreLOT, 2013). De nombreux oses peuvent se lier sur les résidus rhamnosyl en C-4 ou sur les chaînes d'acide galacturonique, dont les plus dominants sont : l'arabinose, le galactose et les arabinogalactanes (Sebaoui, 2018) (Figure 7).



**Figure 7:** Structure du rhamnogalacturonane I (RG I) (Sebaoui, 2018).

### 1.3. Rhamnogalacturonane II

Les rhamnogalacturonanes de type II comprennent approximativement neuf résidus de GalA auxquels sont unies quatre chaînes latérales complexes, nommées A, B, C et D (O'Neill et al., 2004).

Ces chaînes latérales sont constituées d'au moins 12 résidus glycosyles différents : 3-C-hydroxymethyltetrose, 3-C-carboxyl 5-déoxy-Lxylose (acide L-acérique), 2-O-méthyl L-fucose, 2-O-méthyl D-xylose, L-galactose, acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique, acide 2-kéto-3-déoxy-D manno-octulosonique, L-arabinose, D galactose, L-rhamnose, D-acideglucuronique et D-GalA (O'Neill et al., 2004).



## Chapitre 02 : Enzymes glycolytique

degré de méthyl estérification et répartition des groupements méthylesters. Ainsi, une pectine sera d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible, que sa structure est fortement ramifiée et que ces fonctions carboxyliques sont engagées dans une estérification avec le méthanol. (taux de méthyl estérification fort) (Sebraoui, 2018).

### 4 Source de la pectine

Les pectines sont principalement abondantes dans tous les végétaux, en particulier les légumes et les fruits (**Tableau4**). Elles représentent environ 0,5 à 4 % du poids frais du matériel végétal avec une masse moléculaire variant de 10 à 400 KDa (Thakur et al., 1997).

Les sources industrielles principales sont le marc de pomme et les écorces d'agrumes comme les citrons, les oranges. D'un point de vue nutritionnel, les pectines sont considérées comme des fibres solubles ayant une forte capacité de rétention d'eau (Donato, 2004).

**Tableau 4:** Teneur en pectine de différents fruits et légumes (Jayani et al., 2005).

Fruits/légumes	Tissus	Substance pectique (%)
Pomme	Fraiche	0.5-1.6
Banane	Fraiche	0.7-1.2
Pêche	Fraiche	0.1-0.9
Fraise	Fraiche	0.6-0.7
Cerise	Fraiche	0.2-0.5
Pois	Fraîche	0.9-1.4
Carotte	Matière sèche	6.9-18.6
Pulpe d'orange	Matière sèche	12.4-28.0
Pomme de terre	Matière sèche	1.8-3.3
Tomate	Matière sèche	2.4-4.6
Pulpe de betterave à sucre	Matière sèche	10.0-30.0

### 5 Structure des pectines

La structure principale des pectines est formée de chaînes linéaires faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1→4), sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères .

Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  (Brudieux, 2007).

### 6 Les enzymes pectinolytiques

#### 6.1 Définition

Les pectinases sont un groupe d'enzymes hétérogène qui catalysent la dégradation des substances pectiques (KC et al., 2020), elles sont très répandues dans la nature et sont produites par des bactéries, des levures, des champignons et des plantes.

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon les substrats préférés (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), et leur mécanisme d'action sur les molécules de pectine (Satapathy et al., 2020).

#### 6.2 Les sources de la pectinase

Les enzymes dégradant la pectine sont largement distribuées dans les plantes supérieures et surtout les microorganismes (Sharma et al., 2012) (Tableau 5), 50% d'entre eux proviennent de champignons et de levures, 35% de bactéries et le reste 15% d'origine végétale ou animale. (Garg et al., 2016).

**Tableau 5:** Sources de microorganismes pectinolytiques (Nighojkar et al., 2019).

Source	Microorganisme	Référence
Sol d'un site de déchets de prunes et d'orchidées	<i>Aspergillus sp</i>	(Sunnotel et Nigam., 2002)
Peau d'orange en décomposition	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Phutela et al., 2005)

## Chapitre 02 : Enzymes glycolytique

Terre de décharge de déchets agricoles	<i>Aspergillus niger</i>	(Patil et Dayanand., 2006)
Pelures d'agrumes	<i>Aspergillus niger</i>	(Martos et al., 2009)
Déchets agricoles	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp</i>	(Zeni et al., 2011)
Orange pourrie	<i>Aspergillus niger</i>	(Darah et al., 2013)
Mangue pourrie	<i>Aspergillus niveus</i>	(Maller et al., 2011)
Chêne ( <i>Quercus spp.</i> )	<i>Penicillium</i> <i>Pinophilum</i>	(Ruiz et al., 2012)
Pâte d'olive et olives	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	(Sanchez et al., 2015)
Site de traitement des sols de fruits	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus tubingensis</i>	(Patidar et al., 2017 ; Patidar et al., 2016)
Usine de pâte et papier, écorce de mûrier, légumes et fruits	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i> <i>Bacillus sp</i>	(Sittidilokratna et al., 2007)
Déchets agricoles et végétaux	<i>Bacillus sp</i>	(Soares et al., 1999)
Légumes pourris	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Rehman et al., 2014)
Échantillone de sol	<i>Bacillus pumilus</i>	(Sharma et Satyanarayana., 2006)
Sol, eau, fruits et légumes pourris	<i>Bacillus sp.</i>	(Tariq et Latif., 2012)
Sols contaminés par les effluents de l'industrie du papier et de la pâte à papier	<i>Bacillus subtilis</i>	(Kaur et al., 2011)
Déchets de cuisine en décomposition	<i>Bacillus subtilis</i>	(Gupta et al., 2008)
Micro filtres en fibre de verre	<i>Geotrichum klebahnii</i>	(Zapata et Voget., 2012)

### 6.3 Classifications des enzymes pectinolytiques

La dégradation de la substance pectique se fait par différents types d'enzymes (**tableau 6**) pour cela leur classification principalement basée sur deux principes mode d'action ou la mode de clivage et la spécificité au substrat de l'enzyme.

**Tableau 6:** Les différents types d'enzymes pectinolytiques, leur mode d'action et leurs produits de réaction (**Kanungo et Bag, 2019**).

Enzyme	EC N°	Substrat	Type de réaction	Produit
<b>Endo-PG</b>	3.2.1.15	Acidepectine	Hydrolyse	Oligogalacturonides
<b>Exo-PG</b>	3.2.1.67	Acidepectine	Hydrolyse	Monogalacturonides
<b>Exo-PG</b>	3.2.1.82	Acidepectine	Hydrolyse	Digalacturonate
<b>Rhamnogalacturonase</b>	3.2.1.171	RG-I	Hydrolyse	Oligosaccharides avec $\beta$ -d-GalA
<b>RG-galacturonohydrolase</b>	3.2.1.173	RG oligosaccharides	Hydrolyse	l'acide d-galacturonique
<b>RG-rhamnohydrolase</b>	3.2.1.174	RG oligosaccharides	Hydrolyse	$\beta$ -l-Rhamnose
<b>Endo-xylogalaturonan hydrolase</b>	3.2.1.	Pectine	Hydrolyse	Oligogalacturonidesxylosylés
<b>Pectinelyase</b>	4.2.2.10	Pectine	$\beta$ -Elimination	Galacturonidesinsaturés
<b>Pectatelyase (PGL)</b>	4.2.2.2	Acidepectine	$\beta$ -Elimination	Galacturonidesinsaturés
<b>exo-pectatelyase</b>	4.2.2.9	Acidepectine	$\beta$ -Elimination	Galacturonidesinsaturés
<b>Endo-lyase</b>	4.2.2.23	RG-I de la pectine	$\beta$ -Elimination	l-Rhamnopyranose + acide d-

## Chapitre 02 : Enzymes glycolytique

				galactopyranosyluronic e insaturé
<b>Exo-lyase</b>	4.2.2.24	RG oligosaccharides	$\beta$ - Elimination	Disaccharide + insaturéacide galactopyranosyluronic e
<b>Pectinéméthylestérases</b>	3.1.1.11	Acidepectine	Hydrolyse	Acidepectique + méthanol
<b>Pectineacétylestérases</b>	3.1.1.6	Acidepectine	Hydrolyse	Acidepectique + alcool
<b>Acétylestérases</b>	3.1.1.86	RG-1	Hydrolyse	Désacétylé RG-I

### 6.4 Protopectinases

Le terme protopectinase (PPase) (**EC 3.2.1.99**) a d'abord été appliqué à l'enzyme qui hydrolyse ou dissout la protopectine (**Patidar et al., 2018; Hours et Sakai, 1994**). Elles sont classées en deux types.

- Type A réagit avec la région de l'acide polygalacturonique de la protopectine
- Type B réagit avec les polysaccharides qui constituent la paroi cellulaire. Les chaînes qui peuvent relier à la chaîne d'acide polygalacturonique (**Pedrolli et al., 2009**).

### 6.5 Pectines méthylestérases

Les pectines méthylestérases PME (**EC 3.1.1.11**) sont des enzymes classées dans la famille 8 des carbohydrates estérases. Elles catalysent l'hydrolyse des méthyles estérifiés sur certains groupements carboxyles des acides galacturoniques en méthanol et en protons (**Leroux, 2015**).

Elles ont été mises en évidence dans tous les organes : fruits, feuilles, tiges, fleurs et racines, et sont le plus souvent associées à la paroi végétale par des interactions ioniques. Les PME sont des enzymes de taille moyenne avec une masse molaire comprise entre 25 et 54 kDa. (**Videcoq, 2011**).

### 6.6 Pectines acétyl estérases

Les pectines acétyl estérases PAE (EC 3.1.1.6). Elles ont été caractérisées chez les plantes, les bactéries et les champignons. Elles peuvent d'acétyler les HG, mais également les rhamnogalacturonanes du type I (Danielle et al., 2009)

Elles ont une activité optimale dans des pH acides entre 5 et 6,5. Enfin, l'activité PAE semble être amplifiée sur les substrats préalablement déméthylestérifiés (Chen, 2018).

### 6.7 Pectates lyases

Les pectates lyases ou polygalacturonate lyases ou pectate transéliminases (EC 4.2.2.2) ont été découvertes et isolées pour la première fois à partir de la culture d'*Erwinia carotovora* et d'espèces de *Bacillus* (Singh et al., 2019). Elle est clivée les liaisons glycosidiques de préférence dans l'acide polygalacturonique, formant un produit insaturé ( $\Delta$ -4,5-D-galacturonate) par une réaction de transélimination. Contrairement aux pectines lyases, elles ont un besoin absolu en ions  $Ca^{2+}$  et sont classées en tant qu'endo-pectate lyases (EC 4.2.2.2) et exo-pectate lyases (EC 4.2.2.9) (Atanasova et al., 2018).

### 6.8 Pectines lyases

La pectine lyase (EC4.2.2.10) est une enzyme qui catalyse préférentiellement la pectine hautement estérifiée de manière aléatoire en supprimant les liaisons glycosidiques et en produisent des oligogalacturonates de méthyle insaturés comme produits finaux, qui sont principalement produits par le genre de microbes *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, On le trouve également dans certaines plantes et les animaux. Ces enzymes présentent une activité optimale sur une large gamme de pH 5,5-10,5 et de température 35-65°C (Singh et al., 2019).

### 6.9 polygalacturonases (EC 3.2.1.15)

Les polygalacturonases sont la famille des glycosidases (GH28) responsables de la dégradation des substrats homogalacturonane et rhamnogalacturonane de la pectine (Oliyad, 2017 ; Abbott et Boraston, 2007). Leur rôle est d'agir sur l'hydrolyse de la pectine ou du pectique acide. La PGase situé dans les chaînes polygalachoronides, aux chaînes d'acide galactoniques de petite taille moléculaire sont enfin en acide monogalactonique.

Son activité maximale apparaît sur les acides pectiques, alors que cette activité diminue considérablement lorsque la teneur en méthoxyle dans le substrat augmente (Ibiam et Arinze, 2007).

### 6.9.1 Origines des polygalacturonases

- **Origine végétale**

Les polygalacturonases produites par les plantes au niveau intracellulaire fragilisent les membranes cellulaires, ce processus est nécessaire à la croissance de la plante (**Hadfield et Bennett, 1998**). Le fruit produit aussi des polygalacturonases car elle est nécessaire à la maturation (changement de couleur et de goût) et au ramollissement du fruit (**Hadfield et Bennett, 1998 ; Morgutti et al., 2006**). De plus, les PGase sont aussi nécessaires pour la germination et la croissance du tube pollinique dans le pistil et pour le développement et la maturation du pollen jusqu'à sa sortie pour la pollinisation (**Hadfield et Bennett, 1998**).

- **Origine animale**

Les origines animales de la PGase sont les insectes et les nématodes (**Di Matteo et al., 2006**), tels que : *Meloidogyne incognita* (**Jaubert et al., 2002**) et *Ditylenchus dipsaci* (**Barker, 1996**), *sitophilus oryzae* (**Shen et al., 2003**)

- **Origine microbienne**

Plus de 30 genres différents de bactéries et de champignons ont été utilisé pour la production de la polygalacturonase (**Nighojkar et al., 2019**), et spécifiquement les endo PGases sont largement répandus parmi les champignons, les bactéries et les levures (**Sharma et al., 2012**).

- **Origine bactérienne**

Presque toutes les enzymes dégradant la pectine utilisée dans les applications industrielles sont produites par des champignons, mais certaines souches bactériennes peuvent également produire ce type d'enzymes. (**Padma et Anuradha, 2015**).

Le genre *Bacillus* est l'espèce bactérienne la plus importante qui produit la PGase, telle que *B. subtilis*, et *B. licheniformis*, ces bactéries sont responsables d'environ 50 % de la production totale d'enzymes (**Jahan et al., 2017**). Le PGase été signalé aussi en les autres espèces notamment *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *E. chrysanthème*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum* (**Blanco, 1998**).

- **Origine fongique**

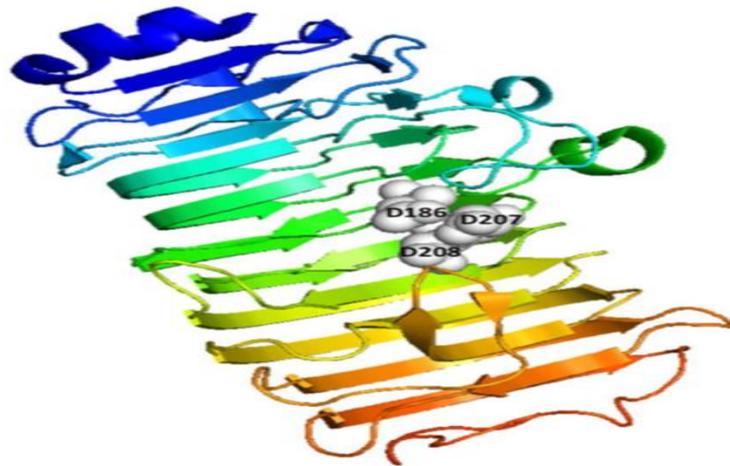
Parmi les espèces fongiques, les champignons filamenteux sont la meilleure source de production de PGase (**Jayani et al., 2010**), car la technique de fermentation utilisée pour produire l'enzyme imite leur environnement naturel. Cela permet la synthèse de grandes quantités d'enzymes (**Palagiri et al., 2019**), en particulier les genres *Aspergillus*, tels que *A. niger*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus* et *A. flavus*. Mais ce n'est pas le seul car il existe de nombreux autres types de champignons qui produisent du PGase, y compris *Penicillium*, *Neosartorya fischeri*, *Bispora sp* et *Talaromyces leycettanus* (**Xu et al., 2020**).

- **Origine levurienne**

Différentes espèces de levures productrices de polygalacturonase sont utilisées industriellement pour améliorer la qualité des jus de fruits, telles que : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces marxianus* et *Cryptococcus albidus*. (**Naumov et al., 2016 ; Blanco, 1998**).

### 6.9.2 Structure de la polygalacturonase

La première structure cristalline de la PG fongique qui a été élucidée est celle du PG II d'*A. niger*. Les protéines PGase se replient en une hélice parallèle droite  $\beta$  avec 10 tours complets, et leur fente de site actif est ouverte aux deux extrémités N et C (**Figure 9**). Cette caractéristique est conforme à la classification de la PGase dans la famille des protéines glycoside hydrolase 28. Trois résidus d'aspartate dans la fente sont essentiels pour la réaction catalytique et sont fonctionnellement conservés entre les endo- et les exoPG. Bien que les PGase de *Pectobacterium carotovora* et d'*A. niger* ne partagent que 19 % d'identité, les deux structures sont très similaires et peuvent être superposées (**Nakamura et Iwai, 2019**).



**Figure 9:** Structure 3D de l'Endo PGase I d'*Aspergillus niger* (Nakamura et Iwai, 2019).

### 6.9.3 Mécanisme d'action

Les PGases sont spécifiquement interactives grâce à hydrolyse et scission de la liaison glycosidique en présence des molécules d'eau à travers le pont d'oxygène. Au cours de l'interaction avec les substrats, la viscosité de la solution réduite dans une plus large mesure avec une augmentation de la fin de réduction. Les polygalacturonases généralement classées en deux groupes (Satapathy et al., 2020) (Tableau 7).

**Tableau 7:** Classification de polygalacturonase (Garg et al., 2016).

Nom proposé par EC	Substrat	Mode d'action et clivage	Produite
➤ <b>Exopolygalacturonases 1</b> (EC 3.2.1.67)	Pectate	➤ Clivage terminal de l'extrémité non réductrice de l'acide polygalacturonique	➤ Mono-Galacturonates
➤ <b>Exopolygalacturonase 2</b> (EC 3.2.1.82)		➤ Clivage de pénultième	➤ Di-galacturonate
<b>Endopolygalacturonase</b> (EC 3.2.1.15)	Pectate	Clivage aléatoire de l'acide pectique	Oligo-galacturonates

- **Les endopolygalacturonases**

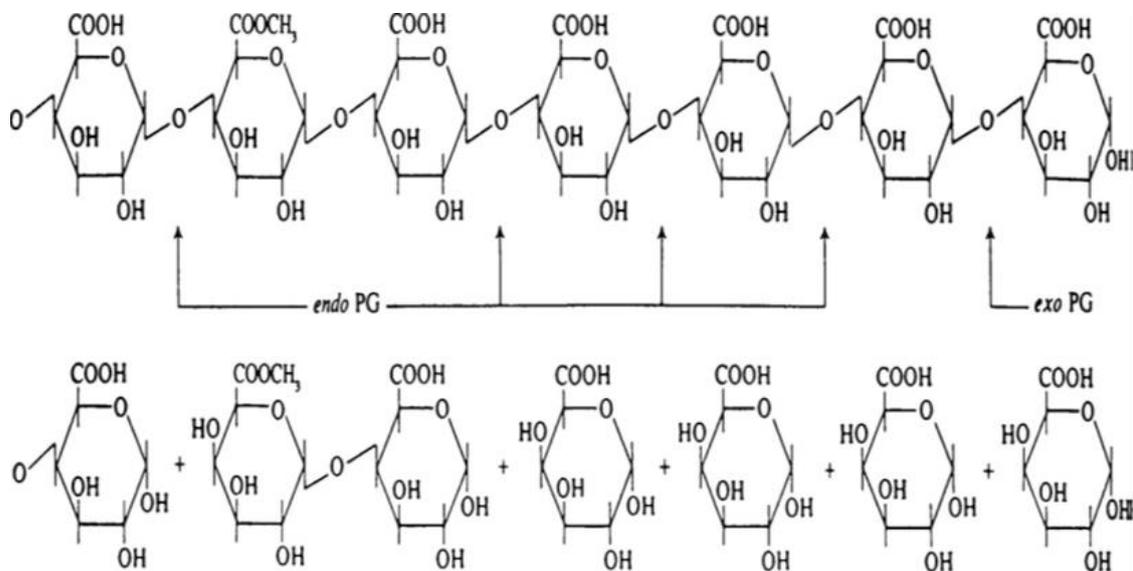
L'endo-polygalacturonase (EC 3.2.1.15) est un hydrolytique endo actif capable d'hydrolyser l'enzyme à 1, 4 glycosidiques liaisons entre l'acide galacturonique non estérifié

adjacent des groupes d'une façon aléatoire. L'endo-polygalacturonase peut attaquer ces régions en libérant des pectines avec un degré élevé d'estérification du méthyle (**Donaghy et Mckay, 1994**).

- **exopolygalacturonases**

Les exo-polygalacturonases (**EC 3.2.1.67**) Cible l'extrémité non réductrice des polymères de la pectine pour libérer le monosaccharide Gala comme un produit final

Certaines protéines PGase peuvent effectuer les deux réactions exoPGase et endoPGase, et il produit enfin des oligomères GalA (**Garg et al., 2016 ; Celorio-Mancera et al., 2009**).



**Figure 10:** Action des exo- et endopolygalacturonases. (**Picot-Allain, 2020**).

## 7 Applications des enzymes pectinolytiques

La production de pectinase occupe environ 10 % de la fabrication globale des préparations enzymatiques. Au fil des ans, les pectinases ont été utilisées dans plusieurs processus industriels (**Tableau8**), tels que le textile, le traitement des fibres végétales, le thé, le café, l'extraction d'huile, le traitement des eaux usées industrielles ...etc (**Shet et al., 2018**).

## Chapitre 02 : Enzymes glycolytique

**Tableau 8:** Application industrielles des enzymes pectinolytiques (Nevalainen, 2020).

Domaine d'application	Processus enzymatique	Référence
<b>Extraction du jus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dégradation de la pectine</li> <li>✓ amélioration de la filtrabilité et réduction de la viscosité</li> <li>✓ Amélioration du pressage de la pulpe, ce qui permet augmentation du rendement en jus</li> </ul>	(Sharma <i>et al.</i> , 2017 ; Ramadan., 2019)
<b>Clarification des jus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Réduction de la répulsion électrostatique qui provoque des protéiniques des floculants pour les agrégats, les rendant plus facile à supprimer.</li> </ul>	(Kashyap <i>et al.</i> , 2001)
<b>Confitures, conserves et gelées</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La production de pectine commerciale comme sous-produit d'extraction et clarification du jus, après traitement de fruits avec pectinases</li> </ul>	(BeMiller., 2019 ; Wang <i>et al.</i> , 2013)
<b>Production de vin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Amélioration de la clarté ainsi que de la saveur et la couleur du vin.</li> <li>✓ via l'extraction des anthocyanes, des tanins et des composés phénoliques.</li> </ul>	(Kashyap <i>et al.</i> , 2001 ; Garg <i>et al.</i> , 2016).
<b>Production de café</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Enlèvement de l'enveloppe mucilagineuse des grains de café</li> </ul>	(Villettaz., 1993)
<b>Production de thé</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Prétraitement des feuilles de thé, en extraction et en traitement d'extrait : dégradation de la pectine dans la cellule de la feuille de thé mur</li> </ul>	(Hoondal <i>et al.</i> , 2002 ; Murthy et Naidu., 2011)
<b>Papier et pâte à papier production</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Réduction de la quantité d'énergie nécessaire pour enlever l'écorce du bois</li> </ul>	(Hoondal <i>et al.</i> , 2002 ; Rättö et Viikari., 1996)

# **Chapitre 03**

Production de la polygalacturonase en  
milieu solide

## 1 Fermentation en milieu solide

### 1.2 Définition

La fermentation en milieu solide (FMS) est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde qui apparaît comme la technique la plus adaptée pour les microorganismes fongiques. La FMS est caractérisée par une croissance microbienne des particules solides humides en absence d'eau libre ou sur un substrat proche de sa capacité maximale de rétention (Mitchell *et al.*, 2002). En effet, les microorganismes se développent dans un système à 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. (Stephanie, 2017). La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité en eau ( $A_w$ ) comprise entre 0,65 et 0,98. La FMS doit posséder une humidité relative, suffisante pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des microorganismes (Prevot, 2013).

Il existe de nombreux avantages qui caractérisent le processus de fermentation en milieu solide, mais cela n'exclut pas qu'il existe également certains inconvénients qui empêchent la production des métabolites par ce processus d'être idéale (Tableau 9).

**Tableau 9** : Les avantages et les inconvénients de la FMS (Castilho *et al.*, 2000 ; Aguilaret *al.*, 2008 ; Assamoi *et al.*, 2009).

#### Avantages

#### Inconvénients

Certains substrats peuvent être utilisés directement comme milieu solide ou enrichis en nutriments.	La détermination de paramètres tels que l'humidité, le pH, l'oxygène et le dioxyde de carbone (en raison du manque de dispositifs de surveillance).
Les conditions de culture sont plus similaires à l'habitat naturel des champignons.	Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés.

## Chapitre 03 : production de la polygalacturonase en milieu solide

Les champignons sont capables de se développer et d'excréter de grandes quantités d'enzymes.	Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles
Le produit d'intérêt après extraction est concentré, ce qui facilite sa purification.	Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés.
L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes	Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture.
La quantité de déchets générés est inférieure par rapport à la fermentation en milieu liquide	La mise à l'échelle des processus des FMS a été peu étudiée et présente plusieurs problèmes.
la simplicité et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles des paramètres environnementaux,	/

### 2. Résidus industriels utilisés dans la FMS

L'utilisation des ressources renouvelables principalement les résidus agro-industriels qui sont générés par des entreprises de transformation industrielles de fruits et de légumes en d'autres produits (boisson, confiture, ...). A cet égard, parmi les résidus les plus prometteurs pour la production des enzymes pectinolytiques citons les résidus agricoles et les écorces de fruits. Habituellement, ces résidus agricoles ne sont pas seulement un support solide pour l'absorption des nutriments et la croissance de la biomasse, mais ils sont aussi une source de carbone et d'éléments minéraux. Parfois, il est nécessaire d'apporter un complément afin de fournir tous les nutriments nécessaires à une croissance optimale du micro-organisme et à la production de l'enzyme ciblée (**Samreenet *al.*, 2019**). Les agro-industries les plus importantes utilisées dans la production de pectinase par le processus de fermentation solide sont les suivants :

- **Son de blé**

Le son de blé, principal sous-produit de la transformation de la farine de blé. Il est principalement composé d'amidon (10 à 20 %), de polysaccharides non amylacés (41 à 60 %) et de protéines (15 à 20 %). Ces déchets agro-industriels peut coûteux et facilement disponibles peuvent servir d'excellents substrats de fermentation pour obtenir divers métabolites secondaires précieux tels que des enzymes, des acides organiques, des protéines cellulaires et des prébiotiques d'origine microbienne. Sa valeur nutritive élevée, la taille de ses particules et sa bonne porosité permettent un meilleur ancrage et facilitent l'excrétion des enzymes. Ces vertus en font un bon choix de substrat pour la production d'enzymes (**Teng et al., 2017 ; Biswas et al., 2019**).

- **Bagasse d'orange**

La transformation de l'orange pour obtenir le jus et d'autres sous-produits, tels que l'huile essentielle et le D-Limonène, génèrent une grande quantité de résidus solides industriellement appelées bagasses d'orange humide. Ces résidus sont principalement formés par la peau, la pulpe et les graines. Ces déchets d'oranges par leurs richesses en glucides solubles, en particulier le fructose, le glucose, le saccharose et la pectine constituent une ressource renouvelable peu coûteuse pour la production des enzymes hydrolytiques telles que les pectinases et les cellulases (**Giese et al., 2008 ; Fiorentin et al., 2010 ; Ahmed et al., 2016**).

- **Pulpe de café**

La pulpe de café est le déchet obtenu après le traitement du café humide. En raison de sa richesse en glucides, en pectine, en protéines, en minéraux et en polyphénols, peut-être un excellent substrat pour la production de métabolites microbiens comme les pectinases. (**Boccas et al., 1994 ; Venugopal et al., 2007 ; Frómata et al., 2020**). La pulpe de café est le substrat solide idéal pour la production de pectinase par FMS selon plusieurs études, cette enzyme a été extraite par les différentes espèces fongiques et bactériennes : *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Rhizomucor pusillus*, *Trametes sp* et *Bacillus sp* **Antier et al., (1993), Torres-Mancera et al., (2013), Oumer et Abate, (2018)**.

### **1 Préparation de l'inoculum**

L'inoculum fongique est préparé en utilisant soit une suspension de spores, soit une culture végétative. La taille de l'inoculum est importante dans une FMS. La suspension utilisée pour

l'inoculation est préparée dans de l'eau distillée, par l'addition d'une solution stérile de Tween 80 à 0,2% (Nighojkar et al., 2019).

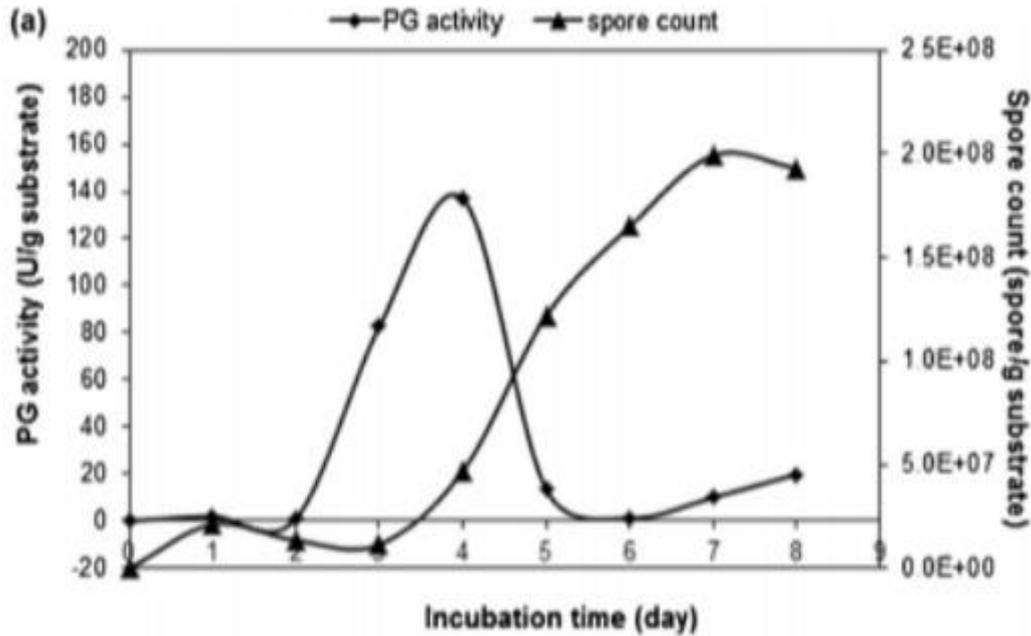
### **2 Conduite de la fermentation en milieu solide**

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont : la préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation du milieu (généralement à 121 °C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci, l'inoculation du milieu de culture à partir d'une suspension de spores, l'incubation du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales comme la température, teneur en eau... (Assamoi et al., 2009).

### **3 Influence des différents paramètres sur la production de la Polygalacturonase par l'*Aspergillus niger* en milieu solide**

#### **▪ Effet de la période d'incubation**

Le temps de culture dépend de la nature du milieu de fermentation, de l'espèce productrice, de la concentration en nutriments et des conditions physiologiques (Irshad et al., 2013). L'activité spécifique de la PGase produite par la moisissure *Aspergillus niger* est obtenue au bout de 72 h de culture selon Demir et al., (2014) (Figure 12). Ces résultats ne sont pas identiques à ceux trouvés par Swain et Ray, (2010) ; Samreen et al., (2019), qui montrent une activité maximale de la PGase produite par *Bacillus subtilius* et *Bacillus firmus* après 36 heures et 96 heures de culture respectivement.

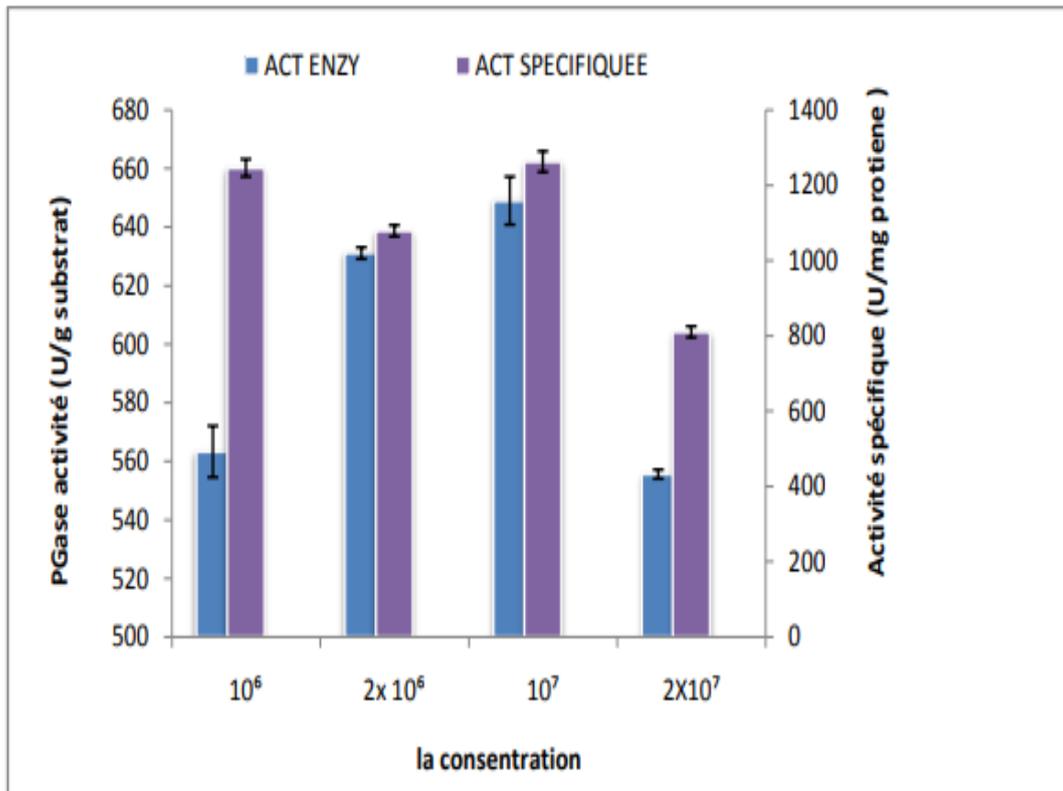


**Figure 11:** Effet de la période d'incubation sur l'activité de la PGase (Demir et al., 2014).

▪ **Effet de la concentration de l'inoculum**

La concentration d'inoculum est un facteur important dans la production de la PGase. En effet, la taille de l'inoculum est l'un des principaux facteurs influençant la croissance et la production de métabolites dans les cultures fongiques (Buyukkileci et al., 2006). Selon Webb et Manan, 2017 la concentration idéale de l'inoculum peut réduire le risque de contamination, et une concentration élevée permet un temps plus court pour l'utilisation du substrat.

D'après les résultats de Demir et al., (2014) une concentration en spores de  $10^7$  spores / g est suffisante pour la production de la PGase par la moisissure *Aspergillus sojae* par une fermentation en milieu solide à base de son de blé. Ce résultat est similaire à celui trouvé par Djama et Abdelilah, (2018) qui montrent qu'une concentration de  $10^7$  spores/g est nécessaire pour la croissance et la production de la PGase par *Aspergillus niger* cultivé sur un milieu solide à base de son de blé (Figure 13).

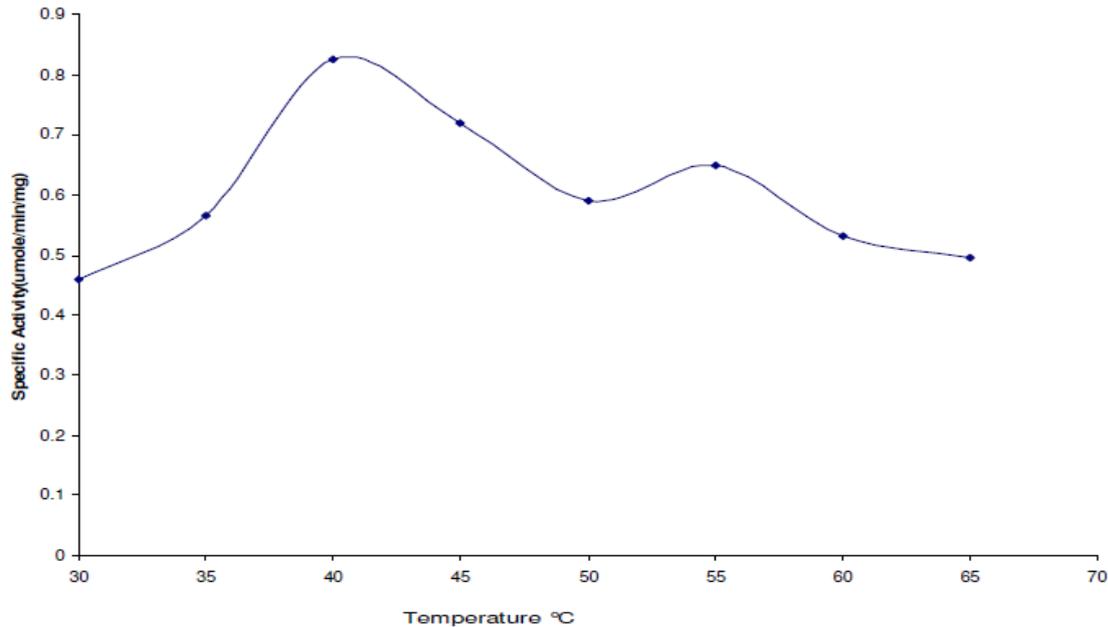


**Figure 12:** Effet de la concentration d'inoculum sur l'activité de la PGase (Djama et Abdelilah, 2018).

- **Effet de la température**

La température est déterminée comme un facteur critique affectant les réponses des enzymes avec leurs substrats. En effet, chaque micro-organisme a sa température optimale de croissance et de production de métabolites (Cao et Wang, 2016). Buga et al., (2010) ont montré que 40 ° C est la température optimale de la production de la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* cultivé sur milieu à base de pomme de terre.

Par ailleurs, une activité spécifique maximale de la PGase est obtenue à 50°C sur un milieu solide à base de son de blé (Anand et al., 2017; Yadav et al., 2017). Cependant, les PGases produites par certaines souches fongiques thermophiles telles que *Aspergillus sojae*, *Paecilomyces variotii* et *Thermoascus aurantiacus* possèdent des températures optimales comprises entre 60 et 70 ° C (Dogan et Tarry, 2008 ; De Lima Damasio et al., 2010 ; Martins et al., 2013).



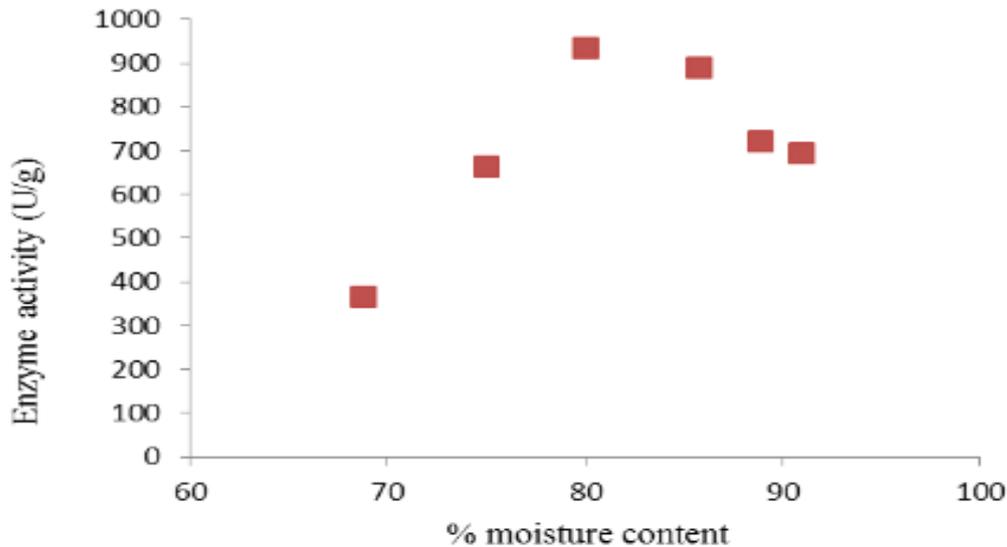
**Figure 13:** Effet de la température sur l'activité de la PGase (Buga *et al.*, 2010).

### ● Effet de l'humidité

L'hydratation est un facteur important qui influence le taux de croissance, l'évolution de la germination, la sporulation et le rendement du produit en FMS (Idrissou et Idir, 2018)

Les résultats de Djama et abdelilah, 2018 indiquent que le taux d'humidité optimale pour la production de la PGase d' *Aspergillus niger* cultivé sur un milieu à base de son de blé est de 60% avec une activité spécifique maximale de 3603,4 U/mg. Cependant Alavi *et al.*, (2019) montrent une production maximale de la PGase par la moisissure *Aspergillus niger* avec un taux d'humidité de 80 %. Selon, abbasi *et al.* , (2011); Castilho *et al.*, (2000); Blandino *et al.*, (2002); Freitas *et al.*, (2006); (Alavi *et al.*, 2019) , le taux d'humidité varie de 40 à 80% pour la production de pectinases sur divers substrats solides avec différentes souches fongiques.

En augmentant l'humidité l'activité enzymatique augmente de manière significative ce qui montre le besoin urgent des micro-organismes en eau pour leur croissance et leur métabolisme (Alavi *et al.*, 2019).



**Figure 14:** Effet du taux d'humidité sur la production de la PGase (Alavi et al., 2019).

### 4 Extraction de la PGase

Après fermentation, une quantité (5g) 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 4500tours/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 (Kaassis et Khanfar, 2019)

### 5 Purification de la polygalacturonase

L'objectif de la stratégie de purification est d'obtenir le plus grand rendement possible de l'enzyme souhaitée avec la plus grande pureté possible (Bajpai, 2014). La plupart des pectinases microbiennes sont extracellulaires et le processus de fermentation est généralement suivi par le prélèvement de cellules du jus de fermentation, soit par centrifugation soit par filtration. L'extrait brut est ensuite concentré par précipitation au sulfate d'ammonium (polygalacturonase isolé à partir d'*Aspergillus niger* a été précipité à 40 à 80 % de saturation) ou avec des solvants organiques (PGase d'*Aspergillus niger* a été précipité à l'acétone à une saturation de 30 %) Suivi d'une combinaison de plusieurs méthodes chromatographiques comme la filtration sur gel et la chromatographie d'affinité. Les précipitations sont généralement utilisées comme une l'étape de séparation. (Buga et al., 2010 ; Venkatanagaraju et Divaka, 2017 ; Anand et al., 2017).

### Chapitre 03 : production de la polygalacturonase en milieu solide

Les différentes méthodes de purification pour l'extraction des différentes pectinases sont résumées dans le **tableau 9**. (Venkatanagaraju et Divaka, 2017).

**Tableau 9 :** Les différentes méthodes de purification pour l'extraction des différentes pectinases (Venkatanagaraju et Divaka, 2017).

Nom d'organisme	Type de fermentations et le substrat utilisé	Poids moléculaire KDa	processus de purification
<i>Aspergillus Sp</i>	Fermentation submergée et FMS pectine-glucose-extrait de son de blé- farine de maïs-saccharose-son de soja- pulpe de betterave-marc de raisin	36-79	Précipitation par le sulfate d'ammonium – Gel Filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Amyoclata Sp</i>	Fermentation submergée	30	Ultrafiltration- Chromatographie échangeuse d'ions- Chromatographie d'interaction hydrophobe
<i>Bacillus Sp</i>	Fermentation submergée et FFS  déchets végétaux	106	Précipitation par le sulfate d'ammonium – Gel filtration-Chromatographie échangeuse d'ions
<i>Botrytis cinerea</i>	Fermentation submergée  déchets végétaux	52	Précipitation par le d'ammonium –Gel filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Erwinia carotovora</i>	Fermentation submergée pectine	42	la saturation en sulfate d'ammonium
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermentation submergée  pectine	75	Précipitation par le d'ammonium – Gel filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Fermentation submergée	56	Précipitation par le d'ammonium – Gel

	pectine		filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fermentation submergée  pectine	31	Précipitation par le d'ammonium – Gel filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Sclerotium Sp</i>	Fermentation submergée- pectine	38	Gel filtration- chromatographie échangeuse d'ions
<i>Streptomyces sp</i>	Fermentation submergée  pectine	32	Précipitation par le d'ammonium – Gel filtration-chromatographie échangeuse d'ions
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Fermentation en milieu solide son de blé- bagasse d'orange	29.3	Gel filtration- chromatographie échangeuse d'ions

## 6 Dosage de l'activité enzymatique de la PGase

L'activité enzymatique est déterminée selon la méthode de Miller., (1959) dans un volume réactionnel de 100µl de l'extrait enzymatique avec 100µl de substrat (tampon Acétate de sodium). L'incubation est faite à 40 °C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 400 µl de DNS. Le mélange est chauffé au bain marie à 100 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, puis 4.4 ml d'eau distillée sont ajoutées. La densité optique est déterminée à 540 nm (Soro, 2007 ; Djama et Abdililah, 2018).

### 3. Caractérisation de la polygalacturonase purifiée

- **Effet de la température**

La température est un facteur important qui régule l'activité enzymatique. Les propriétés caractéristiques des protéines telles que les interactions hydrophobes, la liaison hydrogène et la force ionique résistent à la dénaturation thermique des enzymes. Généralement, les températures optimales de PGases varient entre 40 à 50°C. (Favela-Torres *et al.*, 2006 ; Nazir *et al.*, 2019). La température optimale de la polygalacturonase purifiée d'*Aspergillus niger* est de 50°C et l'enzyme maintient son activité maximale entre 10 et 40°C pour 30 min. Une température optimale similaire a été rapportée pour la PGase de *Rhizopus oryzae* (Anand *et al.*,

2017).

- **Thermostabilité**

Les enzymes d'origine naturelle ne sont pas utilisées en raison de leur stabilité limitée dans les conditions de travail requises. Elles sont donc été remplacées par des enzymes extraites de micro-organisme thermophiles, en raison de leur plus grande stabilité thermique par rapport à leurs homologues mésophiles. Exemple des enzymes les plus courantes produites par ces microorganismes citons les pectinases (**Rigoldi et al., 2018**).

Dans le cas de la polygalacturonase, Les champignons représentent une source idéale pour produire des PGases thermostables avec des hauts rendements. Jusqu'à présent, plusieurs PGase thermophiles ont été identifiées chez *Rhizomucor pusillus*, *Thermoascus aurantiacus*, et *Thermomyces lanuginosus*. Ces PGases présentent généralement des optima de température élevés (55-65°C) et une thermostabilité de 50°C (**Cheng et al., 2016**).

La stabilité thermique de la PGase d'*Aspergillus niger* purifiée sur un milieu solide à base de son de blé révélant une stabilité maximale jusqu'à 40°C et l'activité a diminué nettement au-dessus de cette température. Environ 53 % dès l'activité a été maintenue à 50 °C (**Anand et al., 2017**).

- **Effet du pH**

Les enzymes sont très sensibles aux variations du pH et fonctionnent bien sur une gamme limitée de pH (**Boudoukha, 2018**). Le pH optimum de l'activité enzymatique se situe généralement à pH 5 (**Fenghour et al., 2002**). C'est ce que confirme l'étude de **Sopuruchukwu Ire et Vinking, (2016)** indiquant que le pH 5 est la valeur optimale de PGase produite par *Aspergillus niger*, et pH 4,2 pour la PGase produite par *Wickerhamomyces anomalus* (**Martos et al., 2016**).

- **Effet des ions**

L'effet des ions sur la stabilité des protéines peut être causé par les interactions chimiques entre les protéines et pour former des complexes, tels que des ions utilisés comme substrat, co-substrat ou cofacteurs d'enzymes. Suivant de près la série de Hofmeister, les ions peuvent imposer l'inhibition ou l'activation des enzymes, pour les pectinases. L'effet des ions métalliques a été étudié en les incorporant directement dans le système de substrat enzymatique (**Zhao, 2005 ; Oliyad et Dawit, 2017**). Selon l'étude d'**Asghar et coll, (2013)**, les diverses concentrations d'ions minéraux tels que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  inhibent l'activité de la polygalacturonase

isolé à partir de *Bacillus licheniformis*. On a constaté dans une autre étude que les ions métalliques  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ , augmentent l'activité de la PGase produite par *Aspergillus fumigatus*, tandis qu' $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  inhibent l'activité enzymatique (Anand et al., 2016).

### **4. Applications industrielles de la polygalacturonase**

#### **a) Clarification des jus**

Ces dernières années, en raison de l'augmentation globale des fruits naturels et la consommation de jus. La transformation et les améliorations industrielles de ces jus sont devenues très importantes du point de vue du consommateur. Cependant, le jus brut est trouble et visqueux, il a donc tendance à se déposer pendant le stockage. Par conséquent, il doit être clarifié avant la commercialisation. Le principe de cette technique est basé sur l'extraction, l'amélioration et l'augmentation du rendement de la clarté du jus par l'utilisation d'enzymes hydrolytiques comme la polygalacturonase (Nagar et al., 2012). Selon Ajayi et al., (2015) le traitement du jus se fait par homogénéiser des petits morceaux de tomate fraîche avec la PGase isolée d'*Aspergillus niger* qui donne un jus moins viscosité et avec un bon rendement, alors que le traitement du jus d'agrumes avec la PGase de *Penicillium occitanis* montre une réduction de 30 % du poids sec et cela augmente son volume et améliore sa qualité (Tounsi et al., 2016).

#### **b) Fermentation du café**

Le café est une culture agricole importante, cultivée dans environ 80 pays à travers le monde. Ces dernières années, le café a suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine biotechnologique, car il est situé au premier rang des denrées agricoles commercialisées à l'échelle mondiale devant les céréales et au deuxième rang des produits échangés sur les marchés mondiaux, juste après le pétrole (Murthy et Naidu, 2012). Le traitement du café se fait par une fermentation du grain, c'est un bio processus qui se produit pendant le traitement post-récolte et peut entraîner des changements significatifs dans la qualité du café. Cela améliore le processus de commercialisation et sa demande par les consommateurs (Kumar et al., 2006 ; Waters et al., 2015 ; Haile et Kang, 2019).

Murthy et Naidu, (2011) ont rapporté que la pectinase brute d'*Aspergillus niger* provoque une dégradation complète de la couche mucilagineuse des grains de café après 3,5 heures de fermentation. De même l'étude d'Oumer et Abate, (2017) montre que la pectinase bactérienne de *Bacillus subtilis* élimine la gomme des grains de café.

### **c) Industrie de textile**

L'augmentation de la population mondiale et l'évolution des modes de consommation devraient contribuer à la croissance annuelle de la demande totale de fibres textiles de 3 à 4% par an. Une partie de cette demande est satisfaite par les fibres synthétiques artificielles. La production industrielle de coton a trois objectifs principaux : avoir un impact positif sur l'environnement, être économique et rentable et améliorer la qualité du coton (**Cantrell, 2006 ; Madhu et Chakraborty, 2017**).

Le bioscoring de tissus de coton à l'aide de pectinases s'est révélé être une approche intéressante pour réduire la consommation de produits chimiques et d'énergie dans le traitement des textiles. Des pectinases brutes provenant de diverses origines bactériennes et fongiques ont été utilisées pour le bioscoring de cotons et d'autres types de textiles, par exemple le lin et la ramie. L'application de la polygalacturonase a montré un décapage incomplet sur le tissu dans certains cas. Les changements structurels augmentent les groupes fonctionnels plus polaires et donc l'hydrophilie à la surface des fibres de coton, ce qui pourrait être un facteur important pour l'amélioration de l'absorption d'eau et de la teinture des tissus traités.

Le processus catalysé par l'EndoPGase a donné des tissus avec une résistance à la traction plus élevée que la méthode de décapage chimique. Cela reflétait la spécificité plus élevée de l'enzyme sur l'attaque du squelette d'acide polygalacturonique de la pectine sans décomposition des fibres de cellulose (**Abdulrachman et al., 2017**).

### **d) Extraction de l'huile d'olive**

L'huile d'olive est comestible, elle contient des vitamines essentielles, des acides gras et d'autres éléments naturels d'importance diététique. Elle est connue pour ses propriétés anti-ulcéreuses et pour abaisser le taux de cholestérol plasmatique. Environ 24% de l'huile n'est pas extractible à l'aide des technologies d'extraction existantes et cette partie de l'huile reste soit incorporée au tourteau d'olive, soit perdue dans l'eau du site effluent. Dans le cadre de cette recherche, des traitements enzymatiques ont été utilisés avec succès pour améliorer la récupération et la durée de conservation de l'huile. (**Sharma et al., 2014**). L'ajout de la PGase brute de la levure *Cryptococcus albidus var albidus* à l'olive pâte traitée et purifiée à l'aide d'un Alfa Laval NX 306 centrifugeuses horizontale. A entraîné une augmentation significative de l'huile extraite par rapport aux olives non traitées (**Servili et al., 1992**). **Noomen et al., (2006)** ont également montré que la pectinase isolée de *Penicillium occitanis* a ajouté à la pâte d'olives peut conduire à une amélioration de 10 % du rendement en huile à l'échelle industriel

# **Conclusion**

## Conclusion

---

Les biotechnologies industrielles font partie des technologies essentielles pour le développement économique de demain. Elles exploitent les microorganismes et les enzymes, pour fabriquer divers produits. La polygalacturonase contribue à plusieurs applications industrielles donc elle est considérée comme un outil clé dans la biotechnologie. Cette enzyme est l'une des enzymes les plus abondantes de toutes les classes d'enzymes pectinolytiques et largement produite par des souches fongiques, mais également peut être produite par des souches bactériennes, des plantes et des animaux. *Aspergillus niger* est l'un des champignons les plus importants produisant cette enzyme, en raison de ses propriétés très connues et la facilité de culture.

La culture de ces types de champignons est souvent effectuée par fermentation sur un milieu solide, pour de nombreux avantages de cette technique, elle est principalement basée sur la présence d'un substrat solide, qui est souvent des déchets agricoles comme le son de blé, la pulpe de café...etc, qui sont non seulement un support solide, mais sont aussi riches en nutriments. On doit respecter de nombreuses conditions, telles que le contrôle de la température, le pH et l'humidité, et la durée d'incubation, afin de produire de la polygalacturonase dans des conditions optimales.

La polygalacturonase est purifiée par plusieurs étapes d'abord l'enzyme est extraite en différentes concentrations de sulfate d'ammonium ou de solvant organique, puis séparée par un ou plusieurs différents types de chromatographie. L'étude de ses différentes caractéristiques telle que la thermostabilité et d'autres facteurs comme la température le pH et les ions, et aider à améliorer son efficacité et son activité dans de nombreuses applications dans différents domaines alimentaires, industrielles et pharmaceutiques comme la clarification des jus et la fermentation du café... etc.

Finalement, comme perspectives à ce travail nous proposons de :

- Améliorer de la production d'enzymes par l'application d'une approche statistique
- Produire des enzymes pectinolytiques en employant de nouveaux résidus industriels dans l'extraction et la clarification des jus de fruit et dans le dégommeage des fibres de ramie, ce qui peut améliorer et réduire le coût de production
- Utiliser de la polygalacturonase dans de nouvelles applications industrielles telles que : la fermentation du café et l'extraction de l'huile d'olive, ce qui permet d'améliorer l'économie et le produit national

# **Références bibliographiques**

## Référence bibliographie

---

1. **Abbasi, H., Mortazavipour, R., Setudeh, M. (2011).** Polygalacturonase (pg) production by fungal strains using agro-industrial bioproduct in solid-state fermentation. Chemical engineering research bulletin. 15(1). doi:10.3329/cerb.v15i1.6368.
2. **Abbott, W., Boraston, B. (2007).** The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28-glycoside hydrolase. Journal of molecular biology, 368(5). pp 1215–1222. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.083.
3. **Abd Mallick, Y. (2019).** Eumycetoma due to *Aspergillus niger*: first case report and successful treatment with voriconazole. Journal of pakistan association of dermatologists. 29(4) : pp 428-432.
4. **Abdulrachman, D., Thongkred, P., Kocharin, K., Nakpathom, M., Somboon, B., Narumol, N., Chantasingh, D. (2017).** Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endo-polygalacturonase in pichia pastoris by high cell density fermentation and its application in textile scouring. BMC biotechnology. 17 (1). Doi: 10.1186/s12896-017-0334-9.
5. **Aguilar, C., Gutiérrez-Sánchez, G., Prado, L., Rodríguez, R., Martínez-Hernández, J., Contreras- Esquivel, J. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. American journal of biochemistry and biotechnology. pp 354-366.
6. **Ahmed, I., Zia, A., Hussain, A., Akram, Z., Naveed, T., Nowrouzi, A. (2016).** Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. Journal of radiation research and applied sciences. 9(2). pp 148–154. doi:10.1016/j.jrras.2015.11.003.
7. **Ajayi, A., Peter-Albert, C., Akeredolu, M. Shokunbi, A. (2015).** Clarification of tomato juice with polygalacturonase obtained from tomato fruits infected by *Aspergillus niger*. Pakistan journal of biological sciences. 18: pp 74-80.
8. **Alavi, A., Nia, F., Shariati, F. (2019).** Polygalacturonase production by *Aspergillus niger* solid-state fermentation on barley bran and sugar beet pulp mixture. Journal of chemistry-section a. pp 350-357.
9. **Alexopoulos, C., Mims, C., Blacjwll, M. (1996).** Introductory mycology 4" eds. Editeur: Blackwell. United States of America.

## Référence bibliographie

---

10. **Amsellem, L., Brouat, C., Duron, O., Porter, S., Vilcinskas, A., Facon, B. (2017).** Importance of microorganisms to macroorganisms invasions. *Advances in ecological research*. pp 99–146. Doi:10.1016/bs.aecr.2016.10.005.
11. **Anand, G., Yadav, S., Yadav, D. (2016).** Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* mtcc 2584 and elucidating its application in retting of crotalaria juncea fiber. *3 biotech*, 6(2). Doi: 10.1007/s13205-016-0517-4.
12. **Anand, G., Yadav, S., Yadav, D. (2017).** Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* mtcc 478 suitable for clarification of orange juice. *3 biotech*.7:122.
13. **Andersen, R., Salazar, P., Schaap, J., van de Vondervoort, I., Culley, D., Thykaer, J., Baker, E. (2011).** Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* atcc 1015 versus enzyme-producing cbs 513.88. *Genome research*.21(6).pp 885–897. Doi:10.1101/gr.112169.110.
14. **Antier, P., Minjaresf, A., ROUSSOS, S., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalezf, G.(1993).** Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* c28b25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and microbial technology*. pp 254-260.
15. **Asghar, U., Rehman, U., Qader, U., Maqsood, T. (2013).** Influence of phytic acid and its metal complexes on the activity of pectin degrading polygalacturonase. *Carbohydrate polymers*. 95(1). pp 167–170. Doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.065.
16. **Assamoi, A., Destain, J., Thonart, P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. pp 281-294.
17. **Atanasova, L., Dubey, M., Grujić, M., Gudmundsson, M., Lorenz, C., Sandgren, M., Karlsson, M. (2018).** Evolution and functional characterization of pectate lyase pel12, a member of a highly expanded clonostachys rosea polysaccharide lyase 1 family. *Bmc microbiology*.18(1). Doi : 10.1186/s12866-018-1310-9.
18. **Bajpai, P. (2014).** Purification of xylanases. *Xylanolytic enzymes*. pp 53–61. doi:10.1016/b978-0-12-801020-4.00006-8.
19. **Barker, K. (1996).** Proceedings of the cellulolytic and pectolytic enzymes in the nematode, *Aphelenchus avenae*. *The helminthological society of washington*. [VOL. 33, No. 2.

## Référence bibliographie

---

20. **Biswas, P., Bharti, K., Kadam, A., Dutt, D. (2019).** "Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (mow) paper," *biores.* 14(3).5788-5806.
21. **Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N., Villa, T. (1998).** Cloning, Molecular Characterization, and Expression of an Endo-Polygalacturonase-Encoding Gene. pp 249–255.
22. **Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C. (2002).** Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* volume 58. pp 164–169.
23. **Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L., Viniegra, G. (1994).** Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of food science and technology.* pp 22-26.
24. **Botton, B., Breton, A., Febre, M., Goutier S., Gay, I., Larent J.,...Veau P. (1990).** Moisissure utile importance industrielles .2eme édition. P 419.35.
25. **Boudih, S. (2011).** Identification des moisissures et de leurs metabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicite sur des cellules epitheliales respiratoires in vitro. These de doctorat. Universite paris-est. Français.
26. **Boudoukha, C., (2017-2018).** Enzymologie appliquée. Master 1 biochimie appliquée. Université ferhat abbas sétif. Algérie.
27. **Brock, D., Madingan, T., Martingo, M. Parker, J. (1994).** Metabolisme, biosynthesis and nutrition. En 'biology of microorganisms'. Prentice-hall international, Inc. New jersey. pp 89-124.
28. **Brudieux, V. (2007).** Extraction, modification enzymatique et caracterisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activite a la dermocosmetique. These de doctorat. Universite de limoges. France.
29. **Buga, M., Ibrahim, S., Nok, A.(2010).** Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (sa6). *African journal of biotechnology.* pp 8944-8954.
30. **Buyukkileci, O., 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, pp 464–466.
31. **Cahagnier, B. (1997).** Moisissures des aliments peu hydrates. Ed : lavoisier technique et documentation. Paris. 50p.

## Référence bibliographique

---

32. **Cantrell, R. (2006).** The role of biotechnology in improving the sustainability of cotton. Agricultural research division. pp 6.
33. **Cao, Y., Wang, Y. (2016).** Temperature-mediated regulation of enzymatic activity. Chem cat chem. 8(17), pp 2740–2747. doi:10.1002/cctc.201600406.
34. **Carlile, J., Watkinson, C. (1994).** The fungi. Academic press eds.
35. **Castilho, R., Medronho, A., Alves, L. (2000).** Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource technology. 71(1), pp 45–50. Doi: 10.1016/s0960-8524(99)00058-9.
36. **Celorio-Mancera, P., Carl Greve, L., Teuber, R., Labavitch, M. (2009).** Identification of endo- and exo-polygalacturonase activity inlygus Hesperus (knight) salivary glands. Archives of insect biochemistry and physiology. 70(2), pp 122–135. doi:10.1002/arch.20282.
37. **Chen, G. (2018).** Roles de polygalacturonases (pg) dans le developpement racinaire, chez *Arabidopsis thaliana*. These de doctorat. Universite de picardie jules verne. France.
38. **Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., Luo, Z. , Huang, R. (2016).** A Novel Acid-Stable Endo-Polygalacturonase from *Penicillium Oxalicum* Cz1028: Purification, Characterization, And Application In The Beverage Industry, 26(6): pp 989-98.
39. **Chetouani .A. (2018).** Elaboration et bio evaluation de nouvelles classes d’hydrogels à base de pectine avant et apres son oxydation par le periodate et/ou par le chlore actif et etude de leurs effets sur les comportements physico-chimiques et biologiques de la gelatine et du chitosane. Thèses de doctorat. Université Ferhat Abbas. Sétif 1.
40. **Pedrolli, D., Monteiro, A., Gomes, E., Carmona, E. (2009).** Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. The open biotechnology journal 3, pp 9-18.
41. **De Lima Damasio, R., da Silva, M., Maller, A., Jorqe, A., Terenzi, F., Polizeli, L. (2010).** Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from paecilomyces variotii liquid cultures. Appl biochem biotechnol 160, pp 1496–1507.
42. **D'Oliveira, B., Gomes, E., Rodrigues, A. (2014).** Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. Extremophiles, 19(1), 31–37. doi : 10.1007/s00792-014-0707-0.
43. **De Vries, A., Rombouts,M., Voragen, J., Pilnik, W. (1982).** Enzymic degradation of apple pectins. Carbohydrate polymers, 2(1), pp 25 -33.

## Référence bibliographie

---

44. **Demir, H., Tari, C. (2014).** Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase inssf of *Aspergillus sojae*. Industrial crops and products .pp 302-309.
45. **Di Matteo, A., Bonivento, D., Tsernoglou, D., Federici, L., Cervone, F. (2006).** Polygalacturonase-inhibiting protein (pgip) in plant defence: a structural view. Phytochemistry, 67(6), pp 528–533. doi:10.1016/j.phytochem.2005.12.025.
46. **Dijksterhuis J. Wösten H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. Studies in mycology. 74 : pp 8-23.
47. **Dijksterhuis. J., Samson,R. (2006).** Zygomycetes. Food spoilage microorganisms.pp 415-436. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.4.415>.
48. **Djama, R., abdelilah, W. (2018).** Production de la polygalacturonase par la moisissure *Aspergillus niger* cultivée sur milieu solide (ssf). Mémoire de master. Université frères mentouri constantine1.algerie.
49. **Dogan, N., Tari, C. (2008).** Characterization of three phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. Biochem Eng J 39: pp43–50.
50. **Donaghy, A., McKay,M. (1994).** Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. Bioresource technology, 47(1), pp 25–28. doi : 10.1016/0960-8524(94)90024-8.
51. **Faiza, A., Arooj, M., Haq, B., Muhammad, B .(2020) .** Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. Bba - proteins and proteomics. pp 1570-963.
52. **Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T., Viniegra-González, G. (2006).** Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food technology and biotechnology, pp221-227.
53. **Fenghour, H., Ladjama, A., Taibi, Z. (2002)** Recherche de l'activite pectinolytique chez 22 souches de champignons microscopique isolées d'un sol de la région d'el kala. Université Badji-Mokhtar Annaba.
54. **Fishman, L., Jen, J. (1986).** Chemistry and function of pectins. American chemical society.washington..
55. **Freitas, P., Mortin, N., Silva, D., DaSilva, R. (2006).** Production and partial charactrization of polygalacturonases produced by thermophilic monascus sp n 8 and thermotolerant *Aspergillus sp* n 12 on solide-state fermentation. Brazilin journal of microbiology.pp 1678-4405 .

## Référence bibliographie

---

56. **Frómata, R., Sánchez, J., Ros García, J.(2020).** Evaluation of coffee pulp as substrate for polygalacturonase production in solid-state fermentation. *Emirates journal of food and agriculture*. pp 117-124.
57. **Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., Mahajan, R. (2016).** Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries.pp 13, 3 *Biotech*, 6(1). doi:10.1007/s13205-016-0371-4.
58. **George, M., Ramteke, P. (2019).** Morphology, molecular identification and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer (its) of the ribosomal nuclear dna (rdna) sequence of a pathogenic fungal isolate *Aspergillus niger* lko1. *The journal of the society for tropical plant research*, 6(2): pp 166-170.
59. **Giese, E., Dekker,R. , Barbosa, A. (2008).** Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* mamb-05 in submerged and solid state fermentation. *Bioresources*. pp 335-345.
60. **Gomes, E., de Souza, R., Orjuela, L., Da Silva, R., d'Oliveira, B., Rodrigues, A. (2016).** Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. *Gene expression systems in fungi: advancements and applications*. pp 459–492. Doi: 10.1007/978-3-319-27951-0\_21.
61. **Guan, Y., Wang, D., Lv, C., Zhang, Y., Gelbič, I., Ye, X. (2020).** Correction to: screening of pectinase-producing bacteria from citrus peel and characterization of a recombinant pectate lyase with applied potential. *Archives of microbiology* .pp 1005–1013.
62. **Guettler, V., Jain, K., Rumler, D., (1996).** Method for Making Succinic Acid, Bacterial Variants For Use In The Process, And Methods For Obtaining Variants.Us Patent 5,573,931.
63. **Gulis, V., Kuehn, A., Suberkropp, K. (2009).** Fungi. *encyclopedia of inland waters*. pp 233–243. doi:10.1016/b978-012370626-3.00129-0.
64. **Haile, M., Kang, W. (2019).** The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. *Journal of food quality*, 6 pp.
65. **Hayer, K., Stratford, M., Archer, B. (2014).** Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to l-amino acids. *Applied and environmental microbiology*, 80(19). pp 6046–6053. doi:10.1128/aem.01078-14.
66. **Hocking, D. (2006).** *Aspergillus* and related teleomorphs. *Food spoilage microorganisms*. pp 451–487. doi:10.1533/9781845691417.4.451.

## Référence bibliographie

---

67. **Hours, A., Sakai, T. (1994).** Protopectinase production in solid-state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnology letters*, 16(7). pp 721–726. doi : 10.1007/bf00136478.
68. **IBIAM, A., Arinze, E. (2007).** Determination of in vitro and in vivo production of polygalacturonase (pg) by storage mold *Aspergillus niger* v. Tieghem, during storage of rice (*oryzae sativa* l) seeds. *Journal of applied sciences and environmental management*. Vol. 11 (2), pp 99 – 103.
69. **Irshad, M., Anwar, Z, Zahed. Mahmood, Z., Aqil, T., Mehmmod, S., Nawaz, H.(2013).** Bioprocessing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. *Turkish journal of biochemistry*. 39(1): pp 9-18.
70. **Jahan, N., Shahid, F., Aman, A., Mujahid, T., Qaderc, S. (2017).** Utilization of agro waste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. *Heliyon*.pp13.
71. **Jaubert, S., Laffaire, B., Abad, P., Rosso, N. (2002).** A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*l. *Febs letters*, 522(1-3), pp 109–112. doi : 10.1016/s0014-5793(02)02906-x.
72. **Jayani, S., Saxena, S., Gupta, R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process biochemistry*, 40(9), pp 2931–2944 .
73. **Jayani, S., Shukla, K., Gupta, R. (2010).** Screening of bacterial strains for polygalacturonase activity: its production by *Bacillus sphaericus* (mtcc 7542). *Enzyme research*, 2010, pp 1–5. doi:10.4061/2010/306785.
74. **John, P., Ailsa, H. (2013).** *Fungi and food spoilage*. Third. Edition .london.
75. **Kaassis, M., Khanfar, M. (2019).** 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. Mémoire de master. Université frères mentouri constantine1.Algerie.
76. **Kanungo, A., Bag, P. (2019).** Structural insights into the molecular mechanisms of pectinolytic enzymes. *Journal of proteins and proteomics*. doi : 10.1007/s42485-019-00027-5.
77. **KC, S., Upadhyaya, J., Joshi, R., Lekhak, B., Kumar Chaudhary, D., Raj Pant, B., ... Raghavan, V. (2020).** Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6(2), 59. doi : 10.3390/fermentation6020059.

## Référence bibliographie

---

78. **Kiran, A. (2016).** Fungal protease production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* using rice bran as the substrate. *Academia journal of agricultural research*, PP 01-07.
79. **Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I. (2012).** *Aspergillus fumigatus* and other thermophilic fungi in nests of wetland birds. *Mycopathologia*, 175(1-2), pp 43–56. Doi : 10.1007/s11046-012-9582-3.
80. **Krappmann, S., Braus, H. (2005).** Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Medical mycology*, 43(s1), 31–40. Doi : 10.1080/13693780400024271.
81. **Kubicek, P., ROHR M. (1977).** Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Europ. J. Appl. Microbiol*, 4 : pp 167-168.
82. **Kumar, V., Madhava Naidu, M., Ravishankar, A. (2006).** Developments in coffee biotechnology—in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(1), pp 49–65. Doi: 10.1007/s11240-006-9134-y.
83. **Le Calvez, T. (2009).** Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystèmes hydrothermal marin profond. Thèse de doctorat. Université européenne de Bretagne. France.
84. **Leroux. C. (2015).** Implication des pectines méthyl-esterases (pmes) et de leurs inhibiteurs (pmeis) au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance polarisée du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat. Université de Rouen. France.
85. **Luisa, I., Correia, C. (2013).** *Aspergillus* aspergillose –les défis dans la lutte contre la maladie. Master en sciences pharmaceutiques. Université Fernando Pessoa.
86. **Madhu, A., Chakraborty, N. (2017).** Developments in application of enzymes for textile processing. *Journal of cleaner production*, 145, pp 114–133. doi:10.1016/j.jclepro.2017.01.013.
87. **Martins, S., Leite, R., Silva, R., Gomes, E. (2013).** Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on Solid-State Fermentation. *Enzyme Research*, 2013, pp 1–7. doi:10.1155/2013/438645.
88. **Martos, M., Butiuk, A., Rojas, N., Hours, R. (2014).** Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian archives of biology and technology*. pp 587-594.
89. **Mattey, M. (1992).** The Production of Organic Acids. *Crit. Rev- Biotechnol*, 12 : pp 87-132.

## Référence bibliographique

---

90. **Mcconnaughey, M. (2014).** Physical chemical properties of fungi. Reference module in biomedical sciences. 10 pp. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.05231-4.
91. **Melloul, E. (2015).** Aspergillose aviaire : developpement d'un modele d'Aspergillose chez la dinde (meleagris gallopavo) et evaluation de l'efficacite de l'eniiconazole. Theses de doctorat. Université Paris-Est. Paris. France.
92. **Mitchell, D., Stuart, D. Murthy,S., Naidu, M. (2011).** Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. European journal of applied sciences. 3 (4): pp 130-139.
93. **Mojsov, D. (2016).** Aspergillus enzymes for food industries. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, pp 215–222. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00033-6.
94. **Morgutti, S., Negrini, N., Nocito, F., Ghiani, A., Bassi, D., Cocucci, M. (2006).** Changes in endopolygalacturonase levels and characterization of a putative endo-pg gene during fruit softening in peach genotypes with nonmelting and melting flesh fruit phenotypes." new phytologist 171(2) : pp 315-28.
95. **Mousavi, B., Hedayati, T., Hedayati, N., Ilkit, M., Syedmousavi, S. (2016).** *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. Current medical mycology, 2(1), pp 36–42. doi:10.18869/acadpub.cmm.2.1.36.
96. **Murthy, P., Naidu, M. (2012).** Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review. Resources conservation and recycling (2002). Encyclopedia of bioprocess technology.solid state fermentation, microbial growth kinetics. John wiley & sons. United States.
97. **Nagar, S., Mittal, A., Gupta, K. (2012).** Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* sv-85s xylanase. Biotechnology and bioprocess engineering, 17(6), pp 1165–1175. doi: 10.1007/s12257-012-0375-9.
98. **Nakamura, M., Iwai, H. (2019).** Functions and mechanisms: polygalacturonases from plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors. Journal of general plant pathology. 85: pp 243–250. doi : 10.1007/s10327-019-00856-8.
99. **Naumov, M., Shalamitskiy, M., Naumova, S. (2016).** New family of pectinase genes pgu1b–pgu3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var. Uvarum. Biochemistry, biophysics and molecular biology .467, pp 89–91.

## Référence bibliographie

---

100. **Nazir, Z., Ijaz, S., Gul, R., Saleem, M. (2019).** Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from grapes and its potential to improve juice quality. *Pakistan Journal of Zoology*. Vol. 51, Iss. 4. pp 1203-1598.
101. **Nevalainen, H. (2020).** Grand challenges in fungal biotechnology. Springer nature switzerland ag. Cham, switzerland.
102. **Nighojkar, A., Patidar, K., Nighojkar, S. (2019).** Pectinases: production and applications for fruit juice beverages. *Processing and sustainability of beverages*, pp 235–273. doi:10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2.
103. **Nighojkar, A., Patidar, K., Nighojkar, S. (2019).** Pectinases: production and applications for fruit juice beverages. *Processing and sustainability of beverages*, pp 235–273. doi:10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2.
104. **Noomen, T., Ayadi, M., Khlif, M., Mrad, K., Gargouri, A. (2006).** Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. *Enzyme and microbial technology*. pp1072–1076.
105. **O'Neill, A, Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, G. (2004).** Rhamnogalacturonan ii: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual review of plant biology*. 55, pp 109 - 139.
106. **Oliyad, J. (2017).** Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. *International journal of environment, agriculture and biotechnology*. pp 1007-1014.
107. **Oumer, J., Abate, D. (2018).** Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. *Biomed research international*. 7pp.
108. **Oumer, J., Abate, D. (2017).** Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. *Enzyme research*, 2017, pp 1–7. doi:10.1155/2017/7686904.
109. **Padma, P., Anuradha, K. (2015).** Bacterial isolates for polygalacturonase production from diverse sources. *International journal of scientific progress and research (ijspr)* Volume-10, pp 03.
110. **Palagiri, S., Mayukha, M., Sagar, G., Chourasiya, R., Sibi, G. (2019).** Production of pectinases and pectinolytic enzymes: microorganisms, cultural conditions and substrates. *Advances in biotechnology & microbiology*. Volume 14 Issue 2 - DOI : 10.19080/AIBM.2019.14.555884.

## Référence bibliographique

---

111. **Papagianni, M. (2007).** Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), pp 244–263. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.01.002.
112. **Pasqualotto, C. (2010).** *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Ed springer science and business media. New York. 1027.
113. **Patidar, K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A. (2018).** Pectinolytic Enzymes- Solid State Fermentation, Assay Methods and Applications in Fruit Juice Industries: a review. *3 Biotech*, 8(4). doi : 10.1007/s13205-018-1220-4.
114. **Petersen, H.J., Knudsen, H. (2005).** *Les champignons dans la nature*. Editeur: delachaux. france.
115. **Picot-Allain, N., Ramasawmy, B., Emmambux, N. (2020).** Extraction, characterisation, and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: a review. *Food reviews international*. pp 1–31.
116. **Prevot, V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat. Université de reims champagne-ardenne. France.
117. **Râper, B., Fennel, I. (1977).** *The genus Aspergillus*. Krieger malabar. Florida. 686.
118. **Redecker, D. (2002).** New views on fungal evolution based on dna markers and the fossil record. *Research in microbiology*, 153(3), pp 125–130. doi : 10.1016/s0923-2508(02)01297-4.
119. **Richardson, M. (2009).** The ecology of the zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical microbiology and infection*, 15, pp 2–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x.
120. **Ridley, L., O'Neill, A., Mohnen, D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), pp 929 967.
121. **Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. (2018).** Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *Apl bioengineering*, 2(1), 011501. doi:10.1063/1.4997367.
122. **Samreen, P., Mangipudi, M., Grover, S., Rajan, C., Sibi, G.(2019).** Production of pectinases and pectinolytic enzymes microorganisms, cultural conditions and substrates. *Advances in biotechnology & microbiology*. 7 pp.
123. **Samson, A., Hong, S., Peterson, W., Frisvad, C., Varga, J. (2007).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section fumigati and its teleomorph neosartorya. *Studies in mycology*, 59, pp 147–203. doi:10.3114/sim.2007.59.14.

## Référence bibliographie

---

124. **Satapathy, S., Rout, R., Kerry, G., Thatoi, H., Sahoo, L. (2020).** Biochemical prospects of various microbial pectinase and pectin: an approachable concept in pharmaceutical bioprocessing. *Frontiers in nutrition*, 7pp. doi:10.3389/fnut.2020.00117.
125. **Satyanarayana, T., Kawarabayasi, Y. (2013).** Chapter 26 pectinases of thermophilic microbes. pp 689- 711. *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. Springer dordrecht heidelberg. New york.
126. **Schuster, E. , Dunn-Coleman, N. , Frisvad, J., Dijck, P .(2002).** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), pp 426–435. DOI: 10.1007/s00253-002-1032-6.
127. **Sebaoui, O. (2018).** Modelisation et optimisation de l'extraction de la pectine a partir du zeste de citron et de son utilisation dans l'encapsulation des composés phenoliques des margines de l'industrie oleicole. Theses de doctorat. Universite mouloud mammeri. Tizi-ouzou .algerie.
128. **Servili, M., Begliomini, L., Montedoro, G., Petruccioli, M., Federici, F. (1992).** Utilisation of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. *Journal of the science of food and agriculture*, 58(2), pp253–260. doi:10.1002/jsfa.2740580214.
129. **Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M. (2012).** Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in environmental science and bio/technology*, 12(1), pp 45–60. Doi: 10.1007/s11157-012-9276-9.
130. **Sharma, R., Sharma, P. , Rana, J., Joshi, V. (2014).** Improving the olive oil yield and quality through enzyme-assisted mechanical extraction, antioxidants and packaging. *Journal of food processing and preservation*.pp 157–166.
131. **Shen, Z., Denton, M., Mutti, N., Pappan, K., Kanost, M., Reese, J., Reeck, G. (2003).** Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of insect science*. 9pp.
132. **Shet, A., Desai, S., Achappa., S. (2018).** Pectinolytic Enzymes : Classification, Production, Purification And Applications. 4(3) Page No.337.
133. **Silva, M., Batista, R., Rezende, F., Fungaro, P., Sartori, D., Alves, E. (2011).** Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy. *Brazilian journal of microbiology*, 42(2), pp 761–773. Doi : 10.1590/s1517-83822011000200044.

## Référence bibliographie

---

134. **Singh, J., Kundu, D., Das, M., Banerjee, R. (2019).** Enzymatic processing of juice from fruits/vegetables: an emerging trend and cutting edge research in food biotechnology. *Enzymes in food biotechnology*, pp 419–432. doi:10.1016/b978-0-12-813280-7.00024-4.
135. **Sopuruchukwu Ire, F., Vinking, E. (2016).** Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation using banana peels. *Journal of advances in biology & biotechnology* , 10(1): pp 1-15,
136. **Soro, Y. (2007).** Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (achatiniidae); application à la synthèse de polyglucosylfructosides. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Toulouse.
137. **Stephanie, S. (2017).** Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu solide pour une application en alimentation animale. Thèse de doctorat. Université Bourgogne. Dijon, France.
138. **Swain, R., Ray, C. (2010).** Production, characterization and application of a thermostable exo-polygalacturonase by *Bacillus subtilis* cm 5. *Food biotechnology*, 24(1), pp 37–50. Doi: 10.1080/08905430903320958.
139. **Teng, Y., Chang, L., Huang, M., Chang, C., Lee, T. (2017).** Effects of solid-state fermented wheat bran by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and intestinal microbiota in broiler chickens. *Italian journal of animal science*, 16(4), pp 552–562. doi:10.1080/1828051x.2017.1299597.
140. **Thakur, R., Singh, K., Handa, K., Rao, A. (1997).** Chemistry and uses of pectin — a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 37(1), pp 47–73 .
141. **Thibault, J., Renard, C., Axelos, M., Roger, P., Crepeau, M. (1993).** Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid-hydrolysis. *Carbohydrate research*, 238, 271–286.
142. **Torres-Mancera, T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G. (2013).** Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnology progress*, 29(2), pp 337–345. doi:10.1002/btpr.1696.
143. **Tounsi, H., Sassi, H., Romdhane, B., Lajnef, M., Dupuy, W., Lapailierie, D., Hadj-Taieb N. (2016).** Catalytic Properties Of A Highly Thermoactive Polygalacturonase

## Référence bibliographie

---

- From The Mesophilic Fungus *Penicillium Occitanis* And Use In Juice Clarification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. pp 56-66.
144. **Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E. (2007).** Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microbial cell factories, 6(1), 9. doi : 10.1186/1475-2859-6-9.
145. **Uchikoba, T., Mase, T., Arima, K., Yonezawa, H., Kaneda, M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. Biological chemistry, 382(10). doi:10.1515/bc.2001.185.
146. **Venkatanagaraju, E., Divaka, G. (2017).** Purification strategies for microbial pectinases. Current trends in biotechnology and pharmacy 11(2):pp144-159.
147. **Venugopal, C., Jayachandra, T, Anu Appaiah, A. (2007).** Effect of aeration on the production of endo-pectinase from coffee pulp by a novel thermophilic fungi *Mycotypha* sp. Biotechnology, 6: pp 245-250.
148. **Vidcoq, P. (2011).** Diffusion multi-échelle de pectine méthylesterases dans différents systèmes pectiques. Conséquences biochimiques et structurales. these de doctorat. Université de Nantes. France.
149. **Voragen, F., Schols, H., Visser, R. (2003).** Advances in pectin and pectinase research. Kluwer academic publishers. The Netherlands ; 94(3) : pp 479–480.
150. **Waters, M., Arendt, K., Moroni, V. (2015).** Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality. Critical reviews in food science and nutrition, 57(2), pp 259–274. doi:10.1080/10408398.2014.902804.
151. **WatreLOT, A. (2013).** Interactions non-covalentes entre les polyphénols et les pectines : étude sur un substrat modèle : la pomme. Theses de doctorat. Université d'Avignon. France.
152. **Webb, C., Manan, M. (2017).** Design aspects of solid-state fermentation as applied to microbial bioprocessing. Journal of applied biotechnology & bioengineering. EISSN: 2572-8466.
153. **Xu, H., Zhang, P., Zhang, Y., Liu, Z., Zhang, X., Li, Z., Du, Y. (2020).** Overexpression and biochemical characterization of an endo- $\alpha$ -1,4-polygalacturonase from *Aspergillus nidulans* in *Pichia pastoris*. International journal of molecular sciences, 21(6), 2100. doi : 10.3390/ijms21062100.

## Référence bibliographique

---

154. **Yadav, S., Anand, G., Dubey, K., Yadav, D. (2012).** Purification and characterization of an exo-polygalacturonase secreted by *Rhizopus oryzae* mtcc1987 and its role in retting of crotonaria juncea fibre. *Biologia* 67(6): pp 1069–1074.
155. **Zabel, A., Morrell, J. (2020).** The characteristics and classification of fungi and bacteria. *Wood microbiology*, pp 55–98. doi:10.1016/b978-0-12-819465-2.00003-6.
156. **Zhao, H. (2005).** Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, 37(1-6), pp 16–25. doi:10.1016/j.molcatb.2005.08.007.
157. **Zulkifli, A., Zakaria, L. (2017).** Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *Hayati journal of biosciences*, 24(1), pp 26–34. doi:10.1016/j.hjb.2017.05.002.

**Présenté par :** KIHAL Abir  
RAMDHANE Aya

**Date de Soutenance :** 05/11/2020

**Intitulé :** Polygalacturonase d'*Aspergillus niger* : production, séparation et application industrielle

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de master en biochimie de la nutrition

**Résumé :**

Les biotechnologies industrielles font partie des techniques essentielles pour le développement économique de demain. Elles consistent à mettre à profit la biotechnologie pour assurer la production et la transformation éco efficace de produit chimique comme les enzymes. La capacité de ces enzymes à catalyser diverses réactions chimiques in vivo et in vitro conduit à des applications dans diverses industries, telles que l'alimentation humaine et animale, la pharmacie, les diagnostics, les détergents, le textile, le papier, et la bioénergie. Les micro-organismes sont la principale source d'enzymes, car ils sont cultivés en grande quantité sur une courte période et des manipulations plus faciles surtout avec le processus de la fermentation en milieu solide.

Les enzymes pectinolytiques font parties des enzymes glycolytiques connues par leurs applications industrielles multiples. Les polygalacturonases sont les plus connues de la famille des pectinases produites par l'*Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économique majeur.

Ce travail vise à la production de la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* selon le procédé de la fermentation solide (FMS) à base de résidus industriels comme un support tel que le son de blé et la bagasse d'orange. Ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Le premier chapitre relate des connaissances sur les champignons filamenteux et thermophiles parmi ces champignons l'*Aspergillus niger*. Il est défini en déterminant sa morphologie, sa classification, son habitat et son importance dans le domaine industriel. Ensuite, nous avons étudié la PGase famille des pectinases qui trouve une très large application dans l'IAA dont la principale utilisation est la clarification des jus de fruits. Le dernier chapitre met au point la FMS connu comme processus rentable pour la production des enzymes pectinolytiques. Une purification de l'extrait enzymatique brut est aussi envisagée par fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium ou l'utilisation des solvants organiques, des chromatographies gel filtration et échangeuses d'ions. Du point de vue économique il est intéressant de tester ces enzymes dans le but de leur utilisation en industrie.

Mots clés : Polygalacturonase, *Aspergillus niger*, FMS, séparation, application industrielle

**Devant le jury :**

Président du jury : Mr. NOUADRI T. MCA, UFM Constantine 1

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. MCB, UFM Constantine 1

Examinatrice : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS, Assia Djébar, Constantine

**Année Universitaire 2019/2020**