



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biochimie

**Intitulé**

**Séparation d'enzymes pectinolytiques  
produites par *Aspergillus niger* cultivé sur  
milieu solide (SSF)**

Présenté par : BENKADJA Rania

Le 22/06/2023

BENYOUNES Badr Rihem

**Jury d'évaluation:**

Président du jury : Mr NOUADRI Taher

M.C.A, (UFM Constantine).

Encadrante : Mme BENNAMOUN Leila

M.C.B, (UFM Constantine).

Examina

: Mme DAKHMOUCHE Scheherazad M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.

*Année universitaire 2022 – 2023*

# Remerciements

*En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé, le courage et la patience pour réaliser ce travail.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme Bennamoun Leila**, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :*

***Mr NOUADRI** en tant que président du jury.*

***Mme DAKHMOUCHE** en tant qu'examinatrice.*

*Nous remercions également l'ensemble du personnel du Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications du Département de Biochimie Faculté des Science de la Nature et de la Vie Université frères Mentouri Constantine 1.*

*Nous remercions aussi le binôme **SABA et KHADIDJA** pour leur soutien, elles nous ont beaucoup aidées au niveau du laboratoire.*

# **Dédicace :**

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents Abderrahmane et Yasmína*

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard,  
de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre  
mes objectifs.*

*A mes chères sœurs Manel ,Mounira ,Nesrine et Aya*

*Qui sont ajoutées de la joie à mon cœur .*

*A mon chère Coro*

*Ma source du bonheur.*

*A mes chères amies Lamis, Malak et Rachia*

*Pour le réconfort et l'encouragement.*

*A mon chère binôme*

*Pour sa gentillesse, sa patience et sa compréhension tout au  
long de travail.*

*Rania*

# Dédicace :

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي لَهُ مَا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ وَلَهُ الْحَمْدُ فِي الْآخِرَةِ ۗ وَهُوَ الْحَكِيمُ الْخَبِيرُ

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes parents Mouhamed et fatima*

*A mes sœurs Insaf , Ikram , Imen et son mari .*

*A Arkan l'kbuuda.*

*A ce qu'est me cher.*

*Mes amies S , A , F , k et W .*

*A Rania ma binôme.*

*Pour l'encouragement et le soutien.*

*Pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie*

*Badr Rihem*

# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Résumés</b>	
<b>Introduction</b>	
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 01</b>	
<b>I</b>	<b>Moisissures..... 5</b>
<b>II</b>	<b>Genre <i>Aspergillus</i>..... 5</b>
<b>1</b>	<b>Généralités..... 5</b>
<b>2.</b>	<b>Espèce <i>Aspergillus niger</i>..... 6</b>
2.1.	Taxonomie..... 6
2.2.	Caractères..... 6
2.3.	Morphologie..... 7
2.4.	Importance industriel de l' <i>Aspergillus niger</i> ..... 8
2.4.1.	Production d'enzymes..... 8
2.4.2.	Production d'acide citrique..... 8
2.4.3.	Dégradation des déchets organiques..... 8
2.4.4.	Production de bioplastiques..... 9

2.4.5.	Production de composés chimiques.....	9
2.4.6.	Biotransformation des xénobiotiques.....	9
<b>Chapitre 02</b>		
<b>I</b>	<b>Enzymes glycolytiques .....</b>	<b>11</b>
1.	Substrats pectiques.....	11
2.	Source de pectine.....	11
3.	Structure de la pectine.....	12
<b>II</b>	<b>Les enzymes pectinolytiques.....</b>	<b>14</b>
<b>1.</b>	<b>Definition .....</b>	<b>14</b>
1.1.	Classification de pectinases.....	15
1.2.	Facteurs affectant le rendement en pectinases.....	17
1.3.	Applications de pectinases.....	18
<b>2.</b>	<b>Pectine lyase (PL).....</b>	<b>20</b>
2.1.	Source de la PL .....	20
2.2.	Structure de la PL .....	21
2.3.	Mode d'action.....	22
<b>3.</b>	<b>Les polygalacturonases(PG).....</b>	<b>23</b>
3.1.	Source de la PG.....	23
3.2.	Structure de la PG.....	24

3.3.	Mode d'action.....	25
3.4.	Effet des facteurs environnementaux sur la production de la PG.....	26
<b>4.</b>	<b>La fermentation sur milieu solide.....</b>	<b>27</b>
4.1.	Definition.....	27
4.2.	Avantages et inconvénients du SSF.....	27
4.3.	Microorganismes utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes SSF .....	28
4.4.	Substrats utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes SSF.....	28
4.5.	Son de blé substrat de SSF.....	29
<b>5.</b>	<b>Séparation et Purification des pectinases .....</b>	<b>31</b>
5.1.	Techniques de purification.....	31
5.1.1.	Précipitation.....	31
5.1.2.	Chromatographie.....	31
5.1.3.	Électrophorèse.....	31
<b>Matériel et Méthodes</b>		
<b>1.</b>	<b>Réactivation de la souche.....</b>	<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>Production des enzymes pectinolytiques .....</b>	<b>33</b>
2.1.	Son de blé substrat de fermentation .....	33
2.2.	Préparation de l'inoculum.....	33
2.3.	Dénombrement des spores.....	33
<b>3.</b>	<b>Fermentation.....</b>	<b>33</b>
3.1.	Préparation du milieu de production.....	33

<b>5.</b>	<b>L'extraction.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Méthodes analytiques.....</b>	<b>34</b>
5.1.	Dosage de l'activité de la pectine lyase (PL).....	34
5.2.	Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PG).....	35
5.3.	Dosage des protéines .....	36
<b>6.</b>	<b>Purification partielle des enzymes pectinolytiques PL et PG.....</b>	<b>37</b>
6.1.	Précipitation par l'éthanol et l'acétone.....	37
6.2.	Précipitation au sulfate d'ammonium.....	37
<b>7.</b>	<b>Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS – PAGE).....</b>	<b>37</b>
<b>8.</b>	<b>Détection de l'activité pectinolytique par la méthode de Zymogramme.....</b>	<b>38</b>
<b>Résultats et discussion</b>		
<b>Conclusion</b>		
<b>Références bibliographiques</b>		
<b>Annexe</b>		



# Liste des abréviations

**DNS:** 3,5-Acide Dénitrosalicilique

**EDTA:** Ethylène diamine tétra acétique  
acide

**SSF:** Fermentation à l'état solide

**SMF:** Fermentation immergée

**HE :** Pectine hautement stérifié

**PAE :** Pectine Acétyl Estérase

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PE :** pectinestérase

**PEL :** pectate lyase

**PG:** Polygalacturonase

**PGL :** polygalacturonate lyase

**Ph :** potentiel d'hydrogène

**PME :** Pectine méthyl estérase

**PMG :** polyméthylgalacturonase

**PMGL :** polyméthylgalacturonate lyase

**PL :** pectine lyase

**RGI:** Rhamnogalacturonan I

**RGII:** Rhamnogalacturonan II.

**DM :** Degré de méthylation.

**DE :** Degré d'estérification

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PGA :** acide polygalacturonique

# Liste des Figures

<b><u>Figure 01</u></b>	Aspect microscopique (a) représentation schématique (b) de la conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> .	07
<b><u>Figure 02</u></b>	Représentation de la molécule de pectine.	12
<b><u>Figure 03</u></b>	Structure secondaire de la pectine.	13
<b><u>Figure 04</u></b>	Mode d'action des pectinases.	14
<b><u>Figure 05</u></b>	Diverses applications de pectinases .	18
<b><u>Figure 06</u></b>	Structure tridimensionnelle de la pectine lyase A de la souche 4M-147.	21
<b><u>Figure 07</u></b>	Mode d'action de la pectine lyase.	22
<b><u>Figure 08</u></b>	A) Structure 3D de l'Endo PG I d' <i>Aspergillus niger</i> . B) Site actif de la polygalacturonase.	25
<b><u>Figure 09</u></b>	Courbe étalon de l'acide galacturonique.	35
<b><u>Figure 10</u></b>	Courbe étalon pour le dosage des protéines	36
<b><u>Figure 11</u></b>	Profil électrophorétique SDS-PAGE de la PG après séparation. -Zymogramme de la PG.	42
<b><u>Figure 12</u></b>	Profil électrophorétique SDS-PAGE de la PL après séparation. -Zymogramme de la PL.	43

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 01</u></b>	La position systématique d' <i>Aspergillus niger</i> .	6
<b><u>Tableau 02</u></b>	Teneur en pectine de différents fruits et légumes.	11
<b><u>Tableau 03</u></b>	Classification des pectinases.	15
<b><u>Tableau 04</u></b>	Classification de différents types de pectinase.	17
<b><u>Tableau 05</u></b>	Applications industrielles des pectinases.	19
<b><u>Tableau 06</u></b>	Différentes sources de pectine lyase.	20
<b><u>Tableau 07</u></b>	Origine de la polygalacturonase.	23
<b><u>Tableau 08</u></b>	Avantages et inconvénients du SSF par rapport au SMF.	27
<b><u>Tableau 09</u></b>	Agro-résidus utilisés dans le SSF pour la production d'enzymes.	28
<b><u>Tableau 10</u></b>	Composition chimique de son de blé.	29
<b><u>Tableau 11</u></b>	Précipitation de l'extrait brut de la PG.	40
<b><u>Tableau12</u></b>	Précipitation de l'extrait brut de la PL.	41

## **Résumé :**

Ce travail concerne la séparation et la purification des enzymes fongiques dégradant la pectine. Les enzymes pectinolytiques possèdent un système complexe de protéines, qui comprennent des lyases, des polygalacturonases et des hydrolases. Ces enzymes occupent une place centrale, représentant 25 % du marché globale des enzymes.

En effet, la purification des pectinases est une étape essentielle pour obtenir des enzymes pures utilisables dans divers procédés industriels. Le choix de la méthode de purification est nécessaire pour obtenir des enzymes ayant des activités catalytiques importantes et un haut rendement. Une meilleure purification est obtenue par l'éthanol à 75%. Il a permis d'obtenir une activité spécifique de 1.32 UI/mg et de 0.16 UI/mg respectivement pour la PG et la PL. Le degré de purification est 1.2 pour la PG et 1.28 pour la PL. Le rendement est de 87.4% et 92% respectivement pour la PG et la PL. Une meilleure précipitation par le sulfate d'ammonium à 75% a permis d'obtenir une activité spécifique de 2,88 UI/mg pour la PG et 0,6 UI/mg pour la PL. Le taux de purification est de 4,8 et 2,6 et le rendement est de 60% et 33.6% respectivement.

Ces deux enzymes sont des glycoprotéines, le poids moléculaire a été déterminé par SDS-PAGE et a été estimé à 95 KDa pour l'enzyme PG et à 28 KDa pour l'enzyme PL.

En raison de ces propriétés, les deux enzymes PG et PL peuvent être appliquées dans divers domaines de l'industrie, de l'alimentation, du textile, du papier, de la filtration de l'eau et du traitement des déchets.

**Mots clés:** *Aspergillus niger*, Pectine lyase, Polygalacturonase, Purification, SSF.

## **Summary:**

This work concerns the separation and purification of pectin-degrading fungal enzymes. Pectinolytic enzymes have a complex system of proteins, which include lyases, polygalacturonases, and hydrolases. These enzymes occupy a central place, accounting for 25% of the global enzyme market.

Indeed, the purification of pectinases is an essential step in obtaining pure enzymes that can be used in various industrial processes. The choice of purification method is necessary to obtain enzymes with high catalytic activities and high yield. Better purification is achieved by 75% ethanol. It yielded a specific activity of 1.32 IU/mg and 0.16 IU/mg for PG and PL, respectively. The degree of purification is 1.2 for PG and 1.28 for LP. The efficiency is 87.4% and 92% respectively for PG and PL. Better precipitation by ammonium sulphate at 75% resulted in a specific activity of 2.88 IU/mg for PG and 0.6 IU/mg for LP. The purification rate is 4.8 and 2.6 and the efficiency is 60% and 33.6% respectively.

Both of these enzymes are glycoproteins, the molecular weight was determined by SDS-PAGE and was estimated to be 95 KDa for the PG enzyme and 28 KDa for the PL enzyme.

Due to these properties, both PG and PL enzymes can be applied in various areas of industry, food, textile, paper, water filtration, and waste treatment.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Pectin lyase, Polygalacturonase, Purification, SSF.

# *Introduction*

La biotechnologie blanche est un domaine qui se concentre sur l'utilisation de micro-organismes de cellules végétales ou animales et de leurs composants pour produire des produits et des processus industriels. Elle permet d'optimiser la production à grande échelle de ces enzymes, d'améliorer leurs propriétés et de les utiliser dans des applications industrielles variées, notamment dans l'industrie alimentaire et la valorisation des déchets agricoles.

les enzymes pectinolytiques qui sont un groupe d'enzymes constitué d'estérases, de polygalacturonases et de lyases. Les pectinases occupent 25 % de vente d'enzymes alimentaires dans le monde. sont largement utilisées dans diverses applications industrielles, notamment dans l'industrie alimentaire, l'industrie des boissons, l'industrie textile et l'industrie du papier. Elles sont utilisées pour clarifier les jus de fruits, pour améliorer la texture des aliments, pour faciliter la filtration des boissons, pour traiter les fibres textiles et pour améliorer la qualité du papier, entre autres utilisations. La production d'enzymes pectinolytiques peut être réalisée à partir de différentes sources, telles que des micro-organismes (bactéries, levures, champignons) ou des plantes.

Différentes espèces et souches d'*Aspergillus* peuvent être utilisées pour produire des enzymes pectinolytiques. La souche d'*Aspergillus* choisie doit être capable de produire de manière efficace et en quantités suffisantes les enzymes pectinolytiques souhaitées.

*Aspergillus niger* représente le microorganisme le plus important produisant cette enzyme, en raison de ses propriétés très connues et de sa 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, bagasse d'orange Son de maïs.

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 et la pectine lyase dans des conditions optimales.

La purification des enzymes pectinolytiques peut être réalisée en plusieurs étapes afin d'obtenir une préparation pure et concentrée de l'enzyme. Elle est un processus complexe et peut varier en fonction des exigences spécifiques de l'application et des protocoles de purification utilisés dans les laboratoires ou les installations industrielle

Les différentes étapes réalisées au cours de ce travail sont :

\* production des enzymes pectinolytiques : polygalacturonase et pectinase

\* Mise en évidence de l'activité pectinolytique d'*Aspergillus niger* par fermentation sur milieu solide.

\* purification partielle des enzymes



*Partie  
bibliographie*

# *Chapitre 01*

## **I. Moisissures**

Les moisissures sont des organismes fongiques eucaryotes microscopiques ubiquistes à croissance filamenteuse, uni- ou pluricellulaires. Ils comprennent des milliers d'espèces. Le terme « moisissures » fait généralement référence à la texture de la laine, de la poudre ou du coton (**IOM et al., 2000**).

La seule façon d'identifier les champignons filamenteux était d'observer les caractéristiques culturelles et morphologiques de l'espèce (**Samson et al., 2006**). Ils sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle et représentent un groupe hétérogène de microorganismes. Il est constitué de filaments ou d'hyphes enchaînés les uns par rapport aux autres. Ils ont une paroi composée principalement de polysaccharides.

La croissance des moisissures dépend de plusieurs facteurs, environnemental, notamment l'humidité, la température (La majorité des moisissures sont mésophiles), l'oxygène et le pH. (**Poulin.,2002**) .

## **II. Genre *Aspergillus***

### **1.Généralités**

Champignon du genre *Aspergillus*, décrit pour la première fois en 1729 (**Micheli., 1729**). C'est un champignon saprophyte à filaments septaux transparents et haploïde.*Aspergillus* appartient aux groupes phylogénétiques des Ascomycètes et des Mucorales.

Elle comprend aujourd'hui environ 185 espèces, dont 20 espèces retrouvées en pathologie humaine. *Aspergillus* est une moisissure que l'on trouve partout dans le monde, surtout à la fin de l'été, en automne et en hiver (**Guegan et al.,2019**) .

Ils métabolisent en aérobiose et participent au cycle du carbone et de l'azote dans l'environnement (**Samson et al .,2008**). Ils sont thermophiles, certaines espèces sont capables de survivre à des températures allant jusqu'à 70°C et ne nécessitent pas de nutriments spécifiques (**Guegan et al.,2018**) .

## 1. Espèce *Aspergillus niger*

### 2.1. Taxonomie

Le genre *Aspergillus* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729. Il comprend 250 espèces réparties en 18 divisions : *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Terrei*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Candidi*, *Usti*, *Restricti*, *Flavipedes*, *Cremeri*, *Cervini*, *Sparsi*, *Ornati*, *Warcupi* et *Zonati* (Kaya et al., 2015 ; Chen et al., 2017). Une section *Aspergillus* a été ajoutée. Il correspond à l'espèce anciennement classée sous le nom d'Eurotium (Chen et al., 2017).

**Tableau 1** : La position systématique d'*Aspergillus niger*.

(Kavanagh., 2005).

<b>Domaine</b>	Eucaryote
<b>Royaume</b>	Champignons
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Eurotiomycètes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Eurotiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Niger</i>

### 2.2. Caractères

Les champignons filamenteux imparfaits comme l'*Aspergillus niger* représentent une variabilité de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques (Adjovi et al., 2014 ; El Mahgubi et al., 2013 ; Carvajal et al., 2017).

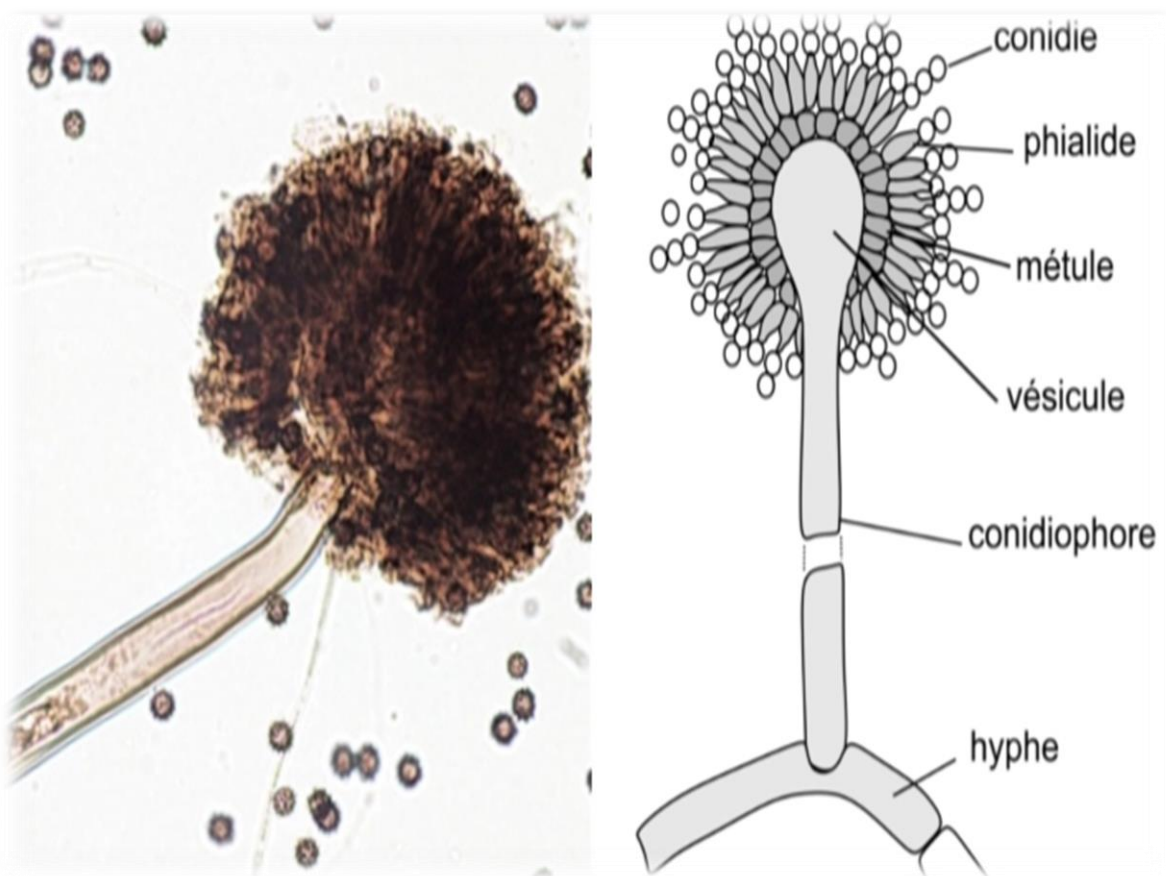
*A. niger* est un mycète mésophile : sa température optimale est de 20-40 °C, avec une bonne croissance à 37 °C sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Czapek Yeast Agar, YES agar et Malt salé).

Cette espèce est xérophile et exige une activité de l'eau de 0,77. Elle peut cependant bien se développer dans un environnement où l'humidité relative est de 90-100 % et de pH très faibles jusqu'à 2. Son développement est aussi inhibé par l'actidione (**Qautresous, 2011**).

### 2.3. Morphologie

Les *Aspergillus* sont caractérisés par une structure morphologique typique. Un conidiophore 1 à 3 mm, qui comprend la tige et la tête conidiale, provient d'un mycélium spécialisé à paroi épaisse structure appelée cellules du pied.

Les conidiophores sont non septés, élargis vers l'apex et se terminent par un gonflement globuleux de 2,5 à 4 µm (**Varga et al., 2011**). La vésicule porte sur toute la surface de 10 à 15 µm de long, généralement des métules brunes, qui portent elles-mêmes des phialides. Les conidies sont produites successivement à partir des extrémités des phialides, formant ainsi des sévices secs non ramifiés en chaîne. Les conidies sont lisses ou ornées, plus ou moins globuleuses et de 4 à 5 µm de diamètre mais parfois plus petit.



**Figure 1 :** Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d'*Aspergillus niger* (**Basil et al, 2023**).

## 2.4.Importance industriel de l'*Aspergillus niger*

Les *Aspergilli* sont utilisés par l'industrie pour la production de métabolites primaires (acides organiques, vitamines, acides gras et acides aminés) et enzymes ainsi que pour les processus de bioconversion. Depuis 1917, les souches d'*A. niger* sont utilisées dans la production d'acide citrique, un Additif accepté avec un large éventail d'applications dans les aliments, les boissons, les produits pharmaceutiques et industries cosmétiques et pour la transformation industrielle et technique (Brooke,1994).

### 2.4.1.Production d'enzymes

*Aspergillus niger* est utilisé pour produire des enzymes industrielles telles que l'amylase, la cellulase, la pectinase, la phytase, l'alpha-galactosidase et bien d'autres. Ces enzymes sont utilisées dans des domaines tels que l'agroalimentaire, la production d'aliments pour animaux, la fabrication de biocarburants, l'industrie textile et l'industrie du papier (Pariza et al.,2010).

### 2.4.2.Production d'acide citrique

*Aspergillus niger* est principalement utilisé pour la production d'acide citrique à grande échelle. Le champignon est cultivé dans des conditions spécifiques, généralement dans des bioréacteurs, pour produire de l'acide citrique par fermentation (Siboukeur et al 2001). L'acide citrique est utilisé dans de nombreux secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire, la pharmacie, les cosmétiques et la chimie (Karaffa et al 2003).

### 2.4.3.Dégradation des déchets organiques

*Aspergillus niger* est capable de dégrader une large gamme de composés organiques, y compris la cellulose, l'amidon, les pectines et d'autres polymères naturels. En raison de cette capacité enzymatique, il est utilisé dans le compostage des déchets organiques et dans le traitement des eaux usées pour éliminer les matières organiques (Coulibaly et al.,2002).

#### 2.4.4. Production de bioplastiques

*Aspergillus niger* est utilisé pour produire des bioplastiques à partir de matières premières renouvelables telles que l'amidon et la lignocellulose. Le champignon décompose ces substrats en sucres fermentescibles, qui peuvent ensuite être utilisés pour produire des polymères biodégradables (Nicolas .2021).

#### 2.4.5. Production de composés chimiques

*Aspergillus niger* est utilisé pour la production de divers composés chimiques tels que l'acide gluconique, l'acide itaconique et l'acide fumarique. Ces composés ont des applications dans l'industrie chimique pour la fabrication de produits chimiques, de plastiques, de résines et d'autres matériaux (Karaffa et al.,2003).

#### 2.4.6. Biotransformation des xénobiotiques

*Aspergillus niger* possède des mécanismes de biotransformation qui lui permettent de dégrader et de transformer les xénobiotiques. Lorsqu'il est exposé à des xénobiotiques tels que les polluants organiques, les pesticides ou les composés pharmaceutiques. Cette capacité est attribuée à ses enzymes de détoxification et à ses voies métaboliques spécialisées, qui peuvent inclure des réactions d'hydroxylation, de conjugaison et d'autres réactions enzymatiques (Myung et al.,2008).

# *Chapitre02*



## I. Enzymes glycolytiques

### 1. Substrats pectiques

Les pectines sont des substances d'origine végétale. Ce sont des polysaccharides complexes qui se trouvent principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures (Alkorta et al., 1998 ; Blanco et al., 1999). Elles jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux en formant un ciment qui lie les cellules entre elles (Iwasaki et al., 1998).

Le degré d'estérification de la pectine, qui est défini comme le rapport entre les résidus d'acide galacturonique méthylé ou acétylé et les unités totales d'acide galacturonique présentes dans la molécule, est l'une des caractéristiques les plus importantes de ces fibres, parce qu'il détermine leurs propriétés gélifiantes et donc leurs propriétés physiologiques (Cuervo et al., 2014).

-Les pectines ayant un degré d'estérification  $DE > 50\%$  sont dites : Hautement méthylée (HM) (Combo et al., 2011).

-Les pectines ayant un degré d'estérification  $DE < 50\%$  sont dites : faiblement méthylée (FM) (Combo et al., 2011).

### 2. Source de pectine

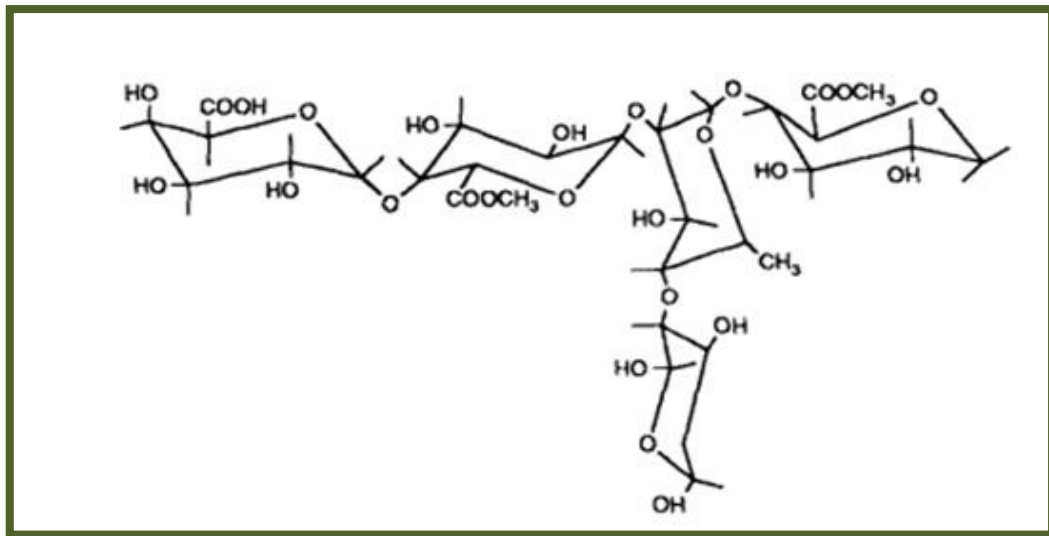
Même si les pectines peuvent être extraites de plusieurs plantes, les sources industrielles principales sont le marc de pomme et les écorces d'agrumes (Donato., 2014) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Teneur en pectine de différents fruits et légumes .

Fruits	% de substances pectiques	Références
Pommes	0.6–1.6	Kadijaet al., 2018
Marc de pomme	1.5-2.5	Renard et thibault., 1993
Bananes	0.7-1.2	Tapre et jain., 2014
Pulped'orange	12.4–28.0	Jayani., 2005
Carottes	6.9–18.6	Kadijaet al ., 2018
Abricots	0.7-1.3	Tapre et jain., 2014

### 3. Structure de pectine

La pectine est un polysaccharide linéaire, composé d'unités d'acide D -galacturonique (D-galA) reliées par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1→4), interrompu par des résidus de L-rhamnose liés en  $\alpha$ -(1→2) avec des chaînes latérales constituées de glucides neutres principalement de L-rhamnose, de L-arabinose et de D-galactose (Akhtar et al., 2002)(Figure 1).



**Figure 2** : Représentation de la molécule de pectine.

(Barford et al., 1986).

Dans la nature, il existe quatre formes de pectines (Alkorta et al., 1998) :

-Les protopectines : sont insoluble dans l'eau. Les tissus intacts des plantes contiennent de la protopectine (Javed et al., 2014).

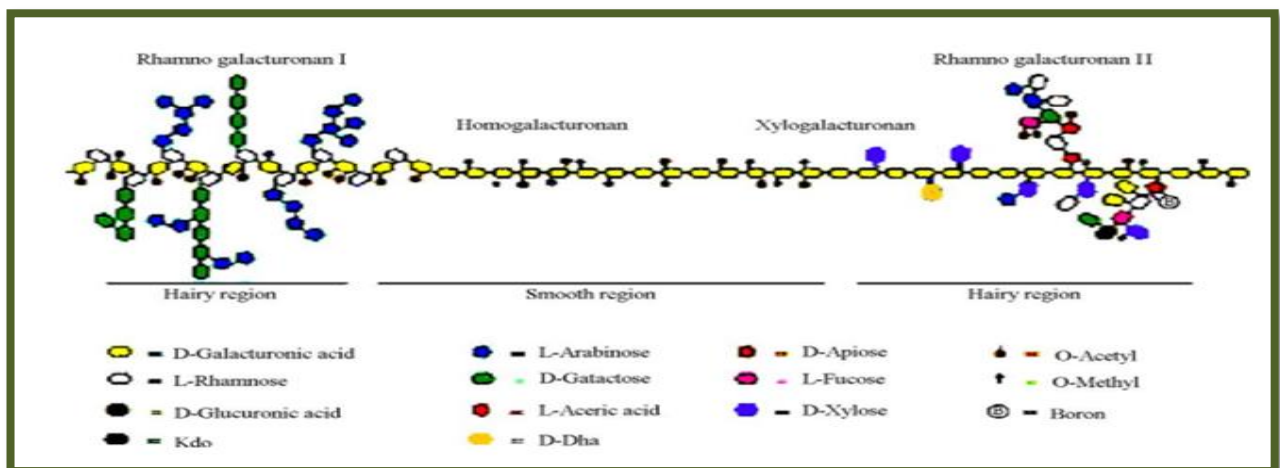
-Les acides pectiniques: sont des acides polygalacturoniques ayant des unités méthylées (Kilara., 1982).

-Les pectinates : sont des sels de l'acide pectinique (Kilara., 1982).

-Les acides pectiques : sont des acides polygalacturoniques possédant une propriété de solubilité et les groupes méthoxylés sont négligeables (Kilara., 1982).

- Les pectates : sont des sels de l'acide pectique (Kilara., 1982).

Les pectines sont constituées de plusieurs polysaccharides associés : les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de dire que les pectines consistent essentiellement en trois domaines distincts, à savoir l'homogalacturonane (Zone lisse nommée HG) et les rhamnogalacturonanes I et II (zones hérissées nommées RG I et RG II) (Perrone et al., 2002) (Figure 2).



**Figure 3** : Structure secondaire de la pectine.

(Zhang., 2006).

- Homogalacturonane

Les homogalacturonanes représentent 57 à 69 % de la pectine (Jackson et al., 2007). Ce sont des polymères linéaires composés uniquement d'acides D-galacturoniques reliés entre eux par des liaisons  $\alpha$ -(1-4) (Combo et al., 2011).

- Rhamnogalacturonane I (RGI)

RG I est constitué de l'acide rhamnose-galacturonique disaccharide répétitif. Les résidus d'acide galacturonique peuvent être acétylés et les deux résidus peuvent avoir des chaînes latérales de sucres neutres tels que le galactose, l'arabinose et le xylose (Willats et al., 2006).

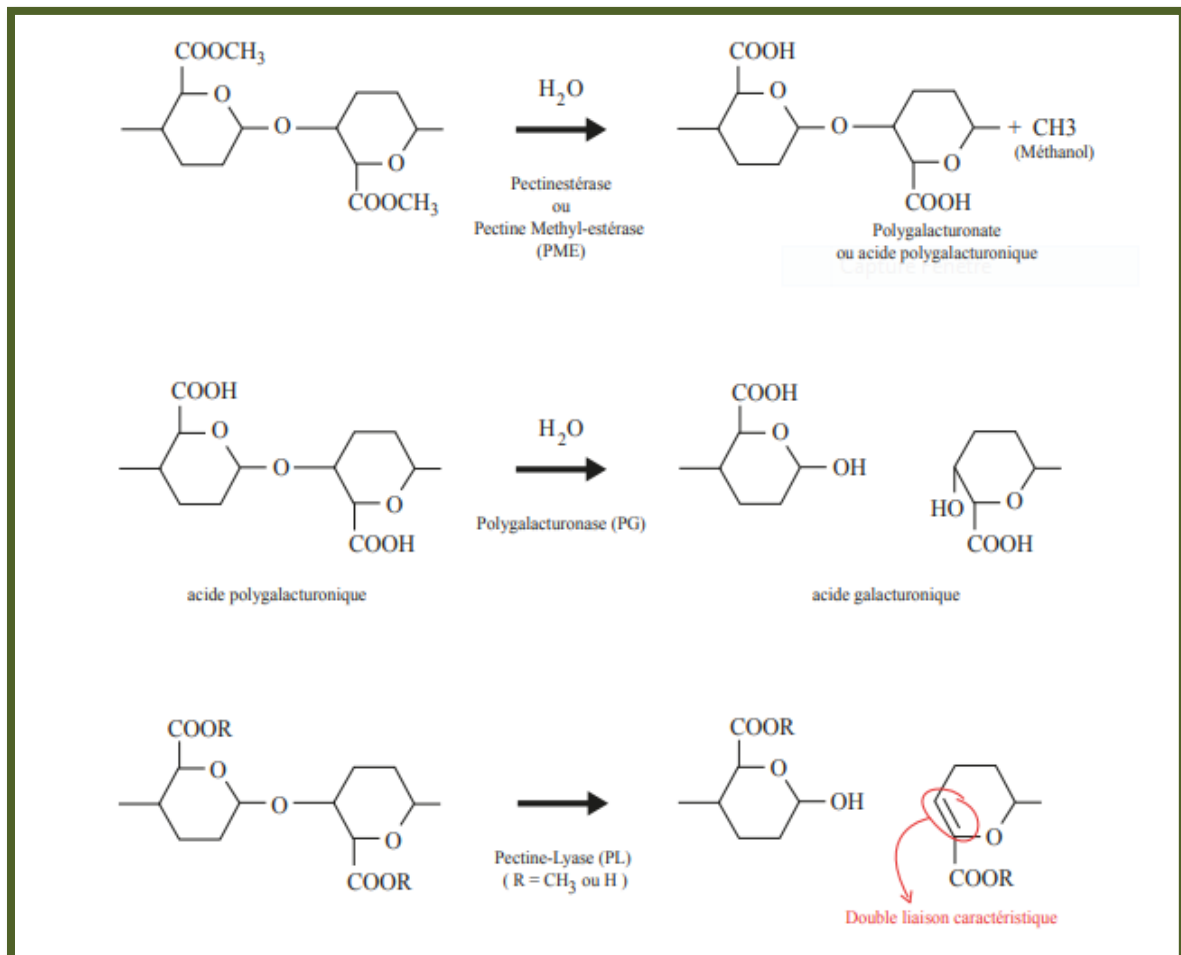
- Rhamnogalacturonane II (RGII)

Malgré son nom, RGII est une chaîne homogalacturonane avec chaînes latérales complexes attachées aux résidus galacturoniques (Willats et al., 2006).

## I. Les enzymes pectinolytiques

### 1. Définition

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe d'enzymes hétérogènes qui hydrolysent les substances pectines et produites par une variété de micro-organismes. La majorité des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique (Jayani et al., 2005). Cette famille d'enzymes est capable de catalyser la rupture de différentes liaisons chimiques glycosidiques des longues chaînes de résidus d'acide galacturonique des substances pectiques dans la pectine (Daniel, 2009 ; Willats et al., 2006). Les enzymes susceptibles de dégrader les chaînes latérales n'appartiennent pas aux enzymes pectinolytiques (Saharan et al., 2019). Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (Jayani et al., 2005), le mécanisme de dégradation, et le type de clivage (endo ou exo) (Favela et al., 2006).



**Figure 4 :** Mode d'action des pectinases.

(Ierny., 1992).

### 1.1. Classification de pectinase

Les enzymes pectinolytiques peuvent être divisées en trois groupes ( Sakai et al.,1992 ; Palomäk et Saarilahti .,1997).

-Pectinestérase : qui élimine seulement les résidus de méthoxyle de la pectine.

-Dépolymérase : qui catalyse le clivage hydrolytique du liaisons  $\alpha$ -(1-4)-glycosidiques dans les fractions d'acide D-galacturonique des substances pectiques.

-Protopectinase : qui dégrade la protopectine insoluble et donner lieu à une pectine soluble.

**Tableau 3** :Classification de pectinase.

( Saharan et al.,2019).

Enzyme	E.C N°	Nom systématique	Mode d'action	Mécanisme d'action	Substratpri maire	Produit
<b>Dépolymérisantes</b>						
<b>*Hydrolase</b>						
-Protopectines			Aléatoire	Hydrolyse	Proto-pectine	Pectine
-Endo-PG	3.2.1.15	Poly-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosideuronategl ycanohydrolase	Aléatoire	Hydrolyse	Acide-pectique	Oligogalagturonates
-Exo-PG	3.2.1.67	Poly-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosideuronategl ycanohydrolase	Terminal	Hydrolyse	Acide-pectique	Monogalacturonates
-ExoPG-digalacturono hydrolase	3.2.1.82	Di-G-hydrolase de poly-(1-4)- $\alpha$ - $\beta$ -galactosideurenate	Pénultième obligations	Hydrolyse	Acide-pectique	Digalacturonates
- Oligogalacturonatehydr olyse			Terminal	Hydrolyse	Tri-galacturonate	Monogalacturonates
-hydrolases d'oligogalacturonatesin saturés 44 :5			Terminal	Hydrolyse	44 :5 galacturonate	Monogalacturonatesinsa turés&saturé (n-1)
-Endo- PMG			Borne	Hydrolyse	Pectine HE	Oligo- MG
			Aletoire	Hydrolyse	Pectine HE	Oligogalacturonate

<b>Estéranes</b>						
<b>- PME</b>	3.1.1.11		Aléatoire	Hydrolyse	Pectine	Méthanol'd'A.P
<b>Lyases</b>						
<b>-Endo-PGL</b>	4.2.2.2	Poly-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronatylase	Aléatoire	Trans- élimination	Acide- pectique	Oligogalacturonatesinsaturés
<b>-Exo-PGL</b>	4.2.2.9	Poly-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronatexylase	Pénultième	Trans- élimination	Acide- pectique	Digalacturonatesinsaturés
<b>-oligo-D-galactosiduronatylase</b>	4.2.2.6	Oligo-D-galactosiduronatylase	Borne	Trans- élimination	Di- galacturonateinsaturés	Monogalacturonatesinsaturés
<b>-Endopolyméthyl-D-galactosiduronatylase</b>	4.2.2.10	PMGL	Aléatoire	Trans- élimination	Poly-(o-di- galcturonates de méthyl- insaturés )	Méthyloligo- galacturonatesinsaturés
<b>-Exopolyméthyl-D-galactosiduronatylase</b>			Terminal	Trans- élimination	Poly-méthyl $\beta$ -di – galacturonates insaturés	Méthylmono- galacturonatesinsaturés

### 1.2.Facteurs affectant le rendement en pectinase

*Aspergillus niger* est l'une des grandes sources de production de pectinase ; Les différents facteurs affectant le rendement des pectinases sont les suivants:

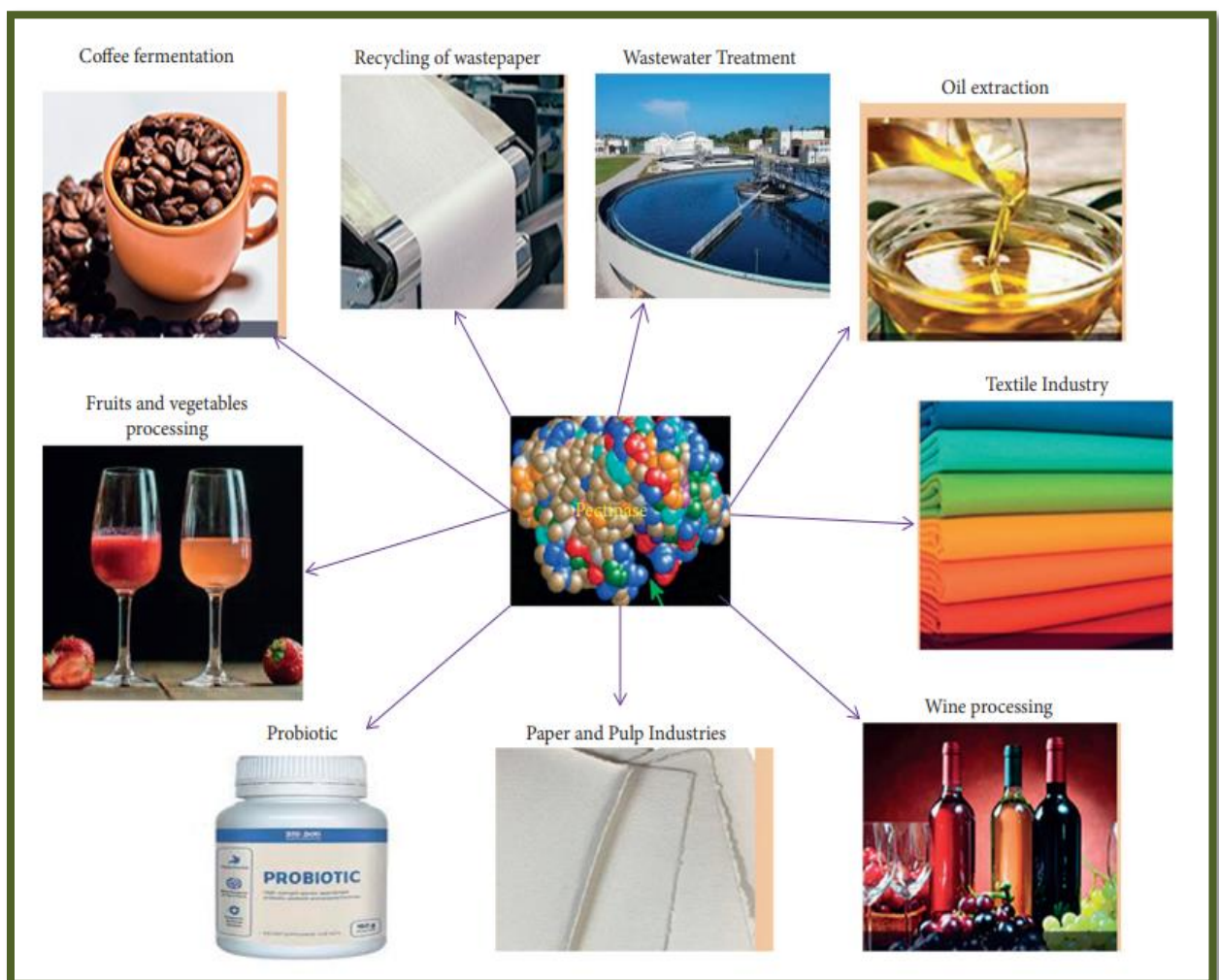
**Tableau 4** : Classification de différents types de pectinase.

(Khadija et al.,2018).

Producteur	Types de pectinase	Ph optimale	Température optimale (c°)
<i>Aspergillus niger CH4</i>	Endo-pectinase	4.5-6.0	Au dessous de 50
	Exo- pectinase	3.5-5.0	
<i>Bacillus sp. R K9</i>	PGL	10	30 – 40
<i>Rhizoctoniasolni</i>	Endo-PG	4.8	50
<i>Clostridiumthermosac charolyticum</i>	Polygalacturonates	5.5 – 7	30 – 40

### 1.3.Applications de pectinase

Les enzymes pectinolytiques sont utilisées dans la transformation des jus et la vinification pour dégrader les substances pectiques. Considérant que les pectinases alcalines trouvent leur application dans la fabrication du papier, l'extraction d'huile végétale, la transformation textile, la transformation du thé et du café et le traitement des eaux usées(Saoudi et al.,2015)(Figure 4) (Tableau 5).



**Figure 5 :**Diverses applications depectinase .

( Sharma et al .,2012 ; Rebello et al .,2017 ; Singh et al .,2016 ).



**Tableau 5** : Applications industrielles de pectinase.

(Gummadi et al.,2007).

<b>Application</b>	<b>But</b>
<b>Stabilisation des nuages</b>	Pour précipiter la matière hydrocolloïde présente dans les jus de fruits
<b>Clarification du jus de fruit</b>	Dégrader les substances pectiques formant des nuages. Par conséquent, le jus peut être facilement filtré et traité.
<b>Extraction de jus et d'huile</b>	Surmonter la difficulté de pressage de la pulpe pour donner du jus et de l'huile
<b>Macération</b>	Pour décomposer les tissus de légumes et de fruits produire des produits pulpeux utilisés comme matière de base pour les jus, le nectar comme dans le cas des aliments pour bébés, le pudding et le yogourt
<b>Liquéfaction</b>	Décomposer les plantes fermentescibles glucides aux sucres simples utilisant des enzymes
<b>Gélification</b>	À utiliser dans la gélification des fruits à faible teneur en sucre
<b>Préservation du bois</b>	Prévenir l'infection du bois en augmentant la perméabilité de l'agent de préservation du bois
<b>Rouage des cultures de fibres</b>	Libérer les fibres des cultures par la fermentation avec des micro-organismes, qui dégradent la pectine
<b>Dégraissage des cultures de fibres</b>	Pour enlever la gomme de ramie de la fibre de ramie
<b>Traitement des eaux usées</b>	Pour dégrader les substances pectiques dans les eaux usées des industries de transformation des agrumes.
<b>Fermentation du café et du thé</b>	Pour enlever le mucilage dans les grains de café. À améliorer la fermentation du thé et la formation de mousse propriété du thé

## 2. Pectine lyase

Pectine lyase (E.C. 4.2.2.10) polyméthoxygalacturonide, également connue sous le nom de pectolyse, c'est un enzyme que dégrade la pectine de la lamelle moyenne et de la paroi primaire.

### 2.1.Source de la PL

Comme toutes les pectinases, cette PL est une enzyme fort inductible, bien qu'une production substantielle en l'absence de son inducteur naturel ait été rapportée (Piccoli et al., 2001). La plupart des lyases de pectine étudiées jusqu'à présent proviennent de micro-organismes (Yadav et al., 2008), mais il existe peu de rapports sur leur existence chez les animaux et les plantes. Elles sont principalement produites par les genres fongiques *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, mais certaines lyases de pectine bactériennes et de levure ont également été signalées. De multiples formes sont produites par des champignons filamenteux, et de nombreuses familles de gènes ont été isolées et caractérisées à partir de *Aspergillus niger* (Maldonado, 1998).

**Tableau 6** : Différents sources de pectine lyase.

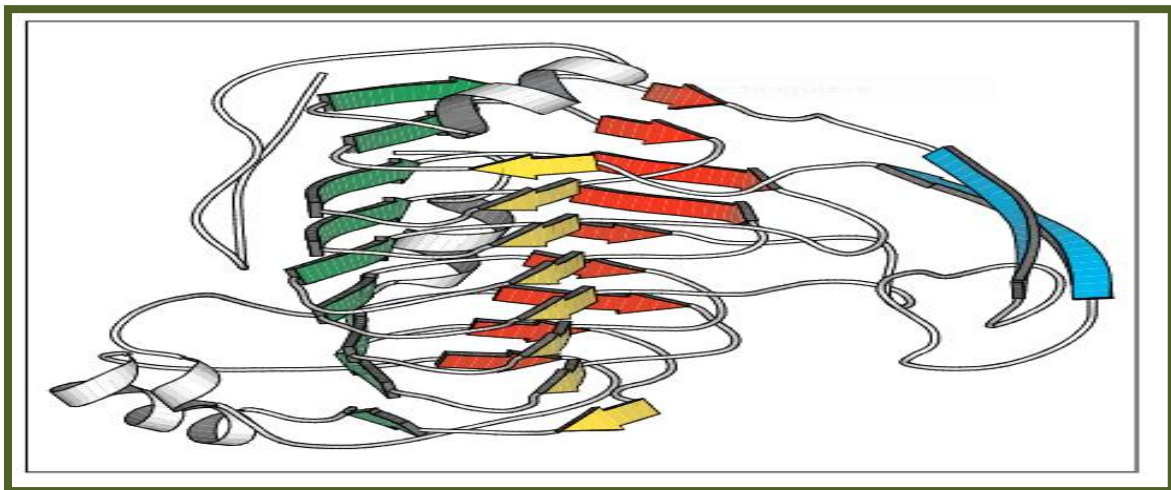
Sources	Références
<b>Champignons</b>  <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus luchuensis var. saitoi</i> <i>Shizophylum commun</i>	(Mehmoud et al., 2019) (Nabi et al., 2003) (Yang et al., 2020) (Kamijo et al., 2018)
<b>Bactéries</b>  <i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pectobacterium carotovora</i> <i>Erwinia carotovora</i>	(Karbalaee et al., 2014) (Prajapati et al., 2021) (Masuria et al., 2012) (Sittidolokartana et al., 2007)
<b>Autre</b>  <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	(Lee et al., 2013)

## 2.2. Structure de la PL

Les structures de la pectine lyase des souches N400 et 4M-147 comprennent les 359 résidus de protéines matures et de molécules de solvant. L'architecture globale se compose d'un domaine parallèle en hélice  $\beta$  et d'une région de boucle (Jurnak et al., 1994).

Les brins  $\beta$  parallèles se replient en une grande hélice droite, qui est alvéolée en section transversale. Les brins  $\beta$  des tours consécutifs s'alignent pour former trois feuilles  $\beta$  parallèles appelées PB1, PB2 et PB3. PB1 et PB2 forment un sandwich  $\beta$  antiparallèle, tandis que PB3 se trouve approximativement perpendiculairement à PB2. PB1 est formé de huit brins  $\beta$  et PB2 et PB3 de neuf brins  $\beta$  chacun. Les brins  $\beta$  sont généralement courts, généralement trois acides aminés pour PB1, quatre ou cinq acides aminés pour PB2 et trois à cinq pour PB3.

Les feuilles  $\beta$  génèrent huit tours complets dans l'hélice  $\beta$  parallèle plus un tour N-terminal supplémentaire incomplet formé par le premier brin  $\beta$  de PB2 et PB3.



**Figure 6** : L'architecture globale de la pectine lyase A de la souche 4M-147.

Représentation schématique dans laquelle les flèches représentent les brins  $\beta$  et les bobines représentent les hélices. La feuille  $\beta$  parallèle 1 (PB1) est représentée en jaune, PB2 en vert et PB3 en rouge. La feuille  $\beta$  antiparallèle dans la longue boucle T3 est représentée en bleu. (Figure préparée à l'aide de MOLSCRIPT (Kraulis, 1991)).

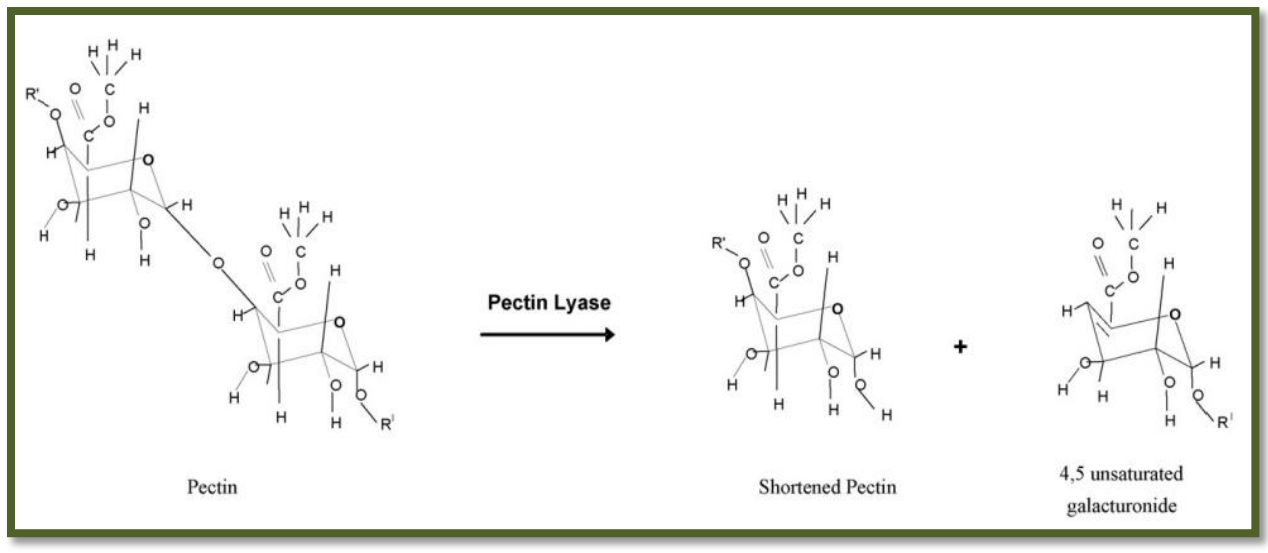
### 2.3. Mode d'action

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de  $\beta$ -élimination (Sasi et al.,2017).

Dans la réaction générale d'élimination  $\beta$ , deux groupes ioniques sont retirés du substrat :

Un proton  $\alpha$  généralement assisté par une base, et un groupe sortant de  $\beta$  souvent assisté par un acide. Cette réaction entraîne la formation d'une double liaison. Dans les réactions d'élimination  $\beta$  catalysées par des enzymes, les ions métalliques semblent souvent jouer un rôle dans l'activation de l'atome  $\alpha$ .

Il est également possible de différencier les lyases en fonction de leur substrat, les pectines lyases clivant préférentiellement les pectines hautement méthylées, alors que les pectates lyases s'attaquent aux pectines faiblement méthylées (Hugouvieux et al.,2014). La pectine lyases, leur activité n'est pas dépendante des ions  $Ca^{2+}$  mais elle peut toute fois être stimulée par la présence de cations divalents (Jayani et al.,2005). Notons que parmi les dépolymérase, seules les pectine lyases ont la capacité de dégrader les pectines hautement méthylées sans intervention préalable des méthylestérases. Les lyases de champignons présentent une activité optimale en milieu acide et neutre, alors que celles de bactéries sont plus actives en milieu alcalin. La dégradation complète du substrat de la pectine nécessite toujours des enzymes qui coupent la chaîne du rhamnogalacturonane (Takao et al.,2009).



**Figure 7 :** Mode d'action de pectine lyase.

( Yadev et al.,2008).

### 3. Les polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) appartiennent à la famille des hydrolases glycosylées 28, clivant le lien  $\alpha$ -1,4 entre deux résidus d'acide galacturonique, et se retrouvent dans les plantes supérieures et les microorganismes (Nakamura et Iwai., 2019). Les PG sont classées en deux classes; endo-polygalacturonase (E.C. 3.2.1.15) et exo-polygalacturonase (E.C. 3.2.1.67) (Patidar et al., 2018).

**Endo-PG** : également connue sous le nom de poly (1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) glycanohydrolase, catalyse l'hydrolyse aléatoire des liaisons  $\alpha$  (1,4) -glycosidiques dans l'acide pectique (Tapre et Jain., 2014).

**Exo-PG**: également connue sous le nom de poly(1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) galacturonohydrolase, catalyse l'hydrolyse dans un mode séquentiel des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques sur l'acide pectique (Tapre et Jain., 2014).

#### 3.1. Source de la PG

Les PG sont produites par des bactéries, des levures, des champignons, des nématodes et des insectes (De Lorenzo et Ferrari., 2002; Jaubert et al., 2002; Girard and Jouanin., 1999).

**Tableau 7:** Origines de polygalacturonase.

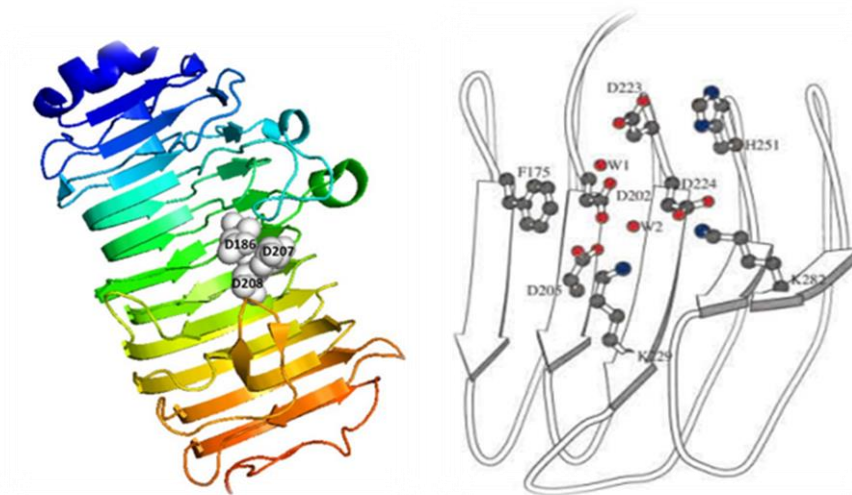
Origines	Références
<b>Bactérienne</b>	
<i>Bacillus sp</i>	(Soares et al., 2001)
<i>Erwinia sp</i>	Mehta et al., 2013)
<i>Bacillus cereus</i>	(Namasivayam et al., 2011)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	(Roy et al., 2018)
<b>Fongique</b>	
<i>Neurospora crassa</i>	(Polize et al., 1991)
<i>Aspergillus japonicus 586</i>	(Teixeira et al., 2000)
<i>Mucor circinelloides ITCC6025</i>	(Thakur et al., 2010)
<i>Saccharomyces sp.</i>	(Radoi et al., 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	(Oyeleke et al., 2012)
<i>Aspergillus niger IBT-7</i>	(Abdullah et al., 2018)

<b>Levurienne</b>	
<i>Wickerhanomycesanomalu</i>	(Martos et al.,2013)
<i>Candida sake</i>	(Buzzini et Martini.,2002)
<i>Rhodotorulaglutinis MP-10</i>	(Taskin.,2013)
<b>Animale</b>	
<i>Ditylenchusdipsaci</i>	(Barker.,1996)
<i>Meloidogyneincognita</i>	(Jaubert et al.,2002)
<i>Sitophilusoryzae</i>	(Shen et al.,2003)
<b>Végétale</b>	
Fruits rouges	(Amid et al.,2014)
Tomate	(Moshrefi et Luh.,1984)
Avocat	(Wakabayashi et Huber.,2001)
Mangue	(Singh et Dwivedi.,2008)

### 3.2.Structure de la PG

La PG est une protéine sécrétée d'environ 360 acides aminés et contient une séquence signale d'environ 20 à 65 acides aminés. Elle est généralement glycosylée et comporte quelques ponts disulfures stabilisants(Pickersgill et al.,1998; Pickersgill et al.,1999 ;Van Santen et al., 1999). La PG une structure monomère hélicoïdale droite constituée de feuillets parallèles pouvant contenir de 7 à 12 tours complets formant de 3 à 4 feuillets (Yoder et Jurnak 1995; Jenkins et al. 1998; Van Santenet al.,1999) (Figure 7-A).

L'alignement de 36 séquences polygalacturonases révèle quatre régions conservées : Asn201-Thr202-Asp203, Gly222-Asp223-Asp224, Gly250-His251-Gly252 et Arg280-Ile281-Lys282(Pickersgill et al.,1998) . Le site actif est constitué de trois résidus d'aspartate sont essentiels pour la réaction catalytique et sont conservés fonctionnellement entre endo- et exoPG(Abbott et Boraston.,2007) et l'histidine est importante pour l'activité de la polygalacturonase(Pickersgil .,2003) (Figure 7-B).



**Figure 8:**A) Structure 3D de l'Endo PG I d'*Aspergillus niger*(Nakamura et Iwai.,2019).

B) Site actif de la polygalacturonase(Pickersgill et al .,1998).

### 3.3.Mode d'action

Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité de PG .On apprécie cette activité en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat. La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur lors de la dépolymérisation de la pectine et d'acidespectique permet de faire la part des activités « endo »et « exo ».Ainsi, avec l'endo-PG lors que seulement 2 à 3 % des liaisons glycosidiques sont rompues, la viscosité est réduite de moitié. Avec l'exo-PG,la même réduction de viscosité n'est observée qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques(Sakai et al., 1993 ; Jayani et al., 2005).

L'action d'un endo-PG libère un mono-, di- et tri-acidesgalacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque« multi-chaîne (Combo et al .,2011).

Lors d'une attaque « uni-chaîne », un complexe enzyme-substrat se forme dans lequel le substrat est complètement dégradé avant que le complexe ne se dissocie et que l'enzyme ne se réassocie à de nouvelle molécule de substrat . Une attaque « multi-chaîne » veut dire qu'après une première rupture d'une liaison d'une molécule du substrat, le complexe enzyme substrat se lie avec une nouvelle molécule pour rompre une autre liaison (Rombouts et Pilnik.,1980).

On distingue deux types d'exo – PG : les exo-PG fongiques qui produisent de l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique (Combo et al .,2011).

### 3.4. Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase

#### ▪ Effet du pH

Les paramètres physico-chimiques du milieu jouent un rôle prépondérant sur la croissance, le développement et la physiologie des champignons (**Badid et al.,2001**). Le pH optimal de l'activité des polygalacturonases situe vers 3,8, la même valeur est rapportée par (**Khairmar et al.,2009**) et (**Combo et al.,2011**). Ce résultat demeure très proche de celui observé par (**Sandri et al.,2011**) qui signalent un pH optimal de 4 pour la souche d'*Aspergillus niger*. Selon la littérature, *Aspergillus* se développe à un pH compris entre 2 et 11. Dans ce sens, (**Gomes et al.,2011**) ont trouvé un pH optimal de 5,5 de l'exo-PG produite par *Aspergillus niger*.

#### ▪ Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité des pectinases montre que l'activité maximale de l'endo et d'exo PG est enregistrée à 35°C. Au-delà de cette température, l'activité pectinolytique diminue et l'enzyme est totalement inhibée vers 65°C. En effet (**Gomes et al.,2011**) ont signalé une valeur de 37°C, et de 30°C pour (**Kumar et al.,2011**) et (**Fenghour et al.,2002**), alors que (**Combo et al.,2011**) et (**Sandri et al.,2011**) ont observé une valeur de température égale à 40°C.

#### ▪ Effet des effecteurs

##### • Effet de CaCl<sub>2</sub>

La concentration de 10 mM de chlorure de calcium a inhibé totalement l'activité de l'exo-PG. Il optimale de 35°C. Il s'avère que le calcium inhibe l'exo-PG contrairement aux observations faites sur l'endo-PG est à noter que les exo-PG d'origine végétale, à l'exception des carottes, sont fortement activées par les cations divalents, particulièrement le calcium et le strontium, et par les ions monovalents à faible concentration (< 10<sup>-3</sup> M). En revanche, elles sont inactivées par des teneurs plus fortes en sels (**Thibault.,1980**).

##### • Effet de l'EDTA

L'EDTA est un agent chélateur qui ne complexe que les cations bivalents impliqués dans l'activation de plusieurs enzymes, en les empêchant, de ce fait, d'agir en tant qu'activateurs (**Fenghour et al.,2002**).



## 4. La fermentation sur milieu solide

### 4.1. Définition

la fermentation à l'état solide (SSF) est envisagée comme une technique de conversion biologique importante pour transformer les matières premières naturelles en une grande variété de produits chimiques et biochimiques. Ce processus implique la fermentation d'un substrat solide avec un microorganisme en l'absence d'eau libre. SSF est exploité avec succès pour la production alimentaire, les enzymes, les antibiotiques, les aliments pour animaux et aussi pour la dégradation des colorants (Prabhakar et al., 2005).

### 4.2. Avantages et inconvénients du SSF

La fermentation sur milieu solide a ses propres avantages et certains inconvénients, lesquels sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 8:** Avantages et inconvénients du SSF par rapport au SmF.

(Krishna.,2005; Perez-Guerra et al., 2003).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-La productivité volumétrique et la concentration du produit seront plus élevées comparativement à SmF.</li> <li>-L'utilisation de matières premières et de résidus agro-industriels résout le problème de pollution de nombreux fabricants.</li> <li>-SSF peut avoir besoin d'un réacteur plus petit par rapport à SmF pour contenir la même quantité de substrat.</li> <li>-La plus faible activité de l'eau du milieu de fermentation réduit le risque de contamination notamment par les bactéries et les levures.</li> <li>-Le coût en capital, les dépenses énergétiques et le coût du processus en aval sont inférieurs à SmF</li> <li>-Dans certains cas, les propriétés biochimiques du SSF peuvent différer de celles du SmF.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-L'agitation du substrat pour obtenir l'homogénéité est difficile.</li> <li>-Limite l'utilisation d'organismes qui nécessitent des niveaux d'humidité élevés.</li> <li>-La détermination de la biomasse au cours du processus est très difficile.</li> <li>-L'aération sera difficile en raison de la forte concentration du solide.</li> <li>-Les temps de culture peuvent être plus longs en raison des délais plus longs des spores inoculées.</li> </ul>

### 4.3. Microorganismes utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes SSF

De nombreux microorganismes, y compris les bactéries, les levures et les champignons, produisent divers groupes d'enzymes (Pandey et al., 1999) (Tableau 9).

### 4.4. Substrats utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes SSF

Les résidus agro-industriels sont généralement considérés comme les meilleurs substrats pour les processus SSF, et l'utilisation de SSF pour la production enzymatique ne fait pas exception à cela. Un certain nombre de ces substrats ont été utilisés pour la culture de microorganismes afin de produire un hôte d'enzymes (Pandey et al., 1999) (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Agro-résidus utilisés dans le SSF pour la production d'enzymes.

Substrats	Microorganismes	Enzymes	Références
Son de blé	<i>Aspergillus niger</i>	Enzyme Pectinolytique	Dinu et al., 2007
Son de blé	<i>Streptomyces lydicus</i>	Enzyme Pectinolytique	Jacob et Prema., 2008
Son de riz	<i>Bacillus sp</i>	$\alpha$ -Amylase	Sodhi et al., 2005
Tourteaud'arachide	<i>C. rugosa</i>	Lipase	Rekha et al., 2012
Son de blé ou bagasse d'orange ou bagasse de canne à sucre	<i>Thermoascusaurantiacus</i>	Enzyme Pectinolytique	Martins et al ., 2002
Son de maïs	<i>Bacillus sp</i>	$\alpha$ -Amylase	Sodhi et al ., 2005
Marc de pomme	<i>Aspergillus niger</i>	Enzyme Pectinolytique	Joshi et al ., 2006

#### 4.5. Son de blé comme substrat de SSF

Parmi les divers résidus agro-industriels, le son de blé détient toutefois la clé, car il est produit partout dans le monde en quantités énormes en tant que sous-produit important de l'industrie céréalière et a été le plus fréquemment utilisé comme substrat pour divers processus biotechnologiques (**Pandey et al.,1999**). De plus, comme le son de blé est un sous-produit peu coûteux et facile à obtenir, la production de pectinase à partir du son de blé peut être profitable (**Kashyap et al.,2003**).

la composition chimique du son de blé varie selon les variétés de blé, des divers procédés de mouture et de la maturité de la plante. Par ailleurs la composition chimique n'est pas la même d'une couche à l'autre (**Zhang.,2012**) (**Tableau 10**).

**Tableau 10** : Composition chimique de son de blé.

	<b>Son de blé</b>	<b>Références</b>
Cellulose	24% 11% 7.2%	<b>Maes and Delcour., 2002</b> <b>Hemery et al., 2007</b> <b>Brillouet and Mercier.,1981</b>
Hémicellulose	70% 30 % 17.94%	<b>Maes and Delcour., 2002</b> <b>Ebringerová.,2006</b> <b>Hemery et al.,2010</b>
Protéine	17.7% 15.7 % 12%	<b>Hollmann et Lindhauer.,2005</b> <b>Martins et al.,2002</b> <b>Slavin.,2003</b>

Lignine	5% 3 %	<b>Palmarola-Adrados et al., 2005</b> <b>Brillouet and Mercier.,1981</b>
Amidon	24.69% 15.4% 11.8%	<b>Dobrev et al., 2007</b> <b>Hemery et al.,2010</b> <b>Shankaranad and Lonsane.,1994</b>
Métaux Fe <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup>	121.63 ppm 16.99 ppm 59.74 ppm 124.97 ppm	<b>Shankaranadand Lonsane.,1994</b>
Vitamine B Vitamine E	0.0303% 0.0095%	<b>Fardet.,2010</b>

## 5. Purification

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**).

### 5.1. Techniques de purification

#### 5.1.1. Précipitation

C'est la plus simple et la plus fréquente technique utilisée pour la purification des enzymes. Il s'agit d'ajouter un sel (sulfate d'ammonium) ou solvant organique (éthanol, acétone) à la solution enzymatique, qui provoque la précipitation des protéines hors de la solution. Ensuite, on utilise la centrifugation ou le filtrage pour recueillir le précipité (**Powar., 2023**).

#### 5.1.2. Chromatographie

La chromatographie est une technique séparative. Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile, à l'aide d'une phase mobile, liquide ou gazeuse, de nature différente. Les facteurs physico-chimiques qui interviennent comme critère de séparation sont totalement différents : la masse moléculaire, la charge, l'hydrophilie/hydrophobicité, la structure tridimensionnelle...etc. Il existe différents types de chromatographie, tels que l'échange d'ions, l'exclusion et la chromatographie d'affinité (**Ladram., 2012**).

#### 5.1.3. L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique qui sépare les protéines en fonction de leur charge et de leur taille en utilisant un champ électrique. Il s'agit de placer la solution enzymatique sur une matrice de gel et d'appliquer un champ électrique. Les protéines migrent à travers le gel en fonction de leur charge et de leur taille, ce qui leur permet d'être séparées et purifiées. Cette technique est couramment utilisée en conjonction avec d'autres techniques de purification telles que la chromatographie (**Powar., 2023**).

# *Matériel et méthodes*

Ce travail est réalisé au laboratoire de Génie microbiologique et Applications, ChaabatErsas Université des Frères Mentouri Constantine 01.

## **1. Réactivation de la souche fongique *Aspergillus niger***

La réactivation est effectuée sur milieu PDA (**Annexe 1**). Elle se fait par dépôt de la souche au centre à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

## **2. Production des enzymes pectinolytique**

### **2.1 Son de blé substrat de la fermentation**

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

### **2.2. Préparation de l'inoculum**

La souche est maintenue sur milieu PDA incubée à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores, après ils sont récupérée par addition de 9 ml d'eau distillée stérile. Avec une anse de platine stérile, la surface de la gélose est grattée légèrement afin de mettre en suspension les spores. la concentration en spores est déterminée à l'aide d'une cellule de Thomas.

### **2.3. Dénombrements de spores**

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

## **3. Fermentation**

### **3.1. Préparation du milieu de production**

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml, 10 g de son de blé sont mis dans chaque Erlenmeyer humidifié avec de l'eau distillé à 60% , ensuite ils sontensemencés avec l'inoculum et homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre puis , Les Erlenmeyers sont bouchées avec du coton cardé enveloppé avec du papier d'aluminium (**Kumar et al., 2005**) et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes, les cultures sont ensuite incubés à 30°C pendant 4 jours.

## 4.L'extraction

Après fermentation, une quantité de (5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 50 ml de solution de Tween 80 (0,02%). Le mélange est mixé pendant 3 minutes et centrifugé à 10 000 tours/min à 4°C pendant 20 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.

## 5.Méthodes analytiques

### 5.1.Dosage de l'activité de la pectine lyase (PL)

Le dosage est réalisé selon la méthode de (**Bradford.,1976**).

- Préparation du milieu réactionnel

Extrait enzymatique brut dilué.....0.2ml

Pectine à 0.1%, tampon phosphate citrate 100mM, 0,2%, pH=5,2.....1.3ml

Le milieu réactionnel est incubé au bain marie à 40°C pendant 20 minutes.

La lecture au spectrophotomètre (**JENWAY., 7305 Spectrophotomètre**) à 232nm se fait directement sur le milieu réactionnel, contre un blanc traité dans les mêmes conditions mais l'extrait brut est remplacé par le tampon phosphate citrate 100mM, 0,2%, pH=5,2, en utilisant une cuve en quartz. L'activité enzymatique est exprimée en UI et calculée selon la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire de 4600 M<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> d'après Albersheim (**Albersheim et Killias, 1962**).

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

$$\text{Activité enzymatique UI/substrat} = \frac{\text{Activité}_{\frac{\text{UI}}{\text{mg}}} \times \text{Volumed' extraction}}{\text{Matièresèche}}$$

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

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



## 5.2. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PG)

Le dosage de l'activité de la polygalacturonase est déterminé comme suit:

- Préparation du milieu réactionnel

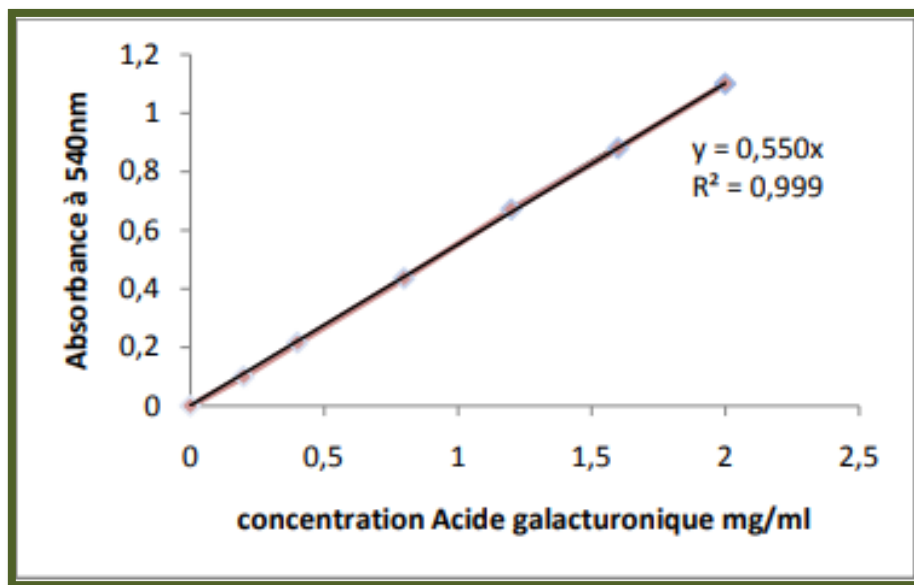
Extrait enzymatique brut.....100ul

PGA à 0.1% ,tampon acétate de sodium 50 mM pH 5.....100ul

Incubé au bain marie à 40°C pendant 20 min.

La réaction est arrêtée par addition de 400 µl de DNS (**Annexe 2**). Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100°C pour le développement de la couleur.

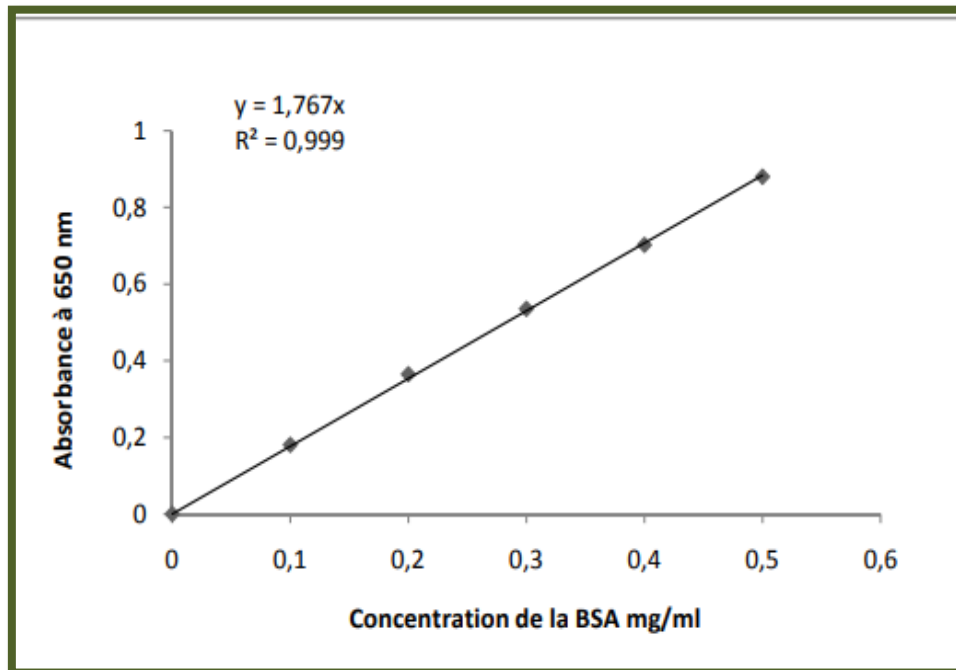
- Après refroidissement dans un bain de glace, 400 µl d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 540 nm contre le blanc traité dans les mêmes conditions mais l'extrait brut est remplacé par le tampon acétate de sodium 50 mM pH 5 à l'aide d'un spectrophotomètre.



**Figure 9** : Courbe étalon de l'acide galacturonique.

### 5.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de (Lowry et al., 1951) qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques: La réaction de Biuret dans laquelle  $\text{Cu}^{2+}$ , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond et la chimie de Folin-Ciocalteu dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleue (Annexe 3), La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine (BSA) à des concentrations de 0 à 500  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figure 10** : Courbe étalon pour le dosage des protéines.

## 6.Purification partielle des enzymes pectinolytiques PL et PG

La séparation partielle des enzymes est réalisée en deux étapes successives :

- **Préparation de l'extrait brut**

Après une incubation de 94 h à 30°C avec la moisissure *Aspergillus niger*. Les cellules sont séparées par centrifugation. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

### 6.1.Précipitation par l'éthanol et acétone

Une purification partielle de l'enzyme brut a été effectuée à l'aide d'éthanol (75%) et d'acétone (75%) selon la méthode décrite par (**Khairnar et al.,2009**) les gardant à -20°C avant l'utilisation .

20ml de l'extrait brut ont été traités avec trois volumes d'éthanol réfrigéré et laissé reposer une nuit au frigo -4 C°, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min. Le culot obtenu a été dissous dans 0.5 ml de tampon phosphate citrate 100mM, 0.2%, pH=5,2

### 6.2.Précipitation au sulfate d'ammonium

L'enzyme précipitée par l'addition de 75% et 80% de sulfate d'ammonium (**Khairnar et al.,2009**) (2.38g par 5ml d'extrait brut pour 75% de saturation et 2.58 par 5ml d'extrait pour 80% de saturation) , pendant la nuit à une température de 4 °C avec une agitation.

- **Centerfugation**

Une centrifugation a été faite pendant 30 minutes à 10000 rpm . Le culot obtenu a été dissous dans 0.5 ml de tampon phosphate citrate 100mM , 0.2%, pH=5,2.

## 7.Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS – PAGE)

Les échantillons de l'extrait enzymatique brut , PL et PG ont été analysés par

Électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) La masse moléculaire relative (Mr) de l'enzyme a été estimée par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (10 %) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), au moyen d'un appareil «Mini Protean» de BIO-RAD. La technique est détaillée dans l'**annexe 04**.

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli., 1970). Les échantillons de protéines sont déposés après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min à 100°C. A la fin de la migration, à ampérage

constant (entre 30 et 50 mA), le gel est démoulé et les protéines sont révélées par une solution de coloration (bleu de Coomassie : BBC-R250 à 0,25%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) pendant environ 1h suivi par décoloration complète du gel pendant une nuit par une solution de décoloration pour visualiser les bandes correspondantes aux protéines séparées

### **8. Détection de l'activité pectinolytique par la méthode de Zymogramme**

Après migration sur gel de polyacrylamide (10%), dans les conditions natives (PAGE), incorporant un substrat de l'APG à 0.2% dans le gel de séparation (en absence de SDS et sans traitement thermique des protéines avant le dépôt).

Le gel est lavé dans de l'eau distillée pendant 1h et incubé pendant 2 h à 50°C en présence du tampon A, puis recouvert pendant 20min dans une solution de rouge de ruthénium à raison de 0,05% (**Annexe 5**). Une zone claire est visualisée sur le gel traité, indique la dégradation de substrat.

# *Résultats et discussion*

Les enzymes obtenues après traitement par les deux méthodes (sulfate d'ammonium 75% - 80% et l'éthanol) sont reprises dans un minimum de tampon phosphate citrate 100Mm ,0.2% pH=5.2. Une détermination de l'activité de la PG et la PL et de la masse en protéines est mesurée au cours de chaque étape, les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux suivants :

**Tableau 11:** Précipitation de l'extrait brut de la PG.

Méthodes de concentration	Acitivité PG totale (UI)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Degré de purification	Rendement %
Extrait brut	2230	1998	1.1	1	100%
Précipitation au sulfate d'ammonium 75%	750	260	2.88	2.6	33.6%
Précipitation au sulfate d'ammonium 80%	246	260	0.94	0.85	11%
Ethanol	1950	1471	1.32	1.2	87.4%
Acétone	0	0	0	0	0

L'examen du tableau 11 montre que, le procédé de précipitation le plus intéressant vis à-vis de l'activité de la PG récupérée et de l'activité spécifique est :

- le sulfate d'ammonium 75% qui provoque une augmentation de l'activité spécifique 2.88 UI/mg elle est plus proche de résultat étudié par (**Shamsan et al.,2022**) qui trouve 1.4 UI/mg .Un degré de purification 2.6 et un rendement 33.6.
- L'éthanol avec une activité spécifique 1.32UI/mg, et un degré de purification 1.2 avec un rendement de 87.4%.
- Par contre, l'utilisation de l'acétone n'a donnée aucun résultat contrairement à l'étude de **Ramalingam et al., 2013** qui ont trouvé une activié spécifique est 2.32 UI/m, et un rendement de 67.7% .

l'utilisation du sulfate d'ammonium, à 80% de saturation, provoque une diminution de l'activité spécifique 0.94UI/mg (Tableau 11).Ce résultat est supérieure à celui obtenu par **Buage et al .,2010** qui ont trouvé une activité spécifique de 0.21 UI / mg.

**Tableau12 :** Précipitation l'extrait brut de la PL.

Méthodes de concentration	Activité PL totale (UI)	Protéines Totales (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Degré de purification	Rendement %
Extrait brut	250	1998	0.125	1	100%
Précipitation au sulfate d'ammonium 75%	151.3	260	0.6	4.8	60%
Précipitation au sulfate d'ammonium 80%	22.3	260	0.09	0.72	9%
Ethanol	230	1471	0.16	1.28	92%
Acétone	0	0	0	0	0

L'examen du tableau 12 montre que, le procédé de précipitation le plus intéressant vis à-vis de l'activité de la PL récupérée et de l'activité spécifique est :

- L'utilisation de sulfate d'ammonium à 75% qui provoque une augmentation de l'activité spécifique 0.6 UI/mg .Ce résultat est inférieur à celui trouvé par **Paterson et al.,2016**. On remarque que le rendement 60% est inférieur aux résultat de **Babagil et Nadaroglu .,2021** qui montre que le rendement de la PL est 78,2 %.

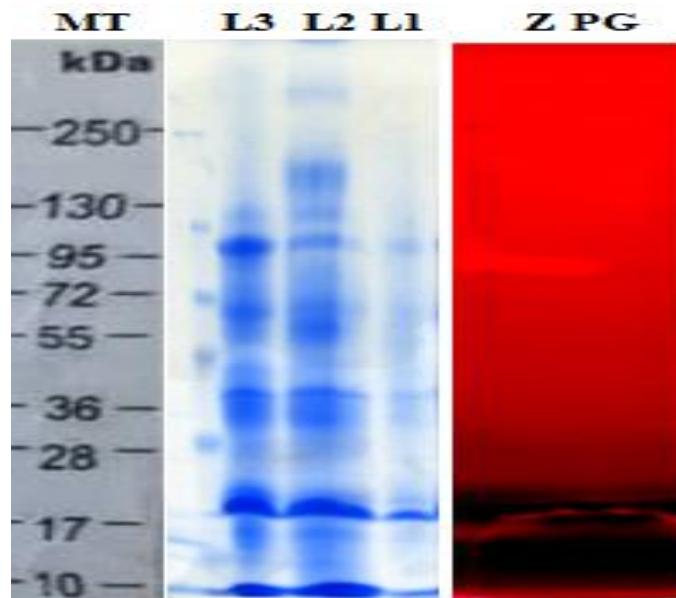
-Par ailleurs L'utilisation d'éthanol donne une activité spécifique de 0.16 UI/mg et un degré de purification de 1.28 et un rendement de 92%.

-L'utilisation de l'acétone n'a aucun effet sur l'enzyme PL.

-l'utilisation du sulfate d'ammonium à 80% de saturation, provoque une diminution de l'activité spécifique 0.09 UI/mg (Tableau 12). Ce résultat est inférieur à ceux lui trouvé par **Oliotula et al.,2007** 0.12UI/mg .

## Contrôle de la pureté partielle des enzymes par SDS-PAGE et de l'activité enzymatique par zymogramme

La pureté des échantillons, aux différents stades de la purification, est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE (Figure 11 et 12).



**Figurez 11 :** Profil électrophorétique SDS-PAGE après purification.

MT : margeurs de taille, L1 : Extrait brut, L2 : Après précipitation au sulfate d'ammonium

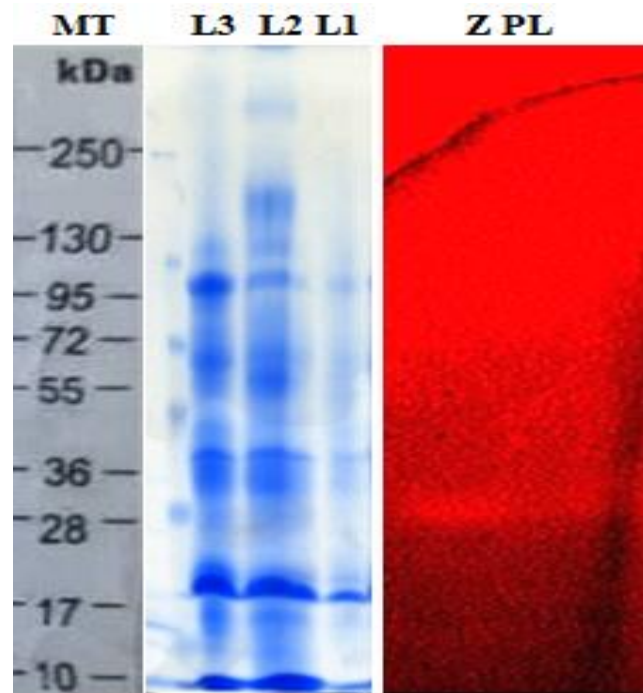
L3 : Après précipitation à l'éthanol, ZPG : Zymogramme de PG.

L'analyse de la figure 11 montre :

-une seule bande avec un PM de 95KDa pour la PG d'*Aspergillus niger*. Ce résultat est proche de celui obtenu par **DeVries et Visser** ,2001 et **Sakamoto et al.**, 2012 qui indiquent un PM de 82 KDa pour la même souche d'*Aspergillus niger*.

-Cependant les travaux de **Dogana et Tari** ,2007 ont permis de purifier une PG de PM de 53 KDa.





**Figure 12 :** Profil électrophorétique SDS-PAGE pendant la purification .

MT : marqueurs de taille, L1 : Extrait brut , L2 :Après précipitation au sulfate d’ammonium

L3 :Après précipitation à l’éthanol , Z PL : Zymogramme de PL

L’analyse de La figure 12 montre

-une seule bande avec un PM de 28 KDa pour la PL. Ce résultat est supérieure à celui obtenu par **poturane et al.,2017** qui indiquent un PM de 23 KDa pour la PL produite par *Aspergillus niger*. Contrairement à la PL 46 KDa séparée par **Sharma et al .,2001**.

Ces différences dans les résultats peuvent être expliquées par l’origine de l’isolement de la souche fongique, la méthode d’extraction et les produits utilisés.

*Conclusion*

## Conclusion

---

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la production des enzymes pectinolytiques a partir de moisissure *Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma et cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé sur milieu optimisé. Après 94h de culture, la souche a montré une bonne croissance et a produit deux enzymes pectinolytiques (PL et PG) à 30°C.

Pour une utilisation de l'enzyme, il a été procédé à sa séparation par différentes méthodes de purification ; précipitation au sulfate d'ammonium, éthanol et à l'acétone. Le procédé de précipitation le plus intéressant vis-à-vis de l'activité PL et PG et de l'activité spécifique est le sulfate d'ammonium à 75 % de saturation.

La détermination des poids moléculaires par électrophorèse a permis d'évaluer le poids moléculaire de 28KDa pour la PL, et 95 KDa pour le PG. Avec un activité spécifique 0.6 UI/mg pour la PL, et de 2.88 UI/mg pour le PG.

Ses enzymes sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 2.6 et 4.8 et des rendements de 33.6% et 60%.

Il est nécessaire d'approfondir ce travail par :

- L'étude d'autre méthode de séparation tels que : la centrifugation, système TPP, L'ultrafiltration, Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.
- L'étude des propriétés physico-chimique des deux enzymes séparées .Ce qui permet de l'exploiter dans divers domaines alimentaires : Fermentation du café et du thé, Macération, Gélification, et Dégommage des fibres libériennes végétales. Aussi dans le domaine de l'environnement : Traitement textile et biorécurage des fibres de coton, Extraction de pétrole, Traitement des eaux usées .demande croissante d'enzymes pectinolytiques dans plusieurs applications industrielles.

*Références  
bibliographiques*

## Référence

---

- Abbott,D.W.andBoraston,A.B.(2007)** .The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. *J Mol Biol.* 368:1215–1222.
- Abdullah, R., Farooq, I., Kaleem,A.,Iqtedar,M.andIftikhar, T.(2018)**.Pectinase production from *Aspergillusniger* IBT-7 using SSF.Bangladesh *J Bot.* 47:473– 8. doi:10.3329/bjb.v47i3.38714.
- Adjovi . Y., Bailly. S., Gnonlonfin . B.J.G., Tadrict . S., Querin. A., Sanni. A., Oswald. I.P., Puel, O. & Bailly, J.D. (2014)**. Contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergillii* of the Flavi section and Aflatoxin B1 in cassava: possible explanation .
- Akhtar,M., Dickinson,E., Mazoyer,J.andLangendorff,V.(2002)** . Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin, *Food Hydrocoll.* 16 :249–256.
- Albersheim P., Killias U. (1962)**.Studies relating to the purification and properties of pectin.
- Alkorta I., Garbisu C., Llama MJ., Serra J.L.(1998)**.Industrial applications of pectic enzymes: A review. *ProcBiochem.*33(1): 21-28.
- Amid, M., Manap,Y.andZohdi,K. (2014)**.Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereuspolyrhizus*.*European Food Research and Technology.*239:21–29.
- Badid, N., Moussaoui,A.andBelbraouet,S. (2001)**.Production de Protéines d’Organismes Unicellulaires Cultivéssur Corn SteepLiquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse. *Rev. Energ.Ren. : Production et Valorisation – Biomasse.*11-28.
- Bajpai, P. (2014)**.Purification of xylanases.Xylanolytic enzymes. pp 53–61. doi:10.1016/b978-0-12-801020-4.00006-8.
- Barford R. A., Magidman P., Phillips J. G., Fishman M. L. (1986)**.Estimation of degree of methylation of pectin by pyrolysis-gas chromatography.*Analytical Chemistry.* 58(12): 2576–2578. doi:10.1021/ac00125a049
- Barker, K. (1996)**.Proceedings of the cellulolytic and pectolytic enzymes in the nematode, *aphelenchusavenae*. *The helminthological society of washington.* 33(2).
- Basil Abdulzahra Abbas., Mohammed Hassan Khudor .,Raed Najeeb Alkhursan .(2023)**.POULTRY FEED FUNGI A PRACTICAL GUIDE POLUTRY FEED FUNGI A PRACTICAL GUIDE - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-niger-on-PDA-culture-and-slide\\_fig4\\_352889250](https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-niger-on-PDA-culture-and-slide_fig4_352889250) .
- Blanco,P., Sieiro,C.andVilla ,G.T.( 1999)**.Production of pectic enzymes in yeasts.*FEMS Microbiol.Lett.* 175:1-9.

## Référence

---

- Brillouet, J.M. and Mercier, C. (1981).** Fractionation of wheat bran carbohydrates. *J. Sci. food Agric.* 32:243-251 .<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740320307>.
- Brooke . A. G. (1994).** Industrial fermentation and *Aspergillus* citric acid. In *The genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications* (eds. Powell, K. A., Renwick, A. and Peberdy, J. F.). Plenum Press, London. pp.129-145.
- Buzzini, P. and Martini, A. (2002).** Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeastlike strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology.* 93:1020–102
- Carvajal-Campos . A., Manizan . A.L., Tadrict. S., Koffi-Akaki.D., Koffi-Nevry. R., Moore . G.G., Fapohunda . S.O., Bailly . S., Montet . D., Oswald . I.P., Lorber, .S., Brabet . C. & Puel, O. (2017).** *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species.
- Chen. A.J., Hubka .V., Frisvad .J.C., Visagie .C.M., Houbraken. J., Meijer .M., Varga. J., Demirel .R., Jurjevic .Z., Kuba- tova .A., Sklenar. F., Zhou .Y.G., Samson .R.A. (2017).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*) and its occur.
- Combo, A.M.M., Aguedo, M. et Paquot, M. (2011).** Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement.* 15(1): 153-164.
- Cuervo, A., Gueimonde, M., Margolles, A., González, S. (2014).** PECTIN: DIETARY SOURCES, PROPERTIES AND HEALTH BENEFITS, Bush, P. L. *Pectin : Chemical Properties, Uses and Health Benefits.* Nova Science Publishers, Incorporated, pp33-42
- Daniel, D.S. (2009).** The Evolution of Fungal Pectinases in Glycosyl Hydrolase Family 28 and Their Association with Ecological Strategy. Thesis submitted to Kent State University for the Degree of Master of Sciences.
- De Lorenzo ,G., D’Ovidio, R. and Cervone; F. (2001).** The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 313–335.
- Demir, H., Tari, C. (2014).** Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products.* 54: 302 – 309.
- Dinu, D., Nechifor, M.T., Stoian, G., Costache, M., Dinischiotu, A. (2007).** Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol.* 131:128–137.
- Dobrev, G.T., Pishtiyski, I.G., Stanchev, V.S. and Mircheva, R. (2007).** Optimization of Nutrient Medium Containing Agricultural Wastes for Xylanase Production by

## Référence

---

Aspergillusniger B03 using Optimal Composite Experimental Design.Bioresource Technology .98: 2671-2678.

**Donato,L.(2004).**Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques , Thèse de Doctorat,Université de Limoges, France.

**Ebringerová,A .(2006).**Structural diversity and application potential of hemicelluloses.Macromol.Symp. 232: 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>.

**El Mahgubi .A., Puel .O., Bailly. S., Tadrict .S., Querin .A., Ouadia .A., Oswald. I.P., Bailly .J.D. (2013).** Distribution and toxigenicity of Aspergillus section Flavi in spices marketed in Morocco. Food Contr. 32 :143–148.

**Fardet, A.(2010).** New hypotheses for the health protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre.Nutr Res Rev 23:65–134.

**Favela-Torres .E., Volke-Sepùlveda .T. & Vniegra-Gonzalez .G., (2006).**Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol. Biotechnol., 44(2), 221-227.

**Fenghour,H., Ladjama, A.andTaibi,Z.(2002).**Recherche de l'activité pectinolytiques chez 22 souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'el kala. Technologies Avancées – Numéro 14.

**Girard, C.andJouanin,L.(1999).**Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from aphytophagous beetle, Phaedoncochleariae.Insect Biochem. Mol. Biol. 29:1129–1142.

**Gomes,J., Zeni,J., Cence,K., Toniazzo,G., Treichel,H.andValduga,E.(2011).** Evaluation of production and characterization ofpolygalacturonase by Aspergillusniger ATCC9642.Foodand bioproducts processing.89: 281–287.

**Guegan H, Robert-Gangneux F, Camus C, Belaz S, Marchand T, Baldeyrou M, Gangneux JP.(2018);(2019)** Improving the diagnosis of invasive aspergillosis by the detection of Aspergillus in broncho-alveolar lavage fluid: Comparison of non-culture-based assays. J Infect. 2018;76(2):196-205. doi: 10.1016/j.jinf.2017.11.011

**Guiraud, J.P.(1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. pp.79..

**Gummadi S.N., Manoj N., Kumar D.S. (2007).**Structural and Biochemical Properties of Pectinases. In Industrial Enzymes; Polaina J., MacCabe A.P., Eds.; Springer:Heidelberg, pp. 99-115

**Hemery, Y. M., Anson, N. M., Havenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., and Rouau, X. (2010).** Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic

## Référence

---

acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*. 43(5): 1429-1438.

**Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., and Abecassis, J. (2007).** Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*. 46(3): 327-347 .(Hemery and her colleagues stress the potential health benefits of the micronutrients and phytochemicals included in wheat bran. The incorporation of these compounds would enhance the nutritional quality of different wheat products. Moreover, this paper includes the health promoting effects of whole grain consumption which has been proven in numerous epidemiological studies.)

**Hugouvieux-Cotte-Pattat. N., Condemine. G., & Shevchik .V. E. (2014).**Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity.*Environmental Microbiology Reports*.John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>.

**IOM, 2000 ; NYC, 2000 ; Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi, 2001.**Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur . Institut national de santé publique du Québec.

**Iwasaki, K., Inoue ,M. and Matsubara, Y.( 1998).** Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor.*Biosci. Biotechnol.Biochem.* 62: 262-272.

**Jackson ,C. L., Dreaden,T. M., Theobald ,L., Tran ,N. M., Beal ,T. L., Eid,M., Gao,M., Shirley, R. E., Stoffel, M. T., Kumar ,M.andMohnen,D. (2007).** Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells : correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*. 17(8): 805-819. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm054>.

**Jacob,N.andPrema,P.(2008).**Novel process for the simultaneous extraction and degumming of banana fibers under solid-state cultivation.*Braz J Microbiol.*39:115–121.

**Jacques .GUINBERTEAU., Patrick .JOLY., Jacqueline NICOT., Jean Marc OLIVIER.(2023).** « CHAMPIGNONS », *Encyclopædia Universalis* [en ligne],. URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/champignons>

**Jaubert,S., Laffaire,J.B., Abad ,P.andRosso, M.N.( 2002).** A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett.* 522: 109–112.

**Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005).**Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944.<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.03.026>.

**Jenkins, J., Mayans, O.andPickersgill, R. (1998) .**"Structure and evolution of parallel betahelix proteins." *J StructBiol.*122(1-2) : 236-246.

**Joshi ,V.K., Parmar,M.andRana, N.S. (2006) .**Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. *Food TechnolBiotechnol.*44:253–256.



## Référence

---

- Jurnak.F., Yoder . M.D., Pickersgill .R. & Jenkins.J. (1994).** Parallel b domains: a new fold in protein structures. *Curr.Opin.Struct. Biol.* 4, 802–806.
- Kadija Tul Kubra, Sikander Ali, Manam Walait and Hira Sundus.(2018).**Potential Applications of Pectinases in Food, Agricultural and Environmental Sectors. *J Pharm Chem Biol Sci*; 6(2):23-34.
- Kamijo .J., Sakai .K., Suzuki. H., Suzuki. K., Kunitake .E., Shimizu .M., Kato .M .(2019).**Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Aspergillus luchuensis* var. *saitoi*. *Food Chem* 276:503–510. [https:// doi.org/ 10. 1016/j. foodc hem.](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.016)
- Karbalaei-Heidari H. R., Rastegari. B.(2014).** Isolation and partial characterization of a bacterial thermostable polymethyl galacturonase from a newly isolated *Bacillus* sp. strain BR1390. *Iranian Journal of Biotechnology* .2014; 12:41–46.
- Kashyap,D.R., Soni, S.K., Tewari,R .(2003)** .Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp.DT7 using solid-state fermentation. *Bioresour Technol.* 88:251–254.
- Kavanagh, K. (2005).***Fungi : Biology and Applications.* 4th ed. John Wiley & Sons Ltd, England. 4:89-111.
- Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P.K., Kaaya, A. (2015).**Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control* 52:103–111.
- Khairnar, Y., Krishna, K.V., Boraste,A., Gupta, N., SohamTrivedi, S., Patil,P., Gupta,G.,Gupta,M., Jhadav,A., Mujapara,A., Joshi, B.and Mishra, D.(2009).**Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *AspergillusNiger*.*International Journal of Microbiology Research.*1(2): 13-17.
- Kilara,A.(1982)** .Enzymes and their uses in the processed apple industry: A Review. *Process Biochem.* 23: 35-41.
- Kraulis, P.J. (1991).** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24, 946–950.
- Krishna, C.(2005).**Solid-state Fermentation Systems-An Overview.*Crit. Rev. Biotechnol.*25: 1-30.
- Kumar,D.P., Thangabalan, B., Venkateswara,R.P.andYugandhar, N. M. (2010).** Productionof pectinases enzyme by *Aspergillus Niger* using *ficusreligiosaleqves* in solid state fermentation . *International Journal of Pharmacy & Technology IJPT.*3 (1): 1351-1359.
- Lee D-W., Kang .JS., Jung. CS., Han .HR., Moon .YS., Park .SJ., Koh. YH.,(2013).**Identification and biochemical analysis of a novel pectate lyase 3 gene in *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Asia Pac Entomol* 16(3):335–342. [https:// doi.org/ 10. 1016/j. aspen. 2013. 04. 016.](https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.04.016)

## Référence

---

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.193: 265-275.
- Maes ,C.andDelcour,J.A. (2002).**Structural characterisation of water extractable and water unextractable arabinoxylans in wheat bran.*J Cereal Sci* 35:315–326.
- Maldonado .MC.,(1998).**de Saad AM. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 20:34–8.
- Martins, E.S., Silva, D., Da Silva ,R., Gomes ,E.(2002)** .Solid-state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem*.37:949–954.
- Martos, M.A., Zubreski,E.R., Combina,M.,Garro,O.A.andHours, R.A.(2013).**Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci Technol*. 33:332–8. doi: 10.1590/S0101-20612013005000047
- Masuria .V. B., Nerurkar .A. S.(2012).**Biochemical properties and thermal behavior of pectate lyase produced by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* BR1 with industrial potentials. *Biochemical Engineering Journal* ; 63:22–30.
- Mehmood .T., Saman. T., Irfan. M., Anwar .F., Ikram M. S., Tabassam .Q.(2019).**Pectinase production from *Schizophyllum commune* through central composite design using citrus waste and its immobilization for industrial exploitation. *Waste and Biomass Valorization* .
- Mehta, S.A., Rana,M., Shaikh,N.and Patel, N.(2013).**Optimization of physiological parameters for pectinase production from soil isolates and its applications in fruit juice clarification. *J Environ Res Dev*. 7:1539–46.doi: 10.21275/ART20179549.
- Mehta, S.A., Rana,M., Shaikh,N.and Patel, N.(2013).**Optimization of physiological parameters for pectinase production from soil isolates and its applications in fruit juice clarification. *J Environ Res Dev*. 7:1539–46.doi: 10.21275/ART20179549.
- Micheli ,PA.(1729),** *Nova Plantarum Genera*. Florentiae.
- Moshrefi, M.andLuh, B.S. (1984).**Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes.*Journal of Food Biochemistry*. 8:39–54.
- Moshrefi, M.andLuh, B.S. (1984).**Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes.*Journal of Food Biochemistry*. 8:39–54.
- Mullins ,J., Harvey ,R., Seaton, A.(1976 )**.Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy*, 6(3): 209-17.

## Référence

---

- Mycol., Pitt JI.(1994).** The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J Med Vet*; 17-32., 32 Suppl 1 .
- Nabi .N. G., Asgher .M., Shah .A. H., Sheikh. M. A., Asad. M. J.(2003).**Production of pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of citrus peels. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* . 40:193–201.
- Nakamura, M., Iwai,H. (2019).** Functions and mechanisms: polygalacturonases
- Namasivayam, E., D, J. R., K, M., Jiji, A., and Kumar, M. (2011).** Production of Extracellular Pectinase by *Bacillus Cereus* Isolated From Market Solid Waste. *Journal of Bioanalysis& Biomedicine*, 03(03). <https://doi.org/10.4172/1948-593x.1000046>
- Oyeleke,S.B., Oyewole, O.A., Egwim, E.C., Dauda,B.E.N.andIbeh, E.N.(2012).**Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillusniger* isolated from corn cob.*Bayero J Pure Appl Sci*. 5:78–83. doi: 10.4314/bajopas.v5i1.15
- Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe, M.andZacchi, G.( 2005).**Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran.*Bioresour. Technol*. 96 (7): 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.004>.
- Palomäki,T.andSaarilahti, H.T. (1997).**Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwiniacarotovora* ssp. *carotovora*. *FEBSLett*.400:122–6.
- Pandey,A., Selvakumar,P., Soccol, C.R., Nigam, P .(1999)** Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *CurrSci* .77:149–162.
- Patidar,K., Nighojkar, S., Kumar,A.andNighojkar, A. (2018).** PectinolyticEnzymesSolid State Fermentation, Assay Methods and Applications in Fruit Juice Industries: a review. *3 Biotech*.8(4). doi : 10.1007/s13205-018-1220-4.
- Pawar, H. (2023).** Role of Enzyme Purification Techniques and its Importance.*Enz Eng*. 12:209.
- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C.andPastrana, L. (2003).**Main Characteristics and Applications of Solid Substrate Fermentation.*Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*. 2: 343-350.
- Perrone,P., Hewage,C. M., Thomson,A. R., Bailey, K. R., Sadler, I. H.andFry, S. C. (2002).**Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins.*Phytochemistry*. 60(1): 67-77. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00039-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00039-0).
- Piccoli-Valle RH., Brandi. IV., Silva .DO., Passos .FJV.(2001).** Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* grown in sugar cane juice in repeated batch cultures. *World J Microbiol Biotechnol* ; 17:433–7.

## Référence

---

**Pickersgill, R. W., Scott, M., Smith, D., Worboys, K., & Jenkins, J. M. (1999).**Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the endo-polygalacturonase from *Erwiniacarotovora* ssp. *carotovora*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55(1): 320-322. <https://doi.org/10.1107/s09074444998010816>

**Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. and Jenkins, J. (1998).**"Crystal structure of polygalacturonase from *Erwiniacarotovora* ssp. *carotovora*." *J Biol Chem.*273(38) : 24660-24664.

**Pickersgill, R.W. and Jenkins, J.A. (2003).** The structures and active sites of pectinases. In: plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors. *Journal of general plant*

**Polizeli, M.D.L.T.M., Jorge, J.A. and Terenzi, H.F. (1991).** Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J Gen Microbiol.* 137:1815–23. doi: 10.1099/00221287-137-8-1815.

**Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., & Bono, A. V. (2005).**An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.*1(2): 1016. <https://doi.org/10.21161/mjm.120502>.

**Prajapati .J., Dudhagara .P., Patel K. (2021).**Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* .d, 35.

**Quatresous N, (2011)** ,Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges.

**Radoi, F., Kishida, M. and Kawasaki, H. (2005).**Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Res.* 5:663–8. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.006

**Ramalingam P., Aswini V., Pradeepa P., Sriram S., Swathik H. (2013).** Partial purification and characterization of cellulase, pectinase and xylanase from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology.* 5(5): 48-59.

**Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A. (2017).** “Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview,” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 16:381–394.

**Rekha, K.S.S., Lakshmi ,C., Devi ,S.V. and Kumar, M.S. (2012).**Production and optimization of lipase from *Candida rugosa* using groundnut oilcake under solid state fermentation. *Intern J Res Eng Technol.* 1:571–577.

## Référence

---

- Renard, C. M. G. C. et Thibault, J. F. F. (1993).** Structure and properties of apple and sugar beet pectins extracted by chelating agents, *Carbohydr. Res.*, 244, 99.
- Rombouts, F.M., Pilnik, W.L. (1980).** Pectic enzymes. In: Rose A.H. (Ed), *Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions*, Academic Press, London, England. 5: 227-282.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M. K., Barua, R., and Hossain, M. T. (2018).** Extracellular Pectinase from a Novel Bacterium *Chryseobacterium indologenes* Strain SD and Its Application in Fruit Juice Clarification. *Enzyme Research*, 2018, 1-7.  
<https://doi.org/10.1155/2018/3859752>
- Saharan .R., Sharma .K.P. (2019).** Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). *Biocatal Agric Biotechnol* 21:101306. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101306>.
- Sakai ,T.(1992).** Degradation of pectins. In: Winkelmann G, editor. *Microbial degradation of natural products*. Weinheim: VCH, p. 57–81.
- Sakai ,T., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E.J.(1993).** Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39:213-279.
- Samson .R.A., Hong .S.B., et Frisvad. J.C. (2006).** Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44:133–148.
- Samson R.A. et Varga J. (2008).** *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology*. 59: 71-73.
- Sandri, I.G., Fontana, R.C., Barfknecht, D.M. and Silveira, M.M.(2011).** Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*. 44:2217- 2222.
- Saoudi, B., Habbeche, A., Kerouaz, B., Haberra, S., Ben Romdhane, Z., Tichati, L., Boudelaa, M., Belghith, H., Gargouri, A. and Ladjama, A. (2015).** Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectatylase from *Actino-madurakeratinilytica* Cpt20. *Process Biochemistry*. 50(12):2259–2266. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.00>.
- Sassi .A.H., Trigui-Lahiani .H., Abdeljalil .S., Gargouri .A. (2017).** Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol* 95:256–262.
- Shankaranad, V.S. and Lonsane, B.K.(1994).** Ability of *Aspergillus niger* to Tolerate Metal Ions and Minerals in a Solid-state Fermentation System for the Production of Citric Acid. *Process Biochemistry*. 29: 29-37
- Sharaf .M.A., Illman, D.L ., Kowalski, Chemometrics, Wiley. B.R., (1986) .** New York.

## Référence

---

- Sharma,N., Rathore,M.and Sharma,M.(2012).** “Microbial pectinase: sources, characterization and applications,” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 12(1):45–60.<https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>.
- Shen, Z., Denton, M., Mutti, N., Pappan,K., Kanost, M., Reese ,J.andReeck, G. (2003).** Polygalacturonase from Sitophilusoryzae: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*.3: 1–9.
- Singh ,R., Sharma, M., Mittal ,A.and Mehta,P. K. (2016).** Microbial enzymes : industrial progress in 21st century. *3 biotech*.6(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
- Singh, P., andDwivedi, U. N. (2008).**Purification and characterisation of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangiferaindica* cv. Dashehari) fruit. *Food Chemistry*.111(2):345–349. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.072 .
- Sittidilokratna .C., Suthirawut .S., Chitradon. L., Punsuvon .V., Vaithanomsat .P., Siriacha.(2007).**P. Screening of pectinase producing bacteria and their efficiency in biopulping of paper mulberry bark. *ScienceAsia* ; 10.2306/scienceasia1513-187, 33:131–135. doi:
- Slavin,J.(2003).** Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 129–134.
- Soares, M.M.C.N., Da Silva, R., Carmona ,E.C., Gomes, E.(2001).**Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction.*World J MicrobiolBiotechnol.* 17:79–82. doi: 10.1023/A:1016667930174.
- Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta,J.K.andSoni, S.K.(2005)** .Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid-state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.* 40:525–534.
- T ierny .Y., (1992).** Clonage et expression chez *Escherichia coli* de gènes de *Bactéroides thetaiotaomicron* impliqués dans la dégradation des pectines. Thèse de doctorat Sciences de la Vie et de la Santé, 1992.
- Takao .M., Akiyama .K and Sakai .T.(2002).**Purification and characterization of thermostable endo-1, 5- $\alpha$ -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Applied and environmental microbiology* ; 1639-46., 68(4):
- Tapre, A. R.andJain,R. K.(2014).** Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. 21(2): 447-453.
- Taskin, M.(2013).** Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorulaglutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172.

## Référence

---

- Teixeira ,M.F.S., Filho,J.L.L.and Duran, N.(2000).**Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz J Microbiol.* 31:286–90. doi:10.1590/S151783822000000400009
- Thakur, A., Pahwa, R., Singh ,S.and Gupta, R.(2010).**Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucorcircinelloides* ITCC6025.*Enz Res*,170-549.doi: 10.4061/2010/170549
- Thibault, J.F.(1980).**Les substances pectiques. In: Costes C., Monties B.(Eds), *Les polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés*,Gauthier-Villars,Paris.232-251.
- Tripathi, G.D., Javed,Z.and Singh ,A.K .(2014).** Pectinase production and purification from *Bacillus subtilis* isolated from soil. *AdvApplSci Res* .5(1): 103-105.
- Van Santen, Y., Benen, J.A.E, Schroter, K.H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J.andDijkstra, B.W. (1999).**"1.68 A Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus Niger* and Identification of Active Site Residues by Site-Directed Mutagenesis." *J Biol Chem.* 274(43) : 30474-30480.
- Varga, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2011).**Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud.Mycol.* 69, 57–80. doi: 10.3114/sim.2011.69.0.
- Wakabayashi ,K.and Huber ,D.J. (2001).** Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Perseaamericana*) fruit mesocarp. *PhysiologiaPlantarum*.113: 210– 6.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D., (2006).** Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 97–104.
- Yadav .S, Yadav .PK, Yadav.D, Yadav .KD.(2008).** Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochem* 43(5):547–552. [https://doi.org/ 10. 1016/j. procbio 2008. 01. 015](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.015).
- Yang .G., Chen. W., Tan .H., Li .K., Li. J., Yin. H., (2020).**Biochemical characterization and evolutionary analysis of a novel pectate lyase from *Aspergillus parasiticus*. *Int J Biol Macromol* 152:180–188. [https:// doi.org/ 10. 1016/j. ijbio mac. 2020. 02. 279](https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2020.02.279).
- Yoder, M.D.andJurnak, F. (1995) .**"Protein motifs.3. The parallel beta helix and other coiled folds. " *Faseb J.* 9(5) : 335-342.
- Zhang, J. (2006).**Biochemical study and technical applications of fungal pectinase.*Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala Dissertations From Faculty of Science and Technology*, p.14.

## Référence

---

**Zhang, Y. (2012).** Etude des relations entre structures et propriétés de films d'arabinoxylanes isolés de co-produits agricoles. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne Ardenne .



# *Annexes*

## **Annexe 1: Milieu PDA**

Extrait de pomme de terre.....	1000ml
Glucose.....	20g
Agar.....	20g

stérilisation à 100°C pendant 20 minutes.

- Préparation de l'extrait pomme de terre

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

- Préparation de milieu de culture

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

## Annexe 2 :Préparation des solutions tampon

### Dosage d'activité enzymatique

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

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

#### Préparation de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- 2.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....7,098g
- 3.3 Eau distillée.....500ml

#### ❖ Solution tampon acétate de sodium, PH=5

- 2.2 Acétate de sodium.....2,05g
- 3.2 Acide acétique.....1,45ml
- 4.2 Eau distillée.....500ml

#### Préparation de NaOH (2N)

- 1.3 NaOH.....8g
- 2.3 Eau distillée.....100ml

#### Réactif de DNS

Dissoudre 2g de DNS dans 40ml de NaOH (2N) et 100 ml d'eau distillée. Ajouter 60g de tartrate double Na, K et compléter à 200 ml avec l'eau distillée avec agitation.

### **Annexe 3 : Dosage des protéines**

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

Solution A : carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0,1N.

Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée.

Solution C : sulfate de cuivre, 5 H<sub>2</sub>O à 1% (w/v) dans l'eau distillée.

Solution D : 0,5 ml de C + 0,5 ml de B + 50 ml de A. Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.

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

Le milieu réactionnel est préparé comme suit:

Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml.

Solution D : 5 ml.

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

## Annexe 4 :Electrophorèse(SDS-PAGE)

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % (Tableau 18) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970) (Laemmli., 1970). La préparation du gel de polyacrylamide en présence de SDS est obtenue par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane-toxique).

### ➤ Compositions de gel d'acrylamide et solutions pour électrophorèse

#### • Solution : Acrylamide – Bisacrylamide :

- Acrylamide ..... 30g
- Bisacrylamide ..... 0.8g
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C à l'abri de la lumière.

#### • Solution : tampon gel de séparation : Tris HCl 1.5M, pH = 8.8

- Tris base..... 36.3g
- HCl 1N ..... 48ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

#### • Solution : tampon gel de concentration : Tris HCl 1.5M, pH = 6.8

- Tris base..... 6g
- HCl 1N ..... 48ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

□ Solution : tampon de migration : (Tris 0.25M, Glycine 1.92M, pH=8.3) – Tris base..... 15.1g

- Glycine ..... 72g
- SDS 0.1%.....5g
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 1000ml

Conservation à 4°C.

- **Solution de persulfate d'ammonium**

Dissoudre 10g de persulfate d'ammonium dans 100ml d'eau distillée. Cette solution doit se préparer juste au moment de l'emploi (extemporanément).

- **Solution : tampon de lyse (tampon d'échantillon)**

- Tris base (0.5M) pH6.8..... 2.13ml
- SDS .....1g
- Glycerol 10 %..... 5ml
- Bleu de bromophenol ..... 20mg
- $\beta$  mercaptoethanol ..... 2.56ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p..... 10m

- **Solution de coloration**

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H<sub>2</sub>O .....45ml
- BBC (R250).....0.25g

- **Solution de décoloration :**

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H<sub>2</sub>O .....45ml

➤ **Préparation et migration du gel pour l'électrophorèse SDS-PAGE**

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par Laemmli(1970)

**Tableau 18:**Composition du gel de polyacrylamide 10%.

<b>Composition du gel polyacrylamide (10%)</b>			
<b>Composants</b>	<b>Gel de séparation (10%)</b>	<b>Composants</b>	<b>Gel de concentration (5%)</b>
H2O	4 ml	H2O	3.4 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	1.5M Tris-HCl pH 6.8	830 µl
Acrylamide 30%	3.3 ml	Acrylamide 30%	630 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	4 µl
<b>VOLUME TOTAL</b>	<b>10 ml</b>	<b>VOLUME TOTAL</b>	<b>5 ml</b>

**\*APS : Persulfate d'ammonium \*\* SDS : Sodium Dodécyle Sulfate**

- Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre immédiatement après l'ajout de l'APS et le TEMED.
- Ajouter de l'éthanol a la surface du gel puis le laisser polymeriser durant 30 minutes.
- Ajouter le gel de concentration, après avoir éliminé l'éthanol grâce a un buvardage d'un papier absorbant, ajuster le peigne et laisser polymériser.
- Démouler le peigne quand le gel est polymérisé et fixer l'ensemble à l'appareil.
- Déposer les échantillons de protéines après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min a 100°C.

- Il faut de plus s'assurer que toutes les protéines aient le même point de départ pour la migration, c'est pourquoi nous avons démarré la migration dans un gel de concentration.
- La migration est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS à ampérage constant (entre 30 et 50 mA) et arrêter exactement quand le "bleu de bromophenol" atteint le bas du gel.
- La révélation est effectuée par deux méthodes :
  - Imprégnation pendant une nuit dans une solution du colorant constituée de bleu de Coomassie 0.25% dans un mélange éthanol-eau-acide acétique glacial.  
La décoloration est réalisée dans un solvant composé de: éthanol-eau-acide acétique jusqu'à décoloration complète du gel, les bandes correspondants aux protéines restent colorées en bleu.
  - Ou par imprégnation dans une solution de nitrate d'argent à 0.1% pendant 30 minutes puis rinçage avec l'eau distillée ensuite développe avec une solution de 3% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  contenant 0.02% de formaldéhyde enfin stopper avec 1% d'acide acétique et lavage avec l'eau distillée.



## **Annexe5 :Détection de l'activité pectinolytique par la méthode de Zymogramme**

Solution de Rouge de ruthénium :

Rouge de ruthénium ..... 0.05g.

Eau distillée q.s.p .....100 ml.

<b>Date de soutenance : 22/06/2023</b>	<b>Présenté et soutenu par : Benkadja Rania</b> <b>Benyounes Badr Rihem</b>
<b>Thème:</b> <b>Séparation d'enzymes pectinolytiques produites par <i>Aspergillus niger</i> cultivé sur milieu solide (SSF)</b>	
<b>Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en BIOCHIMIE</b>	
<p><b>Résumé :</b></p> <p>Ce travail concerne la séparation et la purification des enzymes fongiques dégradant la pectine. Les enzymes pectinolytiques possèdent un système complexe de protéines, qui comprennent des lyases, des polygalacturonases et des hydrolases. Ces enzymes occupent une place centrale, représentant 25 % du marché globale des enzymes.</p> <p>En effet, la purification des pectinases est une étape essentielle pour obtenir des enzymes pures utilisables dans divers procédés industriels. Le choix de la méthode de purification est nécessaire pour obtenir des enzymes ayant des activités catalytiques importantes et un haut rendement. Une meilleure purification est obtenue par l'éthanol à 75%. Il a permis d'obtenir une activité spécifique de 1.32 UI/mg et de 0.16 UI/mg respectivement pour la PG et la PL. Le degré de purification est 1.2 pour la PG et 1.28 pour la PL. Le rendement est de 87.4% et 92% respectivement pour la PG et la PL. Une meilleure précipitation par le sulfate d'ammonium à 75% a permis d'obtenir une activité spécifique de 2,88 UI/mg pour la PG et 0,6 UI/mg pour la PL. Le taux de purification est de 4,8 et 2,6 et le rendement est de 60% et 33.6% respectivement.</p> <p>Ces deux enzymes sont des glycoprotéines, le poids moléculaire a été déterminé par SDS-PAGE et a été estimé à 95 KDa pour l'enzyme PG et à 28 KDa pour l'enzyme PL.</p> <p>En raison de ces propriétés, les deux enzymes PG et PL peuvent être appliquées dans divers domaines de l'industrie, de l'alimentation, du textile, du papier, de la filtration de l'eau et du traitement des déchets.</p> <p><b>Mots clés:</b> <i>Aspergillus niger</i>, Pectine lyase, Polygalacturonase, Purification, SSF.</p>	
<p><b>Jury d'évaluation:</b></p> <p><b>Président du jury : Mr NOUADRI Taher</b> M.C.A, (UFM Constantine).</p> <p><b>Encadrante : Mme BENNAMOUN Leila</b> M.C.B, (UFM Constantine).</p> <p><b>Examina : Mme DAKHMOUCHE Scheherazad</b> M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.</p>	
<i>Année universitaire 2022.2023</i>	

