

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie /Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° Ordre:

N° Série:

Mémoire de Master
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Production de la polygalacturonase par la moisissure
Aspergillus niger cultivée sur milieu solide (SSF)

Par: DJAMA Roqiya et ABDELILaH Wafa

Soutenu le 04 Juillet 2018

Devant le jury :

Président du jury :Mr NOUADRI T. M.C.A, (UFM Constantine).

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. M.C.B, (UFM Constantine).

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

Examinatrice :Mme LABBANI F.Z .K. M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR,Constantine.

Année Universitaire 2017/2018



Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec Sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

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 **DAKHMOCHE** et Mme **LABBANI***

en tant qu'examinatrice

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur

*Mme **LEILA BENNAMOUN** pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour encadrer ce travail.*

Nous remercions également l'ensemble du personnel du Laboratoire de de Génie Microbiologique et Applications du Département de Biochimie Faculté des Science de la Nature et de la Vie -université des frères Mentouri_Constantine 1.

*Nous remercions aussi la doctorante **KARIMA LOUCIF** pour sa gentillesse et sa disponibilité, elle nous a beaucoup aidée au niveau du laboratoire*

... A tous, nous adressons l'expression de notre profonde gratitude.



DÉDICACE

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

Je dédier ce modeste travaille a tous ceux qui nous ont inondés de courage d'estime et de patience, et pour ceux qui ont crue ont nous et pour ceux qu'on porte envers eux un grand amour et sincère reconnaissance.

A Ma chers maman honorable aimable tu représente pour moi le symbole de bonté par excellence, source de tendresse l'exemple de dévouement

A mon cher papa mon archétype signe de noblesse qui ma soutenu, tout au long de ma vie

Soyez honoré par ce par se travaille et que dieu vous garde

A mes chères sœurs Wissem, AMINA et Malak et mes amis, selma, karim,

Que j'aime beaucoup

ROKIA



Dédicaces

Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

À mes chers parents, ma mère et mon père, pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour leur patience, leur amour et leur encouragement.

Que ce travail leur apporte joie et fierté;

À mes chers frères, zakaria ,mourad et ma soeur samah et à toute ma famille;

À mes très chers amis pour leurs aide et soutiens.

wafa

Table des matières

| | |
|--|----|
| Abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Résumés | |
| Introduction | 1 |
| Chapitre I: Revue bibliographique | |
| <i>I. Aspergillus niger</i> | 3 |
| 1. Définition et caractéristiques générales..... | 3 |
| 1.1. Les <i>Aspergillus</i> | 3 |
| 1.2. <i>Aspergillus niger</i> | 3 |
| 2. Croissance et cycle fongique..... | 3 |
| 3. Taxonomie..... | 4 |
| 4. Ecologie..... | 5 |
| 5. Morphologie..... | 5 |
| 5.1. Caractères cultureux..... | 5 |
| 5.2. Aspect microscopique..... | 5 |
| 6. Importance industrielle d' <i>Aspergillus niger</i> | 6 |
| 6.1. Production des acides citriques..... | 6 |
| 6.2. Application dans l'environnement | 7 |
| 6.3. Production des enzymes..... | 7 |
| II. Enzymes glycolytiques : Pectinases | 9 |
| 1. Substrats pectiques | 9 |
| 2 Sources de pectine..... | 9 |
| 2.1. Homogalacturonane (HG)..... | 10 |
| 2.2. Ramnogalacturonan I (RGI)..... | 11 |
| 2.3. Rhamnogalacturonan II (RGII)..... | 11 |
| 3. Solubilité..... | 12 |
| 4. Structure chimique..... | 12 |
| 5. Enzymes pectinolytiques | 12 |
| 5.1 classification..... | 12 |
| 5.1.1 les enzymes désesterifiantes..... | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.2 les enzymes depolymérisantes..... | 14 |
| 5.1.2.1 pectine –lyases..... | 14 |
| 5.1.2.2 Les polygalacturonases (PGase)..... | 14 |
| a) Les endopolygalacturonases | 15 |
| b) Les exopolygalacturonases..... | 15 |
| 6. Structurer de la polygalacturonase..... | 16 |
| 7.Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase..... | 17 |
| 8.Applications des enzymes pectinolytiques..... | 18 |
| 9.Origine des polygalacturonases..... | 19 |
| III: Fermentation en milieu solide et matière première..... | 20 |
| 1.La Fermentation en milieu solide..... | 20 |
| 1.1. Définition..... | 20 |
| 1.2. Les paramètres de contrôle de la FMS | 21 |
| 1.2.1. L’humidité | 21 |
| 1.2.2. La température | 21 |
| 1.2.3. Le pH | 21 |
| 1.2.4. L’aération | 22 |
| 1.3.Les supports..... | 22 |
| 1.4. Avantages et inconvénients de la FMS | 23 |
| 1.4.1. Les avantages de la FMS | 23 |
| 1.4.2. Les inconvénients de la FMS | 23 |
| 5. Utilisations de la FMS en biothechnologie..... | 24 |
| 2.La matière première..... | 25 |
| 2.1. Le son de blé | 25 |
| 2.2. Rôle et propriétés..... | 25 |
| Chapitre II: Matériels et méthodes | |
| 1. réactivation de la souche..... | 27 |
| 2. Mise en évidence de l’activité pectinolytique..... | 27 |
| 3.production de la polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers en FMS..... | 27 |
| 3.1. Son de blé substrat de la fermentation | 27 |
| 3.2. Préparation de l'inoculum..... | 27 |
| 3.3. Dénombrement des spores | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Etude de la composition chimique du son de blé | 27 |
| 3.5. Fermentations..... | 29 |
| 3.5.1. Préparation des milieux de fermentation..... | 29 |
| 3.5.2. L'extraction..... | 29 |
| 3.5.3. Méthodes analytiques..... | 29 |
| Dosage de l'activité enzymatique | 29 |
| Dosage des protéines..... | 30 |
| Chapitre III: Résultats et discussions | |
| 1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique par la souche <i>Aspergillus niger</i> | 31 |
| 2. Etude de la composition chimique du son de blé..... | 31 |
| 3.L'influence des différent paramètre sur la production de la PGase par <i>aspergillus niger</i> | 33 |
| 3.1. L'effet de l'humidité..... | 33 |
| 3.2. L'effet de la concentration de l'inoculum..... | 34 |
| 3.3. L'Effet du temps d'incubation..... | 35 |
| 3.4. L'effet de la température | 36 |
| Conclusion et perspectives..... | 37 |
| références bibliographiques..... | 38 |
| Annexes | |

Liste des abréviations

UI: Unité internationale

aw : activité de l'eau

C° : degré celsius

min : minute

h : heure

cm : centimètre

mg : milligramme

ml : millilitre

N : normalité

NaCl : chlorure de sodium

pH : potentiel d'hydrogène

µg : microgramme

PGase: Polygalacturonase

HG: Homogalacturonane

RGI: Rhamnogalacturonan I

RGII: Rhamnogalacturonan II

DNS: 3,5-Acide Dénitrosalicilique

PDA: Potato Dextrose Agar

YNB: Yeast Nitrogen Base

FMS: Fermentation sur milieu solide

Liste des figures

| Figures | Titres | Pages |
|------------------|---|--------------|
| Figure 1 | Développement d' <i>Aspergillus niger</i> par microscope électronique à balayage (<i>Dijksterhuis et Wösten, 2013</i>). | 04 |
| Figure 2 | Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> (<i>Pasqualotto, 2010</i>). | 06 |
| Figure 3 | La structure de base de la pectine (<i>Willats et al.,2006</i>). | 11 |
| Figure 4 | Chaîne principale d'une pectine composée d'un enchaînement GalA-Rha-GalA Rha.(<i>albagnac et al.,2002</i>). | 12 |
| Figure 5 | Action des pectines-méthylestérases (<i>Khan et al., 1990</i>). | 14 |
| Figure 6 | Action des pectines-lyases (<i>SutherlandU, 1995</i>). | 14 |
| Figure 7 | Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique (<i>KÖRNER et al., 1999</i>) | 15 |
| Figure 8 | Structure tridimensionnelle de <i>A. niger</i> endoPGII (<i>Claudia et al .,2007</i>). | 16 |
| Figure 9 | Les différentes couches cellulaires du son de blé constitutives industriel. (<i>Surjeret al.,2005;Hemery et al .,2009</i>). | 25 |
| Figure 10 | Courbe étalon des sucres réducteurs. | 28 |
| Figure 11 | Courbe étalon d'acide galacturonique | 30 |
| Figure 12 | Courbe étalon pour le dosage des protéines. | 30 |
| Figure 13 | Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire chez la moisissure <i>Aspergillus niger</i> . | 31 |
| Figure 14 | Effet du taux d'humidité sur la production PGase. | 33 |
| Figure 15 | Effet de concentration d'inoculum sur activité PGase. | 34 |
| Figure 16 | Effet de la période d'incubation sur l'activité de PGase. | 35 |
| Figure 17 | Effet de la température sur l'activité de PGase. | 36 |

Liste des tableaux

| Tableaux | Titres | Pages |
|------------------|---|--------------|
| Tableau 1 | Production des enzymes par <i>Aspergillus Niger</i> . | 08 |
| Tableau 2 | teneur en pectine de différents fruits et légumes. | 10 |
| Tableau 3 | classification des enzymes dégradant les pectines (<i>Jayani et al., 2005</i>). | 13 |
| Tableau 4 | propriété de purification de quelques PGases microbiennes. | 18 |
| Tableau 5 | Applications des enzymes pectinolytiques microbiennes (<i>Kumar et Suneetha, 2014</i>). | 19 |
| Tableau 6 | Origine des polygalacturonases. | 20 |
| Tableau 7 | Principales étapes et applications ayant marqué l'évolution de la FMS au cours de l'histoire (<i>Pandey, 1992</i>). | 24 |
| Tableau 8 | La composition chimique du son de blé. | 31 |

Résumé:

Ce travail s'intéresse à la production de la polygalacturonase par *Aspergillus niger* sur milieu solide (SSF) est réalisée sur un milieu à base de son de blé, grâce à sa composition chimique qui est riche en protéines, en minéraux et en sucres réducteurs pour une bonne croissance et une meilleure activité polygalacturonique. Différents paramètres influencent sur cette production Afin de mieux les connaître on a testé l'effet de taux d'humidité ,de la concentration, de la période d'incubation et de la température. L'utilisation d'un taux d'humidité de 60% donne la meilleure production en enzyme avec une activité spécifique de 3600,34 U/mg. Un taux d'inoculum de 10^7 spores/ml s'avère la meilleure concentration avec une activité spécifique de 1260,26 U/mg. Une période de 72 heures et une température de 40°C permettent une meilleure production en PGase avec une activité spécifique de 309,1 U/mg et de 100,5 U/mg respectivement.

Mots clés : *Polygalacturonase , Aspergillus niger , Fermentation sur milieu solide , Son de blé*

Abstract:

This work focuses on the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger* on solid medium (SSF) is made on a wheat bran medium, thanks to its chemical composition which is rich in proteins, minerals and reducing sugars for good growth and polygalacturonic activity. Different parameters influence this production In order to better know them, we have tested the effect of humidity, concentration, incubation period and temperature. The use of a moisture content of 60% gives the best enzyme production with a specific activity of 3600.34 U / mg. An inoculum rate of 107 spores / ml is the best concentration with a specific activity of 1260.26 U / mg. A period of 72 hours and a temperature of 40 ° C allow better production of PGase with a specific activity of 309.1 U / mg and 100.5 U / mg respectively.

Key words: Polygalacturonase, *Aspergillus niger*, Fermentation on solid media, Wheat bran

ملخص:

يركز هذا العمل على إنتاج polygalacturonase بواسطة *Aspergillus niger* على وسط صلب (SSF)

يرصد على وسط نخالة القمح ، وذلك بفضل تركيبته الكيميائية التي هي غنية في البروتينات والمعادن والحد من السكريات للنمو الجيد والنشاط polygalacturonic. معاملات مختلفة تؤثر على هذا الإنتاج من أجل معرفة أفضل لهم ، قمنا باختبار تأثير الرطوبة والتركيز ، فترة الحضانة ودرجة الحرارة. يعطي استخدام محتوى الرطوبة بنسبة 60٪ أفضل إنتاج للأنزيم مع نشاط معين يبلغ 3600.34 وحدة / مغ. معدل التطعيم من 107 أبواغ / مل هو أفضل تركيز مع نشاط معين من 1260.26 يو / ملغ. فترة 72 ساعة ودرجة حرارة 40 درجة مئوية تسمح بإنتاج أفضل من PGase بنشاط معين 309.1 U / mg و 100.5 U / mg على التوالي.

الكلمات المفتاحية: Polygalacturonase ، *Aspergillus niger* ، التخمر على الوسائط الصلبة ، نخالة القمح

Introduction

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (*Botton et al., 1990*). Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' α -amylase, la cellulase, les pectinases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (*Little, 2004*).

Les enzymes pectinolytiques occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes (*Ruiz et al., 2017*), marché en pleine croissance, avec un chiffre d'affaires de 4.6 milliards de dollars pour l'année 2016. Une croissance de 5.8% est attendue pour la période de 2017 à 2022 (Industrial Enzyme Market, 2017). Novozymes (Danemark), Novartis (Suisse), Roche (Allemagne) et Biocon (Inde) sont les principaux producteurs commerciaux de pectinases. En Algérie, l'industrie des enzymes est totalement absente.

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

L'*Aspergillus niger*, le groupe dominant des *Aspergillus*, est largement utilisé comme producteur d'enzymes. Ces microorganismes peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acides, représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux (Bhat, 2000 ; Peciulyte, 2007).

La culture des moisissures pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide (SSF), soit en culture submergée (SMF). Dans notre étude, nous avons choisi le son de blé comme substrat de fermentation en milieu solide, grâce à sa richesse en fibres insolubles comme la cellulose et la pectine. Il a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (*Abdullah et al., 1985*). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Les différentes étapes réalisées au cours de ce travail sont :

- Mise en évidence de l'activité pectinolytique de la souche par fermentation sur milieu solide;
- Etude de la composition chimique du substrat de fermentation ;
- Tester l'effet des conditions qui influencent la production de la PGase : L'effet de l'humidité, de la concentration de l'inoculum, de la période d'incubation et de la température.

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

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Aspergillus niger

1. Définition et caractéristiques générales

1.1. Les *Aspergillus*

L'*Aspergillus* est une espèce de champignon, constitué de filaments, présent dans les moisissures. L'*Aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition. Leurs spores sont présentes dans l'air et la poussière, et peuvent être ingérés en consommant des fruits. Il existe environ 180 espèces d'*Aspergillus*, qui peuvent être nocifs pour l'être humain, en causant des mycoses, ou l'Aspergillose, une infestation des voies respiratoires, potentiellement mortelle (*Samson et Varga, 2007*). Le genre comprend près de 180 espèces répartis en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (*Botton et al., 1990*). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des *Aspergilloses* (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires; *Aspergillus niger* responsable d'*Aspergillose* du conduit auditif) (*Morin, 1994*).

1.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparait sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes (*Raper et Fennel, 1977*). L'*Aspergillus niger* est l'un des espèces de champignons les plus importants économiquement, bien que l'altération des aliments et la production de mycotoxines figurent en tête de ses caractéristiques (*Pitt, 1989*). Peu d'espèces trouvent des applications industrielles dans le domaine alimentaire et dans l'industrie biotechnologique notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (*Botton et al., 1990*).

2. Croissance et cycle fongique

Dans l'environnement les *Aspergillus niger* sont sous la forme de champignons filamenteux septes et ramifiés: cette forme végétative est appelée mycélium. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium: les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes *Aspergillaires* ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninuclées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides, qui sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3 µm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement (*Quatresous, 2011*). La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette

phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (*Quatresous, 2011*).

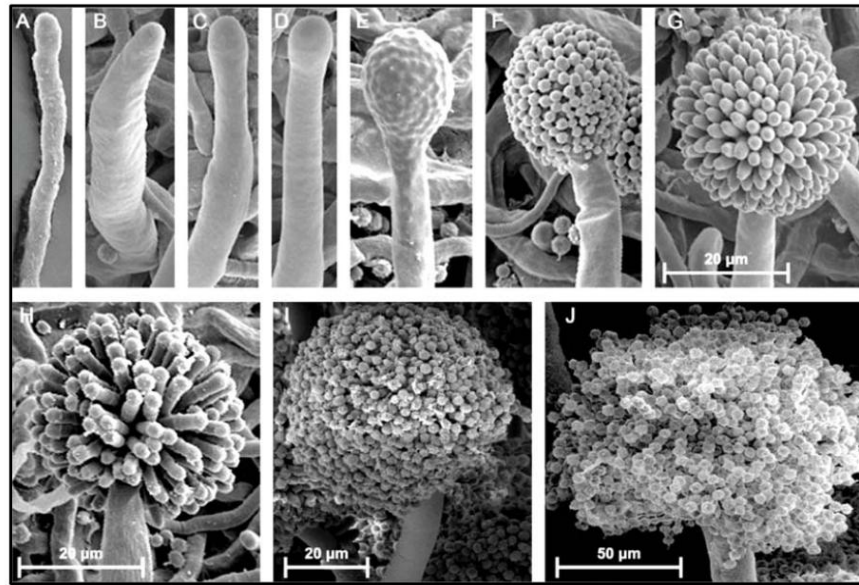


figure 1: Développement d'*Aspergillus niger* par microscope électronique à balayage (*Dijksterhuis et Wösten, 2013*).

3. Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. *Al-Musallam, (1980)* a révisé la taxonomie du groupe *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte. Sept espèces sont reconnues dans ce groupe (*Schuster et al., 2002*). La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant (*Alexopoulos et Mims, 1979 ; Bocquet, 1993*).

Règne: Mycètes

Embranchement: Amastigomycota

Sous-embranchement: Deuteromycotina

Classe: Deutoromycètes

Ordre: Moniliales

Famille: Moniliaceae

Genre: *Aspergillus*

Espèce: *Aspergillus niger*

4. Ecologie

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol, le compost et les zones sombres et humides; aussi on le trouve dans les denrées alimentaires; les céréales, les arachides et dans le matériel végétal (fruits et légumes) en décomposition (*Dijksterhuis et Wösten, 2013*). Elle est capable de croître dans la plage température large de 6-47°C avec une température relativement élevée avec un optimum de 35 à 37°C. La limite d'activité de l'eau pour la croissance est 0,88 (aw) qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* peut pousser sur une très large gamme de pH:1,4-9,8 (*Schuster et al., 2002*). Ces capacités et l'abondante production de conidies, qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce, avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (*Schuster et al., 2002*).

5. Morphologie

5.1. Caractères culturels

Aspergillus niger pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, il peut aussi se développer jusqu'à 42°C (*Tabuc, 2007*). Les colonies peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, le mycélium extensif hyalin en grande partie immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires à la maturation (*Quatresous, 2011*). En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques (*Quatresous, 2011*). Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle, un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes (*Tabuc, 2007*). Cette espèce a une croissance rapide, avec un optimum thermique compris entre 25 et 30°C, mais il peut pousser jusqu'à 42°C. Son développement est aussi inhibé par l'actidione (*Quatresous, 2011*).

5.2. Aspect microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des têtes conidiennes larges, brunrouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre). Les phialides, très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. Les métules et phialides sont légèrement teintées de brun. Les conidies sont

produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. Elles sont typiquement globuleuses, brunes, et mesurent 3,5 à 5 μm de diamètre. La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées. La tête *Aspergillaire* est donc bisériée radiée, et noire à maturité (*Dijksterhuis et Wösten, 2013*).

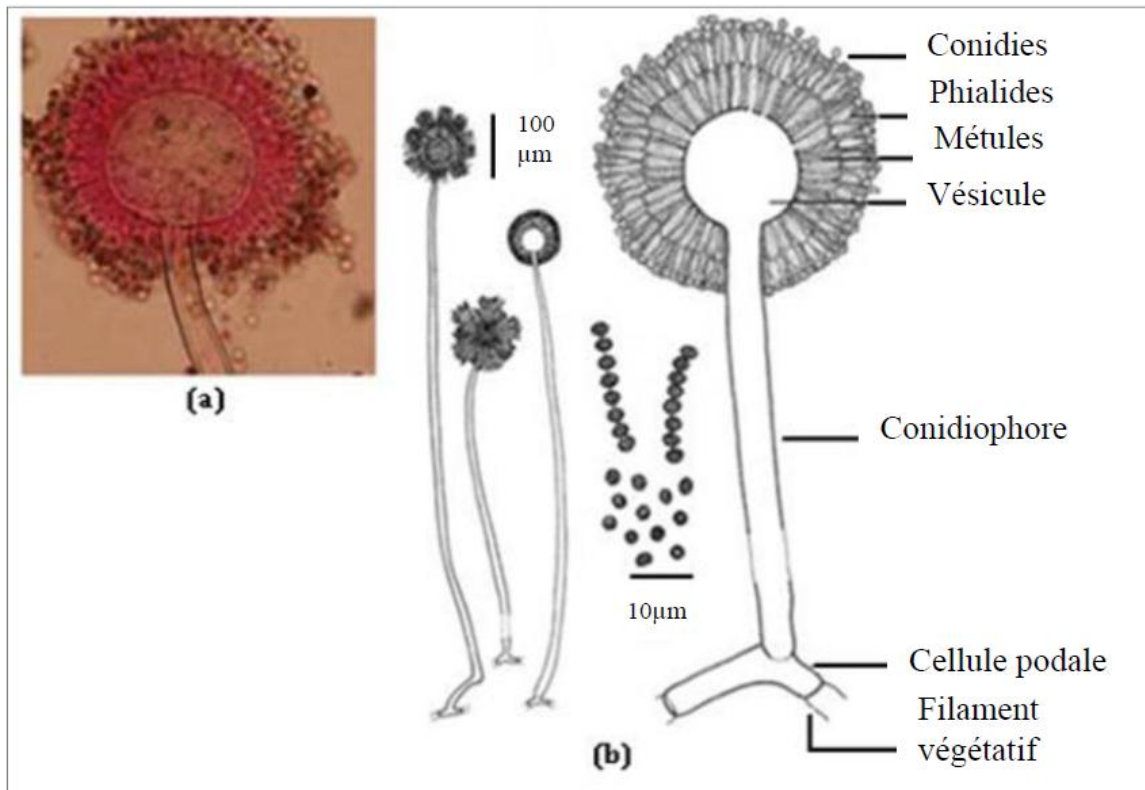


Figure 2 :Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d'*Aspergillus niger* (*Pasqualotto, 2010*).

6. Importance industrielle d'*Aspergillus niger*

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles des espèces d'*Aspergillus niger* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (*Ward et al., 2006*). Les acides organiques et les enzymes constituent les métabolites d'*Aspergillus niger* les plus importants.

6.1. Production des acides citriques

Aspergillus niger est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919 (*Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2012*). L'acide citrique est employé couramment dans une variété d'industries et en volume des ventes,

dépassent largement les autres métabolites tels que l'acide gluconique (*Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002*). L'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*Aspergillus Niger* et *Aspergillus fistulosum* parce que les rendements de ces organismes sont élevés et la formation des produits indésirables tels que l'acide gluconique et l'acide oxalique est minime. La Food and Drug Administration (FDA) a classé *Aspergillus niger* comme source d'acide citrique (*Schuster et al., 2002*).

6.2. Applications dans l'environnement

Les applications d'*Aspergillus* dans l'environnement sont plutôt limitées. Néanmoins, une souche d'*Aspergillus niger* a été étudiée par différents laboratoires pour la bio sorption des métaux lourds (*Dursun, 2003*).

6.3. Production des enzymes

La richesse de l'arsenal enzymatique des espèces *Aspergillaires* les fait utiliser notamment dans la production d'une large gamme des acides organiques (acide citrique, acide gluconique, acide acétique,...), des enzymes (protéases, lipases, amylases, ...) et des métabolites bioactives tels que les *mycotoxines* (*Abraca et al., 2004 ; Varga et al., 2004 ; Hölker et al., 2004 ; Bouchet et al., 2005 ; Heitman et al., 2007*). *Aspergillus niger* est très largement utilisé dans la production des enzymes commerciales vues les hautes productivités enzymatiques qui peuvent être atteintes (*Iwashita, 2002 ; Bakhtiari et al., 2006 ; Aftab et al., 2007 ; Mhetras et al., 2009*)

Les principales activités protéolytiques d'*Aspergillus niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide (*Schuster et al., 2002*). Grâce aux capacités hydrolytiques importantes d'*Aspergillus niger* et sa tolérance à l'acidité (pH<3), il permet d'éviter les contaminations bactériennes au cours des processus biotechnologiques (*Jarai et Bouxton, 1994 ; Dekrif-Dakhmouche et al., 2006*).

| enzymes | Microorganisme | Substrat/milieu | Références |
|----------------|------------------------|--|--------------------------|
| protéase | <i>A.niger LBA02</i> | Son de blé ,tourteau de soja, graines de coton | De castro et al ,2016 |
| protéase | <i>A.niger MTCC281</i> | Son de riz | Paranthman et al,2009 |
| protéase | <i>A.niger LBA02</i> | Son de blé | De Castro et al,2014 |
| protéase | <i>A.niger</i> | Pelures de l'igname | Oludumila et al,2015 |
| protéase | <i>A.niger</i> | Milieu défini | Edens et al,2005 |
| Protéase | <i>A.niger</i> | Son de blé,tourteau de soja,tourteau de tournesol ,tourteau de colza, graines de coton | Mukhtar et al,2009 |
| protéase | <i>A.niger FFB1</i> | Son de blé Milieu czapek-Dox | Bensmail et al,2015 |
| protéase | <i>A.niger</i> | Son de blé | Bhatnagar et al,2010 |
| Protéase acide | <i>A.niger BAN3E</i> | Son de riz, son de blé, tourteau de noix de coco, tourteau d'arachide | Suganthi et al,2011 |
| Amylase | <i>A.niger</i> | Son de riz, son de blé, son de noix de coco | Suganthi et al,2012 |
| amylase | <i>A.niger BAN3E</i> | Son de riz, son de blé, tourteau de noix de coco, tourteau d'arachides, tourteau de soja | Suganthi et al,2011 |
| amylase | <i>A.niger ML-17</i> | Son de blé | Irfan et al,2012 |
| invertase | <i>A.niger LBA 02</i> | Son de blé, tourteau de soja, graines de coton, zeste d'orange | Ohara et al,2015 |
| pectinase | <i>A.niger</i> | Zeste d'orange | Tobechukwu et al,2014 |
| pectinase | <i>A.niger K3</i> | Milieu défini | Rohit et al ,2013 |
| Pectinase | <i>A.niger</i> | Son de blé +cosse de riz | Akhter et al, 2011 |
| cellulase | <i>A.niger</i> | Sciure de bois, cellulose | Charitha devi et al,2012 |
| keratinase | <i>A.niger</i> | Cheveux humains, | Lopes et al,2011 |

Tableau 1 : production des enzymes par *Aspergillus niger*.

II. Enzymes glycolytiques : Pectinases

1. Substrats pectiques

La pectine est un polysaccharide important de la paroi cellulaire des plantes supérieures. Elle existe particulièrement dans les lamelles moyennes et primaires parois cellulaires des plantes, elle joue un rôle fondamental dans la croissance cellulaire, mécanique force et mécanismes de défense. La pectine est un polymère structuralement complexe avec au moins 17 monosaccharides différents interconnecté à travers plus de 20 différents liens. Le polymère de pectine comprend différents domaines structuraux qui sont liés de manière covalente à un autre

(*Merve et al., 2014*) d'un poids moléculaire situé entre 50000 et 150000 Da (*Voragen et al., 1995*). Ces substances consistent de protopectines, d'acides pectiniques, de pectines et d'acides pectiques (*Tapre et al., 2014*). Par conséquent, la pectine est un polysaccharide anionique qui a des régions linéaires formées par les monomères de l'acide D-galacturonique (GalA), liés par des liaisons α - (1,4) glycosidiques, et ramifiées régions principalement constituées de divers types de monosaccharides neutres (principalement le rhamnose, le xylose, mannose, glucose, galactose et arabinose) liés entre eux. Les unités GalA ont un carboxyle groupé, qui peuvent être présents sous forme de groupes carboxyle libres ou de groupes méthyl-estérifiés sur l'origine, l'isolement et le traitement de la pectine (*Caffall and Mohnen, 2009; Mohnen, 2008; Ridley et al., 2001; Thakur et; Yapo, 2011*).

2. Sources de pectines

Les pectines sont extraites des parois cellulaires des agrumes et pomme, moins souvent aussi de pamplemousse et de betterave à sucre. Les pectines commerciales peuvent être classées en pectine à haute teneur en méthoxyle (HMP) avec un Degré d'estérification > 50% et de pectine à faible teneur en méthoxyle (LMP) avec un Degré d'estérification <50% (*Kim et al., 1978*).

| Fruits/légumes | Teneur en pectine en | Références |
|--------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Pommes | 0,5-1,6 | Taper et al., 2014 |
| Abricots | 0,7-1,3 | Taper et al., 2014 |
| Bananes | 0,7-1,2 | Taper et al., 2014 |
| Raisins | | Taper et al.,2014 |
| Ecorces de citron | 2,5-4 | Karr,1976 |
| Mare de pomme | 1,5-2,5 | Hodgson et kerr,1991 |
| Ecorces de fruit de la passion | 2,1-3,0 | Hodgson et kerr,1991 |
| Ananas | 0,3-0,6 | Taper et al., 2014 |
| Pois | 0,5-0,8 | Taper et al., 2014 |
| Peches | 0,3-1,2 | Taper et al.,2014 |
| Papaye | 0,66-1,0 | Hodgson et kerr,1991 |
| Fraises | 0,6-0,7 | Taper et al.,2014 |
| Pulpe de Betterave | 1 | Karr,1976 |
| Tomates | 0,2-0,5 | Taper et al.,2014 |
| Ecorces d' oranges | 3,6-5,5 | Renard et thibault,1993 |
| Tamarins | 1,71 | Hodgson et kerr,1991 |
| Mure | 0,72 | Hodgson et kerr,1991 |
| Framboises | 0,6-0,7 | Hodgson et kerr,1991 |
| Carottes | 0,2-0,5 | Renard et thibault,1993 |
| Mangue | 0,26-0,42 | Hodgson et kerr,1991 |

Tableau 02: teneur en pectine de différents fruits et légumes.

Les principaux constituants des pectines sont les homogalacturonanes (HGA), les Rhamnogalacturonanes (RG) et les xylogalacturonanes (*Schols et Voragen, 2002*)

2.1. Homogalacturonane (HG)

HG est un polymère linéaire formé par l'acide D-galacturonique qui peut être acétylé et / ou méthérisifié. Ça peut être appelé régions lisses de la pectine. La molécule est classée selon son niveau d'estérification: la pectine a au moins 75% des groupes carboxyle méthylés; l'acide pectique ou l'acide polygalacturonique n'a pas de carboxyle estérifié par un groupe méthyle

groupes. Souvent, le mot pectine est utilisé comme nom générique pour les substances pectiques (*Jayani et al.,2005*).

2.2. Rhamnogalacturonan I (RGI)

RG I est composé de disaccharide répété rhamnose- l'acide galacturonique. Les résidus galacturoniques peuvent être acétylé et les deux résidus peuvent porter des chaînes latérales de sucres neutres comme le galactose, l'arabinose et le xylose (*Willats et al.,2006*).

2.3. Rhamnogalacturonan II (RGII)

Malgré son nom, RGII est une chaîne homogalacturonane avec chaînes latérales complexes attachées aux résidus galacturoniques (*Willats et al.,2006*) proposé une molécule de pectine modèle de structure dans lequel HG et RGII sont de longues chaînes latérales du squelette RGI (*Kashyap et al.,2001*).

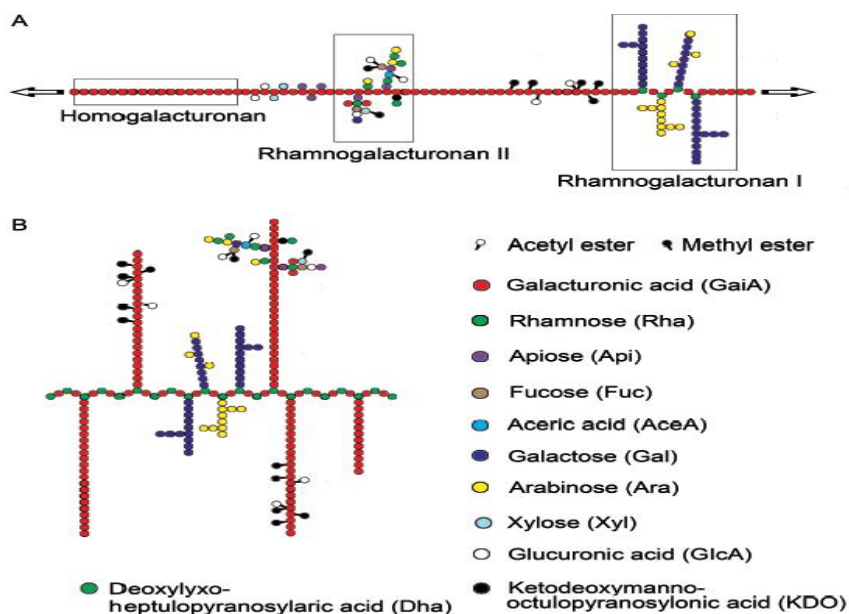


Figure3: La structure de base de la pectine (*Willats et al.,2006*).

Représentations schématiques des conventionnelles (A) et récemment proposées (B) structures de pectine. Les polymères présentés ici ne sont destinés qu'à illustrer certains des principaux domaines trouvés dans la plupart des pectines plutôt que définitif structures. (*Willats et al.,2006*).

3 .Solubilité

La solubilité de la pectine dans l'eau est liée à leur degré de polymérisation, leur nombre et distribution de groupes méthoxyle (*Thakur et al., 1997*). Généralement, la solubilité augmente avec la diminution du poids moléculaire et l'augmentation des groupes carboxyle estérifiés. Ainsi (*Tho et al., 2003*) ont montré que l'acide pectinique avec un degré d'estérification (DE) <10% solubilité dans l'eau. De plus, le pH, la température, la nature du sucre neutre présent ont un effet marqué sur la solubilité (*Rolin, 1993, Simpson et al., 1984*).

4. Structure chimique

La structure de la pectine est très difficile à déterminer car la pectine peut changer pendant - l'isolation des plantes, le stockage et le traitement de matériel végétal (Novosel'skaya et al., 2000). Le squelette de la pectine est composé majoritairement d'unités (200-1000) d'acide D-galacturonique (GalA) reliées par des liens glycosidiques α -(1→4). (Voragen et al., 1995).

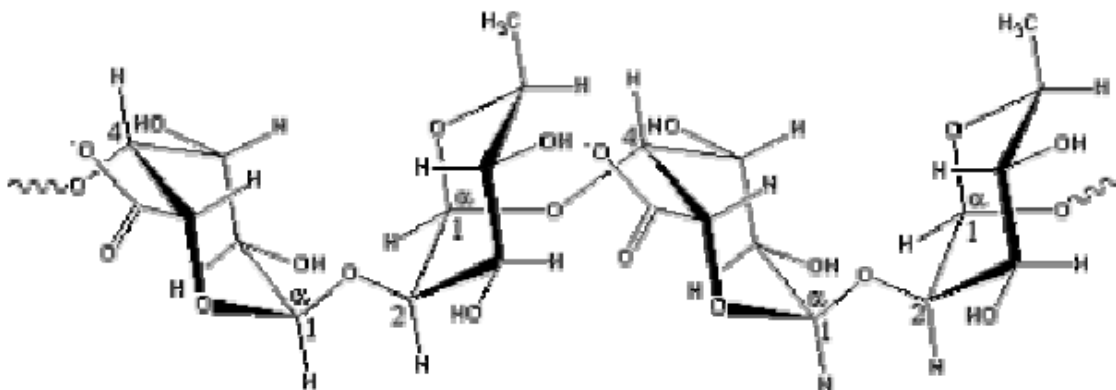


Figure 4: Chaîne principale d'une pectine composée d'un enchaînement GalA-Rha-GalA Rha (*albagnac et al.,2002*).

5. Enzymes pectinolytiques

5.1Classification

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui catalyse la substance pectique par dépolymérisation (hydrolases et lyases) et des réactions de déstérification (estérases).

| Enzymes | E.C | Mécanisme d' action | Mode d' action | Première substrat | Produit |
|-----------------------------------|-----------------|------------------------|-------------------|----------------------|---|
| Estérases | | | | | |
| 1 – pectin méthylestérases | 3.1.1.11 | Hydrolyse | aléatoire | Pectine | Acide pectique+méthanol |
| Dépolymérases | | | | | |
| a)hydrolases | | | | | |
| 1 endopolygalacturonase | 3.2.1.15 | hydrolyse | aléatoire | Acide pectique | oligogalacturonates |
| 2 exopolygalacturonase | 3.2.1.67 | hydrolyse | terminal | Acide pectique | monogalacturonates |
| b) lyases | | | | | |
| 1-endopectate lyases | 4.2.2.2 | Trans- élimination | aléatoire | Acide pectique | Oligogalacturonates insaturé |
| 2-exopectate lyases | 4.2.2.9 | Trans- élimination | Terminal | Acide pectique | Monogalacturonates insaturé |
| 3-endopectine lyase | 4.2.2.10 | Trans- élimination | aléatoire | Pectine | Méthyl- oligogalacturonates insaturé |

Tableau 3: classification des enzymes dégradant les pectines (jayani et al.,2005)

5.1.1 Les enzymes déesterifiantes

Les pectines-méthylestérases ou pectinestérases (PME ou PE) EC (3.1.1.11) catalyse la déestérification du groupe méthoxyle de la pectine former de l'acide pectique et du méthanol. L'enzyme agit préférentiellement sur un groupe ester méthylique de l'unité de galacturonate à côté d'un unité de galacturonate non estérifiée. Il agit avant les polygalacturonases et des pectate lyases qui nécessitent des substrats non estérifiés (*Kashyap et al.,2001*).Il est classé dans la famille des hydrates de carbone estérase 8 (*Coutinho et al.,1999*).

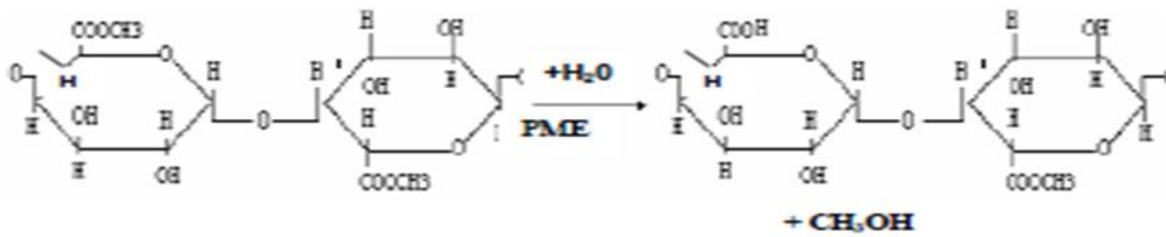


Figure 5: Action des pectines-méthylestérases (*KHANet al., 1990*)

5.1.2 Les enzymes dépolymérisantes

5.1.2.1 Pectine –lyases

La pectine lyase catalyse le clivage aléatoire de la pectine, préférentiellement haute pectine estérifiée, produisant des insaturés méthyloligogalacturonates par transélimination de glycosidiques liens. (*Jayani et al., 2005*). Jusqu'à présent, toutes les pectines lyases décrites sont des endo-PL (EC 4.2.2.10) (*Sinitsyna et al., 2007*) et ses collaborateurs (*Van Alebeek et al., 2002*) ont mené une étude détaillée du mode d'action de la pectine lyase *d'Aspergillus niger* qui produit des mono-, di-, tri- et tétragalacturonates. Outre les di-, tri- et tétragalacturonates insaturés à partir des méthyloligogalacturonates. Insaturé les monogalacturonates n'ont pas été identifiés dans les produits de la réaction dans n'importe que l'essai.

Les deux groupes lyase sont classés en polysaccharideslyase famille1

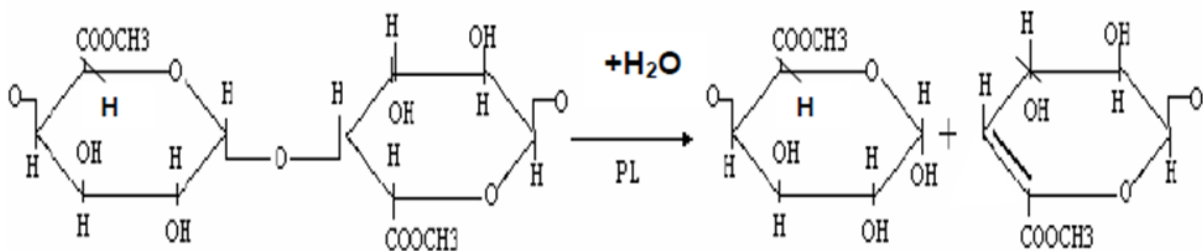


Figure 6 : Action des pectines-lyases (*SUTHERLAND, 1995*).

5.1.2.2 Les polygalacturonases (PGase)

Les PG coupent la liaison glycosidique α 1-4 reliant deux résidus d'acide galacturonique de la chaîne polygalacturonique. Elles ont pour substrat préférentiel les polygalacturonates. Mais, en fonction de leur sensibilité à la présence de groupement méthoxyl (Me). Ces enzymes peuvent réagir différemment. Généralement l'augmentation du DM ralentit l'activité enzymatique et le pourcentage final de liaisons hydrolysées (*Benen et al., 1999*).

Cependant, certaines enzymes PGase sont très actives sur un substrat pas ou peu méthoxylés. Alors que, d'autres ont une activité optimale sur pectine fortement méthoxylé (*Parenticova et al., 2000*). La présence de groupement acétyles influence également la dégradation des pectines par les PG. Le pourcentage d'hydrolyse d'homogalacturonane est élevé lorsque le degré d'acétylation est faible (*Renard et Enard et Javis, 1999*). Polygalacturonases (PGase) agissent sur la chaîne HG conduisant à un ramollissement de la paroi cellulaire (*Yachodar et al., 2014*).

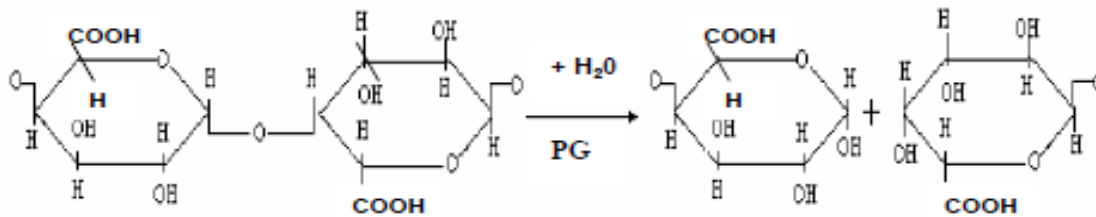


Figure 7: Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique (*KÖRNER et al., 1999*).

Selon leur modes d'action :

a) Les endopolygalacturonases

(endo PG) (PG, Poly- α -1,4-D-galacturonide glycano-hydrolase, E.C. 3.2.1.15) : Elles attaquent au hasard les liaisons α 1-4 des résidus d'acide galacturonique (AG) pour libérer des monomères (AG1), des dimères (AG2) et des trimères (AG3) d'acide galacturonique en fonction du substrat concerné, pectine ou acide pectique (*Rexov et Markovic, 1976*).

b) exopolygalacturonases

(exo PG) E.C. 3.2.1.67) hydrolysent les liaisons α 1-4 entre deux résidus d'acide D-galacturonique : Elles agissent généralement à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les AG ne sont pas estérifiés (*Baron et Thibault, 1985*).

6 Structurer de polygalactoronase

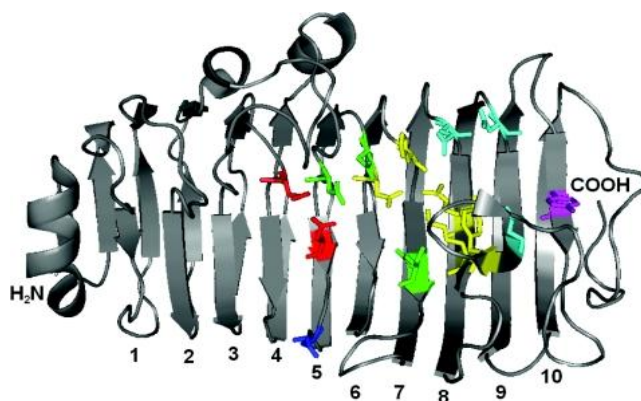


Figure 8: Structure tridimensionnelle de *A. niger* endoPGII (Claudia et al., 2007).

L'hélice β englobe dix échelons complets (numérotés de 1 à 10). Les résidus d'acides aminés associés aux sous-sites -3 à +3 sont rapportés dans le schéma [28]. Asp180, Asp201 et Asp202 sont impliqués dans la catalyse. Les résidus sur les sous-sites -1 et +1 sont strictement conservés parmi les endoPG fongiques .

Les PGase sont des protéines sécrétées d'environ 360 acides aminés et contiennent une séquence signal d'environ 20 à 65 acides aminés. Elles sont généralement glycosylées et comportent quelques ponts disulfures stabilisants (Pickersgill et al. 1998; Pickersgill et al. 1999; Van Santen et al. 1999). Plus de 115 séquences ont été trouvées et étudiées jusqu'à maintenant (Markovic et Janecek 2001). Les PGs ont une structure monomérique en forme d'hélice main droite composée de feuilletts parallèles (righthanded parallel -helix) qui peut contenir de 7 à 12 tours complets formant de 3 à 4 feuilletts (Yoder et Journak 1995; Jenkins et al. 1998; Van Santen et al. 1999). La structure des PGase est représentée à la figure Les PGase et les exo-PGase procaryotes et eucaryotes partagent quelques similitudes dans leurs séquences. Le mécanisme catalytique implique six acides aminés conservés soit Asp-180, Asp-201, Asp-202, His-223, Arg-256 et Lys-258 (numérotation basée sur la séquence primaire de la PGII d'*Aspergillus niger*). L'aspartate 180 avec l'aide de l'aspartate 202 agirait comme une base pour activer la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse et l'aspartate 201 serait le donneur de proton au substrat. L'histidine 223 aurait pour fonction de maintenir le bon état d'ionisation d'un carboxylate impliqué dans la catalyse (probablement celui de l'aspartate 201) en partageant un proton. L'arginine et la lysine seraient quant à elles impliquées dans la liaison du substrat (Armand et al. 2000). La séquence consensus du site actif est montrée (Huang et Schell 1990; Rutkowski et al. 1990; Bussink et al. 1991; Henrissat 1991). Parmi les autres acides aminés

conservés dans les PGase, on retrouve aussi la tyrosine 291. Elle jouerait elle aussi un rôle dans la catalyse et dans la liaison du substrat (*Armand et al. 2000; Stratilova et al. 1993 et 1996; Rao et al. 1996; Pages et al. 2000*). Une séquence protéique type (celle de la PGII d'*Aspergillus nige*).

7. Effet des facteurs sur la production de la polygalacturonase :

➤ PH

Parmi les paramètres physico-chimiques, le pH joue un rôle important, y compris les changements morphologiques sur l'organisme dans la production d'enzymes. Dans cette étude, la production maximale de PG a été atteinte à pH 7,0. Une augmentation supplémentaire du pH, une réduction de la production d'enzyme a été observée. Freitas et al. ont rapporté un pH de 5,5 pour être le meilleur pour la production de PG par *Monascus* sp. N8 et *Aspergillus* sp. NIZ dans SSF. De plus, *Bacillus* sp. est censé produire PG à un pH optimal de 6,0-7,0 dans SSF en utilisant du son de blé.

➤ température

L'influence de la température est liée à la croissance de l'organisme. L'isolat *B. subtilis* CM5 a montré une production de PG optimale à 50 ° C. Une augmentation supplémentaire de la température a conduit à une diminution de la production d'enzymes. La production optimale de PG pour les autres *Bacillus* spp. a été trouvée dans la gamme de 40-50 ° C dans SSF en utilisant le son de blé comme substrat solide.

➤ humidité

L'humidité est l'un des paramètres les plus importants de la pêche artisanale qui influence la croissance de l'organisme et donc la production d'enzymes . En général, le taux d'humidité dans le procédé SSF varie entre 70 et 80% pour les bactéries . La production de PG à partir de *B. subtilis* RCK a été rapportée à 70% de CMH en utilisant du son de blé comme substrat solide. la production optimale de PG pour *B. subtilis* RCK sur le son de blé s'est révélée être de 60% de MHC (*manas et al.,2009*). Le tableau ci dessous rapporte les propriétés physico-chimiques de quelques PGases.

| Source | Mode d' action | pH optimal | T optimal | Référence |
|--------------------------------|----------------|------------|-----------|-------------------------|
| <i>Streptomyces lydicus</i> | Exo-PG | 6.0 | 50 | Jacob N et al.,2008 |
| <i>Aspergillus giganteus</i> | Exo-PG | 6.0 | 55 | Pedrolli DB.,2008 |
| <i>Aspergillus kawakii</i> | Endo-PGI | 4,5 | 50 | Contreas-, Voget.,2004. |
| <i>Aspergillus niger</i> | PG | 4,6 | 40 | Dinu et al.,2007 |
| <i>Bacillus sp.</i> | Exo-PG | 7,0 | 60 | Kobayashi et al.,2001 |
| <i>Fusarium moliniforme</i> | Endo-PG I | 4,8 | 45 | Niture et, Pant.,2004 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Endo-PG | 4,5 | 45 | Saito et al.,2004 |
| <i>Mucor flavus</i> | Endo-PGL | 3,5-5,5 | 45 | Gadre et al .,2003 |
| <i>Penicillium frequentans</i> | Exo-PG I | 3,9 | 50 | Chellegatti et al.,2002 |

Tableau 4 : propriété de purification de quelques PGases microbiennes.

8 Applications des enzymes pectinolytiques

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

| Domaines | Processus |
|-----------------------------|--|
| Production du jus de fruits | Clarification des jus. |
| Cornichons | Favorise la ramollissement durant le processus de fermentation et de stockage. |
| Production de café et thé | - Accélération des processus de fermentation et l'élimination de la mousse. - Elimination des souches mucilagineuses dans les grains de café. |
| Textiles | - Dégraissage des fibres végétales. -Utilisé dans l'élimination des impuretés non cellulosiques dans les fibres cotons. |
| Traitement des eaux usées | Elimination des pectines contenues dans les eaux usées industries agro-alimentaires. |
| Papier et pulpe | Dépolymérisation des pectines retrouvées dans le papier, et réduit la pectine durant le processus de blanchiment. |

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

9. Origine des polygalacturonases

Polygalacturonases (PGs) sont produits par divers organismes, tels que les plantes, les bactéries et les champignons(*Gautam et al.,2017*) sont représentées dans le tableau suivant :

| Enzyme d'origine | Références |
|---|--------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> Animale | |
| <i>Meloidogyne incognita</i> | Jaubert <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Sitophilus oryzae</i> | Shen <i>et al.</i> , 2003 |
| <ul style="list-style-type: none"> Végétale | |
| Avocat | Wakabayashi et Huber, 2001 |
| Banane | Pathak et Sanwal, 1998 |
| Fruits rouges | Amid <i>et al.</i> , 2014 |
| Mangue | Singh et Dwivedi, 2008 |
| Tomate | Moshrefi et Luh, 1984 |
| <ul style="list-style-type: none"> Bactérienne | |
| <i>Erwinia carotovora</i> | Basset <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Pseudomonas marginalis</i> CFBP 1287 | Membre et Burlot, 1994 |
| <i>Bacillus</i> sp. RK9 | Fogarty et Kelly, 1983 |
| <i>Leuconostoc</i> sp. LLn1 | Bekhouche <i>et al.</i> , 2006 |
| <ul style="list-style-type: none"> Fongique | |
| <i>Aspergillus niger</i> | Acuna-Arguelles <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Barakat <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Aspergillus sojae</i> | Demir et Tari, 2016 |
| <i>Penicillium italicum</i> | Alana <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | Manachini <i>et al.</i> , 1987 |
| <ul style="list-style-type: none"> Leuvurienne | |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> LV 10 | Manachini <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Blanco <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> | Federici, 1985 |
| <i>Candida sake</i> | Buzzini et Martini, 2002 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> | Buzzini et Martini, 2002 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> MP-10 | Taskin, 2013 |

Tableau 6: Origine des polygalacturonases.

III. La fermentation sur milieu solide et le son de blé

1. La fermentation sur milieu solide

1.1. Définition

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker *et al.*, 2005). La fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (Duchiron *et al.*, 2011). La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des

proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse. La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau (A_w) comprise entre 0,65 et 0,98 (*Assamoi et al., 2009*).

1.2. Les paramètres de contrôle de la FMS

La conduite de la FMS est régie par des paramètres en fonction des conditions de croissance des différents micro-organismes ainsi que l'objectif fixé préalablement (production de biomasse, d'arômes, d'enzymes...). Ces paramètres de la FMS sont essentiellement l'humidité, la température, le pH et l'aération (*Durand, 1983*).

1.2.1. L'humidité

La quantité d'eau à ajouter est fonction de la capacité de rétention d'eau du substrat solide et de la nature du micro-organisme. Cette teneur en eau doit être suffisante pour le métabolisme des champignons tout en gardant la matrice solide (pas d'écoulement d'eau) et sans affecter la porosité du substrat et par conséquent réduire les échanges gazeux (*Gervais et Bensoussan, 1994*).

1.2.2. La température

Le dégagement de la chaleur générée au cours des activités métaboliques des micro-organismes se traduit par une augmentation de la température. Ceci pose un sérieux problème au cours de la fermentation, aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle.

Par conséquent, le maintien de la température établie en début de la fermentation (généralement température optimale de la croissance du micro-organisme) est une tâche très difficile (*Raimbault, 1980*). La faible conductivité thermique des matériaux, l'absence de l'agitation ainsi que la faible teneur en eau constituent les facteurs majeurs qui limitent le transfert de chaleur au cours de la FMS.

1.2.3. Le pH

L'activité métabolique des micro-organismes engendre la production d'une multitude de produits dans le milieu de culture. Ceci provoque une variation du pH influençant la bonne croissance des micro-organismes. Le pH initial d'une culture est ajusté à son optimum par la solution nutritive qui imprègne le support. Néanmoins, le maintien du pH au cours de la fermentation n'est pas facile à réaliser en particulier pour les FMS non agitées. Cependant, l'utilisation des tampons permet de résoudre ce problème ; par ailleurs, *Raimbault (1980)* et *Roussos (1985)* ont démontré

qu'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée confère au milieu un pouvoir tampon et permet donc de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance des micro-organismes.

1.2.4. L'aération

Selon *Raimbault (1980)*, l'aération au cours de la FMS permet d'assurer :

Le maintien des conditions en aérobiose ;

- L'élimination du CO₂ et de certains métabolites volatils ;
- La régulation de l'humidité ;
- La régulation de la température en évacuant la chaleur dégagée par les micro-organismes.

Au cours des FMS, l'aération des cultures se fait par injection d'air comprimé stérile à travers les fermenteurs à aération forcée. Son débit est fonction de la nature du microorganisme mis en jeu et de la porosité du substrat.

1.3. Les support

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisit avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique dans le cas d'un support organique puisque celle-ci aura une incidence sur les microorganismes et sur le profil enzymatique (substances inductrices), sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et de sels minéraux), sa disponibilité et son coût (*Manpeet et al.,2005,Krishna et al.,2005*). Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques. , et se présentent sous trois formes :

- 1) Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc,...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support ;
- 2) Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ;
- 3) Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif (*Durand et Alani,1998*).

1.4. Avantages et inconvénients de la FMS

1.4.1. Les avantages de la FMS

La fermentation en milieu solide présente une multitude d'avantages par rapport à d'autres types de fermentation comme la fermentation en milieu liquide (*Lonsane et al., 1985 ; Pandey et Soccol, 2000*) :

- Simplicité ;
- Moins d'espace de travail nécessaire ;
- Moins de perte d'eau, ce qui permet d'éviter le problème des effluents liquides à traiter dans le cas de la FML ;
- Matériels utilisés moins complexes d'où réduction des coûts ;
- Absence d'un contrôle rigoureux des paramètres de la fermentation ;
- Réduction de l'énergie requise ;
- Grande reproductibilité ;
- Le produit final (spores, métabolites...) est facilement récupérable et peut être utilisé directement ou après un simple séchage ;
- Le volume du produit entreposé est réduit, d'où la diminution du coût de stockage ;
- Diminution des risques de contaminations microbiennes à cause de la faible humidité. Ce qui rend une éventuelle stérilisation du substrat non nécessaire ;
- Simplicité des milieux de culture, en effet le substrat de fermentation est généralement très simple et le plus souvent naturel ;
- Utilisation directe des spores ou des cellules en suspension comme inoculum ;
- L'aération est plus faible qu'en milieu liquide vu qu'elle est facilitée par la porosité du matériel;
- Si on a affaire à une extraction d'enzymes, la quantité du solvant utilisé est très réduite ;
- Production plus importante ;
- La technologie de production d'enzymes commerciales par FMS est simple, elle ne porte pas sur des micro-organismes génétiquement modifiés (*Raimbault, 1980*).

1.4.2. Les inconvénients de la FMS

Les inconvénients évoqués par les mêmes auteurs (*Hesseltine, 1972 ; Lonsane et al., 1985; Pandey et Soccol, 2000*) sont les suivants :

- Le principal inconvénient est le risque d'une élévation excessive de la température à cause des problèmes du transfert de chaleur ;
- Choix limité des micro-organismes utilisables en raison du faible taux d'humidité ;

- La quantité d'eau utilisée en début de fermentation doit être mesurée avec une grande précision afin d'obtenir le pourcentage d'humidité le plus favorable possible à la croissance du micro-organisme ; ce taux diffère selon la souche et le substrat ;
- Les procédés de la FMS sont plus lents que ceux de la FML d'où la nécessité de prétraitements du substrat pour favoriser l'accès du champignon aux nutriments ;
- Difficulté de régulation de certains paramètres (pH, température, niveau d'O₂ et du CO₂...) surtout à grande échelle ;
- Difficulté d'estimation de la biomasse ;
- Transfert limité de chaleur et de masse, ce qui impose une certaine porosité du substrat ;
- Difficulté de contrôle et d'automatisation de la fermentation (*Durand, 1983*).

1.5. Utilisations de la FMS en biotechnologie

La FMS est non seulement utilisée traditionnellement (exemple : maturation des fromages par les moisissures) mais aussi industriellement dans divers procédés comme :

- La production de la biomasse (la production du blanc de champignons) ;
- La production d'enzymes (pectinases, cellulases, lipases...) ;
- La production de métabolites secondaires (mycotoxines, substances aromatiques...) ;
- La production de spores (la lutte biologique, biopesticides).

La FMS a subi une évolution très importante en partant du traditionnel à l'industriel et ceci est bien montré dans le tableau suivant :

| Période | Développement et Applications de la FMS |
|--------------------------|---|
| 2600 avant J.C. | Panification par les Egyptiens. |
| Avant J.C. | Fabrication du fromage par <i>P. roqueforti</i> . |
| 18 ^{ème} siècle | L'acide gallique utilisé en tannerie et en parfumerie. |
| 1860-1900 | Traitement des eaux usées. |
| 1900-1920 | Production d'enzymes à partir de champignons. |
| 1920-1940 | Enzymes d'origine fongique, acide citrique, fermenteur à tambour rotatif. |
| 1940-1950 | Développement notable dans l'industrie de fermentation. Production de la pénicilline par FMS et FML. |
| 1950-1960 | Transformation de stéroïdes par culture de champignons. |
| 1960-1980 | Production de mycotoxines et de P.O.U. |
| Après 1980 | Production d'une multitude de produits tels que l'alcool, l'acide gibbéréllique et le blanc de champignons comestibles. |

Tableau 7: Principales étapes et applications ayant marqué l'évolution de la FMS au cours de l'histoire (*Pandey,1992*).

2. La matière première

2.1. Le son de blé

Le son de blé regroupe les couches les plus extérieures du blé. Il est constitué de plusieurs couches fines :

- Le péricarpe extérieur et intérieur
- la testa ou le tégument
- La couche hyaline
- la couche d'aleurone

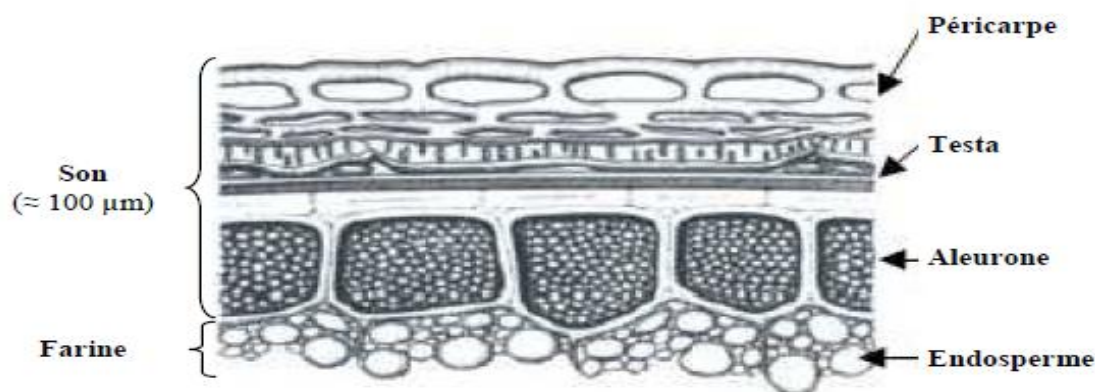


Figure 9 :les différentes couches cellulaires du son de blé constitutives industriel.(*Surjer et al.,2005;Hemery et al .,2009*).

Le péricarpe est riche en fibres insolubles comme la cellulose, en lignine et acide férulique. Le tégument contient principalement des alkylrésorcinols (lipide phénolique). La couche d'aleurone est riche en minéraux et en vitamine B. Elle représente 7% de la masse sèche du grain de blé (*Antoine et al., 2002*).

2.2. Rôle et propriétés

Beaucoup de co-produits issus de l'agriculture remplacent les substrats synthétiques généralement plus onéreux. Parmi ces résidus, le son de blé est un des substrats le plus attractif. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt

biotechnologiques. Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah et al. 1985). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons. Le son de blé contient de la cellulose (13%), l'amidon (15-25%) et du xylane (12,65%) qui induisent une bonne production de cellulases, d'amylases et de xylanases, respectivement. Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des études actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée de son de blé qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol (*Javed et al., 2012*). Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical. Les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du colon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (*Javed et al., 2012*). Il est aussi utilisé comme additif dans l'alimentation humaine pour l'apport de vitamine B. Le son de blé peut aussi être utilisé dans l'alimentation animale. Il a été montré que l'ajout quotidien de son de blé dans l'alimentation des vaches permet d'augmenter la production de lait de 14,65 litres par jour. Cependant, pour être efficace, le son de blé doit être préalablement « déphytisé » car les phytates sont d'importants facteurs antinutritionnels. De part l'abondance mondiale de ce co-produit, ses propriétés et ses nombreuses applications en fermentation mais aussi en médecine, le son de blé est considéré comme « l'or marron » du XXIème siècle (*Javed et al.,2012*).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. réactivation de la souche

La souche utilisée dans ce travail est la moisissure *Aspergillus niger* isolée du sol de Teleghma, fournie par la Doctorante Bramki Amina, Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'université des Frères Mentouri Constantine. La réactivation est effectuée sur milieu PDA (annex1). 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 3 jours.

2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique est mise en évidence selon la méthode décrite par **Reddy et Sreeramulu,(2012)**. Elle est testée sur milieu contenant la pectine comme seule source de carbone (annexe2). Après incubation à 30°C pendant 7jours, les boîtes sont couvertes avec la solution de lugol (annexe3) pendant 15 minutes. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine.

3.production de la polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers en FMS

3.1. 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.

3.2. Préparation de l'inoculum

La récupération des spores est effectuée à partir des cultures d'*Aspergillus niger* sur milieu PDA incubées à 30°C pendant 5 jours, par l'addition de 10 ml d'eau distillée. À l'aide d'une anse de platine stérile, la surface de la gélose est grattée légèrement afin de mettre en suspension les spores.

3.3. Dénombrement des spores

Le nombre de spores est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de Thoma (*Guiraud, 1998*). L'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40.

3.4. Etude de la composition chimique du son de blé

- **Humidité**

La quantité d'eau libre disponible dans un échantillon qui est l'humidité relative, est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique (*Lanouari et al., 2015*). (Il est réalisé par le Laboratoire Agro-div Constantine).

- **Détermination des cendres**

Les cendres totales représentent la partie minérale d'un produit et permettent d'avoir une estimation de l'apport en sels minéraux. Elles sont déterminées par calcination d'un échantillon de poids connu (2 g) dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures . (Il est réalisé par le Laboratoire Agro-div Constantine).

- **Mesure du pH**

Après solubilisation du son de blé dans l'eau distillée, et après agitation et filtration, le pH de la solution est mesuré à l'aide d'un pH mètre.

- **Dosage de la matière grasse**

Le dosage de la matière grasse libre est réalisé par le Laboratoire Agro-div, Constantine.

- **Dosage des sucres réducteurs**

Le dosage des sucres réducteurs est réalisé selon la méthode à l'aide d'acide 3,5 Dénitrosalicilique décrite par *Miller (1959)*. Une prise d'essai de 5g du son de blé est mélangé avec 45ml d'eau distillé, et laissé sous une agitation pendant une heure à 50°C. Laissé décanter pendant 15 minutes. Une filtration est réalisée afin de récupérer le filtrat.

1ml de filtrat additionné de 1ml de DNS (**Annexe 4**), incubé au bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Après, 10 ml d'eau distillé. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en sucres réducteurs est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose.

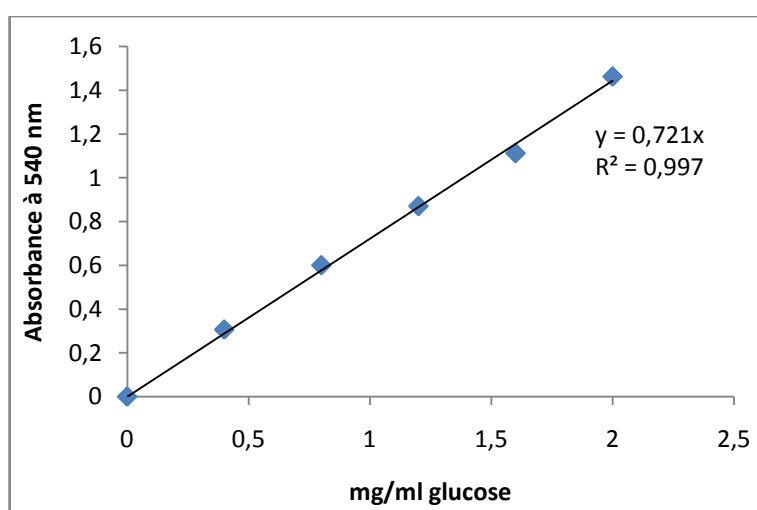


Figure 10 : courbe étalon des sucres réducteurs.

3.5. Fermentations

3.5.1. Préparation des milieux de fermentation

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des Erlen-meyres de 250 ml, 10 g de son de blé sont mis dans chaque Erlen-meyre avec un volume de solution humidifiante qui est l'eau distillée, ensuite ils sont ensemencés avec l'inoculum et homogénéisés à l'aide d'une baguette en verre puis, Les Erlen-meyeres ont été bouchées avec du coton cardé enveloppé avec papier aluminium (qui assure une bonne étanchéité et supporte les hautes températures) (**Kumar et al., 2005**) et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes, après sont incubés à 30°C dans une étuve pendant 3 jours.

Dans notre travail plusieurs testes sont réalisés pour voir l'effet des conditions qui influencent sur la production de la PGase :

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

3.5.2. L'extraction

Après fermentation, une quantité connue (5 g) de substrat fermenté mélangée avec 50 ml de solution de Tween 80 (0,02%). Le mélange est mixé pendant 3 minutes et centrifugé à 4500 tours/min à 4°C pendant 20 minutes (**Demir et Tari, 2014**). Le filtrat obtenu constitue l'extrait enzymatique brut, il est conservé au congélateur pour les études analytiques ultérieures.

3.5.3. Méthodes analytiques

➤ Dosage de l'activité enzymatique

Le dosage est réalisé selon la méthode de **Miller (1959)**. Un volume de 100 µl de l'extrait enzymatique récupéré après la centrifugation est mélangé avec 100 µl de substrat (tampon Acétate de sodium). Le mélange est incubé au bain marie à 40°C pendant 30 minutes après, ajouter 400 µl de DNS (annexe 6), le mélange est ainsi incubé à nouveau à 100°C pendant 15 minutes, puis 4.4 ml d'eau désilé sont ajouter. L'activité enzymatique est la quantité d'enzyme

dans 1 ml qui libèrerait des sucres réducteurs, équivalent à 1 mg d'acide galacturonique. La teneur en acide galacturonique est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, réalisé dans les mêmes conditions opératoires (Annexe7). L'absorbance est mesuré à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

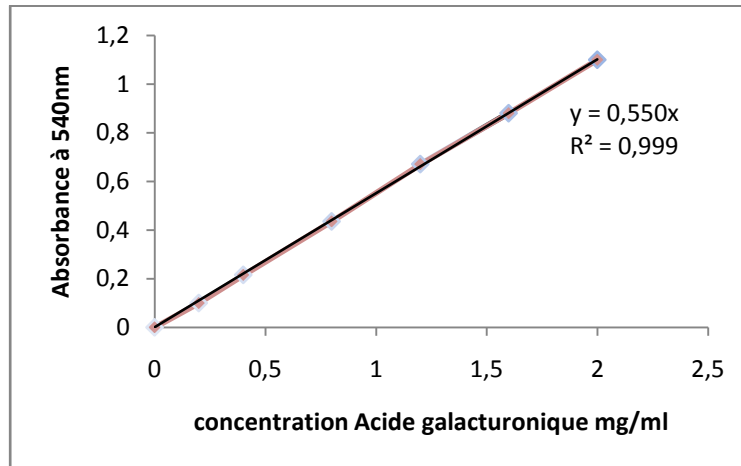


Figure11 : courbe étalon d'acide galacturonique.

➤ Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de *Lowry et al.,(1951)* qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques: La réaction de Biuret dans laquelle Cu^{2+} , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond et la chimie de Folin-Ciocalteu dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleue (Annexe 5), La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine (BSA) à des concentrations de 0 à 500 $\mu\text{g/ml}$

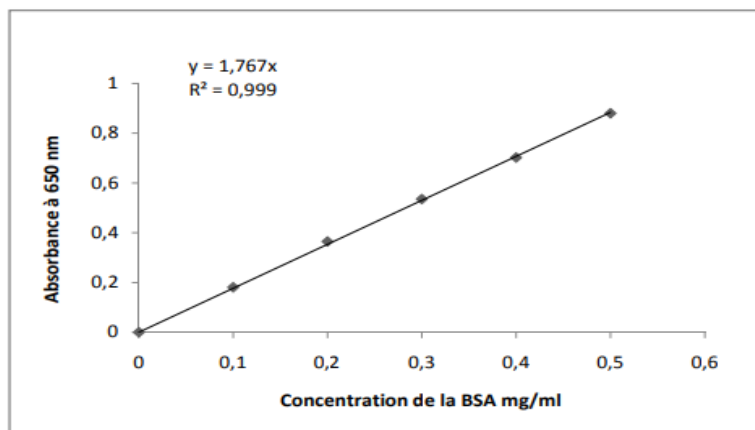


Figure 12: Courbe étalon pour le dosage des protéines.

Chapitre 3

Résultats et discussions

1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique par la souche *Aspergillus niger*

Le résultat du test de la mise en évidence de l'activité pectinolytique, réalisé en boîte de pétri sur un milieu solide à base de pectine, est représenté dans la figure suivante :

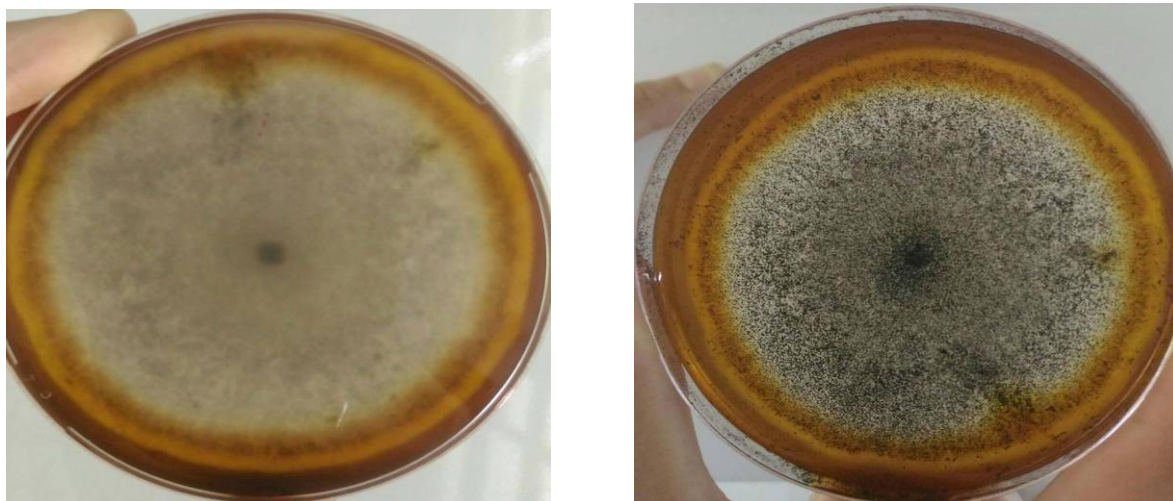


Figure13: Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire chez la moisissure *Aspergillus niger*.

La moisissure *Aspergillus niger* s'est bien développée sur le milieu contenant de la pectine comme seule source de carbone. Cela démontre sa capacité à produire des pectinases. Une zone d'hydrolyse claire est visible dans la figure (13). Ce résultat met en évidence la dégradation de la pectine contenue dans ce milieu.

2. Etude de la composition chimique du son de blé

Le son de blé est utilisé comme substrat de fermentation pour la production de la PGase par fermentation solide. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau ci-dessous :

| Paramètres physico-chimiques | % |
|------------------------------|-------|
| Humidité | 11,50 |
| Cendres | 4,58 |
| Matière grasse | 3,16 |
| Protéines | 19,30 |
| Sucres réducteurs | 5,1 |
| PH | 6,45 |

Tableau 8 : la composition chimique du son de blé.

Il ressort du tableau 8 que le son de blé est riche en matière minérale à hauteur de 4,58%. En protéines à 19.30%, en matière grasse à 3,16% et en sucres réducteurs à 5,1%.

Le taux d'humidité qui est en moyenne de 11,50%, cette valeur est insuffisante pour la croissance de la moisissure et la production d'enzymes. A cet effet, l'humidification de ce substrat est importante pour la fermentation en milieu solide.

La teneur en cendres de 4,58 % est inférieure à celle obtenue par *Bakhella (2005)* :7,5% et à celle obtenue par *Belderock (2000)*: 7,2% . Celle-ci révèle une forte variabilité du potentiel minéral du son de blé; ce qui est due aux conditions environnementales (*Mac Master et al.,1986*) et aux conditions d'extraction (*Mac Master et al.,1978*). En effet, les cendres par leur contenu en minéraux sont nécessaires à toute culture microbienne.

La teneur en matière grasse de 3,16 % est relativement faible par rapport à celle trouvée par *Nelson et al (1963)* qui indique une moyenne de 4% et à celle obtenue par *Belderock , (2000)* de 5%. Selon (*Chasseray, 1991*). Ces différences peuvent être liées à de nombreux facteurs qui se rapportent essentiellement à la variabilité de la composition chimique des grains de blé et au génotype du grain (*Triboi ,1990*).

Le taux en protéines de 19.30% est en accord avec les résultats de *Belderock (2000)* qui indique 20% . Selon *Rhodes et Stones (2002)* les protéines présentent 10 à 20% de la matière sèche du son de blé. Le taux élevé en protéines est étroitement lié à la présence d'endosperme adhérent à la couche d'aleurone (*Kent,1966*) et à la variété du grain de blé (*Peterson et al .,1983*).

D'après les études réalisées par *Saunders et al., (1970)*, la concentration en sucres réducteurs varie entre 4 et 15%, alors qu'elle se situe entre 4,5 et 7% selon *Farell et al.,(1967)*. La valeur de 5,1% obtenue dans la présente étude, montre que le son de blé de la région de Constantine est riche en sucres. Ce qui justifie la possibilité de son utilisation comme substrat carboné pour la production de la PGase.

La valeur du pH de notre échantillon est de 6,45. Cette valeur est située dans la gamme de pH d'après les études réalisées par *Kumar et al., (2011)* et *Jin-lan et al., (2009)*. Les auteurs ont trouvé que le pH favorable pour une production maximale de pectinases par *Aspergillus niger* varie entre 3 et 7, avec un optimum de 5.

L'aptitude de conservation des aliments est déterminée par le pH. Il constitue un obstacle auquel les microorganismes doivent se confronter pour assurer leurs proliférations. Un pH de 3 à 6 est très favorable et assure le bon développement de certains microorganismes tels que : les moisissures et les levures (**Doukani et Tabak, 2015**).

3.L'influence des différents paramètres sur la production de la PGase par *Aspergillus niger*

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

3.1. L'effet de l'humidité

Les résultats de la production de la PGase en fonction du taux d'humidité sont présentés dans la Figure suivante

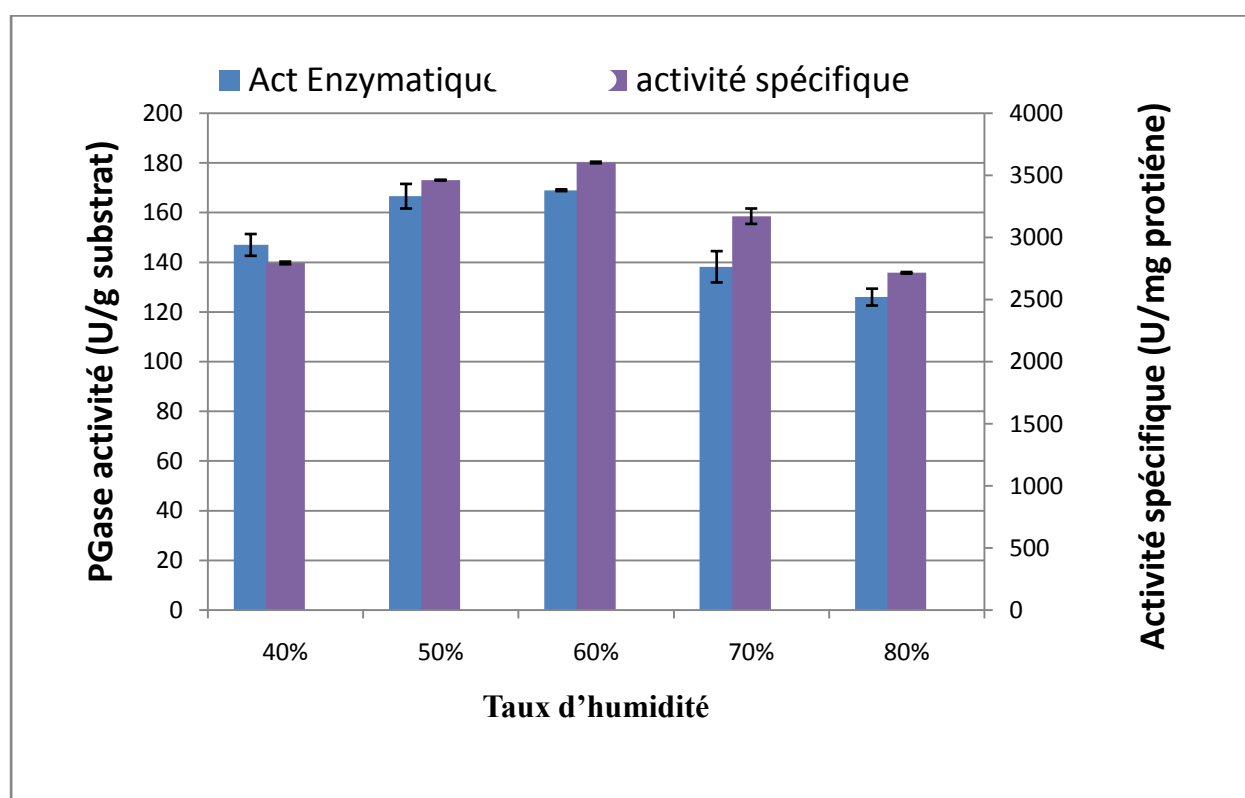


Figure14 : Effet du taux d'humidité sur la production PGase.

Selon *Blandino et al., (2002); Castilho et al., (2000); Freitas et al., (2006)* , les valeurs initiales de teneur en humidité variaient de 40 à 70% pour la production de pectinases à partir de divers substrats solides en utilisant différentes souches fongiques.

Les résultats montrent que le taux optimal d'humidité est de 60% avec une activité maximale de la PGase de 3603,4 U/mg .Cela correspondant aux résultats de *Heidar abbasi et al.,(2011)* qui ont trouvé un taux de 60%

Ces résultats sont similaires aussi à ceux obtenus par *Demir et Tari ,(2015)* qui indiquent un taux de 62% .

Un niveau d'humidité plus élevée que 60% induit une diminution de l'activité PGase (2715,5U/mg à 168h). Des teneurs en humidité élevées peuvent provoquer une diminution de la porosité. Ce qui interfère avec le transfert de l'oxygène ainsi que la perte de la structure des

particules et la réduction du volume de gaz. De plus, elles diminuent les échanges gazeux et augmentent la formation du mycélium aérien (*Sandhya et al., 2005b; Murthy et Naidy, 2010*).

L'humidité initiale du milieu est un facteur critique en SSF. Car c'est elle qui détermine la croissance microbienne et le rendement en produit *Gervais et Molin, (2003)*.

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

Les résultats des expériences des concentration sur l'activité PGase sont représentés dans la figure suivante :

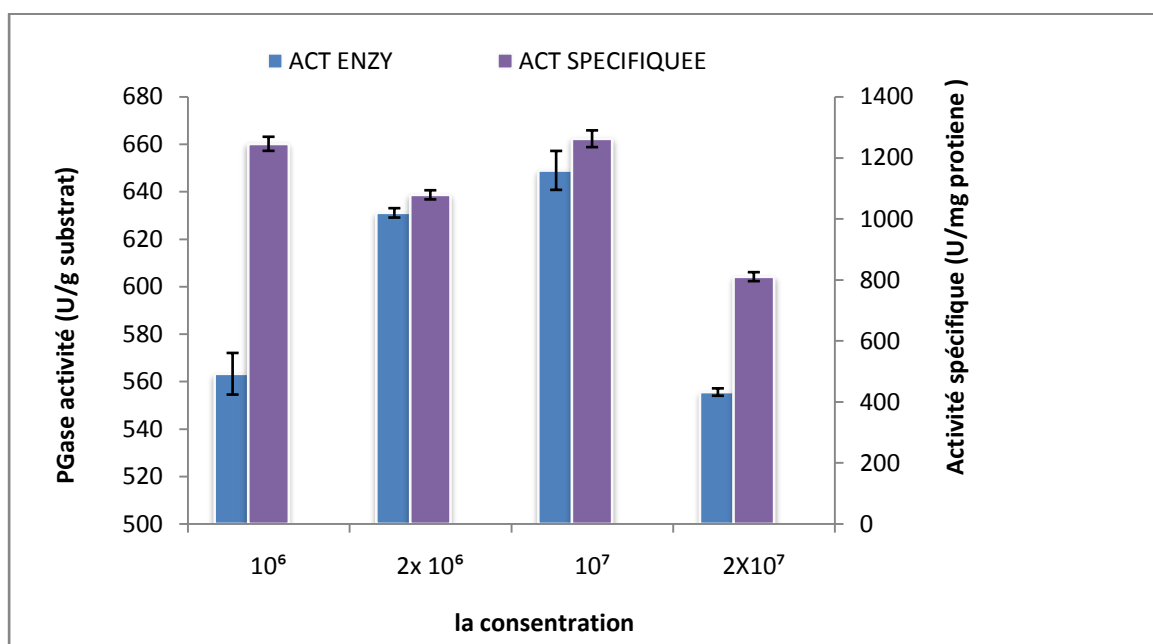


Figure15 : Effet de concentration d'inoculum sur activité PGase.

Les résultats montrent que la production optimale de la PGase de 1262,6U/ mg est obtenue avec une concentration de 10^7 spores/g.

Cette concentration d'inoculum est la même trouvée par *Heidar Abbasi et al.,2011* et *Demir et Tari, 2014* qui montrent qu'une concentration de 10^7 spores / g est suffisante pour la croissance et la production de la PGase d '*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus sojae* respectivement.

D'après les résultats obtenus l'activité enzymatique et l'activité spécifique de la PGase diminuent avec d' autres concentrations d'inoculum (10^6 , 2×10^6 , 2×10^7). Car, un excès de spores peut inhiber la germination.

La concentration d'inoculum est un facteur qui joue un rôle important dans la production de la PGase.

3.3. L' Effet de la période d'incubation

Les résultats de l'influence du temps d'incubation sur la production de la PGase *d'Aspergillus niger* sont consignés dans la figure suivante :

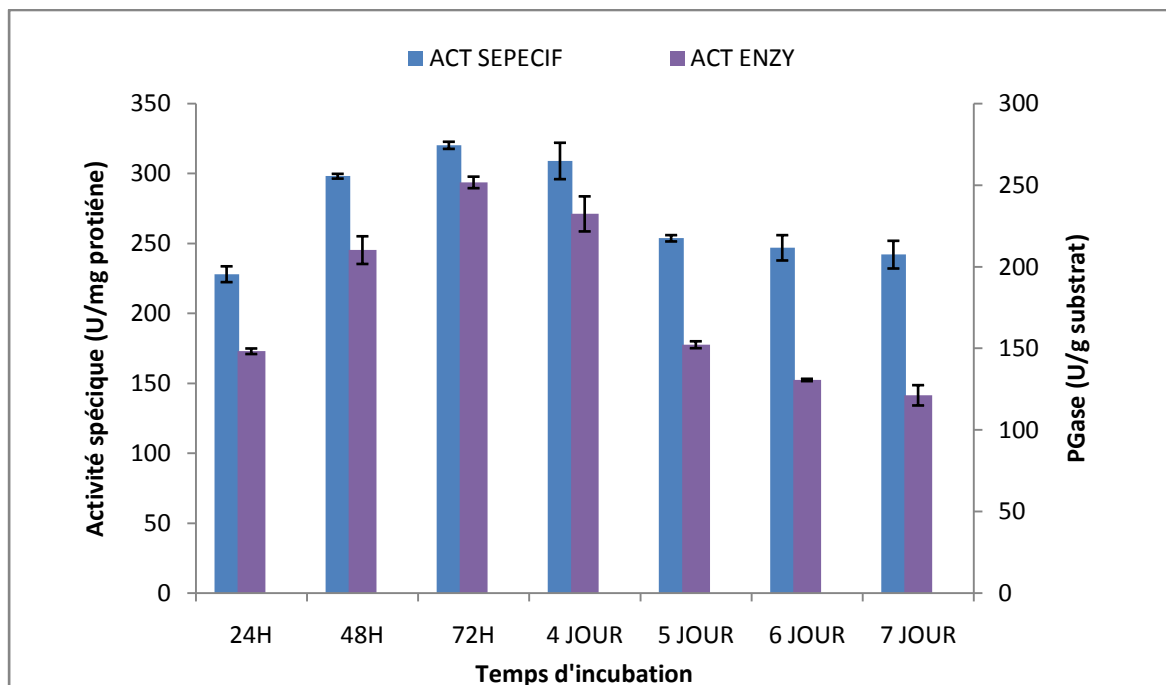


Figure16 : Effet de la période d'incubation sur l'activité de PGase.

En remarque que l'activité spécifique de la PGase augmente et atteint sa valeur maximale de 320,3u/mg au bout de 72h de fermentation. Ces résultats corroborent ceux de *Nicemol et al.,(2006)* et *Adriana et al.,(2002)* et *Hours et al.,(1988)* qui montrent que la production maximale de la PGase des moisissures est obtenue après 72h d'incubation . Cependant , *Martin et al.; (2004); Demir, Tari ,(2015)* indiquent que la production maximal de la PGase est obtenue après 96h d'incubation par la moisissure *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* respectivement.

Par ailleurs, on note une diminution de l'activité spécifique de la PGase qui atteint la valeur de 242,1U/mg après 168h de fermentation. Selon *Akhter et al., (2011)* ; *Singh et Mandal (2012); Suman et Raju, (2017)* la durée d'incubation est un facteur important dans la production de métabolites. Ils démontrent aussi que le déclin de cette production après la prolongation du temps d'incubation serait dû à l'épuisement du milieu de fermentation en nutriments.

3.4. L'effet de la température

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité pectinolytique d'*Aspergillus niger* sont donnés dans la figure suivante:

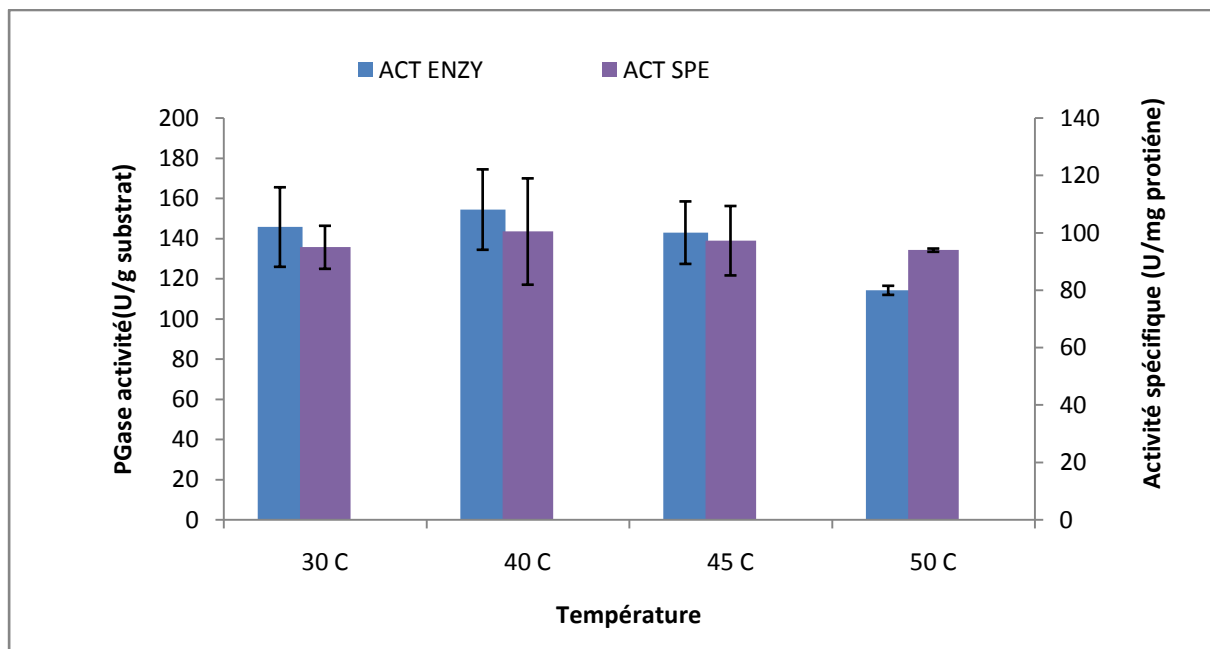


Figure17 : Effet de la température sur l'activité de PGase.

Selon ces résultats, l'activité de la PGase maximale est obtenue à 40°C avec une activité spécifique de 100,5 U/mg.

Le résultat obtenu est largement supérieur à celui trouvé par *Nayyar et al.,(2017); Demir et Tari, (2015)* qui montrent une activité maximale de la PGase d'*Aspergillus niger* à 35°C et *Aspergillus sojae* à 37°C.

D'autres auteurs rapportent une température optimale de 50°C et 55°C pour la production de la PGase par l'*Aspergillus niger* (*Esquivel et Voget, 2004 ; Dey et al., 2014; Mukesh Kumar et al., 2017*).

En effet, (*Pedrolli et al., 2009 ; Nair et Panda, 1997; Solis-Pereira et al., 1993*). la température optimale de la production de pectinases par l'*Aspergillus niger* varient entre 20°C et 40°C.

La variation de la température optimale dépend, d'une part de l'espèce, et d'autre part de la niche écologique dans laquelle le micro-organisme vit.

La région de Thelaghma où la souche a été isolé est une région chaude ce qui explique la croissance et la production optimale de la PGase à 40°C.

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de cette étude est la détermination des conditions qui influencent la production de la PGase par une souche d'*Aspergillus niger*.

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

L'étude de la composition du son de blé a révélé sa richesse en sucres réducteurs (5,1%), en matière minérale (4,58%) et une teneur importante en protéines (19,30 %). De ce fait, il est considéré comme milieu favorable pour la croissance et la production de PGase.

L'utilisation d'un taux d'humidité de 60% donne la meilleure production en enzyme avec une activité spécifique de 3600,34 U/mg.

Un taux d'inoculum de 10^7 spores/ml s'avère la meilleure concentration avec une activité spécifique de 1260,26 U/mg.

Une période de 72h et une température de 40°C permettent une meilleure production en PGase avec une activité spécifique de 309,1 U/mg et de 100,5 U/mg respectivement.

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

- l'étude de l'effet des autres paramètres: comme le pH.
- L'optimisation des paramètres de production de la PGase.
- la purification de l'enzyme produite et la détermination de son poids moléculaire.
- L'emploi d'autres déchets agro-alimentaires tels que les déchets de tomates, de pomme de terre, etc.

Références bibliographiques

Référence bibliographique

Abarca L.M., Francesc A., Jose C. et Cabanes J.F. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilla. Antonie van Leeuwenhoek Kluwer. Academic Publisher. 86: 33-49.

Acuna-Arguelles M.E., Gutierrez-Rajas M., Viniegra-Gonzalez G., Favela-Toress E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A. niger* in submerged and solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 43(5): 808-814.

Abdullah, A. L. et al. (1985). "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." Biotechnology and Bioengineering 27(1): 20-27.

AFNOR. (Agence Française de Normalisation). (1991). Contrôle de la Qualité des Produits Alimentaires. Recueil des Normes Françaises, 3e Ed., Paris, France, pp.360

Aftab A., Singh A. et Ward O.P. (2007). Chymostatin can combine with pepstatin to eliminate extracellular protease activity in cultures of *Aspergillus niger* NRRL-3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34: 165-169.

Akhter N., Morshed M.A., Uddin A., Begum F., Sultan T. et Azad A.K. (2011). Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state fermentation. International Journal of Biosciences. 1(1): 33-42.

Alana A., Llama M., Serra J.L. (1991). Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium*. FEBS Letters. 280: 335–350.

Albagnac G., Varoquaux P., Montigaud J.C. (2002). Technologies de transformation des fruits. Paris, Lavoisier: pp.498.

- Alexopoulos C.J. et Mims C.W. (1979).** Subdivision zygomycotina. En *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons. New York. 191-228.
- Al-Mussalam A. (1980).** Revision of the black *Aspergillus* species. PhD Thesis. Rijks universiteit. Utrecht.
- Anastas, P.T., Warner, J.c. (1998)** "Green Chemistry, Theory and practice" Oxford, UK, Oxford University Press.
- Amid M., Manap Y., Zohdi K. (2014).** Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *European Food Research and Technology*. 239:21–29.
- Antoine, C., et al. (2002).** "Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer." *Sciences des Aliments* **22**: 545-556.
- Armand, S., Wagemaker, M.J., Sanchez-Torres, P., Kester, H.C.M, van Santen, Y.,Dijkstra, B.W., Visser, J., Benen, J.A.E. (2000)** "The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 275(1) : 691-696.
- ASSAMOI, Allah (2009).** Antoine, DESTAIN, Jacqueline, THONART, Philippe. Aspect microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* [en ligne], , vol. 13, n^o2, p. 281-294.
- Bakhtiari M.R., Faezi M.G., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N. et Amidi Z. (2006).** Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011. *Process Biochemistry*. 41: 547-551.
- Baracat-Pereira M.C., Vanetti M.C.D., Araujo E.F.D., Silva D.O. (1993).** Partial characterization of *Aspergillus fumigates* polygalacturonases for the degumming of natural fibers. *Journal of Industrial Microbiology*. 11:139–142.

BARON, et THIBAUT, J.F. (1985). Les enzymes pectinolytiques. Dans: Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel. Mouranche A., Costes C., pp : 143-164, Gauthier-Villars.

Basset A., Khush R.S., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann J.A., Lemaitre B.(2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97:3376-81.

BENEN, J.A.E., KESTER, H. and VISSER, J. (1999). Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry*, **259**, 577-585.

Bekhouche F., Bonnin E., Boulahrouf A., Levaux J.Y. (2006). Production d'enzyme polygalacturonase par des souches microbiennes isolées du lait cru et des olives noires et vertes. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 658- 663.

Bensmail S., Mechakra A. et Fethia-Fazouane N. (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus Niger* FFB1 in solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 4(5): 467-472.

Bhatnagar D., Imelda J. et Paul-Raj R. (2010). Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp. *Indian. J. Fish*. 57(1): 45-51.

Bijay K.S., Pravita K.N., Santilata S.(2016). Improvement of pectinase production by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. 6 (1): 36.

Bussink, H.J., Brouwer, K.B., de Graaff, L.H., Kester, H.C.M., Visser, J. (1991)"Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillusniger*." *Curr Genet* 20(4) : 301-307.

Blanco P., Sieiro C., Dtaz A., Villa T.G. (1997). Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 711-712.

Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F. et Villard J. (2005). Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée. 2ème Ed MASSON. Paris.191.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. 2ème édition. Masson. Paris. 16,41,110,183,364.

Bocquet J. (1993). Généralités sur les microorganismes en biotechnologie. Tech et Doc. Lavoisier. Paris.

Buzzini P., Martini A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeastlike strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 1020–1025.

Caffall K. H. and Mohnen D. (2009)The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*,.344(14): p. 1879–1900.

Chellegatti MASC, Fonseca MJV, Said S.(2002) Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiol Res*; 157: 19-24.

Charitha Devi M., Kumar S. et Reese E.T. (2012). Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus Niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. 2(1): 120-128

Claudia M., Mads H.C., Jure S., Doriano L., Cristiana C.(2007). Study of the mode of action of a polygalacturonase of the phytopathogen *Burkholderia cepacia*. 407 (Pt2): 207-21

.Contreas-Esquivel JC, Voget CE.(2004).Purification and partial characterization of na acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii*. J Biotechnol 2004; 110: 21-8.

Coutinho PM, Henrissat B(1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B. Eds. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 3-12.

De-Castro R.J.S., Nishide T.G. et Sato H.H. (2014). Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 3(4): 236- 245.

De-Castro R.J.S., Nishide T.G. et Soares M.H. (2016). Biochemical characterization of solvent, salt, surfactant and oxidizing agent tolerant proteases from *Aspergillus Niger* produced in different agroindustrial wastes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 5: 94-98.

Demir H., Tari C. (2016). Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. Journal of Science of Food and Agriculture. 96: 3575-3582.

Dijksterhuis J. et Wösten H. (2013). Development of *Aspergillus niger*. Studies in Mycology. 74: 8-23.

Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z. et Bennamoun L. (2006).Application of statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. Journal of Food Engineering. 73: 190-197.

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. Journal of biotechnology, 131(2), 128-137.

- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350 – 356.
- Francis, COPINET, Estelle.(2011)** Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur* [en ligne]. 10 mai. Référence BIO620.
- Dursun A.Y. (2003).** The effect of pH on the equilibrium of heavy metal biosorption by *Aspergillus niger*. *Fres. Environ. Bull.* 12: 1315-1322.
- Durand A.,(1983).** Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de micro-organismes filamenteux. Les antagonismes microbiens. 24ème colloque SFP. Ed. INRA Pub.
- DURAND, Alain.(1998)** La fermentation en milieu solide. *Biofutur* [en ligne], septembre, n°181, p. 41-43.
- Edens L., Dekker P., Hoeven R.V.D., Deen F., Roos A.D. et Floris R. (2005).** Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus Niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20): 7950-7957.
- Eleni G., Rodrigo S.R.L., Roberto S., Denis S.(2009).** Purification of an Exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 Produced in Submerged Fermentation
- Fedecici F. (1985).** Production purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 51: 139-150.
- Fogarty M.V., Kelly C.T. (1983).** Pectic enzymes. In: Fogarty M.W. (ed), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science, London, pp. 131–182.
- Gadre RV, Driessche GV, Beeumen JV, Bhat MK.(2003)** Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. *Enzyme Microb Technol*; 32: 321-30.

Gautam A., Sangeeta Y., Dinesh Y.(2017). Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. 7(2): 122.

Gervais P. & Benssousan M., (1994). Solid-state fermentation of the genus *Aspergillus*. Plenum. Press, New Y.

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

Henrissat, B. (1991) "A classification of glycosyl hydrolases based on amine acid sequence similarities." Biochem J 280 (pt 2) : 309-316.

Hesseltine C.W.(1972). Solid-state Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 14 : 517-532.

HOLKER, Udo, LENZ, Jürgen..(2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* [en ligne], juin 2005, vol. 8, n°3, p. 301-306.

Heitman J., Kronstad J.W., John T.W. et Casselton L.A. (2007). Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. Ed ASM Press « American Society for Microbiology ». USA. 542.

HODGSON, A.S. and KERR, L.H. (1991) Tropical fruit products. In: The Chemistry and Technology of Pectin. Walter R. H., Eds. Academic Press, New York, 67 p.

Hölker U., Höfer M. et Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology.* 64: 175-186.

Huang, J.H., Schell, M.A. (1990) "DNA sequence analysis of pglA and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas so/anacearum*." J Bacteriol 172(7) : 3879-3887.

Irfan M., Nadeem M. et Syed Q. (2012). Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 10(1): 55-64.

Iwashita K. (2002). Recent studies of protein secretion by filamentous fungi-review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 530-535.

Jacob N, Poorna AC, Prema P.(2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour Technol*; 99: 6697-701.

Jarai G. et Buxton F. (1994). Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*. 26: 238-244.

Jaubert S., Laffaire J.B., Abad P., Rosso M.N. (2002). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 522: 109–112.

Javed, M. M. et al. (2012). "Wheat Bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications." *African Journal of Microbiology Research* 6(4): 724-733.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R.(2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem* ;40: 2931-44.

Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 40: 2931–2944.

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

KARR, A.L. (1976). Cell wall biogenesis. In: *Plant Biochemistry*. Bonner, J., Varner, J.E., Eds. Academic Press, New York. 405 p.

Kashyap DR, Vohra PK, Tewari R.(2001). Application of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol*; 77: 215-27.

KHAN, N.Q., ALBRECHT, H., RUTTKOWSKI, E., LOFFLER, F., GOTTSCHALK, M. and JANY, K. D. (1990). Nucleotide and derived amino acid sequence of apectinesterase cDNA isolated from *Aspergillus niger* strain RH5344. *Nucleic Acids Research*. **18**, 4262 p.

Kim W. J., Rao V. N. M. and Smit C. J. B. (1978). Effect of chemical composition on compressive mechanical properties of low ester pectin gels. *Journal of Food Science*, 43(2): p. 572–575.

Kobayashi T, Higaki N, Yajima N, et al.(2001) Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolysaccharidase from a strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem*; 65(4): 842-7.

KÖRNER, R., LIMBERG, G., CHRISTENSEN, T.M.I.E., MIKKELSEN, J.D. and ROEPSTORFF, P. (1999). Sequencing of partially methyl-esterified oligogalacturonates by tandem mass spectrometry and its use to determine pectinase specificities. *Analytical Chemistry*. **71**, pp: 1421-1427.

KRISHNA, Chundakkadu.(2005) Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* [en ligne], 2005, vol. 25, n°1-2, p. 1-30.

Kumar, P., & Suneetha, V.(2014). Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme. *Int. J. Drug Dev. Res*, (2014);6, 109-118.

Lanouari, S., Nasser, B., El Haddoury, J., & Bencharki, B.(2015) Caractérisation physico-chimique des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*) sous traitement herbicide par l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique [Physico-chemical characterization of the seeds of bread wheat (*Triticum aestivum*) under herbicide treatment with 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*; 10(2), 604.

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.

Lonsane B. K., Ghildyal N. P., Budiartman S. & Ramakrishna S. V., 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technoogy*, 7 : 258.

Lopes F.C., Silva L.A.D., Tichota D.M., Daroit D.J., Velho R.V., Pereira J.Q., Corr ea A.P.F. et Brandelli A. (2011). Production of proteolytic enzymes by a keratin degrading *Aspergillus Niger*. *Enzyme Research*. 3(4): 405-415.

Manachini P.L., Parini C., Fortina M.G. (1988). Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 682-685.

Manachini P.L., Fortina M.G., Parini C. (1987). Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. 9: 219-224.

Manas R.S., Shaktimay K., Ramesh R.(2009). Production of exo-polygalacturonase by *Bacillus subtilis* CM5 in solid state fermentation with cassava bagasse. 40 (3): 636-648.

Markovic, O., Janecek, S. (2001) "Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28:sequence-structural features, specificities and evolution." *Protein Eng* 14(9) : 615-631.

Membre J.M., Burlot P.M. (1994). Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2017–2022.

MANPREET, S., SAWRAJ, S., SACHIN, D., PANKAJ, S., BANERJEE, U.C.(2005)..Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology* [en ligne], 2005, vol. 1, n 2, p. 1-9.

- Merve K., Antonio G . Sousa., Marie J.C., Susanne O. Sørensen. , Marie .C.R.(2014).** Characterization of citrus pectin samples extracted under different condition influence of acid type and pH of extraction. 114: 1319–1326.
- Mhetras N.C., Bastawde K.B. et Gokhale D.V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. Bioresource Technology. 100: 1486-1490.
- Miller, G. L.(1959).** Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 31 426-428.
- Mohnen D.(2008).** Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*,. 11(3): p. 266-277.
- Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses. Biologie. Techniques Encyl. Med. Chir. Elsevier, Paris. Maladies infectieuses. 8-10.
- Moshrefi M., Luh B.S. (1984).** Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. Journal of Food Biochemistry. 8:39–54.
- Mukhtar H. et Ul-Haq I. (2009).** Production of acid protease by *Aspergillus Niger* using Solid State fermentation. Pakistan. J. Zool. 41(4): 253-260.
- Niture SK, Pant A.(2004).** Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid médium by a strain of *Fusarium moliniforme*. Microbial Res 159: 305-14.
- Ohara A., De-Castro R.J.S., Nishide T.G., Dias F.F.G., Bagagli M.P. et Sato H.H. (2015).** Invertase production by *Aspergillus Niger* under solid state fermentation: Focus on physicalchemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 4(4): 645-652.
- Oludumila O.R., Abu-Temitope F.A., Enujiugha V.N. et Sanni D.M. (2015).** Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus Niger* isolated from yam peels. International journal of nutrition and food Sciences. 4(2): 125-131.

Pandey A., (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27 (2) : 109-117. -265.

Pandey A. & Soccol C. R.,(2000). Economic utilization of crop residues for value addition. A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, 59 : 12-22.

PANDEY, Asho.k.(2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* [en ligne], mars, vol. 13, n°2-3, p. 81-84.

pagès, S., Heijne,W.H.M, Kester, H.C.M, Visser, J., Benen, J.A.E. (2000) "Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 275(38) : 29348-29353.

Paranthman R., Alagusundaram K. et Indhumathi J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus Niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(3): 308-312.

PARENICOVA, L., BENEN, J.A.E., KESTER, H.C.M. and VISSER, J. (2000a). pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal*. **345**, 637-644.

Pasqualotto A. C. (2010). Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science and Business Media. New York. 1027.

Pathak N., Sanwal G.G. (1998). Multiple forms of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*. 54: 147-52.

Pedrolli DB.(2008). Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus*. M.Sc. Thesis, São Paulo State University 2008, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

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

Pitt J.I. (1989). Recent developpement in the study in the *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. J. App. Bact. Symp. Supplement. 35-45.

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

Raimbault M., (1980). Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291p. *ork*, 17 : 101-133.

Rao, M.N., Kembhavi, A.A., Pant, A. (1996) "Implication of tryptophan and histidine in the active site of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus*. elucidation of the reaction mechanism." *Biochim Biophys Acta* 1296(2) : 167-173.

Raper K.B. et Fennel D.I. (1977). The Genus *Aspergillus*. Krieger Malabar. Florida. 686.

Rohit K.C., Sudipta K.M., Purushotham B. et Kumara S.M. (2013). Isolation, production and characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus Niger* K3. *International Journal of pharma and Bio Sciences*. 4(4): 667-675.

Roussos S., (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulase. Thèse d'Etat, Université de Provence, Marseille. 193p.

Reddy, P. L. and A. Sreeramulu ."(2012)Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district." *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(3): 1-10.

RENARD, C.M.G.C. and THIBAUT, J.F. (1993). Structure and properties of apple and sugar beet pectins extracted by chelating agent. *Carbohydrate Research*, **244**, pp: 99-114.

RENARD, C.M.G.C. and JAVIS, M.C. (1999). Acetylation and methylation of homogalacturonans. I: optimisation of the reaction and characterization of the products. *Carbohydrate Polymers*,**39**, pp: 201-207.

REXOVÀ-BENKOVÀ, L. and MARKOVIC, O. (1976). Pectic enzymes. *Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **33**, pp: 323-385.

Ridley B. L., O'Neill M. A. and Mohnen D.(2001) Pectins structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*(6): p. 929– 967.

Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Sturm, W., &Soccol, C.(2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, *102*(22), 10657-10662.

Rolin C.(1993) Pectin. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*, Ed: James N. BeMiller,**andRoy L. Whistler. Elsevier Inc.,. p.257–293.**

Roukas T. (2000). Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *J. Microbiol Biotechnol.* *25*: 298-304.

Rutkowski, E., Labitzke, R., Khanh, N.Q., Loffler, F., Gottschalk, M., Jany, K.D. (1990) "Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *AspergillusnigerRH5344*." *Biochim Biophys Acta* *1087*(1) : 104-106.

Saito K, Takakuwa N, Oda Y.(2004). Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbial Res* 2004; *159*: 83-6.

Samson R.A. et Varga J. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology.* *59*: 71-73.

Saxena, S., Shukla, S., Thakur, A., & Gupta, R.(2008).. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*,;*55*(1) :33-51.

Schols H.A., Voragen A.G.J. (2002). The chemical structure of pectins. In: Seymour G.B., Knox J.P. (eds), *Pectins and their manipulation*. Blackwell publishing, Oxford, UK, pp.1–29.

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

Simpson B. K., Egyankor K. B. and Martin A. M.(1984).. Extraction, purification and determination of pectin in tropical fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, **1984**. 8(2): p. 63–72.

Seoane, G. (2003) "Biocatalysis. Conférence, PASI on Green Chemistry, Montevideo, Uruguay. Juillet 2003"

Shen Z., Denton M., Mutti N., Pappan K., Kanost M., Reese J., Reeck G. (2003). Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*.3: 1–9.

Singh P., Dwivedi U.N. (2008). Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit. *Food Chemistry*.111: 345–349.

Sinitsyna OA, Fedorova EA, Semenova MV, et al.(2007). Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochem (Moscow)* 2007; 72(5): 565-71.

Stratilova, E., Dzurova, M., Markovic, O., Jornvall, H. (1996) "An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase." *FEBS Lett* 382(1-2) : 164-166.

Stratilova, E., Markovic, O., Skrovinova, O., Rexova-Benkova, L., Jornvall, H. (1993) "Pectinase *Aspergillus* sp. polygalacturonase: multiplicity, divergence, and structural patterns linking fungal, bacterial, and plant polygalacturonases." *J Protein Chem* 12(1) :15-22.

Sughanti R., Benazir J.F., Santhi R., Ramesh Kumar V., Anjana H., Nitya M., Nidhiya K.A., Kavitha G. et Lakshmi R. (2011). Amylase production by *Aspergillus Niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International journal of Engineering Science and Technology*. 3(2): 1756-1763.

Sughanti R., Anjana H., Arumugam B., Arungopal M., Ramesh Kumar V. et Benazir J.F. (2012). *Aspergillus Niger*-A potential enzyme producer on cost effective agroindustrial wastes. *Research Journal of Biotechnology*. 7(1): 25-32.

SUTHERLAND, J.W. (1995). Polysaccharides lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16,pp: 223-347.

Tabuc C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse.

Tapre, A. R., Jain, 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 *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172

Thakur B. R., Singh R. K. and Handa A. K(1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*., 37(1): p. 47-73.

Tho I., Sande S. A. and Kleinebudde P.(2003).. Disintegrating pellets from a water-insoluble pectin derivative produced by extrusion/spheronisation. *European Journal of Pharmaceuticsand Biopharmaceutics*., 56(3): p. 371–380.

Tobechukwu C.E., Sabinus O.O.E., Chukwunonso A.N. et Ferdinand C.C. (2014). Production of pectinases from *Aspergillus Niger* using submerged fermentation with orange peels as carbon source. *International Journal of Microbiology Research*. 58(8): 434-440.

Van Alebeek GJWM, Christensen TMIE, Schols HE, Mikkelsen JD, Voragen AGJ.(2002). Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem*; 277(29): 25929-36.

van Santen, Y., Benen, J.A.E, Schroter, K.-H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, B.W. (1999) "1.68 Å 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., Juhasz A., Kevi F. et Kozakiewicz Z. (2004). Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 627-640.

Voragen, A.G.J.; Pilnik, W.; Thibault, J.-F.; Axelos, M.A.V.; Renard, C.M.G.C.(1995). Pectins. In *Food Polysaccharides and their Applications*, Marcel Dekker Inc.: New York, , pp 287-339.

Wakabayashi K., Huber D.J. (2001). Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Physiologia Plantarum*. 113: 210– 6.

Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J. et Sing A. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.

Willats WGT, Knox P, Mikkelsen JD.(2006).. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17: p 97-104.

Yapo B. M.(2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 2011. 86(2): p. 373–385.

Yashodar B .,Martin B.(2014). Polygalacturonases végétales impliquées dans l'élongation cellulaire et la séparation - la même mais différente?, 3 (4): 613-623.

Yoder, M.D., Jurnak, F. (1995) "Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds." *Faseb J* 9(5) : 335-342.

Zeni, J., Pili, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H., & Valduga, E.
Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering*, (2015); 38(12), 2497-2502.

Annexes

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: Milieu Pectine-agar

- Pectine.....5g
- YMB.....3,53g
- Agar2g
- Eau distillée.....100ml
- stérilisation à 110°C pendant 30 minutes

Annexe 3: Eau iodée (lugol)

- Iode.....0,30g
- Iodure de potassium.....1,51g
- Eau distillé.....100ml

-dissoudre 1,51g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 0,30g d'iode, ensuite compléter à 100ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

Annexe 4 : Dosage des sucres réducteurs

➤ 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.

➤ Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère (0,1g glucose / 50ml d'eau distillé) en utilisant de la DNS le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant:

| | | | | | | |
|----------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2 |
| Volume SM (ul) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Eau distillée (ul) | 1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 |
| DNS ul | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Incubation pendant 10minute après le refroidissement | | | | | |
| L'eau distillée (ml) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Ab 540nm | 0 | 0,306 | 0,600 | 0,870 | 1,112 | 1,462 |

Tableau 9: Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose

Annexe 5: Dosage des protéines

Le dosage est effectué selon la méthode de Lowry, (1951).

Les solutions nécessaires sont :

- _ Solution A : carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0,1N,
 - _ Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée,
 - _ Solution C : sulfate de cuivre, 5 H₂O à 1% (w/v) dans l'eau distillée,
 - _ Solution D : 0,5 ml de C + 0,5 ml de B + 50 ml de A. Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
 - _ Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 au moment de l'emploi.
- Le milieu réactionnel est préparé comme suit:
- _ Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml,
 - _ Solution D : 5 ml.

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

Annexe6 :dosage d'activité enzymatique

➤ **Solution tampon acétate de sodium, PH=5**

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

➤ **préparation de NaOH (2N)**

- NaOH.....8g
- 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 7: Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère (0,1g d'acide galacturonique/ 50ml d'eau distillé), le protocole suivie est résumer dans le tableau suivant:

| | | | | | | | |
|----------------------|--|-----|-------|-------|-------|------|-----|
| | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2 |
| Volume SM (ml) | 0 | 20 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 |
| Eau distillée (ml) | 200 | 180 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |
| DNS ul | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| | Incubation à 100°C pendant 10minute après le refroidissement | | | | | | |
| L'eau distillée (ml) | 4,4 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | 4,4 |
| Ab 540nm | 0 | 0,1 | 0,215 | 0,435 | 0,670 | 0,88 | 1,1 |

Tableau 10 : Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique