

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères Mentouri Constantine 1

Faculté de sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé :

La pectine lyase d'origine fongique et levurienne : Production et séparation de l'enzyme.

Présenté par : LEKRINE Lokmane

Le : 20/12/2020

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS Assia Djebbar, Constantine.

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. MCB, UFM Constantine 1

Examineur : Mme LABBANI F.Z.K MCB, ENS Assia Djebbar, Constantine.

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciement

*Avant tout, je remercie **Le BON DIEU** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.*

*Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude s'adressent à madame **BENNAMOUN Leïla** qui a accepté de m'encadrer, je la remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.*

*Mes remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, **Mme DAKHMOUCHE S ; et Mme***

LABBANI F.z.k.

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

Dédicace

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

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

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

*À mes chères frères **Rahma, Ahmed** et les petits coucous **Taïba** et **Elmoatasse** **Billah***

*Et sans oublier ma grand-mère "**Nenna**" qui m'a donnée tout l'encouragement pour finir ce travail.*

À tous mes amis, pour qu'est proche et qu'est loin chacun a son propre nom, pour la motivation et le soutien inconditionnel qu'ils m'ont offert durant toute la période du mémoire,

Merci infiniment

L. Lokmane

Résumé :

Les enzymes d'origines microbiennes 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 humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Plusieurs enzymes industrielles sont d'origine fongique. Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, les pectinases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies.

Les enzymes pectinolytiques font parties des enzymes glycolytiques connues par leurs applications industrielles multiples. La pectine lyase est la plus abondante de la famille des pectinases produites par les champignons et les levures, les plus répondu en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économiques majeurs.

Ce travail a pour but la production de la pectine lyase par des champignons et des levures, selon un procédé biotechnologique de la fermentation solide à base de résidus agro-alimentaire comme un support tel que le zeste de citron, l'écorce de l'orange et le son de blé. Ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Le premier chapitre rapporte des connaissances sur les champignons et levures en déterminant leurs morphologies, leurs classifications, leurs habitats et leurs importances dans le domaine industriel. Après, j'ai procédé à la classification de la PL dont la famille des pectinases qui trouve une grande masse d'application dans l'industrie agroalimentaire. Le dernier chapitre comporte la fermentation solide avec la technologie des bioréacteurs pour la production des enzymes pectinolytiques. La purification de l'extrait enzymatique brut est réalisée par séparation des parties protéiques au sulfate d'ammonium ou l'utilisation des solvants organiques, des chromatographies gel filtration et échangeuses d'ions.

Mots clés : Pectine lyase, Champignons, Levures, FMS, Bioréacteur, Purification.

ملخص:

تتميز الإنزيمات من أصل جرثومي بعدة خصائص مختلفة تعكس بشكل متزايد استخداماتها في مجالات التطبيق المختلفة، مثل صناعة الأغذية والأعلاف، ومنظفات الغسيل، وصناعة المداغ وصناعة الأدوية. العديد من الإنزيمات الصناعية من أصل فطري. تنتمي إلى إنزيمات عائلة الهيدرولاز مثل البكتينازات، وهي من بين أهم الإنزيمات على المستوى الصناعي، مما يجعلها واحدة من الأدوات الرئيسية للتكنولوجيا الحيوية.

تعتبر الإنزيمات المحللة للبكتين من بين أهم الإنزيمات المحللة للجلوكوز المعروفة بتطبيقاتها الصناعية المتعددة. البكتين لياز هو الأكثر وفرة من عائلة البكتيناز التي تنتجها الفطريات والخمائر، وهي الأكثر استخدامًا في الصناعة القادرة على تصنيع العديد من المستقلبات ذات الأهمية الاقتصادية الكبرى.

يهدف هذا العمل إلى إنتاج Pectine lyase بواسطة الفطريات والخمائر، وفقًا لعملية التكنولوجيا الحيوية للتخمير الصلب على أساس بقايا الأغذية الزراعية كدعم مثل قشر الليمون وقشر البرتقال ونخالة القمح. وذلك من أجل تقليل تكلفة إنتاج هذه الإنزيمات.

يقدم الفصل الأول معلومات عن الفطريات والخمائر من خلال تحديد أشكالها وتصنيفاتها وموائلها وأهميتها في المجال الصناعي. ثم انتقلنا بعد ذلك إلى تصنيف PL، بما في ذلك عائلة البكتيناز، التي تستخدم على نطاق واسع في صناعة المواد الغذائية. الفصل الأخير يتميز بالتخمير الصلب باستخدام تقنية المفاعل الحيوي لإنتاج الإنزيمات المحللة للبكتين. يتم تصور تنقية مستخلص الإنزيم الخام عن طريق فصل أجزاء البروتينين بكبريتات الأمونيوم أو استخدام المذيبات العضوية وترشيح الهلام وكروماتوجرافيا التبادل الأيوني.

الكلمات المفتاحية: Pectine lyase، الفطريات، الخميرة، FMS، المفاعل الحيوي، التنقية

Summary:

Enzymes of microbial origin have various properties and specificities. These properties increasingly reflect their uses in various application areas, such as the food and feed industry, laundry detergents, the tannery industry and the pharmaceutical industry. Several industrial enzymes are of fungal origin. Belonging to the enzymes of the hydrolase family such as, pectinases are among the most important enzymes on an industrial scale, which make them one of the key tools of biotechnology.

Pectinolytic enzymes are among the glycolytic enzymes known for their multiple industrial applications. Pectin lyase is the most abundant of the pectinase family produced by fungi and yeasts, the most widely used in industry capable of synthesizing a multitude of metabolites of major economic interest.

This work aims at the production of pectin lyase by fungi and yeasts, according to a biotechnological process of solid fermentation based on agro-food residues as a support such as lemon zest, orange peel and wheat bran. This is in order to decrease the cost of producing these enzymes.

The first chapter reports knowledge about fungi and yeasts by determining their morphologies, classifications, habitats and importance in the industrial field. We then proceeded to classify PL, including the pectinase family, which is widely used in the food industry. The last chapter features solid fermentation with bioreactor technology which has for the production of pectinolytic enzymes. The purification of the crude enzyme extract is visualized by separation of the protein parts with ammonium sulfate or the use of organic solvents, gel filtration and ion exchange chromatography.

Keywords: Pectin lyase, Fungi, Yeasts, FMS, Bioreactor, Purification.

Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre 1 Les champignons et les levures	3
1 Champignons	4
1.1 Généralités	4
1.2 Morphologie	5
1.3 Structure cellulaire fongique	6
1.4 Reproduction	7
2 Classification des champignons	7
3 Applications et biotechnologies moderne des champignons	11
3.1 Enzymes fongiques	11
3.2 Synthèse des acides organiques	12
3.3 Synthèse de la vitamine B ₂	13
3.4 Antibiotiques et autres agents pharmacologiques	13
3.4.1 Lovastatines	14
3.5 Biotransformation	14
4 Les levures	15
4.1 Généralités	15
4.2 Ecologie et habitat naturel	15
4.3 Caractéristiques des levures	17
4.3.1 Caractéristiques nutritionnelles	17
4.3.2 Caractéristiques physico-chimiques	19

5	Classification des levures	20
6	Reproduction des levures	21
7	Biotechnologie des levures	22
	Chapitre 2 Enzymes pectinolytiques	26
1	Enzymes pectinolytiques	27
1.1	Généralités	27
1.2	Classification des enzymes pectinolytiques	27
1.2.1	Enzymes désesterifiantes	28
1.2.1.1	Pectine méthyl – estérase (EC.3.1.1.11)	28
1.2.1.2	Pectines acetyl-estérase	29
2	La pectine	30
2.1	Définition	30
2.2	Structure de pectine	30
2.3	Homogalacturonane	31
2.4	Rhamgalacturonane	31
2.4.1	Rhamgalacturonane I	31
2.4.2	Rhamgalacturonane II	32
2.5	Xylogalacturonane	33
3	Types de pectines	33
4	La pectine lyase	34
4.1	Définition	34
4.2	Nomenclature officielle	34
5	Origine de la PL	34
5.1	Origine végétale	35
5.2	Origine microbienne	35
5.2.1	Origine bactérienne	35

5.2.2	Origine fongique	35
6	Structure de PL	35
7	Mode d'action	37
8	Purification de la PL	38
8.1	Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la PL	39
8.2	Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la PL	40
8.3	Effet des ions métalliques et des inhibiteurs sur l'activité de la PL	41
Chapitre 3	fermentation solide	42
1	Fermentation solide	43
2	Avantages et inconvénients de la fermentation solide	43
3	Diverses étapes suivies en fermentation solide	45
3.1	Préparation du substrat carboné pour la production de la PL	45
3.2	Inoculation du milieu de culture	45
3.3	Extraction	46
4	Paramètre de culture de la fermentation solide	46
4.1	Température	46
4.2	Teneur en eau	46
4.3	Activité de l'eau (a_w)	46
4.4	pH	47
4.5	Aération	47
5	Bioréacteurs utilisés pour la production de la PL par fermentation solide	47
5.1	Bioréacteur à plateau	48
5.2	Bioréacteur à lit compacte	48
5.3	Bioréacteur à tambour	49
5.4	Conception particulière de bioréacteurs	49
6	Amélioration de la production de la PL par optimisation de différents paramètres	49

6.1 Effet du substrat	49
6.2 Effet de la période de fermentation	50
6.3 Effet de la température	50
6.4 Effet du pH	50
7 Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et fermentation en milieu liquide ou submergé	50
Conclusion	55
Références bibliographiques.....	57

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

A_w : Activité de l'eau

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

GalA : Acide galacturonique

HG: Homogalacturonane

RG I: Rhamnogalacturonan- I

RG II : Rhamnogalacturonan-II

PL : Pectine lyase

PE : Pectinestérase

PG : Polygalacturonase.

PGL : Polygalacturonate lyase

PMG : Polyméthylgalacturonase

PMGL : Polyméthylgalacturonate lyase

PME : Pectine méthyl estérases

SDS : Sodium dodécylsulfate

FMS : Fermentation sur milieu solide

U/g : Unité Internationale par gramme

KDa : Kilo Dalton

Liste des figures

Figure 1 : Vue microscopique de l'espèce <i>Penicillium spp</i>	4
Figure 2 : Types d'hyphes fongiques ; (a) hyphes cénocytaires ; (b) des hyphes cloisonnés ; (c) hyphes cloisonnés et multinucléés de <i>Penicillium</i>	5
Figure 3 : Schéma présente la paroi cellulaire fongique, (a) protéine ; (b) glucane ; (c) membrane cytoplasmique	7
Figure 4 : Structure de β -lactame	13
Figure 5 : Schéma légendé d'une levure	15
Figure 6 : Arbre phylogénique des genres des levures	21
Figure 7 : Mécanisme de dégradation de la chaîne homogalacturonane	27
Figure 8 : Action des pectines méthyl-estérases	28
Figure 9 : Action des pectines acétyl-estérases	29
Figure 10 : Différentes voies de dégradation enzymatiques de pectine	29
Figure 11 : Structure moléculaire de pectine	30
Figure 12 : Structure primaire d'homogalacturonane	31
Figure 13 : Structure du Rhamgalacturonane I	32
Figure 14 : Structure du Rhamgalacturonane II	32
Figure 15 : Structure de xylogalacturonane	33
Figure 16 : Pectines hautement méthylées	34
Figure 17 : Pectines faiblement méthylées	34
Figure 18 : Stéréoscopie des emplacements de 10 acides aminés invariants au sein de la superfamille de la pectine lyase	36
Figure 19 : Stéréoscopie de site actif de la pectine lyase	37

Figure 20 : Dégradation des composées galacturoniques par l'action de la pectine lyase	37
Figure 21 : Activité et stabilité du PL purifié produit par <i>Rhizopus oryzae</i> en fonction de la valeur du pH	41
Figure 22 : Modèle de développement d'un champignons filamenteux dans un milieu de fermentation solide	43
Figure 23 : Structure d'un bioréacteur à plateau utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques dans un milieu FMS	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des champignons	9
Tableau 2 : Habitats naturels des levures	16
Tableau 3 : Intérêt des vitamines et leurs coenzymes dans le métabolisme	18
Tableau 4 : Quelques enzymes industrielles produites par les levures	24
Tableau 5 : Quelques enzymes et protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie	25
Tableau 6 : Classification des principales pectinases	28
Tableau 7 : Etapes de purification de la PL produite par <i>C. inaequalis</i>	38
Tableau 8 : Influence de certain ions métalliques sur l'activité de la PL d' <i>A.gigantus</i>	41
Tableau 9 : Avantages et inconvénients de la fermentation solide	44
Tableau 10 : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé	51

Introduction

Introduction

Introduction

L'existence des êtres vivants dépend de certains catalyseurs appelés enzymes, notamment la croissance de certains microorganismes qui sont capables de réaliser des tâches biochimiques très spécifiques.

Parmi les enzymes actuellement connues, une centaine est disponible à pour des applications industrielles. Dans les industries alimentaires ce sont les branches sucrières et laitières qui sont les plus grands consommateurs d'enzymes.

Les enzymes principalement utilisées sont les enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères naturels tels que les amidons, les pectines, les celluloses et les protéines (**Werner et al., 2010**) parmi eux les enzymes pectinolytiques ou pectinases qui sont un groupe d'enzyme constitué d'estérases, de polygalacturonases et lyases qui agissent sur les substrats pectiques. Les pectinases comptent 25 % de vente d'enzymes alimentaires dans le monde outre que l'industrie alimentaire, ces enzymes sont appliquées dans divers industries comme l'industrie du textile et du papier, dans la fermentation du café, du thé, dans l'extraction des huiles et le traitement des eau usées. (**Mehrnouch et al., 2014**)

Les pectinases sont produites principalement par des moisissures (*Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*) et par des levures (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*) permettent d'hydrolyser la pectine des fruits et d'éviter ainsi la formation de gel lorsque celui-ci est contre-indiqué (jus de fruits concentrés par exemple). Ces enzymes permettent la clarification des jus de fruits, du vin, du vinaigre et des sirops. L'addition de pectinases dans des fruits écrasés aide à l'extraction du jus. La production microbienne de pectinases est inductible par la composition de milieu de fermentation et notamment par la concentration en pectine (**Hadj Taeb et al., 2002**).

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

Introduction

Le son de blé, le zeste de citron, l'écorce de l'orange sont des résidus agro-industriels les plus employés, pour produire des métabolites à valeur ajoutée à partir de divers microorganismes en utilisant la FMS, par leur richesse en glucose et en micronutriments.

Ainsi, le mémoire est divisé en trois parties :

- ✚ La première partie rapporte des connaissances sur les champignons et les levures dont plusieurs caractéristiques : taxonomie, écologie, morphologie, reproduction et importance industrielle.
- ✚ La deuxième partie nous avons étudié les connaissances les plus intéressantes sur la pectine lyase : origine, structure, mécanisme d'action et substrat pectinolytique.
- ✚ La troisième partie de ce mémoire est attribuée à l'étude de la production de la PL par la fermentation solide et l'étude de plusieurs paramètres affectant leur production à savoir : la température, le pH, effet du substrat et la période d'incubation. Décrire les différentes méthodes de purification, la caractérisation et les applications industrielles de l'enzyme étudiée.

Chapitre 1

Les champignons et Les levures

Chapitre 01 : les champignons et les levures

1. Les champignons

1. 1. Généralités

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires qui étaient traditionnellement classés dans le règne végétal. Plus tard, ces organismes ont été exclus de ce vaste règne et constituent actuellement un groupe à part : « le règne des Mycètes » ou autrement dit le règne des « Fungi », car ils se différencient des plantes particulièrement par leur paroi renfermant de la cellulose et de la chitine (Méheust, 2012), par l'absence de la chlorophylle et en conséquence par leur incapacité à produire leurs propres aliments (Berger et Guss, 2005).

Les champignons sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone ainsi qu'organotrophes, se nourrissant habituellement par décomposition de la matière organique, ce qui crée une excellente opportunité pour leur croissance dans les aliments. Le règne fongique est caractérisé par une grande diversité estimée à plus de 1,5 million d'espèces, bien que 70 000 espèces « uniquement » aient été nommées (Paterson, 2006).

Ce règne regroupe entre autres des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) ayant un aspect filamenteux beaucoup plus connus par le terme trivial : « moisissures » **figure 1**. Ces derniers ne sont pas perceptibles par l'œil qu'une fois que leur développement devient important (Tabuc, 2007).

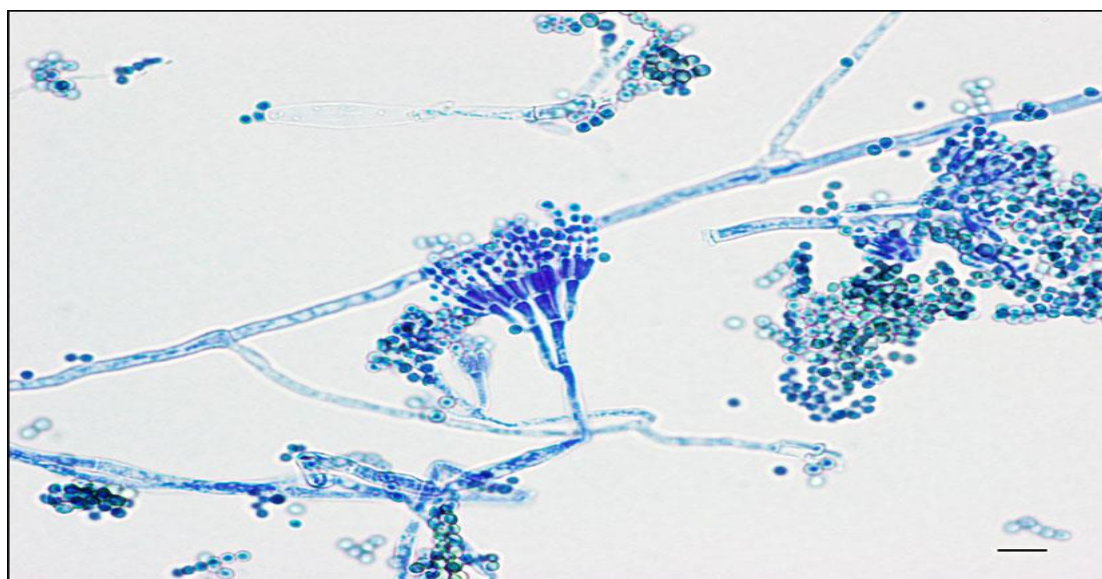


Figure 1 : Vue microscopique de l'espèce *Penicillium spp.*

Chapitre 01 : les champignons et les levures

1. 2. Morphologie

Les champignons sont des organismes eucaryotes, hétérogènes, unicellulaires à filamenteux, porteurs de spores et chimio-organotrophes dépourvus de chlorophylle. Les champignons ont trois formes morphologiques majeures, à savoir la levure unicellulaire, la moisissure filamenteuse (moisissure) et la forme de type levure (forme pseudohyphae).

Les champignons dimorphes (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma*, *Sporothrix schenckii*) sont capables de produire les deux formes (levure et moisissure) en fonction de la température (dimorphisme thermique).

La forme levure est produite dans le corps de l'hôte (in vitro à 37 °C) et la forme moisissure est observée soit dans l'environnement, soit en milieu de culture artificiel (à température ambiante). La forme pseudohyphae est constituée de chaînes de cellules ellipsoïdales allongées avec une constriction entre elles et elle est produite par *Candida albicans*.

Plusieurs d'hyphes sont observés contenant différents caractères, (**figure 2**) et sont comme suit :

- A) Hyphes végétatifs : Ils pénètrent dans le milieu artificiel pour absorber les nutriments.
- B) Hyphes aériens : Ils poussent au-dessus de la surface du milieu artificiel.
- C) Hyphes reproductifs (fertiles) : Ce sont des hyphes aériens portant la structure reproductrice (spore).
- D) Hyphes coénocytaires : hyphes non cloisonnés qui permettent un flux ininterrompu de protoplasme et de noyaux à travers la lumière, par ex : *Phycomycètes*.
- E) Cloisonné avec des cellules non nucléées.
- F) Cloisonné avec cellules multinucléées.

Plusieurs champignons (dermatophytes) produisent des hyphes d'apparence spécifique qui facilite leur identification :

- a) Hyphes en spirale : hyphes enroulés en spirale (*Trichophyton mentagrophytes*)
- b) Corps pectiné : courtes projections unilatérales des hyphes ressemblant aux dents d'un peigne (*Microsporum audouinii*)
- c) Hyphes en bois : projections irrégulières des hyphes qui ressemblent collectivement à un lustre ou à la ramure d'un cerf (*Trichophyton schoenleinii*, *T. violaceum*)
- d) Corps nodulaire : hyphes étroitement tordus ressemblant à un nodule (*Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*)

Chapitre 01 : les champignons et les levures

- e) Hyphes de raquette : Chaîne de cellules hyphes allongées élargies à une extrémité pour produire un arrangement semblable à une raquette de tennis (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*).

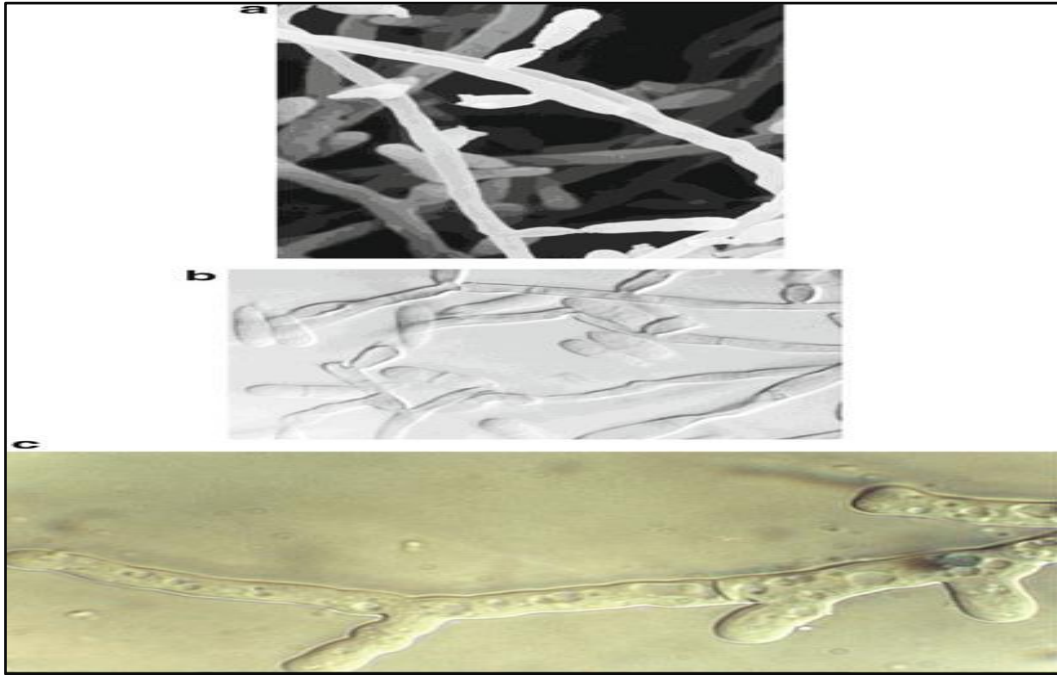


Figure 2 : Types d'hyphes fongiques ; (a) Hyphes cenocytaires ; (b) Hyphes cloisonnés ;
(c) Hyphes cloisonnés et multinucléés de *Penicillium*.

1. 3. La structure cellulaire fongique

Toutes les formes morphologiques (levures et hyphes) des champignons sont entourées d'une paroi cellulaire rigide. Le composant principal de la paroi cellulaire est constitué de fibrilles chitineuses noyées dans une matrice de polysaccharides, de protéines (phosphatase acide, α -amylase et protéase), de lipides et de sels inorganiques (calcium, magnésium, phosphore).

La chitine est un polymère lié (β 1, 4) de la N acétyl-D-glucosamine (GlcNAc). Elle est synthétisée par la chitine synthétase présente dans le chitosome (organe cellulaire).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

La matrice contient du glucane (polymère D-glucose), du mannane, du chitosane (polymère de la glucosamine) et des galactanes. Parmi les glucanes, les polymères avec des unités glycosylés liées ($\beta 1, 3$) et ($\beta 1,6$), connus sous le nom de β glucane, sont courants. Les β -glucanes sont de puissants immunomodulateurs et sont utilisés dans l'industrie avicole.

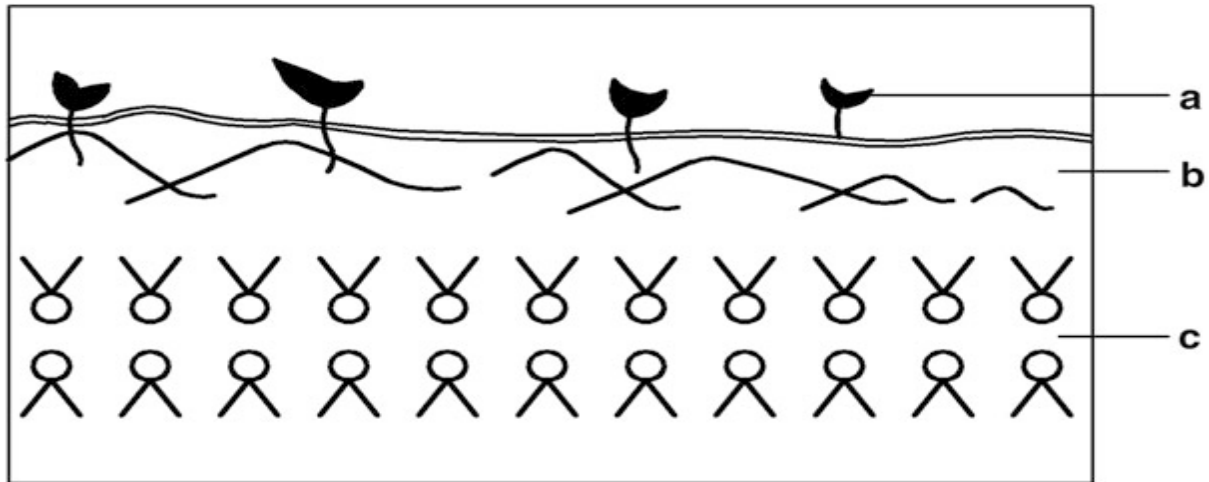


Figure 3 : schéma présente la paroi cellulaire fongique, (a) protéine ; (b) glucane ; (c) membrane cytoplasmique.

1. 4. Reproduction

Les champignons se reproduisent en deux manières principales, à savoir la reproduction sexuée et asexuée. La reproduction des champignons produit des spores qui sont considérées comme une unité de dispersion et de survie des champignons sans embryon. Les spores se séparent de leurs champignons mères et se développent en une descendance individuelle.

2. Classification des champignons

La classification des champignons repose principalement sur des critères morphologiques tels que la pigmentation, la forme des hyphes, la présence ou l'absence de septa et les types de spores. La taxonomie des moisissures et des levures est régie par le Code international de nomenclature botanique (ICBN).

Toute nouvelle proposition de classification des champignons est publiée dans le journal officiel de l'Association internationale pour la taxonomie végétale (Taxon) et est discutée lors

Chapitre 01 : les champignons et les levures

D'une réunion annuelle avant acceptation. La classification des champignons cliniquement pertinents est décrite dans le **Tableau 1**.

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Tableau 1 : Classification des champignons.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Champignons	Zygomycota	Zygomycètes	Entomophthorales	Basidiobolaceae Ancylistaceae	<i>Basidiobolus</i> <i>Conidiobolus</i>	<i>Basidiobolus ranarum</i> <i>Conidiobolus coronatus</i>
	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Neoformans</i> , <i>C. neoformans grubii</i> , <i>C. gattii</i>
	Ascomycota	Euascomycetes	Onygenales	Ajellomycetaceae Onygenaceae	<i>Blastomyces</i> <i>Histoplasma</i> <i>Coccidioides</i> <i>Emmonsia</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadas</i> <i>E. crescens</i> , <i>E. parva</i>
				Arthrodermataceae	<i>Trichophyton</i>	<i>T. tonsurans</i> , <i>T. equinum</i> <i>T. interdigital</i>
					<i>Microsporum</i>	<i>M. audouinii</i> , <i>M. canis</i> <i>M. gypseum-fulvum</i>
					<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i> , <i>E. stockdaleae</i>
					<i>Chrysosporium</i>	
		Eurotiomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i>
			Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>A. marneffeii</i>

Chapitre 01 : les champignons et les levures

		Pyrenomycetes	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	<i>Sporothrix</i>	<i>S. schenckii</i>
		Saccharomycetes	Saccharomytales	saccharomycetaceae	<i>Candida</i>	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata</i>
		Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporioides</i>
			Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>A. alternate</i>
					<i>Bipolaris</i>	<i>B. spicifera</i>
		Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Cladophialophora, Exophiala, Fonsecaea Phialophora</i>	<i>C. bantiana, E. attenuate F. multimorphosa, P. verrucosa</i>
			Ochroconiales		<i>Ochroconis</i>	<i>O. gallopava</i>
		Archiascomycetes	Pneumocystidales	Pneumocystidaceae	<i>Pneumocystis</i>	<i>P. carinii</i>
	Mucoromycotina		Mucorales	Mucoraceae	<i>Rhizopus, Absidia, Mucor</i>	<i>Rhizopus arrhizus (R. oryzae) Mucor circinelloides</i>
	Oomycota	Oomycetes	Pythiales	Pythiaceae	<i>Pythium Lagenidium</i>	<i>P. insidiosum L. giganteum</i>

Chapitre 01 : les champignons et les levures

3. Applications et biotechnologies moderne des champignons

3. 1. Enzymes fongiques

La sécrétion d'enzymes qui servent le mécanisme d'alimentation absorbant des champignons est un énorme atout pour la biotechnologie car les champignons libèrent de nombreux produits protéiques dans leur fluide de culture, ce qui simplifie la purification.

Un avantage particulier de l'utilisation des champignons pour la production de protéines est qu'ils s'engagent dans le traitement post-traductionnel eucaryote de protéines qui est essentiel pour l'activité biologique de nombreuses protéines hétérologues d'intérêt pharmaceutique. Dans le même temps, les champignons sont facilement cultivés comme des bactéries. Les applications biotechnologiques d'enzymes spécifiques fongiques ont un impact sur une vaste gamme de produits. Plus d'une centaine d'enzymes ont été commercialisées à partir de 25 genres dont les ascomycètes *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium*, le zygomycète *Rhizopus* et le basidiomycète *Humicola* (Nicholas et Money., 2016).

Les enzymes fongiques agissent comme des coagulants sont utilisées dans la production de fromage et une version recombinante de la chymosine bovine produite par *Aspergillus niger* est un substitut de l'enzyme obtenue à partir de veaux. Les lactases d'*Aspergillus* et de *Kluyveromyces* augmentent la digestibilité des produits laitiers pour les consommateurs intolérants au lactose. Les lactases sont également efficaces pour digérer les antigènes du lait pour produire des préparations lactées pour les nourrissons (Patrick., 2015).

Les protéases fongiques et les amylases présentes dans les détergents à lessive dégradent les particules de saleté et les lipases sont actives contre les taches de graisse. Les cellulases dans les formulations détergentes augmentent la douceur et la brillance des vêtements.

Les pectinases fongiques tels que le genre *Aspergillus* montre un taux élevé dont la production de ces enzymes qui ont un rôle très important dans la clarification et la macération des jus de fruits, la fabrication des produits hydrolysés de pectine, le rouissage des textiles et des fibres. Les cellulases de *Trichoderma reesei* créent l'apparence délavée populaire du denim. Le traitement du coton brut implique des enzymes bactériennes et fongiques ; les catalases d'*Aspergillus* et d'autres champignons sont utilisées pour blanchir le coton avant de le teindre, et les cellulases sont utilisées dans le processus de finition pour augmenter la douceur du tissu et réduire le « boulochage » (Nicholas et Money., 2016).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Dans la fabrication du papier, les xylanases fongiques sont utilisées dans le blanchissement sans chlore pour hydrolyser les hémicelluloses de la pâte de bois. Ceci a pour effet d'ouvrir la structure moléculaire de la pulpe qui libère les complexes de couleur sombre de lignine insoluble. Les lipases, amylases et cellulases sont également utilisées dans la fabrication et le recyclage du papier. Les xylanases fongiques sont vitales dans de nombreuses autres applications, y compris le dégommeage du lin, du jute et du chanvre, l'ensilage et le traitement des céréales, et comme additifs à la farine de blé pour améliorer la manipulation de la pâte **(Benoit., 2015)**.

La fermentation des céréales avec des bêta-glucanases de *Trichoderma* et d'*Aspergillus* augmente leur valeur nutritionnelle pour les animaux monogastriques comme les porcs et les volailles. Les phosphatases fongiques (phytases) qui libèrent du phosphore des réserves polymères sont également utilisées pour le traitement des aliments pour animaux.

Enfin, les enzymes fongiques peuvent jouer un rôle de plus en plus important dans l'industrie des biocarburants. Après la mouture, les grains entiers peuvent être cuits à froid avec des gluco-amylases et des alpha-amylases pour produire des sucres fermentescibles, notamment du glucose et du maltose. La matière sèche végétale, ou biomasse lignocellulosique, est un énorme aliment inexploité pour le bioéthanol dont l'utilisation nécessitera de nouvelles approches pour l'utilisation d'enzymes fongiques pour libérer les sucres fermentescibles de ces polymères complexes **(Nicholas et Money., 2016)**

3.2. Synthèse des acides organiques

Les espèces *Aspergillus* sont considérées comme les micro-organismes industriels les plus importants. *Aspergillus niger* est une source mondiale pour la production de plus d'un million de tonnes d'acide citrique par an, qui est utilisé comme agent de conservation et chélateur, et comme arôme acide pour les aliments et les boissons gazeuses. Les espèces *Aspergillus niger* et *Penicillium purpurogenum* produisent de l'acide gluconique qui est utilisé pour le nettoyage et la finition des surfaces métalliques et comme additif dans le ciment. Des concentrations plus faibles d'acide gluconique sont également utilisées comme additif alimentaire. La production annuelle est estimée entre 50 000 et 100 000 tonnes **(Restino., 2012)**.

L'acide itaconique, utilisé dans la synthèse des polymères, est produit par *Aspergillus terreus* et *Aspergillus itaconicus* dans une fermentation submergée de sirop de glucose ou de

Chapitre 01 : les champignons et les levures

mélasse. L'acide kojique est un autre produit *Aspergillus* vendu comme cosmétique pour blanchir la peau. C'est un sous-produit de la fermentation de la sauce de soja (**Dickinson et schweizer., 2004**).

3. 3. Synthèse de la vitamine B₂

La production industrielle de vitamine B₂, ou riboflavine, implique la fermentation d'huile de soja et de tourteau de soja par l'ascomycète *Ashbya gossypii*. Les triglycérides du bouillon sont hydrolysés par une lipase sécrétée par le champignon. Les acides gras libres sont ensuite absorbés par le champignon et utilisés comme précurseurs pour la synthèse de la riboflavine. Des souches industrielles d'*Ashbya gossypii* ont été produites par une combinaison de sélection de souches classique et d'ingénierie moléculaire de la voie de la riboflavine pour stimuler la synthèse des vitamines (**Nicholas et Money., 2016**).

3 4. Antibiotiques et autres agents pharmacologiques

Les pénicillines, sécrétées par des espèces de l'ascomycète *Penicillium*, sont de puissants agents antibactériens qui ciblent les bactéries à Gram positif. Ils font partie d'une classe d'antibiotiques qui partagent une structure centrale appelée cycle β -lactame (**Figure 4**). D'autres antibiotiques β -lactamines comprennent les céphalosporines, produites par le champignon *Acremonium*, et les carbapénèmes produits par des bactéries.

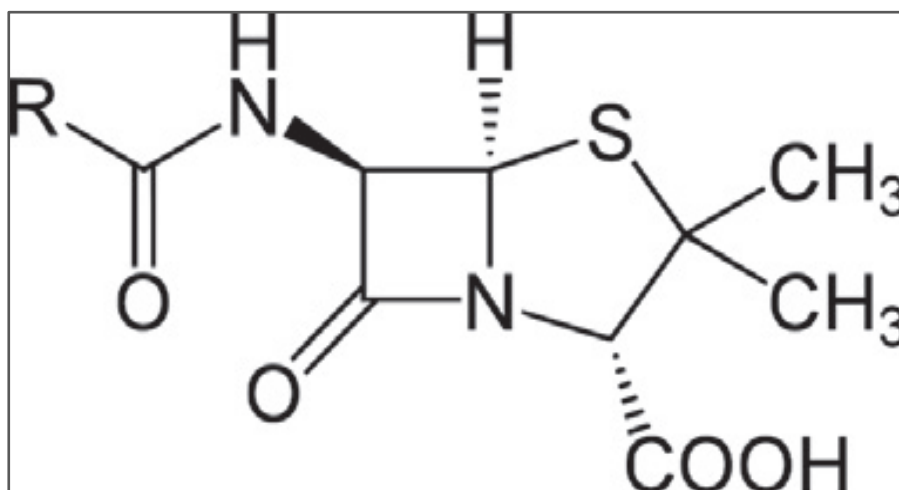


Figure 4 : Structure de β -lactame (**Weissenberger et Van., 1970**).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Les céphalosporines sont des antibiotiques β -lactamines produits par *Acremonium chrysogenum*. Les premières céphalosporines, appelées céphalosporines de première génération, étaient actives contre les bactéries à Gram positif (**Weissenberger et Van., 1970**).

3. 4.1. Lovastatine

La lovastatine est un polycétide fongique utilisé comme médicament hypocholestérolémiant qui inhibe la (3S) -hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase. Cette enzyme catalyse la synthèse du mévalonate, qui est le précurseur immédiat du cholestérol et est la cible de tous les médicaments classés comme statines. La lovastatine a été découverte chez *Aspergillus terreus* et *Monascus ruber*, dans les années 1970, et est un produit naturel dans les pleurotes (*Pleurotus ostreatus*) et la levure du riz rouge (riz fermenté par *Monascus*) (**Nicholas et Money., 2016**).

3.5. Biotransformation

En plus de la valeur des souches naturelles et génétiquement modifiées de champignons en tant que sources d'agents pharmaceutiques, les champignons sont utilisés pour modifier la structure chimique de produits naturels, notamment des enzymes et de petites molécules produites par d'autres organismes. Ces étapes catalysées par des enzymes comprennent des réactions d'oxydation et de réduction, le transfert de groupes fonctionnels et l'hydrolyse. Les transformations fongiques sont utilisées pour produire des cortisones anti-inflammatoires à partir de stérols végétaux, du gestodène contraceptif hormonal issu d'autres stérols et du kétoprofène, qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien important.

La recherche sur la synthèse d'amatoxines létales dans les espèces d'*Amanita*, de *Galerina* et d'autres champignons est prometteuse pour les futures conceptions de médicaments. L'activité de ces peptides cycliques n'est pas affectée par la cuisson, l'acidité gastrique et les enzymes digestives. La résilience structurelle, l'absorption rapide et le ciblage précis font partie des propriétés préférées des nouvelles générations d'agents chimio thérapeutiques pour le traitement du cancer et d'autres maladies. La conception de ces médicaments peut être facilitée par la compréhension du mode d'action des amatoxines et du processus de synthèse peptidique cyclique de ces champignons (**Nicholas et al., 2016**).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

4. Les levures

4.1. Généralités

Le mot levure vient de la langue anglaise et signifie mousse ou bulle, Jusqu'à 1500 espèces de levures ont été découvertes jusqu'à ce jour. Leur isolement et leur identification sont très importants. Les levures sont des eucaryotes unicellulaires qui se multiplient en cellules uniques par le bourgeonnement (par exemple, *Saccharomyces*) ou division directe (par fission, par exemple, *Schizosaccharomyces*), ou elles peuvent se développer en simples filaments irréguliers (Sonali *et al.*, 2018), Les levures sont plus grandes que les bactéries, de forme ovoïde ou sphérique (1 à 5 micromètres de large sur 8 à 10 de long), (figure 5). Son matériel génétique est composé de 16 chromosomes linéaires, situés dans le noyau (Lucile *et al.*, 2016).

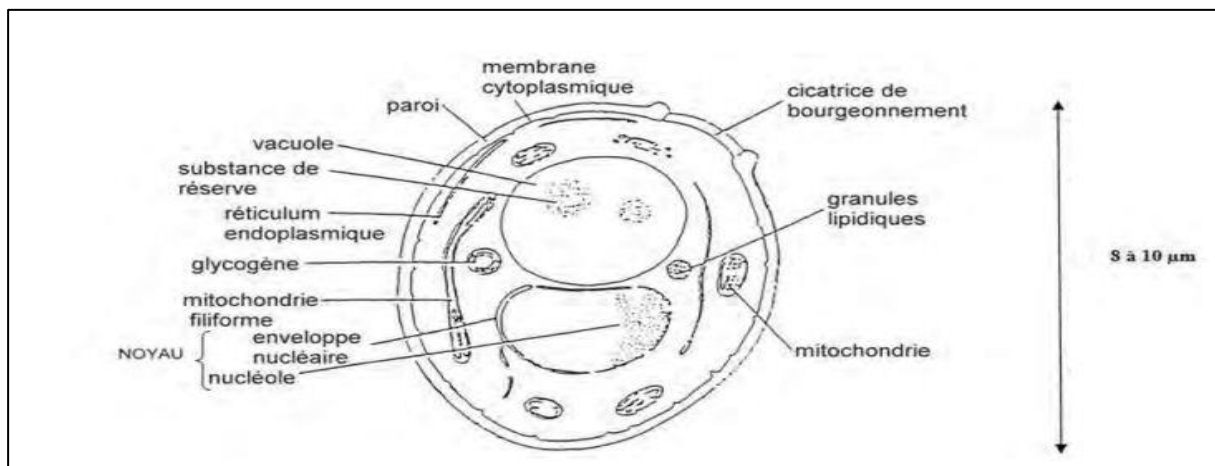


Figure 5 : Schéma légendé d'une levure (Lucile *et al.*, 2016).

4.2. Ecologie et habitat naturel

Les levures sont des espèces ubiquitaires. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnements préférés (sirops, bière, miel, fleurs et de nombreux fruits) (Oteng-Gyang, 1984 et Jimoh *et al.*, 2012; Greppi *et al.*, 2013; Adewara *et al.*, 2013). D'autres écosystèmes où se développent des levures : à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (Leveau et Bouix, 1993 ; Thanh, 2006).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Tableau 2 : Habitats naturels des levures (Walker, 2009).

Habitat	La description
Animal	Plusieurs levures non pathogènes sont associées au tractus intestinal et à la peau des animaux à sang chaud ; les levures (par exemple, <i>Candida albicans</i>) sont des pathogènes opportunistes pour les humains et les animaux ; les levures sont associées aux insectes comme des vecteurs importants dans la distribution naturelle.
Atmosphère	On peut s'attendre à quelques cellules de levure viables par mètre cube d'air. Généralement, <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces spp.</i> , <i>Rhodotorula</i> et <i>Sporobolomyces</i> sont dispersés par l'air à partir de couches au-dessus des surfaces du sol.
Environnement Construit	Les levures sont assez omniprésentes dans les bâtiments. Par exemple, <i>Aureobasidium pullulans</i> est commun sur le papier peint domestique humide et <i>S. cerevisiae</i> est facilement isolé des surfaces des vignobles.
Plantes	L'interface entre les nutriments solubles des plantes et le monde septique sont des niches communes pour les levures ; la propagation des levures dans la phyllosphère est facilitée par les insectes. La présence de certains composés organiques en surface et en décomposition crée des conditions favorables à la croissance des levures.
Sol	Le sol n'est peut-être qu'un réservoir pour la survie à long terme de la levure, plutôt qu'un habitat pour la croissance. Les levures sont omniprésentes dans les sols cultivés (près de 10 000 cellules / g de sol) et ne se trouvent que dans les couches supérieures du sol aérobie (10–15 cm). <i>Lipomyces</i> et <i>Schwanniomyces</i> sont isolés exclusivement du sol.

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Selon (Walker, 2009), La distribution des levures n'est pas celle des bactéries dans le milieu naturel, mais elles peuvent néanmoins être isolées du sol, de l'eau, des plantes, des animaux et des insectes (Tableau 2). Les plants (feuilles, fleurs et fruits) sont des habitats de levure préférés, mais quelques espèces se trouvent de manière commensale ou en relation parasitaire avec les animaux (Oca *et al.*, 2016).

4.3. Caractéristiques des levures

4.3.1. Caractéristiques nutritionnelles

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

➤ Source de carbone

Les levures étant des chimiohétérotrophes ont besoin de sources carbonées (Walker, 2009) et de précurseurs pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés comme les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques (Botton, 1991). Plus de 400 espèces de ces microorganismes identifiées dans la littérature sont capables de métaboliser le glucose, le fructose et le mannose (Pol, 1996 ; Walker, 2009), le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures (Walker, 1998). Certaines d'entre elles utilisent des saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique grâce aux enzymes de leur capital génétique (Kurtzman et Suzuki, 2010).

Les souches de *Schwanniomyces castellii*, *S. fibuligera* produisent la biomasse à partir de l'amidon non hydrolysé (à partir des pommes de terre ou leurs pelures, l'amidon soluble) (Ouédrago *et al.*, 2012), les hydrolysats de plantes, le moût de pomme, (Halász et Lásztity, 1991 ; Klein et Fauveau, 1995 et Bekatorou *et al.*, 2006).

➤ Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, base purines et pyrimidines...), l'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (Walker *et al.*, 1998 et Deak, 2006) et des sources inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Larpen *et Larpen-Gourgaud*,

Chapitre 01 : les champignons et les levures

1997 ; Guiraud, 1998 et Deak, 2006). Toutes les levures sont pratiquement capables d'utiliser l'azote minéral comme les sels d'ammonium utilisés dans les milieux de culture (Bourgeois, 1996). Contrairement à *Hansenula* et *Citeromyces*, certains genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces*. Par contre, les nitrites sont métabolisables par *Debaromyces hansenii* et *Pichia pinus* (Bourgeois, 1996).

➤ Minéraux, oligoéléments et vitamines

Les minéraux sont importants pour les levures et constituent des facteurs de croissance ou des cofacteurs pour les enzymes (Leblon, 1988). Pour un développement adéquat, elles ont besoin d'oligo-éléments variés (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Zn, Sn...) et en très faible concentration servant de stabilisateurs des biomolécules ou constituants essentiels des systèmes enzymatiques (Larpen- Gourgaud et Sanglier, 1992) (Tableau 3). D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine et la thiamine...) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés essentiels à la croissance des levures (Riviere, 1975 ; Botton et al., 1990 et Guiraud, 1998) comme pour *Sacharomyces cerevisiae* qui a besoin de biotine pour croître. Par contre, certaines levures peuvent se multiplier en l'absence de vitamines comme la souche *Candida lusitanae* qui n'a pas besoin de vitamines pour sa croissance. Les besoins en vitamines varient selon l'espèce. Les ions Ca^{2+} ont un effet significatif sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes (Sarikaya et Gurgun, 2000).

Tableau 3 : Intérêt des vitamines et leurs coenzymes dans le métabolisme (Riviere, 1975).

Vitamines	Coenzymes	Réaction enzymatique produites
Acide nicotinique	Pyridine nucléotides (NAD ⁺ et NADP ⁺)	Déshydrogénation.
Riboflavine (B2)	Flavine nucléotides	Déshydrogénation et transport d'électrons.
Thiamine (B1)	Co-carboxylase	Décarboxylation.
Acide folique	Acide tétrahydrofolique	Transfert des groupements à un carbone.
Biotine	Enzymes utilisant la Biotine comme cofacteur	Fixation du CO ₂ et transfert de groupements carbonyles.
Cobalamine (vit B12)	Coenzyme à cobalamine	Réaction de réarrangement moléculaire.

4.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

➤ Effet de la température et du pH

Conformément aux lois thermodynamiques, la température influence les réactions biologiques. La température de culture des levures se situe entre 35 et 45°C pour leur assurer une croissance adéquate. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels (Leveau et Bouix, 1993).

En effet, la température minimale de croissance peut se situer entre 20°C et 50°C pour les microorganismes thermophiles qui poussent à des températures comprises entre 45 et 80°C (Rudiger et al., 1995 et Madigan et Martino, 2006) comme pour des espèces des genres levuriens de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (Deak, 2006). La levure *Candida thermophila*, isolée du sol en Corée, croit à 51°C (Shin et al., 2001), certaines se développent à plus de 50°C : *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (Bourgeois et al., 1988 et Leveau et Bouix, 1993).

D'autres levures peuvent se développer à des températures allant de 0 à 50°C, ce sont les levures mésophiles (Oteng et Gyang, 1984), tandis que les levures psychrophiles ont une température maximale de croissance se situant entre 5°C et 20°C. Les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 100°C (Leveau et Bouix, 1993 et Prescott et al., 1995).

Le pH a également une influence sur le développement des levures qui ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH comme les levures du genre *Candida* qui se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 mais peuvent survivre à pH 9. Les levures sont fortement inhibées par les acides acétique, lactique citrique, l'acide ascorbique et propionique (Nancy, 1983).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

➤ Aération

Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (**Walker et al., 1997**). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes : *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* et *Debaryomyces* (**Bouix et Leveau, 1991**).

D'autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire même en présence d'oxygène comme les *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* ; soit respiratoire en présence d'oxygène comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* la plupart des *Pichia* et des *Hansenula* et quelques *Torulopsis* (**Bouix et Leveau, 1991**).

➤ Pression osmotique et l'activité de l'eau (a_w)

La pression osmotique varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (**Leveau et Bouix, 1979 et Larpent et Larpent Gaurgaud, 1997**), car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (bétaine et glycérol).

5. Classification des levures

La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van 1984, qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. (**Figure 6**). La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (**Bouix et Leveau, 1991**).

Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

- ❖ Les ascomycètes : se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.

Chapitre 01 : les champignons et les levures

- ❖ Les basidiomycètes : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- ❖ Les deutéromycètes : regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

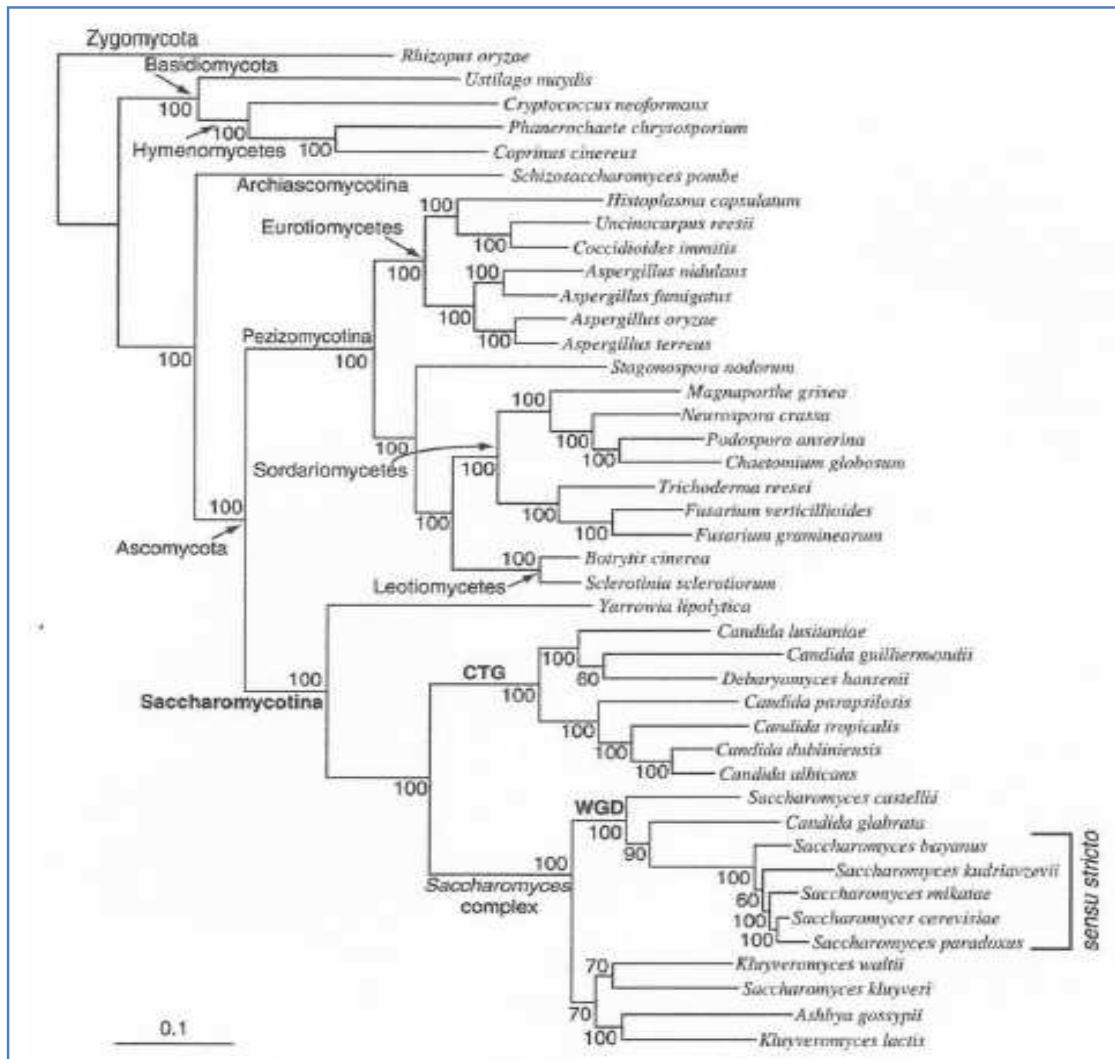


Figure 6 : Arbre phylogénétique des genres des levures (Scannell et al., 2007).

6. Reproduction des levures

Pour les levures, la classification au niveau du genre nécessite la démonstration de la présence ou de l'absence d'une phase sexuelle dans le cycle de vie. Des spores sexuelles, appelées ascospores, sont produites et, lors de la germination, donnent la levure végétative bourgeonnante. L'absence de spores sexuelles au cours du cycle de vie fait que la levure est classée comme forme anamorphe ou asexuée « imparfaite », alors que le succès à démontrer la

Chapitre 01 : les champignons et les levures

présence de spores sexuelles indique la forme téléomorphe ou sexuelle « parfaite ». Sur la base de critères autres que la formation de spores (par exemple, utilisation de composés azotés spécifiques, fermentation de sucres spécifiques, etc.), les anamorphes et les téléomorphes sont identiques. (Kenneth et Charlez., 2007).

7. Biotechnologie des levures

➤ Boissons alcoolisées

Le rôle traditionnel des levures est la fabrication de boissons alcoolisées, dont la fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à fermenter les sucres simples en éthanol. Cette propriété, les fait intervenir dans la vinification et de l'élaboration de la bière (Coulibaly et al., 2014). La levure *Saccharomyces cerevisiae*, est la plus utilisée (Leveau et Bouix, 1993).

➤ Panification :

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère (Urien, 2015). On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (Simon et Meunier, 1970 et Cofalec, 2006).

➤ Affinages des fromages :

Incapables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Larpent, 1991), les levures participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait et contribuent ainsi à réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993). En plus de la levure *S.cerevisiae*, de nombreuses espèces ont été introduites comme les genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (Larpent, 1991).

➤ Production d'enzymes et de protéines recombinantes :

La production de protéines recombinantes utilisées en thérapie est un marché en nette progression, peut atteindre plus de 20 milliards de dollars à l'horizon 2020 (Gaëlle Fleitour, 2012). Les enzymes digestives et leur utilisation en bio-industries sont très développées. A l'horizon 2015, les lipases occupent 38,5 % du marché suivi par les amylases, 30,5 % marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010). Les levures constituent une des importantes sources d'enzymes commerciales en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant, d'obtenir une biomasse importante

Chapitre 01 : les champignons et les levures

à bas prix (**Pol., 1996**). Comme exemples nous citons, l'invertase ou la saccharase ou β -fructosidase ou invertase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (**Simon et Meunier, 1970**).

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Tableau 4 : Quelques enzymes industrielles produites par les levures (Simon et Meunier, 1970 ; Sicard, 1982 ; Liese et *al.*, 2000 ; Wong et *al.*, 2002 ; Pandey, 2006 ; Sikander et *al.*, 2010 et Johnson et Echavarii, 2011).

Enzyme	Code	Type de liaison hydrolysée	Levures	Application industrie
Amylase	EC 3.2.1.1	α 1-4 endogène	<i>Lipomyces starkey</i> <i>Schwanniomyces castellii</i>	Préparation des aliments, textile, papeterie, pharmacie
Chymosine	EC 3.4.23.4	Protéase	<i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Préparation des aliments
β -galactosidase	EC 3.3.1.23	β -1-4 du lactose	<i>Saccharomyces sp.</i>	Applications alimentaires
Inulinases	EC 3.2.1.7	Hydrolyse la liaison 2,1- β -D-fructose	<i>Candida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus</i>	Applications alimentaires
Invertase	EC 3.2.1.26	Hydrolyse la liaison O-C(fructose)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S.arlbergensie</i> , <i>Candida utilis</i>	
Lactase	EC 3.2.1.108	Hydrolyse la liaison β (1-4) du lactose en galactose et glucose.	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromyces fragilis</i> , <i>Candida</i>	Préparation des aliments laitiers
Lipase	EC 3.1.1.3	Hydrolyse les liaisons sn1 et sn3 des triacylglycérols ou TG	<i>Candida lipolytica</i>	Thérapeutique
			<i>Candida rigosa</i>	Préparation des aliments
			<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> <i>Pseudozyma Antarctica</i>	Aromes
			<i>Trichosporon fermentum</i>	Dégraissage, biorestauration
			<i>Yarrowia lipolytica</i>	Thérapeutique, détergents
Pectine lyase	EC 4.2.2.10	Clivage éliminatoire de l'ester méthylique de (1 \rightarrow 4) - α - D- galacturonane pour donner des oligosaccharides	<i>Cryptococcus adeliensis</i> <i>Guehomyces pullulans</i>	La fabrication des produits hydrolysés de pectine

Chapitre 01 : les champignons et les levures

Tableau 5 : Quelques enzymes et protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie.

Types d'enzymes	Code	Levures utilisées	Pathologie à traiter	Références
α -amylase	EC 3.2.1.1	<i>Saccharomyces carlbergensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aide digestive	Wong et al., 2002
Beta-glucosidase	EC 3.2.1.21	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Maladie de Gaucher	Lamers et al., 2016 ; Regenboog et al., 2016
Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD)	EC 1.1.1.49	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Le favisme	(Loiudice et al., 2001)
Hémoglobine	–	<i>Pichia pastoris</i>	Anémie Thalassémie	Huaxin et al., 2007
Lipases	EC 3.1.1.3	<i>Candida lipolytica</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Aide digestive	Sikandar et al., 2010 et Deive et al., 2003
Protéines vaccins	–	<i>Sporidiobolus sp</i>	Prévention des infections.	Bitter et al., 1984 Blin., 2002

Chapitre 2

Enzymes pectinolytiques

"Pectine lyase"

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

1. Les enzymes pectinolytiques

1.1. Généralités

Les enzymes pectinolytiques ou les pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques de pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (**figure 7**) et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques. La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique.

En effet, l'*Aspergillus niger* est la source fongique la plus couramment utilisée pour la production industrielle d'enzyme pectinolytiques (**Jayani et al., 2005**).

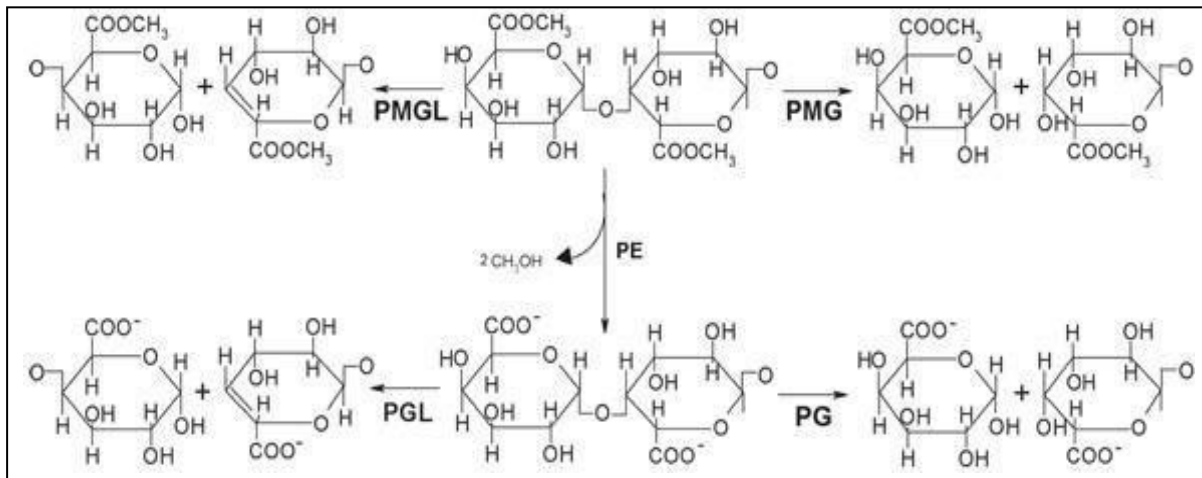


Figure 7 : Mécanisme de dégradation de la chaîne homogalacturonane (**Favela-Torres et al., 2006**).

1.2. Classification des enzymes pectinolytiques :

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature de substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-torres et al., 2006**). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : les pectinestérase (PE) ou pectine-méthylestérase (PME) et les dépolymérase (polygalacturonases et lyases) (**Tableau 6**).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

Tableau 6 : Classification des principales pectinases (Favela-torres et al., 2006).

Nom	Numéro de classification	Mécanisme d'action	Substrat	Produits formés	Autres
Pectine méthylestérase	EC.1.1.1.11	Hydrolyse	Haut DM	Méthanol + GaLA	Fongique (Ph 4.5) Plantes (pH 7)
Polygalacturonase Endo Exo	EC.3.2.1.15 EC.3.2.1.67	Hydrolyse Hydrolyse	Pectate Pectate	Oligos Mono ou dimère	Viscosité pH4-5 Extrémité non-réductrice
Pectine lyase Endo	EC.4.2.2.10	Trans- élimination	Haut DM	Chaines plus courtes	pH 6
Pectate lyase Endo Exo	EC.4.2.2.2 EC.4.2.2.9	Trans- élimination Trans- élimination	DM bas	Dimère	pH 8-9

1.2.1. Les enzymes désesterifiantes

1.2.1.1. Les pectine méthyl – estérases (PME ou PE, EC.3.1.1.11)

Elles catalysent l'élimination des groupement méthoxyles fixés sur la pectine pour former l'acide pectique et du méthanol par hydrolyse des liaison esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique (**Figure 8**). Ce mode d'action conduit à une distribution en bloc des groupement carboxyliques libérés et à une grande sensibilité des acides pectiques produits au Ca^{2+} (Khan et al., 1990).

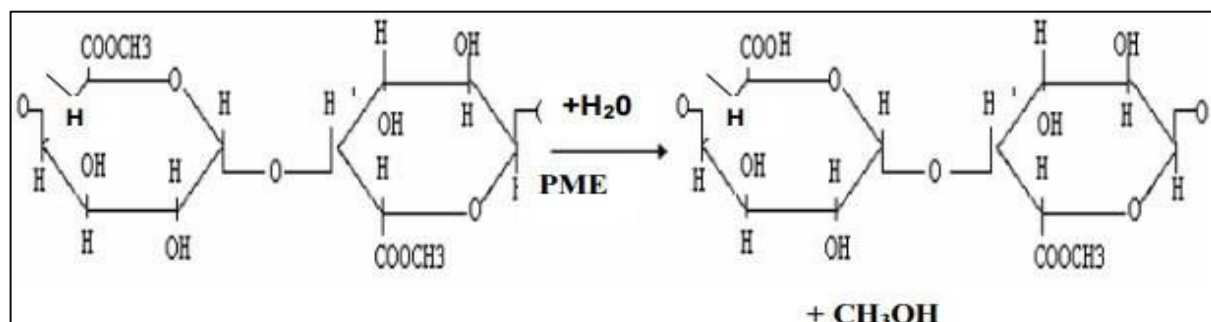


Figure 8 : Action des pectines méthyl-estérases.

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

1.2.1.2. Les pectines acétyl-estérase

Elles éliminent les acides estérifiés en C-2 ou C-3 des résidus acides galacturonique (Figure 9).

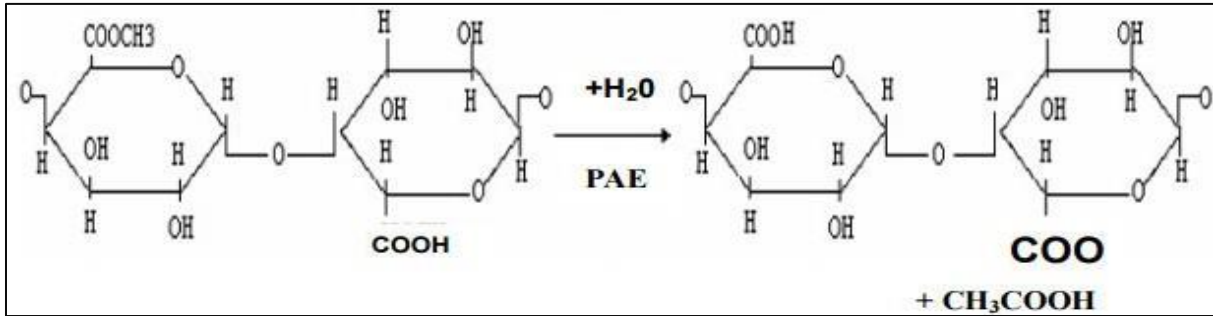


Figure 9 : Action des pectines acétyl-estérases.

1.2.2. Les enzymes de dépolymérisation

Les polygalacturonases hydrolysent des liaisons α (1-4), soit par des réactions de β -élimination (Lyases) qui provoquent la rupture des liaisons glycosidiques et l'apparition d'une double liaison entre les carbones C-4 et C-5 (Morris et al., 2002) (figure 10) par quatre catégories différentes : les polygalacturonases (PG), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonate lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL).

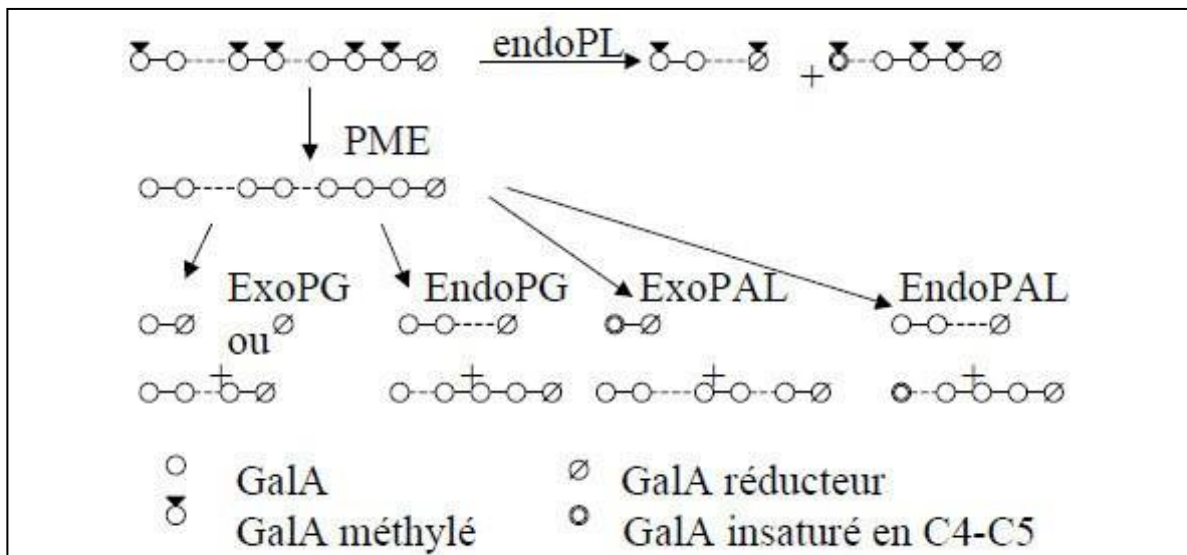


Figure 10 : Les différentes voies de dégradation enzymatique de pectine (Tabuc., 2007).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

2. La pectine

2.1. Définition

La pectine est un polysaccharide qui a été découverte pour la première fois dans le jus de pomme par Vauquelin (**Chan., 2017**). Son nom est issu du mot grec « pektikos » qui signifie se congeler ou se solidifier. Dans le monde végétal, la pectine est un biopolymère indispensable, présente dans tous les végétaux et localisée au niveau de la paroi cellulaire, cette dernière assure la cohésion et la rigidité, en agissant comme ciment intracellulaire.

2.2. Structure de pectine

Les pectines sont une classe complexe de polysaccharides qui entrent dans la composition des parois cellulaires végétales. Elles sont considérées comme des additifs alimentaires (enregistrées sous le n° E440). Le squelette de la pectine est composé majoritairement d'unités d'acide D-galacturonique reliées en α -(1 \rightarrow 4) par des liaisons glycosidiques et de faibles quantités de α -L-rhamnose plus ou moins ramifiés (**Fishman et Jen, 1986**) (**figure 11**).

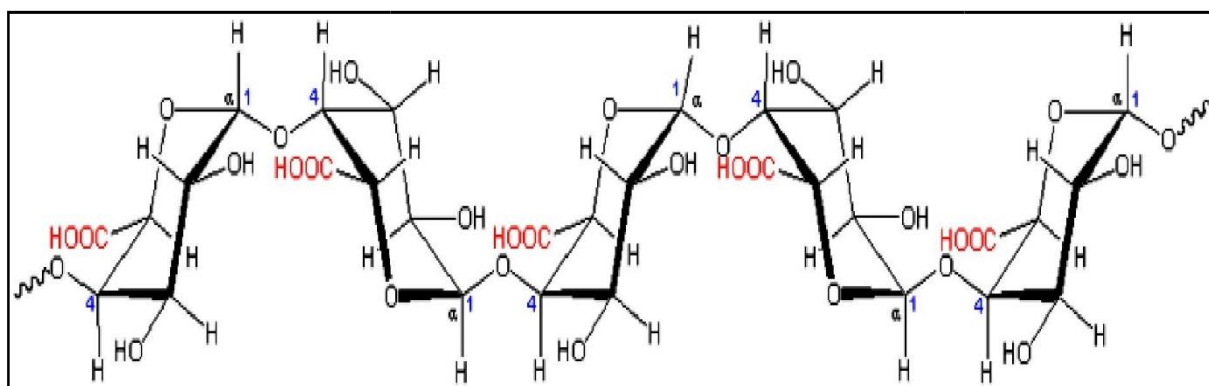


Figure 11 : Structure moléculaire de pectine (**Fishman et Jen., 1986**).

La structure fine des pectines peut varier en fonction de l'espèce considérée, le stade de développement, la localisation pariétale ou tissulaire et le mode d'extraction (**Ridley et al., 2001** ; **Thakur et al., 1997**).

Typiquement dans la paroi végétale d'un tissu indifférencié, les homogalacturonanes I (HG) sont les plus abondants, ils représentent 65% des pectines, la proportion de rhamnogalacturonane I (RG I) est comprise entre 20 % et 35 % (**Mohnen., 2008**). Les rhamnogalacturonanes II (RG II) et xylogalacturonanes (XGA) sont des composés minoritaires qui représentent moins de 10 % des pectines (**O'Neill et al., 2004** ; **Zandleven et al., 2007** ; **Mohnen, 2008**). Ces différents

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

domaines interagissent pour former une macromolécule complexe selon plusieurs modèles structuraux.

2.3. Homogalacturonane

L'homogalacturonane est un homopolymère linéaire constitué d'environ 100 résidus d'acides galacturoniques (GalA) liés en α -(1,4) (Thibault *et al.*, 1993). Certains résidus GalA peuvent être estérifiés en position C-6 par des groupements méthyles ou O-acétylés en O-2 ou O-3 (Perrone *et al.*, 2002).

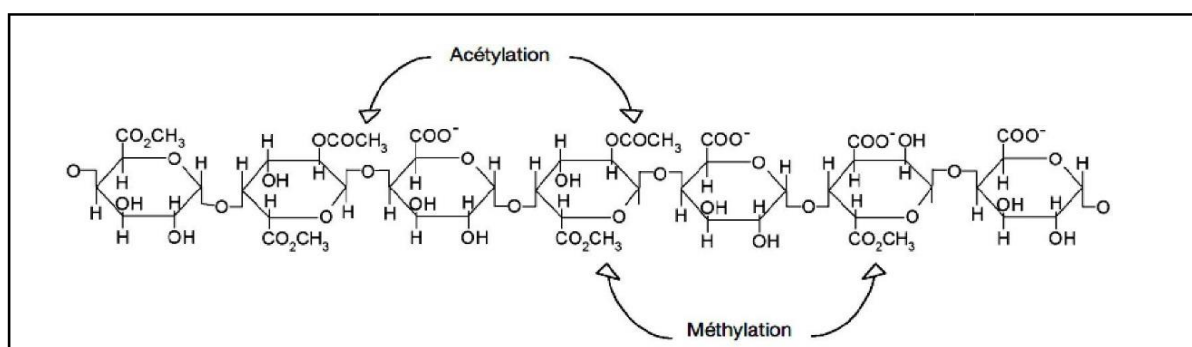


Figure 12 : Structure primaire d'homogalacturonane (Sebaoui, 2018).

2.4. Rhamgalacturonane

2.4.1. Rhamgalacturonane I

Le squelette osidique de rhamnogalacturonane I est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et d'unités galacturoniques [\rightarrow 4) α -D-GalA-(1 \rightarrow 2) α -L-Rha-(1 \rightarrow]. Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RG I sont acétylés (Dumville et Fry, 2000 ; Perrone *et al.*, 2002), de nombreux oses peuvent se lier sur les résidus rhamnosyl en C-4 ou sur les chaînes d'acide galacturonique, dont les plus dominants sont l'arabinose, le galactose et les arabinogalactanes (Bonnin *et al.*, 2002 ; Thibault *et al.*, 2000 ; Ralet *et al.*, 2001) (figure 13).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

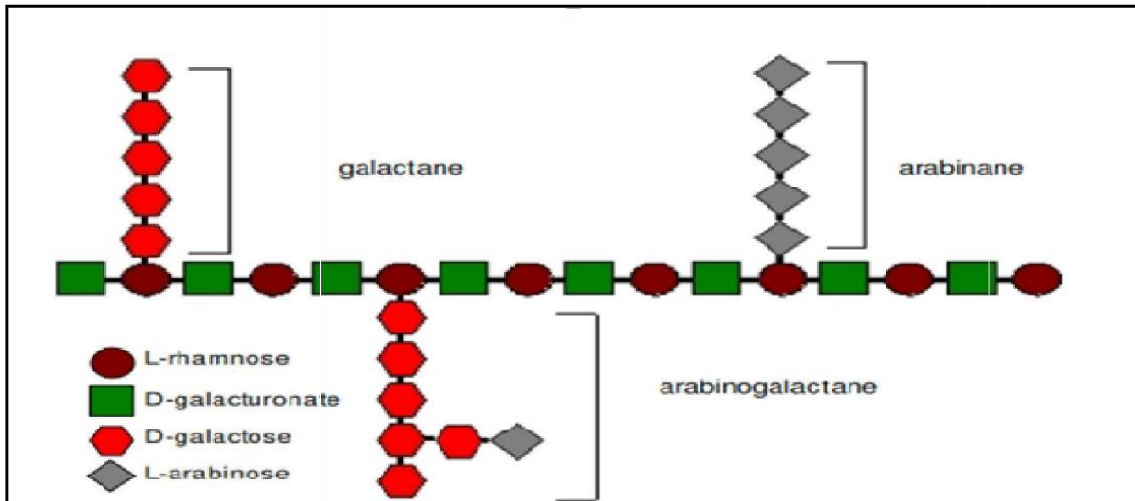


Figure 13 : Structure du Rhamgalacturonane I (RG I) (Sebaoui., 2018).

2.4.2. Rhamgalacturonane II

Le RG II comprend approximativement neuf résidus de Gala, aux quels sont unies quatre chaînes latérales complexes, nommées A, B, C et D (**figure 14**) (O'Neill et al., 2004).

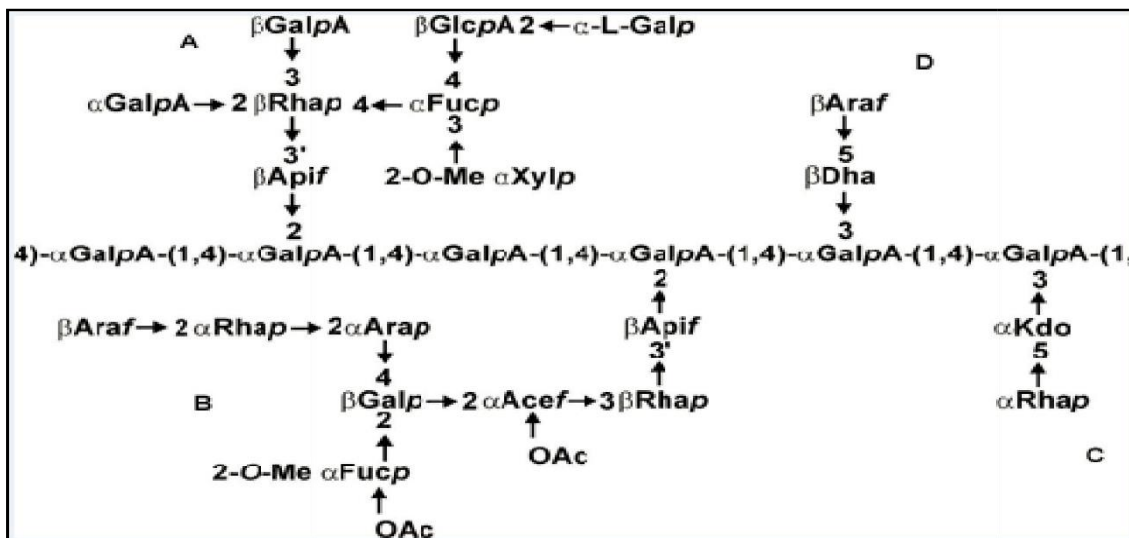


Figure 14 : Structure du Rhamgalacturonane II (RG II).

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

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

2.5. Xylogalacturonane

Les homogalacturonanes peuvent être également substitué par des unités simples de β -D xylose liées sur le C-3 des acides galacturoniques. Ces zones sont appelées xylogalacturonanes (**figure 15**).

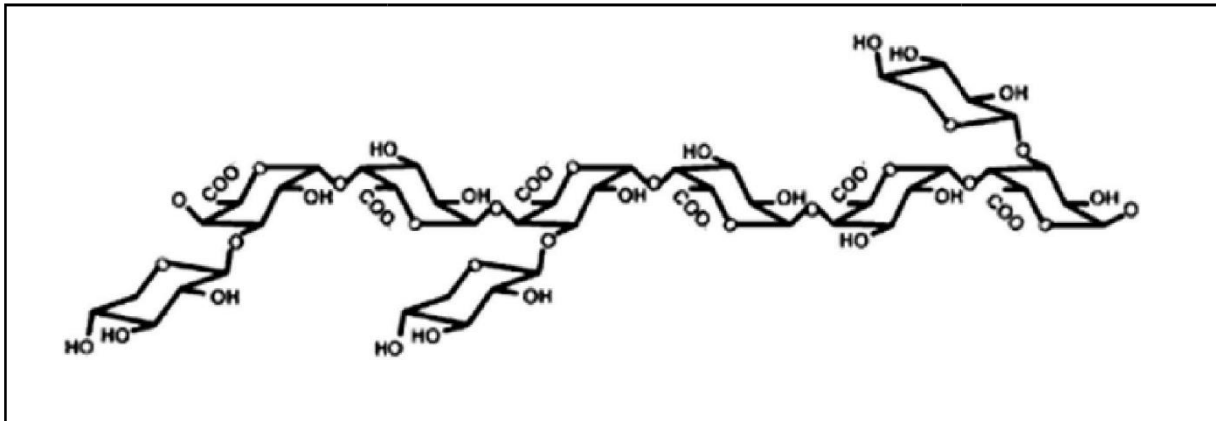


Figure 15 : Structure de xylogalacturonane (Wong., 2008).

3. Types de pectines

Les pectines sont identifiées à partir de leur degré de méthylation (DM) exprimé en %, qui est défini comme étant le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale (nombre de résidus méthylés par rapport aux résidus totaux). Selon leur degré de méthylation, on distingue :

- Les pectines « hautement méthylées » (HM pour High Methoxyl) (**figure 16**) ayant un DM > 50 % sont majoritairement présentes dans la nature (May, 1990).
- Les pectines « faiblement méthylées » (LM pour Low Methoxyl) (**figure 17**) ayant un DM < 50 % sont obtenues à partir des pectines HM, soit par voie chimique (dé-estérification alcaline à basse température) ou par voie enzymatique (utilisation de pectines méthylestérases).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

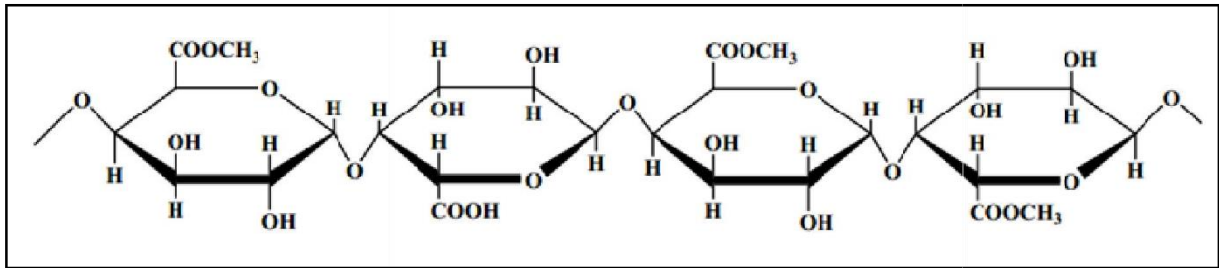


Figure 16 : Pectines hautement méthylées (Serguschenko et al., 2007).

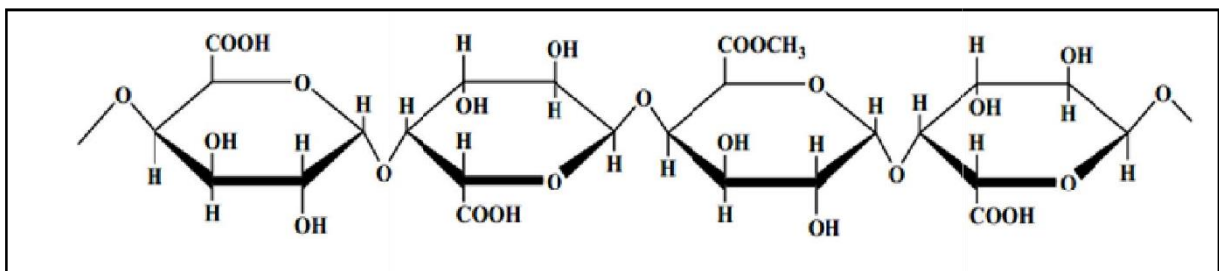


Figure 17 : Pectines faiblement méthylées (Serguschenko et al., 2007).

4. La pectine lyase

4.1. Définition

La pectine lyase (EC.4.2.2.10) est une enzyme pectinolytique qui catalyse le clivage de la pectine, de préférence une pectine hautement estérifiée, produisant des méthyloligogalacturonates insaturés par trans-élimination des liaisons glycosidiques.

4.2. Nomenclature officielle

Nom systématique : (1 → 4) -6- O -méthyl- α - D -galacturonan lyase.

Autres noms : La pectine *trans* -éliminase ; l'endopectine lyase ; la polyméthylgalacturonique *trans*-éliminase ; la pectine méthyltranséliminase; la pectolyase; PL; PNL; PMGL.

5. Origine de la PL

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

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

5.1. Origine végétale

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

5.2. Origine microbienne

Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (**Meunier, 1999**). De plus, la PL végétale est produite en quantité faible, contrairement aux lyases microbiennes. A la suite de ce développement, un grand nombre de pectine lyases furent produites par des bactéries.

5.2.1. Origine bactérienne

Les bactéries produisent principalement des lyases telles que *Bacillus spp.* (**Kashyap et al., 2000**), *Pseudomonas marginalis* (**Hayashi et al., 1997**), *Geobacillus pallidus p26* (**Safinur et al., 2014**) et *Bacillus macerans* (**Morozova et al., 2006**). En effet, les bactéries produisent plutôt des lyases alcalines et stables de point de vue thermique alors que les lyases acides sont produites par les moisissures (**Favela-Torres et al., 2006**).

5.2.2. Origine fongique

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

6. Structure de PL

La PL a été parmi le premier groupe de structures protéiques résolues, sans le bénéfice de données biochimiques pertinentes pour interpréter les aspects fonctionnels de la structure tridimensionnelle.

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

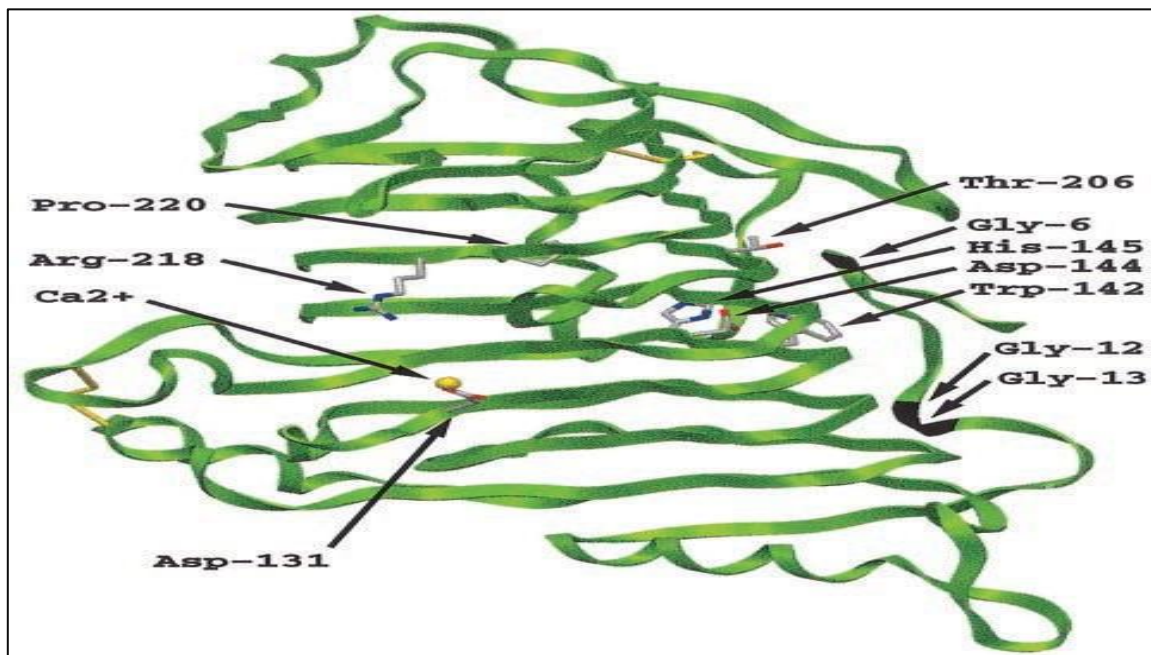


Figure 18 : Stéréoscopie des emplacements de 10 acides aminés invariants au sein de la superfamille de la pectine lyase (Herron et al., 2000).

Lorsque la structure de la PL a été signalée, les détails de son mécanisme enzymatique ont pu être résumés dans les quelques phrases suivantes : la PL est composée de 353 acides aminés, avec une masse moléculaire de 37 676 daltons et deux liaisons disulfure. L'alignement de séquence corrigé a identifié 10 acides aminés invariants, dont 5 sont des acides aminés qui pourraient potentiellement être impliqués dans l'activité catalytique. Notamment, comprennent l'Asp-131, Asp-144, His-145, Thr-206 et Arg-218.

Les cinq acides aminés chimiquement inertes comprennent Gly-6, Gly-12, Gly-13, Trp-142 et Pro-220. Avec la plupart des enzymes, les acides aminés invariants se regroupent autour de la même région générale, celle du site actif. Cependant, la situation est différente avec la PL. Les 10 acides aminés invariants se regroupent dans deux régions distinctes (**Figure 19**). Asp-131, Arg-218 et Pro-220 sont regroupés autour du site de liaison de Ca^{2+} qui a été postulé comme faisant partie du site actif et les sept autres acides aminés se regroupent du côté opposé de l'hélice β parallèle et sont trop éloignés pour faire partie d'un site catalytique près de l'ion Ca^{2+} .

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

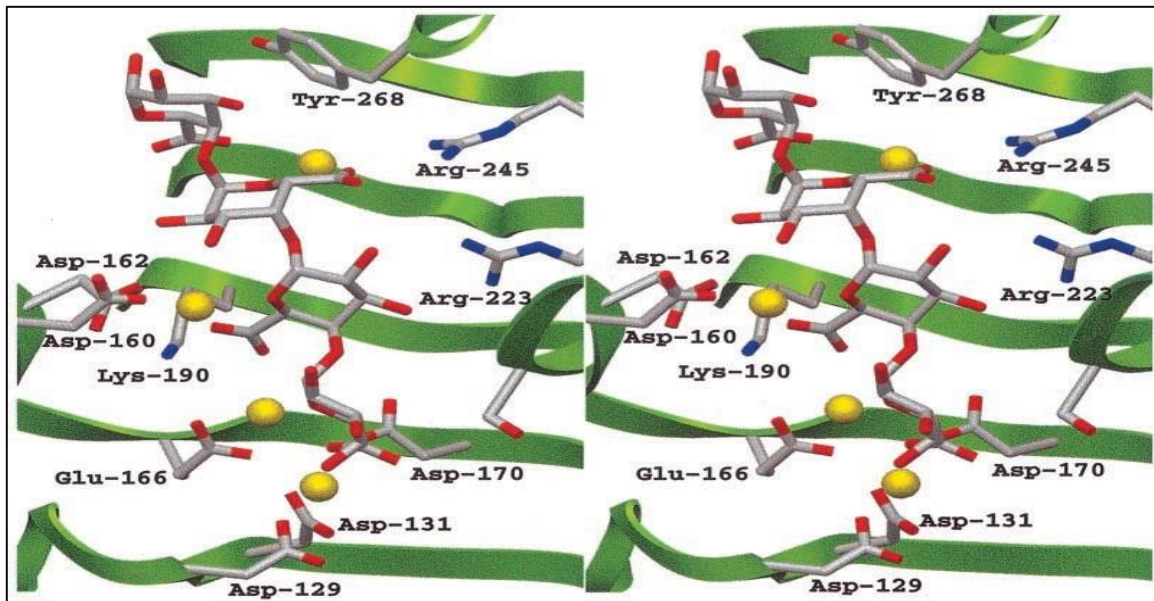


Figure 19 : Stéréoscopie de site actif de la pectine lyase (Preston *et al.*, 1992).

7. Mode d'action

Parmi toutes les pectinases, les pectines lyases sont les seules enzymes capables de dépolymériser une pectine hautement estérifiée en petites molécules sans action préalable d'autres enzymes.

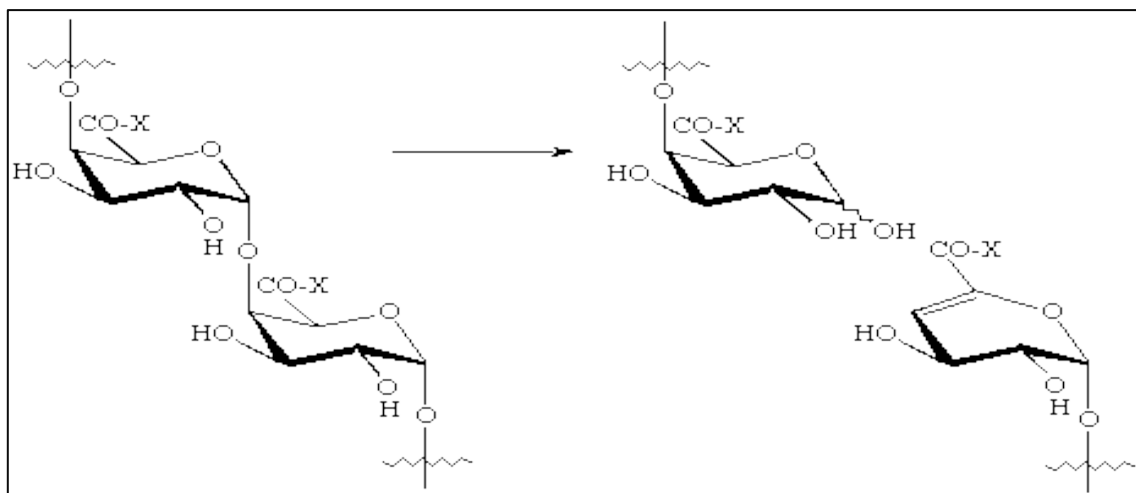


Figure 20 : Dégradation des composés galacturoniques par l'action de la pectine lyase (Mutenda *et al.*, 2002).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

Les pectine lyases appliquent un clivage trans-éliminatoire de l'ester méthylique de (1 → 4) - α - D- galacturonane pour donner des oligosaccharides avec des groupes 4-désoxy-6- O - méthyl- α - D -galact-4-énuronosyle à leurs extrémités non réductrices (Linhardt et al., 1986). La déméthylation ralentit progressivement son action ; il peut néanmoins cliver de part et d'autre d'un résidu déméthylé si le résidu à l'autre extrémité de la liaison scissile est méthylé.

8. Purification de la PL

Les données de plusieurs étapes de purification de la pectine lyase à partir de la fermentation à l'état solide de *Curvularia inaequalis* sont présentées dans le tableau 3. L'étape initiale de purification de PL à partir de *C. inaequalis* a été réalisée par précipitation de protéine avec du sulfate d'ammonium avec un taux de saturation de 70%. Dans cette étape, l'enzyme a été purifiée 3,96 fois avec un rendement d'environ 88,6 % ; l'activité spécifique était de 5,39 U / mg de protéines (Afifi et al., 2002).

La deuxième étape de purification de l'enzyme a été réalisée par chromatographie sur colonne Sephadex G-100. La purification atteint 16,44 avec un rendement de 70,1% et une activité spécifique de 26,3 U / mg de protéine (Tableau 7).

Tableau 7 : les étapes de purification de la PL produite par *C.inaequalis*.(Afifi et al ., 2002).

Les étapes de purification	Volume (ml)	Activité total (U)	Protéine total (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Récupération (%)	Purification
C.F.F.	1000	42.1	31.0	0.84	100	1.0
Précipité de sulfate d'ammonium après dialyse	5	37.3	7.10	5.39	88.6	3.96
Purification sur Sephadex G-100	50	29.5	1.12	26.3	70.1	16.44
Purification sur DEAE-Cellulose	30	19.4	0.28	69.3	46.1	50.96

La troisième étape de purification a été réalisée par le passage sur une chromatographie d'échange d'ions de DEAE-Cellulose en utilisant un gradient linéaire de chlorure de sodium.

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

L'activité la plus élevée de PL a été détectée dans une purification de 50,96 fois et un rendement de 46,1% ; l'activité spécifique était de 69,3 U / mg de protéine (**Tableau 7**).

Tous ces résultats sont en parfait accord avec les résultats de (**Obi et Moneke., 1985**) ; (**Parini et coll., 1988**) ; (**Chen et coll., 1998**) ; (**Moharib et al., 2000**) et (**Siessere et Said., 1989**).

8. 1. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la PL

La température est un paramètre très important pour l'activité et la stabilité des enzymes, l'activité de la plupart des enzymes est optimale entre 15 C° et 45 C°. L'augmentation de la température hors de valeur optimal, provoque la dénaturation des structures secondaires et tertiaires de l'enzyme et l'activité tend rapidement vers zéro. Pour les températures inférieures de 15 C°, la chaleur du milieu apporte un supplément d'énergie qui facilite la réaction enzymatique.

En effet, la température affecte le type et la force des interaction intramoléculaire et avec le solvant. Or ces interactions régissent la stabilité de la structure de l'enzyme donc la géométrie du site actif, cette géométrie se répercute sur la fixation du substrat et/ou la libération du produit (effet sur les constants d'équilibre) et/ou la réactivité des groupement impliqués dans la catalyse (effet sur la constante catalytique).

La PL est incubée à diverses températures en présence de pectine d'agrumes comme substrat, la pectine lyase a montré une activité maximale à 50 ° C, en accord avec d'autres pectinases microbiennes déjà caractérisées. La stabilité thermique de l'enzyme a été testée immédiatement après son incubation sans substrat à trois températures différentes. En l'absence de substrat, la PL était raisonnablement stable à 40 °C, conservant 70% de son activité après 15 min, mais à 50 ° C, l'enzyme perdait son activité rapidement, avec une demi-vie de 9 min. Néanmoins, l'*A. Giganteus* PL était plus stable que les enzymes disponibles dans le commerce Rapidase C80 et Pectinase CCM (**Danielle et al., 2014**).

L'activité optimale d'*A.oryzae* a été enregistrée à 50 °C. La PL provenant d'autres sources a été signalé comme étant de manière optimale active dans cette valeur de 40 à 50 °C (**Wijesundera et al., 1984** ; **Manachini et al., 1988** ; **Afifi et al., 2002**), tandis que 70 °C a été signalé pour PL de *A.niger* (**Spagna et al., 1995**).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

8. 2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la PL

Le pH joue un rôle principal dans l'activité et la stabilité de plusieurs enzymes, les variations du pH et spécifiquement les variations des charges des acides aminés affecte évidemment la charge nette globale des enzymes et la distribution des charges à leur surface. En conséquence, la variation du pH provoque la stabilité et la solubilité des enzymes.

A des pH extrêmes, il y a un excès de charge de même signe (charges négatives portée par les groupements aminés à pH acide et charges positives portées par les groupements acides à pH alcalin). De plus, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène qui ont un rôle clé (de par leur nombre notamment) dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des enzymes sont rompues (**Houssem et Hamdi., 2005**).

La dénaturation induite par le pH est un processus d'autant plus irréversible que l'enzyme est exposée à des pH extrêmes. La variation des charges des acides aminés affecte également la réactivité des groupes impliqués dans la réaction enzymatique (fixation du substrat et/ou catalyse) :

- En conséquence, la variation du pH affecte l'activité des enzymes. Pour la grande majorité des enzymes, des valeurs de pH acides ou basiques induisent une perte totale, irréversible, de l'activité enzymatique.
- A l'inverse, pour chaque enzyme, il existe une zone (relativement étroite) de pH optimal pour son activité.

la dépendance au pH de l'activité PL dans des solutions de pectine neutres et alcalines avec une activité optimale à pH 8,5 (**Danille et Eleonora., 2014**). L'activité maximale en milieu alcalin semble être un comportement atypique pour les pectines lyases, car la plupart des pectines lyases microbiennes décrites dans la littérature ont une activité maximale à des pH allant de 5,0 à 7,0. (**Pedrolli et al., 2009**).

Le test de la dépendance au pH de l'activité PL a révélé que 7,5 était optimal pour l'activité et il y avait une forte diminution de l'activité à la valeur acide et une légère baisse à la valeur basique. Cette valeur de pH optimale est identique à celle trouvée pour PL de *Aureobasidium pullulans* (**Manachini et al., 1988**) tandis que la valeur acide c'est-à-dire 6,4 et 5,0 où elle est trouvée optimale pour PL d'*A. niger* (**Spagna et al., 1995**) et *curvularia inaequalis* (**Affi et al., 2002**).

Chapitre 02 : Enzymes pectinolytiques "Pectine lyase"

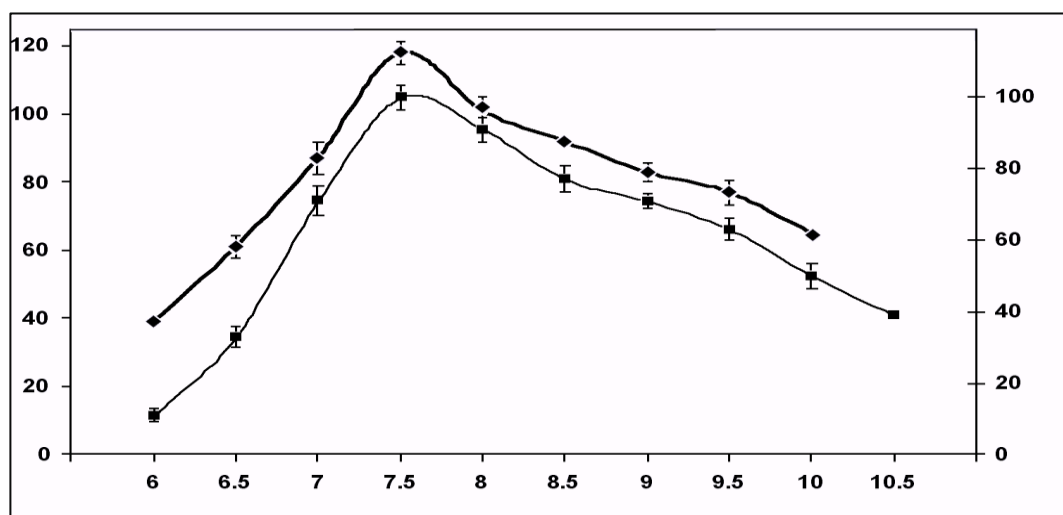


Figure 21 : Activité (●) et stabilité (■) du PL purifié produit par *Rhizopus oryzae* en fonction de la valeur du pH.

8. 3. Effet des ions métalliques et des inhibiteurs sur l'activité de la PL

L'effet de certains ions métalliques et inhibiteurs d'enzymes a été étudié et les données sont présentées dans le tableau 2. L'activité PL était significativement augmentée en présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ou K^+ . Bien que les ions calcium soient largement décrits comme des activateurs de pectinases.

Tableau 8 : influence de certain ions métalliques sur l'activité de la PL d'*A.gigantus* (Danielle et Eleonora., 2014).

Ions métalliques (2mM)	Activité PL (%)
CoCl ₂	153.6 ± 6.6
Pb	134.7 ± 3.2
BaCl ₂	132.4 ± 10.4
MgSO ₄	125.8 ± 12.6
ZnSO ₄	116.9 ± 4.8
NaCl	110.6 ± 5.6
CaCl ₂	107.4 ± 2.8
HgCl ₂	94.0 ± 8.9
MnSO ₄	88.5 ± 3.7
Sodium citrate	96.6 ± 0.6
EDTA	85.8 ± 7.4

Chapitre 3

Fermentation solide

Chapitre 3 : Fermentation solide

1. Fermentation solide

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : *solid-state fermentation* ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci (Fig 19). Rahardjo *et al.* 2006 expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide. Selon les substrats considérés, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90 %, soit 0,65 et 0,98 d'activité d'eau (a_w) (Mathot, 1996 ; Gervais *et al.*, 2003).

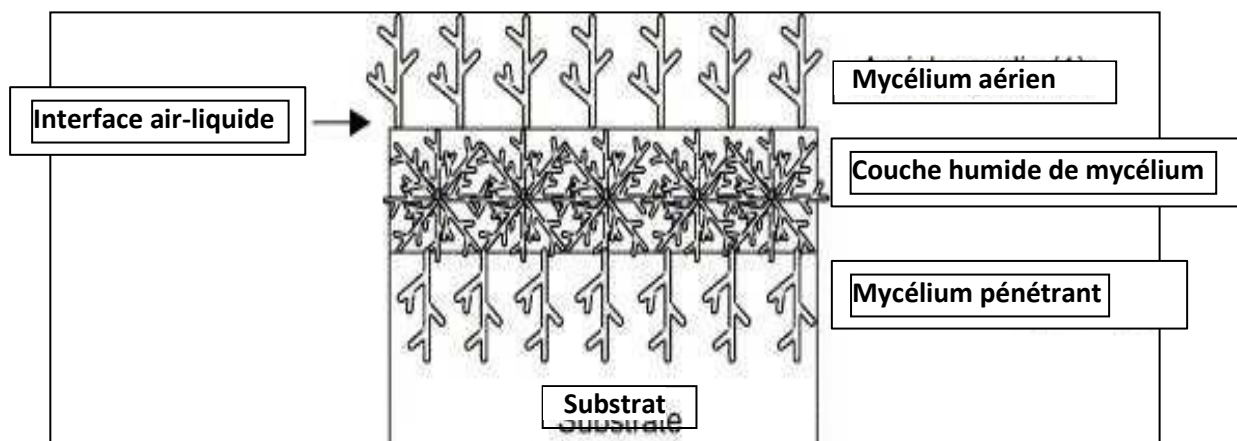


Figure 22 : Modèle de développement d'un champignons filamenteux dans un milieu de fermentation solide.

2. Avantages et inconvénients de la fermentation solide

La technologie de la fermentation solide comporte plusieurs avantages et inconvénients sont résumés dans le tableau suivant :

Chapitre 3 : Fermentation solide

Tableau 9 : Avantages et inconvénients de la fermentation solide (Assamoi et al., 2008 ; Krishna et al., 2005 ; Robledo et al., 2015 ; Alokika et al., 2019 ; Durand., 2003).

Avantages de la FMS	Inconvénient de la FMS
<ul style="list-style-type: none"> - La simplicité de la fermentation solide : car elle ne nécessite pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). - Le faible cout des équipements et des opérations - L'absence de production de mousses lors des fermentations solides, En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides fortement visqueux. Ce qui entraine des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles. - Les problèmes de transfert d'oxygènes et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. - Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au milieu de culture. Ce qui rend le contrôle des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire. - Les microorganismes étant collés au substrat, l'estimation de la biomasse est délicate. - Le contrôle du pH est pratiquement impossible en raison du système hétérogène triphasé et du manque d'équipements et d'électrodes appropriés pour déterminer le pH dans les matériaux solides.

Chapitre 3 : Fermentation solide

3. Diverses étapes suivies en fermentation solide

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont :

- La préparation du substrat ou du milieu de culture.
- La stérilisation du milieu, généralement se fait à 121 °C pendant 20 minutes.
- L'inoculation du milieu de culture.
- L'incubation de milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau).

3.1. Préparation du substrat carboné pour la production de la PL

Les substrats carbonés utilisés en fermentation solide pour la production de la pectine lyase proviennent essentiellement des résidus agricoles et agro-alimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.) et les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine polymérique, etc.).

La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants aux microorganismes. Le traitement physique peut se faire soit mécaniquement (broyage, concassage, hachage, aplatissage), soit thermiquement (chauffage, autoclavage, traitement à la vapeur), soit par irradiation ou par ultrasonication. Le traitement chimique se fait par la voie des alcalis, acides, oxydants, gaz et solvants (**Assamoi et al., 2008**).

3.2. Inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores (**Mathot, 1996**). Celles-ci restent viables plus longtemps que le mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement.

La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une prégermination des spores est parfois envisagée. Des inoculum spores + mycélium + substrat de production peuvent être utilisés également.

Chapitre 3 : Fermentation solide

3.3. Extraction

A la fin de la fermentation, la biomasse solide est traitée avec de l'eau distillée et agitée soigneusement sur un agitateur mécanique. L'échantillon est filtré à travers une mousseline et le résidu est traité à nouveau avec l'eau distillée de la même manière et filtré. Les filtrats sont regroupés et centrifugés, et le surnageant clair est utilisé comme source de métabolites (Kunamneni et al., 2005).

4. Paramètre de culture de la fermentation solide

4.1. Température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en FMS. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température pouvant aller jusqu'à 20°C au-dessus de la température d'incubation (Pandey et Ashok., 2003). Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support. Ce phénomène se produit surtout lors de la croissance de la souche et est directement proportionnel à son activité métabolique génératrice de chaleur, de l'ordre de 100 à 300 kJ par kg de masse cellulaire (Manpreet et al., 2005). Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés, une diminution de la disponibilité des nutriments (Duchiron et al., 2011).

4.2. Teneur en eau

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire et les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (Bellon-Maurel et al., 2003 ; Gervais et al., 2003). Les variations de la teneur en eau sont dues : à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et aux productions d'eau métabolique.

4.3. Activité de l'eau (a_w)

A l'échelle de laboratoire, l'activité d'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée par des solutions salines

Chapitre 3 : Fermentation solide

saturées. À grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau (Manpreet et al., 2005).

4.4. pH

Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques). Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Bellon-Maurel et al., 2003).

En fermentation solide, il n'existe pas d'électrode pouvant enregistrer le pH des milieux solides à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisent des électrodes potentiométriques ou une électrode à pH standard, après suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée. Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels, de Ca^{2+} ou des solutions alcalines.

4.5. Aération

L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Raimbault, 1998). L'aération en fermentation solide est plus facile à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause aussi des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycéliums aériens.

5. Bioréacteurs utilisés pour la production de la PL par fermentation solide

Plusieurs facteurs importants à prendre en considération pour le développement d'un procédé de la fermentation, comprennent la sélection du micro-organisme et du substrat, les paramètres optimaux du procédé et la purification du produit final. Le développement de tout processus de fermentation nécessite des relations appropriées entre la physiologie des micro-organismes et les paramètres de fermentation tels que la température, le pH, l'aération, la teneur en humidité, la nature du substrat solide utilisé, etc.

Chapitre 3 : Fermentation solide

Un certain nombre de bioréacteurs ont été conçus qui pourraient surmonter les problèmes de mise à l'échelle et dans une certaine mesure également la surveillance en ligne de plusieurs paramètres. Ces bioréacteurs régulent également le transfert de chaleur et de masse qui sont difficiles à gérer dans un système basique de fermentation.

Plusieurs types de bioréacteurs ont été conçus pour des applications à petite et grande échelle dans la fermentation solide, y compris les bioréacteurs à plateau, les bioréacteurs à lit garni et les bioréacteurs à tambour (Patidar *et al.*, 2018).

5.1. Bioréacteur à plateau

Le bioréacteur à plateau est un type statique de bioréacteur dans lequel des plateaux en bois ou en acier inoxydable sont utilisés pour placer le substrat solide. Il permet une circulation d'air dans le réacteur à travers des plateaux perforés (Figure 23).

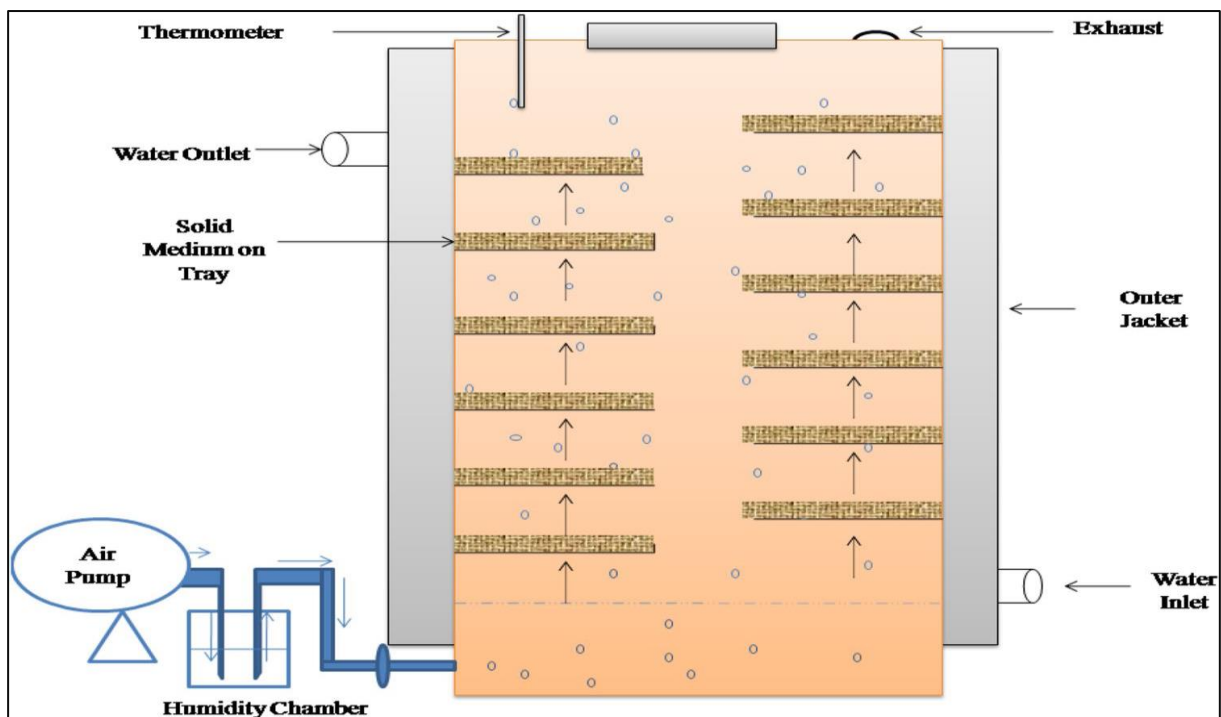


Figure 23 : structure d'un bioréacteur à plateau utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques dans un milieu FMS (Ruiz *et al.*, 2012).

Ortiz *et al.*, (2017) ont rapporté qu'une augmentation de la production de pectine lyase à l'aide d'un bioréacteur à plateau dans des conditions de fermentation optimales, dans cette étude, des milieux solides constitués de 0,1 kg de son de blé, des écorces d'orange et de citron dans une proportion de 66%, 17%, 17%, respectivement, ont été utilisés. (Ortiz *et al.*, 2017).

Chapitre 3 : Fermentation solide

5.2. Bioréacteur à lit compacte

Le bioréacteur à lit compact a été largement utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques tels que la pectine lyase. Il est difficile de contrôler la température dans le bioréacteur à une échelle pilote ou à grande échelle en raison de la limitation du transfert de chaleur et de masse. Une production de la pectine lyase par *A. oryzae* dans un réacteur à lit garni. Dans ce bioréacteur, 15 kg de substrat contenant de la pulpe d'agrumes (51,6%) et de la bagasse de canne à sucre (48,4%) sont utilisés pour la production d'enzymes (**Biz et al., 2016**).

Il a été observé que la combinaison de pulpe d'agrumes et de bagasse de canne à sucre évitait les problèmes de formation d'agglomérats qui avaient été signalés dans les travaux antérieurs de (**Pitol et al., 2016**).

5.3. Bioréacteur à tambour

Dans le bioréacteur à tambour, une agitation continue ou intermittente du milieu solide se produit, ce qui assure l'homogénéité du milieu solide et une meilleure circulation de l'oxygène (**Soccol et al., 2017**).

5.4. Conception particulière de bioréacteurs

Dans le processus de fermentation, le bioréacteur fournit les conditions appropriées pour la croissance et l'activité des micro-organismes impliqués, qui permettent l'activité microbiologique. La fermentation solide peut être considérée comme un « système fermé ». Au temps t^0 , le substrat solide stérilisé dans le bioréacteur est inoculé avec le micro-organisme et l'incubation peut se poursuivre dans des conditions physiologiques optimales. Au cours de toute la fermentation, rien n'est ajouté dans le bioréacteur à l'exception de l'oxygène (sous forme d'air). La composition du milieu de culture, la concentration de biomasse et les concentrations de métabolites changent généralement et constamment en raison du métabolisme des cellules (**Musaalbakri et al., 2017**).

6. Amélioration de la production de la PL par optimisation de différents paramètres

6.1. Effet du substrat

La *Penicillium digitatum* a été cultivé dans des milieux fermentés pour la production de pectine lyase. La concentration du substrat conçue par RSM était de 5, 15, 25, 38,66 g. La meilleure activité (527,47 U / mL) pour PL a été observée à 5 g de substrat. Les écorces de

Chapitre 3 : Fermentation solide

fruits, en particulier les agrumes, le marc de pomme sont mieux utilisées pour la production d'enzymes pectinolytiques. L'écorce de citron a été choisie comme source de carbone et d'énergie pour la production d'enzymes pectinolytiques par criblage et utilisée pour une optimisation supplémentaire par RSM (Siddiqa et al., 2018).

6.2. Effet de la période de fermentation

Pour une meilleure considération d'optimisation de la période de fermentation les jours 1, 3, 5 et 7 ont été conçus grâce à une conception entièrement croisée des paramètres par RSM et l'activité maximale a été enregistrée pour PL au 5ème jour qui était de 527,47 U / mL. Donc 5 jours est la valeur optimale pour la production de la PL par *Penicillium digitatum*. (Siddiqa et al., 2018).

6.3. Effet de la température

Pour étudier l'activité enzymatique maximale et sur des supports de substrat de fermentation solide la température est conçue comme 20, 30, 35 ° C. La PL a montré une activité maximale, à savoir 527,47 U / mL à 30 ° C.

6.4. Effet du pH

Pour la production d'enzymes pectinolytiques, le pH a été ajusté dans de l'eau simple qui a été utilisée pour humidifier le milieu de fermentation. L'activité PL la plus élevée, à savoir 421,83 U / ml, a été enregistrée à pH 8. D'après les résultats enregistrés, il a été clair que l'activité de l'enzyme augmentait progressivement avec l'augmentation du pH du milieu fermenté (Siddiqa et al., 2018).

7. Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et fermentation en milieu liquide ou submergé :

Un tableau comparatif (**tableau 10**) présentant les forces et les faiblesses de chaque technologie est présenté à la page suivante.

Chapitre 3 : Fermentation solide

Tableau 10 : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé.

		FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE	FERMENTATION EN MILIEU LIQUIDE OU SUBMERGE
CONDUITE DE PROCEDE	Température	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle compliqué (transfert de chaleur limité par le support, l'air et l'absence d'eau libre) - Risque de formation de gradients dans le milieu 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle aisé - Température homogène
	pH	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle compliqué - Régulation partielle possible (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon) 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle aisé - Régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques
	Aération	<ul style="list-style-type: none"> - Passive (de surface) ou active (forcée) - Pas ou peu de contrainte d'aération (oxygénation) - Circulation de l'air aisé et aération (transfert d'oxygène) élevée 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire et compliquée - Contrainte d'aération (oxygénation) élevée, liée à la solubilité/au transfert de l'oxygène (fonction de la température) et à la rhéologie des milieux (viscosité)
	Agitation	<ul style="list-style-type: none"> - Absente, discontinue ou continue - Contrainte de cisaillement limitée - Peut limiter l'hétérogénéité du milieu 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies) - Contrainte de cisaillement importante (limitation des souches cultivables) - Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures)
	Antimousse	<ul style="list-style-type: none"> - Pas nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire
	Stérilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité de travailler en condition non stérile ou semi stérile du fait de la faible A_w (limitation des contaminants et de leur développement) et une fois l'implantation de la souche réalisée - Risque de contamination limité, principalement pour les souches à croissance lente et surtout par d'autres champignons - Prétraitement par cuisson ou traitement à la vapeur pour éliminer les principaux contaminants (flore autochtone) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaire - Risque de contamination élevé

Chapitre 3 : Fermentation solide

PROCEDE	Capteurs et contrôle du procédé/de la culture	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle et régulation compliqués des paramètres environnementaux (T, pH, humidité, biomasse, conditions nutritives,...) - Absence de capteurs <i>on line</i> pour le contrôle des paramètres environnementaux (pH, humidité, concentration en nutriments) 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle et régulation aisés des paramètres environnementaux - Capteurs <i>on line</i> disponibles
	OPEX	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles coûts opérationnels du fait d'une consommation d'énergie (aération, agitation) et d'eau de <i>process</i> limitée 	<ul style="list-style-type: none"> - Consommation d'eau et d'énergie (stérilisation, agitation, aération) importante - Durée importante des opérations unitaires
	CAPEX (réacteur/volume)	<ul style="list-style-type: none"> - CAPEX faible (coût des équipements et volume de réacteur limités du fait d'une quantité d'eau moins importante et d'une limitation dans les contraintes de stérilité) 	<ul style="list-style-type: none"> - CAPEX important (taille des fermenteurs)
	<i>Scale-up</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Besoin d'ingénierie et de conception de fermenteurs au niveau de l'échelle industrielle due à une faible standardisation, à l'hétérogénéité du système (gradients de T, pH,...), à une reproductibilité limitée (nécessité de robustesse), et à des problèmes de compaction - Problème d'extrapolation (en Occident surtout – réacteur de 20 T disponible au Japon) 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipements industriels disponibles
	<i>Downstream processing</i> (Extraction)	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'extraction (en fonction de l'application) ou faible volume de solvant utilisé - Haute impureté 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitements importants (volume important à traiter) - Impureté modérée
	Effluents	<ul style="list-style-type: none"> - Faible volume d'eaux résiduaires à traiter 	<ul style="list-style-type: none"> - Volume important d'eaux résiduaires à traiter

Chapitre 3 : Fermentation solide

CULTURE	Type de culture	- Cultures principalement en <i>batch</i>	- Cultures en <i>batch</i> , en <i>fed-batch</i> ou en continues
	Microorganismes	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes pluricellulaires et/ou aux organismes adaptés à une faible Aw et une forte pression osmotique (champignons filamenteux, supérieurs) - Favorable aux souches sauvages - Culture pure et possibilité de cultures mixtes avec synergie des métabolismes - Culture hétérogène - Inoculation en conidies ou en mycélium 	<ul style="list-style-type: none"> - Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures) - Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement - Cultures pures, peu favorable aux cultures mixtes - Culture homogène - Inoculation en cellules ou en volume de culture
	Milieu de culture	<ul style="list-style-type: none"> - Hétérogène - Matière première abondante et bon marché - Polymères solides insolubles - Prétraitement limité ou inexistant (déchets agricoles) - Quantité de substrat importante (concentration élevée, mais problème de diffusion des nutriments ; risque d'une concentration élevée en inhibiteurs) - Quantité d'eau limitante - Quantité d'air non limitante 	<ul style="list-style-type: none"> - Homogène (souche, nutriments, métabolites) - Matière première coûteuse - Soluble ou sous forme de fines particules en suspension - Prétraitement parfois nécessaire - Quantité de substrat limitée (faible concentration) - Quantité d'eau non limitante - Quantité d'air limitante
	Produits	<ul style="list-style-type: none"> - Productivité élevée (rendement similaire ou supérieur et/ou temps de culture plus court que pour la FML) - Performances accrues : stabilité plus élevée (T, pH même extrême), optimum plus large (T, pH), résistance à l'inhibition, affinité pour le substrat - Expression de molécules inédites (profil protéique riche) - Produit fermenté concentré si utilisation directe et donc pas de nécessité de concentration (liquide) 	<ul style="list-style-type: none"> - Produit (très) dilué
	Répression catabolique ou dégradation par des protéases	<ul style="list-style-type: none"> - Faible ou inexistante 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevée

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les industries biotechnologiques font partie des technologies essentielles pour le développement économique de demain. Elles emploient les microorganismes et les enzymes, pour feindre divers produits. La pectine lyase contribue à plusieurs applications industrielles donc elle est estimée comme un outil clé dans la biotechnologie. Cette enzyme pectinolytiques est extrêmement produite par des souches fongiques et levuriennes, mais également peut être produite par des souches bactériennes, des plantes et des animaux.

La fermentation sur un milieu solide est effectivement le procédé qui a été pratiquer pour la culture de ces types de champignons, pour de nombreux avantages de cette technique, elle est principalement basée sur la présence d'un substrat solide, qui est souvent des déchets agricoles comme le zeste de citron, la pulpe d'orange et le son de blé...etc, qui sont non seulement un support solide, mais sont aussi riches en nutriments. Les bioréacteurs un facteur très important qu'il doit être pris en considération pour le développement de ce processus, un système qui fournit toutes les conditions appropriées pour la croissance et l'activité de micro-organisme. On doit respecter plusieurs conditions, telles que le contrôle de la température, le pH et l'humidité, et la durée d'incubation, afin de produire de la pectine lyase dans des conditions optimales.

La pectine lyase est purifiée par plusieurs étapes d'abord l'enzyme est extraite en différentes concentrations de sulfate d'ammonium ou de solvant organique, puis isolée par un ou plusieurs différents types de chromatographie. L'étude des différentes paramètres physico-chimiques tels que la thermo-stabilité et d'autres facteurs, aident à améliorer son efficacité et son activité dans de nombreuses applications : alimentaires, industrielles et pharmaceutiques comme la clarification des jus et l'extraction des huiles... etc.

Enfin, comme perspectives à ce travail une amélioration de la production d'une enzyme nécessite l'application des nouvelles approches statistiques, utilisation de nouveaux résidus industriels dans l'extraction et la clarification des jus de fruit. Utilisation de la pectine lyase dans des nouvelles applications industrielles, est recommandée pour : l'extraction de l'huile d'olive et la clarification des jus de fruits.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Alana, A. ; Llama, M.J. ; Serra, J.L. (1991).** Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. FEBS Lett. **280**, 335–340
2. **Arzandeh, S.; Jinap, S.; Lioe, A. H. (2010).** Aflatoxin in raw peanut kernels marketed in Malaysia. Journal of Food and Drug Analysis, 18(1), 44-50
3. **Atalla, Sherien M.M.; EL Gamal, Nadia G.; Awad, Hassan M.; Ali, Nagia F. (2019).** Production of pectin lyase from agricultural wastes by isolated marine *Penicillium expansum* RSW_SEP1 as dye wool fiber. Heliyon, 5(8). doi: 10.1016/j.heliyon. 2019.e02302
4. **Adeel, S.; Gulzar, T.; Azeem, M.; Rehman, F.U.; Saeed, M.; Hanif, I.; Iqbal, N., (2017).** Appraisal of marigold flower-based lutein as natural colourant for textile dyeing under the influence of gamma radiations. Radiat. Phys. Chem. 130, 35–39.
5. **Assamoi, A.A. ; Destain J. ; Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **13**(2), 281-294
6. **Assis, SA. ; Ferreira, BS. Fernandes, P. Trevisan, HC. Cabral JMS, Oliveira. (2004).** OMMF. Gelatin immobilized pectin methyl-esterase for production of low methoxyl pectin. Food Chem; 86:333–7.
7. **Albersheim, P. Neukom, H. Deuel, H. (1960)** Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. Arch Biochem Biophys; 90 :46–51.
8. **A.F. Afifi, EM ; Fawzi, MA. Foaad, (2002).** Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 on orange peels waste, solid state culture. Ann. Microbiol., 52, 287-297
9. **Blanco, P. Sieiro, C. Villa, TG. (1999).** Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiol Lett; 175:1–9.
10. **Bai, ZH. Zhang, HX. Qi, HY. Peng, XW. Li, BJ. et al. (2004).** Pectinase production by *Aspergillus niger* using waste water in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. Bioresour Technol 95:49–52
11. **Botella, C. Diaz, A. Ory, I. Webb, C. Blandino, A. et al. (2007).** Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. Process Biochem 42:98–101

Références bibliographiques

12. **Branda, E. Turchetti, B. Diolaiuti, G. et al (2010).** Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiol Ecol* 72:354–369
13. **Brandão, LR. Libkind, D. Vaz, A.B.M et al (2011).** Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol Ecol* 76:1–13
14. **Buzzini, P. Martini, A. (2002).** Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* 93 :1020–1025
15. **Chisti, Y. (2014).** Encyclopedia of Food Microbiology fermentation (industrial) Basic Considerations., (10), 751–761.doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00106-3
16. **Chisti, Y. (2010).** Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. In: Flickinger, M.C. (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bio-separation, and Cell Technology*, vol. 7. Wiley, New York, pp. 4516–4534.
17. **Codner, RC.** Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. *J Appl Bacteriol* (2001); 84:147–60.
18. **Castilho, LR.; Medronho, RA.; Alves TLM et al. (2000).** Production and extraction of pectinases obtained by solid-state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol* 71 :45–50
19. **Celestino, SMC. Maria de Freitas, S. Medrano, FJ. Valle de Sousa, M. Filho, EXF. et al. (2006).** Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *J Biotechnol* 123:33–42
20. **Cavello, Ivana; Albanesi, Agustín; Fratebianchi, Dante; Garmedia, Gabriela; Vero, Silvana; Cavalitto, Sebastián (2017).** Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21(2), 319–329.doi:10.1007/s00792-016-0904-0
21. **Connell, L. ; Redman, R. ; Craig, S. et al (2008).** Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol* 56:448–459

Références bibliographiques

22. **Denis, S.; Eduardo da Silva, M.; Roberto da Silva Eleni, G. (2002).** Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. of microbial.* 33 (4), 318–324.
23. **Durand, A. (2003).** Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**, 113-125.
24. **David, S. Hibbett; Manfred Binder; Joseph, F. Bischoff; Meredith Blackwell; Paul, F. Cannon; Ove, E. Eriksson; Ning Zhang. et al. (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi., 111(5), 509–547. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
25. **Dayanand, A. Patil, SR. In:** Detection of potential fungal isolates for the production of pectinase from deseeded dried sunflower head; **(2003).**
26. **Dinu, D. Nechifor, MT. Stoian, G. Costache, M. Dinischiotu, A. et al. (2007).** Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol* 131 :128–137
27. **Dey, TB. Banerjee, R. (2014).** Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Braz J Microbiol* 45 :97–104
28. **Darah, I. Taufiq, MMJ. Lim, SH. (2013).** Pomelo citrus grandis (l.) osbeck peel as an economical alternative substrate for fungal pectinase production. *Food Sci Biotechnol.* doi.org/10.1007/s1006 8-013-0267-6
29. **Gummadi, SN. Panda, T. (2003).** Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. *Process Biochem* 38:987–996
30. **Hossam, S. Hamdy, (2005).** Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Annals of microbiology*, 55(3) 205-211
31. **Irshad, M. Anwar, Z. Mahmood, Z. Aqil, T. Mahmood, S. & Nawaz, H. (2014).** Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(1), 9-18.
32. **Janaina, P. Angelica, D. Nadia, L.D.N. (2018).** Mar. Biotechnological potential of agroindustrial waste in the synthesis of pectin lyase from *Aspergillus brasiliensis*. *Food Sci. Technol. Int.* 24 (2), 97–109.

Références bibliographiques

33. **Joshi, VK. Parmar, M. Rana, NS. et al (2006).** Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. *Food Technol Biotechnol* 44:253–256
34. **Kumar, Y.S. et al. (2012).** Pectinase production from mango peel using *Aspergillus foetidus* and its application in processing of mango juice. *Food Biotechnol.* **26**, 107–123
35. **Kemal, Sarioglu. Nilay, Demir. Jale, Acar. Mehmet,utlu. (2001).** The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. *Journal of Food Engineering* 47, 271-274
36. **Kashyap, DR. Vohra, PK. Chopra, S. Tewari, R. (2001).** Applications of pectinases in commercial sector: a review. *Bioresour Technol*; 77:215–27.
37. **Kashyap, DR. Soni, SK. Tewari, R. et al (2003).** Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 88 :251–254
38. **Kuhad, RC. Kapoor, M. Rustagi, R. et al (2004).** Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 20:257–263
39. **Lee, WC. Yusof, S. Hamid, NSA. Baharin, BS. et al (2006).** Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *J Food Eng* 73: 55–63
40. **Li, Z. Bai, Z. Zhang, B. Xie, H. Hu, Q. Hao, C. Xue, W. Zhang, H. et al (2005).** Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1483–1486
41. **Lima, Juliana Oliveira. Pereira, Jorge Fernando. Araújo, Elza Fernandes de. Queiroz, Marisa Vieira de (2017).** Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. *Brazilian Journal of Microbiology*, doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.009
42. **Mehnouche, A. Yazid, M. Khanani, Z. (2014).** Purification and characterization of thermal alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *Eur. Food Res. Technol.* 239: 21-29
43. **Money, Nicholas, P. (2016).** *The Fungi, Fungi and Biotechnology.*, (418), 401–424. doi :10.1016/b978-0-12-382034-1.00012-8
44. **Martinez, A. Cavello, I. Garmendia, G. et al (2016).** Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20:759–769

Références bibliographiques

45. **Merín, MG. Morata, de Ambrosini. VI (2015).** Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-*Saccharomyces* yeasts for enzymatic production during winemaking. *Lett Appl Microbiol* 60:467–474
46. **Natalia, M. Regina de Souza, S. Roberto da Silva Eleni, G. (2004).** Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47 (5), 813–819.
47. **Nakagawa, T. Kaichiro, Y. Tatsuro, M. Noboru, T. (2002).** Cold-active pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *J Biosci Bioeng* 94:175–177
48. **Normand, J. Ralet, MC. Thibault, JF. et al (2010).** Purification, characterization, and mode of action of a rhamnogalacturonan hydrolase from *Irpex lacteus*, tolerant to an acetylated substrate. *Appl Microbiol Biotech* 86:577–588
49. **Poturcu, K. Ozmen, I. Biyik, H. H. (2017).** Characterization of an Alkaline Thermostable Pectin Lyase from Newly Isolated *Aspergillus niger*_WHAK1 and Its Application on Fruit Juice Clarification. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42(1), 19–29. doi:10.1007/s13369-016-2041-6
50. **Pedrolli, D.A. Carmona, E.C. (2009).** Pectin lyase from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45, 610–616
51. **Pinelo, M. Zeuner, B. & Meyer, A. S. (2010).** Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 259-265
52. **Patidar, Mukesh Kumar. Nighojkar, Sadhana. Kumar, Anil. Nighojkar, Anand. (2018).** Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech*, 8(4), 199. doi :10.1007/s13205-018-1220-4
53. **Pedrolli, Danielle Biscaro. Carmona, Eleonora Cano. (2014).** Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* Able to Release Unsaturated Monogalacturonate during Pectin Degradation. *Enzyme Research*, 1–7. doi:10.1155/2014/353915
54. **Roberta, H.P.V. Flavia, M.L.P. Frederico, J.V.P. Daison, O.S. (2001).** Production of pectin lyase by *Penicillium grisoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz.J. Microbiol.* 32, 135–140
55. **Rafaella, B.S. Maria, R.V. Michei, R.Z.P. Garbriela, A.L.V. Viviane, C.P.L. Pedro, H.M. Juliana, A.S. Lidia, A.D. Igor, V.R.O. Aline, M.Y. Valker, A.D.F. Adalberto, P.**

Références bibliographiques

- Lara, D.S. (2015).** Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Front. Microbiol.* 10 (6), 269.
56. **Rahardjo, Y.S.P. Tramper, J. & Rinzema, A. (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **24**(2), 161-179.
57. **Ranveer, Singh Jayani. Shivalika, Saxena. Reena, Gupta. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: A review., 40(9), 2931–2944.doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.
58. **Revilla, I. Ganzalez-san jose, ML. (2003).** Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int J Food Sci Technol*; 38:29–36
59. **Sandri, Ivana Greice. Lorenzoni, Cristiane Menegoto Toscan. Fontana, Roselei Claudete. Da Silveira, Mauricio Moura. (2013).** Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 469–475. doi: 10.1016/j.lwt.2012.10.015
60. **Sidra, B. Javid, M. Naqvi, S.M.S. Raja, T.M.A. Guffar, M.G. Saqib, H.H. (2013).** Production and partial purification of pectin lyase by *Aspergillus niger* grown on orange peels. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (13), 1144–1149
61. **Sara, S. Jacinto, L. Graciela, S. Jorge, T. Nohemi, R. Patricia, L. Luis, G. Felipe, R. Carlos, H. (2009).** Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. *Enzym. Microb. Technol.* 44 (3), 123–128.
62. **Safia, K. Zahid, A. Zafar, I. Awais, A. Tahir, A. Sajid, M. Muhammad, I. (2014).** Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *J. Rad. Res. Appl. Sci.* 7, 327–332.
63. **Sakai, T. Okushima, M.** Purification and crystallisation of a protopectin- solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem* (1982); 46:667–776.
64. **Sakamoto, T. Hours, RA. Sakai, T. (1994).** Purification, characterization and production of two pectic-transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*; 58:353–8.
65. **Sakai, T.** Protopectinase from yeast and yeast-like fungus. In: Wood WA, Kellogg ST, editors. *Methods in enzymology*, 161. San Diego: Academic Press; (1998) p. 335–50.
66. **Souza, JVB. Silva, TM. Maia, MLS. Teixeira, MFS. (2003).** Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A. *UMIDA.1. Process Biochem*; 4:455–8.

Références bibliographiques

67. **Singh nee' Nigam, Poonam. Pandey, Ashok. (2009).** Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation., doi:10.1007/978-1-4020-9942-7
68. **Sangeeta, Yadav. Pramod Kumar, Yadav. Dinesh, Yadav. Kapil Deo Singh, Yadav. (2008).** Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus.*, 43(5), 547–552. doi: 10.1016/j.procbio.2008.01.015
69. **Steven, R. Herron. Jacques, A. E. Benen. Robert, D. Scavetta. Jaap, Visser. Frances Journak, (2000).** Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. Colloquium, 97 (16) 8762-8769
70. **Yadav, S. Yadav, P.K. Yadav, D. Yadav, K.D.S (2009).** Purification and characterization of pectin lyase secreted by *Penicillium citrinum.*, 74(7), 800–806. doi:10.1134/s0006297909070141
71. **Siddiqa, A. Noreen, S. Khalid, AM. Raza, A. Anwar, Z. Irshad, M. (2018).** Statistical optimization of Pectin Lyase from *Penicillium digitatum* in Solid State Fermentation. International Journal of Applied Biology and Forensics 2: 157-170
72. **Thangaratham, T. Manimegalai, G. (2014).** Optimization and production of pectinase using agro waste by solid state and submerged fermentation. Inter.J. curr.Microbiol. Appl. Sci. 3 (9), 357–365
73. **Van der Vlugt-Bergmans, CJB. Meeuwse, PJA. Voragen, AGJ. van Oogen, AJJ. (2000).** Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. Appl Environ Microbiol; 66:36–41.
74. **Wei-Chen, C. Huann-Ju, H. Tsung-Che, T. (1998).** Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium splendens* infected cucumber fruits. Bot. Bull. Acad. Sin. (Taipei) 39, 181–186
75. **Yadav, S. et al (2008).** Purification and characterisation of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices. Ann. Microbiol. 58, 61–65
76. **Yadav, S. Shastri, N.V. (2005).** Partial purification and characterization of a pectin lyase produced by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. Indian J. Biotechnol. 4, 501–505
77. **Yadav, S. & Shastri, N. V. (2004).** Partial purification of an extracellular pectin lyase from a strain of *Aspergillus niger*. Indian Journal of Microbiology, 4, 201-204.

Présenté par : LEKRINE Lokmane

Date de soutenance : 20/12/2020

Intitulé : le pectine lyase d'origine fongique et levurienne : production et séparation de l'enzyme

Résumé :

Les enzymes d'origines microbiennes 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 humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Plusieurs enzymes industrielles sont d'origine fongique. Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, les pectinases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies.

Les enzymes pectinolytiques font parties des enzymes glycolytiques connues par leurs applications industrielles multiples. La pectine lyase est la plus abondante de la famille des pectinases produites par les champignons et les levures, les plus répandu en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économiques majeurs.

Ce travail a pour but la production de la pectine lyase par des champignons et des levures, selon un procédé biotechnologique de la fermentation solide à base de résidus agro-alimentaire comme un support tel que le zeste de citron, l'écorce de l'orange et le son de blé. Ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Le premier chapitre rapporte des connaissances sur les champignons et levures en déterminant leurs morphologies, leurs classifications, leurs habitats et leurs importances dans le domaine industriel. Après, j'ai procédé à la classification de la PL dont la famille des pectinases qui trouve une grande masse d'application dans l'industrie agroalimentaire. Le dernier chapitre comporte la fermentation solide avec la technologie des bioréacteurs pour la production des enzymes pectinolytiques. La purification de l'extrait enzymatique brut est réalisée par séparation des parties protéiques au sulfate d'ammonium ou l'utilisation des solvants organiques, des chromatographies gel filtration et échangeuses d'ions.

Mots clés : Pectine lyase, Champignons, Levures, FMS, Bioréacteur, Purification.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme DAKHMOUCHE S. MCA, ENS Assia Djébar, Constantine.

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. MCB, UFM Constantine 1

Examineur : Mme LABBANI F.Z.K MCB, ENS Assia Djébar, Constantine.

Année universitaire : 2019/2020