

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم : ..... : **Département : Microbiologie**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biotechnologie**

**Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique**

Intitulé :

---

## **La production des enzymes pectinolytiques par *Aspergillus niger* cultivé sur les résidus d'agrumes.**

---

**Présenté et soutenu par : HASNAOUI Sofia**

**Le : 09/2020**

**ZEMMOURI Sara**

**ZIADI Chaima**

**Jury d'évaluation :**

Président du jury : **BENKAHOUL Malika**

Maitre de Conférences B (UFM Constantine).

Rapporteur : **LEGLIMI Hind**

Maitre de Conférences A (UFM Constantine).

Examineur : **BOUCHERIT Zaineb**

Maitre Assistante A (UFM Constantine).

*Année universitaire*  
**2019-2020**



# Remerciements

---

*On remercie en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la patience pour terminer ce travail.*

*On adresse notre reconnaissance à Mme Leghlimi Hind Maitre de Conférences classe A. Université des Frères Mentouri. Constantine, qui a dirigé ce travail, de nous avoir si bien encadré, orienté et fait bénéficier de ses précieux conseils, sa riche expérience et de ses compétences. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Docteur.*

*On tient à remercier aussi tous les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.*

*A :*

*Mme la présidente BENKAHOUL Malika Maitre de Conférences classe B. Université des Frères Mentouri. Constantine.*

*Mme l'examinatrice BOUCHERIT Zaineb Maitre Assistante classe A. Université des Frères Mentouri. Constantine.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignants, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises.*

*Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.*

*On ne saura oublier tous nos proches qui nous ont soutenus durant ces années.*

*Un très grand merci à nos parents Merci pour tout, pour le soutien infaillible dans les moments les plus compliqués, pour les encouragements depuis toujours, Par ce travail, on tient à vous rendre hommage, car vous le mérites.*

*Vos persévérances et vos sacrifices sont pour nous des exemples.*

*Merci à nos amies B. Rayene et B. Houneida pour vos encouragements.*

# *Dédicace*

---

*Afin d'être reconnaissante\_ envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé*

*À effectuer ce travail de recherche,*

*Je dédie ce mémoire :*

# Dédicace

---

## *A MA TRÈS CHÈRE MÈRE :*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.*  
*Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.*  
*Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi,*  
*reçoit ce travail en signe de ma*  
*vive reconnaissance et ma profonde estime.*  
*Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je*  
*puisse te combler à mon tour.*

## *A MON TRÈS CHER PÈRE :*

*Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.*  
*Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme*  
*et de la confiance en soi.*  
*Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.*  
*Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement*  
*sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter.*  
*Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain*  
*et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté*  
*et ne jamais te décevoir.*  
*A mes chères sœurs, Abir, NourHene et Djouléne, qui m'ont soutenu et encouragé*  
*depuis toujours dans les pires moments.*  
*Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur,*  
*quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.*

*Hasnaoui Sofia*

# Dédicace

---

*A ceux qui me sont les plus chers  
A ceux qui ont toujours cru en moi  
A ceux qui m'ont toujours encouragé  
Je dédie ce mémoire à ... ✿*

## *A Mes Très Chers Parents*

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que je me suis réalisée.*

*Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.*

*Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

*Zemmouri Sara*

# Dédicace

---

*Je dédie ce travail à ...*

*A mes parents,*

*Pour m'avoir soutenue tout au long de mes études.*

*Pour m'avoir permise d'être qui je suis.*

*Pour vos mains qui ont tant travaillées,*

*Pour votre cours qui m'a ton donné,*

*Pour vous qui m'avez tant aimé. Que Dieu les protège.*

*A ma sœur Meriem et à mes frères Mohamed et Salah eddine*

*Pour tous les bons moments passés ensemble.*

*Pour avoir été toujours présentes à mes côtés quand j'en avais besoin.*

*Qu'ils trouvent dans ce modeste travail la preuve de mon amour et ma  
gratitude éternelle.*

*A mes amis et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment*

*Ziadi Chaima*



## Table des matières

### Résumés

### Abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Introduction générale..... 2

### Chapitre I: Revue de littérature

#### I.1. Introduction..... 5

#### I.2. Fermentation sur milieu solide (FMS)..... 5

##### I.2.1. Définition ..... 5

##### I.2.2. Paramètres de contrôle ..... 6

##### I.2.3. Applications ..... 8

##### I.2.4. Avantages..... 9

##### I.2.5. Inconvénients ..... 9

#### I.3. Les enzymes..... 10

##### I.3.1. Définition ..... 10

##### I.3.2. Applications ..... 12

##### I.3.3. Les pectinases ..... 12

##### I.3.4. Utilisations des enzymes pectinolytiques..... 18

##### I.3.5. Origine des polygalacturonases..... 20

##### I.3.6. Mode et mécanisme d'action des polygalacturonases ..... 21

#### I.4. Milieux de culture utilisés pour la production des enzymes pectinolytiques..... 22

##### I.4.1. Sources de nutriments ..... 22

##### I.4.2. Utilisation des résidu-industriels pour la production des enzymes pectinolytiques..... 23

#### I.5. Champignons pectinolytiques ..... 23

##### I.5.1. Généralités sur les champignons ..... 23

##### I.5.2. Les *Aspergilli* ..... 24

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

II.1. Introduction.....	30
II.2. Matériel.....	30
II.2.1. Matériel végétal .....	30
II.2.2. Matériel microbiologique .....	30
II.2.3. Milieux de culture.....	31
II.3. Méthodes.....	31
II.3.1. Préparation du matériel végétal (substrat de fermentation) .....	31
II.3.2. Réactivation de la souche fongique .....	32
II.3.3. Production de la polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyer.....	33
II.3.4. Dosage de l'activité enzymatique .....	36
II.3.5. Purification de l'extrait enzymatique brut .....	37
<b>Chapitre III: Discussion générale .....</b>	<b>41</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>45</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Résumé

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases, font partie des enzymes hydrolases connues par leurs applications industrielles multiples. Les polygalacturonases sont les plus connues de la famille des pectinases produites par *Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêt économique majeur. Ce travail vise la production des polygalacturonases selon le procédé de la fermentation solide à base des résidus d'agrumes (citron et orange), ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes. Aussi, ces substrats sont riches en nutriments surtout la pectine qui est le substrat inducteur de ces enzymes. Les fermentations sont effectuées sur les résidus de citron ou d'orange afin de choisir le meilleur substrat. Après humidification des substrats à 70%, inoculation par la moisissure *Aspergillus niger* et incubation à 30°C pendant 5 jours, l'extraction des enzymes est effectuée avec l'eau distillée, suivi d'une filtration et d'une centrifugation. Le surnageant obtenu sert pour la mesure de l'activité EndoPGase par viscosimétrie, et le dosage de l'activité ExoPGase selon la méthode de Somogy et Nelson, (1952). Une purification partielle de l'extrait enzymatique brut est aussi envisagée, par fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium et un dessalage et concentration par dialyse. Au vu des résultats des études précédentes, l'*Aspergillus niger* est utilisé à échelle industrielle pour la production des pectinases, aussi les résidus d'agrumes semblent un bon substrat pour ce type de production, selon la fermentation à l'état solide.

**Mots clés :** *Aspergillus niger*, les enzymes pectinolytiques, l'endopolygalacturonase (EndoPGase), l'exopolygalacturonase (ExoPGase), fermentation sur milieu solide (FMS), résidus d'agrumes (orange et citron), substances pectiques.

## **Abstract**

Pectinolytic enzymes or pectinases are among the hydrolyser enzymes known by their multiple industrial applications. Polygalacturonases are well known of the pectinase family produced by *Aspergillus niger*, the most widely responded fungal species in industry capable of synthesizing a multitude of metabolites of major economic interest. This work marks the production of polygalacturonases using the solid-state fermentation (SSF) based on citrus fruit residues (lemon and orange), with the aim of reducing the cost of producing these enzymes. Also, these substrates are rich in nutrients especially pectin which is the inducing substrate of these enzymes. Fermentations are carried out on the lemon or orange residues in order to choose the best substrate. After humidification of the substrates at 70%, inoculation with the mold *Aspergillus niger* and incubation at 30 ° C for 5 days, the extraction of the enzymes is carried out with distilled water, followed by filtration and centrifugation. The supernatant obtained is used for the measurement of EndoPG activity by viscometry, and the assay of ExoPG activity according to the method of Somogy and Nelson, (1952). A partial purification of the crude enzyme extract is also envisaged, by fractionation of the proteins with ammonium sulfate and desalting and concentration by dialysis. Based on the results of previous studies, *Aspergillus niger* is used on an industrial scale for the production of pectinases, so citrus residues appear to be a good substrate for this type of production, depending on solid fermentation.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, pectinolytic enzymes, endopolygalacturonase (EndoPGase), exopolygalacturonase (ExoPGase), solid-state fermentation (SSF), citrus residues (orange and lemon), pectic substances.

**ملخص**

تعد الإنزيمات المحللة للبكتين من بين الإنزيمات المعروفة بتطبيقاتها الصناعية المتعددة. Polygalacturonases الأكثر استعمالاً التي تنتجها *Aspergillus niger*، وهي أكثر الأنواع الفطرية استجابة على نطاق واسع في الصناعة، والقادرة على تصنيع العديد من المواد ذات الأهمية الاقتصادية الكبرى. تستهدف هذه الدراسة إنتاج polygalacturonases باستخدام عملية التخمير الصلبة المعتمدة على بقايا الحمضيات (الليمون والبرتقال)، بهدف تقليل تكلفة الإنتاج، حيث تعتبر الحمضيات من الفواكه الغنية بالعناصر الغذائية خاصة البكتين الذي يعتبر الركيزة المحفزة لهذه الإنزيمات. يتم إنتاج هذا النوع من الإنزيمات بالاعتماد على بقايا الليمون أو البرتقال من أجل اختيار أفضل ركيزة. بعد ترطيب الركائز إلى 70٪، باستخدام *Aspergillus niger* للزرع. يتم حضن الحوجلة في المزارع عند 30 درجة مئوية لمدة 5 أيام. يتم استخراج الأنزيمات بالماء المقطر، يليه الترشيح والطررد المركزي. تستخدم المادة الطافية التي تم الحصول عليها لقياس نشاط EndoPG عن طريق قياس اللزوجة، وأما قياس نشاط ExoPG فيتم وفقاً لطريقة (Somogy Nelson (1952)، وكذا تنقية جزئية لمستخلص الإنزيم الخام، عن طريق تجزئة البروتينات بكبرينات الأمونيوم وإزالة الملح والتركيز عن طريق التصفية. بناءً على نتائج الدراسات السابقة، يتم استخدام *Aspergillus niger* على نطاق صناعي لإنتاج هذه إنزيمات، لذلك تبدو مخلفات الحمضيات ركيزة جيدة لهذا النوع من الإنتاج، اعتماداً على التخمير الصلب.

**الكلمات المفتاحية:** *Aspergillus niger*، الإنزيمات المحللة للبكتين، ExoPGase، EndoPGase، الزراعة في الأوساط الصلبة، بقايا الحمضيات (برتقال وليمون)، البكتين.

## Abréviations

- ***a<sub>w</sub>*** : Activité de l'eau.
- **DNS** : 3,5 Acide dinitrosalicylique.
- **EB** : Extrait brut.
- **EC** : Enzyme commission.
- **EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique.
- **ExoPG** : Exopolygalacturonase.
- **EndoPG** : Endopolygalacturonase.
- **EP** : Extrait purifié.
- **EEPP** : Extrait enzymatique prépurifié.
- **FDA** : *Food and Drug Administration*.
- **FMS** : Fermentation sur milieu solide.
- **FML** : Fermentation en milieu liquide.
- **GH** : Glycosides hydrolases.
- **kDa** : Kilodalton.
- **kJ** : Kilojoule.
- **I.U.B.** : *International Union of Biochemistry*.
- **GRAS** : *Generally Regarded As Safe*.
- **MF** : Matière fraîche.
- **MS** : Matière sèche.
- **PDA** : Potato Dextrose Agar.
- **PE** : Pectinestérase.
- **PG/PGase** : Polygalacturonase.
- **PGL** : Polygalacturonate lyase.
- **pH** : Potentiel d'hydrogène.
- **PMG** : Polyméthylgalacturonase.
- **PMGL** : Polyméthylgalacturonate lyase.
- **RF** : Réduction en fluidité.
- **rpm** : Rotation par minute.
- **SA** : Sulfate d'ammonium.
- **SDS page** : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

---

**Liste des figures**

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Chapitre I : Revue de littérature</b>		
1	Processus de fermentation solide	6
2	Mécanisme d'action des enzymes	11
3	Applications des enzymes	12
4	Structure schématique de la pectine	13
5	Mode d'action des pectinases	14
6	L'acide galacturonique (a) et l'acide polygalacturonique (b)	16
7	Réaction d'hydrolyse de la liaison $\alpha$ -(1-4) du PGA par la polygalacturonase	16
8	Exemple de topologie du site actif des glycosides hydrolases en forme de sillon (A) en forme de poche (B) et en forme de tunnel (C)	22
9	<i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2 (a) et <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2S5 (b)	26
10	Aspect microscopique (a) et représentation schématique du conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> (b)	27
<b>Chapitres II : Matériel et méthodes</b>		
11	Matériel végétal	30
12	Etapas de la préparation du substrat de fermentation	31

13	La souche d' <i>Aspergillus niger</i> (a) mycélium aérien, (b) revers de la boîte	33
14	Préparation de l'inoculum	33
15	La dialyse	38
16	Le boudin de dialyse	39

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Chapitre I : Revu de littérature</b>		
1	Classification des enzymes	11
2	Propriétés physico-chimiques de quelques polygalacturonases	17
3	Classification des lyases	18
4	Applications des enzymes pectinolytiques	19
5	Origine des polygalacturonases	20
<b>Chapitres II : Matériel et méthodes</b>		
6	La masse de sulfate d'ammonium ajoutée pour arriver à 90%	38

# *Introduction*

## Introduction générale

Chaque année, le monde produise 2.12 milliards de tonnes de déchets, parmi ces déchets environ 34 millions de tonnes d'écorces et de graines d'agrumes ont été générés pendant la transformation des aliments (**Martin et al., 2010**). Sachant que, les agrumes occupent la seconde place des échanges mondiaux des produits végétaux (**Ferhat et al., 2010**). En effet, la production des agrumes en Algérie atteint 15 millions de quintaux en 2019 selon le ministre. Durant ce processus de la transformation industrielle des agrumes, des pertes colossales sont infligées aux industries, car juste environ 50% du poids des oranges et de citrons frais sont transformés en jus, et le reste des fruits sont considérés comme des sous-produits (pelures, grains d'agrumes) (**Rodriguez-Lopez et al., 2013**).

Par ailleurs, l'accumulation de ces substrats, cause de graves problèmes environnementaux. Récemment, les chercheurs se sont tournés vers la réutilisation de ces déchets industriels. Cependant la peau d'agrumes peut être le substrat important pour la production de divers enzymes y compris les pectinases, et ont donc prouvé que, l'utilisation des déchets agro-industriels permet de diminuer les coûts de production et par conséquent de minimiser la pollution de l'environnement d'une part, et de l'autre part d'augmenter le rendement en produits désirés, surtout quand ils sont utilisés pour une fermentation à l'état solide.

La nouvelle biotechnologie, permet la valorisation de ces sous-produits par l'utilisation des procédés de bio-fermentation ; la fermentation sur milieu solide (FMS) présente de nombreux avantages, y compris l'utilisation des résidus agro-industriels, bons marchés pour produire divers enzymes commerciales (**Pandey, 1994**).

La pectinase ou les enzymes pectinolytiques trouvent une très large application dans l'industrie agro-alimentaire dont la principale utilisation est la clarification des jus de fruits (**Jayani, 2005**). Dans ce sens la plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique, l'*Aspergillus* est le genre le plus communément utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques (**Heerd et al., 2012**), particulièrement avec l'espèce *niger* (**Rodriguez-Fernández et al., 2012**). Les préparations des pectinases à partir de cette moisissure contiennent : les polygalacturonases, les pectinestérases et les pectine-lyases.

Dans cette optique, la présente étude vise l'utilisation d'*Aspergillus niger* pour la production de polygalacturonases par fermentation sur milieu solide à base de résidus

d'agrumes (écorce d'orange et de citron) ; grâce à leur richesse en pectine, protéines et en carbohydrates.

Dans le cadre du présent travail, un plan adopté pour explorer cet objectif est subdivisé en trois grandes parties :

- Dont la première, est une synthèse bibliographique mettant au point la FMS et ces avantages, les enzymes et leurs applications dans divers domaines, les enzymes pectinolytiques et les champignons producteurs de ces enzymes.
- La deuxième partie expérimentale mettant au point le matériel et les méthodes utilisés pour la préparation des sous-produits et l'étude de la composition chimique du substrat de fermentation, la production de PGase par *A. niger* selon la culture en milieu solide à base des résidus de citron et d'orange, et de poursuivre par une purification partielle de l'extrait enzymatique brut.
- Une discussion générale, en se basant sur quelques résultats des travaux antérieurs, permettant d'évaluer notre thématique de recherche, vu qu'on n'a pas eu la chance d'appliquer notre protocole expérimental pour obtenir des résultats, et on a donc eu recours aux résultats des chercheurs qui ont adopté la même méthode du protocole.

Ce manuscrit sera clôturé par une conclusion générale. Des perspectives seront proposées pour donner suite à cette étude, dans le but d'améliorer la production de ces enzymes et de compléter ce travail.

# *Chapitre I*

---

## I. Revue de littérature

### I.1. Introduction

L'homme depuis des millénaires, a utilisé les microorganismes, entre autres les mycètes, à des fins alimentaires pour la fabrication de produits fermentés : pain levé, fromage et boissons alcoolisées, sans même se douter de leur existence (**Bousseboua, 2004**).

Par ailleurs, Pasteur a été le premier qui a établi au 19<sup>ème</sup> siècle, le rôle fondamental des microorganismes, dans le processus de fermentation de la bière et d'autres produits diététiques, grâce aux leurs propriétés métaboliques (**Bousseboua, 2004**).

Ainsi, l'exploitation industrielle des champignons a gagné peu à peu divers domaines : l'industrie pharmaceutique, l'industrie chimique..., en basant sur les nouvelles biotechnologies qui ont ouvert des champs d'application nouveaux et considérables à la microbiologie industrielle et même à la microbiologie alimentaire, en mettant sur le marché des produits totalement nouveaux, par l'exploitation d'aptitudes métaboliques exceptionnelles des champignons principalement les espèces du genre *Aspergillus* notamment l'*Aspergillus niger* qui produit des métabolites d'intérêt économique majeur : les acides organiques (l'acide lactique, l'acide citrique...), les enzymes (l'amylase, les pectinases...) (**Bousseboua, 2004**). En effet, la production de métabolites exige la culture de ces microorganismes par fermentation en milieu liquide (FML) ou par fermentation sur milieu solide (FMS). En se basant sur l'application de la FMS qui représente une gamme d'avantages, ce qui encourage par conséquent, le recours à ce procédé pour produire des métabolites à haute valeur ajoutée (**Gassara, 2012**).

### I.2. Fermentation sur milieu solide (FMS)

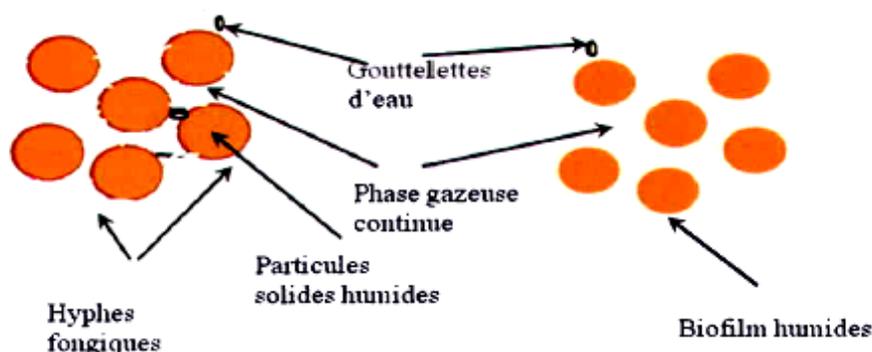
#### I.2.1. Définition

La fermentation sur milieu solide correspond à la croissance de microorganismes aérobies ou anaérobies, sur des particules solides humides en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre (**Durand, 2003 ; Gervais et al., 2003 ; Rahardjo et al., 2006**). Ces microorganismes croissent sur une matrice solide à laquelle est liée une phase liquide, et une phase gazeuse, qui est piégée dans ces particules ou entre celles-ci (**Rahardjo et al., 2006**).

De ce fait les moisissures ont été considérées comme l'organisme le plus adapté à une fermentation solide, grâce aux hyphes qui peuvent se développer et pénétrer sur la surface

des particules solides et entre elles, et puis les coloniser (**Dos Santos, 2004**). Néanmoins, il existe quelques procédés qui intègrent les bactéries et les levures (**Gassara, 2012**). La fermentation sur milieu solide diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (**Duchiron *et al.*, 2011**). Les substrats utilisés dans les processus de FMS sont souvent des produits ou sous-produits de l'agriculture, de la foresterie ou de la transformation alimentaire. Typiquement, la source d'éléments nutritifs est au sein de la particule (**Gassara, 2012**).

La FMS est donc constituée de trois phases (Figure 1) : une matrice (phase solide), une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice, et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. La capacité de rétention en eau des supports solides peut aller de 12 à 90 %, soit une activité de l'eau ( $a_w$ ) comprise entre 0.65 et 0.98 (**Assamoi *et al.*, 2009**).



**Figure 1:** Processus de fermentation solide (**Gassara, 2012**).

### I.2.2. Paramètres de contrôle

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

➤ L'humidité

L'humidité est l'un des paramètres physico-chimiques qui contrôle la culture microbienne. La quantité d'eau ajoutée est en fonction de la capacité de rétention d'eau du substrat solide et de la nature du microorganisme en question. Cette teneur en eau doit être suffisante pour le métabolisme des champignons, en gardant la matrice solide (pas d'écoulement d'eau), et sans affecter la porosité du substrat, qui va réduire les échanges gazeux (**Gervais et Bensoussan, 1994**).

➤ La température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en milieu solide. La faible conductivité thermique de l'air comparée à celle de l'eau, les supports et l'absence d'eau libre, limite le transfert de chaleur et son élimination. Ceci favorise des élévations de température pouvant dépasser les 20°C de la température d'incubation. Ce phénomène se produit surtout lors de la croissance de la souche, et il est directement proportionnel à son activité métabolique génératrice de chaleur, de l'ordre de 100 à 300 kJ par kg de masse cellulaire (**Pandey, 2003 ; Manpreet et al., 2005**). Ceci pose un sérieux problème au cours de la fermentation à l'état solide. Et par conséquent, le maintien de la température établie au début du processus, qui représente la température optimale de la croissance du microorganisme utilisé, est une tâche très difficile (**Raimbault, 1980**).

La solution du problème réside donc, dans l'élimination du surplus de chaleur. En fermenteur solide, la régulation thermique est réalisée par un brassage « Malaxage doux » du milieu afin de ne pas endommager le mycélium. En combinaison à ceci, le milieu peut être refroidi par passage d'un flux d'air humidifié et refroidi à travers le milieu (**Duchiron et Copinet, 2011**).

➤ Le pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (**Manpreet et al., 2005**). Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée, par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'acidité du milieu. Un autre système de régulation passif consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon (**Raimbault, 1998 ; Sandhya et al., 2005**).

**Raimbault (1980)** et **Roussos (1985)**, ont démontré qu'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée confère au milieu, un pouvoir tampon qui permet de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance des microorganismes. 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  $\text{Ca}^{2+}$  ou des solutions alcalines. (**Assamoi et al., 2009**).

➤ L'aération

L'aération est un facteur essentiel en fermentation sur milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation, pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux, la dissipation de la chaleur métabolique, l'élimination du  $\text{CO}_2$  et de certains métabolites volatils, en évacuant la chaleur dégagée par les microorganismes (**Duchiron et Copinet, 2011 ; Raimbault, 1998**). L'aération se fait par une injection d'air comprimé humidifié stérile afin de ne pas assécher le milieu, à travers les fermenteurs à aération forcée. Le débit est en fonction de la nature du microorganisme mis en jeu et de la porosité du substrat (**Raimbault, 1980**).

### I.2.3. Applications de la FMS

La fermentation sur milieu solide, constitue le processus de production industrielle le plus répandu. Généralement la FMS est appliquée dans le domaine de l'industrie alimentaire humaine (fromage, production de champignons comestibles, choucroute et saucissons secs), le compostage et l'ensilage, la biofiltration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylase, cellulase, protéase, xylanase, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organiques, etc.) (**Gassara, 2012**).

Les travaux actuels sur la FMS, se focalisent sur l'application de ces procédés dans le développement de bioprocédés à savoir la bioremédiation, la biodégradation des composants toxiques, la détoxification biologique des résidus agro-industriels et la production de produits à haute valeur ajoutée. Ces derniers se composent, à titre indicatif, de métabolites secondaires biologiquement actifs incluant les antibiotiques, les alcaloïdes, les biofertilisants..., etc. Les procédés de FMS offrent des avantages potentiels dans la

bioremédiation et dans la détoxification biologique des composants dangereux et toxiques (Gassara, 2012).

#### **I.2.4. Avantages de la FMS**

L'utilisation des procédés de fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages (Assamoi *et al.*, 2009) ceux-ci incluent :

- La simplicité de cette technologie (applicable en milieu rural) et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). Le coût des équipements et des opérations est donc faible.
- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes.
- De plus, les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides. Etant donné que la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat. Ce qui réduit le coût énergétique nécessaire.
- En calibrant bien les particules du substrat (hachage, broyage, tamisage, etc.), l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue. En cas d'aération active ou forcée, une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules.
- En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides, fortement visqueux. Ce qui entraîne des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène (Durand, 1983).

La fermentation sur milieu solide représente aussi quelques limitations à considérer, en essayant de les minimiser au maximum possible.

#### **I.2.5. Inconvénients de la FMS**

Bien que la fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages, ce procédé souffre aussi de quelques limitations (Assamoi *et al.*, 2009) :

- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur,

pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation. L'évaporation compense partiellement cet échauffement, mais en réduisant l'eau disponible. L'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur.

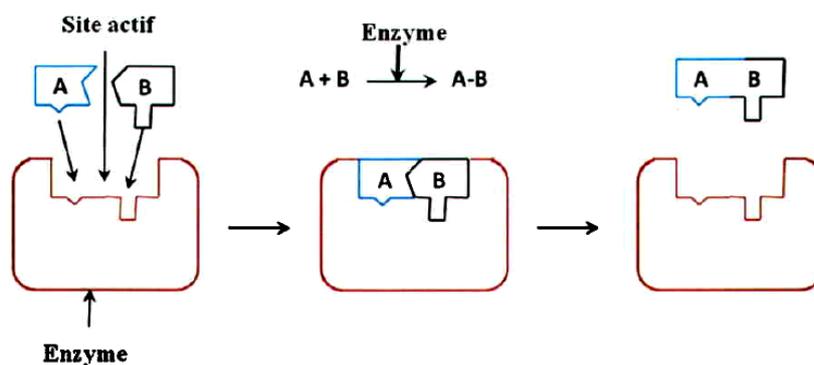
- Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire.
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.
- Etant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture.

### **I.3. Les enzymes**

#### **I.3.1. Définition**

Chaque cellule vivante produit une gamme d'enzymes, qualifiées de biocatalyseurs protéiques, ayant de forts poids moléculaires (10 à 100 kDa), destinées à la catalyse de l'ensemble de ses réactions biochimiques vitales. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série L, unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide (**Bergmeyer et al., 1979 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**). Ces enzymes sont normalement produites en faible quantité mais certains microorganismes, bactéries et champignons, les produisent en quantités relativement importantes. C'est le cas d'exo-enzymes, capables d'hydrolyser les polymères présents dans le milieu : protéines, polysaccharides..., dont les produits de dégradation sont alors absorbés par les microorganismes et utilisés comme nutriments élémentaires de croissance (**Bousseboua, 2004**). En présence de son substrat, en concentration suffisante et dans des conditions physico-chimiques adéquates, de pH et de température ( $T^\circ$ ), l'enzyme (E) convertit ce substrat (S), pour former un ou des produit(s) (P). La spécificité des enzymes est généralement comparée à celle d'une clef qui n'ouvre qu'une seule porte (Figure 2) (**Moutounet, 2014**).

La production industrielle des enzymes microbiennes, est obtenue par la fermentation de substrats, constitués essentiellement de sous-produits peu coûteux des industries agro-alimentaires. Elles sont obtenues à partir des cultures industrielles de bactéries et de champignons, sélectionnés par mutation ou, de plus en plus, génétiquement manipulés afin d'obtenir les meilleurs rendements (**Bousseboua, 2004**).



**Figure 2:** Mécanisme d'action des enzymes (**Gassara, 2010**).

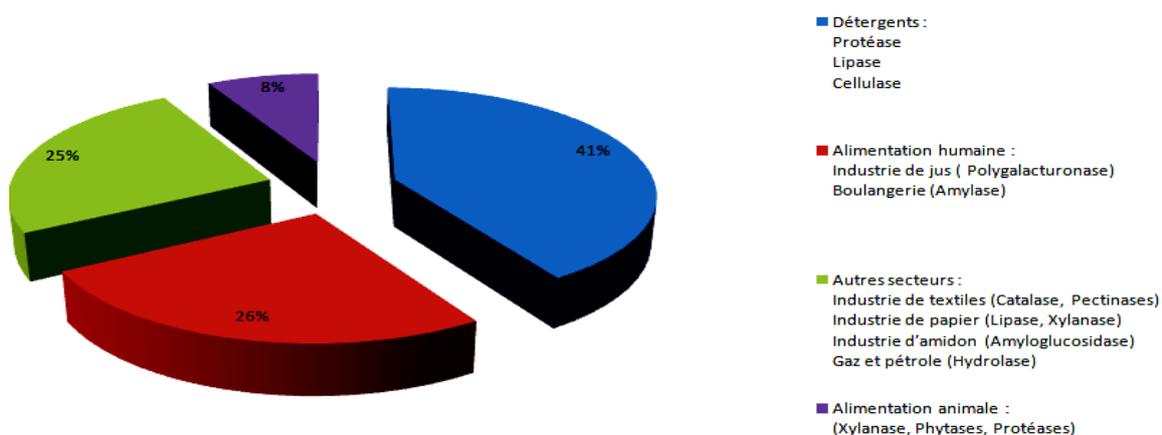
La classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'I.U.B (*International Union of Biochemistry*) (Annexe n°1). Les enzymes se répartissent en six classes (Tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (**Rao et al., 1998 ; Assamoi et al., 2009**).

**Tableau 1:** Classification des enzymes (**Rao et al., 1998 ; Assamoi et al., 2009**).

E.C (Classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1.X.X.X	Oxydoréductase	Oxydoréduction.
E.C.2.X.X.X	Transférase	Transfert de groupements fonctionnels.
E.C.3.X.X.X	Hydrolase	Hydrolases.
E.C.4.X.X.X	Lyase	Elimination de groupement et formation de double liaison.
E.C.5.X.X.X	Isomérase	Isomérisation.
E.C.6.X.X.X	Ligase	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP.

### I.3.2. Applications

Environ 200 enzymes sont commercialisées dans le marché (**Gassara, 2012**). Aujourd'hui le marché mondial des enzymes industrielles se développe rapidement, étant actuellement valorisé à plus de 2 milliards d'euros par an. Les principaux secteurs utilisant les enzymes sont plusieurs citant : les détergents, le traitement de l'amidon et la production d'aliments pour les animaux. Les enzymes sont désormais utilisées dans de nombreuses applications très diverses, allant du blanchiment biologique du papier jusqu'aux techniques plus efficaces pour l'extraction de pétrole et de gaz naturel (Figure 3). Les enzymes alimentaires sont obtenues par extraction à partir de plantes ou d'animaux, ou par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes ; elles sont ajoutées aux aliments pour exercer une fonction technologique dans la fabrication, la transformation, la préparation, le traitement, le conditionnement, le transport ou l'entreposage (stockage) de denrées alimentaires, y compris celles utilisées en tant que auxiliaires technologiques. En général, l'utilisation des enzymes est très rentable, sans danger et reconnue comme une technologie verte (**Charnock et Cleary, 2005**).



**Figure 3:** Applications des enzymes (**Gassara, 2012**).

### I.3.3. Les pectinases

Dans la nature, les microorganismes sont capables de synthétiser et sécréter une multitude d'enzymes d'intérêt industriel. Parmi ces enzymes, les pectinases qui hydrolysent les substances pectiques, constituant les parois cellulaires des agrumes, des bananes, des betteraves..., etc. Ces enzymes sont largement distribuées dans les plantes supérieures et les microorganismes (**Whitaker, 1990**).

L'application commerciale des pectinases a été observée premièrement en 1930, dans la préparation des jus de fruits et du vin. Et en 1960, les scientifiques ont commencé d'utiliser ces enzymes plus efficacement. Actuellement les pectinases sont désormais appliquées dans le secteur commercial en accentuant sur leurs propriétés dans l'augmentation du rendement et l'amélioration de l'extraction de jus (Yadav *et al.*, 2009).

### ➤ Substrat

Les substances pectiques est le nom générique des composés sur lesquels les enzymes pectinolytiques sont actives. Ce sont des polysaccharides acides de fort poids moléculaire, principalement constitués de  $\alpha$ -(1-4) lié les résidus d'acide D-galacturonique, à un petit nombre de résidus de rhamnose dans la chaîne principale et d'arabinose, le galactose et la xylose sur sa chaîne latérale (Figure 4). Elles sont constituées d'un complexe de macromolécules glycosidiques, qui sont présentes dans le règne végétal. Elles existent particulièrement dans les lamelles moyennes et primaires des parois cellulaires des plantes, ces substances jouent un rôle fondamental dans la croissance cellulaire et dans les mécanismes de défense (Merve *et al.*, 2014).

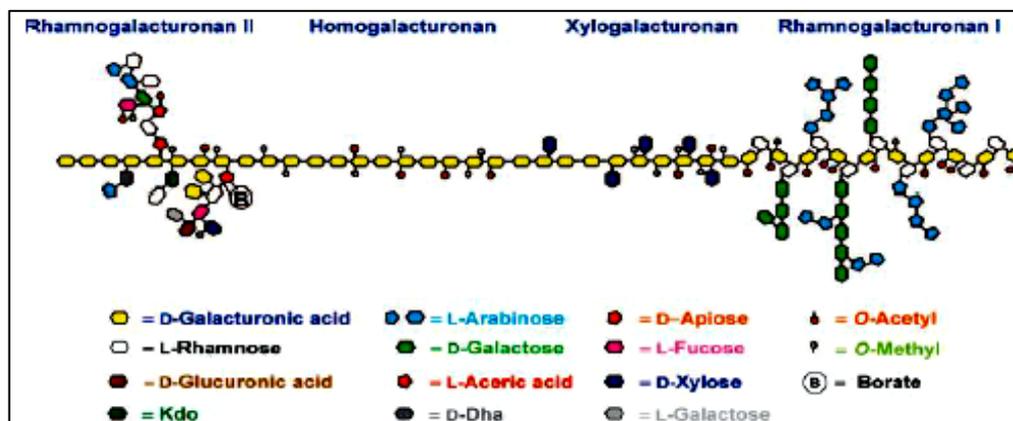


Figure 4 : Structure schématique de la pectine (Henrik *et al.*, 2007).

### ➤ Structure des substances pectiques

Les substances pectiques sont constituées de quatre groupes :

- La propectine

C'est une substance pectique, insoluble dans l'eau présente dans les tissus intacts. L'hydrolyse de la propectine produit essentiellement de la pectine ou des acides pectiques (Ranveer *et al.*, 2005).

- Les acides pectiques

Ce sont des polymères qui contiennent des quantités négligeables des groupements méthoxyle. Les sels des acides pectiques sont appelés pectates (**Ranveer et al., 2005**).

- Les acides pectiniques

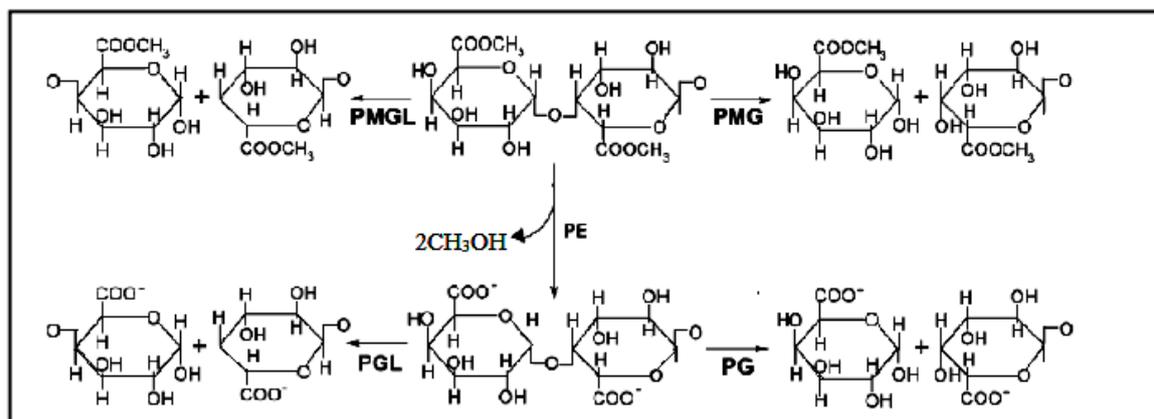
Représentent des chaînes d'acides polygalacturoniques, qui contiennent entre 0 et 75% d'unités d'acides galacturoniques méthylées. Les sels des acides pectiniques sont appelés pectinates (**Ranveer et al., 2005**).

- La pectine ou polyméthylgalacturonate

C'est un polymère qui confère une rigidité à la paroi cellulaire quand il est lié à la cellulose, dans lequel au moins, 75 % des groupes carboxyle des unités galacturonates sont estérifiés avec du méthanol (**Ranveer et al., 2005**).

### ➤ Enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases, sont un groupe hétérogène d'enzymes, qui hydrolysent les substances pectiques, largement présentes au niveau des parois cellulaires des agrumes, des pommes et moins souvent chez le pamplemousse et la betterave à sucre. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Figure 5) et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques (**Combo et al., 2011**).



**Figure 5 :** Mode d'action des pectinases.

**PMGL :** Polyméthylgalacturonate lyase ; **PMG :** Polyméthylgalacturonase ; **PE :** Pectinestérase ;

**PGL :** Polygalacturonate lyase ; **PG :** Polygalacturonase (**Lamrini, 2012**).

## ▪ Classification

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique ou 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 Pectinestérases (PE) ou Pectine-méthylestérases (PME) et les Dépolyméras (Polygalacturonases et Lyases) (**Lamrini, 2012**).

### 1. Pectinestérases (PE) ou Pectine-méthylestérases (PME)

Les pectinestérases catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être suivie, soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres, ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (**Jayani *et al.*, 2005**). Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre, et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne, les uns après les autres dans une direction donnée (**Sakai *et al.*, 1993**).

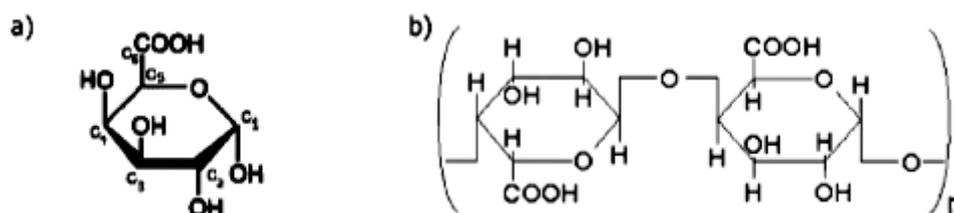
La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) pourrait contrecarrer cette inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (**Sakai *et al.*, 1993**).

### 2. Dépolyméras

Les dépolyméras sont des hydrolases (Polygalacturonases et Lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Selon le modèle d'action, aléatoire ou terminal, les dépolyméras peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes : les Polygalacturonases (PG), les Polyméthylgalacturonases (PMG), les Polygalacturonate-lyases (PGL) et les Polyméthylgalacturonate-lyases (PMGL) (**Rexova *et al.*, 1976**).

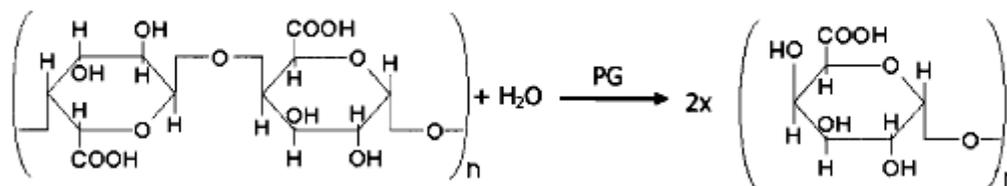
## a. Polygalacturonases (PG)

Les polygalacturonases sont des enzymes pectinolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-4) du pectate et d'acide polygalacturonique (PGA). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectinolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) qui attaquent au hasard les liaisons  $\alpha$ -(1-4) des résidus d'acide galacturonique (AG) (Figure 6) (**Rexov et Markovic, 1976**). Et des exo-PG (EC 3.2.1.67) qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -(1-4) entre deux résidus d'acide D-galacturonique (Figure 7) : elles agissent généralement à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les AG ne sont pas estérifiés (**Baron et Thibault, 1985**).



**Figure 6 :** L'acide galacturonique (a) et l'acide polygalacturonique (b)

(Gagnon, 2009).



**Figure 7 :** Réaction d'hydrolyse de la liaison  $\alpha$ -(1-4) du PGA par la polygalacturonase

(Gagnon, 2009).

Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action (Tableau 2) (De Vries *et al.*, 2001 ; Jayani *et al.*, 2005).

**Tableau 2:** Propriétés physico-chimiques de quelques polygalacturonases (De Vries *et al.*, 2001 ; Jayani *et al.*, 2005).

Source PG	Nature	Masse moléculaire (kDa)	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	Température optimale (°C)	pH optimal
<i>Aspergillus japonicus</i>	EndoPG I	38	-	30	4-5.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	EndoPG II	65	-	30	4-5.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	EndoPG A	41	-	45	5
<i>Aspergillus niger</i>	EndoPG I	61	982	43	3.8-4.3
<i>Aspergillus niger</i>	EndoPG II	38	3750	45	3.0-4.6
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo	63	2571	50	5.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	39	2870	45	5.5
<i>Aspergillus alliceus</i>	ExoPG I	40	-	45-50	3.5
<i>Sclerotinia borealis</i>	Endo	40	2088	40-50	5.0

#### b. Lyases ou Transéliminases

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de  $\beta$ -élimination. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petites tailles. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Ces enzymes sont classées en différents types en fonction de leur mode d'action et de substrat sur lequel elles agissent (Tableau 3) (Jayani *et al.*, 2005).

La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectinolytiques. Les PGL sont activées par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$ . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique) (Combo *et al.*, 2010).

**Tableau 3:** Classification des lyases (Combo *et al.*, 2010).

Enzyme	Numéro EC	Mécanisme d'action	Modèle d'action	Premier substrat	Produits
Endopolygalacturonate lyase	4.2.2.2	Trans- élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
Exopolygalacturonate lyase	4.2.2.9	Trans- élimination	Avant- dernière liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase	4.2.2.10	Trans- élimination	Aléatoire	Polyméthyl-D- digalacturonates insaturés	Méthyloligogalacturonates insaturés
Exopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase		Trans- élimination	Dernière liaison	Polyméthyl-D- digalacturonates insaturés	Méthylmonogalacturonates insaturés

#### ▪ Régulation

La production des enzymes pectinolytiques est induite par de faibles concentrations d'acide galacturonique. Les concentrations élevées de sucres (5%), réduisent la production durant la phase stationnaire, ce qui indique que les concentrations élevées d'acide galacturonique ou l'un de ses métabolites présentent une auto-répression catabolique. En présence de glucose, la production d'enzymes se réduit à des niveaux de base (Tsuyumu *et al.*, 1997 ; Guevara *et al.*, 1997).

#### I.3.4. Utilisations des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques trouvent une très large application dans l'industrie agro-alimentaire, dont la principale utilisation est la clarification de jus des fruits et du vin. En effet, l'industrie des jus de fruits utilise souvent des pectinases isolées du genre *Aspergillus*, et la première application remonte aux années 1930 pour la clarification de jus de pomme (Sine, 2010). L'utilisation des pectinases en association avec les amylases à le pouvoir de clarifier les jus et ainsi réduire le temps de filtration de 50% (Saxena *et al.*, 2008).

Elles sont utilisées également comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (**Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011**).

Au cours des années, les pectinases ont été utilisées dans plusieurs procédés industriels classiques, tels que l'industrie de textile, la transformation des fibres végétales, la fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et des légumes, l'extraction du pétrole, le traitement des eaux usées industrielles contenant des matières pectiques, etc. (Tableau 4) (**Zenil *et al.*, 2015**).

**Tableau 4:** Applications des enzymes pectinolytiques (**Kumar et Suneetha, 2014**).

Domaine	Processus
Production de jus de fruits	Extraction et clarification des jus de fruits.
Traitement de textile	Elimination des agents d'encollage. Elimination des impuretés non cellulosiques.
Extraction des huiles	Extraction d'huile d'olive, de tournesol, etc.
Traitement des eaux usées	Elimination des pectines retrouvées dans les eaux usées.
Industrie de papier	Dépolymérisation des pectines retrouvées dans le papier.
Production de café et du thé	Accélération des processus de fermentation et l'élimination de la mousse. Elimination des souches mucilagineuses dans les grains de café.
Préparation des protoplastes	La fusion des protoplastes, appelée aussi hybridation somatique, est très utilisée pour l'amélioration des plantes. L'obtention de protoplastes, qui exige la dégradation de la paroi pectocellulosique, pourrait être améliorée grâce à l'action de pectinases ou chitinases combinée à celle des $\beta$ -glucanases.
Purification des virus végétaux	Dans les cas où la particule virale est limitée au phloème, des pectinases et des cellulases alcalines peuvent être utilisées pour libérer le virus des tissus et donner des préparations très pures de virus.

### I.3.5. Origine des polygalacturonases

Les polygalacturonases (PGs) sont produites par divers organismes, tels que les plantes, les bactéries et les champignons (**Gautam *et al.*, 2017**) qui sont représentés dans le tableau suivant (Tableau 5) :

**Tableau 5** : Origine des polygalacturonases

Origine d'enzymes	Références
<b>Animale</b>	
<i>Meloidogyne incognita</i>	Jaubert <i>et al.</i> , 2002
<i>Sitophilus oryzae</i>	Shen <i>et al.</i> , 2003
<b>Végétale</b>	
Avocat	Wakabayashi et Huber, 2001
Banane	Pathak et Sanwal, 1998
Fruits rouges	Amid <i>et al.</i> , 2014
Mangue	Singh et Dwivedi, 2008
Tomate	Moshrefi et Luh, 1984
<b>Bactérienne</b>	
<i>Erwinia carotovora</i>	Basset <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Membre et Burlot, 1994
<i>Bacillus.sp</i>	Fogarty et Kelly, 1983
<i>Leuconostoc.sp</i>	Bekhouche <i>et al.</i> , 2006
<b>Fongique</b>	
<i>Aspergillus niger</i>	Acuna-Arguelles <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Baracat <i>et al.</i> , 1993
<i>Aspergillus sojae</i>	Demir et Tari, 2016
<i>Penicillium italicum</i>	Alana <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Manachini <i>et al.</i> , 1987
<b>Levurienne</b>	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Manachini <i>et al.</i> , 1988
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blanco <i>et al.</i> , 1997
<i>Cryptococcus albidus</i>	Federici, 1985
<i>Candida sake</i>	Buzzini et Martini, 2002
<i>Pichia guilliermondii</i>	Buzzini et Martini, 2002
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Taskin, 2013

### 1.3.6. Mode et mécanisme d'action des polygalacturonases

Les PGases coupent la liaison glycosidique  $\alpha$ -(1-4) reliant deux résidus d'acide galacturonique de la chaîne polygalacturonique. Les exo-polygalacturonases dégradent leurs substrats à partir d'une extrémité (réductrice ou non), tandis que les endo-polygalacturonases le font au hasard. Les analyses viscosimétriques permettent de différencier les « endo » des « exo » enzymes. Une diminution de 50% de la viscosité, équivaut à un pourcentage des liaisons hydrolysées inférieur à 10 %, dans le cas des endo-polygalacturonases ; tandis que des valeurs de l'ordre de 40 % sont observées pour les exo-polygalacturonases (**Palanivelu, 2006**). Pour les endo-polygalacturonases, le pourcentage de liaisons hydrolysées (1 à 10 %), correspondant à 50 U de diminution de la viscosité, indique des différences dans leurs mécanismes d'action. Une « endo-enzyme » peut dégrader le substrat par des attaques :

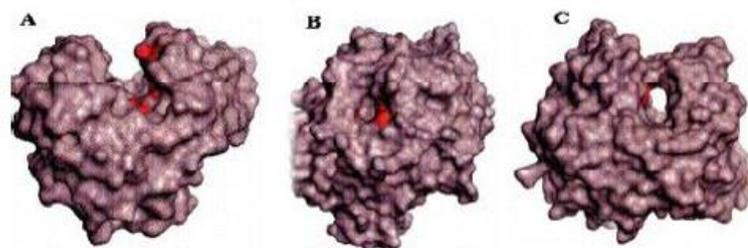
« unichaîne », « multichaîne », ou par des attaques multiples :

- Au cours d'une attaque « unichaîne », il se forme un complexe enzyme-substrat dans lequel le substrat est entièrement dégradé avant la dissociation de ce complexe et la réassociation de l'enzyme avec une nouvelle molécule de substrat.
- Une attaque « multichaîne » signifie qu'après une première rupture d'une liaison d'une molécule du substrat, le complexe enzyme substrat s'associe avec une nouvelle molécule pour rompre une autre liaison (**Rombouts et Pilnik, 1980**).
- Le phénomène peut être intermédiaire « attaque multiple » (**Baron et Thibault, 1985**).

Les produits finaux de l'hydrolyse d'un acide pectique sont dans le cas des endopolygalacturonases les monos et les digalacturonides, et l'acide trigalacturonique pour certaines enzymes. Dans le cas de l'exopolygalacturonase, l'acide monogalacturonique est le produit final. Les endopolygalacturonases montrent des différences dans leurs mécanismes de dégradation des oligogalacturonides. Ces différences sont déterminées par la nature du site actif, et plus spécifiquement par le nombre de sous-sites et la position du groupe catalytique (**Rombouts et Pilnik, 1980**).

Le mode d'action d'une enzyme est imposé par la structure du site actif (**Davies et Henrissat, 1995**) (Figure 8). Ainsi, les endo-enzymes présentent généralement un site actif exposé au solvant formant une crevasse ou un sillon (Figure 8A) qui permet la fixation de plusieurs unités saccharidiques. En revanche, le site actif des exo-enzymes est le plus souvent en forme de « poche » (Figure 8B), permettant la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice ou réductrice d'une chaîne d'oligo ou de polysaccharide. Enfin, les enzymes processives ont la particularité de posséder de longues boucles qui referment partiellement la crevasse catalytique pour former une structure en tunnel (Figure 8C). Cette topologie en

tunnel permet aux glycosides hydrolases (GH) de fixer la chaîne polysaccharidique et de progresser de façon processive le long de celle-ci, de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, et d'un site de coupure à l'autre. C'est le mode d'action de certaines cellobiohydrolases I (GH 48), par exemple (Guimarães *et al.*, 2002).



**Figure 8:** Exemple de topologie du site actif des glycosides hydrolases en forme de sillon (A) en forme de poche (B) et en forme de tunnel (C) (Davies et Henrissal, 1995).

#### **I.4. Milieux de culture utilisés pour la production des enzymes pectinolytiques**

La production d'enzymes pectinolytiques par l'espèce fongique *Aspergillus niger*, a besoin d'une source alternative de carbone et d'énergie dans le milieu de culture, nécessaire pour la croissance et pour la production d'enzymes (Tien, 1985).

La production d'enzymes pectinolytiques est influencée par la composition du milieu de culture, la durée et la température d'incubation, la concentration du substrat, l'aération, le volume d'inoculum et la source d'azote et de carbone (Islam *et al.*, 2013).

##### **I.4.1. Sources de nutriments**

Les conditions du milieu de culture influencent la production d'enzymes pectinolytiques. Plus les conditions du milieu sont optimisées, plus la production d'enzymes par l'organisme est élevée. Dans le même contexte, plusieurs recherches ont été réalisées pour optimiser les conditions du milieu de culture favorables à la production d'enzymes pectinolytiques (Francis et Emmanuel, 2016). D'après ces études qui montrent l'effet de source de carbone sur la production de polygalacturonases utilisant les déchets de banane comme substrat de fermentation. *Aspergillus niger* a donné une production maximale d'enzymes en présence de fructose, et une activité significative avec le glucose. Cependant, la source d'azote était le nitrate d'ammonium ( $\text{KNO}_3$ ) permettant une production maximale d'enzymes, avec un pH 5.0 et une température de 50 °C. D'autres études ont montré que la température optimale est 40 °C et le pH optimal est 4.0 (Islam *et al.*, 2013).

La présence de la pectine dans le milieu de culture comme le son de blé et les écorces de citron et d'orange induit la sécrétion des enzymes pectinolytiques par *A.niger*. Ceci explique l'utilisation des déchets agro-industriels riches en pectine comme milieu de culture pour produire les enzymes pectinolytiques par les microorganismes.

#### **I.4.2. Utilisation des résidu-industriels pour la production des enzymes pectinolytiques**

La production des enzymes reste très coûteuse en raison du coût élevé de la matière première, qui représente entre 40 et 60 % du coût de production. Pour cette raison, des études ont visé l'utilisation des déchets comme matière première pour la production d'enzymes. Ces matières premières ont été choisies comme substrat de croissance pour la production d'enzymes en raison de leur présence en très grande quantité, leur haute biodégradabilité, leur richesse en carbone et leur élimination de ses propres effets néfastes sur l'environnement (**Gassara, 2012**). Un certain nombre de substrats ont été utilisés pour la culture des microorganismes afin de produire les pectinases par une fermentation solide, parmi lesquels on cite : le son de blé, les écorces de citron et d'orange et les déchets de bananes.

En effet, les agrumes (orange, citron) sont parmi les fruits les plus abondants dans le monde (**Torquato et al., 2017**), qui peuvent servir comme substrats de fermentation en fonction de leur teneur en pectine. Le genre *citrus* renferme plusieurs fruits, parmi eux on retrouve *citrus limon* qui est le citron (**Bampidis et Robinson, 2006**), qui a été le plus fréquemment utilisé dans la production d'enzymes pectinolytiques.

Par ailleurs, dans un processus de FMS, le substrat solide fournit non seulement les éléments nutritifs à la culture microbienne mais sert aussi à la fixation des cellules. Le substrat qui fournit tous les nutriments nécessaires pour les microorganismes est considéré comme le support idéal. Toutefois, certains éléments nutritifs peuvent être disponibles à des concentrations sub-optimales voir absents dans les substrats. Dans ces cas, il deviendra nécessaire de les compléter par une source extérieure (**Gassara, 2012**).

### **I.5. Champignons pectinolytiques**

#### **I.5.1. Généralités sur les champignons**

Les champignons ou fungi (du latin) ou mycètes (du grec mukès) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes, non photosynthétiques. Ils se répartissent en deux grands groupes : les levures et les moisissures (**Bousseboua, 2004**). Ils se rencontrent également sur les végétaux, les produits d'origine végétale, les viandes, les cadavres des animaux...

etc. (Senal *et al.*, 1993 ; Kirk *et al.*, 2001). Les champignons de formes mycéliennes sont appelés moisissures, alors que les levures sont dépourvues de mycélium et sont des organismes souvent associés en agrégats de plusieurs cellules. Il existe également des champignons dimorphes qui, selon les conditions du milieu peuvent alternativement exister sous forme de levure ou de moisissure. Les champignons sont pour la plupart saprophytes et dégradent au profit de leur croissance toutes sortes de débris organiques. De nombreuses espèces sont commensales et vivent donc en association symbiotique, alors que certains sont parasites et se développent aux dépens d'autres organismes vivants (Bousseboua, 2004).

Les mycètes sont capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (entre 3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20 et 30 °C. Cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développent à des températures très basses (< 15 °C) ou même parfois négatives (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003). La reproduction des champignons se caractérise par des formes et des mécanismes très divers et complexes, répartis en deux types : la reproduction asexuée et la reproduction sexuée (Bousseboua, 2004). Se reproduisent par des spores, selon un mode asexué (imparfait ou végétatif) et/ou sexué (parfait) (Senal *et al.*, 1993).

En fait, relativement peu de microorganismes ont une application industrielle. Les microorganismes utilisés en industrie sont la plupart du temps des champignons par l'exploitation de leurs aptitudes métaboliques (enzymes et acides organiques) (Bousseboua, 2004). La littérature a montré que les enzymes tels que les pectinases, qui ont un intérêt industriel majeur, peuvent être facilement obtenues à partir des genres fongiques (Patil *et al.*, 2012), en particulier : *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Penicillium* (Radula et Anitharaj, 2011).

### 1.5.2. Les *Aspergilli*

Le genre *Aspergillus* a été reconnu comme un microorganisme en 1729 par Micheli (Balajee *et al.*, 2006). L'*Aspergillus* est un champignon filamenteux (ou moisissure) qui se développe par un système de filaments ou hyphes présents dans les moisissures, l'*Aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition (Samson et Varga, 2007). Le genre comprend environ 180 espèces répartis en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (Botton *et al.*, 1990). Parmi les *Aspergillus*, *Aspergillus nidulans*, *niger*, *oryzae* et *fumigatus* qui sont les plus étudiées (Botton *et al.*, 1990).

➤ *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger*, l'aspergille noire, est l'une des espèces les plus utilisées en industries agro-alimentaires, ainsi que dans les différentes recherches en vue de leurs innombrables métabolites d'intérêt, tels que les enzymes : les pectinases, les amylases, les cellulases et les acides organiques. L'espèce *niger* est un champignon filamenteux Ascomycète. C'est une des espèces les plus connues du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et les légumes (**Raper et Fennel, 1977**). L'*Aspergillus niger* est capable de croître dans une large plage de température (6-47 °C) avec un optimum de 35 à 37 °C. Cette espèce est caractérisée par la production d'un grand nombre de spores en chaîne. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphes tubulaire (extension strictement apicale), donnant naissance à un réseau mycélien par ramification qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (**Meyer et al., 2004 ; Ward et al., 2006**).

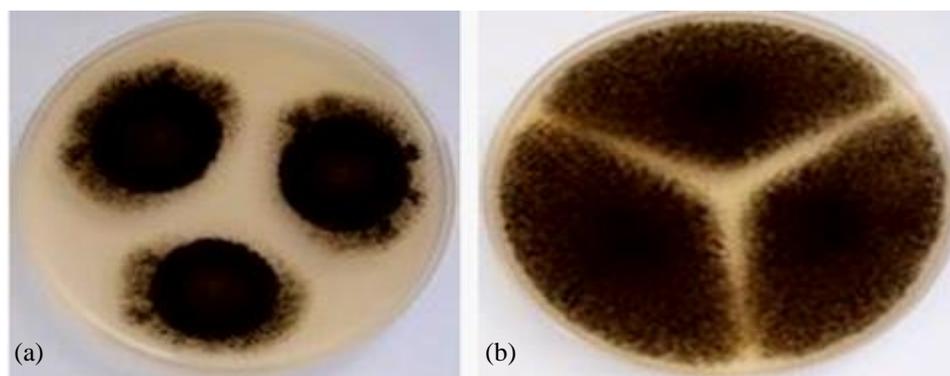
### 1. Taxonomie

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

Règne :	Mycetes
Embranchement :	Amastigomycota
Sous-embranchement :	Deuteromycotina
Classe :	Deutoromycetes
Ordre :	Moniliales
Famille :	Moniliaceae
Genre :	<i>Aspergillus</i>
Espèce :	<i>Aspergilus niger</i>

## 2. Caractères cultureux

*Aspergillus niger* pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (gélose au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, et elle peut aller jusqu'à 42°C (Tabuc, 2007), son développement est aussi inhibé par l'ajout de l'actidione dans le milieu de culture (Quatresous, 2011). Les colonies peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, le mycélium extensif hyalin en grande partie immergée dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires à la maturation (Figure 9) (Quatresous, 2011). En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noires, qui sont généralement disposées en cercles concentriques (Quatresous, 2011). Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle, un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes (Tabuc, 2007).

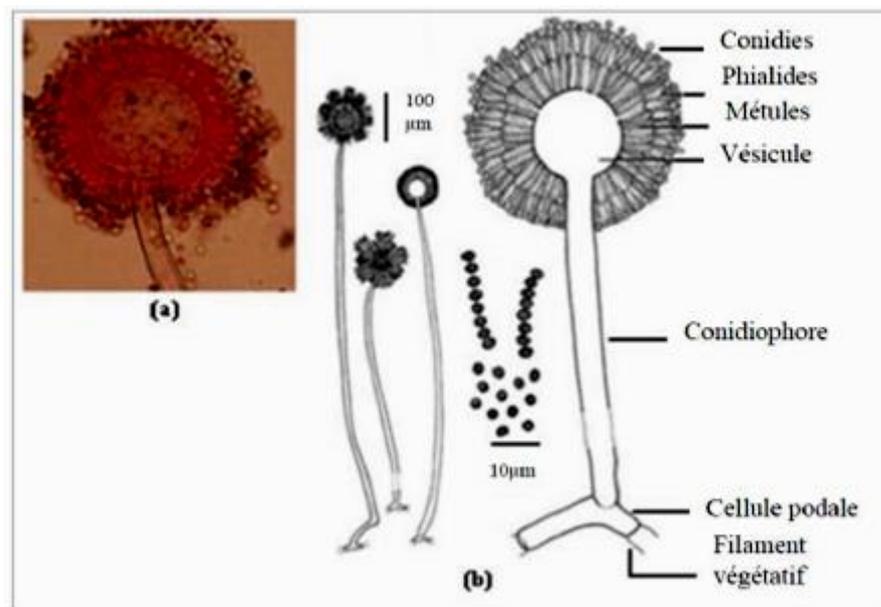


**Figure 9 :** *Aspergillus niger* sur milieu M2 (a) et *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (b) (Zenati, 2018).

## 3. Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « *Hülle cells* » ou enveloppe à bulles (une structure caractéristique des différentes espèces fongiques provient de la pointe des hyphes secondaires qui à leur tour émergent des hyphes primaires et se développent à la suite d'un processus de gonflement). On observe alors des têtes conidiennes larges, brun-rouges très sombre à noires, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1.5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre). Les phialides très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout

le contour de la vésicule. Les métules et les phialides sont légèrement teintées de brun. Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. Elles sont typiquement globuleuses, brunes, et mesurent 3.5 à 5 µm de diamètre. La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées. La tête aspergillaire est donc bisériée radiée, et noire à maturité (Figure 10) (Dijksterhuis et Wösten, 2013).



**Figure 10 :** Aspect microscopique (a) et représentation schématique du conidiophore d'*Aspergillus niger* (b) (Pasqualotto, 2010).

#### 4. Utilisations industrielles d'*Aspergillus niger*

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles d'*Aspergillus niger* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward *et al.*, 2006). L'*Aspergillus niger* est aussi utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes comme la pectinase, la protéase et l'amyloglucosidase qui étaient les premières à être exploitées et ont été initialement produites en culture de surface (Schuster *et al.*, 2002).

La plupart des préparations commerciales des pectinases sont d'origine fongique, les pectinases d'*Aspergillus niger* sont les plus utilisées en industrie, car ces enzymes sont extracellulaires ce qui facilite leur extraction et leur purification. De plus, l'*Aspergillus niger*

---

a le caractère GRAS (*Generally Regarded As Safe*), ce qui favorise l'utilisation des métabolites produits par *niger* en toute sécurité (**Mrudula et Anitharaj, 2011**).

L'*Aspergillus niger* peut être cultivé et employé pour synthétiser d'autres composés utiles, et les utiliser en divers domaines :

- Applications dans l'environnement

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

- Production d'acide citrique

*Aspergillus niger* est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919 (**Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002**). L'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus fistulosum* parce que les rendements de ces organismes sont élevés. La *Food and Drug Administration* (FDA) a classé *Aspergillus niger* comme source d'acide citrique (**Schuster et al., 2002**). Ce dernier est employé couramment dans une variété d'industries, et en volume des ventes, dépassent largement les autres métabolites tels que l'acide gluconique (**Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002**).

- Production des enzymes

L'espèce d'*Aspergillus niger* est capable de produire une très large gamme d'enzymes d'intérêt industriel à part les pectinases, citant : les protéases, les amylases..., etc. Les principales activités protéolytiques d'*Aspergillus niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide (**Schuster et al., 2002**). Grâce aux capacités hydrolytiques importantes d'*Aspergillus niger* et sa tolérance à l'acidité (pH < 3), il permet d'éviter les contaminations bactériennes au cours des processus biotechnologiques (**Jarai et Bouxton, 1994 ; Dekrif-Dakhmouche et al., 2006**).

# *Chapitre II*

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Introduction

Ce chapitre est une description d'un plan expérimental, basé sur l'extraction des polygalacturonases, après leur production par fermentation en milieu solide par la moisissure *Aspergillus niger*. En premier lieu, c'est la réactivation de la souche et la préparation des substrats de fermentation. Ensuite, la conduite des fermentations est effectuée en erlens meyers. Enfin, on procède à l'extraction des enzymes produites, l'analyse et la purification des extraits obtenus.

### II.2. Matériel

#### II.2.1. Matériel végétal

Dans cette étude, les écorces de citron et d'orange sont les matières premières principalement utilisées comme substrat de fermentation.

Les résidus de citron et d'orange (écorces et pépins) ont été récupérés après extraction de leur jus dans un extracteur manuel (Figure 11), et stockés dans le congélateur jusqu'à leur utilisation. Dans cette étude, l'utilisation d'écorces séchées et tamisées au lieu d'écorces fraîches, ce qui permet l'augmentation de la concentration en matières sèches, et ainsi la diminution de l'activité de l'eau, ce qui prolonge la durée de leur conservation (Bouharoune, 2016).



Figure 11 : Matériel végétal (Bouharoune, 2016).

#### II.2.2. Matériel microbiologique

La souche fongique *Aspergillus niger* est utilisée pour la production des polygalacturonases, par fermentation en milieu solide. La souche est fournie gracieusement de la part de notre encadrante Mme LEGHLIMI. H. Cette moisissure a été isolée à partir de sols proches de la source thermale de hammam DEBEGH à Guelma (Leghlimi, 2013).

### II.2.3. Milieux de culture

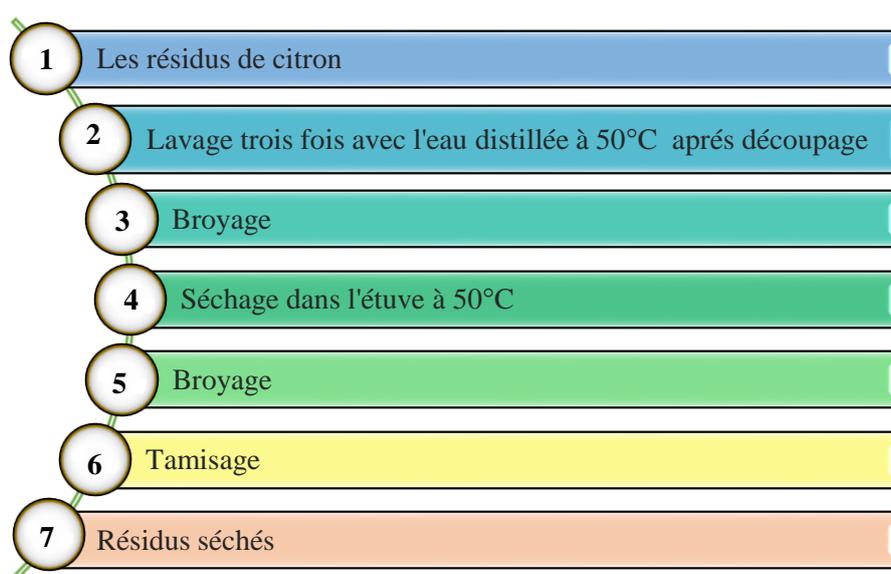
Les milieux de cultures utilisés dans ce travail sont : Potato Dextrose Agar (PDA) et Sabouraud (Annexe n°2), ces deux milieux sont utilisés pour la réactivation et la sporulation de la souche. Le milieu de production est à base d'écorces de citron ou d'orange selon le cas. Ceci est dans le but de comparer la production des enzymes recherchées, et par conséquent, nous permettra de choisir le bon substrat pour une meilleure production (**Bouhadi et al., 2016 ; Bouharoune, 2016**).

## II.3. Méthodes

### II.3.1. Préparation du matériel végétal (substrat de fermentation)

Après décongélation, Les échantillons des écorces de citron ont été lavées trois fois avec l'eau distillée à 50 °C afin d'éliminer les résidus solubles qui peuvent influencer la croissance microbienne et la qualité de l'extrait enzymatiques brut. Les résidus obtenus sont broyés à l'aide d'un broyeur, puis séchés dans une étuve à circulation d'air à 50 °C pendant deux jours (**Bernardin et al., 2005**). Un second broyage est réalisé après le séchage, la poudre obtenue est tamisée à l'aide d'un tamis pour obtenir des particules ayant un diamètre  $\leq 0.4$  mm (400  $\mu$ m), la farine obtenue est conservée dans des boites en métal, hermétiquement fermées (Figure 12) (**Bouharoune, 2016**).

De même, les écorces d'orange après extraction de leur jus ont été récupérées, puis séchées à une température de 50 °C puis broyées et tamisées dans une tamiseuse pour obtenir des particules ayant des diamètres compris entre 0.2 et 0.8 mm (**Bouhadi et al., 2016**).



**Figure 12 :** Etapes de la préparation du substrat de fermentation (**Bouharoune, 2016**).

## ➤ Composition biochimique du substrat de fermentation

### 1. Détermination de l'humidité (AFNOR, 1986)

L'humidité est déterminée par dessiccation d'un échantillon de 5 g de résidus de citron ou d'orange, dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention de poids constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité. Les essais sont réalisés en triplicate. L'humidité est calculée selon cette formule :

$$M_s \% = (m_2 - m) / (m_1 - m) \cdot 100$$

Avec :

$M_s$  : teneur en matière sèche %.

$m_2$  : masse de capsule + la pris d'essai après séchage en g.

$m_1$  : masse de capsule + la pris d'essai avant séchage en g.

$m$  : masse de capsule vide.

$$\text{Humidité \%} = 100 - M_s$$

### 2. Détermination des cendres (AFNOR, 1986)

Les cendres sont obtenues après incinération de 5 g du matériel végétal dans un four à moufle à une température de 550 °C pendant 6 heures. Le résidu obtenu représente les cendres qui, par différence, donne la matière organique contenue dans l'échantillon

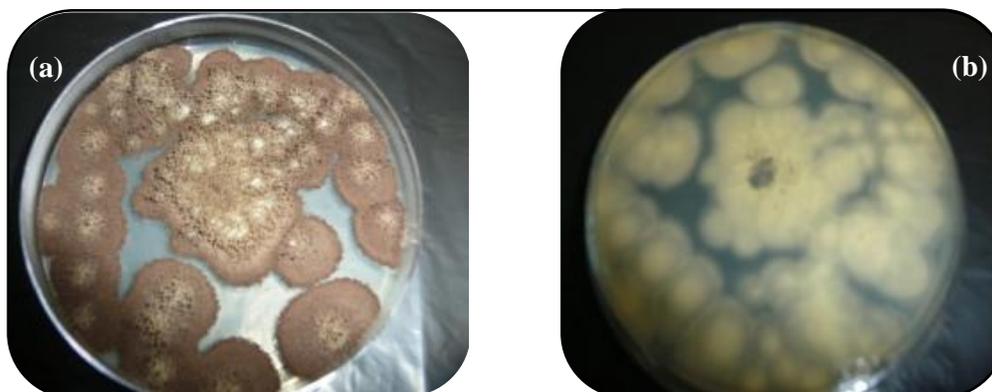
### 3. Détermination des protéines (AFNOR, 1986)

L'azote total est dosé par volumétrie après minéralisation selon la méthode de Kjeldhal. Ce dosage est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, et dosé après déplacement en milieu alcalin et distillation sous forme d'ammonium.

#### II.3.2. Réactivation de la souche fongique

La réactivation est effectuée par l'ensemencement d'une suspension de spores ou d'une bouture mycélienne provenant de tubes de conservation, sur milieu à l'extrait de

pomme de terre (PDA). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 5 jours jusqu'à une bonne sporulation (Figure 13) (Leghlimi, 2013).



**Figure 13** : La souche d'*Aspergillus niger* (a) mycélium aérien, (b) revers de la boîte (Leghlimi, 2013).

#### ➤ Conservation de la souche

Les suspensions de spores préparées à l'aide d'une solution diluée de tween 80 (0.1%) à partir de boîtes de culture bien sporulées, sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

### II.3.3. Production de la polygalacturonase (PGase) en erlenmeyers

#### ➤ Préparation de l'inoculum

L'inoculum représente la suspension de spores. Cette suspension est obtenue par addition de 10 ml d'une solution diluée de tween 80 (0.1%) dans une boîte de 5 jours de croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu PDA. Un grattage superficiel de la croissance fongique à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, permet de récupérer la suspension de spores. Cette dernière peut être filtrée à travers une gaze stérile, afin d'éliminer toute impuretés du mycélium et de la gélose (Figure 14) (Bouhadi *et al.*, 2016 ; Bouharoune, 2016).



**Figure 14** : Préparation de l'inoculum (Bouharoune, 2016).

### ➤ **Dénombrement des spores**

Le dénombrement des spores est réalisé par comptage sur une cellule de Malassez, et observation sous microscope optique (**Bouharoune, 2016**).

### ➤ **Conduite de la fermentation**

La production des enzymes recherchées est effectuée par FMS, dans des erlens meyers de 250 ml à raison de 10 g de substrat solide par erlen : résidus de citron ou résidus d'orange, selon le cas. Le substrat solide est enrichi par humidification à 70% avec cette solution : glucose 0.5%, urée 0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.65%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.26%,  $\text{FeSO}_4$  0.014%,  $\text{MgSO}_4$  0.01%. Le contenu des erlens est homogénéisé à l'aide d'une baguette en verre. Ensuite les erlens sont bouchés avec du coton cardé et du papier aluminium, puis stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement, les erlens sont inoculés aseptiquement, par 1 ml de la suspension de spores préalablement préparée. Après homogénéisation du milieu de culture et de l'inoculum, à l'aide d'une tige en verre stérile, les erlens sont incubés dans une étuve, à 30°C pendant 5 jours (**Bouharoune, 2016**).

### ➤ **Extraction des enzymes**

L'extraction consiste à la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, après l'incubation des milieux à base des écorces d'orange, 100 ml d'eau distillée sont ajoutés à la totalité du produit fermenté. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur secoueur pendant 30 minutes, puis filtré pour éliminer les spores et les particules solides du milieu. Le filtrat est ensuite clarifié par centrifugation à 10000 rpm pendant 20 minutes. L'analyse du surnageant permet de mesurer les activités enzymatiques recherchées (**Bouhadi et al., 2016**).

Après la période d'incubation des milieux à base des écorces de citron, 50 ml d'eau distillée sont ajoutés dans l'erien meyer, ce dernier est agité énergiquement dans un agitateur pendant 30 minutes, le contenu est filtré à travers une gaze stérile, le filtrat est ensuite centrifugé à 10000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans une centrifugeuse. Le surnageant obtenu est l'extrait enzymatique brut (EB) (**Bouharoune, 2016**).

### ➤ **Mesures effectuées après l'extraction**

#### **1. Mesure du pH**

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné, par l'introduction de l'électrode dans l'extrait enzymatique brut (**Bouharoune, 2016**).

## 2. Détermination des protéines solubles (Lowry, 1951)

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions, la première est la réaction de Biuret où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la protéine (complexe pourpre entre le biuret "  $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$  " et deux liaisons peptidiques consécutives en présence de cuivre en milieu alcalin), la deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu ce dernier à base de phosphomolybdate et de phosphotungstène, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes présents dans les protéines et se réduit en complexe bleu qui s'ajoute à celle de biuret. Cela engendre une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène et c'est la fixation de cuivre par chélation qui faciliterait le transfert d'électrons vers ce réactif. L'intensité de la couleur est déterminée par lecture colorimétrique à 660 nm dans un spectrophotomètre. Le taux des protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de Bovin Sérum Albumine (BSA) à  $5 \text{ g.L}^{-1}$  (Annexe n°3) (Bouharoune, 2016).

## 3. Mesure du taux d'humidité

L'humidité est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de l'activité enzymatique du polygalacturonase en Unités par gramme de substrat sec.

L'humidité des substrats fermentés (résidus de citron et d'orange, selon le cas) est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec, qui consiste à sécher des échantillons de 5 g dans une étuve à une température de  $105^\circ\text{C}$ , jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie *et al.*, 1984). Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{H}\% = [(\text{PH-PS}) / \text{PH}] \times 100$$

Où :

**PH** : poids humide.

**PS** : poids sec.

### II.3.4. Dosage de l'activité enzymatique

#### ➤ Dosage de l'activité de l'endopolygalacturonase (EndoPGase)

Le principe est basé sur la réduction de fluidité d'une solution de pectine à 1% dans une solution tampon acétate de sodium pH 4.5 (**Ghildyal et al., 1981**). Le mélange réactionnel est constitué de 10 ml de pectine (1%) et 0.5 ml d'extrait enzymatique, incubé à 35°C pendant 1 heure, la réaction est stoppée par l'ébullition du mélange à 90°C puis refroidissement à 20°C. La fluidité est déterminée à l'aide d'un viscosimètre à écoulement. La viscosité spécifique du mélange est alors exprimée par la formule ci dessous (**Bouharoune, 2016**).

$$\text{Viscosité spécifique} = [(T_0 - T_\epsilon) / (T_0 - T_{ea})]$$

**T<sub>0</sub>** : Temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans la solution témoin ;

**T<sub>ε</sub>** : Temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans l'échantillon ;

**T<sub>ea</sub>** : Temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans l'eau distillée.

Le principe de la mesure repose sur la coupure des liaisons α-(1-4) de la pectine (substrat) par l'EndoPGase, qui va entraîner une diminution de la longueur des chaînes de la pectine occasionnant une baisse de la viscosité de la solution. L'activité est exprimée numériquement en unité de dépectinisation (U.D). 1U.D est la quantité d'enzyme nécessaire pour que la viscosité d'une solution de pectine diminue de 50% (**Bouhadi et al., 2016**).

#### ➤ Dosage de l'activité de l'exopolygalacturonase (ExoPGase)

Elle est déterminée par libération des sucres réducteurs estimés par la méthode de Somogy et Nelson, (1952). Le mélange réactionnel contient 0.5 ml d'extrait enzymatique et 1 ml de pectine dans l'acétate de sodium à pH 5.5. Le mélange est incubé à 45°C pendant 60 minutes. Une unité enzymatique est exprimée par la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole d'acide galacturonique par unité de volume et par unité de temps. L'activité de l'ExoPGase est exprimée en μ mol/ min /ml d'extrait (**Bouhadi et al., 2016**).

$$\text{Activité ExoPG} = (A * 1000) / (212.12 * 60 * 0.5)$$

Où :

**A** : Equivalent d'acide galacturonique produit par la réaction enzymatique ( $\mu$  mol) ;

**212.12** : Masse molaire de l'acide galacturonique hydraté (g) ;

**0.5** : Volume de l'extrait (ml) ;

**60** : Temps d'incubation (min).

Les groupements réducteurs apparus sont déterminés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNSA) décrite par Miller, (1954). La réaction est stoppée par l'ajout de 1ml de réactif du DNS (Annexe n°4) (**Bouharoune, 2016**).

### II.3.5. Purification de l'extrait enzymatique brut

#### ➤ Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (SA)

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines contaminantes dans une solution contenant un mélange complexe de protéines. Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dans la solution des protéines. Cette quantité est celle nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de sulfate d'ammonium suffisante pour saturer cette solution à une température et un pH où le travail est effectué. A cette concentration les protéines contaminantes, en fait une partie d'entre elles précipiteront sans entrainer la protéine désirée (**Dixon, 1953**).

La précipitation des protéines est menée progressivement, d'abord par saturation en sels à 30% puis à 90% (Tableau 6).

Après avoir mesuré le volume de chaque extrait brut une quantité de sulfate d'ammonium déterminée à partir du tableau de saturation en sulfate d'ammonium est ajoutée d'une manière à avoir 30% de saturation dans chaque extrait enzymatique, le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes, la séparation des protéines contaminées est réalisée par centrifugation à 4° C pendant 15 minutes. Le culot est récupéré pour les tests d'activités enzymatiques, tandis que le surnageant est récupéré pour une deuxième saturation à 90% en sulfate d'ammonium, après 30 minutes d'agitation le mélange est à nouveau centrifugé dans une centrifugeuse

réfrigérée, le culot est récupéré par sa dissolution dans un minimum d'eau distillée (Bouharoune, 2016).

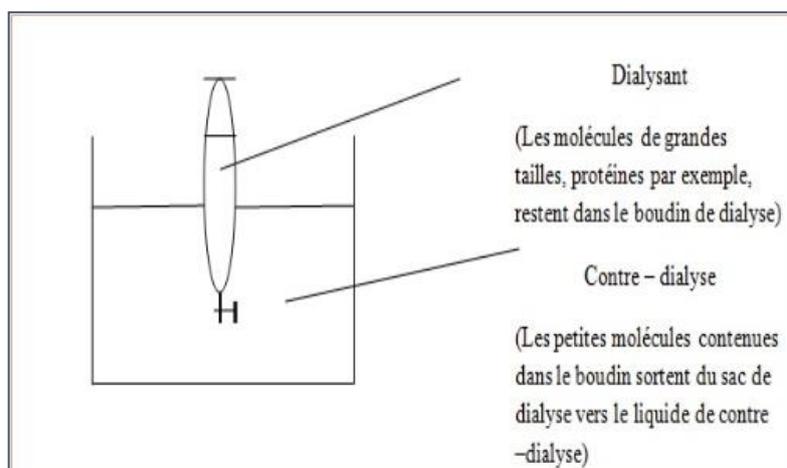
Cependant Bouhadi *et al.*, (2016) ont réalisé la précipitation au sulfate d'ammonium dans une fourchette de 40-90%.

**Tableau 6 :** La masse de sulfate d'ammonium ajoutée pour arriver à 90% (Bouharoune, 2016).

Pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium	0 à 30%		30% à 90%		
	Solutions	Volume (ml)	Sulfate d'ammonium (g)	Volume de surnageant (ml)	Sulfate d'ammonium (g)
Extrait des écorces	86	15.136	84	37.716	26

#### ➤ Dialyse et concentration de l'extrait enzymatique brut

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Les membranes de dialyse utilisées se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de « boudin » de dialyse. Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse (Figure 15) (Hainque *et al.*, 2008).



**Figure 15 :** La dialyse (Hainque *et al.*, 2008).

Après le dessalage par dialyse, les fractions protéiques se retrouvent diluées dans un excès d'eau migrant dans les boudins, elles sont alors concentrées en recouvrant les boudins avec une solution de saccharose à 60%. Après 10 heures, le concentré est récupéré. Ce dernier représente l'extrait enzymatique prépurifié (EEPP) (Figure 16) (**Bouharoune, 2016**).



**Figure 16** : Le boudin de dialyse (**Bouharoune, 2016**).

# *Chapitre III*

---

## Discussion générale

La production de polygalacturonase (PG) par *Aspergillus niger* sur milieu à base des résidus agro-industriels (écorces de citron et d'orange) est abordée par plusieurs travaux, grâce à l'importance de cette enzyme et de ces applications dans le secteur biotechnologique. Actuellement, ces enzymes occupent une position de leader parmi les enzymes industrielles commerciales. Ceci s'explique par la part des pectinases d'origine microbienne, qui représente 25% des ventes des enzymes alimentaires, dans le monde. Les pectinases d'origine fongique représentent une source précieuse pour de multiples applications industrielles, car les champignons filamenteux constituent les moteurs de production des enzymes de dégradation des pectines, particulièrement *Aspergillus niger*, qui est le plus commun en classe des champignons inoffensifs (GRAS) (*Generally Regarded As Safe*) ; de ce fait, les enzymes produites par ce champignon peuvent être utilisées en toute sécurité.

Par ailleurs, la présente étude vise l'utilisation des ressources renouvelables principalement les résidus agro-industriels qui sont générés par des entreprises de transformation industrielle de certains légumes et fruits (agrumes par exemple), en d'autres produits (boissons, confitures, compotes...). A cet égard, les industries agroalimentaires des agrumes, s'orientent actuellement vers le développement et l'amélioration de la production des enzymes pectinolytiques, du fait de leur rôle fondamental dans ce type d'industrie (à titre d'exemple, la clarification des jus de fruits). En effet, les déchets générés par ces industries constituent une matière organique riche en polysaccharides de la paroi végétale, à savoir la cellulose, l'amidon, la lignine et la pectine. Ces macromolécules ont une valeur nutritionnelle importante et nécessitent d'être valoriser en tant que matière première ou substrat pour faire cultiver des microorganismes, qui par conséquent, sont capables d'utiliser ces nutriments et de produire de nouvelles molécules à forte valeur ajoutée. Ce qui conduit en fin de parcours, à une dépollution naturelle de l'environnement d'un côté, et de l'autre côté, c'est économique par l'apparition d'une nouvelle gamme de produits biotechnologiques sur le marché. Par ailleurs, la production des enzymes d'origine microbienne est effectuée par des fermentations en milieux liquides ou sur substrats solides, représentés par des milieux naturels sous forme de résidus issus de ces industries, ce qui constitue une alternative de choix qui s'insère dans cette préoccupation où la production d'enzymes industrielles nécessite l'utilisation de milieux à moindre coût, sachant que le coût du milieu de production représente 30 à 40% du coût de production des enzymes industrielles (Srinubabu *et al.*, 2007). Ce qui est possible par l'utilisation des résidus agroindustriels

disponibles et bon marché. Effectivement, dans notre étude on a opté sur l'utilisation des écorces de citron et d'orange comme substrat naturel pour la croissance du champignon filamentueux *Aspergillus niger* et la production des enzymes pectinolytiques, selon le procédé de la fermentation sur milieu solide (FMS), connu comme processus rentable. En effet, la FMS permet de traiter les résidus agro-industriels comme substrat ce qui réduit le coût du traitement et l'impact environnemental causés par ces résidus. Ce système solide est préconisé pour améliorer le niveau de production des enzymes en raison de plusieurs avantages par rapport à la fermentation liquide (FML).

En raison des difficultés qu'on a rencontrées au laboratoire à cause de la pandémie du Covid-19 et le confinement poursuit. On n'a pas eu la chance d'appliquer notre protocole expérimental pour obtenir des résultats, mais ça n'empêche pas de juger utile notre stratégie de recherche, en se basant sur les résultats précédents des études menées sur la production de polygalacturonases d'origine fongique, et qui ont adopté le protocole que l'on a prévus.

Selon l'étude de **Bouharoune, (2016)** la production de pectinases de la moisissure *Aspergillus niger* est effectuée par fermentation sur deux milieux solides : écorces de citron et son de blé, dont le pH initial et la température d'incubation des cultures est de l'ordre de 3.2 et 37°C, respectivement. L'utilisation des écorces de citron, permet d'obtenir une activité EndoPGase très élevée mesurée à (1.7 %RF/min), et la valeur mesurée pour l'activité ExoPGase est de (0.626  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ). Aussi la teneur en protéine est très élevée (1.063 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et même chose pour l'activité pectinolytique totale est très élevée dans l'extrait brut des écorces de citron (53,83U), cela s'explique par la richesse du citron en pectine qui représente le sucre inducteur de ces enzymes. Après la précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse et concentration de l'extrait enzymatique, les activités enzymatiques dans les extraits prépurifiés sont donnés comme suit : l'activité EndoPGase (1.73% RF/min) et l'activité ExoPG de (0.564  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ) dans le milieu de fermentation, avec une diminution dans le taux des protéines solubles (0.497 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). L'augmentation de l'activité spécifique des deux enzymes montre que les pectinases se trouvent de plus en plus en quantités importantes par rapport aux autres protéines. Par ailleurs, **Patil et Dayanand, (2006)** ont utilisés des déchets agricoles pour la production de pectinases par *Aspergillus niger*, dont le pH et la taille de l'inoculum du milieu ont été ajustés à 5.0 et  $1.10^7$  spores/g, respectivement. Les flacons ont été incubés à 30°C pendant 72 heures. Le niveau maximum de production de pectinases a été atteint à 72 heures de culture. L'activité Exo pectinase était plus élevée par rapport à l'activité Endo pectinase : 10 U/g et 2 U/g, respectivement. Après

la précipitation au sulfate d'ammonium, l'activité maximale des pectinases a été enregistrée à 0.3% de concentration dans les écorces de citron, avec une augmentation de l'activité ExoPGase (15 U/g), poursuivie d'une augmentation d'EndoPGase (5 U/g).

Toujours dans la production de pectinase par *Aspergillus niger* en milieu solide à base de résidus d'orange ; **Bouhadi et al., (2016)** ont pu évaluer une activité maximale (32.41U/ml) de l'EndoPGase après 72 heures, et (20.66U/ml) après 144 heures pour l'ExoPGase. Les caractéristiques des pectinases produites montrent un pH optimum de 3.8 et une température optimale de 35°C.

Parmi les modes de fermentation utilisés pour la production des enzymes, la fermentation à l'état solide est généralement préférée parce qu'elle permet la production d'enzymes brutes hautement concentrées. Par conséquent, les coûts de l'extraction sont faibles et permettent ainsi, d'obtenir des enzymes purifiées. D'après les études sur la production des enzymes, on peut dire que la biosynthèse des enzymes d'origine microbienne dépend de certains facteurs, entre autres les composants du milieu, la température d'incubation, le pH initial du milieu, etc. L'étude de la composition chimique du substrat de fermentation s'impose aussi pour orienter une telle production. La composition des écorces de citron d'après **Bouharoune, (2016)** a révélé une teneur en protéines de 2.2% de matière sèche, en pectine de 4.4 % de matière fraîche et une teneur en cendre plus faible 1.7% de matière sèche. En ce qui concerne les écorces d'orange d'après **Bouhadi et al., (2016)** qui ont enregistré sa richesse en sucres réducteurs de 45.5% du poids sec des résidus et de 51% en sucres totaux avec un taux très élevé en pectine de 23.87% et de 96.78% en cendre.

Ces résultats montrent que ces sous-produits d'agrumes sont considérés comme une bonne source de pectine qui est un facteur inductible, ce qui justifie leur emploi pour la production de ces enzymes. Sachant que l'utilisation des écorces d'orange donne la meilleure production de polygalacturonases (**Bouhadi et al., 2016**) par rapport aux écorces de citron qui ont donné une production moyenne (**Bouharoune, 2016**).

A la lumière de la littérature examinée, les résidus d'orange sont largement utilisés comme substrat de fermentation pour la production des enzymes pectinolytiques, cela est dû à la teneur élevée en polysaccharides dans ces écorces notamment la pectine. Ceci indique que les écorces d'orange pourraient être appropriées à comparer avec celle du citron ou autres sous-produits agroindustriels, pour la production de pectinases par FMS.

*Conclusion*

## Conclusion générale et perspectives

Ce travail, a pour objectif la valorisation des déchets d'agrumes générés par les industries agro-alimentaires, et l'exploitation des aptitudes métaboliques d'*Aspergillus niger*, l'espèce la plus répondeuse, pour la production des enzymes pectinolytiques selon la culture en milieu solide. Passant tout d'abord par la préparation du matériel végétal particulièrement, le broyage et le tamisage des écorces d'orange et de citron afin d'obtenir le milieu de base approprié sous forme d'une poudre, prêt pour la production des polygalacturonases. Le milieu de base est humidifié à 70% avec une solution de glucose et de sels minéraux. Après incubation des erlens de culture à 30°C pendant 5 jours, nous procédons à une extraction des enzymes recherchées par l'utilisation de l'eau distillée. Après filtration et centrifugation, le surnageant obtenu représente l'extrait enzymatique brut, utilisé pour le dosage des activités enzymatiques. Cet extrait fait aussi l'objet d'une purification partielle par précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium, suivie par une dialyse permettant le dessalage et la concentration des extraits.

La situation actuelle et le confinement poursuit, nous ont empêché d'appliquer le plan expérimental prévu et d'avoir des résultats. Mais la démarche proposée semble intéressante pour la production des polygalacturonases par FMS.

La composition des écorces d'agrumes révèle une richesse en sucres. Cette proportion favorise son utilisation comme milieu de base pour la culture des microorganismes. En effet, les écorces d'orange contiennent une teneur importante en pectines, ce qui entraîne une bonne induction pour la synthèse des enzymes pectinolytiques. Les résultats de plusieurs études montrent que l'*Aspergillus niger* possède une capacité importante pour la production des enzymes pectinolytiques, ce qui est encourageant de poursuivre les investigations avec ce champignon, tout en valorisant d'autres déchets agro-industriels.

Comme perspectives à ce travail, nous proposons de :

- Compléter et de perfectionner l'analyse qualitative et quantitative de cette enzyme, par des méthodes analytiques beaucoup plus sophistiquées telles que la chromatographie sur colonne et l'électrophorèse SDS page.
- Essayer cette étude avec une autre espèce fongique capable de produire des pectinases.
- Valoriser d'autres déchets industriels pour la production et tester d'autres agents humidifiants, afin de trouver un procédé économique d'intérêt industriel.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

- **Abarca L.M., Francesc A., Jose C. et Cabanes J.F. (2004).** Taxonomy and significance of black Aspergillia. Antonie van Leeuwenhoek Kluwer. Academic Publisher. 86: 33- 49.
- **Acuna-Arguelles M. E., Gutierrez-Rajas M., Viniestra-Gonzalez G., Favela- Toress E. (1995).** Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A.niger* in submerged and solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 43 (5): 808-814.
- **Afnor, (1986).** Les dossiers de la normalisation issn, (2), 8297 ,4827.
- **Aftab A., Singh A. et Ward O.P. (2007).** Chymostatin can combine with pepstatin to eliminate extracellular protease activity in cultures of *Aspergillus niger* NRRL-3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34: 165- 169.
- **Alana A., Liama M., Serra J. L. (1991).** Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium*. FEBS Letters. 280: 335–350.
- **Alexopoulos C. J. et Mims C.W. (1979).** Subdivision zygomycotina. En Introductory Mycology. John Wiley and Sons. New York. 191-228.
- **Amid M., Manap Y., Zohdi K. (2014).** Purification and characterization of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. European Food Research and Technology. 239: 21–29.
- **Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.13 (2). 281-294.

### B

- **Bakhtiari M.R., Faezi M.G., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N. et Amidi Z. (2006).** Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011. Process Biochemistry. 41: 547-551.

- **Balajee S. A., D. Nickle, J. Varga and K. A. Marr. (2006).** Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705-12.
- **Bampidis V. et Robinson P. (2006).** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3), 175-217.
- **Baron A et Thibault J. F. (1985).** Les enzymes pectinolytiques. Dans : *Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel*. Mouranche A., Costes C., pp : 143-164, Gauthier-Villars.
- **Baracat-Pereira M. C., Vanetti M. C. D., Araujo E. F. D., Silva D. O. (1993).** Partial characterization of *Aspergillus fumigatus* polygalacturonases for the degumming of natural fibers. *Journal of Industrial Microbiology*. 11:139–142.
- **Basset A., Khush R. S., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann J. A., Lemaitre, B. (2000).** The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 3376-81.
- **Bekhouche F., Bonnin E., Boulahrouf A., Levaux J.Y. (2006).** Production d'enzyme polygalacturonase par des souches microbiennes isolées du lait cru et des olives noires et vertes. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 658- 663.
- **Bennett J. W. (2009).** *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical Mycology*: 1-8.
- **Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al., (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris.17 p.
- **Blanco P., Sieiro C., Dtaz A., Villa T. G. (1997).** Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 711-712.
- **Bocquet J. (1993).** Généralités sur les microorganismes en biotechnologie. Tech et Doc. Lavoisier. Paris.38-46 p.
- **Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F. et Villard J. (2005).** Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. 2ème Ed MASSON. Paris.191.
- **Bouhadi N., Nouani A., Benmalek N., Benchabane A. (2016).** Valorisation des sous-produits d'agrumes : production d'enzymes pectinolytiques par bioconversion. *Algerian journal of environmental science and technology*, 2 (1), 148-154.

- **Bouharoune K. (2016).** Contribution à la production d'enzymes pectinolytiques par fermentation sur deux milieux solides. Mémoire Master : Qualité et conservation des aliments. Boumerdes: Université M'Hamed Bougara, 79 p.
- **Bousseboua H. (2004).** Cours de microbiologie générale. Constantine : Université Mentouri. 9-12, 251, 255 p.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris. 16, 41, 110, 183,364.
- **Buzzini P., Martini A. (2002).** Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeastlike strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 1020–1025.

## C

- **Charnock S., Cleary B. (2005).** Les enzymes : Applications industrielles et analytiques. *Mégazyme*. Extrait de la revue des œnologues n°116. 5 p.
- **Combo A. M. M., Aguedo M. et Paquot M. (2011).** Les oligosaccharides pectiques production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 153-164.

## D

- **Davies G., Henrissat B. (1995).** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853-859.
- **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de contrôle sanitaire. *Médicale international et TEC et DOC*, Paris. PP. 112-140.
- **Demir H., Tari C. (2016).** Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 96: 3575-3582.
- **De Vries R.P. (2002).** The  $\beta$ -1, 4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.*, 269, 4985-4993.
- **Dixon M. (1953).** A nomogram for ammonium sulphate solutions, *Biochem. J.* 54:457

- **Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z. et Bennamoun L. (2006).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*. 73: 190-197.
- **Drouin. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de maître ès sciences. Institut national de la recherche scientifique INRS-centre Eau, Terre et Environnement. 95 p.
- **Duchiron F., Copinet E. (2011).** Fermentation en milieu solide. Document (Doc. BIO 620) Université de Reims. 1-16 p.
- **Durand A. (2003).** Bioreactor designs for solid-state fermentation *Biochem. Eng J* 13: 113-125.
- **Durand A. (1983).** Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de micro-organismes filamenteux. Les antagonismes microbiens. 24ème colloque SFP. Ed. INRA Pub.
- **Dursun A.Y. (2003).** The effect of pH on the equilibrium of heavy metal biosorption by *Aspergillus niger*. *Fres. Environ. Bull.* 12: 1315-1322.

## F

- **Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. et Vniegra-Gonzalez G. (2006).** Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 221-227.
- **Fedecici F. (1985).** Production purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 51: 139-150.
- **Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. (2010).** Citrus d'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des publications universitaires. Edition : 1.03.5130, Algérie.
- **Fogarty M. V., Kelly C. T. (1983).** Pectic enzymes. In: Fogarty M.W. (ed), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science, London, pp. 131–182.
- **Francis S and Emmanuel G (2016).** Production, Purification and Characterization of Polygalacturonase from *Aspergillus niger* in Solid State and Submerged Fermentation Using Banana Peels. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, 10(1), 1-15.

## G

- **Gagnon M. C. (2009).** Production et optimisation d'une pectinase en vue de son utilisation dans le procédé de fabrication du papier. Thèse de doctorat : Biophysique et Biologie Cellulaires. Québec : L'Université du Québec à Trois-Rivières, 305 p.
- **Gassara F. (2012).** Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications. Thèse de Doctorat : Sciences de l'eau. Québec : Université du Québec Institut national de la recherche scientifique Centre Eau Terre Environnement, 366 p.
- **Gautam A., Sangeeta Y., Dinesh Y. (2017).** Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. 7(2): 122.
- **Gervais P and Benssusan M. (1994).** Solid-state fermentation of the genus *Aspergillus*. Plenum. Press, New Y. 101-140 p.
- **Gervais P and Molin P. (2003).** The role of water in solid-state fermentation. Biochem Eng J 13: 85-101.
- **Guevara M. A., Gonzalez-Jaen M. T., Estevez P. (1997).** Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. Can J Microbiol; 43:245–53.
- **Guimarães B.G., Souchon H., Lytle B.L., Wu J.H., Alzari P.M. (2002).** The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolases cells, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome, Journal of Molecular Biology. 320: 587-96.
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire, (edn) dunod. Paris. 625 p

## H

- **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. (1994).** Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8th Ed. International Mycological Institute, Egham. United. Kingdom. 632p.
- **Hainque B et autres. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Gorenjski Tisk. Paris. 34- 40- 42- 45-303 p.

- **Heerd Doreen, Sirma Yegin., Canan Tari and Marcelo Fernandez-Lahore. (2012).** "Pectinase Enzyme-Complex Production by *Aspergillus Spp.* In Solid-State Fermentation: A Comparative Study." Food and Bioproducts Processing 90, n° 2: 102-110.
- **Heitman J., Kronstad J.W., John T.W. et Casselton L.A. (2007).** Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. Ed ASM Press « American Society for Microbiology ». USA. 542.
- **Henrik V.S., Jacob K.J., Susanne O.S., Jesper H and Naomi G (2007).** Minireview. Biosynthesis of pectin. Physiologia Plantarum, 129: 283–295.
- **Hölker U., Höfer M. et Lenz J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 64: 175-186.

## I

- **Islam S., Feroza B. A.K.M. Alam B and Begum S. (2013).** Pectinase production by *Aspergillus niger* isolated from decomposed apple skin. Bangladesh journal of scientific and industrial research, 48 (1), 25-32.

## I

- **Jaubert S., Laffaire J.B., Abad P., Rosso M. N. (2002).** A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Federation of European Biochemical Societies letters. 522: 109–112.
- **Jarai G. et Buxton F. (1994).** Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. Current Genetics. 26: 238-244
- **Jayani R. S., Saxena S., Gupta R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem. 40: 2931-2944.

## K

- **Kirk, P.M., Cannon, P.F., David J.C., Egham U.K. et Stophes J.A. (2001).** Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9th Ed. CABI. Bioscience. UK. Center and Central Bureau Voice. Utrecht. The Net. 260 p.
- **Kumar P., and Suneetha V. (2014).** Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme. *Int. J. Drug Dev. Res.* 6, 109-118.

## L

- **Lamrini S. (2012).** Etudes préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Mémoire Master : Biotechnologie Microbienne. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fés Maroc, 79 p.

## M

- **Manachini P. L., Fortina, M. G., Parini C. (1987).** Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. 9: 219-224.
- **Manachini P. L., Parini C., Fortina M. G. (1988).** Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 682- 685.
- **Martin MA, Siles JA, Chica AF and Martín A, (2010).** Biomethanization of orange peel waste. *Bioresour Technol*, 101:8993–8999
- **Manpreet S., Sawraj S., Sachin. D., Pankaj S., Banerjee U.C. (2005).** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1(2). 1-9.
- **Membre J. M., Burlot P. M. (1994).** Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2017–2022.
- **Merve K., Antonio G., Sousa., Marie J. C., Susanne, O. Sorensen., Marie C. R. (2014).** Characterization of citrus pectin samples extracted under different condition influence of acid type and pH of extraction. 114: 1319–1326.
- **Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2e Ed, DOIN éditeurs, France, pp 204-205.

- **Mhetras N.C., Bastawde K.B. et Gokhale D.V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*. 100: 1486-1490.
- **Moshrefi M., Luh B. S. (1984).** Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. *Journal of Food Biochemistry*. 8:39–54.
- **Moutounet M. (2014).** Terroir d'innovation. Institut français de la vigne et du vin. Enzymes en œnologie : Fabrication, réglementation, applications, Itinéraires n°26. 32 p.
- **Mrudula S., Anitharaj R. (2011).** Pectinase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Glob J Biotechnol Biochem* 6: 64–71.

## P

- **Palanivelu P. (2006).** Polygalacturonases: Active site analysis and mechanism of action. *Indian Journal of Biotechnology*. 5: 148-162.
- **Pandey A. (1994).** Solid state fermentations. Wiley Eastern Publishers, New Delhi.
- **Pandey A. (2003).** Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13 (3).81-84.
- **Pelmont J. (1995).** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaires de Grenoble. 2<sup>ème</sup> édition .1040 p
- **Pasqualotto A. C. (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science and Business Media. New York. 1027.
- **Pathak N., Sanwal G. G. (1998).** Multiple forms of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*. 54: 147–52.
- **Patil S. R and Dayanand A. (2006)** Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, 97 (18), 2340-2344.

## Q

- **Quatresous N. (2011).** Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges. 132p.

## R

- **Rahardjo YSP., Tramper J., Rinzema A. (2006).** Modeling conversion and transport Phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechno Adv* 24:161-179.
- **Raimbault M. (1980).** Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.
- **Raimbault M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1 (3). 174-188.
- **Ranveer S. J., Shivalika S., Reena G. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40: 2931–2944.
- **Rao M.B., Tanksaleam., Ghatgem., Sdeshpandev v. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbial. Mol.Biol.Rev.*597-635p.
- **Raper K.B. et Fennel D.I. (1977).** The Genus *Aspergillus*. Krieger Malabar. Florida. 686 p.
- **Renard C. M. G. C. and Thibault J. F. (1993).** Structure and properties of apple and sugar beet pectins extracted by chelating agent. *Carbohydrate Research*, 244, pp: 99-114.
- **Rexová-Benková L. et Markovic O. (1976).** Pectic enzymes. *Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 33, pp: 323-385.
- **Rodríguez-Fernández D. E., J. A. Rodríguez-León J. C. de Carvalho W. Sturm and C. R. Soccol (2011).** "The Behavior of Kinetic Parameters in Production of Pectinase and Xylanase by Solid-State Fermentation." *Bioresource Technology*102, no. 22: 10657-62.
- **Roukas T. (2000).** Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *J. Microbiol Biotechnol.* 25: 298-304.
- **Rombouts F.M., Pilnik W.L. (1980).** Pectic enzymes. In: Rose A.H. (Ed), *Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions*, Vol. 5, Academic Press, London, England, pp. 227-282.
- **Roussos S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulase. Thèse d'Etat, Université de Provence, Marseille. 193 p.

## S

- **Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J. (1993).** Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 213-279.
- **Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 40(8). 2689-2694.
- **Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. et Van Dijck P.W.M. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger* - areview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 426–435.
- **Senal J., Fraselle, J., Impens R., Kummert J., Lepoivre, Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., et Viseur J. (1993).** *Traité de pathologie végétale.* Gembloux. Belgique.
- **Shen Z., Denton, M., Mutti N., Pappan K., Kanost, M., Reese J., Reeck G. (2003).** Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science.* 3: 1–9.
- **Singhania R. R., Patel K., Soccol C. L., Pandey A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation *Biochem Eng J.* 44:13-18.
- **Singh P., Dwivedi U. N. (2008).** Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indicacv. Dashehari*) fruit. *Food Chemistry.* 111: 345–349.
- **Somogyi M. (1952).** Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. *J Biol Chem* 200: 245.
- **Srinubabu G., Lokeswari N., Jayaraju K. (2007).** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.,* 4(2); 208-215.

## T

- **Tabuc C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse. 85p

- **Taskin M. (2013).** Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172.
- **Tien M. Marcus. (1985).** Wallenberg foundation symposia proceeding: 2; New horizons. Lectures given at the 1985 Marcus Wallenberg Symposium in Falun, Sweden.
- **Torquato L. D., Pachiega R., Crespi M. S., Nespeca M. G., de Oliveira J. E and Maintinguer S. I. (2017).** Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste management*, 59, 181-193.
- **Tsuymu S. (1997).** Self catabolite repression of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol*. 137:1035–6.
- **Tortora J., Funk, B.F. and Case Ch.I. (2003).** Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN. Canada. 25 p

## V

- **Varga J., Juhasz A., Kevi, F. et Kozakiewicz Z. (2004).** Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 627-640.

## W

- **Wakabayashi K., Huber D. J. (2001).** Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Physiologia Plantarum*. 113: 210– 6.
- **Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J. et Sing A. (2006).** Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.
- **Whitaker JR. (1990).** Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. *Microbial enzymes and biotechnology*. 2nd Ed. London: Elsevier Science Ltd. p. 133–76.

## Y

- **Yadav S., Yadav PK., Yadav D., Yadav KDS. (2008).** Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry*. 43: 547-552.

Z

- **Zenati R. (2018).** Fermentation d'*Aspergillus niger* cultivé sur milieu à base de lactosérum. Mémoire Master : Microbiologie Appliquée. Oum El Bouaghi : Université L'Arbi Ben Mhidi, 66 p.

*Annexes*

## Annexe n°1

La commission des enzymes (Enzyme Commission) a établi une classification qui attribue à chaque enzyme un nombre à quatre chiffres (E.C. X.X.X.X) en fonction de :

- La réaction chimique.
- La classe de réaction.
- La sous-classe.
- Des caractéristiques de l'enzyme.

## Annexe n°2

- **Préparation du milieu de culture : PDA (Potato Dextrose Agar).**

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

Stérilisation par autoclavage, à 121°C pendant 20 minutes.

- **Préparation de l'extrait de pomme de terre**

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

- **Préparation du milieu de culture : Sabouraud.**

- Eau distillée.....1000ml
- Glucose.....20g
- Agar.....15g
- Peptone.....10g

Stérilisation par autoclavage, à 121°C pendant 20 minutes.

### **Annexe n°3**

#### **- Dosage des protéines (Méthode de Lowry ,1951)**

Les solutions nécessaires sont :

- Solution A : Carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0.1N.
- Solution B : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée.
- Solution C : Sulfate de cuivre, 5 H<sub>2</sub>O à 1% (w/v) dans l'eau distillée,
- Solution D : 0.5 ml de la solution C + 0.5 ml de la solution B + 50 ml de la solution A. Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
- Solution E : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 au moment de l'emploi.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit :

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

Après une agitation et un repos de 10 minutes sur la paillasse, 0.5 ml de la solution E sont rajoutés. Après une deuxième agitation, le développement de la coloration est obtenu après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est réalisée à 650 nm.

Gamme d'étalonnage :

- Préparation de l'étalon de protéine (sérum albumine) 0.5 g de BSA dans 100ml d'eau distillée.
- Préparation d'une solution fille de 100 ml de la solution mère comme suivant :

## Préparation des solutions et dosage des protéines (Bouharoune, 2016).

	<b>Tube 1</b>	<b>Tube 2</b>	<b>Tube 3</b>	<b>Tube 4</b>	<b>Tube 5</b>	<b>Tube 6</b>
<b>L'eau distillée (ml)</b>	10	8	6	4	2	0
<b>BSA (ml)</b>	0	2	4	6	8	10
<b>Solution cuivrique (Lowry A+B)</b>	5 ml					
Agitation et attendre 10 min						
<b>Folin – Ciocalteu (dilué)</b>	0.5 ml					
Agitation et laisser 30 min à l'obscurité						
Mesure l'absorbance à 650 nm						

**Annexe n°4****- Dosage de l'activité enzymatique par la méthode au DNSA**

Préparation des réactifs :

- DNSA
  - 1 g de DNSA.
  - 20 ml de NaOH (2N).
  - 50 ml d'eau distillée.
  - 30 g de tartrate double de sodium et de potassium.

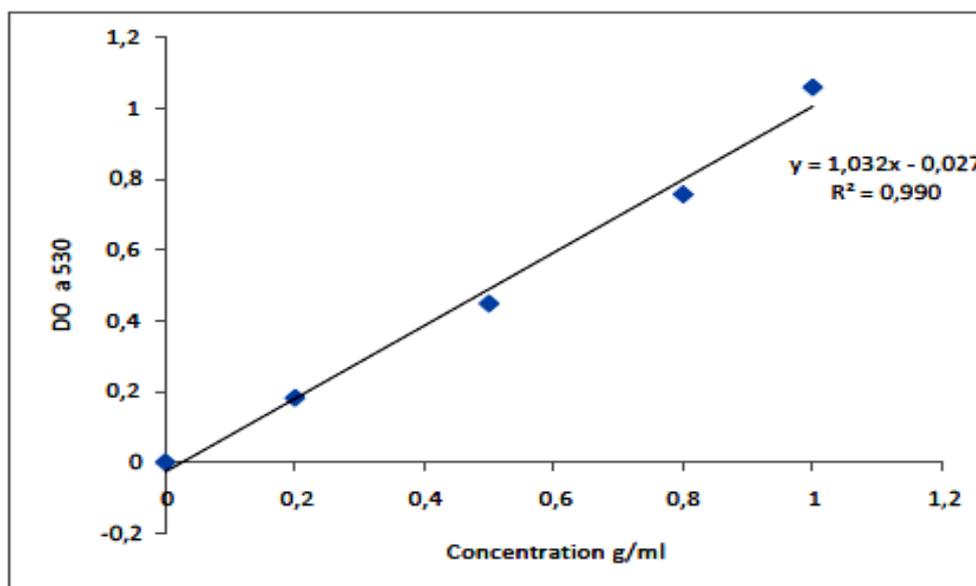
Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

- Solution substrat
  - 1 g pectine.
  - 100 ml de tampon acétate 0.1 M à pH 5.6.
- Courbe d'étalonnage
  - Préparation de la solution mère du glucose a 1 g/L.
  - 1 g d'acide galacturonique dans 1 L d'eau distillée.

Préparation des dilutions comme suivant :

Dosage de l'activité enzymatique au DNS (**Bouharoune, 2016**).

N° de tubes	1	2	3	4	5
L'eau Distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2
AC.gal (g)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
DNS	3 ml				
Incubation de (60 min) ébullition puis refroidissement de (5 min)					
L'eau Distillée (ml)	6				
[C] g/ml	0	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
La lecture de l'absorbance à 530 nm					

Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique (**Bouharoune, 2016**).

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

**Filière : Biotechnologie**

**Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique**

**Titre**

**La production des enzymes pectinolytiques par *Aspergillus niger* cultivé sur les résidus d'agrumes.**

**Résumé**

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases, font partie des enzymes hydrolases connues par leurs applications industrielles multiples. Les polygalacturonases sont les plus connues de la famille des pectinases produites par *Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêt économique majeur. Ce travail vise la production des polygalacturonases selon le procédé de la fermentation solide à base des résidus d'agrumes (citron et orange), ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes. Aussi, ces substrats sont riches en nutriments surtout la pectine qui est le substrat inducteur de ces enzymes. Les fermentations sont effectuées sur les résidus de citron ou d'orange afin de choisir le meilleur substrat. Après humidification des substrats à 70%, inoculation par la moisissure *Aspergillus niger* et incubation à 30°C pendant 5 jours, l'extraction des enzymes est effectuée avec l'eau distillée, suivi d'une filtration et d'une centrifugation. Le surnageant obtenu sert pour la mesure de l'activité EndoPGase par viscosimétrie, et le dosage de l'activité ExoPGase selon la méthode de Somogy et Nelson, (1952). Une purification partielle de l'extrait enzymatique brut est aussi envisagée, par fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium et un dessalage et concentration par dialyse. Au vu des résultats des études précédentes, l'*Aspergillus niger* est utilisée à échelle industrielle pour la production des pectinases, aussi les résidus d'agrumes semblent un bon substrat pour ce type de production, selon la fermentation à l'état solide.

**Mots clés :** *Aspergillus niger*, les enzymes pectinolytiques, l'endopolygalacturonase (EndoPGase), l'exopolygalacturonase (ExoPGase), fermentation sur milieu solide (FMS), résidus d'agrumes (orange et citron), substances pectiques.

**Membre du jury :**

Président du jury : <b>BENKAHOUL Malika</b>	M. C. B (UFM Constantine).
Rapporteur : <b>LEGLIMI Hind</b>	M. C. A (UFM Constantine).
Examineur : <b>BOUCHERIT Zaineb</b>	M. A. A (UFM Constantine).

**Présenté par :**

HASNAOUI Sofia

ZEMMOURI Sara

ZIADI Chaima

**Année universitaire : 2019-2020**