

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie - Biologie Cellulaire et Moléculaire

للإدارة علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية - البيولوجيا الخلوية والجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

N° d'ordre :

Spécialité : Biochimie.

N° de série :

Intitulé :

**Etude bibliographique d'une pectinase d'origine fongique :
production et séparation.**

Présenté par : BOURKINA OUMEIMA

Le 06 /11/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : M^{me} BENNAMOUN Leila (MC-B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr NOUADRI Tahar (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : M^{me} DAKHMOUCHE Scheherazad (MCA- ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).

**Année universitaire
2021 - 2022**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie - Biologie Cellulaire et Moléculaire

للمادة علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية - البيولوجيا الخلوية والجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

N° d'ordre :

Spécialité : Biochimie.

N° de série :

Intitulé :

**Etude bibliographique d'une pectinase d'origine fongique :
production et séparation.**

Présenté par : BOURKINA OUMEIMA

Le 06 /11/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : M^{me} BENNAMOUN Leila (MC-B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr NOUADRI Tahar (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : M^{me} DAKHMOUCHE Scheherazad (MCA- ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).

**Année universitaire
2021 - 2022**



Remerciement

Nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements à Allah qui nous a donné le courage et la volonté de mener à terme cette étude.

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **BENAMOUN Leila** d'avoir accepté d'encadrer ce mémoire, pour ses conseils et orientations fructueuses pour la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de la réalisation de ce modeste travail.*

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et notre gratitude envers tous ceux qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de cette traversée du désert et nous ont permis de redoubler d'effort et de persévérance.

*Nos vifs remerciements vont à Madame **Dekhmouche Scheherazad** (MCA, à ENSC) ainsi qu'au M. **Nouadri Tahar** (MCA, à l'UFMC₁) qui ont accepté d'examiner ce mémoire.*



Dédicaces

A ma très chère mère Nabila

Quoi que je fasse ou quoi je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père Zineddine,

Tu a toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

*A mon unique frère Alaa Eddine, et mes belles sœurs Bessma ,
Narimene .*

*A mon beau-frère Faycel Puisse Dieu te donne santé, bonheur
courage et surtout réussite.*

Oumaima Bourkina

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations	iii
Résumé	
Introduction	1
Chapitre I la moisissure <i>Aspergillus niger</i>	
1. Généralités	2
2. Cycle de vie d' <i>A. niger</i>	2
3. Définition	3
4. Diversité et taxonomie des <i>Aspergillus</i>	4
5. L'écologie	6
6. Applications industrielles et pharmaceutiques d' <i>A.niger</i>	7
7. Les acides organiques	7
8. Synthèse biologique des <i>A. niger</i>	8
9. Reproduction	8
a. Aspect macroscopique	9
b. Aspect microscopique	9
10. Besoins nutritionnels et cultureux des <i>Aspergillus</i>	10
11. Besoins cultureux.....	10
Chapitre II Les enzymes pectinolytiques	11
1. Substrats pectiques.....	11
2. Les enzymes pectinolytiques :	11
3. Classification des enzymes pectinolytiques.....	12
4. Les PGs	13
4.1. Définition.....	13
4.2. Origine microbienne	14

4.3.	Les PGs d' <i>A. niger</i>	14
4.3.1.	Mécanisme de la catalyse de la PG	15
4.3.2.	Résidus impliqués dans la liaison du substrat	15
4.3.3.	Structure	15
4.3.4.	Classification des PGs	18
4.3.5.	Mode d'action de la PG	19
4.3.6.	Les propriétés biophysiques et enzymatiques des PGs	20
4.3.7.	Caractérisation des PGs	21
4.3.7.1.	Effet du pH	21
4.3.7.2.	Effet de la température	22
4.3.7.3.	Effet des effecteurs	23
4.3.8.	Applications industrielles de la PG d' <i>A. niger</i>	24
Chapitre III Les PGs produites par fermentation sur milieu solide.....		28
I.	Production, purification et caractérisation des PGs issues d' <i>A. niger</i> dans le milieu solide en utilisant les pelures de bananes	28
1.	Méthodes :.....	28
2.	Résultats :.....	29
2.1.	Mise en évidence de l'activité pectinolytique	29
2.2.	L'influence des différents paramètres sur la production de la PG par <i>A. niger</i>	29
2.3.	Effet de la source du carbone	29
2.4.	Effet des sources d'azote sur l'enzyme Production.....	30
2.5.	L'effet de la concentration de l'inoculum.....	31
2.6.	Purification des PGs produites par <i>A. niger</i>	31
2.7.	Effet de la température sur l'activité et la stabilité des PGs purifiées.....	32
2.8.	Effet du PH sur l'activité PG.....	33
II.	La production des PGs par SSF sur un mélange de son de blé et de pulpe de la betterave sucrée.....	33
1.	Méthodes :.....	33

2.	Résultats.....	34
2.1.	Effet du rapport son d'orge/ pulpe de betterave sucrée.....	34
2.2.	Effet de la concentration d'inoculum.....	34
2.3.	Effet du temps d'incubation.....	35
2.4.	Effet de la température de fermentation :.....	36
2.5.	Effet du taux d'humidité sur l'activité enzymatique.....	37
III.	Conclusion.....	37
	Conclusion et perspectives.....	38
	Références bibliographiques.....	38

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des enzymes dégradant les pectines (homogalacturonanes) d'après.....	13
Tableau 2: Résumé de la purification des PGases d' <i>A. niger</i>	31

Liste des figures

Figure 1: Développement d'Aspergillus niger par microscope électronique à balayage	11
Figure 2: Taxonomie, phylogénie et applications/produits clés des espèces d'Aspergillus importantes sur le plan industriel.....	5
Figure 3: Morphologie de trois moisissures représentatives.	6
Figure 4: a) Aspect microscopique, b) représentation schématique de la conidiophore d'A. niger.....	9
Figure 5: Mode d'action des pectinases.....	12
Figure 6: Structure tridimensionnelle de endo PG II d'A .niger	16
Figure 7: Alignement de séquence des acides aminés pour huit endoPGs à partir de la première méthionine	17
Figure 8: Modèle de la structure des endoPGs. En rose : acides aminés du site actif, en orange : N-terminal et en bleu : C-terminal	17
Figure 9: Modèle à ruban de la structure de la polygalacturonase : Endo-Polygalacturonase II d'A.niger	18
Figure 10: Réaction d'hydrolyse du lien glucosidique C1 1-4 du PGA par une endoPG19	
Figure 11: Mécanisme d'action de la polygalacturonase d'A. niger	21
Figure 12: Effet du pH sur l'activité PGase	22
Figure 13: Effet de la température sur l'activité Polygalacturonase	22
Figure 14: Effet de CaCl ₂ sur l'activité polygalacturonase	23
Figure 15: Effet de l'EDTA sur l'activité PGs	24
Figure 16: Effet des enzymes pectinolytiques dans l'extraction de l'huile d'olive. (a) Effet de la pectinase lors du malaxage. (b) Effet de la pectinase sur l'étape de décantation de l'huile.....	25
Figure 17: Effet sources de carbone sur la production de PGases par A. niger	30
Figure 18: Effet sources d'azote sur la production de PGs par A. niger	30
Figure 19: Effet de concentration d'inoculum sur activité PGs	31
Figure 20: Profil d'élution de la polygalacturonase d'Aspergillus niger sur Sephadex G100.....	32
Figure 21: Effet de la température sur l'activité (◆) et la stabilité(■) des PGases purifiées	32
Figure 22: Effet du PH sur l'activité (◆) et la stabilité(■) des PGs purifiées.	33

Figure 23: Effet du pourcentage de pulpe de betterave à sucre en mélange avec du son d'orge sur l'activité enzymatique.....	34
Figure 24: Effet du nombre de spores sur l'activité enzymatique produite	35
Figure 25: Effet du temps d'incubation sur la production des PGs.....	36
Figure 26: Effet de la température sur l'activité enzymatique	36
Figure 27: Effet du taux d'humidité sur l'activité PGs	37

Liste des abréviations

APG : Acide polygalacturonique

PG : polygalactorunase

Endo PG : Endo polygalacturonase

FMS/ SSF : Fermentation en milieu solide

FML : Fermentation en milieu liquide

SmF : Fermentation en milieu submergé

GaIA : Acide galacturonique

Résumé

Résumé

Ce travail vise à la production de la polygalacturonase (PG) d'*Aspergillus niger* selon le procédé de la fermentation solide (SSF) et l'optimisation de différents paramètres de production, en se concentrant sur les travaux bibliographiques précédents à fin de connaître ces conditions optimales.

Les PGs sont les enzymes qui font partie de la famille des pectinases. *A. niger*, l'espèce fongique la plus répondeuse en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économiques majeurs notamment les PGs, ces dernières sont l'intérêt de beaucoup d'étude en raison de leur utilité et efficacité dans divers industries : extraction de jus non clarifié, bioénergie, alimentation, recyclage de déchets (écologique).

D'après les études précédentes une meilleure production de PGs par *A. niger* nécessite un taux d'humidité soit entre 40 et 60%, une température entre 30 et 40 °C et un PH au environ de 5 et en d'une source d'azote et le fructose comme source de carbone.

Mots clés : *A. niger*, les PGs, les paramètres de production, la fermentation solide.

Résumé

Abstract

This work aims to study the production of PGs issued from *A. niger* by using solid-state fermentation (SSF) and optimize different parameters of production based on bibliographic previous works about this subject and conclude optimal conditions for this procedure.

Polygalacturonases (PGs) are enzymes are part of the pectinases family. *Aspergillus niger* the most common popular fungal species in the industry for its capacity of producing a multitude metabolites which concerns the economic interest including PGs. These enzymes are the interest of many studies because of their usefulness and efficiency in various industries: extraction of unclarified juice, bioenergy, food, recycling of waste (ecological).

For a best production of PGs by *A. niger*, it is demonstrated that 40 to 80 % of humidity, a temperature between 30 and 40°C, and a PH close to 5, in the presence of a nitrogen source and fructose as a carbon source.

Key words: *A. niger*, PGs, optimal conditions, solid fermentation.

تهدف هذه الدراسة الى إنتاج polygalacturonase بواسطة *A.niger* باستعمال التخمر الصلب وتحسين مختلف شروط الإنتاج بالإعتماد على دراسات سابقة حول هذا الموضوع ومنه استنتاج الشروط المثالية.

ال polygalacturonases انزيمات تنتمي إلى عائلة البيكتينازات. *A. niger* من اكثر أنواع الفطريات إنتشارا نظرا لقدرته على إنتاج العديد من جزيئات الأيض ذات قيمة في المصانع التي تهتم اقتصادها منها ال polygalacturonases. هذه الأخيرة هي موضع اهتمام العديد من الدراسات بسبب فائدتها وكفاءتها في مختلف الصناعات: استخراج العصير غير الموضح ، والطاقة الحيوية ، والغذاء ، وإعادة تدوير النفايات (البينية).

لأفضل إنتاج Polygalacturonases بواسطة *A.niger* لقد تبين أن استعمال من 40-80% من الرطوبة، و حرارة بين 30-40 C° و PH 5 بحضور مصدر للأزوت و الفراكتوز كمصدر كربون.

الكلمات المفتاحية : *A.niger* ، البيكتينازات ، الشروط المثالية ، التخمر الصلب.

Introduction

Introduction

Les champignons sont des micro-organismes eucaryotes, les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux opportunistes, connue par leur diversité. *A. niger* l'espèce dominante des aspergillus connue par leurs applications aux différents domaines, ils ont reçu une attention particulière ces dernières années en tant que source majeure des métabolites à valeur ajoutée tels que les enzymes (**Perfect et al., 2001**).

Les enzymes sont des biomolécules qui catalysent des réactions biochimiques spécifiques et diverses ce qui explique leur importance dans différents domaines. Ces biocatalyseurs peuvent être d'origine animale, végétale ou microbienne, ces dernières sont les enzymes dominantes dans le marché avec un taux de 88%, et le reste 8% animale et 4 % végétale (**Gurung et al., 2013**).

En valorisant les déchets d'industrie du jus de fruits (orange, banane...) et l'utiliser comme un substrat naturel pour produire des PGs.

Dans cette étude, le but est d'étudier la production et l'optimisation des différents paramètres des PGs à travers la fermentation à l'état solide (SSF).

Afin d'apporter notre contribution dans ce domaine, nous avons choisi de mener une étude sur la production des PGs par *A. niger*, qui se décline en trois chapitres :

- ✚ **Chapitres I** : Est consacré à une synthèse bibliographique sur la moisissure *A. niger* et leur application industrielle, besoins nutritionnels et leur synthèse biologique
- ✚ **Chapitres II** : visent l'étude des enzymes pectinolytiques.
- ✚ **Chapitres III** : Etude de quelques articles visant la production des PGs par SSF.

Enfin, ce travail est achevé par une **conclusion**.

Chapitre I

La moisissure

Aspergillus niger

1. Généralités

Aspergillus est un genre de champignon omniprésent qui se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition. Il existe environ 180 espèces d'*Aspergillus*, qui peuvent être nocifs pour l'être humain, en causant des mycoses, ou l'Aspergillose, une infestation des voies respiratoires, potentiellement mortelle (**Samson et Varga, 2007**). Le genre comprend près de 180 espèces répartis en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (**Botton et al., 1990**).

2. Cycle de vie d'*A. niger*

A.niger se trouve dans l'environnement sous forme de filaments fongiques ramifiés : mycélium, ces derniers peuvent se développer à cause de stress et donne des conidiophores. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninuclées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides, qui sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies (2 à 3 μm de diamètre) qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement (**Quatresous, 2011**). La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, il y aura l'apparition d'un tube germinatif (**Fig 1**) qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (**Quatresous, 2011**).

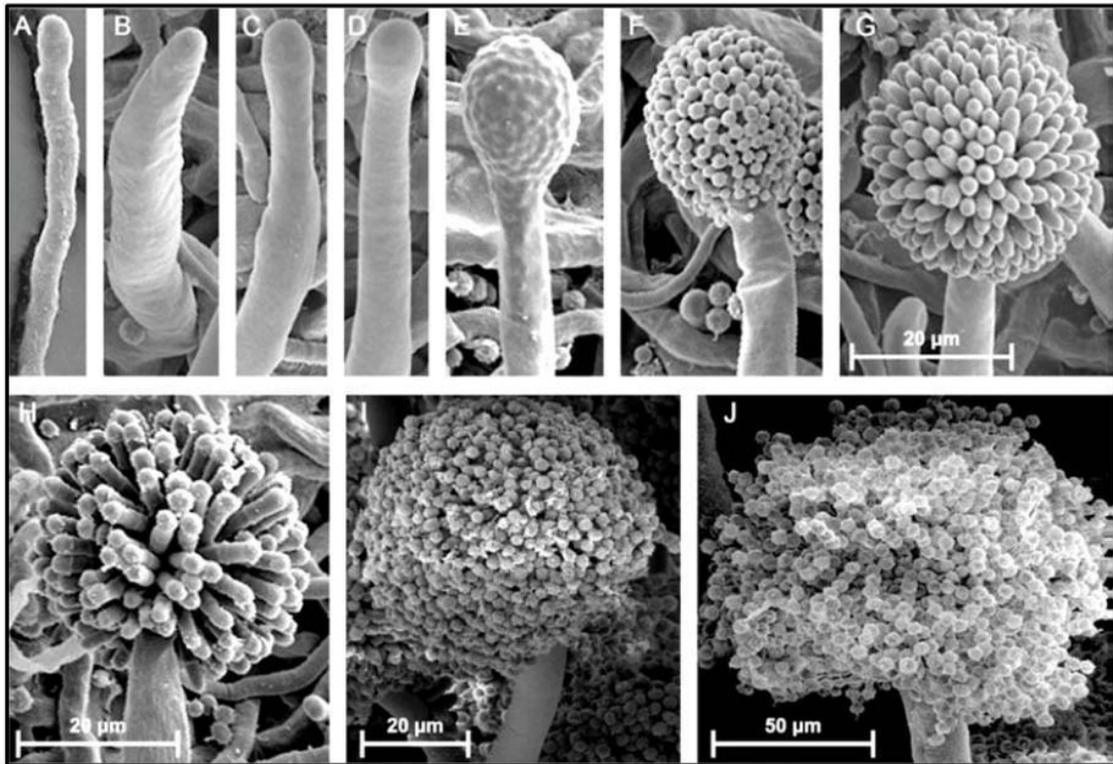


Figure 1: Développement d'*Aspergillus niger* par microscope électronique à balayage (Dijksterhuis et Wösten, 2013).

3. Définition :

C'est un champignon ascomycète filamenteux omniprésent dans l'environnement et impliqué dans des infections opportunistes chez l'homme (Perfect et al., 2001).

A. niger est surtout connu pour son rôle de producteur d'acide citrique (Magnuson & Lasure, 2004). Avec une production d'acide citrique de plus d'un million de tonnes métriques par an, sa production par *A. niger* sert de modèle de processus de fermentation fongique. En tant que membre commun des communautés microbiennes présentes dans les sols, *A. niger* joue un rôle important dans le cycle mondial du carbone et aussi produit un large éventail d'enzymes hydrolytiques et oxydatives impliquées dans la dégradation de la ligno-cellulose végétale.

4. Diversité et taxonomie des *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* appartient à la famille des *Aspergillaceae* et génétiquement proche du genre *Penicillium* (Vandijck et al., 2003).

Ces deux genres ont des applications biotechnologiques cruciales. En 2015, un total de 344 espèces a été inclus dans *Aspergillus* (Van de Vondervoort et al, 2005). Pour l'identification et la classification d'*Aspergillus*, les détails morphologiques des conidiophores et/ou des cléistothèces (fructifications sexuées), des cellules (cellules fournissant des nutriments pour les cléistothèces) ou des sclérotés (structure d'hivernage) sont utilisés (Schuster et al., 2002).

Bien que la morphologie des espèces d'*Aspergillus* soit la pierre angulaire de l'identification de ces champignons, les informations sur la séquence de certains gènes, notamment la calmoduline, l'ADNr ITS, la b-tubuline et le PRB2, sont actuellement utilisées pour la classification et l'identification précise (Schuster et al., 2002).

Sur la base de ces informations collectives, le genre peut être subdivisé en quatre sous-genres (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* et *Nidulantes*) et 19 sections, dont *Aspergillus*, *Flavi* (*A. flavus*), *Nigri* (*A. niger*), *Circumdati* (*A. chraceus*), *Fumigati* (*A. fumigatus*) et *Nidulantes* (*A. nidulans*). Parmi les sous-genres d'*Aspergillus*, plusieurs espèces des sections *Nigri* et *Flavi* sont utilisées dans la fermentation, la transformation

des aliments et la production d'acides organiques et d'enzymes importants en biotechnologie (Schuster et al., 2002).

Un arbre phylogénétique a été construit avec des séquences partielles de gènes de calmoduline (ASPGD et NCBI) des espèces d'*Aspergillus* suivantes :

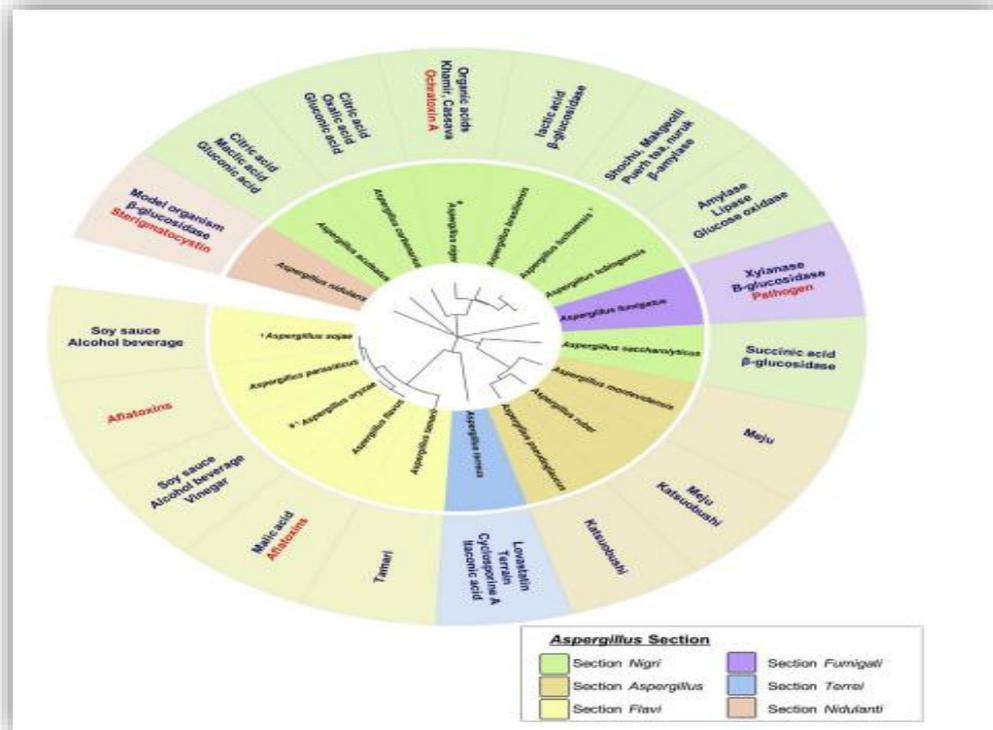


Figure 2: Taxonomie, phylogénie et applications/produits clés des espèces d'*Aspergillus* importantes sur le plan industriel (Schuster et al., 2002).

Aspergillus acidus CBS 106.47, *Aspergillus aculeatus* ATCC 16872, *Aspergillus awamori* NRRL 35710, *Aspergillus brasiliensis* ITBS 101740, *Aspergillus N*, *Aspergillus flavus* NRRL 3357, *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus kawachii* IFO 4308, *Aspergillus luchuensis* KACC 46490, *Aspergillus montevidensis* NRRL 108, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus niger* nigerpergIB86, *Aspergillus* NRR, *Aspergillus* NRRL513 *ruber* NRRL 76, *Aspergillus saccharolyticus* CBS 127449, *Aspergillus sojae* CBS 100928, *Aspergillus tamarii* NRRL 426, *Aspergillus terreus* NIH 2624, *Aspergillus tubingensis* CBS 134.48, *Aspergillus goii* DTO 134E9.

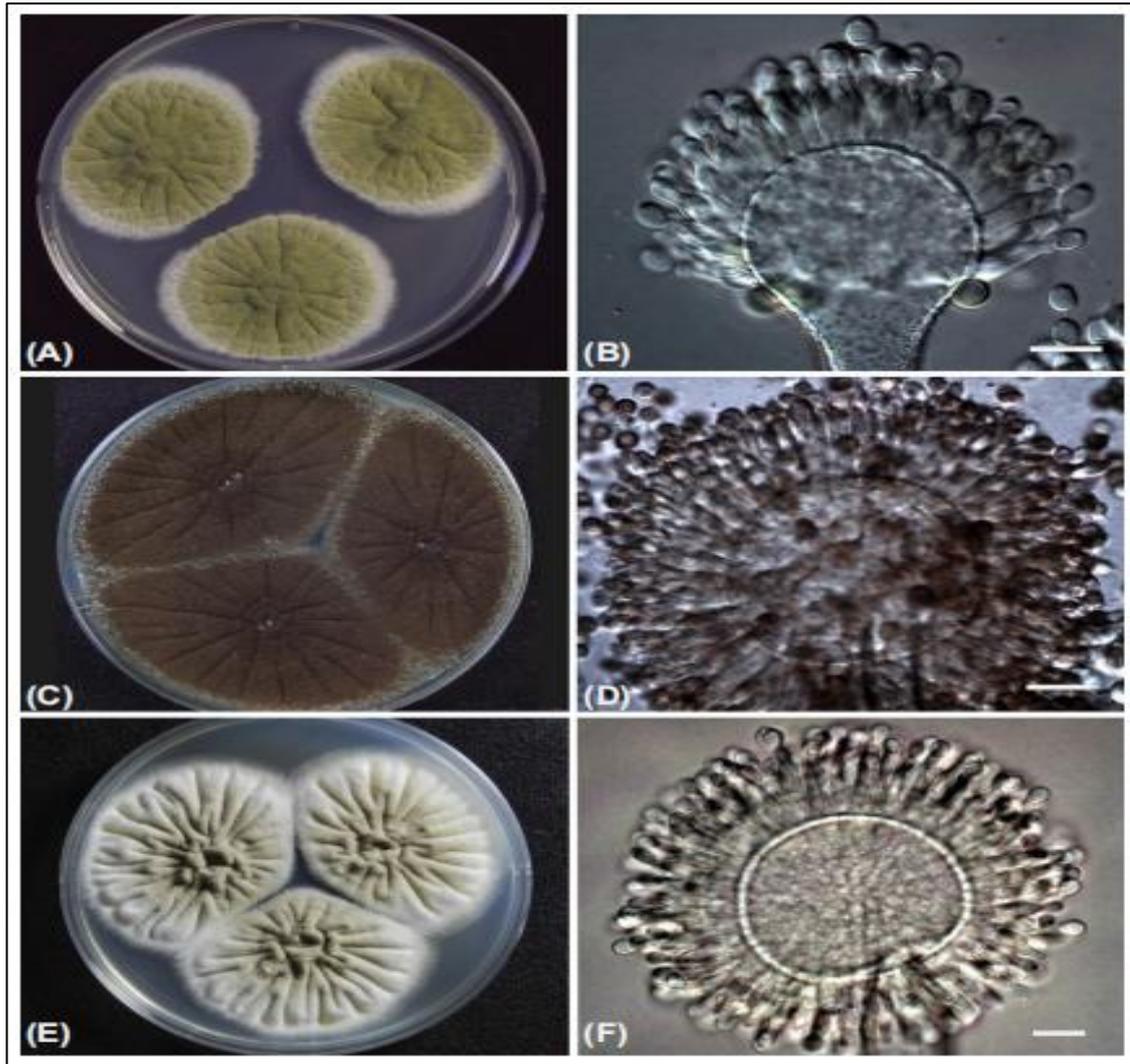


Figure 3: Morphologie de trois moisissures représentatives.

Les figures de gauche sont des photographies de colonies d'*Aspergillus oryzae* (moisissure koji jaune ; A), d'*Aspergillus luchuensis* (moisissure koji noire ; C) et d'*Aspergillus luchuensis var. kawachii* (moisissure à koji blanc ; E). Les figures de droite sont des têtes de conidiophores des trois moisissures koji (B, *Aspergillus oryzae*; D, *Aspergillus luchuensis*; F, *Aspergillus luchuensis var. kawachii*). Barres d'échelle $\frac{1}{4}$ 20 mm (Ward et al., 2006).

5. L'écologie

A niger est cosmopolite et d'occurrence très commune, cette espèce peut se développer sur les matières organiques en conditions aérobies (Shraddha et al., 2011), ou sur d'autres substrats tels que le sol, dans le compost et sur la matière végétale en

décomposition. De même, elle peut se trouver sur les sols glacés et dans les environnements marins, mais elle préfère habituellement les sols secs et chauds (**Schuster et al., 2002**).

L'omniprésence de cette espèce est garantie par la production abondante de conidies qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (**Schuster et al., 2002**).

6. Applications industrielles et pharmaceutiques d'*A.niger*

A. niger est un organisme modèle important pour plusieurs domaines de recherche importants, notamment l'étude de la sécrétion de protéines eucaryotes. En général, les effets de divers facteurs environnementaux sur la suppression ou déclenchant l'exportation de diverses enzymes dégradant la biomasse, mécanismes moléculaires essentiels au développement du processus de fermentation et mécanismes impliqués dans le contrôle de la morphologie fongique. Actuellement, les génomes de trois souches différentes d'*A. niger* ont été séquencés (tableau 1). Deux des souches séquencées, NRRL 3 (ATCC 9029, CBS 120.49, N400) et ATCC 1015 (NRRL 328, CBS 113.46) sont des souches de type sauvage, tandis que l'autre souche CBS 513.88, un dérivé de NRRL 3122 (ATCC 22343, CBS 115989) a été isolé après mutagenèse et sélection pour une production améliorée de glucoamylase. En 2005, le génome d'*A. niger* ATCC 1015, une souche historique de type sauvage, a été utilisé dans des recherches qui ont abouti au premier procédé breveté d'acide citrique (**Kang et al., 2015**), qui a été accepté pour le séquençage par le Département américain de l'énergie (DOE) Programme de génome microbien (MGP).

7. Les acides organiques

Les espèces d'*Aspergillus* produisent une gamme variée de métabolites primaires et secondaires. En général, les métabolites primaires sont appelés métabolites directement impliqués dans la croissance et le développement d'un organisme et jouent généralement un rôle majeur dans les fonctions physiologiques normales. Actuellement, plusieurs souches d'*Aspergillus* sont utilisées pour la production d'acide organique dans les industries (**Knuf et al., 2012**).

L'Acide citrique : un acide organique largement utilisé qui est particulièrement important dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, de nombreuses espèces telles

que *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. goneii*, *A. foetidus* et *Penicillium janthinelum* sont capables de le produire (Bennett et al., 2003).

L'acide citrique est largement utilisé pour l'ajustement du pH et également comme anticoagulant, antioxydant, durcisseur pour les adhésifs et retardateur de tassement du béton (Frisvad, 2011).

8. Synthèse biologique des *A. niger*

Les espèces d'*Aspergillus* peuvent survivre dans diverses conditions de culture et produire une variété de protéines et de métabolites primaires et secondaires (Weld, 2006). Ainsi, plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont largement utilisées en biotechnologie comme usines cellulaires pour la production d'enzymes, d'acides organiques et des produits pharmaceutiques (Teotia, 2016). Cependant, certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent produire des métabolites nocifs, tels que les aflatoxines et l'ochratoxine A (Guillam, 2006). Par conséquent, des études approfondies pour garantir la sécurité sont nécessaires avant de sélectionner une souche hôte pour la production d'enzymes et d'acides organiques. Pour améliorer la sécurité des systèmes hôtes et leur capacité à produire des enzymes et des acides organiques, des méthodes classiques (par exemple, la mutagenèse aléatoire) ont été utilisées au cours des dernières décennies (Abarca et al., 2004).

Les génomes de nombreuses espèces d'*Aspergillus* ont maintenant été séquencés et des techniques d'édition du génome ont été rapidement développées pour les champignons filamenteux (Pasqualotto, 2010).

Les informations génomiques et les outils multi-omiques peuvent être utilisés efficacement pour éliminer les goulots d'étranglement du développement et créer de nouvelles souches hôtes génétiquement modifiées pour l'expression de protéines hétérologues (ou homologues) et d'autres applications industrielles (Mattey, 1992).

9. Reproduction

L'état asexuel d'*Aspergillus* est ce qui attire le plus souvent les bio-technologistes. Il est en fait caractérisé 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.

a. Aspect macroscopique

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud).

La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentrées (**Kristiansen, 1978**).

b. Aspect microscopique

Les têtes cnidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires.

Les conidiophores sont longs atteignant 1.5 - 3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule podale avec un hyphe fertile. Les vésicules (50 - 70 µm) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-3 × 3-3.5 µm) sont portées par des metules brunâtres, de dimensions variables (10-15 µm). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5 µm ; parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5 µm ; parfois jusqu'à 6 µm de diamètre (**Fig 4**) (**Kubicek, 1977**).

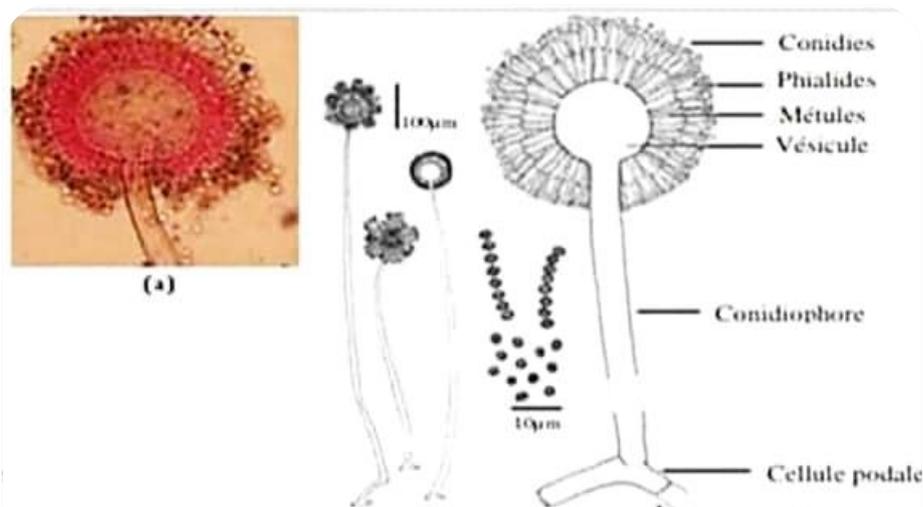


Figure 4: a) Aspect microscopique, b) représentation schématique de la conidiophore d'*A. niger* (**Kubicek, 1977**).

10. Besoins nutritionnels et cultureux des *Aspergillus*

Carbone : Les *Aspergillus* peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés, tel que, glucose, fructose, mannose, saccharose et maltose (**Papagianni, 2007**). Les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucre simple. Les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées par les *Aspergillus*.

Azote : la teneur en azote affecte d'une manière nette la croissance d'*Aspergillus*, les plus utilisées en fermentation sont le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium, le nitrate de potassium et l'urée. Ainsi une teneur élevée en azote a pour effet, une augmentation de la croissance cellulaire et de la consommation des sucres (**Cahagnier, 1997**).

Sels minéraux : sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des *aspergillus* et leurs déficiences ou leurs excès ont des répercussions négatives sur la fermentation. A cet effet, une forte teneur en phosphore conduit à une élévation de la croissance cellulaire.

11. Besoins cultureux

La température idéale pour la croissance des *aspergillus* est comprise entre 20 et 42 °C, un pH de 2 à 6,5 et une activité de l'eau (aw) faible soit 0,77 (**Cahagnier, 1997**).

Chapitre II
*Les enzymes
pectinolytiques*

1. Substrats pectiques

La pectine est un polysaccharide important de la paroi cellulaire des plantes supérieures. Elle existe particulièrement dans les lamelles moyennes et primaires parois cellulaires des plantes, elle joue un rôle fondamental dans la croissance cellulaire, mécanique force de défense. Structuralement complexe avec au moins 17 monosaccharides différents interconnecté à travers plus de 20 différents liens.

Le polymère de pectine comprend différents domaines structurels qui sont liés de manière covalente à un autre (Merve et al., 2014) .d'un poids moléculaire situé entre 50000 et 150000 Da, Ces substances consistent de protopectines, d'acides pectiniques, de pectines et d'acides pectiques (Tapre et al., 2014).

Par conséquent, la pectine est un polysaccharide anionique qui a des régions linéaires formées par les monomères de l'acide D galacturonique (GalA), liés par des liaisons α - (1,4) glycosidiques, et ramifiées régions principalement constituées de divers types de monosaccharides neutres (principalement le rhamnose, le xylose, mannose, glucose, galactose et arabinose) liés entre eux. Les unités GalA ont un groupe carboxyle. (Thakur et Yapo, 2011).

2. Les enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et leur production est élaborée par différents genres d'actinomycètes tel que : Micromonospora, Microbispora, Actinoplanes, Streptosporangium et les Streptomyces (Massaoudi, 2015).

Par définition, les pectinases forment une catégorie d'enzymes (polygalacturonases (E.C 3.2.1.15 et E.C 3.2.1.67), pectine lyases (E.C 4.2.2.10) et pectate lyases (E.C 4.2.2.2)) qui coupent les liaisons glycosidiques des résidus d'acide galacturonique dans les matériaux pectiques (Kheder, 2007).

Il est important de mentionner que les pectinases sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation

(trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo), voir **Figure 5** (Lamrini, 2012).

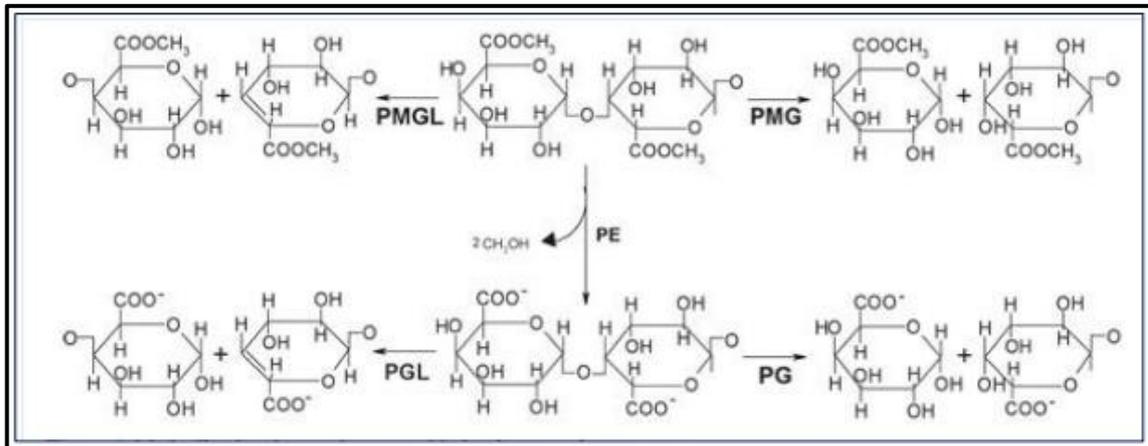


Figure 5: Mode d'action des pectinases (Combo et al., 2011).

3. Classification des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres et al., 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérase (polygalacturonases et lyases) voir le (Tableau 1) ci-dessous.

Tableau 1: Classification des enzymes dégradant les pectines (homogalacturonanes)
d'après (Jayani et al., 2005 ; Yadav et al., 2009).

Type	Enzyme	EC.n°	Mécanisme d'action	Mode d'action	Substrat préférentielle	Produit formé
1. Esterase						
1. PME	pectine méthylestérases	3.1.1.11	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique +méthanol
2. PAE	Pectine acetyle esterase	3.1.1.6	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique+ Ethanol
2. Dépolymérase (a) hydrolases						
1. Endo PG	Endo polygalacturonase	3.2.1.15	Hydrolyse	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonase
2. Exo PG	Exopolygalacturonase	3.2.1.67	Hydrolyse	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonase
(b) lyases						
1. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonateinsaturés
2. Exo PL	Exopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonate Insaturés
3. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.10	Trans-élimination	Aléatoire	Pectine	Méthyle oligogalacturonate Insaturés

4. Les PGs

4.1.Définition

Les PGs sont des enzymes pectinolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). 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 PGs impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PGs (EC 3.2.1.15) et des exo-PGs (EC 3.2.1.67) (Jayani et al., 2005).

4.2. Origine microbienne

Les PGs produites et sécrétées par divers microorganismes tels que certaines bactéries, levures et champignons *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas solanacearum* sont les principaux pathogènes bactériens connus produisant la PG. Parmi les autres micro-organismes producteurs de cette enzyme : *Aspergillus niger* *Aspergillus awaori*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Stereum purpureum*, les souches de bactéries *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*, produisent une PG qui, lorsque sécrétée, entraîne la maladie de la pourriture molle pour de nombreux fruits et légumes comme la maladie appelée "jambe noire" chez la patate (**Basset et al., 2000**). Quelques levures produisent aussi des PGs comme certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* (**Gainvors et al. 2000 ; Blanco et al. 2002; Siero et al. 2003; Radoi et al. 2005**) et d'autres levures comme *Kluyveromyces marxianus* (**Siekstele et al. 1999; Jia et Wheals 2000**) et *Kluyveromyces fragilis* (**Sakai et al., 1984**). Elles sont aussi produites par les fruits impliqués dans le ramollissement et la décomposition des tissus des plantes.

L'orange est le premier fruit consommé sous forme de jus. La transformation industrielle génère de grandes quantités de résidus non utilisés, constitués essentiellement d'écorces, de pépins et de pulpes. Ces déchets sont riches en pectines, fraction qui a un effet inducteur sur la production de pectinases. De ce fait, les déchets agro-industriels (résidus d'orange) ont été utilisés comme substrat pour la production d'enzymes pectinolytiques par voie biologique comme objectif de valorisation. Les résidus d'orange contiennent une teneur importante de pectines, ce qui entraîne une bonne induction de la synthèse de l'enzyme.

4.3. Les PGs d'*A. niger*

La PG II d'*A. niger* fait partie d'une famille de sept PGs exprimées par ce champignon. Elle a été purifiée pour la première fois en 1999 en même temps que la PG I à partir d'une préparation commerciale de pectinases de ce champignon (**Kester et Visser, 1990**).

Les gènes correspondant à ces deux PGs ont ensuite été découverts (**Bussink et al., 1991**) et utilisés pour cribler une banque de fragments du génome d'*Aspergillus* obtenus à l'aide d'enzymes de restriction. Ce criblage a permis de trouver les cinq autres PGs de la famille, nommées PG A à PG E (**Parenicova et al., 1998**).

Les PGI, PGB et PGA démontrent une activité encore meilleure avec des V_{max} de 800, 900 et 1200 U/mg. Toutefois, c'est la PG II qui est en tête avec une activité de 4000 U/mg. Les études effectuées sur la PG II d'*A. niger* ayant permis d'approfondir les connaissances sur les relations structure/fonction des PGs ainsi que leurs conclusions seront présentées dans les sections qui suivent. Certains résultats utiles concernant les différentes PGs d'*A. niger* où leurs mutants seront aussi exposés.

4.3.1. Mécanisme de la catalyse de la PG

Les résidus impliqués dans la réaction catalytique de la PG ont été découverts en 2000 lors d'une étude dans laquelle des mutagenèses dirigées ont été effectuées sur la PG II. En effet, l'équipe maintenant réputée de Visser et Benen a orienté ses choix de mutations sur les quelques résidus d'acides aminés hautement conservés des hydrolases de la famille 28 (Armand et al., 2000). Parmi les résidus d'acides aminés conservés, les mutagenèses ont été dirigées sur ceux qui étaient chargés, soit les résidus aspartate 180, aspartate 201, aspartate 202, histidine 223, arginine 256, et lysine 258.

Deux raisons expliquent ces choix : premièrement, les résidus impliqués dans la catalyse par les glycosides hydrolases sont généralement des aspartates ou des glutamates et deuxièmement, les résidus chargés positivement chez les PGs ont plus de chance de jouer un rôle important dans l'établissement de liaisons avec le substrat qui lui est chargé négativement.

4.3.2. Résidus impliqués dans la liaison du substrat

Le site de liaison d'un substrat, lorsque celui-ci est un polymère d'hydrates de carbones, est constitué de régions appelées « subsites ». Ces « subsites » sont les endroits où se lient les monomères de la chaîne carbonée. En général, les enzymes dépolymérisantes comme la PG a plusieurs « subsites » et leur nombre varie de 2 à 14 (Thoma et al., 1971). Les « subsites » sont numérotés à partir du site catalytique, lequel est localisé entre les « subsites » -1 et +1.

4.3.3. Structure

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

Les résidus sur les sous-sites -1 et +1 sont strictement conservés parmi les (**endo PGs**) fongiques.

Pickersgill et al. (1998) ont aligné 36 PGs et ils ont déterminé qu'il y avait quatre régions conservées soient : Asn201_Thr202_Asp203, Gl122_Asp223_Asp224, Gly50_His251 _ Gly252 et Arg280_Ile281_Lys282.

Ces séquences sont retrouvées dans le même ordre dans les différentes PGs, seule la position des acides aminés change. Le site actif est constitué de trois acides aspartiques (D) et d'une histidine (H) (**Shimizu et al., 2002**), il est donc conservé au sein des divers organismes qui produisent des PGs puisque ces quatre acides aminés se retrouvent dans les régions conservées.

La structure 3D est aussi très conservée, même si le pourcentage d'identité de la séquence varie beaucoup. La structure est majoritairement composée de feuilletts bêta formant un baril entrecoupé de boucles, le site actif est entouré de deux boucles formant un tunnel dans lequel le substrat va s'insérer (**Fig 6**) (**Shimizu et al., 2002**).

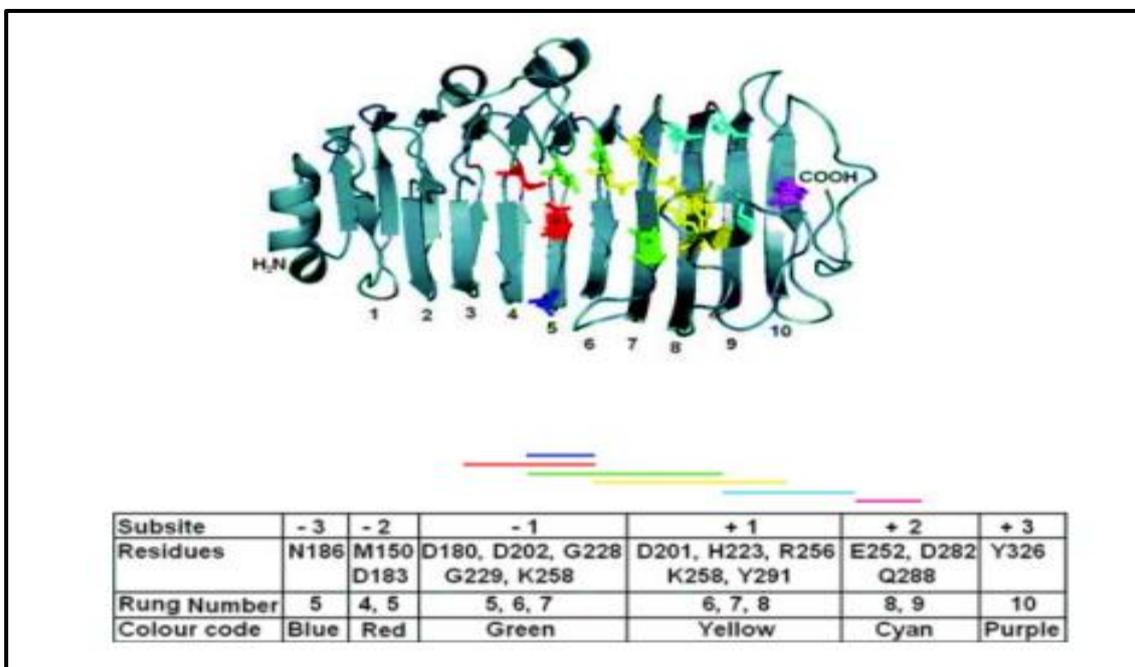


Figure 6: Structure tridimensionnelle de endo PG II d'*A. niger* (**Claudia et al., 2007**).

Les endoPGs proviennent des bactéries *Erwinia carotovora* et *Xanthomonas axonopodis*, des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*, des champignons *Stereum purpureum* et *Aspergillus niger* et des plantes *Zea maize* et *Arabidopsis thaliana*. En vert : séquence avec 80 % d'homologie, en magenta : acides aminés du site actif.

<i>E. carotovora</i>	225	-rnt	gidpmssk	niatiaysniatg	nvaika	----y	kgraetr	nisilhndfg		
<i>X. axonopodis</i>	240	spnt	gldldsvv	natihdsdvmgg	cvaiaktiasrs	-a	-----	nitvrnsrCy		
<i>S. cerevisiae</i>	175	ghnt	gfdvgsss	nvlhgctvynq	ciavns	---g	-s	-----	tikfmnnyCy	
<i>K. marxianus</i>	175	ghnt	gfdvgnv	nnvtienschvynq	ciavns	---g	-t	-----	gvyfknyCy	
<i>S. purpureum</i>	175	--nt	gfdv	-sannvtiqncivknq	ciaind	---g	-n	-----	nirfennqCs	
<i>A. niger</i>	195	-ant	gfdigdsty	ititganvynq	cvavns	---g	-e	-----	niyfsggvCs	
<i>Zea maize</i>	210	--nt	gihmgdssg	ititntvigvg	cisigp	---g	-ts	-----	kvnitgvtCg	
<i>A. thaliana</i>	185	spnt	gihlgrsdg	ikilnsfistg	cisvgd	---g	-mk	-----	nlhvekvteCg	
<i>E. carotovora</i>	275	tg	gmsigs	----e	tmg	-vynvtv	ddlkmg	ttn-----	griksd--	
<i>X. axonopodis</i>	289	gt	gisigs	---ev	msg	-vsnvlvd	nnalvst	ddlgnrst	dns	griktsl-
<i>S. cerevisiae</i>	221	ng	gisvgs	vggrs	-dnt	-vngfwa	ennhvins	dn-----	griktve-	
<i>K. marxianus</i>	221	gg	gisigs	vggrs	-nnt	-vdtvyf	ennqivns	dn-----	griktiq-	
<i>S. purpureum</i>	218	gg	gisigs	ia--t	gkh	-vsnvvik	gntvtr	sm-----	grikaqr-	
<i>A. niger</i>	239	gg	gisigs	vggrs	-dnt	-vknvtfy	dsdikss	qn-----	griktiyg	
<i>Zea maize</i>	254	pg	gisigs	lgryk	-dek	vt	dinvkd	ctlkktmf	-----	grikaye-
<i>A. thaliana</i>	231	pg	gisvgs	lgryg	heqd	-vsgikv	invtlq	etdn-----	grikt---	

Figure 7: Alignement de séquence des acides aminés pour huit endoPGs à partir de la première méthionine (Pickersgill et al., 1998).



Figure 8: Modèle de la structure des endoPGs. En rose : acides aminés du site actif, en orange : N-terminal et en bleu : C-terminal (Shimizu et al., 2002).

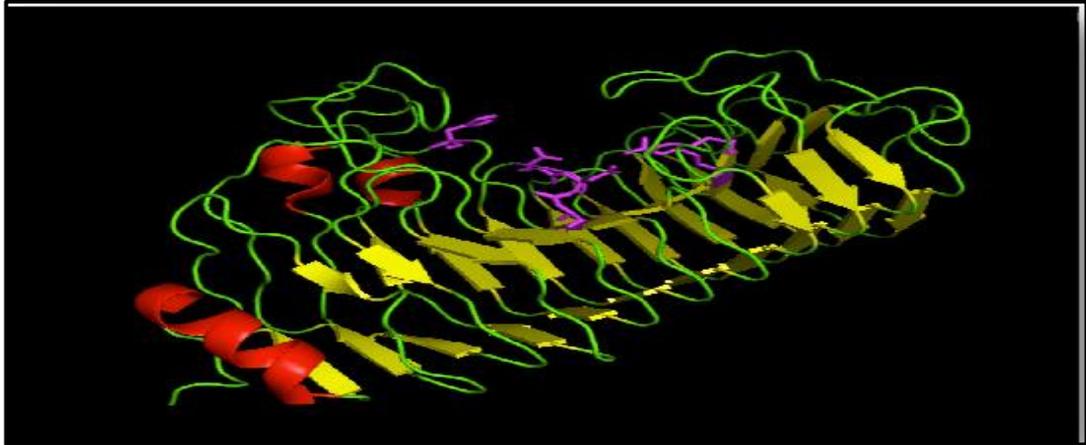


Figure 9: Modèle à ruban de la structure de la polygalacturonase : Endo-Polygalacturonase II d'*A.niger* (Van Santen et al., 1999).

Les sphères sont des atomes de Zinc au nombre de trois ; ce sont des ligands lié de façon non covalente à la protéine lors de sa cristallisation.

4.3.4. Classification des PGs

Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani et al., 2005).

- **Endo-PG** sont produites par divers micro-organismes tels que des bactéries, des levures et des moisissures. Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines HM, l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acide galacturoniques non méthylés. Toutefois, lorsque le DM augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai et al., 1993).
- **Exo-PG** sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. Il y a deux types :
 - les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique.
 - les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique (Orifla et al., 2001).

4.3.5. Mode d'action de la PG

La fonction des pectinases est d'hydrolyser les liens glucosidiques $\alpha(1-4)$ liant deux GA non méthylés. Étant donné que la chaîne de RG-I est composée d'un GA suivi d'u rhamnose, il n'y a pas deux GA liés par un lien Cl (1-4), ainsi, les pectinases ne peuvent pas dégrader ce type de pectine. Ainsi, seuls les homogalacturonans et le RG-II sont hydrolysés par les PGs.

Les endoPGs hydrolysent le substrat de façon aléatoire à l'intérieur du polymère, tandis que les exoPGs font l'hydrolyse à partir des extrémités du polymère (**Gainvors et al., 2000**).

La **figure10** montre l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique (PGA, substrat qui sera utilisé pour les expérimentations) par une endoPG, et pour chacune des hydrolyses, la longueur du polymère diminue et il y a formation d'un groupe réducteur à une des extrémités.

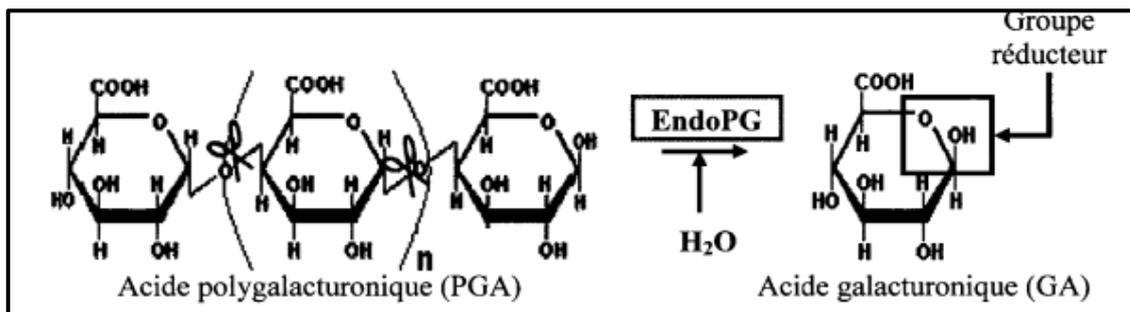


Figure 10: Réaction d'hydrolyse du lien glucosidique Cl 1-4 du PGA par une endoPG (**Houle, 2007**).

Mukadam et al., (2010) ont rapporté que la longueur du gène de PG des *Aspergillus* vont de 1107 à 2495 nucléotides. Ils avaient isolé PG I de cette espèce qui contient 1101 nucléotides et 367acides aminés. L'alignement de séquences multiples de la séquence d'acides aminés de PG des espèces fongiques différentes comme *A. niger* XM ; 001389525 (**Pel et al., 2007**) et *A. fumigatus* (XM 746347), **Nierman et al., (2005)** partage respectivement 96 % et 76 % de similarité.

Toutes les polygalacturonases (endo ou exo) appartiennent à la famille des glycosides hydrolases 28 (GH28). Les résultats de l'analyse de la séquence d'acides aminés de toutes les polygalacturonases provenant de diverses sources ont montré les

quatre hautement conservés régions (**Palanivelu, 2006**). Les résidus d'acides aminés de ces quatre motifs sont NTD, G/QDD, G/SHG, RIK. Parmi ces quatre régions, les deux sont catalytiques régions (G/QDD et G/SHG) et les deux autres sont des régions de liaison au substrat. Les distances (nombre d'acides aminés) entre ces motifs conservés sont spécifiquement maintenues dans la plupart des cas. Cette distance précise entre les motifs hautement conservés peut être essentielle pour la liaison au substrat et la catalyse (**Palanivelu, 2006**), aussi ont rapporté que l'acide aminé acide Asp et l'acide aminé basique His sont responsables de catalyse de la liaison glycosidique dans les PGs (pectates). His agit comme un donneur de proton et l'Asp agit comme un nucléophile et la réaction est très similaire catalyse acido-basique (**Fig10**). Ce mécanisme de réaction est très similaire à d'autres glycosidases comme les levansucrases (**Chambert et al., 1976**).

Par ailleurs, la mutation au niveau de **His188** affecte considérablement l'activité enzymatique et indique que l' **His188** hautement conservé est essentiel dans le site actif. Altération d'un point critique **Asp212** par **Glu** ou **Asn** de la PG de *Fusarium moniliforme* ne montre aucune activité, ainsi **Asp212** agit comme nucléophile au lieu de donneur de protons car le remplacement de **Asp212** par **Glu** doit faire preuve activité d'effet catalytique (**Saptadip Samanta, 2019**).

4.3.6. Les propriétés biophysiques et enzymatiques des PGs

- La plupart des PGs ont un pH optimal aux environs de 4 et 4,5 à l'exception des PGs des levures *Saccharomyces* et *Kluyveromyces* qui ont un pH optimal autour de 5.
- La plupart des PGs perdent beaucoup d'activité hors de l'intervalle de pH 3,5 à 5,5. La température optimale de ces enzymes, elle tourne généralement autour de 40°C et 50°C, et à températures plus élevées que 50°C.
- Le taux et les patrons de glycosylation des PGs ont aussi une importance sur l'activité de l'enzyme. C'est en déglycosylant les PGs de façon enzymatique ou en empêchant la glycosylation de se produire que ces conclusions ont été tirées. (**Mylène Claude Gagnon, 2009**).

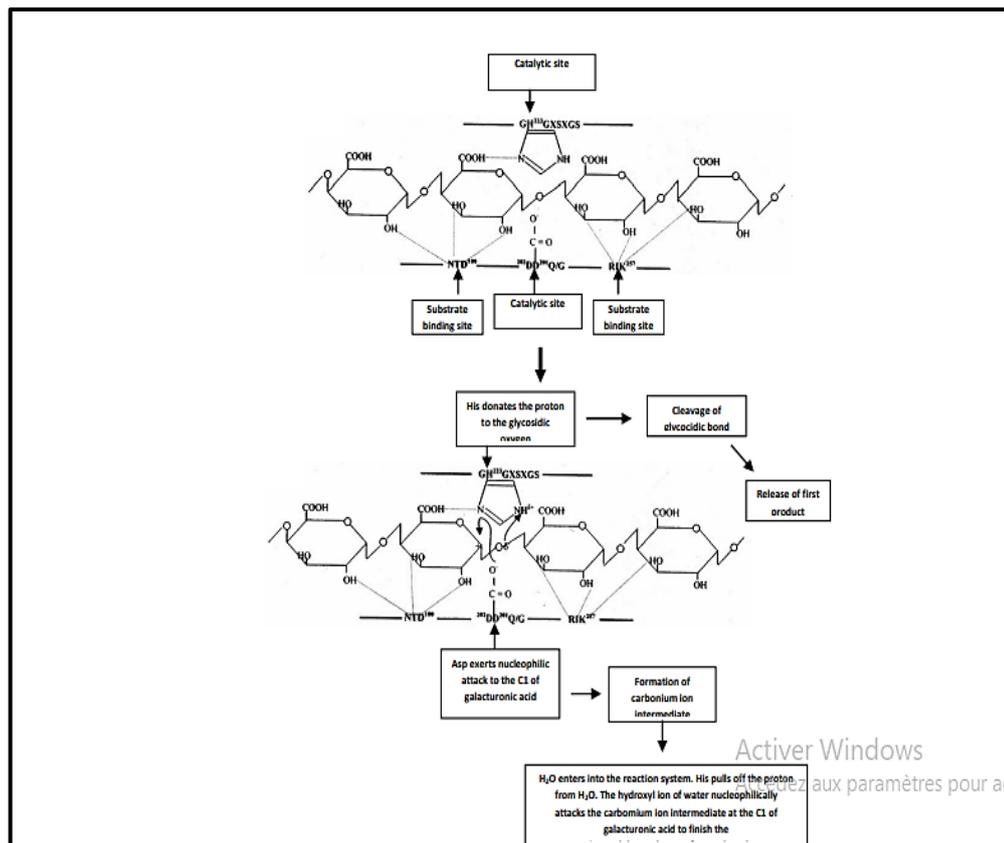


Figure 11: Mécanisme d'action de la PG d'*A. niger* (Palanivelu, 2006).

4.3.7. Caractérisation des PGs

Après l'ajout fractionné de sulfate d'ammonium jusqu' à 90% de saturation pour précipiter toutes les protéines, l'extrait enzymatique est dialysé contre l'eau distillée pendant 24h à 4°C. Les caractéristiques de l'enzyme sont recherchées dans le dialysat.

4.3.7.1.Effet du pH

Le pH optimal de l'activité des PGs situe vers 3,8 (**Fig 12**), la même valeur est rapportée par (Combo et al, 2011).Ce résultat demeure très proche de celui observé par (Sandri et al, 2011) qui ont avait un pH optimal de 4 pour la souche d'*A. niger*.

Selon la littérature, *Aspergillus* se développe à un pH compris entre 2 et 11. Dans ce sens, (Gomes et al., 2011) ont trouvé un pH optimal de 5,5 de l'exo-PG produite par *A. niger*. Par ailleurs, la variation du pH des activités pectinolytiques dépend d'une part, de l'espèce microbienne, et d'autre part, de la nature du substrat utilisé.

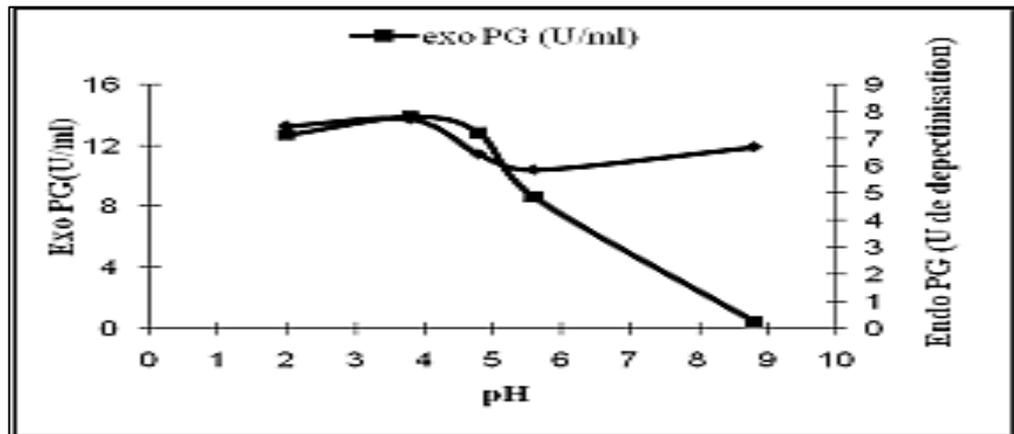


Figure 12: Effet du pH sur l'activité PG (Bouhadi et al., 2016).

4.3.7.2. Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité des pectinases est observée sur une gamme de températures allant de 25 à 65 °C (**Figure13**). L'effet de la température sur l'activité des pectinases montre que l'activité maximale de l'endo et de l'exoPG est enregistrée à 35°C. Au-delà de cette température, l'activité pectinolytique diminue et l'enzyme est totalement inhibée vers 65°C. Ces résultats sont très proches de la température optimale de l'activité pectolytique rapportée par plusieurs auteurs. En effet, (**Gomes et al., 2011**) ont signalé une valeur de 37°C, de 30° C pour (**Kumar et al., 2011**) et (**Sandri et al., 2011**) 40°C. En se basant sur le pH optimal et la température optimale, les résultats obtenus ont montré la convenance de l'enzyme pour les applications

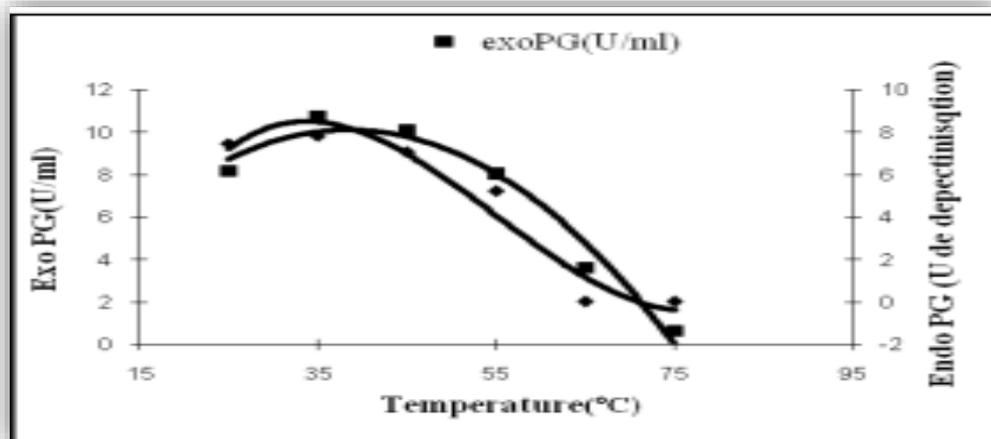


Figure 13: Effet de la température sur l'activité Polygalacturonase (Bouhadi et al., 2016).

biotechnologiques à savoir la clarification, la macération et l'extraction du jus où des températures de 30 à 55 °C et un milieu acide sont exigés.

4.3.7.3. Effet des effecteurs

○ Effet de CaCl₂

L'addition du chlorure de calcium (CaCl₂) n'a pas d'effet sur l'activité de l'endo-PG (**Figure 14**), par contre, la concentration de 10 mM de chlorure de calcium a inhibé totalement l'activité de l'exo-PG qui amorce une diminution à partir de 2mM. Il optimale de 35°C. Il s'avère que le calcium inhibe l'exo-PG contrairement aux observations faites sur l'endo-PG, il est à noter que les exo-PG d'origine végétale, à l'exception des carottes, sont fortement activées par les cations divalents, particulièrement le calcium et le strontium, et par les ions monovalents à faible concentration (< 10⁻³ M). En revanche, elles sont inactivées par des teneurs plus fortes en sels (**Thibault, 1980**)

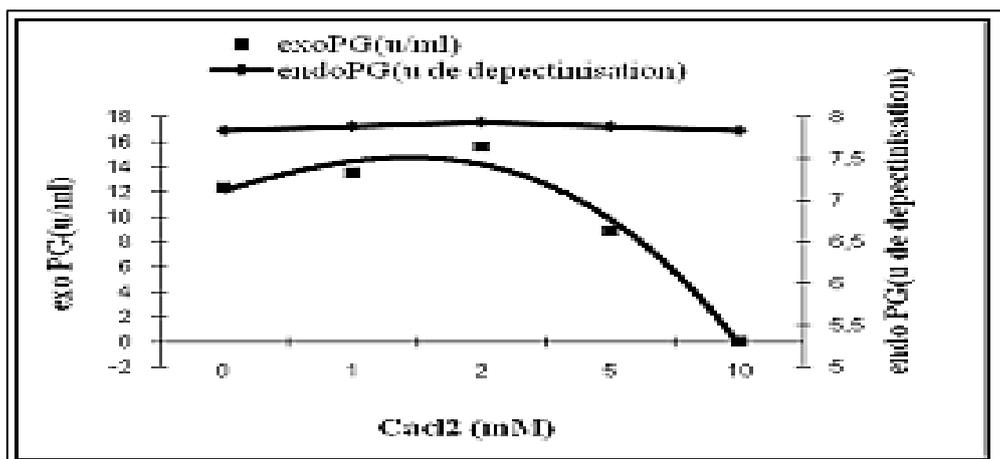


Figure 14: Effet de CaCl₂ sur l'activité polygalacturonase (**Bouhadi et al., 2016**).

○ Effet de l'EDTA

La présence d'EDTA dans le milieu réactionnel n'a aucun effet sur l'activité de l'endo-PG alors que l'activité de l'exo-PG varie légèrement (**Figure 15**).

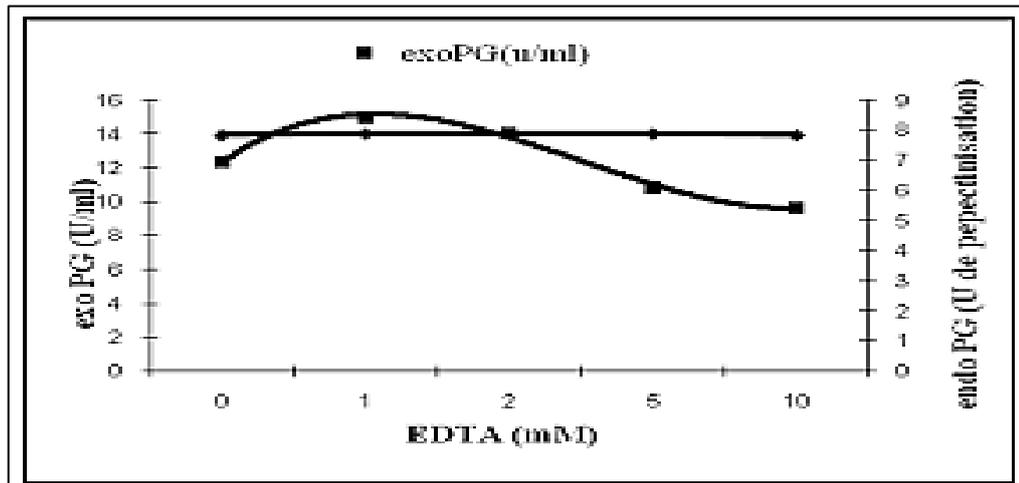


Figure 15: Effet de l'EDTA sur l'activité PGs (Bouhadi et al., 2016).

L'EDTA est un agent chélateur qui ne complexe que les cations bivalents impliqués dans l'activation de plusieurs enzymes, en les empêchant, de ce fait, d'agir en tant qu'activateurs (Bouhadi et al., 2016).

4.3.8. Applications industrielles de la PG d'*A. niger*

- ✓ Les pectinases ont connues un grand intérêt dans divers domaines tel que : le textile, industries du papier, fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à parti fruits et légumes, ainsi que le traitement des eaux usés (Zeni1 et al., 2015).
- ✓ Ces enzymes peuvent être utilisées en agro-alimentaire pour la clarification du jus, dans l'industrie du textile pour l'assouplissement des fibres et dans l'industrie des pâtes et papiers.
- ✓ Elles sont utilisées également dans la clarification du vin, ou bien comme compliment alimentaire dans l'alimentation animale (Rodriguez-Fernández et al., 2011).

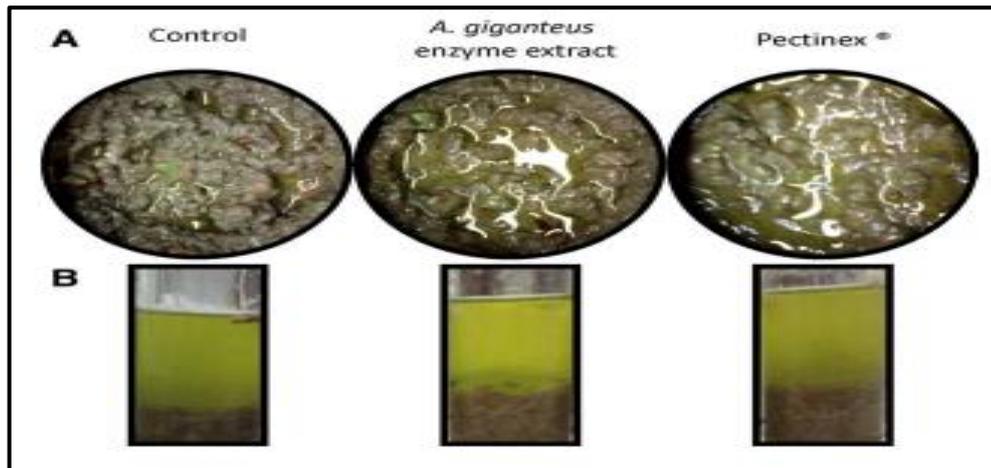


Figure 18: Effet des enzymes pectinolytiques dans l'extraction de l'huile d'olive. (a) Effet de la pectinase lors du malaxage. (b) Effet de la pectinase sur l'étape de décantation de l'huile (**J Pharm Chem Biol Sci.2018**).

- ✓ **Extraction de jus non clarifié :** Les pectinases jouent également un rôle dans la stabilisation des nuages pour donner du jus trouble surtout dans les agrumes, les purées et nectar (**efficace pour l'extraction de jus troubles**). La pasteurisation est effectuée pour inactiver les enzymes restantes et les résidus de grande taille sont éliminés par centrifugation laissant de petites particules dans suspension. L'autre voie est la dénaturation de la pectine estérases par chauffage mais cette méthode n'est pas très efficace car cela prend du temps et gâte également la saveur du jus.
- ✓ **Fermentation du café, du cacao et du thé :** utilisées dans divers types de fermentation, ils accélèrent la fermentation traitée. Lors de la fermentation du thé, les enzymes pectinases d'origine fongique dégradent la pectine présente dans les parois cellulaires des feuilles de thé mais en plus la quantité de ces enzymes peut endommager les feuilles de thé, donc une concentration spécifique doit être maintenue pendant la fermentation. Ils agissent également comme agent anti-mousse en détruisant la pectine dans les poudres de thé (**Kubra et al., 2018**).
- ✓ Pendant la fermentation de café les pectinases éliminent la couche de mucilage à partir de grains de café. A cet effet, l'enzyme des préparations de pectinases sont pulvérisées sur le cacao fèves pour effectuer la fermentation, les préparations enzymatiques de pectinases sont plus efficace parce que les enzymes accélèrent les processus de fermentation du Cacao pour développer la saveur chocolat. Dans de nombreuses

fermentations du cacao, les micro-organismes jouent un rôle, y compris (micro-organisme pectolytique).

- ✓ **Aliments pour animaux** : Les pectinases font partie de ces enzymes qui aident à la production d'aliments pour animaux. Ils ont la capacité de réduire la viscosité des aliments, ce qui intensifie directement la capacité d'absorption des nutriments des animaux. Ces nutriments libèrent des fibres par le processus d'hydrolyse et cela réduit également la défécation des animaux (**Kubra et al., 2018**).
- ✓ **Production de bioénergie** : La bioénergie est l'énergie produite à partir de la vie d'organisme en transformant les hydrocarbures produits par ces organismes comme les plantes et algues, principalement sous forme de sucres et de lipides en composés similaires à l'essence, au diesel et l'éthanol. Les plantes riches en source de pectine comme le marc de pomme, les agrumes et la betterave à sucre ont été recommandées comme sources possibles d'hydrocarbure pour la production de bioéthanol (**Kubra et al., 2018**).
- ✓ **Industrie du papier et de la pâte** : Industrie du papier et de la pâte les industries du papier et de la pâte à papier ont commencé à exploiter des enzymes comme les xylanases, les ligninases, les mannanases et les pectinases pour le bioblanchiment (**Kirk et Jefferies, 1996 ; Bajpai, 1999 ; Kubra et al., 2018**). La formation de la feuille est une étape essentielle de la fabrication du papier et la présence de pectines dans la pâte fragilise la déshydratation en raison de leur forte cationique (**Garg et al., 2016**). Ce problème peut être résolu en utilisant méthode de cuisson conventionnelle à la soude (**Kubra et al., 2018**). Le bio-blanchiment est un traitement des pâtes kraft de feuillus et de bambou est médié par des pectinases et autres polysaccharidases. Ce procédé respectueux de l'environnement préserve la qualité et la luminosité du papier sont similaires à la méthode conventionnelle mais diminuent la libération d'agents écotoxiques comme les composés organochlorés dans les eaux usées (**Saptadip Samanta, 2019**).
- ✓ **Recyclage des déchets (vieux papiers)** : Le processus de désencrage chimique crée des risques pour l'environnement ; mais, enzymatique désencrage réduit les risques de pollution, la consommation d'énergie, les problèmes d'élimination et améliore les performances. Un groupe d'enzymes (pectinases, hémicellulases cellulases et enzymes lignolytiques) sont appliqués pendant le processus de désencrage. Fondamentalement les enzymes modifient les caractéristiques de liaison

entre l'encre et la fibre ; le résultat est élimination de l'encre de la surface des fibres lors du lavage(**Pathak et al., 2010 ; Xu et al., 2011 ; Saptadip Samanta, 2019**).

Chapitre III
Les PGs produites
par fermentation
sur milieu solide

Cette partie est dans le but d'étudier des recherches précédentes faites dont le sujet de la production et l'optimisation de PGs par *A. niger* par fermentation solide, en comparant les résultats de ces expériences.

Etude de la production et séparation des PGs à partir des études précédentes

I. Production, purification et caractérisation des PGs issues d'*A. niger* dans le milieu solide en utilisant les pelures de bananes

Le but est d'isoler un microorganisme fongique capable de produire des PGs dans un milieu solide et optimiser les différents paramètres de culture et la procédure de purification (**Ire et al., 2016**). Par l'évaluation de l'influence des : Conditions de cultures sur la production de l'enzyme et les paramètres physicochimiques sur la purification de l'enzyme par la méthode « One factor at a time approach » (OFAT).

1. Méthodes

- ✓ Isolement de 12 souches fongiques à partir de pelures de bananes fraîches.
- ✓ Criblage de la capacité de la production des PGs par des méthodes conventionnelles et l'isolat avec zone d'inhibition.
- ✓ Purification de l'enzyme brute : précipitation par sulfate d'ammonium, filtration gel par le séphadex G100.
- ✓ Mesure des paramètres physicochimiques sur l'activité enzymatiques par des méthodes standards.

- **Préparation de la poudre de peau de banane**

Les peaux fraîches de bananes ont été séchées à l'air libre à une température ambiante (30°C), puis broyé et tamisé pour obtenir un substrat de petites particules qui fournit une grande surface d'attaque microbienne (**Ire et al., 2016**).

2. Résultats :

2.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

Parmi les 12 souches obtenues à partir de pelures de bananes fraîches cultivées dans les boîtes de pétri seulement 5 ont démontrés une dégrader la pectine. L'isolat le plus efficace parmi les cinq souches fongiques a été sélectionné pour la production des PGs et identifié par la suite comme *A. niger* utilisant les caractéristique macros et microscopique (Ire et al., 2016).

Le résultat montre que, les colonies se développent et se propager dans les 2-3 jours suivant la période d'incubation à la texture mousseuse et légèrement veloutée. Les hyphes étaient septés et ramifiés avec des têtes ronds, grandes et également radiées (Ire et al., 2016).

2.2. L'influence des différents paramètres sur la production de la PG par *A. niger*

Les facteurs testés (l'humidité, la concentration de l'inoculum, la source de carbone et la source d'azote) montrent des effets plus significatifs sur la production des PGs (Ire et al., 2016).

2.3. Effet de la source du carbone :

L'effet de la source de carbone sur production des PGs avec pelures de banane comme substrat pour la fermentation, la plus production la élevée été en présence de **fructose** (17,23U/ml) suivi de **glucose** (15,28 U/ml), alors que l'amidon et les pelures de de manioc sont de mauvais inducteurs des PGs, le champignon a produit la plus faible quantité d'enzyme lorsque l'amidon a été incorporé dans le milieu (**Figure 17**).

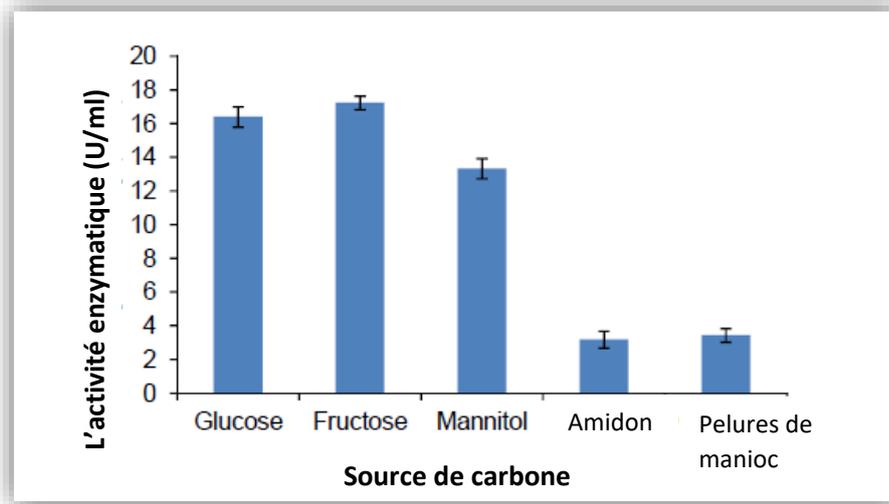


Figure 21: Effet sources de carbone sur la production de PGs par *A. niger* (Ire et al., 2016).

2.4. Effet des sources d'azote sur l'enzyme Production

La **figure 18** représente l'effet de la source d'azote sur la production de PGs par *A. niger* avec peaux de banane comme substrat pour la fermentation. Le résultat indique que parmi les différentes sources d'azote étudiées le nitrate d'ammonium (**KNO₃**) était la meilleure source d'azote pour la production de l'enzyme, suivi par peptone et l'urée dans l'ordre décroissant. La plus faible production de l'enzyme a été observée en présence de NH₄Cl.

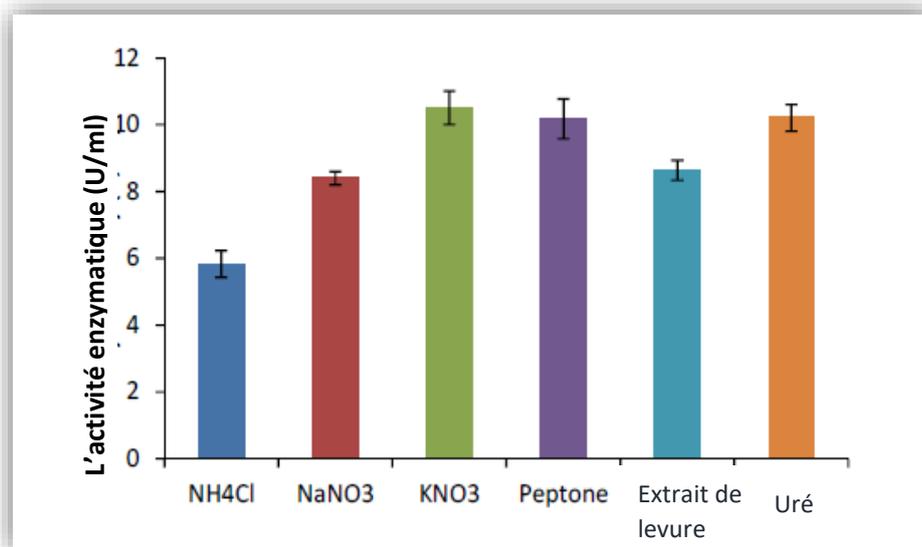


Figure 25: Effet sources d'azote sur la production de PGs par *A. niger* (Ire et al., 2016).

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

Les résultats montrent que la production optimale de l'enzyme se produisait lorsque la concentration de l'inoculum était de **4 ml**.

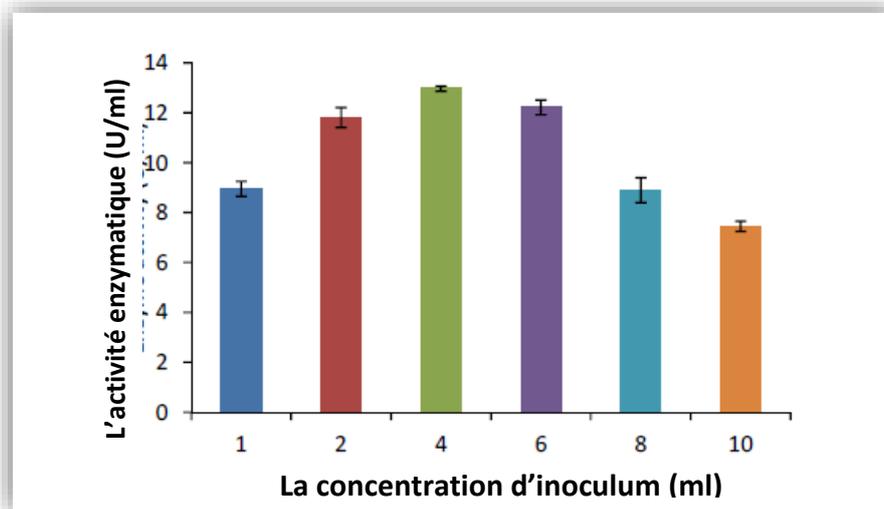


Figure 26: Effet de concentration d'inoculum sur l'activité PG (Ire et al., 2016).

2.6. Purification des PGs produites par *A. niger*

Les PGs d'*A. niger* ont été purifiés par précipitations par sulfate d'ammonium et chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G100. Le profil d'élution des pectinase est représenté dans la **figure 20**, le résultat montre que la fraction **12** est la plus active qui a une activité enzymatique et teneur en protéines sur Séphadex G100 la plus élevée. Les résultats des procédures de purification sont résumés dans **le tableau 3**.

Tableau 2: Résumé de la purification des PGases d'*A. niger* (Ire et al., 2016).

L'étape de purification	Volume de la protéine (ml)	Protéine total (mg)	Activité total (U)	Activité spécifique (U/mg de protéine)	Le rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	100	442	1747	3.95	100	1.0
Sulfate d'ammonium	68	28.56	541.96	18.98	31.02	4.80
Séphadex G100	30	0.9	150	166.67	8.59	42.17

L'activité spécifique de relargage de sulfate d'ammonium (75%) était de 18,98 U/mg de protéines et 31 % récupérés dans protéines de précipitation avec un pli de de 4,80. Filtration sur gel Sephadex G100 fourni un facteur de purification de 42 avec un

rendement de 8,59 % et une purification globale jusqu'à 42 fois et une activité spécifique de 166,67 U/mg de protéine ont été atteints.

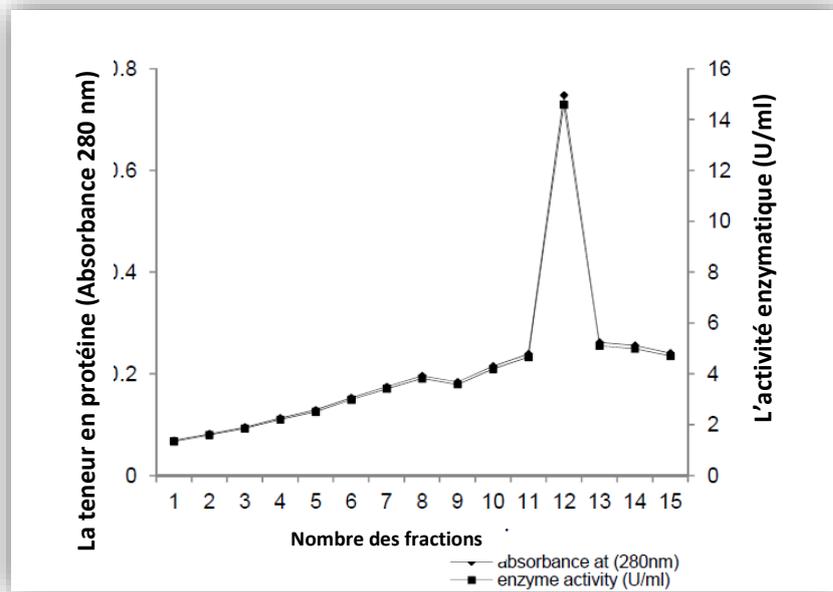


Figure 29: Profil d'élution de la PG d'*A. niger* sur Sephadex G100 (Ire et al., 2016).

2.7. Effet de la température sur l'activité et la stabilité des PGs purifiées :

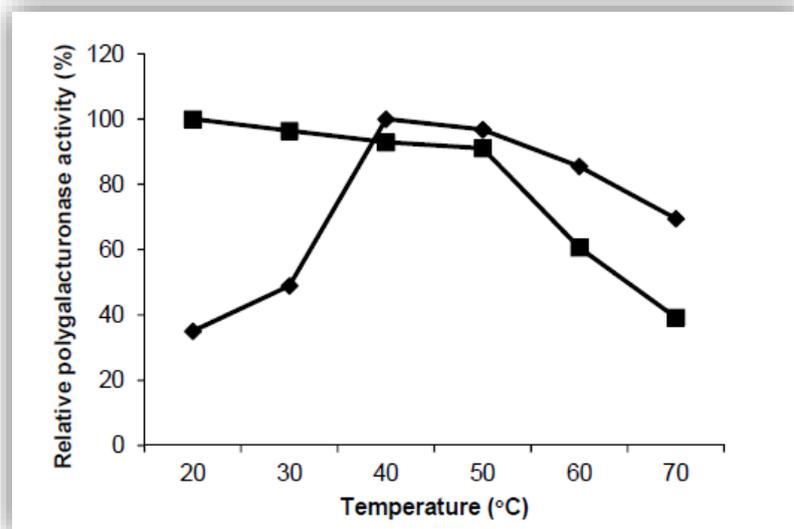


Figure 30: Effet de la température sur l'activité (◆) et la stabilité(■) des PGases purifiées (Ire et al., 2016).

Les deux courbes de stabilité et d'activité des PGs purifiés montrent une activité maximale à 40 °C et un intervalle de stabilité [20 – 50] °C pendant 1h.

2.8. Effet du PH sur l'activité PG

L'enzyme a une activité de pH optimale à **5,0** et était stable dans la plage de pH de [4-6].

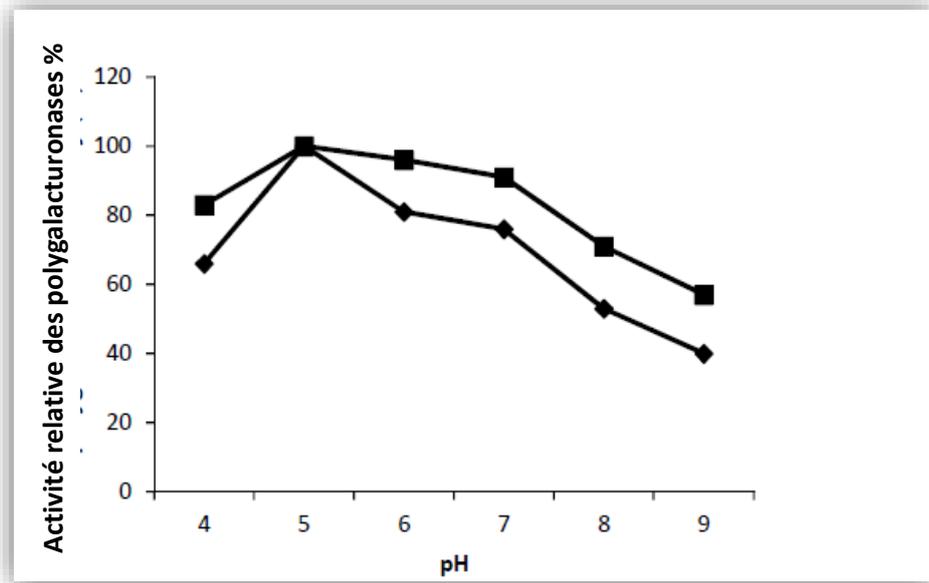


Figure 31: Effet du PH sur l'activité (♦) et la stabilité(■) des PGs purifiées (Ire et al., 2016).

II. La production des PGs par SSF sur un mélange de son de blé et de pulpe de la betterave sucrée

L'objectif de l'étude d'**Alavi et al. (2019)** est de produire des PGs à partir d'*A. niger* par SSF avec le son d'orge et la pulpe de betterave sucrée comme substrat.

1. Méthodes

Evaluation du processus de la production des PGs et optimisation différents facteurs : source de carbone, temps de la fermentation, la concentration d'inoculum, la teneur en humidité.

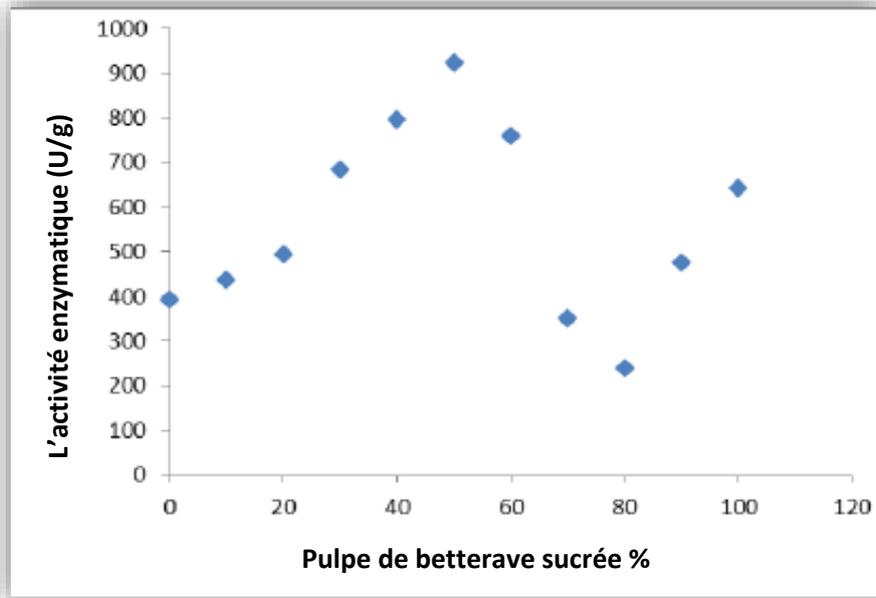


Figure 34: Effet du pourcentage de pulpe de betterave à sucre en mélange avec du son d'orge sur l'activité enzymatique (Alavi et al., 2019).

2. Résultats

2.1. Effet du rapport son d'orge/ pulpe de betterave sucrée

A chaque fois le rapport des deux substrats change avec mesure de l'activité enzymatique (Ae), la **figure 23** montre une Ae maximale en **50:50** (50% son d'orge 50% pulpe de betterave), en augmentant la concentration de pulpe de betterave l'Ae diminue jusqu'à 80% Ae augmente de nouveau. Selon les résultats mentionnés, un rapport de poids de 50:50 a été considéré comme le rapport optimal.

2.2. Effet de la concentration d'inoculum

Les résultats (**Figure 24**) montrent que la concentration optimale est de 50 millions de spores (10 million de spores/g de substrat) où l'activité enzymatique est près de 98%.

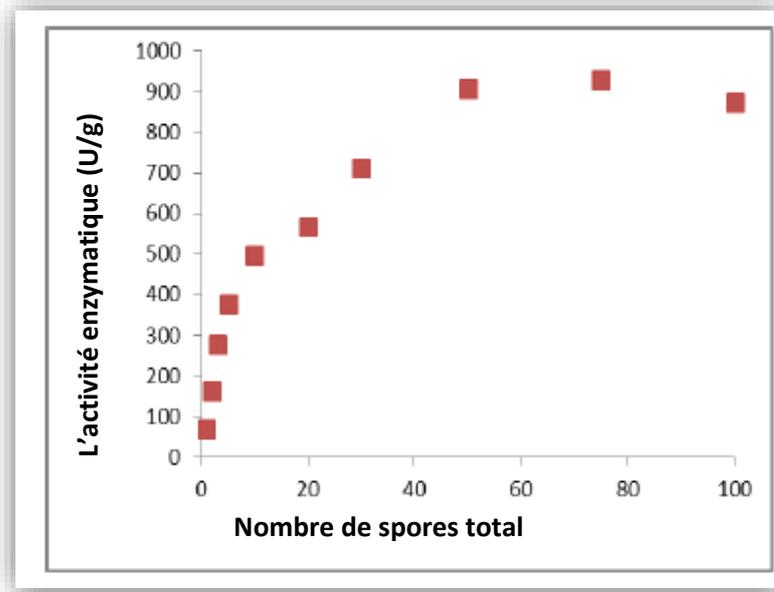


Figure 36: Effet du nombre de spores sur l'activité enzymatique produite (Alavi et al., 2019).

2.3.Effet du temps d'incubation

Il est très important de trouver le moment optimal pour que la fermentation produise l'enzyme, car c'est là où la fermentation doit être arrêtée et l'enzyme doit être extraite. La durée de **7 jours** a été considérée comme la période optimale pour une activité enzymatique maximale, **Martin et al.**, ont observé des résultats similaires (durée optimale de 8 jours) pour l'enzyme PGs (**Djama & Abdellah, 2018**). Selon **Akhter et al., (2011)**, la durée d'incubation est un facteur important dans la production de métabolites. Ils démontrent aussi que le déclin de cette production après la prolongation du temps d'incubation est dû à l'épuisement du milieu de fermentation en nutriments.

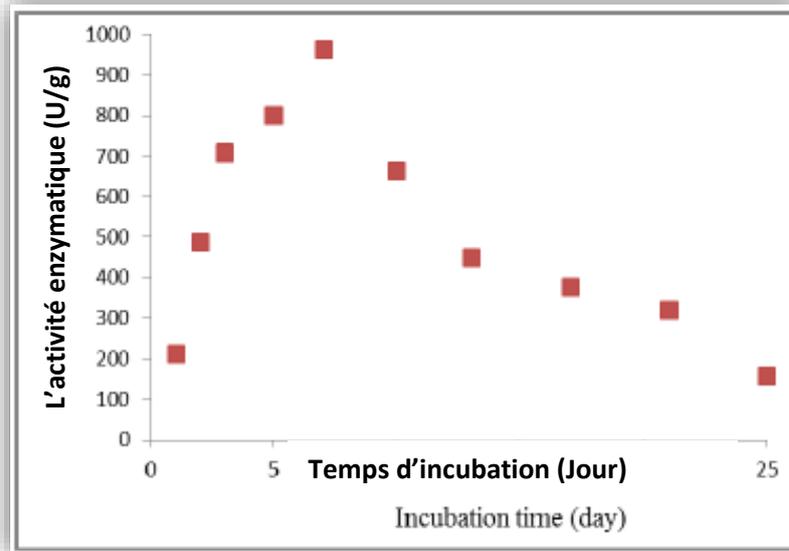


Figure 39: Effet du temps d'incubation sur la production des PGs (Alavi et al., 2019).

2.4.Effet de la température de fermentation :

La température est le facteur le plus important dans la production d'enzymes dans de nombreux processus de fermentation, à la fois dans la fermentation à l'état solide et submergée. La température fournit de l'énergie pour la croissance et l'activité métabolique des micro-organismes (Patil & Dayanand, 2006), à la fin de la phase de latence, l'augmentation de la température n'est pas favorable à la croissance et à la production de l'enzyme, car plus d'absorption d'énergie réduit le temps d'adaptation des micro-organismes aux conditions de croissance. Selon les résultats (Figure 26), l'activité PGs maximale 1000 U/g a été obtenue à 30°C.

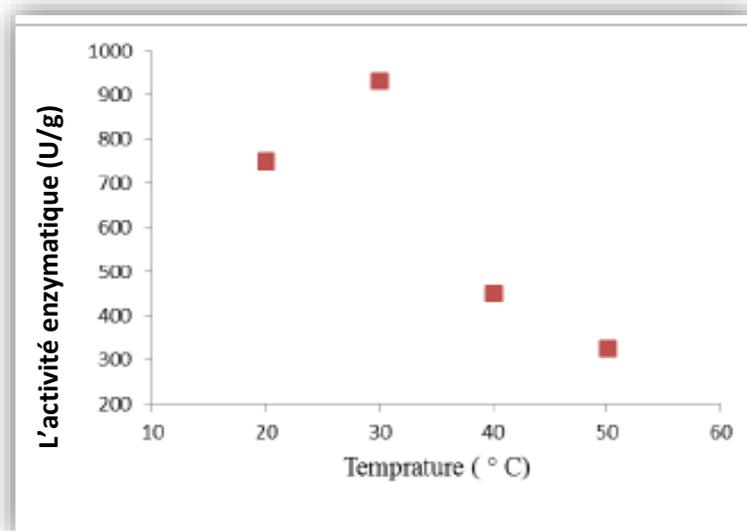


Figure 40: Effet de la température sur l'activité enzymatique (Alavi et al., 2019)

2.5. Effet du taux d'humidité sur l'activité enzymatique

L'hydratation est un facteur important qui influence le taux de croissance, l'évolution de la germination, la sporulation et le rendement du produit en FMS. Selon, **abbasi et al. , (2011); Castilho et al., (2000); Blandino et al., (2002); Freitas et al., (2006)**, le taux d'humidité varie de **40 à 80%** pour la production de pectinases sur divers substrats solides avec différentes souches fongiques. En augmentant le taux d'humidité, l'activité polygalacturonase augmente, ce qui prouve que l'humidité est un facteur primordial pour la croissance et le métabolisme jusqu'à atteint une activité maximale à **80%**. Au-delà de cette valeur Ae diminue, la porosité réduit, la pénétration d'oxygène et le volume de gaz diminue, ce qui peut engendre une contamination bactérienne du milieu.

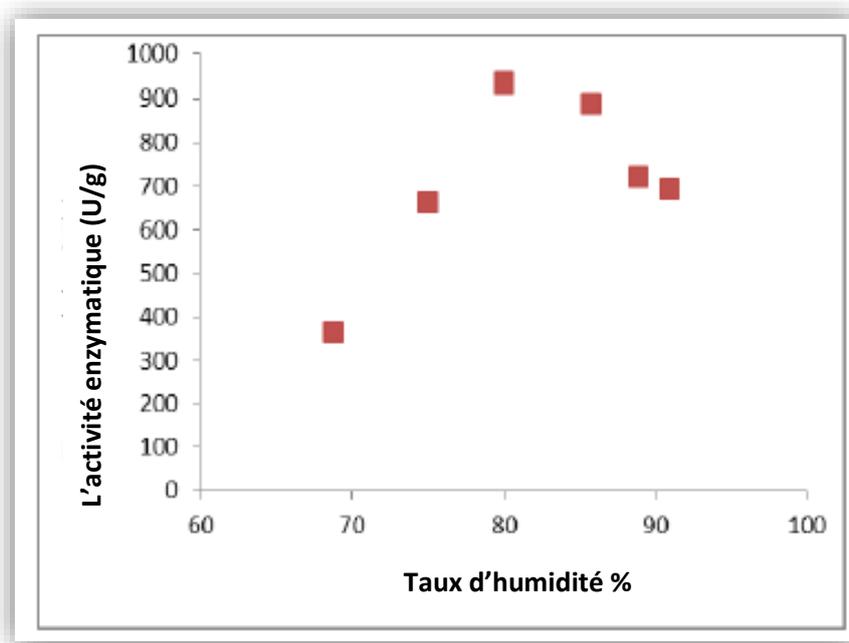


Figure 44: Effet du taux d'humidité sur l'activité PG (Alavi et al., 2019).

III. Conclusion :

D'après ces études bibliographiques, on peut déduire que l'optimisation des paramètres de production des PGs par fermentation solide est importante et nécessaire pour une meilleure production avec un bon rendement : la température optimale est [30 – 40] °C, le PH près de 5, le taux d'humidité entre 50 et 80%. Ces résultats s'accordent avec d'autres études précédentes.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Aspergillus niger est une espèce fongique filamenteuse et omniprésente en abondance dans des milieux différents : sol, aliments, fruits. Cette espèce est connue par sa production de diverses molécules à intérêt industrielle parmi elles les enzymes PGs.

Les enzymes PGs sont le groupe le plus important des enzymes pectinolytiques qui catalysent les substances pectiques. Ces enzymes ont connu un grand intérêt en raison de leur utilisation vaste en industrie, surtout l'industrie de la fabrication de jus de fruit, ces enzymes ont la capacité de dégrader la pectine. Elles peuvent être produites par divers micro-organismes parmi eux *Aspergillus niger*. En utilisant deux procédés de fermentations différentes : la fermentation submergée SmF et la fermentation solide SSF. La production industrielle de ces enzymes nécessite des conditions spécifiques pour une production optimale.

Cette étude s'intéresse à la production des PGs par le champignon *Aspergillus niger* à travers la fermentation solide SSF, en étudiant différents travaux de recherche et en comparant leurs résultats obtenues et avoir les paramètres optimisés de cette culture (effet de la température, de pH, de temps d'incubation...).

Selon cette étude on peut déterminer les conditions optimales de la production des PGs par la fermentation solide par la moisissure *A. niger* à savoir :

- ✚ La température optimale est dans l'intervalle **[30-40] °C**.
- ✚ Le pH optimal est **5** dans l'intervalle **[4-6]**.
- ✚ Le taux d'humidité **optimale varie entre [40-80] %**.

Les PGs d'*A. niger* ont été purifiés par précipitations par sulfate d'ammonium et par chromatographie d'exclusion sur gel séphadex G100 pour obtenir une meilleure activité spécifique et un bon rendement.

En perspective le travail peut être orienté en :

- ✚ Etudiant l'effet des paramètres : pH, température, temps d'incubation, source de carbone...

Conclusion et perspectives

- ✚ Optimisation des paramètres de production de la PG.
- ✚ Purification de l'enzyme produite en vue de son application en industrie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques.

- Abarca L.M., Francesc A., Jose C., Cabanes J. F. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek Kluwer, Academic Publisher*, 86: 33-49.
- Abbasi, H., Mortazavipour, S. R., & Setudeh, M. (2011).** Polygalacturonase (PG) production by fungal strains using agro-industrial bioproduct in solid state fermentation. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 15(1), 1-5.
- Akhter, N., Morshed, M. A., Uddin, A., Begum, F., Sultan, T., & Azad, A. K. (2011).** Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state media. *Int J Biosci*, 1(1), 33-42.
- Alavi, A., Tahghighi Nia, F., & Pajoom Shariati, F. (2020).** Polygalacturonase Production by *Aspergillus Niger* Solid State Fermentation on Barley Bran and Sugar Beet Pulp Mixture. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 3(3), 350-357.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996).** Phylum Zygomycota. *Introductory mycology* (4^e éd.). Wiley, New York 127-171.
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017).** Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification. *International Journal of Food Engineering*, 13(2).
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003).** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497e516.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., & Webb, C. (2002).** Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2), 164-169.
- 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^{ème} édition. Masson. Paris. 16,41,110,183,364.
- Boxquet, J. 1993.** Généralités sur les micro-organismes. En 'Biotechnologie'. Ed. R. SCRIBAN. Tee. Doc. Lavoisier. Paris. 38-46.

Références bibliographiques.

- Brooke, A. G. (1994).** Industrial fermentation and *Aspergillus citric acid*. In K. A. Powell, A. Renwick, & R. F. Peberdy (Eds.), *The genus Aspergillus: From taxonomy and genetics to industrial application* (pp. 122e134). New York: Plenum Press.
- Cahagnier B. (1997).** Moisissures des aliments peu hydrates. Ed : Lavoisier technique et documentation. Paris. 50P.
- Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. (2000).** Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45-50.
- Combo M., Aguedo M., et Paquot M. (2011).** Les oligosaccharides pectiques : production et applications Possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15, 153-164.
- Currie JN** Citric acid fermentation. *J Biol Chem* 1917; 31:1537.
- Dijksterhuis J. et Wösten H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology*. 74: 8-23.
- Dennison C. (2011).** Three-phase partitioning, in *Methods in protein biochemistry*. Walter de Gruyter: Berlin, Germany 1-5.
- Drouin M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître ès sciences (M.Sc.). Canada
- Essuman, E. K., Ankar-Brewoo, G. M., Barimah, J. and Ofosu, I. W. (2014).** Functional Properties of Protein Isolate from Fern Fronds. *International Food Research Journal*. 21(5): 2085-2090.
- Flavie Prévot. (2015).** Thèse de doctorat " École doctorale de physique et de chimie Icpes, UMR 7515. (Valorisation de déchets végétaux pour la bioproduction de poly(acide lactique)P19 /48
- Freitas, P., Mortin, N., Silva, D., DaSilva, R. (2006).** Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *monascus sp n 8* and thermotolerant *Aspergillus sp n 12* on solide-state fermentation. *Brazilin journal of microbiology*.pp 1678-4405.

Références bibliographiques.

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., & Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One*, 6, e23496. 22-Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16,31e44.

Gagaoua et Hafid. (2016).Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification.. Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000, Constantine, Algeria. , *Biosensors Journal*.5 :1.

Gastón E. Ortiz1. · María C. Ponce-Mora1 · Diego G. Nosedal. (2017). Gabriela Cazabat2 Celina Saravalli2 · María C. López2 · Guillermo P. Gil2 · Martín Blasco3 · Edgardo O. Albertó Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction" *J Ind Microbiol Biotechnol*" 44:197–211

Ghosh JS. (2016). Solid state fermentation and food processing: A Short Review. *Int J Food Sci Nutr* 6(1): 1-7.

Gomes, E., Simoes, R. R. L., da Silva, R, and Silva, D. (2017). Purification of an Exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 Produced in Submerged Fermentation. *International Journal of Microbiology*. 1-8.

Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008).*Biochimie de HARPER*. 3ème édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.

Grigoraş, C. G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs (Thèse de doctorat, Université d'Orléans).

Guillaume V. (2006). Mycologie auto-évaluation et manipulation. Ed De Boeck & Lacier, Bruxelles, 62P.-

Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, Medicine and beyond. *BioMed research international*, 18.

Références bibliographiques.

Haberra S.(2014). Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse de Doctorat. Faculté Des Science Département De Biochimie.17p.

Hadfield, K. A et Bennett, A. B. (1998). "Polygalacturonases: many genes in search of a function." *Plant Physiol* 117(2): 337-43.

Hainque B et autres. (2008). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Gorenjski Tisk. Paris. (P : 34- 40- 42- 45-303).

Houle, V. (2007). *Détermination de l'impact de la glycosylation sur l'activité et la stabilité de l'endopolygalacturonase de S. cerevisiae par mutagenèse dirigée* (Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières).

Ire, F. S., & Vinking, E. G. (2016). Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation using banana peels. *J Adv Biol Biotechnol*, 10(1), 1-15.

Javed, R., Nawaz, A., Munir, M., Hanif, M., Mukhtar, H., Haq, I. U., & Abdullah, R. (2018). Extraction, purification and industrial applications of pectinase: A review. *J. Biotechnol. Biores*, 1, 1-6.

Jayani r.s., saxena s., gupta r. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review *Process Biochem.*, 40, 2931-2944

Jônatas de Carvalho Silvaa,1 , Pedro Renann Lopes de França,1 , Attilio Convertic Tatiana Souza Portoa.(2018). Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginateimmobilized enzyme 61–70.

Kang, C., Yu, X. W., & Xu, Y. (2015). Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42, 263e272.

Khairnar, Y., Krishna, K.V., Boraste,A., Gupta, N., SohamTrivedi, S., Patil,P., Gupta,G.,Gupta,M., Jhadav,A., Mujapara,A., Joshi, B., Mishra, D.(2009). Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus Niger*. *International Journal of Microbiology Research*, Vol 1, 2, pp-13-17

Références bibliographiques.

Kheder F.(2007).Production et Purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique De Lorraine.4-39p.

Knuf, C., & Nielsen, J. (2012). Aspergilli: Systems biology and industrial applications. *Biotechnology Journal*, 7, 1147e1155.

Kristianem B., Sinclair C.G. (1978). Production of citric acid in batch culture biotechnol. *Bioeng*, 20: 1711-1722.

Kubicek C.P., Rohir M. (1977). Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Europ. J. Appi. Microbiol*, 4: 167-168.KUBICEK1977167-168

Kubra, K. T., Ali, S., Walait, M., & Sundus, H. (2018). Potential applications of pectinases in food, agricultural and environmental sectors. *J Pharm Chem Biol Sci*, 6(2), 23-34.

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

Lamrini S. (2012).Etudes préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Mémoire de magéster. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.14-28p.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001).Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, end Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

M. Vincent, Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica Acta* 251 (1996) 3-17.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1966). *Brock biology of microorganisms* (10^e éd.). Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 524-574.

Magnuson, J. K., & Lasure, L. L. (2004). Organic acid production by filamentous fungi. In *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine* (pp. 307-340). Springer, Boston, MA.

Références bibliographiques.

Martin N, De Souza SR, Da Silva R, Gomes E. (2004). Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Braz Arch Biol Technol* 47(5): 813-819.

Massaoudi Y. (2015). Contribution à la recherche et l'isolement de *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) et à la caractérisation des bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques et à effet antagoniste de *Dickeya* sp. Mémoire de Magister. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 13p

Mattey M. (1992). The production of organic acids. *Crit. Rev- Biotechnol*, 12: 87-132.

Merve K., Antonio G., Sousa., Marie J.C., Susanne O. Sørensen., Marie .C.R.(2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions 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. 2ème Ed Doin, 430P

Nabi NG, Asgher M, Shah AH, Sheikh MA, Asad MJ. (2003). Production of pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of citrus peels. *Pak J Agr Sci* 40(3-4): 193-201.

Orfila, C., Seymour, G. B., Willats, W. G., Huxham, I. M., Jarvis, M. C., Dover, C. J., ... & Knox, J. P. (2001). Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1→5)- α -l-arabinan in the pericarp of *Cnr*, a ripening mutant of tomato. *Plant Physiology*, 126(1), 210-221.

PA Pagianni M. (2007). Advances in citric fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane, transport and modeling. *Biotechnol- Advanc*, N° 25: 244-263. PA PAGIANNI M, 2007, 244-263

Pagarra, H., Rahman, R. A., Azelee, N. I. W., & Ilias, R. M. (2019). Optimization and characterization of exo-polygalacturonase by *Aspergillus Niger* cultured via solid state fermentation. *Jurnal Teknologi*, 81(1).

Palagiri, S., Mayukha, M., Sagar, G., Chourasiya, R., & Sibi, G. (2019). Production of pectinases and pectinolytic enzymes: microorganisms, cultural conditions and substrates. *Adv. Biotechnol. Microbiol*, 14, 53-59.

Références bibliographiques.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31

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

Patil, S. R., & 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.

Perfect, J., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., De Repentigny, L., Chapman, S. W., ... & Stevens, D. A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1824-1833.

Perfect, J., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., De Repentigny, L., Chapman, S. W., ... & Stevens, D. A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1824-1833.

Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., & van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 20, 200e206.

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

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J. & Vandamme E.J., 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 39, 213-279.

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

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C., VAN DIJCK P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl microbiol biotechnol*, 59[4-5]: 426-435. *Science (Oxford)*, 31: 603-632.

Shimizu, T., Nakatsu, T., Miyairi, K., Okuno, T. et Kato, H. (2002). "Active-site architecture of endopolygalacturonase 1 from *Stereum purpureum* revealed by crystal

Références bibliographiques.

structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution." *Biochemistry* 41 (21): 6651-9.

Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Research, 2011

Tapre, A. R., Jain, R. K.(2014).Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. 21(2): 447- 453.

Teotia, P., Kumar, M., Varma, A., & Kumar, V. (2016). Molecular tools for strain improvement in *Aspergillus*. In V. G. Gupta (Ed.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 119e124). Elsevier.

Thakur B. R., Singh R. K. and Handa A. K.(2011). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,. 37(1): p.47-73

Thibault J.F.(1980).Les substances pectiques. In: Costes C., Monties B.(Eds), *Les polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés*,Gauthier-Villars,Paris,232-251

V. P. B. Rekha, Mrinmoy Ghosh, Vijayanand Adapa, Sung-Jong Oh . K. Pulicherla, K. R. S. Sambasiva Rao (2013). Optimization of Polygalacturonase Production from a Newly Isolated *Thalassospira frigidophilosprofundus* to Use in Pectin Hydrolysis: Statistical Approach." *The National Center for Biotechnology Information*"vol(12)

van de Vondervoort PJI, Langeveld SMJ, Ram AFJ, et al. Comparison of the *Aspergillus niger* genomic DNA sequence with its genetic map. In: *The Second Aspergillus Meeting*. CA: Asilomar Conference Center, 2005.

van Dijck, P. W., Selten, G. C., & Hempenius, R. A. (2003). On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 27-35.

Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (1999). Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 263e276.

Références bibliographiques.

van Santen, Y., Benen, J. A., Schröter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J., & Dijkstra, B. W. (1999). 1.68-Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and Identification of Active Site Residues by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30474-30480.

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

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. et Knox, J. P. (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis." *Plant Mol Biol* 47(1-2): 9-27.

Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., & Wu, J. Y. (2017). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1327418>

Yang, L., Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2017). *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 33-49.

Année universitaire : 2021-2022	Présenté par : BOURKINA Oumaima
Etude bibliographique d'une pectinase d'origine fongique : production et separation.	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie.	
<p>Ce travail vise à la production de la polygalacturonase d'<i>Aspergillus niger</i> selon le procédé de la fermentation solide (SSF) et l'optimisation de différents paramètres de production, en se concentrant sur les travaux bibliographiques précédents à fin de connaître ces conditions optimales.</p> <p>Les polygalacturonases sont les enzymes qui font partie de la famille des pectinases. <i>Aspergillus niger</i>, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêts économiques majeurs notamment les PGs. ces dernières sont l'intérêt de beaucoup d'étude en raison de leur utilité et efficacité dans divers industries : extraction de jus non clarifié, bioénergie, alimentation, recyclage de déchets (écologique).</p> <p>Pour une meilleure production de PGs par <i>A. niger</i>, il a été démontré qu'un taux d'humidité soit entre 40 et 60%, une température entre 30 et 40 °C et un PH au environ de 5 et en présence d'une source d'azote et le fructose comme source de carbone.</p>	
<p>Mots-clés : <i>Aspergillus niger</i>, les polygalacturonases, les paramètres de production, la fermentation solide.</p>	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Encadreur : Mme BENNAMOUN Leila (M.C.B – Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p> <p>Examineur 1 : Mr NOUADRI Tahar (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p> <p>Examineur 2 : Mme DAKHMOUCHE Scheherazad (MCA – ENS ASSIA DJEBAR).</p>	