



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 Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie /Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا 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

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Expression pectinolytique d'*Aspergillus oryzae* : optimisation sur substrat agro - industriel

Présenté par : FERDI Hadil

soutenu le : 28/06/2024

BOUFENNARA Nourhane Malak

Jury d'évaluation :

Président Mme KASSA-LAOUR M. (M.C.B- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Mme BENNAMOUN L. (M.C.A- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s) : Mme DAKHMOUCHE S. (Professeur, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).

Année universitaire 2024 - 2025

Remerciements



Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude envers Allah, qui nous a accordé la force, la patience et la volonté nécessaires pour mener à bien cette étude.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à Madame BENAMOUN Leila (MCA), pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Nous lui sommes reconnaissants pour ses conseils avisés, ses orientations pertinentes, ainsi que pour la confiance et le soutien qu'elle nous a témoigné tout au long de la réalisation de ce modeste mémoire.

Nos remerciements chaleureux vont enfin à Madame DERAMOUCHE Scheherazad (PROFESSEUR, ENSC) et à Madame KASSA-LAOUR MONNA (MCB, UFMCI) pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

Nous exprimons également notre reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, nous ont soutenus et encouragés durant cette période exigeante, contribuant ainsi à nourrir notre persévérance et notre détermination.

Dédicace HADIL

À mes plus grands soutiens et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinie.

À mon paradis, la prunelle de mes yeux, la source de ma joie et de mon bonheur, la première personne à croire en mes rêves et à soutenir mes ambitions : **ma très chère mère, Nadia.**

Quoi que je fasse ou dise, je ne pourrai jamais te remercier à la hauteur de tout ce que tu m'as offert.

Ton affection m'enveloppe, ta bienveillance me guide, et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force face aux obstacles de la vie.

À celui qui m'a appris à être forte, ma source de vie et d'affection, mon père bien-aimé, **Kaddour,**

Ton soutien discret, ta sagesse et tes sacrifices silencieux m'ont permis d'avancer avec confiance et détermination. Merci pour ta foi en moi.

À **ma chère sœur Maroua,** Ton écoute constante, ta sagesse, ton soutien infaillible et ton amour m'ont accompagnée à chaque étape. Merci d'avoir toujours été là, dans les moments d'incertitude comme dans les instants de joie.

À **mon frère bien-aimé Mohemad,** Pour ta présence rassurante, ton appui discret mais essentiel, et ta confiance indéfectible. Ta force et ton exemple ont été une source précieuse de motivation.

À **tous les membres de ma grande famille,** en particulier **mes tantes et mes cousines Dikra et Hawa,**

Merci pour votre affection, vos encouragements sincères et votre chaleur inestimable.

À **Chaima,** Pour ta bienveillance, ton soutien constant et cette amitié fidèle qui m'a portée dans les moments de doute comme de réussite. Ta présence a donné du sens et de la force à chaque étape de ce travail.

À **Marwa et Douli,** Pour votre écoute, votre énergie, et votre amitié sincère. Vous avez été un soutien précieux tout au long de cette aventure.

À **Nourhane,** Mon binôme, ma complice de route. Merci pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet.

À **Aya, Khawala, Salma et Amina,** Merci du fond du cœur pour votre aide précieuse au laboratoire, votre disponibilité, votre esprit d'équipe et votre soutien. Votre présence a rendu ce travail plus fluide, plus léger et plus humain.

À moi-même,

Pour n'avoir jamais abandonné, même lorsque le chemin semblait incertain.
Pour la force puisée dans le silence, pour le courage de continuer et la foi en mes capacités.
Cette réussite est avant tout celle d'un parcours intérieur, construit avec volonté, patience et espoir.

À toutes les personnes qui m'ont soutenue, de près ou de loin,
Que ces lignes soient le témoignage sincère de ma profonde gratitude.

Dédicace NOURHANE

À mes plus grands soutiens et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinie.

À mon paradis, la prunelle de mes yeux, la source de ma joie et de mon bonheur,
la première personne à croire en mes rêves et à soutenir mes ambitions : **ma très chère mère, Malika.**

Quoi que je fasse ou dise, je ne pourrai jamais te remercier à la hauteur de tout ce que tu m'as offert.

Ton affection m'enveloppe, ta bienveillance me guide, et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force face aux obstacles de la vie.

À celui qui m'a appris à être forte, ma source de vie et d'affection, mon père bien-aimé,
Abderrazak,

Ton soutien discret, ta sagesse et tes sacrifices silencieux m'ont permis d'avancer avec confiance et détermination. Merci pour ta foi en moi.

À ma chère sœur **Salsabile**, Ton écoute constante, ta sagesse, ton soutien infailible et ton amour m'ont accompagnée à chaque étape. Merci d'avoir toujours été là, dans les moments d'incertitude comme dans les instants de joie.

À mon frère bien-aimé **Amine** et ma joie mon petit frère **Ahmed**, Pour ta présence rassurante, ton appui discret mais essentiel, et ta confiance indéfectible. Ta force et ton exemple ont été une source précieuse de motivation.

À tous les membres de ma grande famille, en particulier **mes tantes et mes cousines**,
Merci pour votre affection, vos encouragements sincères et votre chaleur inestimable.

À **Jihane, Belkiss et myss**, Pour votre bienveillance, votre soutien constant et cette amitié fidèle qui m'a portée dans les moments de doute comme de réussite. Votre présence a donné du sens et de la force à chaque étape de ce travail.

À **Hadil**, Mon binôme, ma complice de route. Merci pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet.

À **Aya, Khawla, Salma et Amina**, Merci du fond du cœur pour votre aide précieuse au laboratoire, votre disponibilité, votre esprit d'équipe et votre soutien. Votre présence a rendu ce travail plus fluide, plus léger et plus humain.

À **moi-même**,

Pour n'avoir jamais abandonné, même lorsque le chemin semblait incertain.

Pour la force puisée dans le silence, pour le courage de continuer et la foi en mes capacités.

Cette réussite est avant tout celle d'un parcours intérieur, construit avec volonté, patience et espoir.

À **toutes les personnes qui m'ont soutenue**, de près ou de loin,
Que ces lignes soient le témoignage sincère de ma profonde gratitude.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

Introduction 1

Chapitre Enzymes pectinolitiques

1. Enzymes glycolytiques	4
1.1 Substrats pectiques.....	4
1.2 Source de la pectine.....	4
1.3 Structure de la pectine	5
2. Enzymes pectinolytiques.....	6
2.1 Classification	6
2.1.1 Enzymes désesterifiantes	8
2.1.2 Enzymes dépolymérisantes.....	9
2.1.2.1 Polygalacturonases.....	9
2.1.2.2 Origine des polygalacturonases	9
2.1.2.3 Structure de la polygalacturonase	11
2.1.2.4 Mode d'action de la polygalacturonase	11
2.1.2.5 Production de polygalacturonase	12
2.1.2.6 Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase	13
3. Applications industrielles des pectinases	14
3.1 Clarification du jus de fruit	14
3.2 Extraction de jus et d'huile	15
3.3 Fermentation du café et du thé	15
3.4 Macération.....	15
3.5 Industrie pharmaceutique	15
3.6 Production de biocarburants	15

Chapitre 2 Champignons

1. Champignons	18
----------------------	----

1.1 Champignons filamenteux	18
1.2 Classification classique des champignons.....	18
2. Genre <i>Aspergillus</i>	19
2.1 Définition et caractéristiques générales.....	19
3. Espèce <i>Aspergillus oryzae</i>	19

Chapitre 3 Méthodes d'optimisation

1.Introduction à l'optimisation en biotechnologie.....	22
1.1 Objectif de l'optimisation enzymatique.....	22
2.Introduction aux plans d'expériences statistiques.....	22
2.1 Objectifs d'utilisation des plans d'expériences	22
2.2 OFAT (One Factor at a Time)	23
2.3 Plan de Plackett et Burman (1946).....	23
2.4 Plan de Box et Wilson	24

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique.....	27
1.1 Souche fongique.....	27
1.2 Réactivation de la souche fongique <i>Aspergillus oryzae</i>	27
2.Mise en évidence de l'activité pectinolytique extracellulaire d' <i>Aspergillus oryzae</i>	27
2.1. Substrat de fermentation	27
2.2. Préparation de l'inoculum	27
2.3 Dénombrements de spores	28
3.Méthode de fermentation	28
3.1. Fermentation solide.....	28
3.2 Fermentation liquide.....	28
3.3. Fermentation submergée	29
4. Extraction enzymatique.....	29
4.1 Extractions de milieu solide	29
4.2 Extractions de milieu submergé et liquide	29
4.3 Détermination de la matière sèche.....	29
5.Méthodes analytiques	29
5.1. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PG)	29

6. Méthode d'optimisation	31
6.1 Plan de Plackett-Burman (PBD) (Plackett –Burman, 1946)	31
6.2 Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : Central Composite Design)	33
6.3 Validation du modèle	37

Résultats et discussion

1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique par la souche <i>Aspergillus oryzae</i>	39
2. Sélection du mode de culture	40
3. ANOVA et Tests Post-Hoc	41
4.Optimisation de la production de la polygalacturonase	45
4.1 Criblage des facteurs influençant la production de la PG	45
4.2 Optimisation de la production de la polygalacturonase selon le plan statistique de Box et Wilson (1951)	51
4.3 Validation du modèle	56
 Conclusion générale	 59
Références bibliographiques	61
Annexes	

Liste des abréviations

- **ANOVA** : Analysis of Variance (Analyse de variance)
- **CCD** : Central Composite Design (Plan composite centré)
- **CM** : Carré Moyen (dans le contexte de l'ANOVA)
- **DE** : Degré d'Estérification
- **DL** : Degrés de Liberté
- **FIV** : Facteur d'Inflation de la Variance
- **FM** : Faiblement Méthylées
- **HG** : Homogalacturonane
- **HM** : Hautement Méthylées
- **IC** : Intervalle de Confiance
- **PBD** : Plackett-Burman Design (Plan de Plackett-Burman)
- **PG** : Polygalacturonase
- **PGL** : Polygalacturonate Lyase
- **PME** : Pectin Méthylestérase
- **PMG** : Polyméthylgalacturonase
- **PMGL** : Polyméthylgalacturonate Lyase
- **R²** : Coefficient de détermination
- **RG-I** : Rhamnogalacturonane I
- **RG-II** : Rhamnogalacturonane II
- **RSM** : Response Surface Methodology (Méthode des surfaces de réponse)
- **SMF** : Fermentation en Milieu Liquide (liquide Fermentation)
- **SSF** : Fermentation en Milieu Solide (Solid-State Fermentation)
- **U/g** : Unités par gramme
- **U/gs** : Unités par gramme de substrat
- **U/ml** : Unités par millilitre
- **UI** : Unité Internationale

Liste des Figures

Figure 1 : Structure et composition de la pectine (<i>Zheng et al., 2021</i>).	5
Figure 2 : Structure cristalline de la polygalacturonase (<i>Radha et al., 2019</i>).	11
Figure 3 : Sites d'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1→4) catalysées par les enzymes polygalacturonases.	12
Figure 4 : Applications diverses des pectinases (<i>Anand et al., 2020</i>).	16
Figure 5: Vue d'ensemble détaillée d' <i>Aspergillus oryzae</i> . L'illustration centrale met en évidence	20
Figure 6 Représentation tridimensionnelle d'un plan composite centré complet impliquant trois facteurs expérimentaux, illustrant la disposition des points factoriels, axiaux et centraux dans l'espace expérimental (<i>Vial et Jardy, 1998</i>).	25
Figure 7: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.....	30
Figure 8: Courbe étalon de l'acide galacturonique.	31
Figure 9: Mise en évidence de l'activité pectinolytique extracellulaire chez la souche <i>Aspergillus oryzae</i>	39
Figure 10: Influence des différents types de milieux (submergé, liquide et solide) sur la production de la polygalacturonase par <i>Aspergillus oryzae</i>	40
Figure 11: IC simultanée de Tukey à 95 %	42
Figure 12: Boîte à moustache d'activité	43
Figure 13: IC simultanée de Hsu à 95%	44
Figure 14 Diagramme Pareto des effets normalisés.	50
Figure 15: Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité pectinolytique	54
Figure 16: Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité pectinolytique par rapport à la valeur prédite par le modèle.....	55
Figure 17: Diagramme de surface de pectinase, déchet et humidité.	56
Figure 18: Les valeurs optimales des variables de la réponse déterminées par « RSM ».	57

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneur en pectine de différents fruits et légumes (<i>Chan et al., 2017</i>).	4
Tableau 2 : Classification de pectinase.....	8
Tableau 3 : Origines de la polygalacturonase.	10
Tableau 4: Générateurs des matrices pour N= 4, 8, 12, 16, et 20 essais de PBD	32
Tableau 5: Matrice du PBD pour l'étude de 7 variables avec 8 expériences.	32
Tableau 6: Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du PBD.	33
Tableau 7: Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans	35
Tableau 8: Structure du plan composite centré à 2 facteurs.	36
Tableau 9: Analyse de la variance.....	41
Tableau 10: Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %	42
Tableau 11: Effet des facteurs testés sur la production de la polygalacturonase	46
Tableau 12: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la PG	49
Tableau 13: ANOVA pour le plan PBD.	49
Tableau 14: Valeurs expérimentales (observées) de l'activité spécifique.	51
Tableau 15: Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de la production de la polygalacturonase.	52
Tableau 16: Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité pectinolytique.....	53

Résumé :

Cette étude a pour objectif d'optimiser la production de pectinase par *Aspergillus oryzae* en utilisant des déchets d'oranges comme substrat, à l'aide d'approches statistiques. Après réactivation de la souche, différents modes de fermentation : solide, liquide et submergée sont comparés afin d'évaluer leur impact sur la production enzymatique.

L'optimisation des conditions de culture se déroule en deux phases. Tout d'abord, un plan de Plackett-Burman permet d'identifier les variables influençant significativement la production enzymatique parmi 5 facteurs testés. L'analyse révèle que l'humidité et la concentration en déchets sont les paramètres les plus déterminants. Ces derniers sont ensuite optimisés grâce à la méthode de surface de réponse (Box-Wilson), permettant de définir les conditions optimales suivantes : 84,14 % d'humidité et 4,48 % de concentration en déchets.

La validation du modèle met en évidence une activité enzymatique de 25,742 UI/g, nettement supérieure à celle obtenue dans les conditions initiales. Ces résultats mettent en valeur la pertinence des outils statistiques dans l'optimisation des procédés de fermentation pour la valorisation de déchets agroalimentaires.

Mots-clés : *Aspergillus oryzae*, pectinase, fermentation, déchets d'oranges, Plackett-Burman, Box-Wilson, optimisation.

Abstract:

This study aims to optimize the production of pectinase by *Aspergillus oryzae* using orange waste as a substrate, through the application of statistical approaches. After reactivating the fungal strain, different fermentation modes solid-state, liquid, and submerged are compared to assessing their impact on enzyme production.

The optimization of culture conditions is carried out in two phases. First, a Plackett-Burman design is used to identify the variables that significantly influence enzyme production among the five tested factors. The analysis reveals that moisture content and waste concentration are the most critical parameters. These variables are then optimized using the response surface methodology (Box-Wilson), leading to the determination of the following optimal conditions: 84.14% moisture and 4.48% waste concentration.

Model validation demonstrates an enzymatic activity of 25.742 U/g, significantly higher than that obtained under non-optimized conditions. These results highlight the relevance of statistical tools in optimizing fermentation processes for the valorization of agro-industrial waste.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, pectinase, fermentation, orange waste, Plackett-Burman, Box-Wilson, optimization.

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج إنزيم البكتيناز بواسطة *Aspergillus oryzae* باستخدام نفايات البرتقال كركيزة، وذلك من خلال تطبيق منهجيات إحصائية. بعد إعادة تنشيط السلالة الفطرية، تم مقارنة أنماط مختلفة من التخمر – التخمر في الحالة الصلبة، والسائلة، والمغمورة – لتقييم تأثيرها على إنتاج الإنزيم.

تم تنفيذ تحسين ظروف الزراعة على مرحلتين. في المرحلة الأولى، تم استخدام تصميم بلاكيت-بورمان (Plackett-Burman) لتحديد المتغيرات التي تؤثر بشكل كبير على إنتاج الإنزيم من بين خمسة عوامل تم اختبارها. وقد أظهرت التحاليل أن كلاً من نسبة الرطوبة وتركيز النفايات هما العاملان الأكثر تأثيراً. بعد ذلك، تم تحسين هذين العاملين باستخدام منهجية سطح الاستجابة (Box-Wilson)، مما أتاح تحديد الظروف المثلى التالية: رطوبة بنسبة 84.14% وتركيز نفايات بنسبة 4.48%.

أظهرت عملية التحقق من النموذج نشاطاً إنزيمي بلغ 25.742 وحدة/غرام، وهو أعلى بكثير من النشاط المسجل في الظروف غير المحسنة. وتؤكد هذه النتائج على أهمية الأدوات الإحصائية في تحسين عمليات التخمر من أجل تلبية النفايات الزراعية والصناعية.

الكلمات المفتاحية: أسبرجيلوس أوريزا (*Aspergillus oryzae*)، بكتيناز، تخمير، نفايات البرتقال، تصميم بلاكيت-بورمان (Plackett-Burman)، بوكس-ويلسون (Box-Wilson)، تحسين.

A brown scroll graphic with the word "Introduction" written on it. The scroll is horizontal and has a slight curve, with a small circular detail at the top right corner.

Introduction

Introduction

L'étude de l'activité enzymatique chez les micro-organismes connaît un essor important dans le domaine de la biotechnologie, en raison de leur capacité à produire des enzymes d'intérêt industriel. Pour exploiter ce potentiel, il est nécessaire de mettre en place des systèmes de production à la fois efficaces et économiquement viables. Cela passe par une sélection adaptée des souches, l'optimisation des conditions de culture, ainsi que l'emploi de méthodes de purification performantes. Une fois obtenues, les enzymes doivent faire l'objet d'une évaluation rigoureuse afin de vérifier leur spécificité et leur efficacité dans différents contextes d'utilisation (*Bhatt, 2023*).

Parmi les enzymes les plus sollicitées figurent les hydrolases, notamment l' α -amylase, la cellulase et les pectinases. Ces dernières, aussi appelées enzymes pectinolitiques, sont essentielles à la dégradation des pectines végétales et représentent environ 25 % du marché mondial des enzymes alimentaires (*Ruiz et al., 2017*). Le marché des enzymes industrielles, évalué à 4,6 milliards de dollars en 2016, affiche une croissance annuelle prévue de 5,8 % sur la période 2017–2022 (*Industrial Enzyme Market, 2017*). Il est dominé par des entreprises telles que Novozymes (Danemark), Novartis (Suisse), Roche (Allemagne) et Biocon (Inde). À l'inverse, ce secteur reste encore sous-développé en Algérie.

Les pectinases d'origine microbienne suscitent un intérêt croissant du fait de leurs applications variées dans l'agroalimentaire, le textile ou la papeterie. Elles comptent parmi les biocatalyseurs les plus prisés à l'échelle commerciale (*Oumer, 2017*).

Le champignon *Aspergillus oryzae*, filamenteux et multicellulaire, est largement utilisé en biotechnologie, notamment dans la production de denrées fermentées telles que le miso, la sauce soja ou le vinaigre. Cette utilisation repose sur sa capacité à sécréter des enzymes comme les amylases et les protéases, qui permettent la conversion des composés complexes en molécules simples (*Watarai et al., 2019*).

Sa culture peut s'effectuer en fermentation en milieu solide (SSF) ou submergé (SmF). La SSF présente plusieurs atouts : simplicité de mise en œuvre, faible coût et rendements souvent supérieurs (*De Castro et al., 2014*). Elle offre en outre la possibilité de valoriser des résidus agroalimentaires (épluchures de fruits, pulpes, etc.) comme substrats pour la production de polygalacturonases (PG) (EC 3.2.1.67).

Chapitre 1

Enzymes pectinolitiques

1. Enzymes glycolytiques

1.1 Substrats pectiques

Les composés pectiques sont des hétéropolysaccharides structuraux majeurs localisés dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales. Ces macromolécules sont dépolymérisées par les enzymes pectinolytiques, principalement les pectinases, qui catalysent la rupture des liaisons glycosidiques, libérant ainsi des oligomères et monomères utilisables dans divers procédés biotechnologiques et industriels (*Anand et al., 2020*).

- Les pectines dont le degré d'estérification (DE) est supérieur à 50 % sont qualifiées de hautement méthylées (HM).
- Les pectines dont le degré d'estérification (DE) est inférieur à 50 % sont qualifiées de faiblement méthylées (FM) (*Bermúdez et al., 2018*).

1.2 Source de la pectine

Bien que la pectine soit présente dans de nombreuses espèces végétales, les pelures et les graines de certains fruits, tels que les pommes, les poires et les agrumes, constituent des sources particulièrement riches en pectine (Tableau 1) (*Chan et al., 2017*).

Tableau 1 : Teneur en pectine de différents fruits et légumes (*Chan et al., 2017*).

Fruits/Légumes	Teneur en pectine en %	Références
Marc de pomme	4.60-20.92	(<i>Bockki et al., 2011</i>)
Ecorce Orange	10.90- 24.80	(<i>Kaya et al., 2014</i>) ; (<i>Koubala et al., 2008</i>) ; (<i>Venzon et al., 2015</i>)
Écorce de pamplemousse	21.60 - 28.00	
Écorce de citron	20.90 - 30.60	
Peaux de banane	2.40-21.70	(<i>Oliveira et al., 2015</i>)
Pelures de carottes	8.90-9.10	(<i>Christiaens et al., 2015</i>)
Écorce de tomate	14.90- 83.50	(<i>Grassino et al., 2016</i>)
Écorce de pastèque	13.01- 25.79	(<i>PrakashMaran et al., 2014</i>)

1.3 Structure de la pectine

Les substances pectiques constituent une famille de polysaccharides complexes principalement composés d'acide galacturonique, associés à divers monosaccharides tels que le rhamnose, l'arabinose, la xylose et le galactose. Sur le plan structural, elles sont classées en trois principales catégories : l'homogalacturonane, le rhamnogalacturonane I et le rhamnogalacturonane II (figure1) (*Lu et al., 2016*).

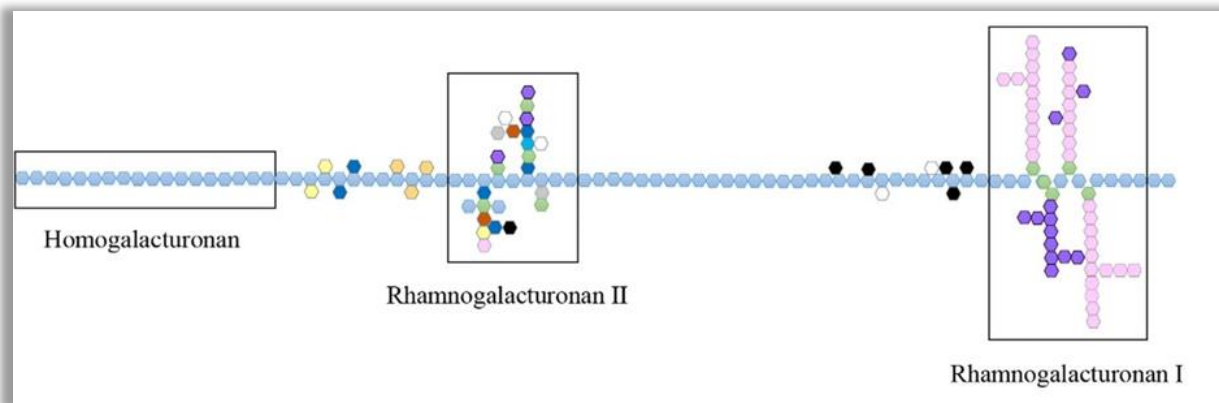


Figure 1: Structure et composition de la pectine (*Zheng et al., 2021*).

- **Homogalacturonane**

L'homogalacturonane (HG) est un polymère linéaire d'acide galacturonique, lié en α -1,4. Son principal paramètre structural est le degré d'estérification (DE), qui correspond à la proportion de groupements carboxyles estérifiés par des alcools, notamment le méthanol (*Doan et al., 2021*).

- **Rhamnogalacturonane I**

Le rhamnogalacturonane I est un polysaccharide ramifié constitué d'acide galacturonique et de rhamnose, portant des chaînes latérales de sucres neutres (arabinan, galactan, arabinogalactane), qui lui confèrent une structure « chevelue » (*Kaczmarzka et al., 2022*).

- **Rhamnogalacturonan II**

Le rhamnogalacturonane II est un polysaccharide complexe composé d'un noyau de disaccharides répétitifs, constitué d'acide galacturonique en liaison α -1,4 et de rhamnose en liaison α -1,2. Ce polymère est également fortement ramifié par des résidus d'arabinan, de galactan et d'apiofuranosyl (*Mao et al., 2019*).

Dans la nature, il existe quatre formes de pectines (*Atta et Larrea, 2022*) :

- **Les protopectines** : La protopectine est une substance insoluble présente dans les parois des plantes. Elle se transforme en pectine et en acides pectiques lors de l'hydrolyse.
- **Les acides pectiniques** : Ce sont des acides polygalacturoniques contenant des unités méthylées.
- **Les pectinates** : Ce sont des composés salins résultant de la neutralisation de l'acide pectinique.
- **Les acides pectiques** : Ce sont des acides polygalacturoniques solubles, caractérisés par une faible teneur en groupes méthoxyle.

2. Enzymes pectinolytiques

2.1 Classification

Les pectinases, des groupes hétérogènes d'enzymes capables d'hydrolyser la pectine, sont utilisées dans diverses applications commerciales, principalement dans l'industrie agroalimentaire pour la clarification des jus de fruits. Elles sont classées selon leur substrat, leur mécanisme de dégradation (hydrolyse ou trans-élimination), et leur mode de clivage (endo ou exo). Les enzymes pectinolytiques ciblent spécifiquement la fraction galacturonique des substances pectiques. Divers micro-organismes, notamment des

champignons filamenteux comme *Aspergillus oryzae*, sont capables de produire des pectinases (tableau 2) (*Abdollahzadeh et al., 2020*).

Les enzymes pectinases, selon leur mode d'action sur le substrat, se répartissent en trois catégories : les protopectinases, les pectinestérases et les dépolymérase (hydrolases et transéliminases).

- **Protopectinase** : Ce type de pectinase, généralement présent dans les fruits non mûrs, convertit la protopectine insoluble en pectine soluble (*Patidar et al. 2018*).
- **Pectinestérase** : est une carboxylestérase, Elle catalyse la déstérification des liaisons méthyl-esters de la structure du galacturonane dans la pectine (*Garg et al., 2016*).
- **Dépolymérase** : Cette catégorie comprend à la fois des enzymes hydrolytiques et des enzymes de rupture (*Oumer, 2017*).

Tableau 2 : Classification de pectinase.

(Saharan et al.,2019 ; Patidar et al., 2018 ; Oumer, 2017).

Classe	Sous-classe	Type enzymatique	Mécanisme d'action	Numéro EC
Pectine estérases	-	Pectine méthylestérase (PME)	Hydrolyse	EC 3.1.1.11
Hydrolases	Endo-polygalacturonase (endo-PG)	Poly(1,4- α -D-galacturonide) glycanohydrolase	Hydrolyse	EC 3.2.1.15
	Exo-polygalacturonase (exo-PG)	Exo-poly(1,4- α -D-galacturonide) hydrolase	Hydrolyse	EC 3.2.1.67
	Polyméthylgalacturonase (PMG)	Agit sur pectine méthylée	Hydrolyse	-
Lyases	Pectate lyase (endo/exo-PGL)	Clive acide pectique par β -élimination	Trans élimination	EC 4.2.2.2 / 4.2.2.9
	Pectine lyase (endo/exo-PMGL)	Clive pectine méthylée	Trans élimination	EC 4.2.2.10
Protopectinases	Type A (interne) / Type B (externe)	Libèrent la pectine à partir du protopectine	Hydrolyse	-

2.1.1 Enzymes désesterifiantes

La pectinestérase (PE, E.C. 3.1.1.11) est une hydrolase de la famille des estérases des acides carboxyliques, connue sous différents noms comme pectin méthylestérase. Elle catalyse l'hydrolyse des groupes méthyles sur la pectine. La pectinestérase fongique élimine les groupes méthyles de manière aléatoire, tandis que celle des plantes suit un mécanisme plus spécifique, agissant près d'un groupe carboxyle libre ou à l'extrémité non réductrice de la molécule (Patidar et al., 2018).

2.1.2 Enzymes dépolymérisantes

Les dépolymérase sont des hydrolases, incluant les polygalacturonases (PG) et les lyases, qui dégradent les pectines et pectates. Elles se divisent en quatre catégories : PG, PMG, polygalacturonate lyases (PGL) et polyméthylgalacturonate lyases (PMGL), en fonction du substrat et du mécanisme de clivage. Les PG et PMG hydrolysent les pectates et pectines, tandis que les PGL et PMGL les dégradent par β -élimination. Ces enzymes peuvent être endo- ou exo-dépolymérase, selon le site de clivage de la chaîne (*Atta et Larrea, 2022*).

2.1.2.1 Polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) sont des enzymes de la famille des hydrolases glycosylées 28. Elles coupent les liaisons α -1,4 entre les résidus d'acide galacturonique. On les trouve chez les plantes supérieures et les micro-organismes (*Nakamura et Iwai, 2019*).

Elles se divisent en deux types (*Atta et Larrea, 2022*) :

- **Endo-PG (E.C. 3.2.1.15)** : aussi appelée poly(1,4- α -D-galacturonide) glycanohydrolase. Elle coupe les liaisons α -1,4 de façon aléatoire dans l'acide pectique
- **Exo-PG (E.C. 3.2.1.67)** : aussi appelée poly(1,4- α -D-galacturonide) galacturonohydrolase. Elle coupe les liaisons α -1,4 de manière séquentielle, à partir des extrémités

2.1.2.2 Origine des polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) sont produites par une variété d'organismes, notamment les plantes, les bactéries et les champignons (tableau 3) (*Gautam et al., 2017*) :

Tableau 3 : Origines de la polygalacturonase.

Enzyme	Origines	Références
Polygalacturonase	Végétale	
	Fruits rouges	(Amid et al., 2014).
	Avocat	(Wakabayashi et Huber, 2001).
	Mangue	(Singh et Dwivedi, 2008).
	Animale	
	Sitophilusoryzae	(Shen et al., 2003).
	Meloidogyneincognita	(Jaubert et al., 2002).
	Ditylenchusdipsaci	(Barker et al., 1996).
	Fongique	
	<i>Aspergillus niger</i> IBT-7	(Abdullah et al., 2018).
	<i>Rhizopus</i> sp	(Mrudula et Anitharaj, 2011).
	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Buyukkileci et al., 2010).
	Bactérienne	
	<i>Streptomyces lydicus</i>	(Jacob et al., 2008).
	<i>Chryseobacteriumindologenes</i>	(Roy et al., 2018).
	<i>Erwiniasp</i>	(Mehta et al., 2013).
	Levurienne	
	<i>Candida sake</i>	(Buzzini et Martini, 2002).
	<i>Rhodotorula glutinis</i> MP-10	(Taskin, 2013).
	<i>Wickerhanomycesanomalu</i>	(Martos et al., 2013).

2.1.2.3 Structure de la polygalacturonase

De nombreux synonymes des feuilletts bêta de cette enzyme prennent une forme hélicoïdale, appelée bêta-hélice. Cette structure hautement stable, due aux nombreux ponts hydrogène et aux fibres entre les liaisons disulfures, est une caractéristique commune des enzymes impliquées dans la dégradation de la pectine.

L'intérieur de la bêta-hélice est hydrophobe. La cristallographie aux rayons X a été utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle (3D) des PG chez *Fusarium moniliforme*.

Le site actif de la PG de *Fusarium moniliforme* comprend six résidus d'acides aminés chargés : H188, R267 et K269, impliqués dans la liaison au substrat ; D212, responsable du don de proton à l'oxygène glycosidique ; et D213 et D191, qui activent H₂O pour une attaque nucléophile (figure 2) (*Radha et al.,2019*).

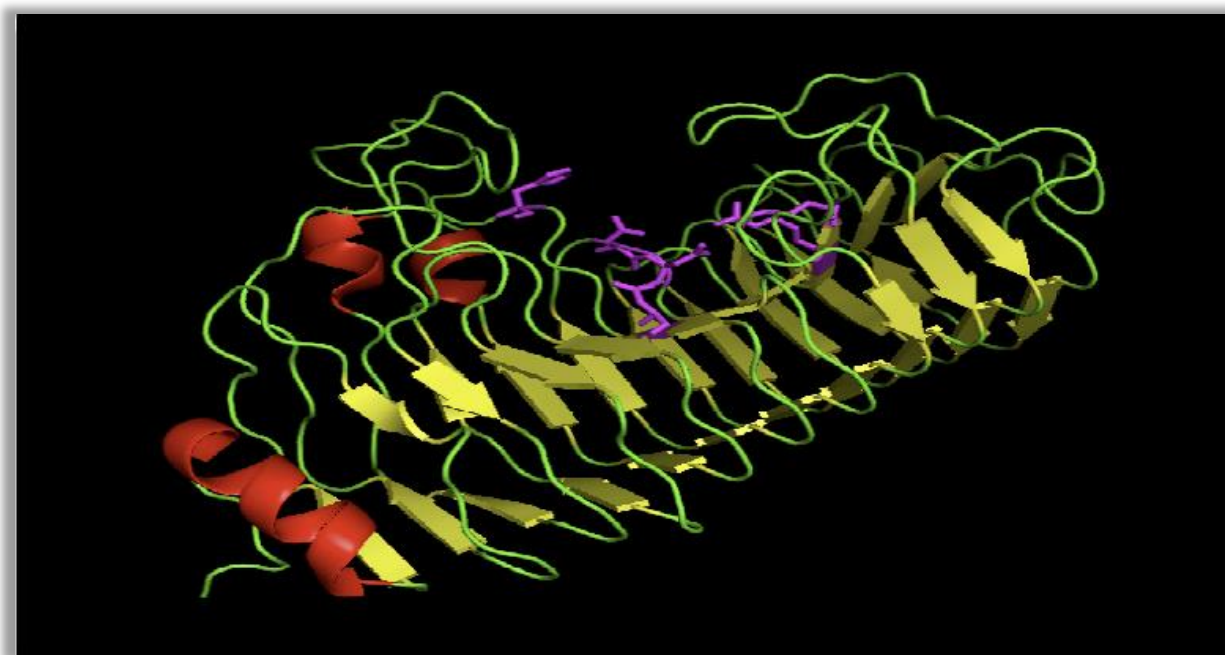


Figure 2 : Structure cristalline de la polygalacturonase (*Radha et al.,2019*).

2.1.2.4 Mode d'action de la polygalacturonase

Les polygalacturonases exercent leur action enzymatique principalement par hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,4 entre les résidus d'acide galacturonique dans la chaîne de polygalacturonase. Deux grands types de mécanismes sont observés selon la classe

de l'enzyme. Les endo-polygalacturonases agissent de manière aléatoire à l'intérieur de la chaîne, provoquant une chute rapide de la viscosité du substrat. Certaines endo-PG peuvent adopter un mécanisme multi-chaîne, où l'enzyme hydrolyse plusieurs chaînes à la fois, retardant l'accumulation des petits fragments de dégradation. Les exo-polygalacturonases, quant à elles, agissent de manière séquentielle depuis les extrémités non réductrices de la chaîne. Certaines exo-PG présentent un mode d'action processif, ce qui signifie qu'elles restent fixées au substrat et effectuent plusieurs coupures successives sans se détacher, libérant des unités d'acide galacturonique de façon continue. Ces mécanismes varient selon l'origine microbienne de l'enzyme, son environnement et le degré de méthylation du substrat (Figure 3) (Atta et Larrea, 2022).

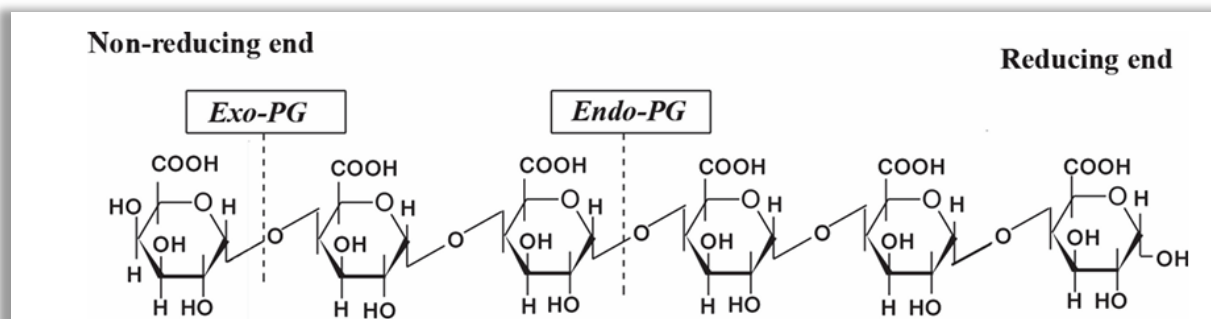


Figure 3 : Sites d'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1→4) catalysées par les enzymes polygalacturonases.

2.1.2.5 Production de polygalacturonase

Les PGases sont produites principalement par fermentation submergée (SMF) grâce à un contrôle précis des paramètres comme le pH, la température, l'aération et l'humidité (Gangadharan et al., 2008). Cependant, la fermentation en milieu solide (SSF) suscite un intérêt croissant, utilisant divers substrats tels que les résidus agro-industriels (épluchures d'agrumes, pulpe de betterave, son de blé, etc.), qui offrent des nutriments essentiels à la croissance microbienne et à la production enzymatique (Handa et al., 2016). Les PGases issues de différentes sources varient par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action. La thermostabilité est un critère clé. Les exo-PGases ont une masse moléculaire de 30 à 50 kDa et un pH optimal de 4 à 6, tandis que les endo-PGases glycosylées sont plus grandes (50 à 80 kDa) avec un pH optimal entre 3,8 et 7,6 (Sharma et al., 2019).

2.1.2.6 Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase

Les micro-organismes sont couramment exploités pour la production de polygalacturonases (PG) en fermentation submergée, car ce procédé permet un contrôle précis des paramètres influençant leur production, tels que le pH, la température, l'aération et l'humidité (*Gangadharan et al., 2008*).

Cependant, ces dernières années, un nombre croissant d'études se sont intéressées à la production d'enzymes par fermentation en milieu solide (FMS). (*Handa et al., 2016*)

- **pH**

Les enzymes présentent une grande sensibilité aux variations de pH et n'agissent efficacement que dans une plage de pH restreinte (*Boudoukha , 2018*). L'activité enzymatique atteint généralement son optimum autour d'un pH de 5 (*Fenghour et al., 2002*). Le pH initial optimal pour la production de PGase est de 4,5 chez *Aureobasidium pullulans* LV 10 et de 4 chez *Aspergillus fumigatus* (*Manachini et al., 1988 ; Sandri et al., 2015*). En revanche, le pH optimal pour la production de PG par *Penicillium citrinum* est de 5 (*Ramachandran, 2005*), tandis qu'un pH optimal de 5,5 a été rapporté pour l'exo-PG produite par *Aspergillus niger* (*Gomes et al., 2011*), et un pH optimal de 5 produite par *Aspergillus oryzae* RR103 (*Kumar et al., 2011 ; Ma et al., 2016*).

- **La température**

La température joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité enzymatique. Les propriétés intrinsèques des protéines, telles que les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les forces ioniques, contribuent à leur résistance à la dénaturation thermique. En général, les températures optimales pour l'activité des polygalacturonases se situent entre 40 et 50 °C (*Favela-Torres et al., 2006 ; Nazir et al., 2019*). En effet, (*Gomes et al., 2011*) ont rapporté une température optimale de 37 °C, tandis que (*Kumar et al., 2011*) ont indiqué une valeur de 30 °C, et d'après (*Ketipally et Ram, 2018*) la production optimale de polygalacturonase par *Aspergillus oryzae* RR103 a été obtenue à une température d'incubation de 35 °C.

- **Thermostabilité**

Les enzymes d'origine naturelle sont rarement utilisées en raison de leur faible stabilité dans les conditions opérationnelles exigées. Elles ont donc été remplacées par des enzymes issues de micro-organismes thermophiles, qui présentent une stabilité thermique supérieure à celle de leurs homologues mésophiles. Parmi les enzymes les plus couramment produites par ces micro-organismes, on peut citer les pectinases (**Rigoldi et al., 2018**).

Dans le cas de la polygalacturonase, les champignons constituent une source privilégiée pour la production de PG thermostables à haut rendement. À ce jour, plusieurs PGases thermophiles ont été identifiées chez *Rhizomucor pusillus*, *Thermoascus aurantiacus* et *Thermomyces lanuginosus*. Ces enzymes se caractérisent généralement par des températures optimales élevées, comprises entre 55 et 65 °C, ainsi qu'une bonne stabilité thermique autour de 50 °C (**Cheng et al., 2016**).

- **Effet des ions**

Les ions métalliques influencent la stabilité et l'activité des enzymes en formant des complexes ou en agissant comme cofacteurs. Dans le cas des pectinases, leur effet est souvent évalué directement dans le système enzyme-substrat (**Zhao, 2005 ; Oliyad et Dawit., 2017**). (**Asghar et al., 2013**) ont montré que les ions Cu^{2+} et Al^{3+} inhibent la polygalacturonase de *Bacillus licheniformis*. En revanche, (**Anand et al., 2016**) ont observé que Cu^{2+} et K^{+} stimulent l'enzyme produite par *Aspergillus fumigatus*, tandis que Ag^{2+} , Ca^{2+} et Hg^{2+} l'inhibent.

3. Applications industrielles des pectinases

Les pectinases sont des enzymes polyvalentes utilisées dans divers secteurs industriels en raison de leur capacité à dégrader la pectine et d'autres composants de la paroi cellulaire. Dans l'industrie textile, elles améliorent l'absorption et la blancheur des fibres tout en préservant leur intégrité (figure 4) (**Sonia et al., 2009**).

3.1 Clarification du jus de fruit

La dégradation des substances responsables du trouble pectique permet une filtration et un traitement plus faciles du jus (**Maria et al., 2021**).

3.2 Extraction de jus et d'huile

Pour faciliter l'extraction du jus et de l'huile à partir de la pulpe de fruit lors du pressage (*Mwaurah et al., 2020*).

3.3 Fermentation du café et du thé

Pour éliminer la couche de mucilage des grains de café, améliorer la fermentation du thé et optimiser sa capacité à former de la mousse (*Samanta et al., 2021*).

3.4 Macération

Pour dégrader les tissus des fruits et légumes afin de produire des produits pulpeux servant de base aux jus, aux nectars, ainsi qu'aux aliments pour bébés, aux puddings et aux yaourts (*Samanta, 2021*).

3.5 Industrie pharmaceutique

Les pectinases comptent parmi les enzymes industrielles les plus importantes, avec des applications significatives dans le domaine pharmaceutique. Elles interviennent notamment dans la préparation de fibres alimentaires ou nutritionnelles, l'extraction d'huiles essentielles, la formulation de comprimés, ainsi que dans des produits destinés à la régulation de la glycémie et du cholestérol, sans oublier leur utilisation en cosmétique (*Edwards et al., 2011 ; Sharma et al., 2023*).

3.6 Production de biocarburants

Bien que les biocarburants issus de la biomasse lignocellulosique soient considérés comme une source d'énergie renouvelable prometteuse, la résistance naturelle de cette biomasse à la dégradation constitue un frein majeur à leur production. Afin d'optimiser les rendements en bioéthanol, l'une des approches consiste à renforcer l'efficacité de conversion des parois cellulaires des plantes (*Jordan et al., 2012*).

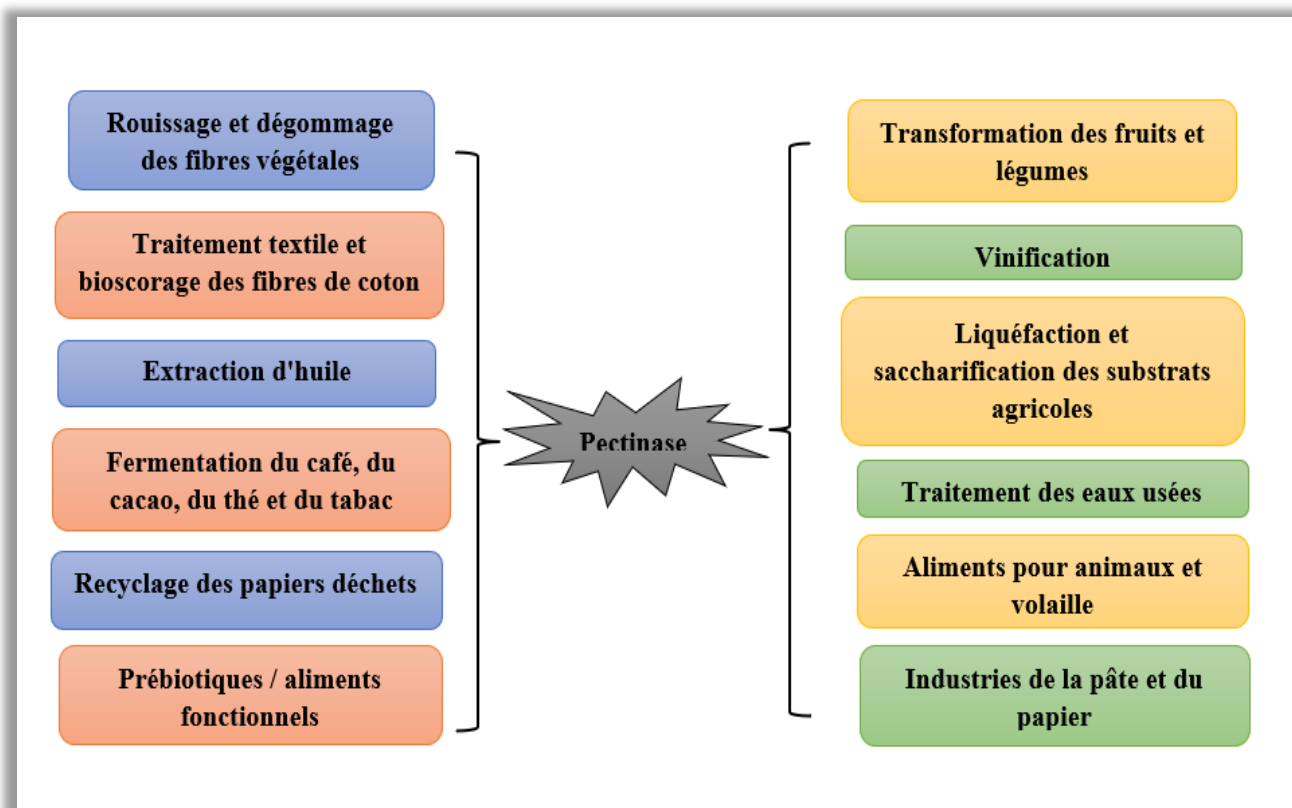


Figure 4 : Applications diverses des pectinases (*Anand et al., 2020*)

Chapitre 2

Champignons

1. Champignons

1.1 Champignons filamenteux

Les champignons filamenteux ou les eumycètes sont des microorganismes dépourvus de chlorophylle qui se nourrissent en absorbant et en exploitant la matière organique (source de carbone) produite par d'autres organismes autotrophes (hétérotrophe) (*Dufresne, 2018*). Ces êtres sont des thallophytes qui ne possèdent pas d'organes végétatifs apparents : ils n'ont ni tige, ni feuilles, ni racines. Le polycaryon hyphe se répand par l'expansion et le divisionnement de la pointe, processus qui se poursuit avec une ramification continue et des fusions pour constituer un mycélium interconnecté (*kachour, 2005*).

1.2 Classification classique des champignons

La classification des champignons a évolué au fil du temps, reposant sur divers critères tels que leur morphologie, leurs caractéristiques phénotypiques (aspects morphologiques et biochimiques), ainsi que leur habitat, leur répartition géographique et leur mode de vie (*Mesfek, 2014*). Parmi les principales classifications adoptées, les champignons sont regroupés en quatre grandes classes (*Sylvie, 2015*) :

- **Phycomycètes** : Groupe très hétérogène, divisé en six sous-classes distinctes par les taxonomistes. Ces champignons possèdent un mycélium généralement cénocytique (non cloisonné).
- **Ascomycètes** : Champignons dits parfaits, caractérisés par un mycélium bien développé et cloisonné, produisant des spores spécifiques appelées ascospores.
- **Basidiomycètes** : Autre groupe de champignons parfaits, reconnaissables à la production de basidiospores situées à l'extrémité ou sur le côté d'une structure nommée baside.
- **Deutéromycètes** : Catégorie temporaire regroupant les champignons imparfaits, en attendant l'identification de leur phase de reproduction sexuée.

2. Genre *Aspergillus*

2.1 Définition et caractéristiques générales

En 1729, Michelli attribua le nom *Aspergillus* aux moisissures qu'il observa au microscope, en raison de leur ressemblance frappante avec le goupillon (« *Aspergillus* » en latin) utilisé lors des cérémonies religieuses (*Balajee et al., 2006*). Ces champignons cosmopolites sont largement répandus dans l'environnement et présentent un caractère ubiquiste. Ils se développent aussi bien en milieu rural (silos à grains, foin, paille humide, céréales ou fruits moisis, matières organiques en décomposition) qu'en milieu urbain (*Biofarma, 2002*). Bien qu'ils soient présents à travers le monde, ils sont plus fréquemment associés aux régions au climat chaud (*Castegnaro et Pfohl-Leskiewicz, 2002*).

Selon la classification systématique du vivant, les *Aspergillus* appartiennent au règne des *Fungi*, au phylum des *Ascomycota*, à l'ordre des *Eurotiales* et à la famille des *Aspergillaceae* (*Kosmidis et al., 2015*). Ils se développent sur une grande variété de substrats, tels que la matière organique en décomposition, le sol, le compost, les fruits secs, les arachides et les céréales. De nombreuses espèces colonisent également les environnements intérieurs, notamment la poussière et l'air (*Aleksic et al., 2016*).

Outre leur présence naturelle, certaines espèces d'*Aspergillus* jouent un rôle clé dans l'industrie, notamment pour la production d'enzymes spécifiques ou la fabrication d'aliments fermentés comme la sauce soja et le saké (*Bennett et al., 2010 ; Kaya-Celiker et al., 2015*).

3. Espèce *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae, plus connu sous le nom de « moisissure Koji », joue un rôle fondamental dans la fermentation de nombreux aliments traditionnels de la cuisine d'Asie de l'Est (*Liu et al., 2024 ; Yamashita, 2021*). Cette espèce appartient au genre des champignons filamenteux *Aspergillus* (voir Figure 5 pour la classification taxonomique), lequel regroupe des espèces aux usages variés : certaines sont bénéfiques pour l'homme, tandis que d'autres peuvent être pathogènes ou produire des substances toxiques. Les espèces du genre *Aspergillus* se reproduisent généralement par des voies sexuée et asexuée (*Asgarivessal et al., 2023 ; Ojeda-López et al., 2018*). Toutefois, *A. oryzae* se distingue par une reproduction principalement asexuée (*Wada et al., 2012*). La structure du conidiophore, visible dans la Figure 5 illustrant la morphologie d'*Aspergillus*, joue un rôle clé dans la

classification taxonomique de ce genre fongique, car elle porte les spores asexuées (*Suleiman, 2023*). Sur les quelque 400 espèces connues d'*Aspergillus* (*Ibrahim et al., 2023*), *A. flavus* et *A. parasiticus* figurent parmi les plus notoires en raison de leur capacité à produire des mycotoxines (*Ting et al., 2020 ; Priesterjahn et al., 2020*).

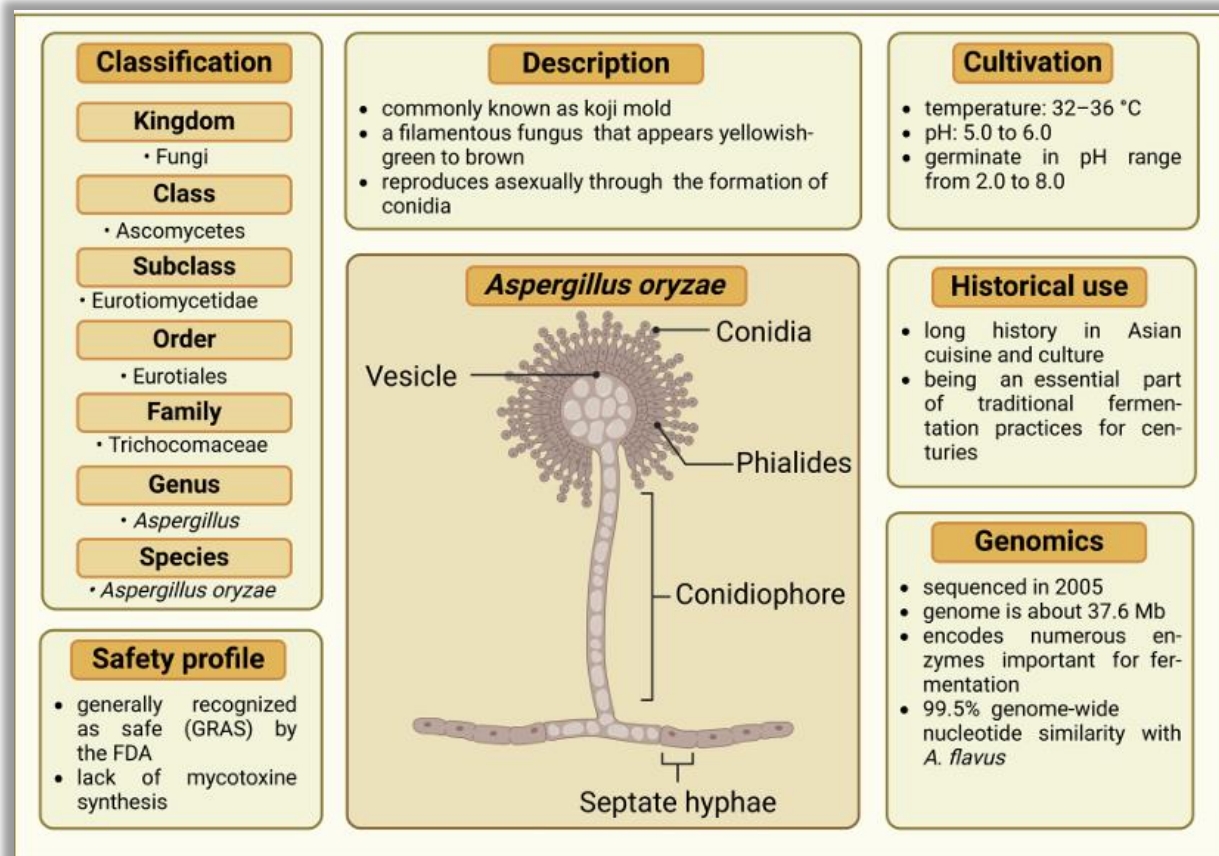


Figure 5: Vue d'ensemble détaillée d'*Aspergillus oryzae*. L'illustration centrale met en évidence Les structures morphologiques caractéristiques du champignon, telles que les vésicules, conidies, phialides, conidiophores et hyphes septés. Autour de cette représentation figurent les principaux éléments liés à l'espèce, notamment sa classification taxonomique, son innocuité, sa description morphologique, ses conditions de culture, ses usages traditionnels ainsi que ses caractéristiques génomiques. Illustration réalisée avec BioRender. (*Seidler, 2024*).

Chapitre 3

Méthodes d'optimisation

1.Introduction à l'optimisation en biotechnologie

Le processus d'optimisation revêt une importance capitale pour la production industrielle d'enzymes, en particulier lorsqu'il s'agit de surproduction. Dans ce contexte, la modification des milieux de culture constitue une alternative plus accessible et efficace que les manipulations génétiques (*Reddy et al., 2008*). L'optimisation vise à améliorer les processus biochimiques afin d'obtenir un produit fiable, tout en réduisant les coûts et en respectant les normes environnementales. Pour cela, il est essentiel de concevoir des conditions de production adaptées, notamment en ajustant le type de milieu, la température, le pH et le temps d'incubation, afin d'augmenter la productivité et l'efficacité des métabolites microbiens bioactifs obtenus par fermentation (*Naddem et Dimesh, 2016*). Divers plans d'expériences sont couramment utilisés dans ce cadre, notamment pour la production de métabolites tels que les enzymes (*Hamma et Saoudi, 2016*).

1.1 Objectif de l'optimisation enzymatique

L'optimisation vise à identifier les valeurs optimales des variables d'entrée d'un processus afin d'obtenir la sortie souhaitée. Elle peut avoir pour but d'augmenter le rendement, de réduire le temps de traitement nécessaire à la fabrication d'un produit ou encore d'atteindre des caractéristiques précises du produit final (*DAAS M S ; 2020*).

2.Introduction aux plans d'expériences statistiques

Le terme « plans d'expériences » est la traduction de l'anglais *Design of Experiments*, signifiant littéralement « conception des expériences ». Selon *Chekroune (2008)*, ils représentent « un essai technologique d'utilisation maximale des données ». Les plans d'expériences constituent une méthode structurée de planification expérimentale, visant à obtenir des conclusions fiables et pertinentes de manière efficace et économique. Cette approche repose sur l'idée qu'une expérimentation soigneusement conçue permet une analyse statistique claire et une interprétation aisée des résultats (*Belkadi et Makked, 2016*).

2.1 Objectifs d'utilisation des plans d'expériences

Il existe généralement de nombreux facteurs susceptibles d'influencer une réponse, certains ayant un impact critique, tandis que d'autres n'en ont que très peu, voire aucun. Dans cette optique, il peut être judicieux de réduire ce nombre à un ensemble restreint (environ 2 à 5 facteurs), afin de concentrer les efforts sur leur maîtrise. Les plans d'expériences de criblage

constituent une méthode efficace permettant, avec un nombre limité d'essais, d'identifier les facteurs les plus influents (*DAAS M S ; 2020*).

2.2 OFAT (One Factor at a Time)

L'approche OFAT (One Factor At a Time) consiste à faire varier un seul facteur à la fois, en maintenant les autres constants, afin d'identifier les causes critiques d'un effet. Bien qu'elle repose principalement sur le test d'hypothèse (Web 2), cette méthode est longue, coûteuse, incapable de détecter l'optimum global et ne prend pas en compte les interactions entre facteurs (*Hajji et al., 2008 ; Kammoun et al., 2008*). Les facteurs étudiés peuvent être des paramètres physiques ou nutritionnels influençant la croissance des micro-organismes et leur rendement enzymatique (*Bhardwaj et al., 2019*).

2.3 Plan de Plackett et Burman (1946)

La méthode de Plackett-Burman constitue une approche de criblage particulièrement efficace pour identifier les facteurs significatifs parmi un grand nombre de variables susceptibles d'influencer un processus, tout en requérant un nombre limité d'essais expérimentaux (*Edulis et al., 2020*).

Les plans de Plackett-Burman, également appelés plans multifactoriels, ont été introduits en 1946 (*Benoist et al., 1994*). Il s'agit de plans factoriels fractionnaires à deux niveaux, disponibles pour un nombre d'essais égal à 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, etc., soit tout multiple de 4. La conception Plackett-Burman suit la formule $k = N - 1$, où k représente le nombre de variables étudiées et N le nombre total d'expériences.

Ces plans sont particulièrement utiles lorsque le nombre de variables est élevé, car ils permettent d'identifier rapidement les facteurs les plus significatifs en vue d'expérimentations ultérieures. Dans ce type de conception, seuls les effets principaux sont considérés, les interactions entre facteurs n'étant pas prises en compte. Cela en fait une approche économique et largement utilisée pour des études de criblage.

Contrairement aux plans factoriels classiques, les points expérimentaux d'un plan Plackett-Burman ne peuvent pas être représentés sous forme géométrique régulière (comme

un cube). Pour cette raison, ces plans sont qualifiés de non géométriques, non réguliers, et sont considérés comme des plans orthogonaux (*Panda et al., 2016*). Dans certains cas, notamment pour $N=12,20,24,28$ ou $N=12,20,24,28$ ou 36, ces conceptions sont particulièrement avantageuses, car elles comblent les lacunes laissées par les plans standards (*Dutta, 2016*).

2.4 Plan de Box et Wilson

Chaque microorganisme possède des conditions spécifiques optimales pour la production maximale d'un métabolite donné. Il est donc essentiel d'optimiser la composition du milieu de culture afin de maintenir un équilibre entre les différents constituants, ce qui permet de minimiser la quantité de substances inutilisées à la fin du processus de fermentation (*Naddem et Dimesh, 2016*).

Le plan composite centré (PCC) constitue un outil expérimental performant, permettant d'identifier les facteurs influents, d'étudier leurs interactions et de déterminer les conditions optimales dans un système à variables multiples (figure 6). Ce type de plan a été largement utilisé pour optimiser la production de diverses enzymes, comme le rapportent plusieurs études :

- Production de polygalacturonase par *Aureobasidium pullulans* (*Bennamoun, 2017*),
- Production de protéase par *Aspergillus oryzae* (*Benkahoul et al., 2017*),
- Production d'amylopullulanase par *Clavispora lusitaniae* ABS7 (*Dakhmouche, 2016*).

Initialement introduit par Box et Wilson en 1951, le plan composite centré est conçu pour déterminer les niveaux optimaux des variables influentes en vue de maximiser la réponse du système étudié. Il est structuré en trois composantes principales permettant de générer un nombre total d'essais égal à $2^k + 2k + N$, où k est le nombre de facteurs étudiés et N le nombre de répétitions au centre du plan.

Ces composantes sont :

- Un plan factoriel complet à deux niveaux (-1, +1), basé sur k facteurs ;

- $2k2k$ points axiaux (ou en étoiles), situés aux niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$, où la valeur de α dépend du nombre de facteurs ;
- N répétitions au point central (niveau 0), destinées à estimer l'erreur expérimentale et la courbure de la réponse.

Ce type de plan permet ainsi une exploration efficace de l'espace expérimental et une optimisation fine des paramètres du système.

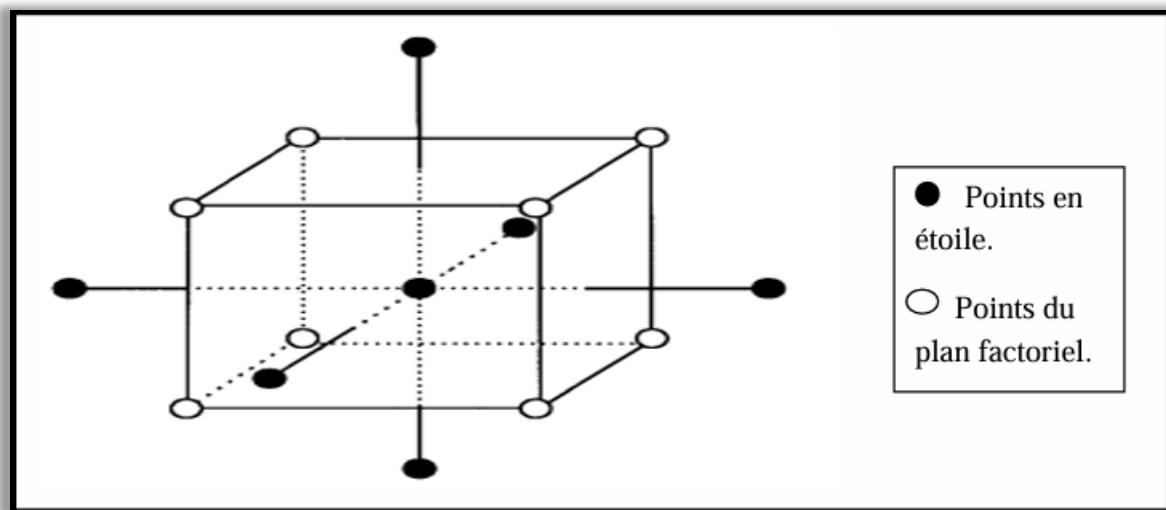


Figure 6 Représentation tridimensionnelle d'un plan composite centré complet impliquant trois facteurs expérimentaux, illustrant la disposition des points factoriels, axiaux et centraux dans l'espace expérimental (*Vial et Jardy, 1998*).

Matériels et Méthodes

Ce travail est réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Il a pour objectif de déterminer les conditions de culture les plus favorables à la production d'une pectinase d'intérêt industriel, et d'optimiser cette production en utilisant des méthodes statistiques.

1. Matériel biologique

1.1 Souche fongique

La souche fongique *Aspergillus oryzae* utilisée dans cette étude, a été fournie par l'Institut Pasteur Paris, (France).

1.2 Réactivation de la souche fongique *Aspergillus oryzae*

La réactivation des souches est réalisée sur un milieu PDA (Annexe 1), ensemencé dans des boîtes de Pétri et des erlenmeyers. L'inoculation est effectuée en déposant la souche au centre du milieu à l'aide d'une anse de platine, dans des conditions aseptiques. Les boîtes de Pétri et les erlenmeyers sont ensuite incubés à 30 °C pendant une durée de 3 jours.

2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique extracellulaire d'*Aspergillus oryzae*

La mise en évidence de l'activité pectinolytique s'effectue sur un milieu contenant de la pectine. La composition de ce milieu est indiquée en annexe 4. Après la croissance des cellules, les boîtes sont recouvertes de la solution d'eau iodée (Lugol) (Annex 5). L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine.

2.1. Substrat de fermentation

Le milieu de base est préparé à partir de déchets d'oranges industrielles composés de pulpes et de peau. Ils obtenus de la production de jus d'oranges SIJUCO (Skikda, Algérie) compagne de février 2025. Le substrat récupéré humide séché à l'air libre, puis réduit en poudre à l'aide d'un broyeur et d'un tamis (tamis AFNOR, ouverture 0,63mm et 2 mm). Le substrat ainsi obtenu est conservé dans des sacs en plastiques à température ambiante.

2.2. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum débute par la coulée de 50 ml de milieu PDA dans un erlenmeyer de 250 ml. Une fois refroidi, le milieu est ensemencé avec la moisissure

Aspergillus oryzae. Les erlenmeyers sont ensuite bouchés à l'aide de coton cardé stérile, recouvert de papier aluminium, puis placés en incubation à 30 °C pendant 72 heures. Après trois jours d'incubation, 40 ml d'eau distillée sont ajoutés dans chaque erlenmeyer. Les spores sont ensuite détachées de la surface de la gélose par agitation manuelle, permettant d'obtenir une suspension cellulaire homogène.

2.3 Dénombrements de spores

Le nombre de spores est déterminé par la technique de dénombrement à l'aide d'une cellule de Thomas (*Guiraud, 1998*). En raison de la forte concentration de la suspension, Une dilution 1/10 a été réalisée. Le comptage des spores est effectué dans la grille de la cellule, au microscope, avec un grossissement de 40×

3.Méthode de fermentation

3.1. Fermentation solide

5 grammes de déchets d'oranges sont placés dans des erlenmeyers de 250 ml. Chaque erlenmeyer est humidifié avec de l'eau distillée à 70 %. Ensuite, les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé stérile recouvert de papier aluminium, puis autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les milieux sontensemencés avec l'inoculum et homogénéisés à l'aide d'une tige stérile, puis incubés dans une étuve à 30 °C pendant 72 heures.

3.2 Fermentation liquide

Le milieu de culture liquide est préparé en diluant 2 % (p/v) de déchets d'oranges dans de l'eau distillée. Le mélange est chauffé sous agitation afin de favoriser l'extraction des composés solubles et d'obtenir une solution homogène. Le surnageant est ensuite séparé par filtration à l'aide de papier filtre Whatman, ce qui permet d'éliminer les particules solides. Les volumes filtrés sont transférés dans des fioles Erlenmeyer, puis bouchés à l'aide de coton cardé recouvert de papier d'aluminium. La stérilisation est effectuée par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les milieux sontensemencés avec un inoculum préalablement préparé, puis incubés à 30 °C pendant 72 heures sous agitation continue à 150 rpm, dans un incubateur à agitation (shaker incubator).

3.3. Fermentation submergée

Le milieu submergé à base de déchets d'oranges est préparé à raison de 2% dans l'eau distillée, puis homogénéisé par simple agitation manuelle.

4. Extraction enzymatique

L'extraction enzymatique est réalisée en fonction du mode de culture : solide, liquide et submergé.

4.1 Extractions de milieu solide

Dans le premier Erlenmeyer, ajouter 50 ml de Tween, puis transférer le mélange dans un flacon. Agiter pendant 5 minutes, puis centrifuger pendant 15 à 20 minutes à 1500 tours/min. Ensuite, filtrer le surnageant.

Dans le deuxième Erlenmeyer, peser le déchet à l'aide d'un papier aluminium, puis le placer dans des boîtes de Pétri. Mettre les boîtes dans l'étuve à 70 °C pendant 72 heures afin de sécher l'échantillon.

4.2 Extractions de milieu submergé et liquide

Après la phase de fermentation, le contenu des Erlenmeyers est filtré à l'aide de papier filtre Whatman afin de séparer la biomasse fongique du milieu de culture. Le filtrat, contenant l'extrait enzymatique brut, a été transféré dans des flacons, puis conservé à -20 °C pour maintenir son potentiel biocatalytique en vue des applications biotechnologiques ultérieures.

4.3 Détermination de la matière sèche

La teneur en matière sèche a été déterminée en déposant un échantillon de 2,5 g dans une boîte de Pétri en verre préalablement séchée et tarée. L'échantillon a été ensuite séché dans une étuve maintenue à 30 °C jusqu'à stabilisation du poids, indiquant l'élimination totale de l'eau. Les données obtenues sont présentées dans le tableau en annexe 3.

5.Méthodes analytiques

5.1. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PG)

L'activité de la polygalacturonase est évaluée selon la méthode décrite par Miller (1959). Cette enzyme agit sur l'acide pectique en libérant progressivement des sucres

réducteurs. La quantification de ces sucres est réalisée à l'aide d'un dosage colorimétrique, basé sur le principe suivant : en milieu alcalin et sous l'effet de la chaleur, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS), de couleur jaune, est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, de couleur rouge orangé (voir Figure 7). L'activité enzymatique est exprimée en unités internationales (UI), correspondant à la quantité d'enzyme libérant une micromole d'acide galacturonique par minute, à 40 °C et à pH 5 Selon la thèse de **Bennamoun (2017)**.

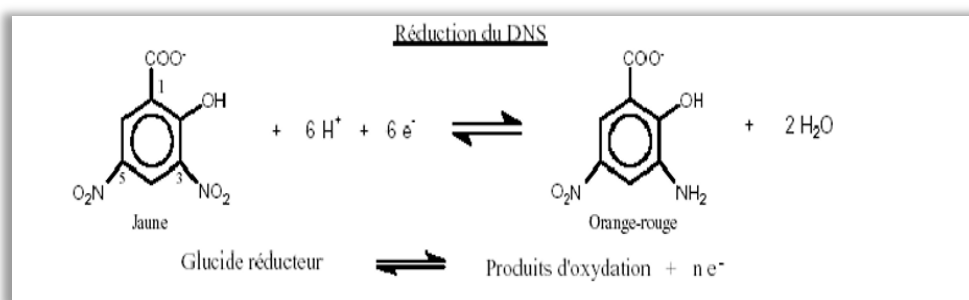


Figure 7: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS

L'activité de la polygalacturonase est déterminée selon le protocole suivant :

- Préparation du milieu réactionnel :
 - 100 µL d'extrait enzymatique brut
 - 100 µL de polygalacturonate (PGA) à 0,1 % préparé dans un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5 (Annex 2).

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

La réaction est stoppée par l'ajout de 400 µL de réactif DNS (Annexe 2). Le mélange est ensuite chauffé dans un bain-marie à 100 °C pendant 15 minutes afin de permettre le développement de la couleur.

Après refroidissement dans un bain de glace, 4,4 ml d'eau distillée sont ajoutés au mélange. L'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La quantité de sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage (Figure 8) à des concentrations de 0-2 mg/ml.

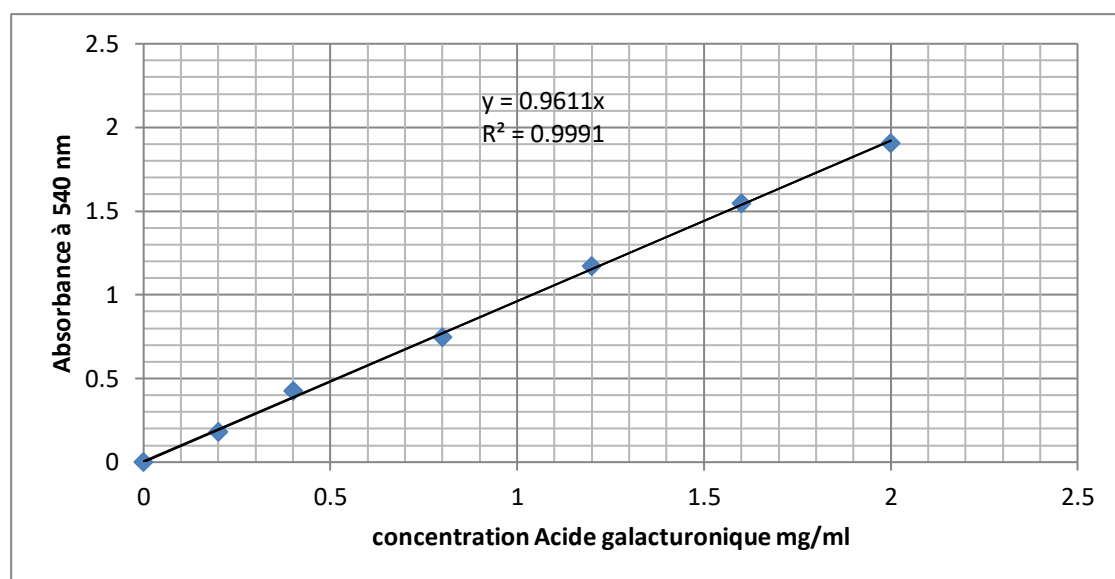


Figure 8: Courbe étalon de l'acide galacturonique.

6. Méthode d'optimisation

6.1 Plan de Plackett-Burman (PBD) (Plackett –Burman, 1946)

Le modèle de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946) a été utilisé dans la première phase de cette étude. Ce plan expérimental permet de rechercher les facteurs exerçant une influence significative sur la production de pectinases par *Aspergillus oryzae*. Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable. Ce sont donc des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (Tableau 4). Dans le cadre de notre travail, 8 expériences ont été réalisées pour l'évaluation de 7 facteurs, en tant que méthode de criblage. Chaque variable a été testée à deux niveaux : (+1) correspondant à la concentration maximale, et (-1) à la concentration minimale (Tableau 5).

Les 5 variables réelles sont : concentration de déchet (X1), taille de particule (X2), humidité (X4), pectine (X5) et Extrait de levure (X7). Les 2 facteurs restants (X3 et X6) Les variables désignées comme erreurs sont utilisées pour évaluer l'erreur expérimentale, ce qui permettra ensuite de calculer l'erreur standard. Les niveaux élevés (+) et les niveaux faibles (–) de l'ensemble des variables testées sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 4: Générateurs des matrices pour N= 4, 8, 12, 16, et 20 essais de PBD

(Plackett et Burman, 1946).

Nombre d'essais	Générateur (1e ligne de la matrice)
N = 04	+ + -
N = 08	+ + + - + - -
N = 12	+ + - + + + - - - + -
N = 16	+ + + + - + - + + - - + - - -
N = 20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -

Tableau 5: Matrice du PBD pour l'étude de 7 variables avec 8 expériences.

Facteurs							
N° d'essai	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

X1 : concentration de déchet ; X2 : taille de particule ; X3 : erreur ; X4 : humidité ; X5 : pectine ; X6 : erreur ; X7 : extrait de levure (+), niveau supérieur ;(-), niveau inférieur.

Tableau 6: Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du PBD.

Facteur	niveau		unités
	-	+	
Concentration de déchet	5	7,5	g
Taille de <u>particule</u>	0,63	2	mm
Erreur	-	-	-
Humidité	60	80	%
Pectine	0	0,2	%
Erreur	-	-	-
Extrait de levure	0	0,25	%

6.2 Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : Central Composite Design)

Pour les deux variables indépendantes, sélectionnées à partir du plan de Plackett-Burman, à savoir X_1 : humidité et X_2 : concentration en déchet, le plan composite centré (CCD) est conçu avec cinq niveaux pour chaque facteur : $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$. La structure du plan CCD utilisé est représenté dans les tableaux.

Il est composé de 3 parties :

1. Un plan factoriel complet à deux niveaux $(-1, +1)$: Il comporte $2^k = 2^2 = 4$ essais, où $k = 2$ représente le nombre de facteurs étudiés (Tableau 7).
2. $2k$ points axiaux : Ces points sont situés aux niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$ pour chaque variable. Pour $k = 2$, on obtient 4 essais et La valeur de α est égale à 1,414.
3. Points centraux (niveau 0) : Des répétitions au centre du plan (généralement 3 répétitions) sont effectuées pour estimer l'erreur expérimentale et évaluer la qualité du modèle.

L'analyse du plan CCD permet d'obtenir une équation du deuxième degré :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

\hat{Y} : la réponse (activité pectinolytique) ;

X_1, X_2 : les formes codées des variables explicatives ;

β_0 : la constante du modèle ;

β_1, β_2 : les coefficients linéaires ;

β_{11}, β_{22} : les coefficients quadratiques ;

β_{12} : le coefficient d'interaction.

Les valeurs optimales de l'humidité et de la concentration de déchet sont déterminées par la résolution du système d'équations dérivées partielles de la réponse, puis converties en valeurs réelles.

Tableau 7: Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans

Le plan centré de Box et Wilson.

Facteurs	Niveau des facteurs				
	$-\alpha(-1.414)$	-1	0	+1	$+\alpha(1.414)$
X1 : Humidité (%)	55.86	60	70	80	84.14
X2: Concentration de déchet (g)	4.48	05	6.25	7.5	8.02

Tableau 8: Structure du plan composite centré à 2 facteurs.

N ° D'essais	Niveaux des facteurs	
	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1.414	0
6	1.414	0
7	0	-1.414
8	0	1.414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

- **Analyse statistique**

Tous les tests ont été effectués en triple et les valeurs moyennes sont analysées et interprétées par logicielle Minitab version 2022. Estimation des paramètres statistiques est réalisé par Analyse de la Variance (ANOVA) selon test Tukey pour groupe homogène.

6.3 Validation du modèle

Dans cette partie, une étude comparative est réalisée entre le milieu optimisé et le milieu de base, afin d'évaluer l'impact des conditions améliorées sur la production de la pectinase.

Résultats et discussion

L'optimisation de la production de la polygalacturonase (EC 3.2.1.67) par *Aspergillus oryzae* est conduite selon une approche expérimentale en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, l'effet du mode de culture sur l'expression enzymatique est évalué. Trois modalités sont testées : la culture en milieu solide, la culture en milieu liquide et la culture submergée. Cette étape préliminaire, vise à sélectionner le système de culture le plus favorable à la biosynthèse de la polygalacturonase.

Dans un second temps, une méthode statistique de criblage est mise en œuvre pour sélectionner les facteurs influençant significativement la production enzymatique. À cet effet, le plan factoriel de Plackett et Burman (1946) est utilisé. Ce plan a permis de réduire le nombre de variables à étudier en mettant en évidence celles ayant un effet significatif sur la réponse enzymatique.

Enfin, les facteurs retenus sont soumis à une optimisation ciblée à l'aide du plan d'expériences de Box et Wilson (1951), basé sur la méthode des surfaces de réponse. Cette approche permet de modéliser les interactions entre les variables significatives et d'identifier les conditions optimales de culture en vue de maximiser la production de la polygalacturonase.

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

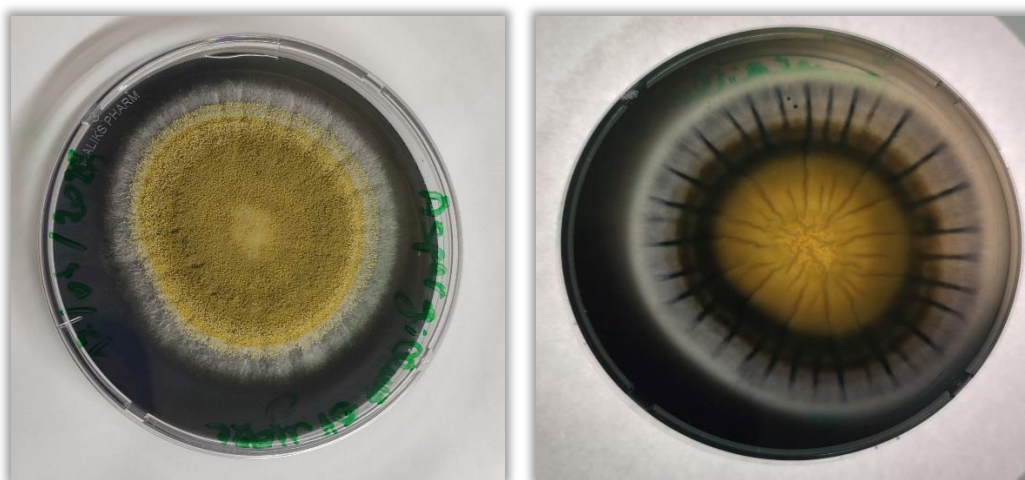


Figure 9: Mise en évidence de l'activité pectinolytique extracellulaire chez la souche *Aspergillus oryzae*

La moisissure *Aspergillus oryzae* présente une bonne croissance sur des milieux contenant de la pectine en tant que seule source de carbone, ce qui suggère l'induction d'un système enzymatique pectinolytique impliqué dans l'hydrolyse de ce polysaccharide (figure 9).

2. Sélection du mode de culture

Ce test vise à évaluer les performances de milieux optimisés dans les conditions de fermentation solide, liquide et submergée, dans le but sélectionner le procédé le plus adapté à la production de la polygalacturonase par *Aspergillus oryzae*.

L'activité enzymatique est comparée dans différents milieux de fermentation. Les valeurs mesurées sont respectivement de 4,16 UI/ml en fermentation en milieu solide (SSF), 0,57 UI/ml en milieu submergé (SmF) et 0,24 UI/ml en milieu liquide (FmL). Dans cette étude, l'activité de la polygalacturonase (PG) se révéla la plus élevée en SSF, indiquant ainsi une efficacité supérieure de ce procédé pour la production enzymatique, comme le montre la (figure10).

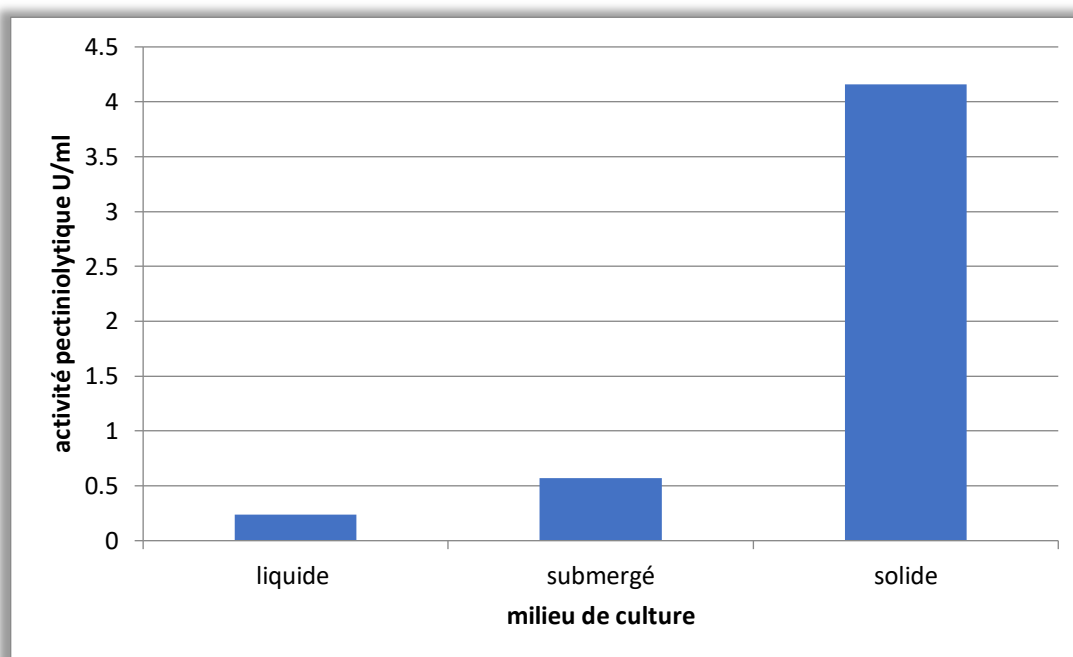


Figure 10: Influence des différents types de milieux (submergé, liquide et solide) sur la production de la polygalacturonase par *Aspergillus oryzae*.

En outre, *A. oryzae* a produit une activité protéolytique significativement plus élevée en SSF qu'en SmF, ce qui est en accord avec les observations rapportées par *Belmessikh et al., (2013)*.

3. ANOVA et Tests Post-Hoc

Cette analyse a pour but de comparer les activités pectinolytiques obtenues dans trois types de milieux de culture : solide (SSF), liquide (FmL) et submergé (SmF). Chaque condition est testée en triplicata, et les activités enzymatiques sont exprimées en unités par millilitre (U/ml).

L'analyse statistique par ANOVA révèle un effet hautement significatif du type de milieu de culture sur l'activité enzymatique ($F = 398,09$; $p < 0,001$). La valeur très élevée de F suggère que les différences entre les moyennes des groupes sont bien supérieures aux variations internes observées au sein de chaque groupe. Par ailleurs, le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté = 99,00 %) indique que le modèle explique presque entièrement la variabilité des données, soulignant ainsi l'influence déterminante du mode de culture sur la production enzymatique (tableau 9).

Tableau 9: Analyse de la variance.

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,174133	99,25%	99,00%	98,32%

Des tests post-hoc de Tukey sont effectués afin d'identifier les différences significatives entre les groupes. Les comparaisons entre le milieu solide (SSF) et les milieux liquide (FmL) et submergé (SmF) révèlent des différences fortement significatives ($p < 0,001$), avec des intervalles de confiance n'incluant pas zéro, ce qui confirme la supériorité du milieu solide.

En revanche, la comparaison entre les milieux submergé et liquide ne montre pas de différence significative ($p = 0,226$), l'intervalle de confiance incluant zéro, ce qui suggère une performance enzymatique similaire entre ces deux milieux (figure11).

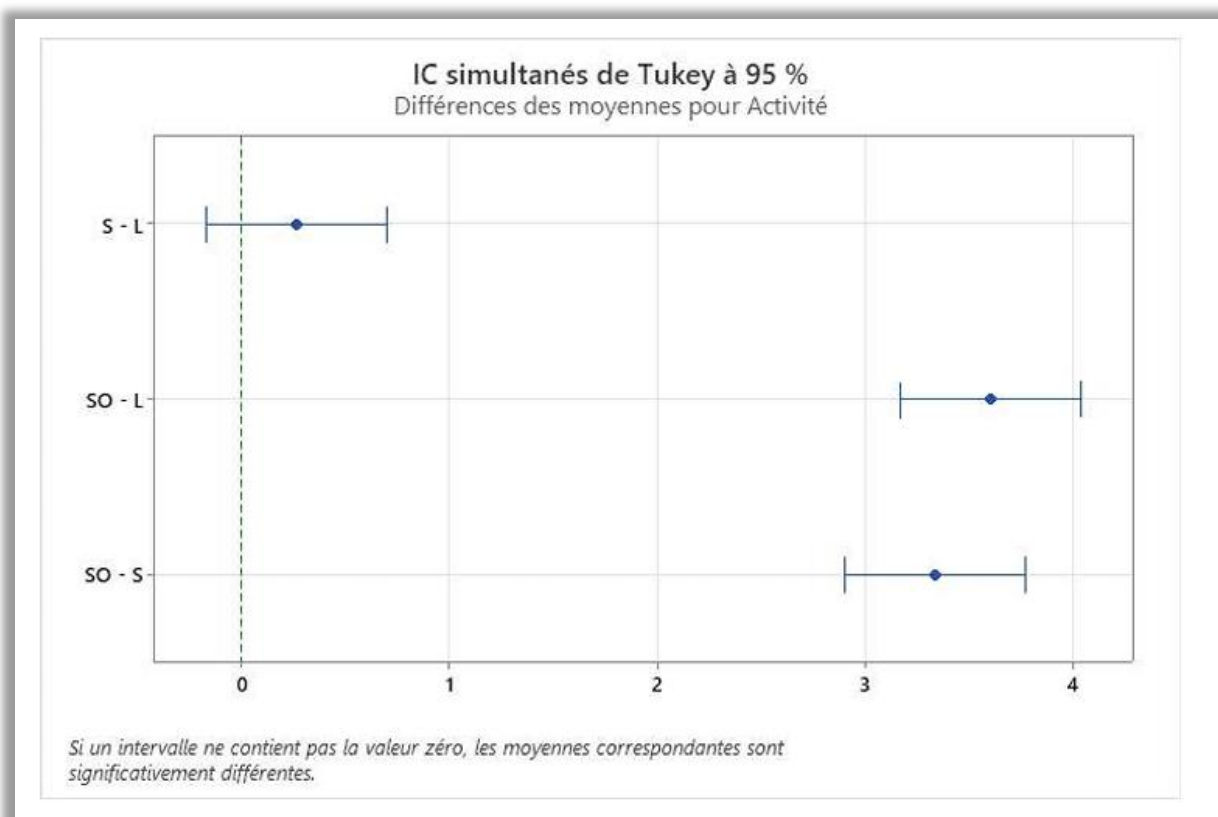


Figure 11: IC simultanée de Tukey à 95 %

Les intervalles de Tukey confirment que le milieu solide est significativement différent, tandis que submergé et liquide se regroupent.

Au vu des résultats obtenus, Le milieu solide affiche l'activité la plus importante (moyenne = 3,823), ce qui indique qu'il privilégie nettement l'activité par rapport à submergé (0,490) et liquide (0,223). De plus L'écart-type global (0,174) atteste d'une bonne uniformité des variances, soutenant ainsi les postulats de l'ANOVA (tableau 10).

Tableau 10: Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Milieu	N	Moyenne	Groupement
Solide	3	3,823	A
Submergé	3	0,4900	B
Liquide	3	0,2233	B

La boîte à moustaches représentant l'activité enzymatique illustre la distribution des valeurs mesurées pour chaque milieu de culture. Pour le milieu solide (SSF), la boîte est haute et étroite, indique une faible variabilité des données et une concentration des valeurs autour de 3,8 U/ml, ce qui témoigne d'une activité élevée et homogène. En revanche, les boîtes correspondant aux milieux submergé (SmF) et liquide (FmL) sont plus larges et se chevauchent, ce qui traduit une variabilité plus importante et des moyennes proches. La boîte du milieu solide se démarque nettement par sa hauteur, ce qui souligne sa supériorité statistique en termes d'activité enzymatique (figure 12).

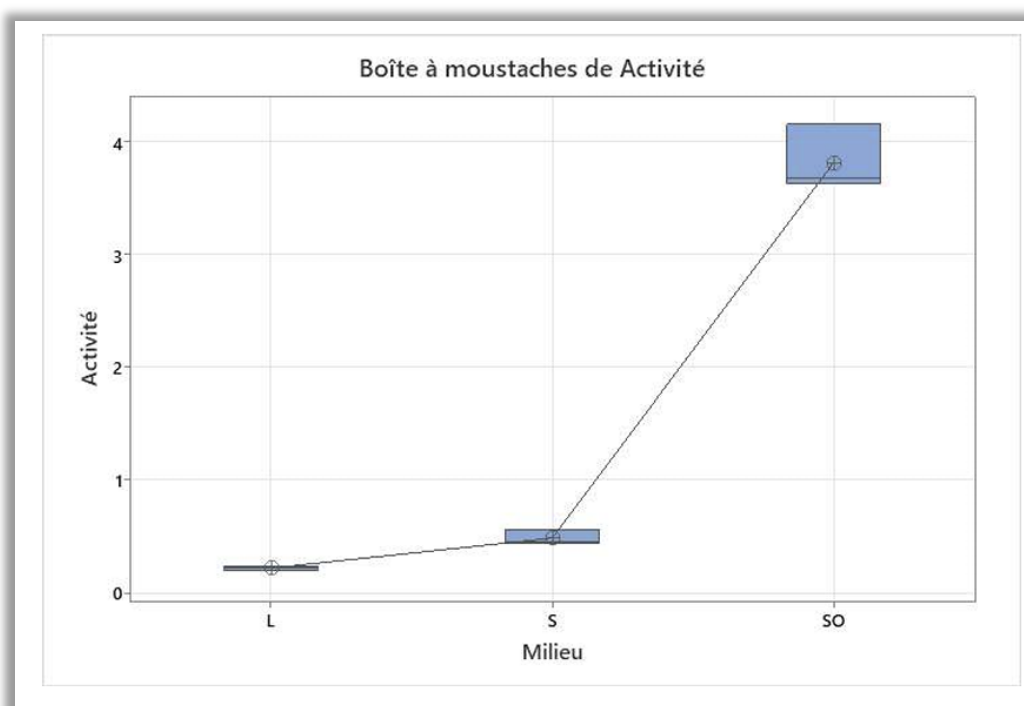


Figure 12: Boîte à moustache d'activité

- **Comparaisons Multiples**

Les conclusions issues de la méthode de Hsu confirment celles obtenues avec le test de Tukey. Le milieu solide présente une activité enzymatique significativement plus élevée que les autres milieux, comme en témoigne un intervalle de confiance qui n'inclut pas zéro. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les milieux submergé et

liquide, indiquant des performances comparables dans ces deux conditions de culture figur13.

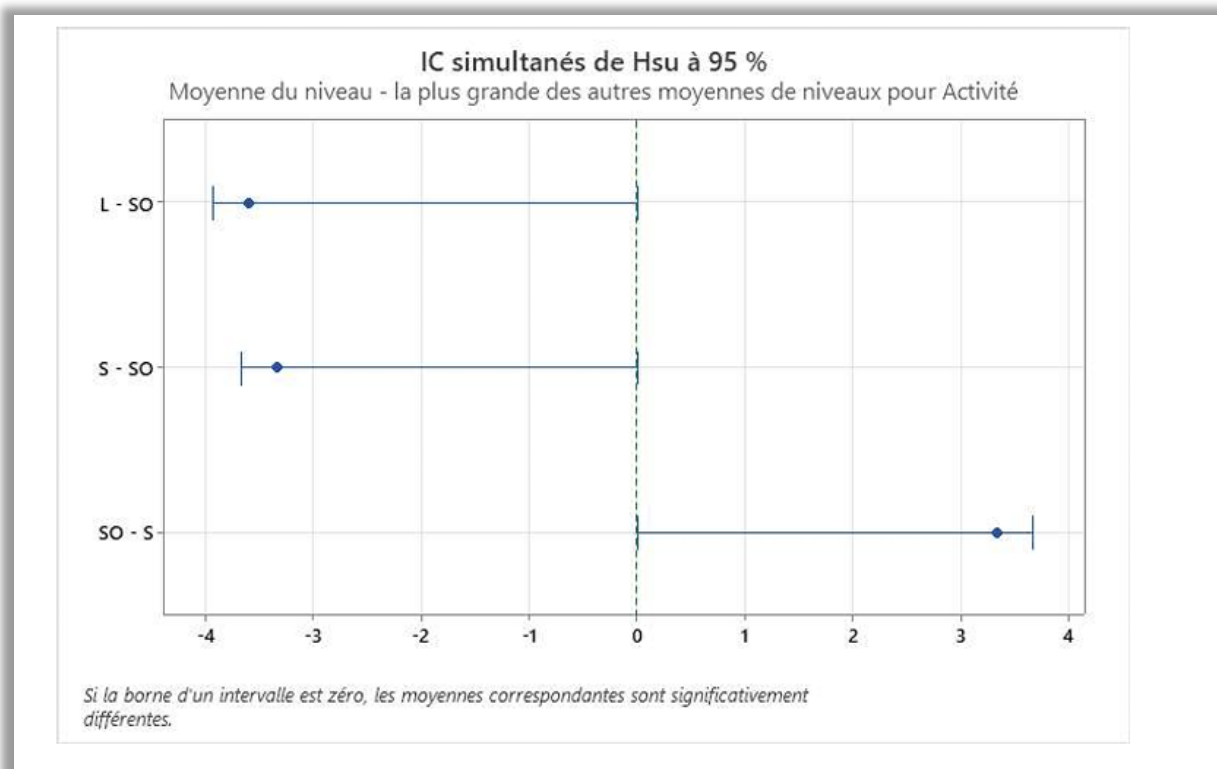


Figure 13: IC simultanée de Hsu à 95%

Les intervalles de confiance (IC) des comparaisons entre les milieux confirment la supériorité du milieu solide (SSF). Les comparaisons L - SO (liquide – solide) et S - SO (submerge – solide) présentent des IC négatifs qui n’incluent pas zéro, ce qui indique que le milieu solide est significativement plus performant que les milieux liquide (FmL) et submergé (SmF). De même, l’IC positif de la comparaison SO – S (solide – submerge), n’incluant pas zéro, renforce cette conclusion. Par ailleurs, l’application de la méthode de Hsu confirme de manière claire et sans ambiguïté que le milieu solide constitue le meilleur choix pour maximiser la production enzymatique.

• Conclusion

Le milieu solide se distingue par une activité pectinolytique significativement supérieure à celles observées dans les milieux liquide et submergé. En revanche, aucune différence notable ne se relevé entre ces deux derniers. Ainsi, le milieu solide apparaît comme le plus approprié pour une production optimale de pectinases.

L'absence d'agitation mécanique, la proximité directe entre le mycélium et les particules solides, ainsi qu'une micro-aération naturelle du substrat, contribuent à une sécrétion accrue des enzymes extracellulaires, rendant la fermentation en milieu solide (FMS) particulièrement adaptée aux champignons filamenteux (*Duchiron et Copinet, 2011*). Cette configuration offre un environnement favorable à la physiologie d'*Aspergillus oryzae*, facilitant ainsi une production enzymatique plus efficace comparée à la fermentation en milieu liquide (FML) (*Balakrishnan et al., 2021 ; Melnichuk et al., 2020*).

Par ailleurs, *Lee et Ra, (2022)* rapportent que l'utilisation de résidus agricoles tels que le tourteau de soja a permis d'obtenir une pectinase hyperactive par FMS, accompagnée d'un cocktail enzymatique comprenant de la protéase, de la glucanase et de la cellulase. Cette approche s'est révélée économiquement avantageuse, notamment grâce à la réduction des coûts liés aux équipements, à la production et à l'exploitation.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la supériorité de la FMS et souligne son intérêt dans une stratégie de valorisation des résidus agro-industriels pour une production enzymatique durable, efficace et à faible coût.

4.Optimisation de la production de la polygalacturonase

4.1 Criblage des facteurs influençant la production de la PG

Pour étudier l'impact de différents paramètres sur l'activité de la pectinase, un plan d'expériences de type Plackett-Burman (PB) s'utilise afin de déterminer les variables les plus influentes. Cinq variables réelles sont considérées : la concentration en déchet, la taille des particules, l'humidité, la pectine et l'extrait de levure. Deux variables supplémentaires s'introduisent en tant que facteurs fictifs pour estimer l'erreur expérimentale et permettre le calcul de l'erreur standard. Un total de 8 expériences se génère à l'aide du logiciel Minitab 2022, avec les niveaux élevés (+) et faibles (–) de chaque variable définis dans le tableau 11.

Tableau 11: Effet des facteurs testés sur la production de la polygalacturonase
(Plan de Plackett-Burman).

Expérience	Facteurs							Activité pectinolytique (U/g)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	
1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	19,50
2	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	12,80
3	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	11,53
4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	28,29
5	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	25,44
6	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	33,83
7	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	18,37
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	20,59

• Effet des facteurs testés sur la production de la PG

L'analyse de la variance (ANOVA) montre que le modèle global est hautement significatif ($p = 0,019 < 0,05$), ce qui indique que les variables étudiées exercent un effet réel sur l'activité pectinase. Parmi les cinq variables testées, la concentration en déchet ($p = 0,012$) et l'humidité ($p = 0,006$) présentent un effet significatif, avec des valeurs F élevées (82,00 et 155,25 respectivement), traduisant une forte contribution à la réponse. L'extrait de levure ($p = 0,071$) et la pectine ($p = 0,096$) montrent également une certaine influence, bien que leur effet soit moins prononcé. En revanche, la taille de particule ne présente pas eu d'effet significatif ($p = 0,543$), ce qui suggère qu'elle ne contribue pas de manière notable à la variabilité de l'activité enzymatique (tableau 12 et 13).

Le modèle présente un bon ajustement aux données expérimentales, comme en témoigne un coefficient de détermination R^2 de 99,23 %, indiquant que près de la totalité de la variation observée est expliquée par le modèle. De plus, le R^2 ajusté (97,32 %) et le R^2 prédit (87,75 %) confirment la pertinence du modèle et sa capacité à prédire les réponses avec fiabilité. La faible valeur de l'erreur expérimentale (CM résiduel = 1,543) corrobore la robustesse statistique du modèle.

- **Effet de la concentration de déchet**

Selon les études de *Prajapati et al., (2021)* et de *Maktouf et al., (2014)*, les déchets d'oranges constituent un substrat idéal pour la production de pectinase et *Amilia et al., (2017)* rapporte que Les écorces d'agrumes, notamment celles des oranges, sont particulièrement riches en pectine 18,3 %, une substance qui favorise la prolifération d'une grande diversité de micro-organismes, tels que des bactéries et des champignons. *Ahmed et al., (2021)* ont rapporté que l'écorce de satkara constituait une source de carbone significative pour la production de pectinase par *Aspergillus niger* ATCC1640.

L'analyse statistique selon le plan de Plackett et Burman indique que la concentration en déchet exerce un effet significatif et positif ($p = 0,012$) sur la production de pectinase.

- **Effet de l'humidité**

Selon *Cai et Yang, (2024)* La production de pectinase par *Aspergillus oryzae* est optimale à des niveaux élevés d'humidité car il favorise la solubilisation et la diffusion des nutriments dans le substrat, ce qui améliore leur accessibilité pour le métabolisme microbien, mais une teneur en eau insuffisante inhibe la croissance microbienne ce qui entraîne une réduction significative de la production de biomasse et, par conséquent, de pectinase.

L'analyse statistique selon le plan de Plackett et Burman indique que le taux d'humidité a un effet significatif et positif ($p = 0,006$) sur la production de pectinase par *Aspergillus oryzae*.

- **Effet de la pectine**

Satpathy et al., (2024) indique que la concentration de 1,5 % de pectine constitue un facteur déterminant pour l'augmentation significative du rendement en pectinase.

Selon l'analyse des résultats obtenus par le plan de Plackett et Burman, la pectine ($p = 0,096$) exerce une certaine influence sur la réponse, bien que son effet soit relativement limité par rapport à d'autres variables testées.

- **Effet de l'extrait de levure**

Selon *Bennamoun et al., (2004)* l'extrait de levure agit comme un facteur stimulant important dans la biosynthèse de l' α -amylase. À une concentration maximale de 0,5 %, il permet une augmentation de 114,5 % de la production enzymatique, avec une probabilité

d'effet positif d'au moins 80 %, ce qui souligne son rôle essentiel en tant que source d'azote organique et de facteurs de croissance.

L'analyse statistique selon le plan de Plackett et Burman indique que l'extrait de levure ($p = 0,071$) exerce également une certaine influence, mais son effet reste relativement limité.

- **Effet de la taille de particule**

La taille des particules du substrat en fermentation solide influence la production d'enzymes. Si les particules sont trop petites, elles se tassent et empêchent l'air de circuler, ce qui gêne la croissance des micro-organismes et réduit la production enzymatique. Si elles sont trop grosses, la surface de contact est faible, ce qui limite l'accès des micro-organismes aux nutriments (*Caceres et al., 2015*).

Une taille de particules entre 0,5 et 2 mm est généralement idéale, car elle permet un bon équilibre entre circulation de l'air, humidité et surface disponible, favorisant ainsi une meilleure production d'enzymes.

L'analyse statistique selon le plan de Plackett et Burman indique que la taille des particules ($p = 0,543$) n'a pas d'effet significatif sur la production de pectinase.

Tableau 12: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la PG

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	21,294	0,439	48,49	0,00	1,00
C1	-3,976	0,439	-9,06	0,012	1,00
C2	0,319	0,439	0,73	0,543	1,00
C3	5,471	0,439	12,46	0,006	1,00
C4	1,316	0,439	3,00	0,096	1,00
C5	-1,554	0,439	-3,54	0,071	1,00

Tableau 13: ANOVA pour le plan PBD.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	5	399,947	79,989	51,86	0,019
Linéaires	5	399,947	79,989	51,86	0,019
C Déchet	1	126,485	126,485	82,00	0,012
T particule	1	0,813	0,813	0,53	0,543
Humidité	1	239,477	239,477	155,25	0,006
Pectine	1	13,860	13,860	8,99	0,096
E Levure	1	19,313	19,313	12,52	0,071
Erreur	2	3,085	1,543		
Total	7	403,032			

L'analyse du plan PBD permet d'obtenir l'équation de régression suivante :

$$Y = 21,294 - 3,976 \times \text{C Déchet} + 5,471 \times \text{Humidité}$$

- **Graphiques de Pareto**

L'analyse des effets normalisés via le diagramme de Pareto (Figure 14) permet de mettre en évidence les facteurs les plus impactant sur la production de pectinase par *Aspergillus oryzae*. Parmi les cinq facteurs évalués dans le plan de Plackett-Burman, l'humidité (C) se distingue comme le paramètre le plus influent, son effet normalisé dépassant

largement le seuil critique (valeur de $t = 4,30$ pour $\alpha = 0,05$). Le deuxième facteur le plus influent est le carbone déchet (A), suivi de la levure (E) et de la pectine (D). Ces observations indiquent que la nature du substrat carboné et les composés azotés contenus dans l'extrait de levure jouent un rôle important dans la régulation de la synthèse de la pectinase. Ces éléments pourraient agir en modulant l'activité enzymatique ou en favorisant la croissance cellulaire du champignon. En revanche, le facteur taille des particules (B) n'exerce pas d'effet significatif sur la réponse. Son impact minimal est illustré par une courbe quasi horizontale, suggérant une influence négligeable sur l'activité enzymatique dans les conditions expérimentales étudiées (figure 14).

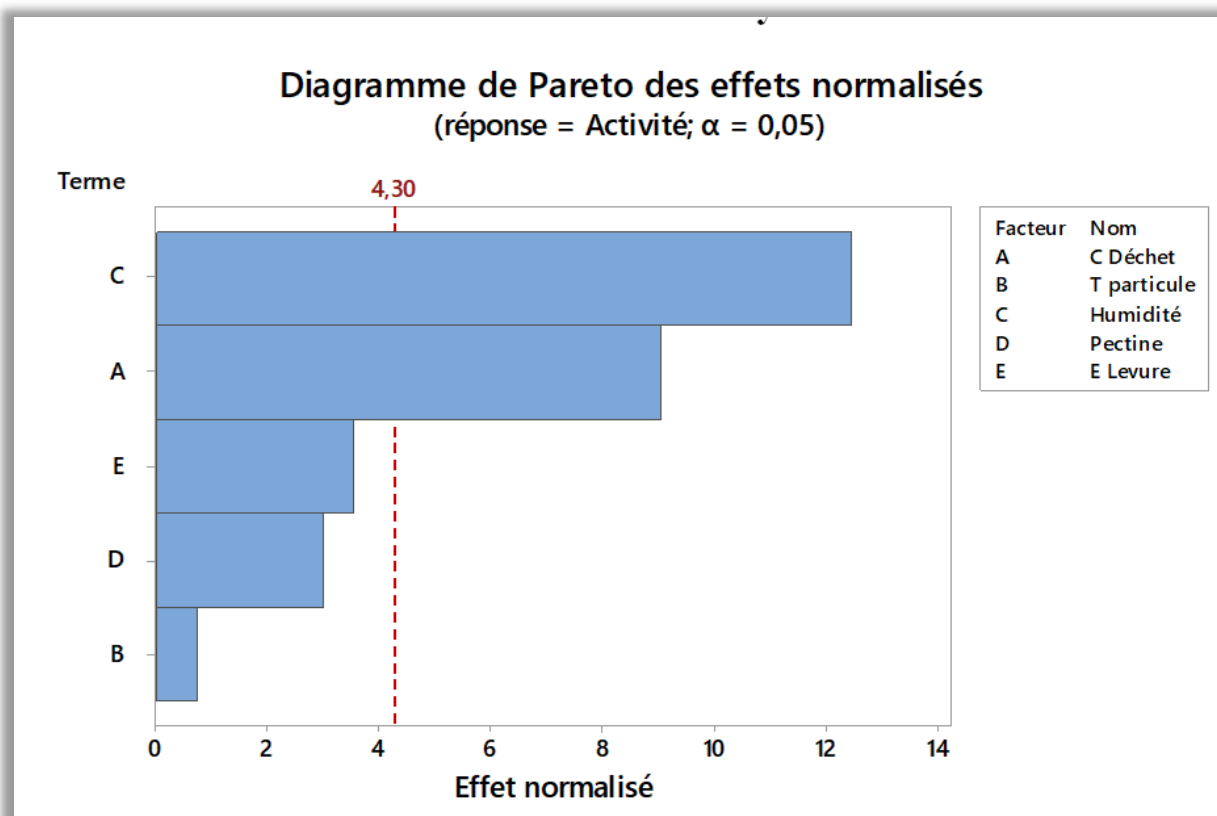


Figure 14 Diagramme Pareto des effets normalisés.

La production de la PG est nettement influencée par l'humidité et la concentration de déchet. Les optima de ces facteurs sélectionnés seront déterminés antérieurement par l'emploi d'une autre conception : plan composite centré de Box et Wilson (1951).

4.2 Optimisation de la production de la polygalacturonase selon le plan statistique de Box et Wilson (1951)

L'étude d'optimisation des conditions de culture en vue de maximiser l'activité de la pectinase produite par *Aspergillus sp.* Se conduit en considérant deux variables significatives : la concentration en déchet et le taux d'humidité. L'expérimentation se réalise selon un plan composite centré (CCD), et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau correspondant. Le modèle mathématique, représenté par l'équation de régression, exprime l'activité pectinase en fonction des deux facteurs étudiés : la concentration en déchet (A) et l'humidité (B), ainsi que leurs effets quadratiques et leur interaction (tableau 14).

Activité pectinolytique = 168,0 – 17,03 déchets – 2,872 humidités + 1,387 déchet*déchet + 0,02202 humidité*humidité – 0,0214 déchet*humidité.

Tableau 14: Valeurs expérimentales (observées) de l'activité spécifique.

N° d'essai	Niveau de facteur		L'activité (U /g)
	X1	X2	
1	-1	-1	20,02
2	-1	1	20,27
3	1	-1	14,67
4	1	1	16,90
5	-1,414	0	20,78
6	1,414	0	14,34
7	0	-1,414	16,00
8	0	1,414	17,64
9	0	0	14,00
10	0	0	13,00
11	0	0	13,00
12	0	0	13,68
13	0	0	13,00

La signification statistique du modèle de régression quadratique se vérifie par l'analyse de la variance (ANOVA) et le test de Fisher. La valeur élevée du test de Fisher ($F = 44,10$) et la valeur de p très faible ($p = 0,000$) indiquent que le modèle est hautement significatif. Le coefficient de détermination (R^2) du modèle est de 96,92 % (0,9692), ce qui est très proche de 1, confirmant ainsi l'adéquation du modèle aux données expérimentales et une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites de l'activité pectinase. Cela signifie que 96,92 % de la variation de l'activité enzymatique s'explique par les deux variables indépendantes (déchet et humidité), tandis que les 3,08 % restants correspondent à une variation inexpliquée par le modèle.

La valeur prédite du R^2 (0,7821) indique également une bonne capacité prédictive du modèle, en accord avec la valeur ajustée du R^2 (0,9473). Le R^2 ajusté corrige la valeur de R^2 en fonction du nombre de variables incluses et de la taille de l'échantillon. Comme attendu, il est légèrement inférieur au R^2 global. Ces résultats confirment la fiabilité et la validité statistique du modèle établi pour prédire l'activité pectinase en fonction des conditions d'humidité et de concentration en déchet.

Tableau 15: Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de la production de la polygalacturonase.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de P	FIV
Constante	13,260	0,272	48,75	0,000	
Déchet	-2,105	0,304	-6,92	0,000	1,00
Humidité	1,092	0,304	3,59	0,009	1,00
Déchet*Déchet	4,346	0,462	9,42	0,000	1,02
Humidité*Humidité	4,402	0,461	9,54	0,000	1,02
Déchet*Humidité	-0,536	0,609	-0,88	0,408	1,00

L'analyse de variance (ANOVA) révèle que les effets linéaires de la concentration en déchet ($p = 0,000$) et de l'humidité ($p = 0,009$) sont hautement significatifs sur la production de pectinase, ce qui confirme que ces deux paramètres influencent de manière notable l'activité enzymatique. Par ailleurs, les effets quadratiques de ces variables, à savoir déchet² ($p = 0,000$) et humidité² ($p = 0,000$), sont également très significatifs, indiquant une réponse

non linéaire du système. Cela suggère l'existence de niveaux optimaux pour ces facteurs, au-delà ou desquels l'activité pectinase diminue. En revanche, l'effet d'interaction entre la concentration en déchet et l'humidité ($p = 0,408$) n'est pas significatif, ce qui montre que ces deux paramètres agissent de manière indépendante sur la réponse mesurée. Cette absence d'interaction, confirmée par la faible valeur du test de Fisher ($F = 0,77$), signifie qu'il n'y a pas d'effet combiné notable entre ces variables dans les conditions testées. Ces résultats soulignent donc l'importance des effets individuels (linéaires et quadratiques) de la concentration en déchet et de l'humidité sur la production de pectinase, tandis que leur interaction ne semble pas jouer un rôle significatif. Ces observations justifient une approche d'optimisation axée sur chacun des deux facteurs de manière indépendante afin de maximiser la réponse enzymatique (tableau 15 et 16).

Tableau 16: Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité pectinolytique.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	5	81,5793	16,3159	44,10	0,000
Linéaires	2	22,4776	11,2388	30,38	0,000
Déchet	1	17,7067	17,7067	47,86	0,000
Humidité	1	4,7709	4,7709	12,90	0,009
Carré	2	58,8155	29,4077	79,49	0,000
Déchet*Déchet	1	32,8125	32,8125	88,69	0,000
Humidité*Humidité	1	33,7058	33,7058	91,11	0,000
Interaction à 2 facteur	1	0,2862	0,2862	0,77	0,408
Déchet*Humidité	1	0,2862	0,2862	0,77	0,408
Erreur	7	2,5898	0,3700		
Inadéquation de L'ajustement	3	2,5760	0,8587	248,88	0,000
Erreur pure	4	0,0138	0,0034		
Total	12	84,1691			

- **Graphiques de Pareto**

Le diagramme de Pareto des effets normalisés (Figure 15) met en évidence les facteurs significatifs influençant la production de pectinase. Les effets quadratiques des deux variables étudiées, à savoir l'humidité (BB) et la concentration en déchet (AA), se distinguent comme les plus importants, dépassant nettement le seuil de significativité établi à 2,36. Ces termes quadratiques révèlent une réponse de type courbe, confirmant la présence d'effets non linéaires marqués sur l'activité enzymatique. L'effet linéaire de la concentration en déchet (A) est également significatif, bien que moins prononcé. En revanche, les effets linéaires de l'humidité (B) et l'interaction entre déchet et humidité (AB) restent en dessous du seuil de significativité, indiquant que leur contribution à la variabilité de la réponse est négligeable dans les conditions expérimentales (figure 15).

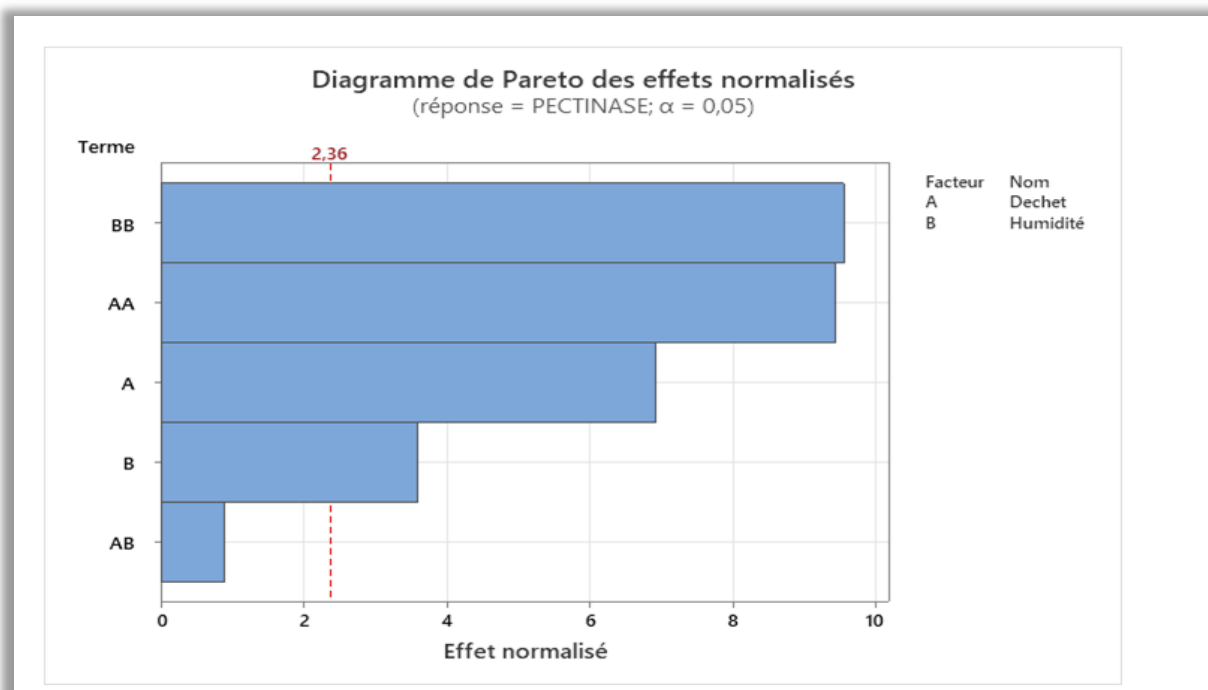


Figure 15: Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité pectinolytique

- **Droite de Henry**

La droite de Henry est une technique graphique permettant d'ajuster une distribution gaussienne à une série de données issues de l'observation d'une variable numérique continue.

Après avoir effectué cet ajustement, il est essentiel de vérifier la validité du modèle afin de s'assurer qu'il représente de manière adéquate le système réel étudié. La (Figure 16) présente le diagramme de probabilité normale des résidus, un outil essentiel pour identifier et interpréter les écarts systématiques par rapport aux hypothèses du modèle. Les résidus sont représentés en fonction des valeurs normales théoriques attendues. Le diagramme révèle que les points s'alignent approximativement sur une droite, sans déviations systématiques significatives. Les résidus sont principalement concentrés entre -1,0 et +1,0, avec une distribution symétrique autour de zéro. Cela confirme que les erreurs suivent une distribution normale, sont indépendantes les unes des autres, et que les variances des erreurs sont homogènes. Ces observations indiquent que le modèle est bien adapté aux données expérimentales, et que les résidus du modèle ajusté sont normalement distribués (figure 16).

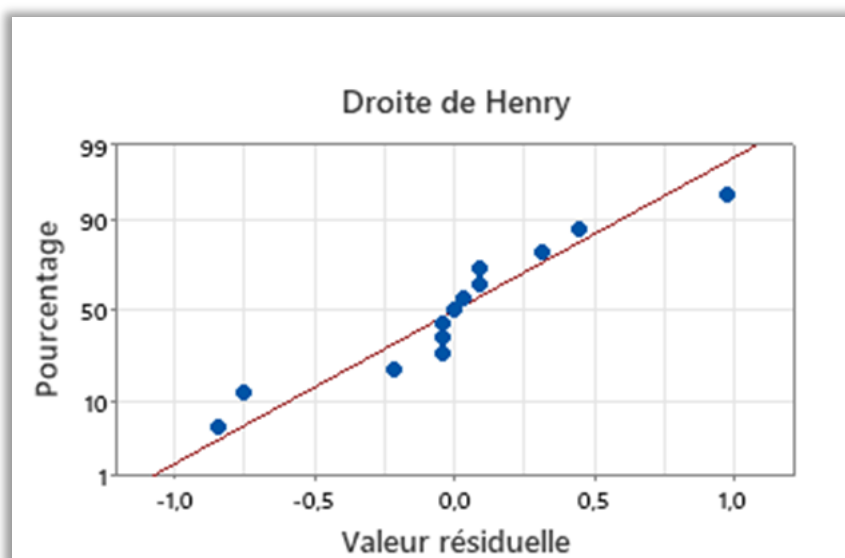


Figure 16: Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité pectinolytique par rapport à la valeur prédite par le modèle.

• Détermination des interactions entre les variables

La figure 17 présente une surface de réponse tridimensionnelle montrant l'influence combinée de la concentration en déchet (4,5–8 %) et de l'humidité (60–85 %) sur l'activité de la pectinase, les autres paramètres étant constants. La production maximale de pectinase s'atteint pour des valeurs optimales intermédiaires, soit environ 4,48 % de déchet et 84,14 % d'humidité. L'activité enzymatique augmente progressivement avec l'élévation de ces deux

facteurs jusqu'à un pic, puis diminue au-delà de ces niveaux optimaux, révélant une réponse quadratique caractéristique. Cela indique que des conditions modérées sont plus propices à la production enzymatique, tandis qu'un excès de déchet ou une humidité trop faible ou trop élevée réduisent l'activité de la pectinase. Cette dynamique est clairement illustrée par les variations de relief (vallées et pics) sur le graphique, mettant en évidence la sensibilité du système à ces deux facteurs.

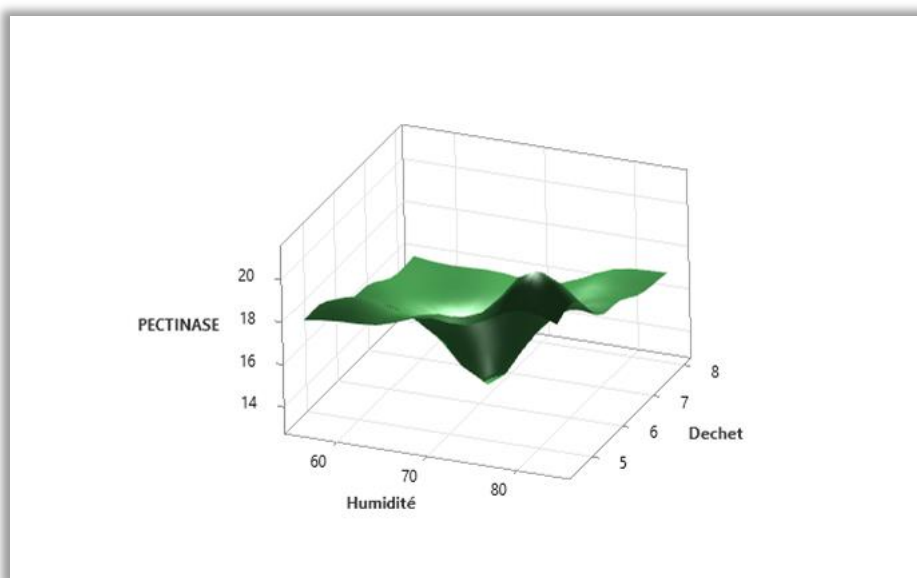


Figure 17: Diagramme de surface de pectinase, déchet et humidité.

4.3 Validations du modèle

La validation du modèle se réalise en menant des essais expérimentaux en triplicata dans les conditions optimales prédites par le plan composite centré. Ces essais permettent de confirmer la cohérence entre les valeurs prédictives du modèle et les résultats expérimentaux. Les paramètres optimaux, obtenus à l'aide de l'outil d'optimisation de Minitab, sont une concentration en déchet de 4,48 % et une humidité de 84,14 %. L'activité pectinase prédite par le modèle dans ces conditions était de 25,742 U/gs, tandis que la valeur expérimentale obtenue est très proche, avec une moyenne de $25,65 \pm 0,31$ U/gs, ce qui confirme la précision et la robustesse du modèle.

L'optimisation du milieu par la méthode RSM-CCD permet une augmentation significative de l'activité pectinase, démontrant une amélioration notable de la production enzymatique. Ces résultats valident pleinement l'efficacité du modèle pour l'optimisation du

procédé, et confirment que les conditions identifiées sont appropriées pour maximiser la production de pectinase en milieu solide (figure 18).

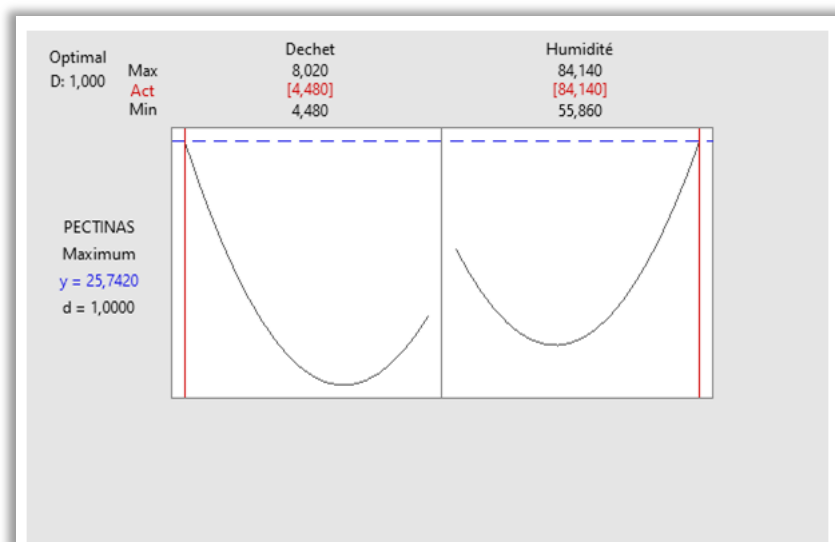


Figure 18: Les valeurs optimales des variables de la réponse déterminées par « RSM ».

• Conclusion partielle

La production de pectinase par *Aspergillus oryzae* en milieu solide était de 13,06 UI/g de substrat. Après optimisation, elle a doublé pour atteindre 25,74 UI/g.

Conclusion Générale

L'étude menée a permis de mettre en évidence le fort potentiel d'*Aspergillus oryzae* en tant que producteur de pectinases, grâce à son arsenal enzymatique pectinolytique bien développé. L'utilisation des déchets d'oranges comme substrat s'est révélée être une stratégie à la fois efficace et économique, valorisant ainsi un résidu agro-industriel abondant.

L'approche expérimentale adoptée, combinant un plan de Plackett-Burman pour la sélection des facteurs significatifs et une méthode de surface de réponse (RSM) selon Box-Wilson pour l'optimisation, a permis d'identifier deux paramètres majeurs : l'humidité et la concentration en déchets. Les conditions optimales déterminées (84,14 % d'humidité et 4,48 % de déchets) ont permis d'atteindre une activité enzymatique maximale de 25,742 UI/g.

Par ailleurs, la comparaison entre les deux types de milieux de culture a clairement montré que la fermentation en milieu solide (FMS) est plus adaptée que la fermentation en milieu liquide (FML) pour la production de polygalacturonase par *A. oryzae*, en raison de sa meilleure adéquation aux besoins physiologiques de ce champignon filamenteux.

Les résultats obtenus démontrent non seulement la robustesse du modèle d'optimisation établi, mais aussi le potentiel de valorisation des déchets agricoles dans une démarche de développement durable.

Dans le cadre des perspectives de cette étude, plusieurs axes de recherche mériteraient d'être explorés, notamment :

- Transposer les conditions optimisées à l'échelle du laboratoire vers une échelle industrielle, en utilisant un fermenteur.
- L'utilisation d'autres déchets agro-industriels, tels que les résidus de betterave sucrière, comme substrats alternatifs pour l'optimisation de la production de pectinase par *Aspergillus oryzae*.
- L'induction de mutations génétiques chez *Aspergillus oryzae*, afin d'améliorer la production de pectinase et éventuellement favoriser la biosynthèse de métabolites secondaires d'intérêt industriel.

Références Bibliographiques

- [DAAS M S ; 2020] : DAAS Mohamed Skander “Cours Plans d’expériences” Université Frères Mentouri - Constantine 1.
- [DAAS M S ; 2020] : DAAS Mohamed Skander « Plans d’expériences » <http://Fac.umc.edu.dz,79p,2020>, le 1/2/2023 à 20.30 1-13.
- Abdullah, R., Farooq, I., Kaleem, A., Iqtedar, M. and Iftikhar, T. (2018). Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using SSF. *Bangladesh J Bot.* 47:473– 8.
- Akhtar, M., Dickinson, E., Mazoyer, J. and Langendorff, V (2002). Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin, *Food Hydrocoll.* 16 :249–256.
- Alazi, E.; Niu, J.; Otto, S.B.; Arentshorst, M.; Pham, T.T.M.; Tsang, A.; Ram, A.F.J. W361R Mutation in GaaR, the Regulator of D-Galacturonic Acid-Responsive Genes, Leads to Constitutive Production of Pectinases in *Aspergillus Niger*. *Microbiologyopen* 2019, 8, e00732. [CrossRef] [PubMed].
- Aleksic B, Bailly S, Draghi M et al (2016) Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Build Environ* 106:265–273.
- Amid M., Manap Y., Zohdi K. (2014). Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *European Food Research and Technology.* 239:21–29.
- Amilia, K.R.; Sari, S.L.A.; Setyaningsih, R. Isolation and screening of pectinolytic fungi from orange (*Citrus nobilis* Tan.) and banana (*Musa acuminata* L.) fruit peel. In *IOP Conference Series: Materials*.
- Anand, G., Yadav, S., Gupta, R. & Yadav, D. (2020). Pectinases: from microbes to industries. *Microorganisms for sustainable Environment and Health*, 287-313.
- Anand, G., Yadav, S., Gupta, R. & Yadav, D. (2020). Pectinases: from microbes to industries. *Microorganisms for sustainable Environment and Health*, 287-313.

- Anand, G., Yadav, S., Yadav, D., 2016. Purification and characterization of poly galacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber. 3 Biotech 6, 201–207.
- Asgarivessal, M., Mirzaei, S., and Soltani, J. (2023). Heterothallism and sexual reproduction in the Iranian isolates of *Aspergillus flavus*. Mycol. Iran. 10, 33–44.
- Asghar, U., Rehman, U., Qader, U., Maqsood, T. (2013). Influence of phytic acid and its metal complexes on the activity of pectin degrading polygalacturonase. Carbohydrate polymers. 95(1). pp 167–170.
- Badalyan, S. M. (2014). “Potential of mushroom bioactive molecules to develop healthcare biotech products” in Proceedings of the 8th International Conference on mushroom biology and mushroom products (ICMBMP8). (New Delhi: Yugantar Prakashan Pvt. Ltd), 373–378.
- 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.
- Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, SKS, Muniraj, I., et Uthandi, S. (2021). Optimisation et mise à l'échelle de la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* par fermentation en milieu solide de tourteaux d'huile comestible. BMC Biotechnology, 21(1).
- Barker, K. (1996). Proceedings of the cellulytic and pectolytic enzymes in the nematode, *aphelenchus avenae*. The helminthological society of washington. 33(2).
- Bassim Atta, M. and Ruiz-Larrea, F. 2022. Fungal Pectinases in Food Technology. In: Pectins - The New-Old Polysaccharides (Ed. Martin Alberto Masuelli). IntechOpen; 10.5772/intechopen.100910.
- Belkadi, T, Makked , L . Traitement des margines d'olives par coprécipitations en utilisant les plans d'expériences [Mémoire de Master. Université de Tizi-Ouzou, Faculté des sciences ,2016.
- Belmessikh A, Boukhalfa H, Mechakra-Maza A, Gheribi-Aoulmi Z, Amrane A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*: Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. Ind Crop Prod. 2013; 44:377–85.

- Belmessikh, A., Boukhalifa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., et Amrane, A. (2013). Optimisation statistique du milieu de culture pour la production de protéases neutres par *Aspergillus oryzae*. Étude comparative des fermentations en milieu solide et immergé sur marc de tomate. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 377–385.
- Benkahoul malika, Belmessikh Aicha, Boukhalifa Hayet, MechakraMaza Aicha (2017). Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels.
- Bennamoun L, (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides Sahariens Purification et caractérisation enzymatique (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase.
- Bennamoun, L., Meraihi, Z., & Dakhmouche, S. (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par **Aspergillus oryzae** Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. **Journal of Food Engineering*, 64*(3), 257–264.
- Bennett, J.W.(Ed.). (2010).Anoverview of thegenus *Aspergillus*.Caister Academic, 16 :497–516.
- Benoist D, Tourbier Y, Germain-Tourbier S (1994). Plans d'expériences : construction et analyse. Paris : Technique et documentation-lavoisier. 695 p.
- Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Rodríguez-Juan E, González-Benjumea A, Fernández-Bolaños J. Molecular interactions between 3,4-dihydroxyphenylglycol and pectin and antioxidant capacity of this complex in vitro. *Carbohydr Polym*. 2018;197:260–268.
- Bhatt, P. (Ed.), 2023. Industrial applications of microbial enzymes, First edition. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton
- BIOFAMRA. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. N° 25 mars, 2002.
- Boudoukha, C., (2017-2018). Enzymologie appliquée. Master 1 biochimie appliquée. Université ferhat abbas sétif. Algérie.
- Brejnholt, S. M. (2009). Pectin. In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents* (pp. 237-265): Wiley-Blackwell.

- B.T. Hoa, P. VHung, Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology, Int. Food Res. J. 20 (2013) 3269–3274.
- Buyukkileci, A.O.; Tari, C.; Fernandez-Lahore, H.M.; Genckal-Demir, H.; Gogus, N., 2010. Optimization of exo-polygalacturonase production from orange peel by *Aspergillus sojae*. J. Biotechnol. 150S, S414–S415.
- Buzzini, P. and Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeastlike strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology. 93:1020–102.
- Cai, Y.; Yang, G. Enzyme Cocktail with Hyperactive Lipase through Solid-State Fermentation by the Novel Strain *Penicillium sp.* Y-21. Sci. Rep. 2023, 13, 14527. [CrossRef] [PubMed].
- Caceres R., Coromina N., Malinska K., Marfa O. (2015). Evolution of process control parameters during extended co-composting of green waste and solid fraction of cattle slurry to obtain growing media. Bioresource Technology, 9(179), 398–406.
- Canteri-Schemin, M. H., Fertoni, H. C. R., Waszczynskyj, N., & Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48, 259-266.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec&Doc champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. Carbohydrate Polymers, 161, 118–139.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. Carbohydrate Polymers, 161, 118–139.
- Chang, S. T., and Miles, P. G. (2004). Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact, 2nd Edn. (CRC Press), 480.

- Chekroune ,M. Etude de comparative de deux techniques de séchage (convection et micro-onde) par application des plans d'expérience. Cas du fruit de datte [Mémoire de Magister]. Boumerdes : Université de Boumerdes, Faculté des Sciences de l'Ingenieur, 2008.
- Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., et al., 2016. A Novel Acid-Stable Endo-Polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, Characterization, and Application in the Beverage Industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6:989-998.
- Christiaens, S., Uwibambe, D., Uyttbroeck, M., Van Droogenbroeck, B., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting point for waste valorisation in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 275-282.
- Combo, A.M.M., Aguedo,M.et Paquot,M .(2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. 15(1): 153-164.
- Couto, S. R. et M. A.Sanroman (2006). "Application of solid-state fermentation to food.
- Dakhmouche S, (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zone aride. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine.
- De Castro RJS; Sato H, (2015). Production d'enzymes par fermentation à l'état solide : Aspects généraux et analyse de la physique Caractéristique biochimiques des substrats pour la valorisation des déchets agro-industriels. *Valorisation de la biomasse des déchets*, 6, 1085-1093.
- Doan, C.T., Chen, C.L., Nguyen, V.B., et al., 2021. Conversion of Pectin-Containing By-Products to Pectinases by *Bacillus amyloliquefaciens* and its applications on hydrolyzing Banana Peels for Prebiotics Production. *Polymers*, 9:1483.
- Duchiron, F. et E. Copinet (2011). "Fermentation enMilieu Solide (FMS)." *Technique de l'ingénieur : Dufresne P.* 2018. Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique.pp.1-64.
- Dutta S (2016). *Optimization in Chemical Engineering*. India: Cambridge University Press. 375p.

- Edwards, M.C., Henriksen, E.D., Yomano, L.P., et al., 2011. Addition of Genes for Cellobiase and Pectinolytic Activity in *Escherichia coli* for Fuel Ethanol Production from Pectin-Rich Lignocellulosic Biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 15 :5184-5191.
- Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T., Viniegra-González, G. (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food technology and biotechnology*, pp221 227.
- Fenghour, H., Ladjama, A., Taibi, Z. (2002) Recherche de l'activite pectinolytique chez 22 souches de champignons microscopique isolées d'un sol de la région d'el kala. Université Badji-Mokhtar Annaba.
- FONS F, MOREL S AND RAPIOR S (2018). L'importance des champignons pour l'homme : intérêts, dangers et perspectives. *Annales de la société d'horticulture et d'histoire naturelle de l'Hérault*.157.
- Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*. 99: 4597-4602.
- Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*. 99 : 4597-4602.
- Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R (2016) Micro bial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6:1–13
- 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.
- Gomes,J., Zeni,J., Cence,K., Toniazzo,G., Treichel,H.andValduga,E.(2011). Evaluation of production and characterization ofpolygalacturonase by *Aspergillus Niger* ATCC9642.*Foodand bioproducts processing*.89: 281–287.
- Grassino, A. N., Halambek, J., Djaković, S., imac Brnčić, S., Dent, M., & Grabarić, Z. (2016). Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids*, 52, 265-274.
- Grassino, A. N., Halambek, J., Djaković, S., imac Brnčić, S., Dent, M., & Grabarić, Z. (2016). Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids*, 52, 265-274.

- Hajji. M, Rebai. A, Gharsallah. N, Nasri .M. 2008. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in Mirabilis jalapa tuber powder using statistical experimental design. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 79 ; 915–923.
- Hamma S et Saoudi S, (2016). Optimisation de la production des des xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13 xylanases chez par la méthode des plans d'expériences. Mémoire de master. Université A. MIRA - Bejaia.
- Handa S., Sharma N., Pathania S. (2016). Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus sp.* C4 under solid state fermentation. *Fermentation*. 2, 10; doi: 10.3390/fermentation2020010.
- Handa S., Sharma N., Pathania S. (2016). Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus sp.* C4 under solid state fermentation. *Fermentation*. 2, 10.
- Happi Emaga, T., Ronkart, S. N., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*, 108(2), 463-471.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, S. G. A., Alsaadi, B. H., Althubiani, M. M., Awari, Z. I., Hussein, H. G. A., et al. (2023). Secondary metabolites, biological activities, and industrial and biotechnological importance of *Aspergillus sydowii*. *Mar. Drugs* 21 :441.
- Industrial Enzymes market. www.market and markets.com/industrial/enzymes. Visité le 25 février 2017.industry-A review." *Journal of Food Engineering* 76(3): 291-302.
- Iwasaki K., Inoue M. & Matsubara Y., 1998. Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 262-272.
- Jacob N, Poorna AC, Prema P. (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour Technol*; 99: 6697 701.
- Jaubert,S., Laffaire,J.B., Abad, P.andRosso, M.N. (2002). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett*. 522: 109 112.
- José Pablo, López-Gómez et Joachim Vénu,(2021),Revoir Rôle potentiel du solide séquentiel et du liquide immergé les fermentations dans une bioéconomie circulaire.

- KACHOUR L. 2005. Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité. Thèse de magistère, Département de Biochimie. pp.1-20.
- Kaczmarska, A., Pieczywek, P.M., Cybulska, J., et al., 2022. Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. Carbohydrate Polymers, 11890.
- Kammoun. R, Naili.B, Bejar. S. 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72, Grown on gruel . Bioresource Technology; 99; 5602–5609.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S. O., & Ralet, M.-C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. Annals of Botany, 114(6), 1319 1326.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S. O., & Ralet, M.-C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. Annals of Botany, 114(6), 1319 1326.
- Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P.K., Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus spp.* contamination in peanuts. Food Control 52:103–111.
- Kim, K. H. (2017). S3-1 Discovery of new bioactive metabolites from Korean wild mushrooms. 균학회소식 29, 21–22.
- Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax 2015; 70 (3): 270-7.
- Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crépeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from —Améliorée and —Mangol mango peels. Food Hydrocolloids, 22(7), 1345-1351.
- Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crépeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from —Améliorée and —Mangol mango peels. Food Hydrocolloids, 22(7), 1345-1351.

- Kumar, C.G., Kamle, A., Mongolla, P. and Joseph, J. Parametric optimization of feruloyl esterase production from *Aspergillus terreus* strain GA2 isolated from tropical agro-ecosystems cultivating sweet sorghum. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2011;21(9):947-953.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., and Jülich, W.-D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2, 285–299.
- Liu, Y., Sun, G., Li, J., Cheng, P., Song, Q., Lv, W., et al. (2024). Starter molds and multi enzyme catalysis in koji fermentation of soy sauce brewing: a review. *Food Res. Int.* 184 :114273.
- Lu, X., Lin, J., Wang, C., et al., 2016. Purification and characterization of exo-polygalacturonase from *Zygoascus hellenicus* V25 and its potential application in fruit juice clarification. *Food Science and Biotechnology*, 5:1379 1385.
- Ma, Y., Sun, S., Hao, H. and Xu, C. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016 ;88:479-487.
- Manachini P.L., Parini C., Fortina M.G. (1988). Pectic enzymes from *Aure basidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 682-685.
- Mao, G., Wu, D., Wei, C., et al., 2019. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science and Technology*, 65-78.
- Martos, M.A., Zubreski, E.R., Combina, M., Garro, O.A. and Hours, R.A. (2013). Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci Technol*. 33:332–8.
- Mat Jalil, T., Zakaria, N.A., Salikin, N.H., et al., 2023. Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 1.
- Mehta, S.A., Rana, M., Shaikh, N. and Patel, N. (2013). Optimization of physiological parameters for pectinase production from soil isolates and its applications in fruit juice clarification. *J Environ Res Dev*. 7 :1539–46.

- Melnichuk, N., Braia, MJ, Anselmi, PA, Meini, M.-R., et Romanini, D. (2020). Valorisation de deux déchets agro-industriels pour la production d'alpha-amylase à partir d'*Aspergillus oryzae* par fermentation en milieu solide. *Waste Management*, 106, 155–161.
- Mesbahi G., Jamalain J. & Farahnaky A., 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*, 19, 731-738.
- Mesfek F., (2014). Mémoire de magister en Biotechnologie, Étude écologique et taxonomique des champignons forestiers et morphologie des ectomycorhiziens du chêne vert dans la wilaya de Relizane. Université d'oran es-senia.
- Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K.-G., Lee, S. H., & Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology*, 102(4), 3855- 3860.
- Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K.-G., Lee, S. H., & Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology*, 102(4), 3855- 3860.
- 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.
- Namir, M., Siliha, H., & Ramadan, M. F. (2015). Fiber pectin from tomato pomace: characteristics, functional properties and application in low-fat beef burger. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(3), 305-312.
- Nazir, Z., Ijaz, S., Gul, R., Saleem, M. (2019). Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from grapes and its potential to improve juice quality. *Pakistan Journal of Zoology*. Vol. 51, Iss. 4. pp 1203-1598.
- Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., et al. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the *Aspergilli*. *Stud. Mycol.* 91.
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., . . . Azeredo, H. M. C. (2015). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*.
- Oliyad, J. (2017). Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. *International journal of environment, agriculture and biotechnology*. 1007-1014.

- Oumer, O. J. (2017). Pectinase: Substrate, Production and their Biotechnological Applications. International Journal of Environment, Biotechnology Agriculture (IJEAB),2(3).
- Oumer, O.J., & Abate, D. (2017). Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage S from coffee beans. Enzyme Res. 24(9), 53-60.
- Panda T, Kumar RA, Theodore T (2016). Statistical optimization of biological systems. New York: CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business. 290p.
- Patidar MK, Nighojkar S, Kumar A, Nighojkar A (2018) Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. 3 Biotech 8:1–24.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. Carbohydrate Polymers, 101, 786-791.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. Carbohydrate Polymers, 101, 786-791.
- Priesterjahn, E.-M., Geisen, R., and Schmidt-Heydt, M. (2020). Influence of light and water activity on growth and mycotoxin formation of selected isolates of *Aspergillus f lavus* and *Aspergillus parasiticus*. Microorganisms 8:2000.
- R Ketipally and MR Ram. Optimization of pectinase production by *Aspergillus oryzae* RR 103. Curr. Agr. Res. J. 2018; 6, 37-44.
- R. Abdollahzadeh, M. Pazhang, S. Najavand, V. Fallahzadeh-Mamaghani, A.R. Amani-Ghadim, Screening of pectinase-producing bacteria from farmlands and optimization of enzyme production from selected strain by RSM, Folia Microbiol. 65 (2020) 1–15.
- Ramachandran S. (2005). Isolation, purification and characterization of pectinase from *Penicillium citrinum*. Thèse de doctorat, Université Mahatma Gandhi, Inde.
- Reddy. L.V.A, Wee. Y.J, Yun. J.S., Ryu. H.W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. Bioresources and Technology; 99; 2242–2249.

- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., Gautieri, A. (2018). Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *Apl bioengineering*, 2(1), 011501.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M. K., Barua, R., and Hossain, M. T. (2018). Extracellular Pectinase from a Novel Bacterium *Chryseobacterium indologenes* Strain SD and Its Application in Fruit Juice Clarification. *Enzyme Research*, 2018, 17.
- Ruiz H.A., Rodriguez-Jasso R.M., Hernandez-Almanza A., Contreras-Esquivel J.C., Aguilar C.N. (2017). Pectinolytic enzymes. In: Pandey A., Negi S., Soccol C.R. (Eds), *Current developments in biotechnology and bioengineering. Production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier, London, pp. 47–71.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., and Iacomini, M. (2016). Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr. Polym.* 136, 358–375.
- Saharan, R., Sharma, K.P. (2019). Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). *Biocatal Agric Biotechnol* 21:101306.
- Samreen, P., Manipuri, M., Grover, S., et al., 2019. Production of Pectinases and Pectinolytic Enzymes: Microorganisms, Cultural Conditions and Substrates. *Advances in Biotechnology and Microbiology*, 14(2):555884.
- Sandri I.G., Fontana R.C., da Silveira M.M. (2015). Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *LWT- Food Science and Technology*. 61(2): 430–436.
- SCHOLS H.A. & VORAGEN A.G.J. (2002). La structure chimique des pectines. In : *Pectines and their Manipulation*. Blackwell Publishing Ltd, 129.
- Schols HA, Visser R.G.F, Voragen A.G.J. (2009). *Pectin and pectinases*. Wageningen Academic publisher, Wageningen, Netherlands. Science and Engineering; IOP Publishing: Bristol, UK, 2017. [CrossRef].
- Sharif-rad j, butnariu m, ezzat s.m, adetunji c.o, imran m, sobhani s.r, tufail t, hosseinabadi t, ramirez-alarco k, martorell m, maroyi a and martins n (2020). Mushrooms-rich preparations on wound healing: from nutritional to medicinal attributes. *Front. Pharmacol.* 11, 567518.

- Sharma N., Rathore M., Sharma M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 12(1) : 45-60.
- Sharma, D.C., Mishra, A.K., Mishra, K.K. 2023. Fungal Pectinases: Diversity and Multifarious Applications. In: *Fungi and Fungal Products in Human Welfare and Biotechnology* (Eds. Satyanarayana, T. and Deshmukh, S. K.). Springer Nature Singapore, pp. 435-464.
- Shen, Z., Denton, M., Mutti, N., Pappan, K., Kanost, M., Reese, J. and Reeck, G. (2003). Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*. 3: 1–9.
- Singh P., Dwivedi U.N. (2008). Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit. *Food Chemistry*. 111: 345–349.
- Satpathy, A., Mukherjee, K. et Nigam, VK. Culture par lots et optimisation de la production de pectinase à partir de *Bacillus* sp. (BIOSMNF02) grâce au modèle quadratique RSM-D optimal. *Biomass Conv. Bioref.* 14 , 31979–31990 (2024).
- Subramaniam, R. et Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nature*. 3(3) : 480486..
- Suleiman, W. B. (2023). A multi-aspect analysis of two analogous *Aspergillus spp.* belonging to section Flavi: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *BMC Microbiol.* 23 :71.
- Sylvie, P .2015. La classification des champignons ; laboratoire de botanique, phytochimie et mycologie / umr - cnrs 5175 cefe, faculté de pharmacie, 15 avenue charles flahault, université montpellier i, bp 14491, 34093 montpellier cedex 5, France.
- Taskin M. (2013). Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172.
- Thakur B.R., Singh R.K. & Handa A.K., 1997. Chemistry and uses of pectin: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37(1), 47-73.
- Ting, W. E., Chang, C.-H., Szonyi, B., and Gizachew, D. (2020). Growth and aflatoxin B1, B2, G1, and G2 production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground flax seeds (*Linum usitatissimum*). *J. Food Prot.* 83, 975–983.

- Venzon, S. S., Canteri, M. H. G., Granato, D., Junior, B. D., Maciel, G. M., Stafussa, A. P., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4102-4112.
- Venzon, S. S., Canteri, M. H. G., Granato, D., Junior, B. D., Maciel, G. M., Stafussa, A. P., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4102-4112.
- Wada, R., Maruyama, J., Yamaguchi, H., Yamamoto, N., Wagu, Y., Paoletti, M., et al. (2012). Presence and functionality of mating type genes in the supposedly asexual filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2819–2829.
- 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.
- Wang, X.-M., Zhang, J., Wu, L.-H., Zhao, Y.-L., Li, T., Li, J.-Q., et al. (2014). A mini review of chemical composition and nutritional value of edible wild grown mushroom from China. *Food Chem.* 151, 279–285.
- Watarai N, Yamamoto N, Sawada K, Yamada T (2019) Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Res* 26(6):465–472.
- Yamashita, H. (2021). Koji starter and koji world in Japan. *J. Fungi* 7:569.
- Zdunek, A., Pieczywek, P.M., Cybulska, J. 2020. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1:1101-1117.
- Zhao, H. (2005). Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, 37(1-6), pp 16–25.

Annexes

Annexe 1 : Milieu PDA

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

Stérilisation à 121°C pendant 20 minutes.

• Préparation de l'extrait pomme de terre

200g grammes de pommes de terre non pelées sont lavés, coupées en petits dés, puis ajoutées à un litre d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 30 min. Après cuisson, les morceaux de pommes de terre sont écrasés, filtrés, et le filtrat est complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final 1 litre.

• Préparation de milieu de culture

Le glucose et l'agar sont dissous à chaud dans l'extrait, puis le volume est ajusté à un litre avec de l'eau distillée.

Annexe 2 : Préparation des solutions tampon

Solution tampon acétate de sodium, PH=5

Acétate de sodium.....2,05 g

Acide acétique.....1,45ml

Eau distillée.....500ml

Préparation de NaOH (2N)

NaOH.....8g

Eau distillée.....100ml

Réactif de DNS

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

Annexe 3 :

Tableau : les poids moléculaires

Milieu	Poids vide	Poids humide	Poids sec après 72h
Milieu liquide 1	7,4456	9,3718	7,5034
Milieu liquide 2	7,0802	9,2745	7,1593
Milieu submergé 1	7,2627	32,1528	8,1374
Milieu submergé 2	7,5321	31,8737	8,4060
Milieu solide 1	7,0388	9,5211	8,8462
Milieu solide 2	7,2690	11,1890	10,0744

Annexe 4 : Milieu Pectine-agar

Pectine.....	5g
Extrait de levure.....	2g
Agar.....	5g
Eau distillée.....	8g
PH =5	

Stérilisation à 110°C pendant 20 minutes.

Annexe 5 : Eau iodée (Lugol)

Iode.....	0,60g
Iodure de potassium.....	3,02g
Eau distillée.....	200ml

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : FERDI Hadil BOUFENNARA Nourhane Malak
Expression pectinolytique d' <i>Aspergillus oryzae</i> : optimisation sur substrat agro - industriel	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie	
<p>Résumé : Ce travail a pour objectif de déterminer les conditions de culture les plus favorables à la production de pectinase par <i>Aspergillus oryzae</i>, à partir de résidus d'oranges utilisés comme substrat, et d'optimiser cette production à l'aide de méthodes statistiques. Dans un premier temps, la souche fongique est réactivée sur milieu PDA, puis utilisée pour ensemercer des milieux solides, liquides et submergés préparés à base de déchets d'oranges. L'activité de la polygalacturonase (PG) (EC 3.2.1.67) est dosée par la méthode au DNS. L'effet du type de fermentation sur la production enzymatique est comparé. Dans un second temps, les plans statistiques de Plackett et Burman et de Box et Wilson sont respectivement utilisés pour identifier et optimiser les facteurs influençant la production de pectinase. Le plan de Plackett-Burman (PBD) est appliqué pour cribler sept variables, dont cinq réelles : la concentration en déchet, la taille des particules, l'humidité, la pectine et l'extrait de levure. Les résultats obtenus montrent que les facteurs significatifs influençant la production d'enzyme par la moisissure <i>Aspergillus oryzae</i> sont : l'humidité et la concentration en déchet. Les valeurs optimales des variables étudiées sont déterminées par la méthodologie de surface de réponse à savoir : L'humidité 84,14%, et la concentration de déchet 4,48 %. La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la pectinase de 25,742 UI/gs plus élevée que dans les conditions non optimisées.</p> <p>Ces résultats significatifs soulignent l'importance des approches statistiques dans l'optimisation de la production de pectinase par fermentation.</p>	
Mots-clés : <i>Aspergillus oryzae</i> , pectinase, fermentation, déchets d'oranges, Plackett-Burman, Box-Wilson optimisation.	
Laboratoires de recherche : laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<p>Président du jury : Mme KASSA-LAOUR M. (M.C.B- U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p>Encadrant : Mme BENNAMOUN L. (M.C.A- U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p>Examineur(s) : Mme DAKHMOUCHE S. (Professeur, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).</p>	