

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université M'hamedBougaraBoumerdes

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Génie des procédées

Filière : génie des procédées

Option : génie Alimentaire

**THEME : purification de deux enzymes pectinolytiques synthétisées
par *Aspergillus niger* . Applications de ces enzymes pour la
macération de la purée d'abricot.**

Présenté par : Benhaoua Moussa
Allek Taher Yacine

Soutenu le : 13/07/2019

Jury:

Président : SEKOUR
Examineur : ABDELAQUI
Promoteur : BENMALEK

UMBB
UMBB
UMBB

Table des matières

<u>Titre</u>	<u>Page</u>
Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des Figure	
Résumé	
Introduction	1
Partie théorique	
Chapitre I : substances pectiques	3
1. Généralités sur les substances pectiques.....	5
2. Les substances pectiques	5
2.1 Localisation des substances pectiques dans la paroi cellulaire des végétaux	
2.2 La lamelle moyenne	6
2.2.1 La paroi primaire	7
2.2.2 La paroi secondaire	7
2.3 Rôle des substances polysaccharides dans la paroi cellulaire	7
2.4 Structure moléculaire des substances pectiques	8
2.4.1 Les homogalacturonanes	9
2.4.2 Les rhamnogalacturonanes (RG)	10
2.4.2.1 Rhamnogalacturonanes type I	10
2.4.2.2 Rhamnogalacturonanes type II	10
2.5 Sources des substances pectiques	11
2.6 Type des substances pectiques	12
2.6.1 Les pectines H.M (pectines hautement méthylées)	12
2.6.2 Les pectines F.M (pectines faiblement méthylées)	12
2.6.3 Les pectines moyennement méthylées	12
3. Hydrolyse enzymatique de la pectine	14
3.1 Les enzymes pectinolytiques.....	15
3.2 Classification des enzymes pectolytiques et leur mode d'action	16
3.2.1 Les pectinestérases	17
3.2.2 Les polygalacturonases (enzymes de dépolymérisation)	19
3.2.2.1 Les endopolygalacturonases (endo PG)	19
3.2.2.2 Les exopolygalacturonases (exo PG)	19

3.2.3	Les pectines lyases	20
3.2.4	Les pectates lyases	20
4.	Utilisation industrielle des enzymes pectolytiques	21
4.1	Production des enzymes pectolytiques	22
4.1.1	Procédés de bioproduction des enzymes pectolytiques.....	22
5.	Fermentation sur milieu solide	22
5.1	Microorganismes utilisés pour la production industrielle des pectinases.....	23
5.1.1	Données microbiologique sur l'Aspergillus Niger	23
5.1.2	Description de l'Aspergillus Niger	24
5.1.3	Propriétés génétiques d'Aspergillus Niger	25
5.1.4	Utilisation biotechnologiques de l'Aspergillus	25
5.1.5	Bioconversion des résidus agroalimentaires par l'Aspergillus pour la production des pectinases	26
6.	Fermentation en milieu solide (FMS)	27
6.1	Qu'est-ce que la fermentation	27
6.2	Définition scientifique	27
6.3	Définition industrielle	27
6.4	Définition de la fermentation en milieu solide	28
6.5	Paramètres influençant la fermentation en milieu solide (FMS).....	28
6.5.1	Aération et oxygène	28
6.5.2	PH	29

Chapitre II : clarification de jus d'abricots

1.	Donnés générales sur les jus	30
2.	Clarification éventuelle des jus	30
3.	La nature des troubles dans les jus	30
4.	Composition biochimique de l'abricot	31
5.	Morphologie et structure de l'abricot	33
6.	Transformation industrielle des abricots	34
7.	La clarification de jus d'abricots	34
7.1.	La clarification par enzymage et collage	34

Partie pratique

Chapitre I. Matériel et méthodes.....

1 Matériels biologique	36
2 Préparation de l'inoculum	36
3 Matériel végétal	36
4 Préparation de milieu de culture	36
4.1 Inoculation des milieux de cultures	36
5 Extraction des enzymes pectinolytiques	37
6 Dosage des protéines dans EEB	37
7 Recherche des activités enzymatiques dans l'EEB	37
7.1 Dosage de l'activité de l'endopolygalacturonase	37
7.2 Dosage de l'activité exopolygalacturonase (exo-PG)	38
7.3 Dosage de l'activité de la pectine lyase	38
8. Purification des enzymes	39
8.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut	39
8.2. Dialyse et concentration de l'extrait enzymatique	39
8.3. Purification de l'extrait enzymatique (EEPP)	40
8.3.1. Appareillages employés	40
8.4. Dépôt de l'échantillon	41
8.5. Elution	41
8.6. Analyse des fractions récupérées	41
9. Détermination de poids moléculaire des enzymes récupérées	41
10. Applications des extraits enzymatiques à la clarification d'un jus	42
10.1. Obtention et clarification de jus d'abricots	42

Chapitre II. Résultats et discussion.....

1. Détermination de la teneur en eau	44
1.1 Teneur en eau de résidu avant la fermentation	44
2 Développement sur milieu PDA de l'<i>Aspergillus</i>	46
3 Dosages des protéines dans les extraits enzymatiques	47
3.1 Extrait enzymatique brut	48
3.2 Extrait enzymatique pré-purifié	48
4 Dosage des activités enzymatiques dans l'EEB et l'EEPP	50
4.1 Activité polygalacturonasique	50
5. Profil de purification des enzymes pectolitiques sur SéphadexG75	52

6. Détermination du poids moléculaire des fractions purifiés	55
7. Application des extraits enzymatiques sur les abricots	57
7.1. Caractéristiques du jus d'abricot obtenu.....	58
Conclusion	60
Références bibliographiques
Annexe.....

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents types des substances pectique et leurs propriétés. (Sathyanarana et al., 2007)	2
Tableau 2: Composition biochimique de l'abricot	38
Tableau 3: Teneur en eau dans le résidu d'oranges.	54
Tableau 4: Teneur en eau dans le milieu de fermentation.	54
Tableau 5: Concentration des protéines solubles dans l'EEB.	58
Tableau 6: Concentration des protéines solubles dans l'EEPP.	58
Tableau 7: Activité polygalaturonasiq.	61
Tableau 8: Activité pectine-lyase.	61
Tableau 9: Tableau de purification.	63
Tableau 10: Poids moléculaires des enzymes récupérées.	66
Tableau 11: Volume de jus récupéré.	67
Tableau 12: Caractéristiques optiques du jus clarifié par les extraits enzymatiques . .	68

Table des figures.

Figure 1: Structure de la pectine (Bestile et Jouany., 1990).	3
Figure 2: Configuration schématique de l'architecture de la paroi primaire des végétaux (Bekouche.,2006).	3
Figure 3: Localisation des substances pectiques dans la paroi cellulaire des végétaux.	4
Figure 4: les sucres simples constituant la chaîne pectique (Worth., 1967).	6
Figure 5: Structure des squelettes de pectines (Bekouche., 2006).	7
Figure 6: Structure primaire d'un homogalacturonane.(Combo et al., 2011)	7
Figure 7: Schéma d'estérification par le méthanol ou d'acétylation par l'acide acétique de l'acide α-D- galacturonique (Ducasse., 2009).	8
Figure 8: Structure d'un rhamnogalacturonane.(Belhamri., 2011).	9
Figure 10:mécanismes de dégradation de la chaîne homogalacturonate (Combo et al.,2011).	18
Figure 11/A: les différentes voies de dégradation enzymatique des pectines (Tabuc., 2007).	19
Figure 12: Action pectine-lyase (Tabuc., 2007).	24
Figure 13: Activité des pectines-lyase(Tabuc.,2007).	25
Figure 14: Structure d'abricots (Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie).	41
Figure 15: Dessalement par dialyse (webdepot.ca).	48
Figure 16: Diagramme appliqué pour production du jus d'abricot.	51
Figure 17: Résidus d'oranges avant fermentation.	55
Figure 18: Résidus d'oranges dans les milieux de fermentations.	56
Figure 19: 2^{ème} jour de culture	56
Figure 20: 3^{ème} jour de culture	56
Figure 21: 5^{ème} jour de culture	57
Figure 22: Courbe d'étalonnage de BSA.	57
Figure 23: Extrait enzymatique dans un boudin de dialyse.	59
Figure 24: Boudin de dialyse dans une solution de saccharose.	59
Figure 25: Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.	60
Figure 26: Courbe d'élution de l'EEPP sur Séphadex G75. (Débit : 0.84ml/min)	62
Figure 27: Extraits enzymatiques purifiés.	63
Figure 28: Courbe des protéines standards.	65
Figure 29: Courbe d'étalonnage des protéines standards. (Séphadex G75)	66
Figure 30: Le jus obtenu par macération de la purée d'abricots.	67
Figure 31: Action des extraits enzymatiques sur le jus d'abricot.	69

Résumé

La purification de deux enzymes pectinolytiques (une pectine lyase "PL" dont le PM est 83.17 K Da et une enpolygalacturonase "endoPG" dont le PM est de 70.79 Kda) a été réalisée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie de gel de filtration séphadex G75, les facteurs de purification ont été de 1226.688 et 22,85 avec des rendements de l'ordre de 30.89% et 0.17% pour l'endoPG et la PL respectivement.

Ces enzymes ont été obtenues par culture microbienne des *Aspergillus* noirs sur les résidus d'oranges en milieu solide, ce milieu a montré sa spécification pour la production des pectinases.

L'utilisation de ces enzymes pour la production du jus de fruit d'abricot a nettement amélioré le rendement en jus qui a été de l'ordre de 59.33% sous l'action de l'extrait enzymatique brut (EEB), 68% sous l'action de l'extrait enzymatique pré-purifié (EEPP), et de 38% sous l'action de l'extrait enzymatique purifié (EEP). Le jus traité par l'EEP était nettement plus limpide par rapport au jus témoin.

Mots clés: Enzymes pectinolytiques, Purification, Jus, *Aspergillus*.

Summary :

The purification process of two pectic enzymes (one pectin lyase with a molecular mass of 83.17 Kda and an endopolygalacturonase "endoPG" with a molecular mass of 70.79Kda) was realized with the precipitation of ammonium sulphate and a chromatography of a filtration gel named "Sephadex" G75, purification factors were 1226.688 and 22.85 with a yield of 30.89% and 0.17% for both endoPG and PL consecutively.

These enzymes were obtained by a solid state fermentation of a dark gender of *Aspergillus* cultivated on orange residues as a culture media, this culture medium proves that his specificity is helpful for the production of pectinases.

The usage of these enzymes for the production of apricot jus clearly elevated the yield jus which was 59.33% under the action of the primary enzymatic extract, 68% under the action of the pre purified enzymatic extract, and a 38% yield under the influence of the purified enzymatic extract. The jus that was treated by the primary enzymatic extract, was clearer than our witness jus.

Key words: pectic enzymes, purification, jus, *Aspergillus*.

:
تم إجراء عملية تنقية اثنين من إنزيمات التحلل البكتيني (PL الذي يبلغ PM EndoPG 83.17Kda يكون PM 70.79Kda) بواسطة كروماتوجرافيا الترسيب الهلامي لسلفات الأمونيوم والترشيح الهلامي Sephadex G75 ، عامل التنقية هو UI688.1226 EndoPG 30.89 PL UI22.851 . 0.17

تم الحصول على هذه الإنزيمات عن طريق الاستنبات الميكروبي لفطريات أسبيرجيلز الأسود على بقايا البرتقال في وسط

أدى استخدام هذه الأنزيمات لإنتاج عصير فواكه المشمش إلى تحسن كبير في العصير (59.33) EEB (68) EEPP (38) EEP. العصير المعالج بـ EEP أوضح بكثير مقارنة بعصير التحكم.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات البكتينية ، التنقية ، العصير

Introduction générale

La production et l'utilisation des enzymes fongiques sont très appréciées et attrayantes dans le domaine agro-alimentaire et dans l'industrie alimentaire grâce à la disponibilité et diversité des matières premières dans la nature, et grâce à leurs prix qui est perceptiblement bas. L'exploitation des résidus agroalimentaires comme Les écorces d'agrumes, Le son de blé, la pulpe de café, les graines du tournesol comme substrats de production microbienne des enzymes fongiques d'intérêt a permis d'élaborer des milieux de cultures d'une grande spécificité pour la production des enzymes à des activités enzymatiques spécifiques élevées et des quantités abondantes.

Ainsi comme pour leur grande capacité de production d'enzymes de type polysaccharidases dégradant la biomasse végétale, est dont la perspective de leurs purifications est leurs utilisations industrielles, nous nous sommes intéressés à une souche locale d'*Aspergillus niger* pour la production d'enzyme très convoitées dans le domaine alimentaire, à savoir les pectinase. **(Laretta-Garde.,1997).**

En effet les enzymes pectinolytiques sont utilisées dans l'industrie des fruits pour faciliter l'extraction, la clarification des jus et l'amélioration de leur rendement, elles sont utilisées pour l'extraction des huiles végétales, la liquéfaction des fruits et légumes, la fermentation du thé et du café et dans le domaine d'épuration des eaux riches en pectines, aussi bien dans l'industrie de textiles pour le nettoyage du coton et le dégommage des fibres des plantes.

Une augmentation considérable de la production d'agrumes a été remarquée depuis 1980, en 2010 l'estimation de la production était de l'ordre de 66,4 millions M tonne, ce qui a présente une augmentation de 14% comparativement à 1997 et 1999, plus de 30,1millions de MT de production sont destinées à la production du jus, des huiles essentielles et d'autres produits **(FAO, 2003).**

L'écorce d'agrumes représente 50% du poids de fruits, ce qui effectue un problème environnemental majeur dans plusieurs industries. Ces résidus industriels sont riches en pectine, celluloses et hémicellulose **((Sathayanarayan et al., 2007).**

Dans notre travail nous avons essayé de récupérer les résidus d'oranges pour les utiliser comme seule source carbonée pour la production de pectinases à partir d'*Aspergillus niger*. On bénéficie par cette méthodologie deux points :

- points environnemental
- l'utilisation des produits à bas prix pour la production de produits valorisables recherchées dans le domaine alimentaire.

Ce mémoire est réparti en deux parties :

- 1) partie bibliographique : cette partie est divisée en 2 chapitres ;
 - Chapitre I : les substances pectiques et Les enzymes pectinolytiques
 - Chapitres II : La clarification des jus.
- 2) partie expérimentale :
 - Chapitres I : matériels et méthodes utilisés ;
 - Chapitres II : Résultats obtenus et leurs interprétations.

1. Généralités sur les substances pectiques:

La pectine est un additif alimentaire naturel largement utilisé, grâce à ces propriétés émulsifiantes, stabilisantes et gélifiantes (**Baïssise et al., 2010**).

Elle fut isolée par Bracanon en 1825 à partir des fruits qui se caractérisaient par leurs propriétés gélifiantes, après avoir constaté que la pectine est la molécule responsable sur ces propriétés (**Habibi., 2004**).

Elle fut nommée pectines, de grec pectos ce qui signifie rigide. L'analyse de cette « pectine » a permis de constater qu'il ne s'agissait pas d'une molécule mais d'un groupe de substances qui présentent une grande hétérogénéité. On les a appelés alors « substances pectiques » ou pectines (**Habibi., 2004**).

2. Les substances pectiques :

Les substances pectiques sont des macromolécules de nature glucidique d'origine exclusivement végétale (**Albagnac et al., 2002**). Elles sont définies comme étant un mélange d'hétéro polysaccharide (**Baïssise et al., 2010**) dont la chaîne principale est constituée d'ester polygalacturonique méthylé qui peut être composée de 300 à 1000 unités d'acides galacturoniques (**Yeoh et al., 2008**).

Selon la société chimique américaine les substances pectiques sont classées en 4 groupes : protopectines, acide pectique, acide pectinique et pectine (**Faravash et Zokaie., 2008**). Le tableau (1) représente les différents types des substances pectiques.

L'hétérogénéité des substances pectiques est due aux différences dans leurs degrés d'estérification leurs méthodes d'extractions et leurs poids moléculaire qui varient de 25 à 350 kDa pour une variété de fruits et légumes (agrumes, pommes et poires) (**Sathayanarayan et al., 2007**).

Elles sont le constituant majeur de la paroi végétale, lamelle moyenne et la paroi primaire de plantes supérieures, elle représente 22 à 30% du poids sec des écorces d'agrumes et une proportion importante subsiste dans les jus de fruits (**Yeoh et al., 2008, Fenghour et al., 2002**).

Tableau 1 : Les différents types des substances pectique et leurs propriétés.
(Sathyanarana et al., 2007)

Substances	Description	Propriétés
Protopectine	Unités de galacturonates liés par liaison à (1-4) glycosidique, les groupements carboxyliques sont hautement estérifiés par le méthanol, elles peuvent être liées aux cations bivalents Ca^{++} .	Insolubles dans l'eau, degré d'estérification est supérieur à 90 %
Pectine	Unités de galacturonates liés par liaison glycosidique en a (1-4), les groupements carboxyliques sont estérifiés par le méthanol.	Soluble dans l'eau, degré d'estérification est entre 75% et 90%.
Acide pectinique	Unité de galacturonate liées par liaison glycosidique en a (1-4), les groupements carboxylique faiblement méthylé sont estérifie par le méthanol.	Soluble dans l'eau, le degré d'estérification est entre 0% et 75%.
Acide pectique	Unité de galacturonate liées par liaison glycosidique en a (1-4).	Soluble dans l'eau, le degré d'estérification est 0%
Rhamnogalacturane	Unités de galacturonates liés par liaison glycosidique en a (1-4) avec le rhanose en O (1-2) et P (1-4).	Soluble dans l'eau

Elles jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux en formant un ciment rattachant les cellules les unes aux autres. Les pectines sont constituées essentiellement par des résidus d'acide galacturonique liés entre eux par des liaisons a-(1-4), partiellement acétylés ou estérifiés par des groupes méthyles (figure 1) (Combo et col, 2011).

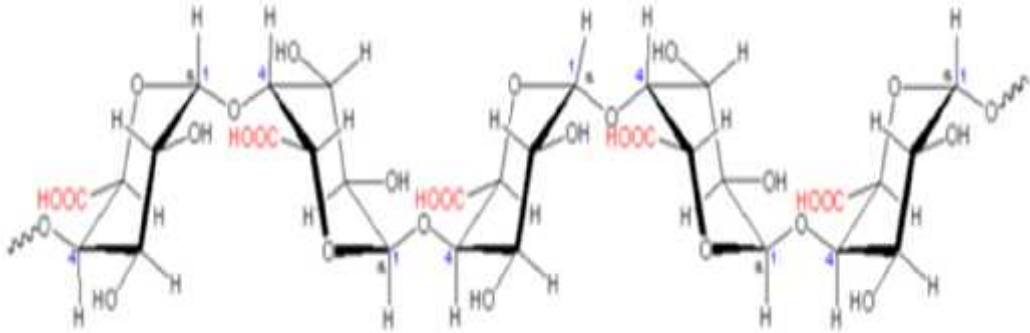


Figure 1: Structure de la pectine (Bestile et Jouany., 1990).

2.1 Localisation des substances pectiques dans la paroi cellulaire des végétaux :

La paroi cellulaire végétale est une organisation supramoléculaire de polysaccharides et d'éléments. Pondéralement mineurs : lignine, protéines de structure, enzymes, composés phénoliques, lipides et minéraux. Les polymères forment un réseau tridimensionnel ou une trame fibrillaire de cellulose est enchâssée dans une phase amorphe.

La figure N°02 représente la distribution des constituants de la paroi des cellules végétale :

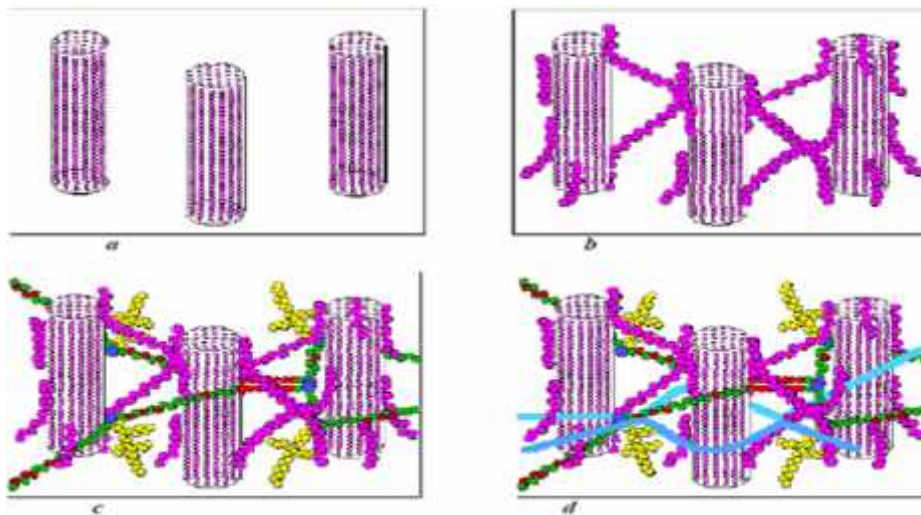


Figure 2: Configuration schématique de l'architecture de la paroi primaire des végétaux (Bekouche.,2006).

Les molécules de cellulose (chaînes de (3-glucose) sont associées sous forme de microfibrilles (a). Certaines hémicelluloses comme les xyloglucanes permettent le positionnement des fibrilles cellulosiques entre elles. Cellulose et xyloglucanes sont réunis

par des liaisons H (b).

Un réseau supplémentaire composé de pectines augmente la complexité de la matrice (c). A la fin de la croissance le réseau polysaccharidique peut être solidifié par un réseau secondaire de protéines composé "Hydroxyproline Rich Glyco Proteins " (HRGP) (d).

L'observation microscopique de la paroi végétale est distinguée par trois états d'organisation : la lamelle moyenne, la paroi primaire, la paroi secondaire. (**Larreta-Garde., 1997**).

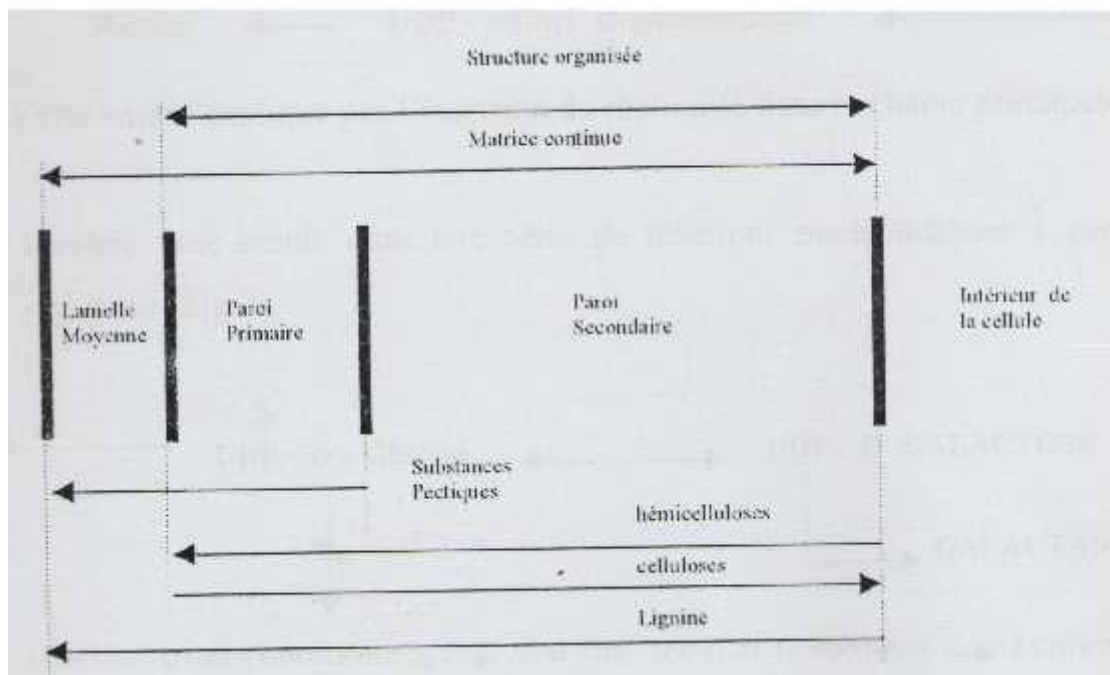


Figure 3: Localisation des substances pectiques dans la paroi cellulaire des végétaux.

2.2 La lamelle moyenne :

Partie commune située entre deux cellules voisines dont le rôle est d'assurer la cohésion entre les cellules. Son épaisseur varie de 0,2 à 1 μ m (**Bidlack et al., 1952**).

La lamelle moyenne est essentiellement constituée de substances pectiques, on pense généralement qu'elle est stabilisée sous forme d'un gel. Ce gel serait formé par l'association de chaînes pectiques, au niveau des zones homogalacturoniques non estérifiées, par l'intermédiaire d'ions calcium. Les relations entre les substances pectiques de la lamelle moyenne et de la paroi primaire sont difficiles à préciser. Il semble que la proportion de zones rhamnogalacturoniques soit plus importante dans la paroi primaire

(Larreta-Garde., 1997).

2.2.1 La paroi primaire :

Les polysaccharides s'organisent et interagissent entre eux pour former la paroi primaire.

La plus mince (0,1-0,2 µm), constitue la seule enveloppe fibrillaire des cellules en croissance et montre une grande plasticité. Elle présente une structure biphasique, où les microfibrilles de cellulose sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines.

La paroi cellulaire primaire est composée de 9-25% de cellulose, de 25-50% d'hémicellulose, 10-35% de pectines et 10% de protéines **(Brudieux., 2007).**

2.2.2 La paroi secondaire :

Se forme lors de la différenciation des cellules. La paroi s'épaissit alors par des dépôts de cellulose en couches orientées qui confèrent à la paroi une grande résistance mécanique, et peut s'imprégner de lignine, notamment dans les tissus de soutien et les vaisseaux conducteurs. Cette paroi secondaire inextensible est faiblement hydrophile. **(Larreta-Garde., 1997)**

2.3 Rôle des substances polysaccharides dans la paroi cellulaire :

La paroi cellulaire végétale est donc formée majoritairement de polysaccharides dont la structure et les relations intermoléculaires peuvent expliquer cinq grandes fonctions :

- Elle assure l'extension du réseau intercellulaire.
- Elle contribue à l'adhésion des cellules dans la lamelle moyenne
- Elle limite la porosité de la paroi cellulaire.
- Elle contribue au maintien de l'équilibre physico-chimique du symplaste (eau et ions).
- Elle assure la transduction de signaux extracellulaires vers le milieu intracellulaires au travers de la libération d'oligosaccharides bioactifs **(Brudieux., 2007).**

Dans les fruits et légumes, la composition moyenne de la paroi est proche de celle des

parois primaires, ce qui reflète la prédominance des parenchymes de réserve dans ces tissus végétaux. Ils comportent cependant toujours une certaine proportion de tissus secondaires, provenant des tissus conducteurs (**Larreta-Garde., 1997**).

2.4 Structure moléculaire des substances pectiques :

La pectine est probablement la biopolymère le plus complexe, elle peut être constituée de 17 différents monosaccharides (figure N°04) (**Raletet al., 2008**).

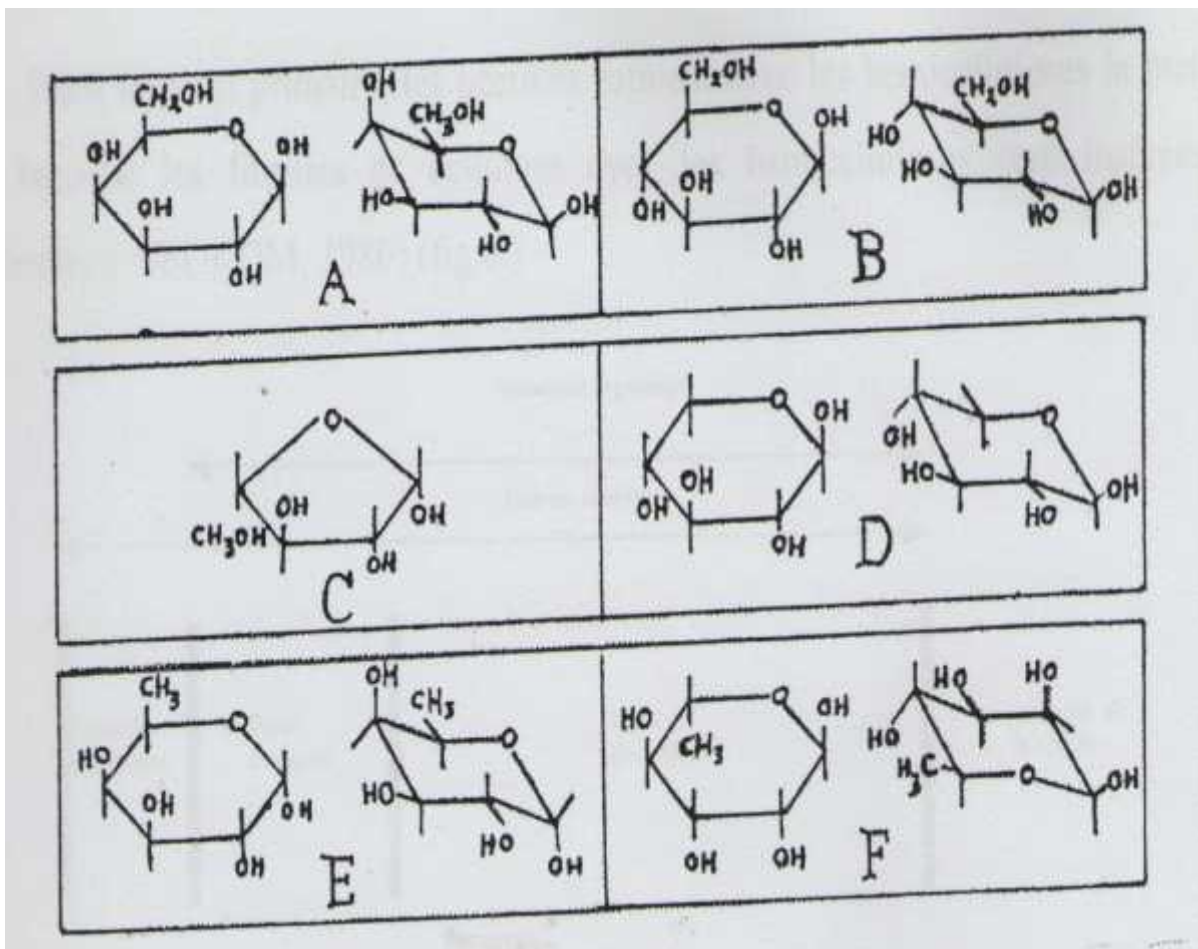


Figure 4: les sucres simples constituant la chaîne pectiques (Worth., 1967).

[A= d galactose ; B= d glucose ; C= l arabinose; D= d xylose; E = d fructose; F= l rhamnose].

Le squelette pectique est formé de T alternance de la région d'homogalacturonanes (HG) (zone lisse) et de la région de rhamnogalacturonanes (RG) (zone hérissée) substituées riche en sucres neutres (**Bekouche.,2006**).

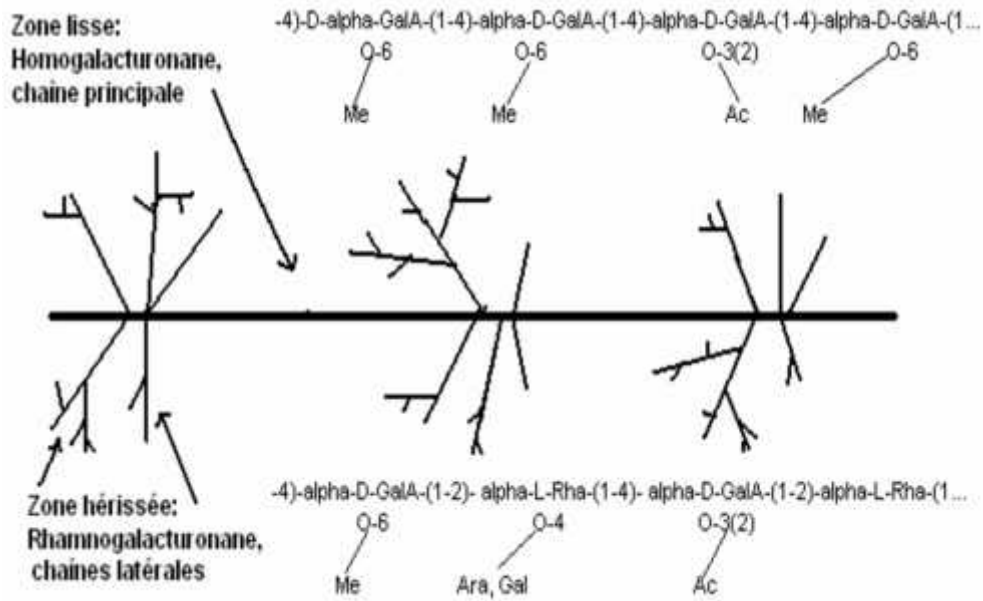


Figure 5: Structure desquelette de pectines (Bekouche., 2006).

2.4.1 Les homogalacturonanes :

Les homogalacturonanes représentent 57 à 69 % de la pectine. Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturonique reliés entre eux par des liaisons α - (1-4) et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être estérifiées respectivement par du méthanol et éthanol. Elles forment la zone lisse des pectines. Le méthyle estérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction. En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (Combo et al., 2011).

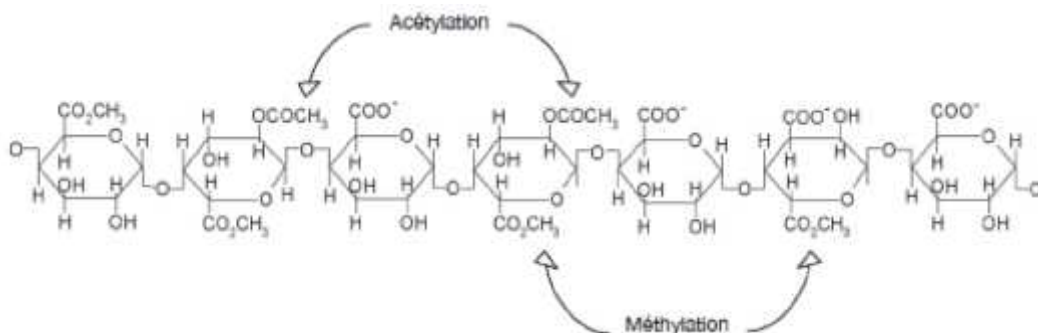


Figure 6: Structure primaire d'un homogalacturonanes.(Combo et al., 2011)

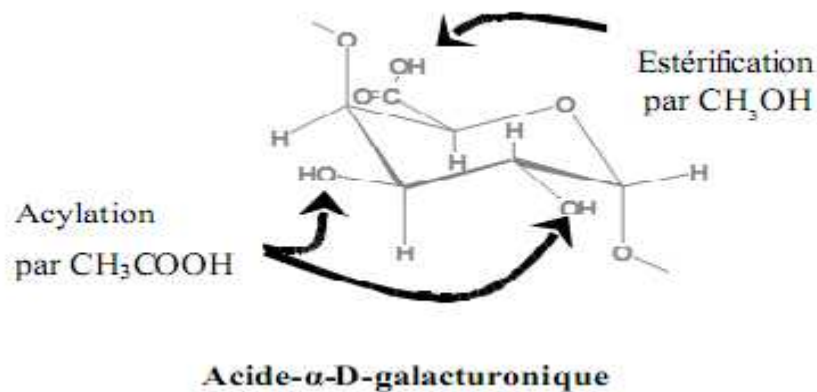


Figure 7: Schéma d'estérification par le méthanol ou d'acétylation par l'acide acétique de l'acide α -D- galacturonique (Ducasse., 2009).

2.4.2 Les rhamnogalacturonanes (RG) :

Les RG représentent la liaison entre l'acide galacturonique et le rhamnose, ce dernier est suivi de chaînes d'arabinane et d'arabinogalactane (Belhamri., 2005).

Ce groupe comporte deux représentants : les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et de type II (RG-n) :

2.4.2.1 Rhamnogalacturonanes type I :

Le RG-I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14 % de la pectine et environ 20 à 80 % des rhamnoses. Le RG-I est composé par les répétitions du disaccharide [— 2)- α -L-Rhap-(1-4)- α -D- Galp-1 —] (figure N°06) ce motif peut être répété plus de 100 fois (Ducasse, 2009).

Comme dans l'homogalacturonanes, certains résidus d'acide galacturonique de RG-I sont acétylés. Différents substituant polysaccharidiques neutres sont capables de se greffer à ce squelette osidique au niveau du carbone C4 du L-rhamnose (Comboet al.,2011).

2.4.2.2 Rhamnogalacturonanes type II :

Formé principalement d'arabinose et de galactose. Les chaînes sont principalement constituées de -D-galactanes liées en (1—3) et -D-galactanes liées en (1—6) suivies de L-arabmofuranosyl liées en (1—5) (Belhamri., 2005).

Le RG-II est un galacturonane substitué qui représente 10 à 11 % de la pectine et dont la structure complexe est très conservée au sein des espèces végétales. Avec un DP d'environ 60, le RG-II comprend au moins huit résidus d'acides galacturoniques liés en 1-4 constituant la chaîne principale, sur laquelle sont greffés quatre complexes glycosidiques différents. Ces complexes glycosidiques sont composés d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de galactopyranose, d'apiofuranose et de galactopyranose et d'autres sucres inhabituels tels que l'acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique, l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique et l'acide acétique (Combo et al., 2011).

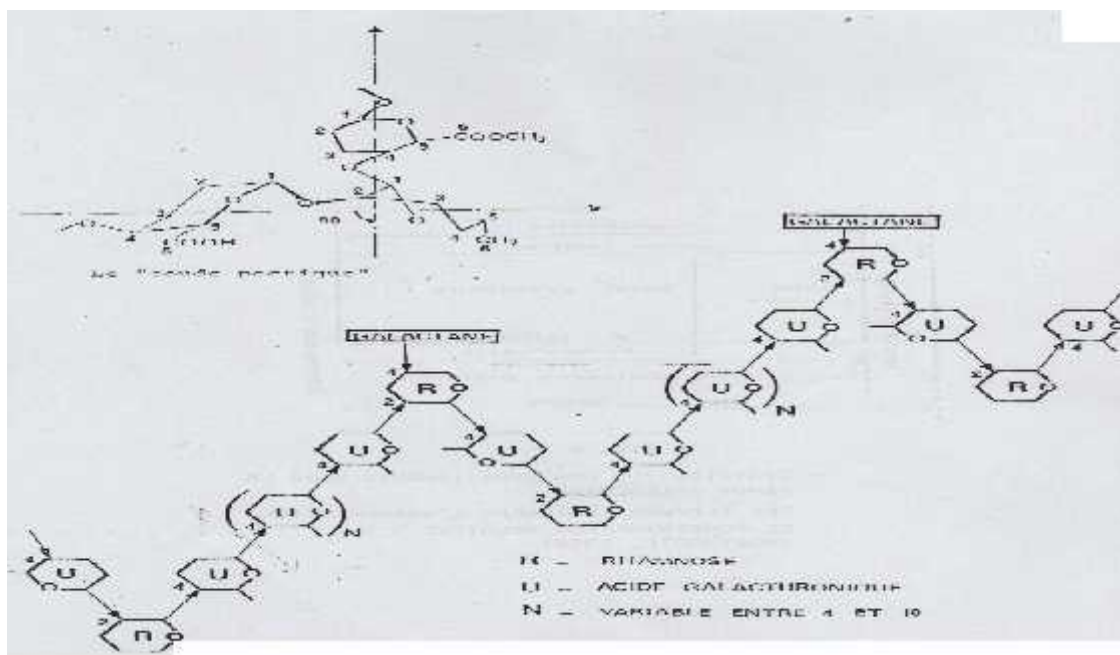


Figure 8: Structure d'un rhamnogalacturonanes.(Belhamri., 2011).

2.5 Sources des substances pectiques :

Le terme « pectines » fait référence à un ensemble de polysaccharides complexes qui entrent dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs. Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes (Tableau N°02) et évoluent avec la maturation des tissus. Bien qu'elles puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les principales sources industrielles de pectines sont les marcs de pomme et les écorces de citron et d'orange. Les pectines représentent environ 0,5 à 4 % du poids frais du matériel végétal (Bari et al., 2009, Combo et al., 2011).

Par exemple dans les oranges elle se situe dans la partie blanche d'albédo (Yeoh et

al.,2008)

Le tableau N°02 représente la teneur en substances pectiques de quelques végétaux.

2.6 Type des substances pectiques :

Généralement, les pectines sont caractérisées par leur degré de méthylation (DM) défini comme étant le pourcentage molaire de groupements carboxyles qui estérifiés par le méthanol par rapport aux groupements carboxyliques libres (**Combo et al., 2011**).

La pectine peut présenter différents niveaux d'estérification quantifiés par le pourcentage de groupements carboxyliques estérifiés par une molécule de méthanol. Ainsi, trois catégories de pectine peuvent être distinguées (**Belhamri., 2011**).

2.6.1 Les pectines H.M(pectines hautement méthyles):

Sont les pectines dont plus de 50% des groupements carboxyles est estérifié par le méthanol, les pectines hautement méthylés se caractérisent par leurs propriétés gélifiantes (**Combo et al., 2011**).

2.6.2 Les pectines F.M(pectines faiblement méthylés) :

Sont les pectines dont moins de 50% de groupements carboxyles sont estérifiés. Ces derniers peuvent contenir des groupements amides ; dans ce cas on parle alors des L.M.A. (low methylated amidated pectins) (**Combo et al., 2011**).

2.6.3 Les pectines moyennement méthylés :

Ce sont des pectines qui ont un degré d'estérification est inférieur à 10 %.

Le degré de méthylation ou d'estérification des pectines joue un grand rôle dans la formation de gel. Pour les H.M, les pectines forment du gel en présence de sucres neutres ; par contre les F.M forment du gel en présence de sucres neutres ; par contre les F.M forment du gel en présence du calcium (**Combo et al., 2011**).

Tableau N°2 : Teneurs en substances pectiques dans quelques végétaux (Combo., 2011),

Fruits	Teneur en substances pectiques (% du poids frais)
Pomme (<i>Malus spp.</i>)	0,5-1,6
Marc de pomme	1,5-2,5
Banane (<i>Musa aeuminata</i>)	0,7-1,2
Pulpe de betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	0,1
Carambole (<i>Averrhoa carambola</i>)	0,66
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5
Goyave (<i>Psidiumguaiava</i>)	0,77-0,99
Pulpe de cilioii (<i>Cili'us lenion</i>)	2,5 -4,0
Litchi (<i>Litchi chinesis</i>)	0,42
Mangue (<i>Mangiferaindica</i>)	0,26-0,42
Zeste d'orange (<i>Citrus sinesis</i>)	3,5-5,5
Papaye (<i>Carciapapaya</i>)	0,66-1,0
Fruit de la passion (<i>Passiflora</i>)	0,5
Edulispéricarpe du fruit de la passion	2,1-3,0
Pêche (<i>Prunus persica</i>)	0,1-0,9
Ananas (<i>Ananas comosus</i>)	0,04-0,13
Fraise (<i>Fragariaananassa</i>)	0,6-0,7
Tamarin (<i>Tamarindusindica</i>)	1,71
Tomate (<i>Lycopersiconesculentum</i>)	0,2-0,6

3. Hydrolyse enzymatique de la pectine :

La maturation des fruits s'accompagne d'une perte de fermeté des tissus. Ce processus est dû à la modification structurale des parois et plus particulièrement à la dégradation des pectines et des xyloglucanes. Au cours de la maturation des fruits une augmentation de la fraction soluble parallèlement à une diminution hémicellulose et de cellulose et des pectines insolubles a été écrite pour les cas de raisin (**Ducasse.,2009**). Une autre étude montre une perte de galactose provenant des AG-I, une baisse du degré de méthyl estérification des pectines, une augmentation des protéines riches en prolines et en hydroxyprolines et une augmentation de la fraction solubles des polysaccharides (**Ducasse., 2009**). Ceci suggère donc une hydrolyse des polysaccharides structuraux au sein des parois cellulaires. Toutes les modifications sont les résultats combinées de nombreuses enzymes qu'on appelle enzymes pectolytiques ou pectinases. La forme complexe des substances pectiques et leur diversité dans les parois cellulaires des plantes est probablement la cause de l'existence d'une variété des formes de ces enzymes pectolytiques (figure N°10) (**Sathyanarayana et al., 2007**).

3.1 Les enzymes pectinolytiques :

Les pectines sont des substrats de nombreuses enzymes qui peuvent, soit en modifier le degré d'estérification (enzymes saponifiantes), soit en diminuer le degré de polymérisation (enzymes dépolymérisantes) (Jeantet et al., 2007).

Les enzymes pectolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines (Combo et al., 2011). Ces enzymes se trouvent dans tous les tissus végétaux des plantes, les fruits principalement et en particulier les agrumes (Dupuy, 1982).

Le terme « enzyme pectolytiques » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Figure 10) et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectolytiques. La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique. L'*Aspergillus Niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectolytiques (Combo et al., 2011).

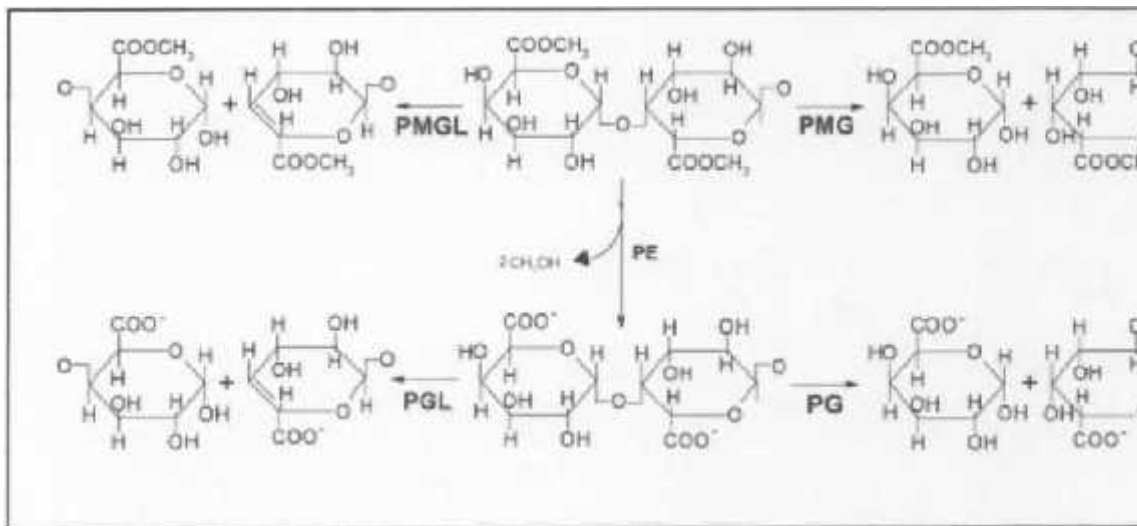


Figure 9: mécanismes de dégradation de la chaîne homogalacturonate (Combo et al., 2011).

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase, PMG : polyméthylgalacturonate,

PE : pectinestérases, PGL : polygalacturonate lyase, PG : polygalacturonases.

3.2 Classification des enzymes pectolytiques et leur mode d'action :

Les enzymes pectolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligo-galacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Combo et al., 2011).

Trois types principaux de réaction sont catalysés par les enzymes qui dégradent la chaîne principale des pectines : saponification (estérases), dépolymérisation par hydrolyse (polygalacturonases) et dépolymérisation par B- élimination (lyases). La figure N°11(A et B) représente le classement et les différentes voies de dégradation enzymatique des pectines (Larreta-Garde, 1997).

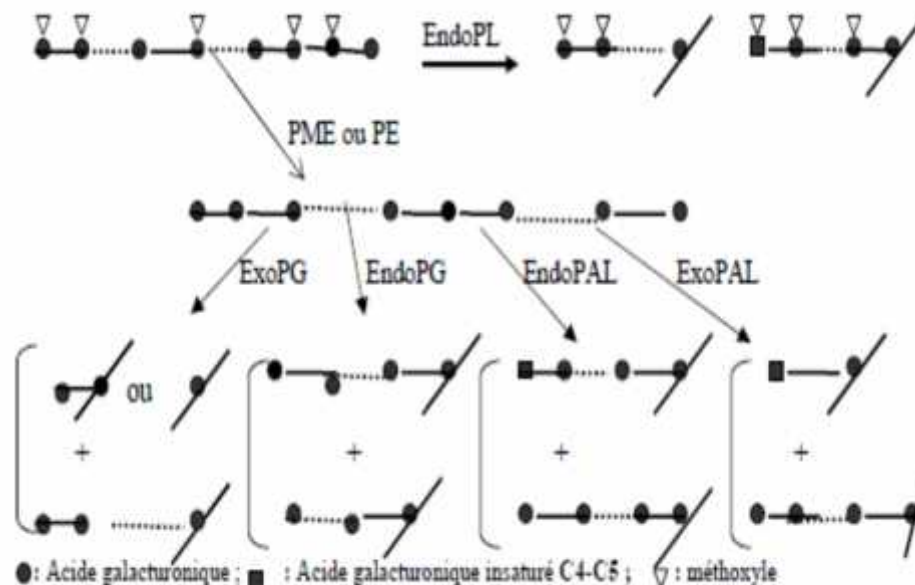


Figure 10/A: les différentes voies de dégradation enzymatique des pectines (Tabuc., 2007).

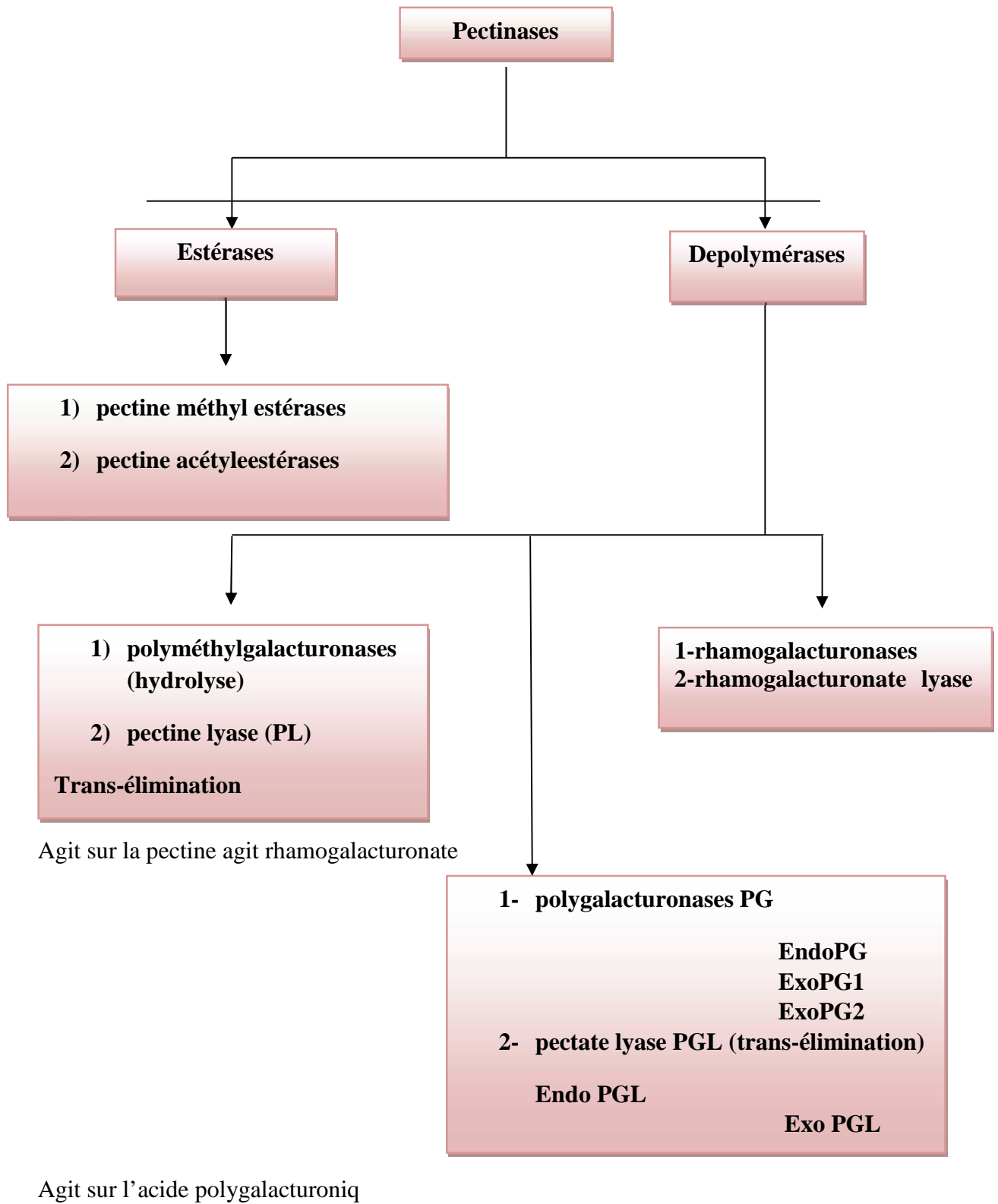


Figure 11/B : classification des enzymes pectolytiques.

3.2.1 Les pectinestérases :

Les estérases, pectine méthylestérase et acétylestérase, catalysent la rupture d'une liaison ester. Les pectines méthylestérase (PME) catalysent l'hydrolyse de l'ester méthylique des homogaiacturonanes, libérant du méthanol et des acides pectiques (**Ducasse., 2009**).

L'activité pectine méthylestérase (PME) a été mise en évidence dans de nombreux végétaux supérieurs, en particulier dans les fruits ou plusieurs isoformes de PME peuvent être présentes (**Jeantet et al, 2007**).

Les pectines méthylestérase sont des enzymes pectolytiques qui catalysent la réaction de déméthylation de la pectine. Ainsi, elles libèrent du méthanol et produisent des pectines de faible degré de méthylation (figure 12) (**Albagnac et al., 2002**).

Elles agissent par récurrence le long de la chaîne pectique selon un mécanisme monochainé multiple attaque. Associées par des liaisons de faibles énergies à la paroi cellulaire, elles sont partiellement entraînées dans le jus au cours de l'extraction (**Jeantet et al., 2007**).

La PME est principalement produite des plantes comme la banane, les agrumes et les tomates, et aussi par des bactéries et moisissures (**Jeantet et al., 2007 ; Hasunuma et al., 2003**). Le poids moléculaire de la PE microbiennes varié de 30- 50 kda (**Hadj taib et al., 2002 ; Christensen et al., 2002**). Le pH optimum de ses activités varié entre 4 et 7 à l'exception du pH de la PE d'Erwinia qui est alcalin, sa température optimale se situe entre 40 et 60 °C et son point isoélectrique varié de 4 à 8, les valeurs de Km varient de 0,1 à 0,5 mg/ml.

La pectine estérases industrielle est utilisée pour le maintien de la texture dans l'industrie des fruits et dans la clarification des jus de fruits.

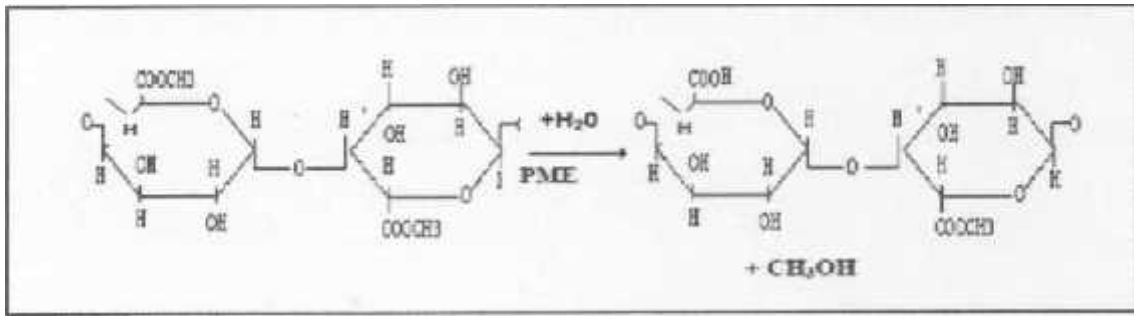


Figure N°13 : Action des pectines-méthylestérase (Tabuc., 2007).

3.2.2 Les polygalacturonases (enzymes de dépolymérisation) :

Les polygalacturonases (PG) composent une des familles les plus étudiées dans les fruits au cours du développement (**Ducasse., 2009**).

Les polygalacturonases (PG) hydrolysent la liaison à (1-4) entre deux motifs d'acide galacturonique non estérifié, notamment dans les zones homogalacturoniques (**Ducasse., 2009**). On distingue les exopolygalacturonases (exo-PG) et les endopolygalacturonases (endo-

PG):

3.2.2.1 Les endopolygalacturonases (endo PG) :

Elle attaque au hasard les liaisons à (1-4) des résidus d'acide galacturonique pour libérer des monomères, des dimères et des trimères d'acide galacturonique en fonction des substrats concerné, pectines ou acide pectique (**Rexová Benková et Makovic., 1976**).

L'endo PG est largement produits par les champignons et bactéries, elle se trouve sous différents formes ayant un poids moléculaire qui varié de 30 à 80 KDa et un point isoélectrique entre 3,8 et 7,6, la majorité des endo PG ont un PH optimale entre 2,5 et 6 et une température optimale entre 30 et 50 °C [8']. La valeur de Km de l'endo PG se situe entre 0,14 et 2,7 mg /ml pour les pectates (**Sathyanarayan et al., 2007**).

3.2.2.2 Les exopolygalacturonases (exo PG) :

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

Les polygalacturonases sont d'origine végétale, fongique, bactérienne ou animale. Elles ont toutes un PH optimum d'action entre PH 3.5 et 5.5. Leur substrat préférentiel est l'acide pectique (**Albagnac et al., 2002**).

L'exoPG est largement produits par l'Aspergillus Niger, Erwinia sp et quelques plants comme le marque de carotte, pêche, citrons et pommes (**Pathak et Sanwal., 1998**).

Le poids moléculaire de l'exo PG varié entre 30 à 50 kda et son point isoélectrique varie entre 4 et 6.

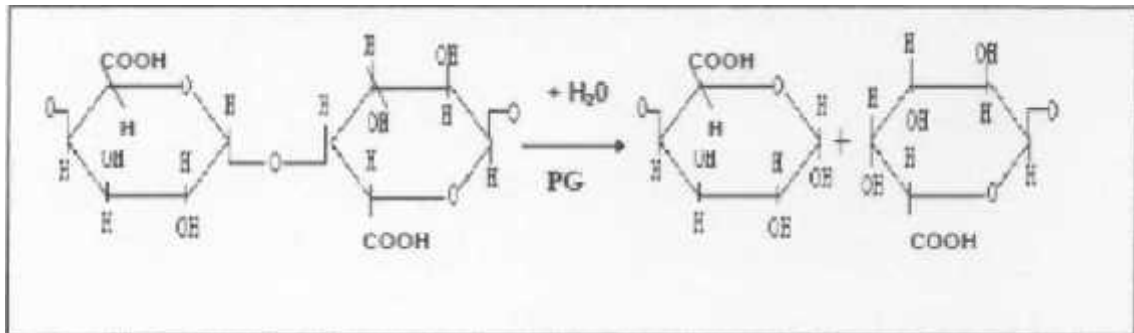


Figure N°14 : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturoniques

(**Tabuc., 2007**).

3.2.3 Les pectines lyases :

Les lyases agissent sur la pectine en catalysant la rupture entre deux motifs d'acide galacturonique par un mécanisme de B-élimination. On distingue les pectines lyases(PL) et les pectates lyases (PAL). Ces derniers, produits uniquement par des micros organismes, sont inactives aux PH des jus de fruits (**Jeantet et al., 2007**).

Les PL coupent les liaisons entre résidus d'acide galacturonique méthyles. Toutes les pectines lyases identifiées sont des endo-enzymes. Elles sont produites par les moisissures (en particulier du genre Aspergillus) et par des bactéries (**Albagnac et al., 2002**).

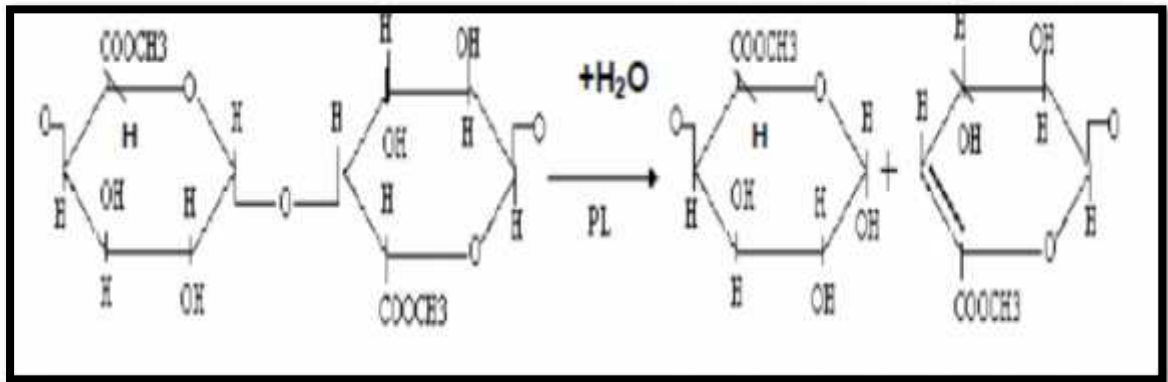


Figure 11: Action pectine-lyase (Tabuc., 2007).

3.2.4 Les pectates lyases :

Les pectates-lyases (PAL) agissent préférentiellement sur une chaîne d'acide galacturonique mais aussi sur les pectines faiblement méthyles selon un mécanisme endo ou exo :

➤ **Les endopectate-lyases** : (endo PAL) attaquent au hasard à l'intérieur de la chaîne polygalacturoniques. Le substrat préférentiel est une pectine faiblement méthoxylés (LM)

Avec un degré de polymérisation (DP) plus élevé. Le plus petit substrat obtenu est un trimère (AG3).

➤ **Les exopectate-lyases** : (exo PAL) ont une action récurrente à partir de l'extrémité réductrice de l'acide galacturonique en libérant des dimères insaturés (AG2). La présence de calcium serait nécessaire à l'action des endo et des exopectate-lyases (Figure N°15).

Les pectates lyases pourraient agir en synergie avec la pectine-méthylestérase au cours de la maturation en dépolymérisant les pectines et en augmentant ainsi leur solubilité (Ducasse., 2009).

La masse moléculaire de la pectine lyase varié de 30 à 40 kda (Soriano et al., 2005) à l'exception de la PL produits par Aureobasidium pullants et Pichiapinus (90 kda). En général, la PL est active dans les milieux acide avec optimum qui varie de 4 à 7 aussi certains trouvent une activité de la PL dans des conditions de PH alcalin (Denisete et al., 2005 ; Soriano et al., 2005). Le point isoélectrique a été trouvé dans les environs de 3,5, son Km est de 0,1 mg/ml et 5mg/ml dépendent de substrat utilisé(Sakyiamer et al., 2001).

La PGL (pectates lyase) se trouvent seulement chez les microorganismes, son PH optimale est alcalin (6-10) (Singh et col, 1999), le poids moléculaire de la PGL varie entre 30 et 50 kda(M^c carthy et al., 1985).

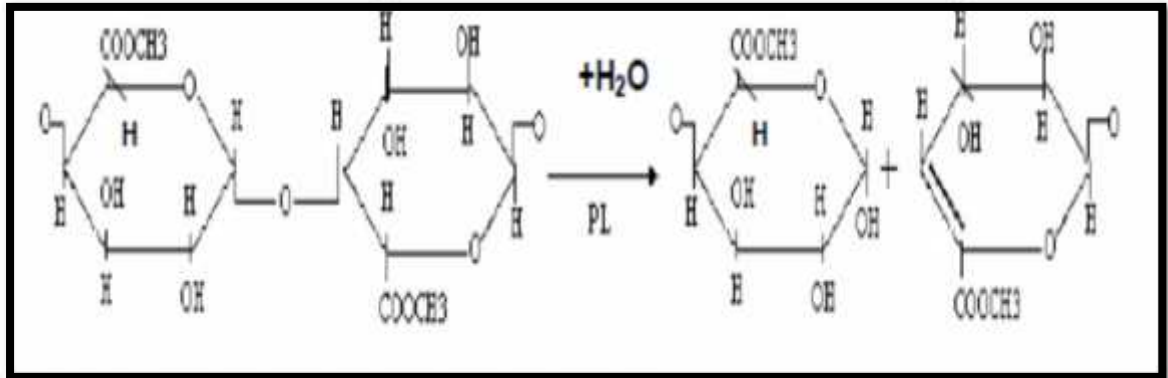


Figure 12: Activité des pectines-lyase(Tabuc.,2007).

4. Utilisation industrielle des enzymes pectolytiques :

Les travaux publiés sur la production des enzymes pectinolytiques ont montré que ces dernières sont utilisées dans l'industrie des fruits pour faciliter l'extraction et la clarification des jus, elles sont utilisées aussi pour la fermentation du thé et café et liquéfaction des fruits, légumes (Sheykinjad et al., 2008), dans l'extraction des huiles d'olive et aussi utilisées pour la dégradation des eaux polluées riches en pectines et la stabilisation des jus (Khalil et al., 2002). Dans l'industrie de textile et papier elles sont aussi bien utilisées pour le nettoyage du coton et le gommage des fibres (De gregrio et al, 2002).

4.1 Production des enzymes pectolytiques :

Les enzymes pectolytiques sont très disponibles dans la nature, elles peuvent être produites à partir des plantes et par les microorganismes et les bactéries (De gregrio et al., 2002), mais peu d'espèces de levures qui ont montré leur habilité à produire ces enzymes (Nagel et Waughn., 1961; Bambyet al., 1990). Les préparations d'enzyme pectinolytiques les plus connus sont celle produites par voie microbienne notamment celles produites par l'Aspergillus qui ont beaucoup intéressées les chercheurs.

Les préparations enzymatiques produites par l'Aspergillus Niger et Awamori sont les plus populaires dans le commerce (De gregrio et al., 2002). La polygalacturonases (PGS) est l'enzyme la plus étudiée et la plus abondantes aussi la pectinéméthylesterase (PMES)

produite à partir de l'Aspergillus purifiée et caractérisée, par contre la pectine lyase (PELS) reste l'enzyme la moins étudiée (**Sathayanrayan., 2007**).

La production d'enzyme pectolytiques occupe 10 % des manufactures de production d'enzymes. Ces derniers 20 ans on a remarqué une augmentation de production d'enzymes de 8 à 15% chaque année (**Kosakov et al., 2006**).

4.1.1 Procédés de bioproduction des enzymes pectolytiques :

Les pectinases peuvent être produites par fermentation solides on anglais (solide State fermentation SSF) ou par fermentation liquide en anglais (submerge fermentation smf) (**Ducasse., 2009**). La fermentation solide est surtout utilisée pour la production des protéines, enzymes et éthanol, tandis que la fermentation liquide est surtout utilisée pour l'étude de la synthèse métabolique des microorganismes (**De gregrio et al., 2002**).

5. Fermentation sur milieu solide :

La fermentation solide peut être définies comme « la croissance des microorganismes (seulement moisissures sur un matériau solide et humide en absence d'eau libre » (**Guena., 2003**).

Par ailleurs (**Pardey et al., 2004**), ont définies la fermentation solide comme étant la transformation microbienne des matériaux biologiques dans leur état naturels solide, dans le Cas contraire de la fermentation liquide qui se déroule dans des solutions diluées (**Poonamet al., 2009**) ont définies la fermentation solide par l'humidification du substrat par une couche fine d'eau sur la surface des particules sans que la quantité soit suffisante pour former un mélange.

Les proportions d'eau/substrat en fermentation solide sont généralement 1 :1, 1 :10.

Les fermentations en milieu solides présentent un certain nombre d'avantages par rapport à fermentation en milieu liquide que LAMBERT et MEERS (1983) ont résumé de la façon suivante :

- L'aération est plus facile à travers les espaces de substrats granuleux : l'agitation du substrat lorsqu'elle intervient, est discontinue.
- L'absence de phase liquide et l'humidité faible du substrat permettent :

De réduire les volumes de fermenteurs.

D'éviter les contaminations bactériennes grâce à une faible humidité.

➤ Les milieux de cultures sont très simples (**Roussos., 1987**).

5.1 Microorganismes utilisée pour la production industrielle des pectinases :

Une variété des bactéries *Bacille POLYNYXA*(**Bamby et al., 1990**) *ERWINIA SP*(**Tanabe et Kobayashi., 1987**), *E. CAROTOVA*(**Tanabe et al., 1987**) *PS SYRINGAE*(**Margo et al., 1994**) etc..., et certains de levures *KL FRAGILIS*(**Donaghy et al., 1994**) et *KL MAXIANUS*(**Bamby et al., 1990**) sont connus comme producteurs de pectinases cependant les moisissures sont les plus connus pour la production industrielle des pectinases plus particulièrement celle produites par l'*Aspergillus Niger* est la plus utilisée (**Ismail., 1996**).

5.1.1 Données microbiologique sur l'*Aspergillus Niger* :

Plus de 180 espèces d'*Aspergillus* sont bien connus pour leurs utilité commercial (*A. Nysae* et *A. Niger*), et médicale soit comme état agent pathogène (*A. Parasiticus* et *A. Fumigatus*) ou producteurs de toxine contaminant des aliments (*A. Flavus*), ou source de producteurs de cholestérol (*A. Tereus*).

L'*aspergillus* soit à des température allant de 10 à 50 °C et des PH allant de 2 à 11 et une salinité de 34%, ils caractérisées par la production de grand concentration en métabolites (plus de 200mg/l d'acide citrique), il peuvent être cultivée sur milieu solide (à une a_w 0,4) et sur milieu liquide (**Lubertozzi et Keasling., 2009**).

Le genre *Aspergillus* est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure N°16).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud ; ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (**Tabuc., 2007**).

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (**Botton et al., 1990**).

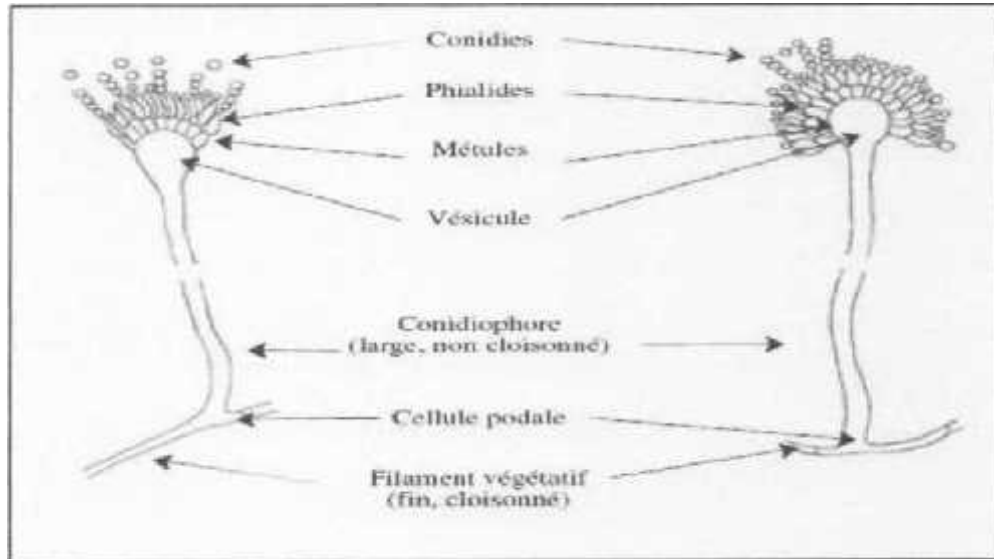


Figure N°17 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (**Tabuc., 2007**).

5.1.2 Description de l'*Aspergillus Niger* :

Aspergillus Niger appartient à l'embranchement des Deutéromycètes ; il fait partie de la sous classe des Hyphomycètes, ordre des moniliales. Il est caractérisé par sa paroi cellulaire chitineuse (non pectocellulosique) et son mode de reproduction asexué par conidiospores (conidies).

La multiplication végétative est réalisée, après la germination des spores, par des filaments microscopiques, les hyphes. Ces filaments s'allongent par croissance apicale et se ramifient. La masse des hyphes constituant le thalle du champignon est appelé mycélium (**Hamdi., 1991**).

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. Niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*a. Niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. (**Bousseboua., 2002**)

5.1.3 Propriétés génétiques d'Aspergillus Niger :

Comme pour la plupart des microorganismes, la croissance des champignons est auto catalytique et fournit une allure exponentielle dans un système non limité. Cependant, cette phase est souvent relativement courte et se maintient habituellement pendant 3 à 6 doublements de la biomasse. Elle est suivie d'une phase de ralentissement pendant laquelle la cinétique de croissance est linéaire. Les taux de croissance des souches d'*A. Niger* les plus étudiées sont de l'ordre de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (temps de doublement de 3 à 4 h) (**Hamdi., 1991**)

5.1.4 Utilisation biotechnologiques de l'Aspergillus :

La biotechnologie a été née à 1894 quand (**Tokichi et Takamire**) eut élaboré la première préparation d'enzymes commerciale d'Amylase brut à partir d'*Aspergillus oryzae*. Actuellement 70 enzymes biotechnologiques sont utilisées comprenant 32 classes d'activités dont 22 appartiennent aux espèces d'*Aspergillus*. Ces enzymes sont utilisées dans une large application industrielle comme la conversion de l'amidon , fermentation de l'éthanol (amylase), additifs aux détergents (protéase, lipase)et dans le domaine de textile (cellulohydrolyase, cellulase), papier (cellulase, hémicellulose), plus de 2/3 des enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire, boisson comme la production des sirops à une grande concentration en fructose (amylase invertase) , jus de fruits et vins(pectinase, cellulase, glycosidase), boulangerie (glucoseoxydase, amylase, métalloprotéinase) etc... (**Lubertozzi et Keasling., 2009**).

Tableau N°03 : Enzymes produites par A. Niger et leurs applications industrielles (Lubertozzi et Keasling, 2009).

Les enzymes	Application
Amylases	Médecine, alimentation, boissons
Pectinases	Clarification des jus de fruits, traitement du café
Glucoamylase	Sirop de glucose à partir d'amidon
Glucose oxydase	Dosages, antioxydants, alimentation
Naringinases Xylanases	Hydrolyse des glucosides amers
Anthocyanases	Décoloration des vins rouges
Tanases	Pharmacie, Tanneries
Protéases	Médecine, alimentation et industrie du cuir
Arabinanases	Hydrolyse des gommes et des mucilages
Inulinase	Production de fructose à partir d'inuline

5.1.5 Bioconversion des résidus agroalimentaires par l'Aspergillus pour la production des pectinases :

Beaucoup de travaux ont été réalisés pour la production des pectinases en utilisant différentes résidus agroalimentaires comme source carbonée, comme le son de blé (Castilho et al., 1999), le son de Soja (Castilho et al., 2000), marc de pomme (Hang et Woodanms., 1994), marc des canneberge et fraises (Zheng et Shetty., 2000), la pulpe des betterave (Sidi et al., 1984), pulpe de café (Antier et al., 1993), écorces des oranges et

citrons (**Garzon et Haus.,1992**). Dans tous ces travaux *l'Aspergillus a* été cultivé en fermentation solide.

6. Fermentation en milieu solide (FMS) :

6.1 Qu'est-ce que la fermentation :

La fermentation est un terme que l'on associe le plus souvent aux boissons ou aux produits laitiers, et fait toujours penser à un phénomène se passant en milieu liquide, alors pourquoi ce titre a priori déconcertant de la fermentation en milieu solide ?

Pour cela, il convient de revenir aux origines de ce terme.

Les fermentations sont très anciennes et sont utilisées par l'homme depuis l'origine de l'humanité. Cela a toujours été un moyen de conservation des denrées alimentaires ; de tout temps, il a toujours été impossible de conserver les produits humides (sauf en zone polaire), car il y a toujours des micro-organismes qui se développent, les environnements stériles n'existant pas dans la nature. Nos lointains ancêtres ont appris à reconnaître les « pourritures nobles » c'est-à-dire les aliments qui restaient consommables même après une croissance microbienne qui bien que non visible à l'œil nu, modifiait la texture, l'apparence, l'odeur et le goût des aliments, mais ceux-ci restaient consommables sans risque. C'est ainsi que sont nés tous nos produits fermentés traditionnels.

6.2 Définition scientifique :

Il faut attendre Louis Pasteur, vers le milieu du XIXe siècle pour avoir une vision rationnelle et scientifique des phénomènes impliqués. Pasteur va donner la première définition scientifique de la fermentation : « la fermentation, c'est la vie sans air » ; cette première définition est élaborée à la suite de ces travaux sur la bière et convient très bien à toutes les fermentations liquides traditionnelles.

Par la suite, cette définition a été précisée et les fermentations, au sens scientifique, sont des métabolismes énergétiques anaérobies intracellulaires à base de molécules organiques, et s'opposent aux respirations qui sont les autres grandes voies métaboliques énergétiques.

6.3 Définition industrielle :

A la suite des travaux de Pasteur, de nombreuses applications industrielles de la

fermentation en milieu liquide ont vu le jour (voir les nombreux dossiers sur ce thème dans la base bioprocédés) les industriels se sont très vite aperçus que certains microorganismes aérobies produisaient aussi des métabolites d'intérêt et ont donc modifié les appareils utilisés « les fermenteurs » pour y cultiver aussi les organismes aérobies. Cela a entraîné la dérive du sens « fermentation », qui aujourd'hui dans l'industrie, est relatif à tout procédés faisant intervenir une culture microbienne qu'elle se passe en phase solide ou en phase liquide.

6.4 Définition de la fermentation en milieu solide :

On distingue donc différentes appellations dans les procédés de fermentations qui sont liées au type du milieu de culture utilisé : ainsi, on parle de fermentation en milieu liquide (quand tous les constituants du milieu sont solubles), de fermentation en milieu submergé (lorsqu'une partie des constituants du milieu n'est pas soluble), de fermentation à cellules immobilisées (correspondant à un réacteur constitué de billes de polymères insolubles (comme les billes d'alginate) sur lesquelles sont inclus des micro-organismes ou des enzymes, le tout immergé dans un liquide) et de fermentation en milieu solide.

Dans la FMS, le substrat n'est pas soluble et il n'y a pas d'eau libre. Il est constitué de particules solides et peut être aussi pâteux dans le cas d'un levain. Le substrat sert de support et de sources d'aliments aux micro-organismes qui s'y développent, soit en surface, soit dans la masse du substrat humide, mais toujours à la surface des particules. L'eau présente est « liée » au support et doit se situer à une activité de l'eau (A_w) permettant l'expression du métabolisme des microorganismes, mais ne doit pas excéder la capacité maximale de rétention en eau des particules solides.

6.5 Paramètres influençant la fermentation en milieu solide (FMS):

6.5.1 Aération et oxygène :

En fermentation en milieu solide, la conduction et le transfert de chaleur se font difficilement entre les substrats végétaux et l'air. L'aération devient donc un paramètre incontournable surtout s'il s'agit d'une culture fongique, car ces micro-organismes aérobies ont besoin d'un apport continu en oxygène pour coloniser le substrat. Le développement pourra se faire également à l'intérieur, entre les particules de substrat, si l'air présent a une teneur en oxygène suffisante.

1. Données générales sur les jus :

Un jus est le produit liquide fermentescible mais non fermenté obtenue par des procédés mécaniques de la partie comestible de fruits ; les procédés usuels étant la pression, l'aspiration ou l'essorage centrifuge, accompagnés ou non d'une clarification enzymatique et d'une filtration pour les jus claires et d'un raffinage sur tamis pour le jus trouble (**Etienne., 2002**)

2. Clarification éventuelle des jus :

La clarification ne s'applique qu'à certains jus de fruits, dont les matières en suspension s'oxydent rapidement et donnent un jus avec un aspect brunâtre désagréable. Cette clarification est obtenue par l'action des enzymes amylolytiques, protéolytiques et pectinolytiques, suivies de débourbage centrifuge, de collage avec adjuvants tel que gélatine, caséine, blanc d'œuf ou autres albumines animales, et de filtration c'est le cas de jus de raisins ou de pomme (**Etienne., 2002**).

3. La nature des troubles dans les jus :

On appelle troubles une phase dispersée qui diffuse la lumière. Ce trouble, dû à une suspension de flocons de densité voisine de celle de framboise, décante lentement et se redisperse à la moindre agitation. On le recueille par centrifugation et après, lyophilisation, il se présente sous forme d'une poudre rose-brune (**Aoussat., 1978**).

L'intensité de la lumière diffusée est sensiblement proportionnelle à la quantité de trouble présent. La néphélométrie est donc la technique de mesure de troubles dont l'importance peut s'exprimer en unité de diffusion (**Aoussat., 1978**).

Dans le cas de jus de fruits, on observe des troubles d'origine différentes ; c'est ainsi que l'on parle :

- De trouble au froid
- De troubles d'oxydations
- De troubles métalliques
- De troubles protéiques
- De trouble au tanin, etc...

Enzymes à l'aide de pressurage :

Les étapes successives de l'obtention d'un jus sont le broyage du végétal entier, le pressurage, centrifugation ou la filtration puis éventuellement, selon le produit désiré, une clarification, une concentration et une pasteurisation. Le broyage entraîne la solubilisation partielle des pectines et la pulpe obtenue est un milieu hétérogène dans le quelle la phase liquide est très visqueuse. L'addition d'enzymes pectinolytiques à la pulpe augmente le rendement en jus de cette étape (**Larreta-Garde., 1997**).

De plus, la dégradation partielle des tissus des fruits par ces enzymes favorise l'extraction des pigments et des arômes et contribue à améliorer les qualités organoleptiques du jus.

Le traitement enzymatique de la pulpe permet d'augmenter les rendements de pressurage, par contre, le jus obtenu en sortie de presse, appelé mout, et alors plus riche en pectines plus trouble qu'en absence des enzymes et nécessite un traitement enzymatique renforcé lors de la clarification (**Larreta-Garde., 1997**).

4. Composition biochimique de l'abricot :

Les abricots sont disponibles toute l'année, sous forme frais, congelés, en conservés ou séchés, sont une savoureuse source de nutriments (**Siddiq., 2006**). A maturité, l'abricot est un fruit dont la chair contient 86 % d'eau. Les principaux constituants du suc vasculaire sont des sucres (**Lichou., 1998**). La valeur diététique d'une portion comestible d'abricot de 100 g est résumée dans le tableau 1 (**Anes-Ciquial., 2012**).

Tableau 1: Composition biochimique de l'abricot

Constituant	Valeur
Energie	4.91Kcal
Eau	86.1g
Protéines	0.9g

Lipides	0.207g
Sucres	8g
Fibres	1.7g
Acides organiques	1.4g
AG saturés	0.019g
AG monoinsaturés	0.11g
AG polyinsaturés	0.052g
Sodium	2.2mg
Magnésium	8.67mg
Phosphore	16.6mg
Potassium	237mg
Calcium	15.6mg
Manganèse	0.16mg
Fer	0.32mg
Cuivre	0.06mg
Zinc	0.13mg
Beta-Carotène	1.63mg
Vitamine E	0.61mg
Vitamine C	5.45mg

Vitamine B1	0.02mg
Vitamine B2	0.03mg
Vitamine B3	0.5mg
Vitamine B5	0.24
Vitamine B6	0.06
Vitamine B9	6.22

5. Morphologie et structure de l'abricot :

Assez symétrique, l'abricot est constitué de deux oreillons séparés par une suture radiale plus ou moins profonde. Cette dernière s'étend sur la moitié du fruit entre l'attache pédonculaire et l'apex. La surface est régulière ou parfois légèrement bosselée. En fonction de la forme et de l'épaisseur des oreillons, la morphologie peut être arrondie ou oblongue. Les fruits ont également tendance à s'arrondir à l'approche de leur maturité. Le poids moyen varie de moins de 40 g à plus de 90 g (**Lichou., 1998**).

La couleur de fond de l'épiderme peut être blanc crème (Moniqui), orange claire (Canino, Polonais), orange (Bergeron) ou d'un orange très intense (Goldrich, Orangered bhart, Harostar). Chez de nombreuses variétés, une surimpression plus ou moins développée généralement rouge apparaît 2 à 3 semaines avant la récolte, selon les variétés et l'exposition des fruits au soleil. En général, la couleur de la chair est assez proche de la teinte de fond de l'épiderme (**Lichou., 1998**). La paroi se diversifie en trois structures tissulaires distinctes : l'épiderme (peau), le mésocarpe (chair) et l'endocarpe lignifié (noyau)

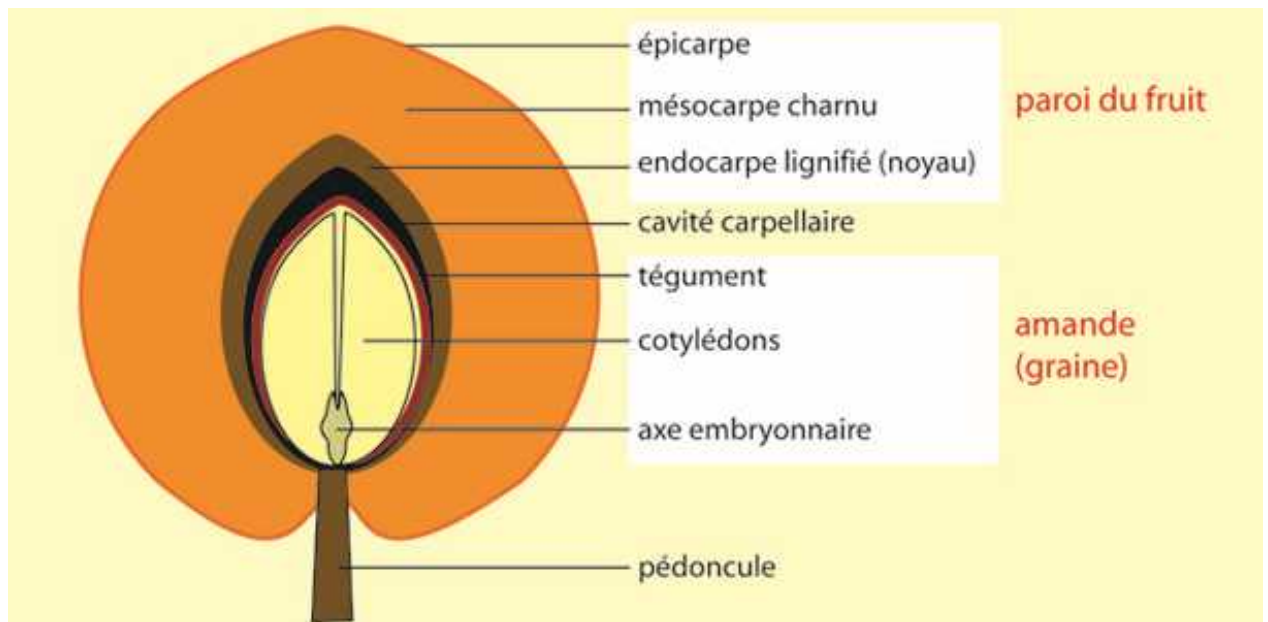


Figure 1: Structure d'abricots (Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie).

6. Transformation industrielle des abricots :

Les abricots sont utilisés dans l'industrie sous forme de jus, confitures, compotes,

Abricots appertisés, abricots surgelés, est des sirops (Lichou et Jay., 2012).

7. La clarification de jus d'abricots :

Comme pour le jus de pomme, le pressurage, amélioré ou non par des enzymes, produit le mout, qui correspond à un jus brut dont la viscosité et la turbidité sont élevées. La clarification consiste en élimination de ce trouble. La clarification du mout par une simple opération de filtration pose de nombreux problèmes technologiques due à la viscosité du milieu et au colmatage des filtres par les particules de trouble.

L'élimination des matières pectiques peut se faire par précipitation ou par hydrolyse, dans le premier cas, les pectines du mout sont déméthylées par une pectineméthylestérase pure et l'ajout des ions de calcium entraine alors la formation d'un gel de pectate de calcium piègent le mécanisme de clarification de jus trouble (Larreta-Garde., 1997).

7.1. La clarification par enzymage et collage :

Les particules en suspension sont partiellement dégradées par le mélange pectinéméthylestérase/polygalacturonase. Les colloïdes protecteurs des particules qui sont les pectines, sont solubilisées puis celles-ci sont progressivement hydrolysées provoquant jusqu'à accumulation des produits finaux, mono, di et trimères d'acide galacturonique. La solubilisation partielle des pectines démasque en partie les composés protéiques chargés positivement au PH des jus.

Les particules peuvent alors flocculer par interaction électrostatique et sédimenter d'autant plus facilement que la viscosité du milieu est réduite (**Albagnac et al., 2012**).

1 Matériels biologique :

Nous avons utilisé *l'Aspergillus niger* comme micro-organisme pour la production des enzymes pectinolytiques. Ce dernier a été cultivé sur milieu PDA dans des boites de pétrie, et revivifié sur le même milieu pour avoir des colonies jeunes.

2 Préparation de l'inoculum :

Après propagation du micro-organisme dans des boites de pétrie sur un milieu PDA et incubation pendant 5 jours à 30 °C, le micro-organisme a été déboité à l'aide d'une pipette pasteur après avoir ajouté 10 ml d'eau distillée stérile dans les boites de pétri. La solution de spore récupérée est ajustée à 100 ml par l'eau distillée stérile puis les spores sont dénombrées à l'aide d'une cellule de *Malassez*.

3 Matériel végétal :

On a récupérer le résidu des oranges après une extraction de leur jus dans un extracteur électrique de ménage , les résidus (pulpes et écorces), ont été broyés à l'aide d'un broyeur *Moulinexet* ont été sécher dans une étuve *Memmert* a une température de 70 degré pendant 5heures puis tamisés et stockées dans un milieu sec, la teneur en eau dans le résidu a été déterminé par la formule suivante :

$$X = (m_2 - m) / (m_1 - m) \times 100$$

Avec :

X : teneur en matière sèche (%) ;

m_2 : masse de capsule avec la prise d'essai après séchage en g ;

m_1 : masse de capsule avec la prise d'essai avant séchage en g ;

m : masse de capsule vide.

Humidité (%) = 100- X (%) (Matière sèche).

4 Préparation de milieu de culture :

Ces écorces ont été introduite dans des Erlenmeyers de 250ml enrichies par une solution de KH_2PO_4 à 1%, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 1%, MG SO_4 à 1%, FESO_4 à 1%, et l'urée à 1% plus 2g de glucose, les Erlenmeyers ont été agités puis stérilisés à 115°C pendant 30 min et refroidis.

4.1 Inoculation des milieux de cultures :

Les milieux de cultures ont été inoculés par 1ml de l'inoculum et incubés dans une étuve à 30°C pendant 5 jours, l'inoculum a été préservé dans une température de 3°C.

5 Extraction des enzymes pectinolytiques :

Après croissance de micro-organisme dans le milieu de culture. Nous avons ajouté 50ml d'eau distillée stérile dans les Erlenmeyers, qui ont été agités à l'aide d'un agitateur à secousse pendant 30min, le contenu des Erlenmeyers a été filtré sur une gaze stérile, le filtrat a été ensuite centrifugé à 10000tours /min pendant 20min, 261 ml de filtrat qui ont été récupérés ceux-ci représentent l'extrait enzymatique brut (EEB).

6 Dosage des protéines dans EEB :

Le dosage des protéines solubles a été réalisé en utilisant la méthode de Lowry (**Lowry., 1951**), cette méthode est une méthode de dosage colorimétrique. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin puis un second, dit réactif de Folin- Cicalteu, est ajouté. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance entre 650 et 700 nm. D'après la courbe d'étalonnage de BSA on se trouve avec :

$$Y= 0.5102X$$

Avec : Y= la concentration des protéines solubles.

X= la densité optique lue à 700 nm.

7 Recherche des activités enzymatiques dans l'EEB :

7.1 Dosage de l'activité de l'endopolygalacturonase :

L'activité endopolygalacturonasique a été déterminée par calcul du pourcentage de baisse de la viscosité ou de déterminer le temps nécessaire pour atteindre 50% réduction de viscosité d'un milieu réactionnel constitué de 10ml de solution de pectine à 1% (préparée dans une solution tampon pH 4.2) et l'EEB. Le mélange est incubé à 30° pendant 45 min, la réaction a été stoppée par chauffage à 90° pendant 5 min et la viscosité spécifique du milieu est alors déterminée à température ambiante à l'aide d'un viscosimètre à écoulement

de type *Fungilab*, la viscosité spécifique est calculée par la formule qui suit ;(Casanova.,1989).

$$\text{Viscosité spécifique} = [(t_0 - t_\epsilon) / (t_0 - t_{ea})]$$

Avec :

t_0 : temps d'écoulement de milieu réactionnel avant réaction

t_ϵ : temps d'écoulement de milieu réactionnel après réaction

t_{ea} ; temps d'écoulement d'eau

7.2 Dosage de l'activité exopolygalacturonase (exo-PG) :

L'activité exopolygalacturonasique est déterminée par libération des groupements réducteurs estimés par la méthode de **Somogyi** et **Nelson**, le milieu réactionnel est composé de 0.5ml de l'EEB et 1 ml de solution de pectine 1% (préparée dans solution tampon pH 5.5), le mélange est incubé à 45° pendant 60 min. une unité enzymatique est exprimée par la quantité d'enzyme nécessaire pour la libération d'une micromole d'acide galacturonique par unité de volume et par unité de temps. L'activité de l'exo PG est exprimée, donc en μ mol/ min/ml d'extrait (**Casanova., 1989**).

$$\text{Activité exo PG} = (A \times 1000) / (212,12 \times 60 \times 0,5)$$

Avec :

A : équivalent d'acide galacturonique produit par la réaction enzymatique (μ mol)

212,12 : masse molaire de l'acide galacturonique hydraté (g)

0,5 : volume de l'extrait (ml)

60 : temps d'incubation (min)

7.3 Dosage de l'activité de la pectine lyase :

La libération des composés galacturonyles insaturés par trans-élimination peut être détectée par la lecture de l'absorbance de ce mélange réactionnel à 235 nm (**Nagel et Anderson., 1965**). L'augmentation de l'absorbance à 235 nm est due à la formation des doubles liaisons aux extrémités non réductrices des pectines (**Theuil et al. 2011**). Le mélange réactionnel qui comprend 0,5ml de pectine à 1% dans le tampon tris HCL de

0,05M (Ph 8,8), 0,5 de l'extrait enzymatique plus 0,5ml de pectine et incubation à 45° pendant 60min à la fin de l'incubation, ajouter 4,5 ml de HCL à 0,01N sont ajoutés pour stoppé la réaction. La densité optique du mélange est déterminée à 235 nm.

$$\text{Activité Lyase} = (\text{DO} \times 1000) / (4800 \times 60 \times 0,5)$$

Avec :

DO : densité optique lue,

4800 : coefficient d'extinction molaire,

60 : temps d'incubation (min),

0,5 : volume de l'extrait (ml).

8 Purification des enzymes :

8.1 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut :

Cette méthode consiste à ajouter le sulfate d'ammonium provoquant ainsi une déshydratation et une précipitation des protéines, ce qui établira par voie de conséquence le phénomène de relargage. L'avantage de relargage est que les protéines conservent leur conformation native et peuvent être redissoutes habituellement sans dénaturation. Le choix est porté sur le sulfate d'ammonium pour sa solubilité dans l'eau est sa force ionique élevée (**Kamoun., 1977**). La fourchette utilisée dans ce travail est de 40-90% saturation en sulfate d'ammonium.

8.2 Dialyse et concentration de l'extrait enzymatique :

La dialyse est une méthode de séparation qui permet d'éliminer d'une solution macromoléculaire des ions par le passage de ceux-ci à travers une membrane semi-perméable. Les protéines du fait de leur poids moléculaire élevées, ne sont pas diffusible (**Kamoun., 1977**).

Après la mise en suspension des protéines précipitées dans un volume adéquat de tampon acétate 0,1 M (pH 4,2), l'extrait est dialysé à travers une membrane semi-perméable (boudins de dialyse préparés) contre de l'eau distillée pendant 24 à 48 h au réfrigérateur à 4°C l'eau distillée chargée de sels d'ammonium est renouvelée chaque 3h pour accélérer la diffusion. L'extrait enzymatique ainsi déminéralisé étant concentré par

dialyse contre une solution saturée de saccharose, l'extrait enzymatique obtenu est l'extrait enzymatique pré-purifié (EEPP).

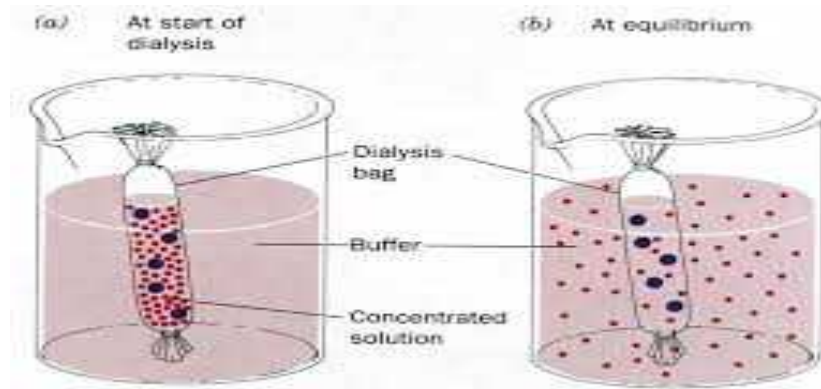


Figure 1: Dessalement par dialyse (webdepot.ca).

8.3 Purification de l'extrait enzymatique (EEPP) :

La purification des préparations enzymatiques a été réalisée par chromatographie d'exclusion moléculaire (ou gel filtration). Le gel de filtration est une technique de chromatographie qui permet de séparer des molécules en fonction de leurs tailles et de leurs formes. On utilise des granules de gel poreux, le diamètre des pores étant une caractéristique de chaque type de gel. Cette méthode fréquemment utilisée dans la purification et la séparation des protéines sont élues dans un ordre décroissant (**Durang et Monsan., 1974**).

Les molécules quittent donc un gel Séphadex placé dans une colonne de verre dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes. Les plus petites molécules des protéines pénètrent dans les grains de Séphadex, les plus grandes migrent donc plus vite vers le bas de la colonne.

La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires (**Audigié., 1982**). Notre extrait enzymatique est soumis à une chromatographie sur gel Séphadex de filtration "G75"

8.3.1 Appareillages employés :

- Colonnes analytique type QTY10, de dimension 1,5 * 30 cm
- Pompe péristaltique STA-Multipurpose model (*Desaga*)
- Collecteur de fraction Spectra chrom CF-2

La lecture de l'absorbance est réalisée sur spectrophotomètre UV-VIS type *Shimadzu* réglé à 280 nm contre un blanc de tampon.

•Préparation du gel et remplissage de la colonne :

Les gels de séphadex sont des gels de dextrans réticulés par de l'épochlorhydrine. Les propriétés de ces gels sont liées aux taux de réticulation. Les gels séphadex de type G sont utilisés pour la séparation des molécules hydrosolubles. LeSéphadex G75se caractérise par un intervalle de fractionnement de protéines ayant une taille allant de 3000 à 70000 Kda.

La préparation de gel est une opération capitale : une prise d'essai de gel est mise en suspension dans l'eau distillée est lavée 3 fois avant l'opération de gonflement qui doit être effectué dans un excès de solvant à 4°C, la durée de préparation de gel est 24h, on a laissés le gel a 30h. Une fois le gel est prêt, il est coulé à la fois sur la paroi de la colonne à l'aide d'un entonnoir. Le gel doit être bien tassé et homogène et présente une seul phase.

8.4 Dépôt de l'échantillon :

Le gel est stabilisé dans la colonne par passage du tampon acétate (PH 4,2), pour éliminer toutes traces d'impuretés. La densité optique de la première fraction contre un blanc doit être zéro, la surface de gel étant stabilisé en plaçant sur la colonne un adaptateur et un volume entre 0.5 et 1ml de l'extrait enzymatique est déposé sur la surface de gel dans la colonne à l'aide d'une pipette.

8.5 Elution :

L'élution est réalisée par perfusion de tampon dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit (0.84ml/min), le débit imposé à la colonne doit toujours être inférieur au débit spontané de cette colonne. La densité optique des éluâtes recueillis à l'aide du collecteur de fraction à raison de 2.8ml par tube est lue à 280 nm dans un spectrophotomètre UV- Visible, on trace par conséquence la courbe DO en fonction de volume d'élution, les éluâtes recueillis correspondant à des pics d'absorption sont rassemblés séparément en fractions.

8.6 Analyse des fractions récupérées :

Sur chaque fraction récupérée nous avons recherché les activités endo, PG, PL. la teneur en protéines solubles a été estimée par la méthode de Lowry sur les fractions qui

présentent une activité pectinasique. L'injection d'enzyme pré-purifié est répétée plusieurs fois afin de récupérer une quantité considérable des fractions actives.

9. Détermination de poids moléculaire des enzymes récupérées :

Il existe une zone de poids moléculaire qui varie linéairement avec le logarithme du poids moléculaires connue. Cette méthode est également utilisable pour les peptides et pour des macromolécules non protéiques .Il est ainsi possible de déterminer le poids moléculaire d'une enzyme en mesurant son volume d'éluion grâce à la mesure de son activité dans l'éluant, un étalonnage préalable de la colonne utilisée par une série d'enzyme de poids moléculaires connus permet d'obtenir, avec une bonne précision, le poids moléculaire étudiée (**Kamoun., 1977**). Avec les mêmes conditions de l'injection de l'extrait enzymatique pré purifié, Nous avons appliqué sur une colonne analytique ou le gel est coulée et ensuite équilibré par passage d'environ 10 fois son volume avec le tampon acétate de sodium pH 5.4. Environ 1ml de protéines standards (BSA, chymosine, trypsine inhibiteur).

10. Applications des extraits enzymatiques à la clarification d'un jus d'abricots :

Plusieurs méthode de clarification de jus d'abricots sont adoptés dans les industries selon les conditions opératoire ; l'introduction des enzymes pectinolytiques pour l'augmentation du rendement ou bien pour la clarification des jus est l'objet de recherche de plusieurs auteurs (**Wilinskaet al., 2007**).

10.1. Obtention et clarification de jus d'abricots :

Le jus d'abricot est l'un des jus les plus consommés et appréciés en Algérie, ainsi le fruit d'abricot est largement cultivé dans plusieurs régions du pays. Les abricots utilisés sont ramenés du marché local de la région de Boumerdes, les fruits ont été nettoyés dénoyautés puis broyés et réduits en purée (diagramme). La purée obtenue est réparties dans des béchers de 200 ml en 4 fractions de 150 g, dans chacune nous avons ajouté 15 ml d'extrait enzymatique:

Fraction 1 : 15 ml d'EEB,

Fraction 2: 15 ml d'EEPP,

Fraction 3: 15 ml d'EP

Fraction 4: 15 ml d'eau distillée (ED), cette fraction sert de témoin.

Les 4 béchers ont été incubés à 40 °C pendant 16 heures, puis les purées sont pressurées dans un tissu pour extraire le jus dont le volume est mesuré.

1 ml d'EEB a été ajouté dans le jus de chaque fraction puis le mélange est incubé à 40°C pendant 2 heures, les jus sont filtrés puis analysés pour déterminer leurs transmittances et turbidités.

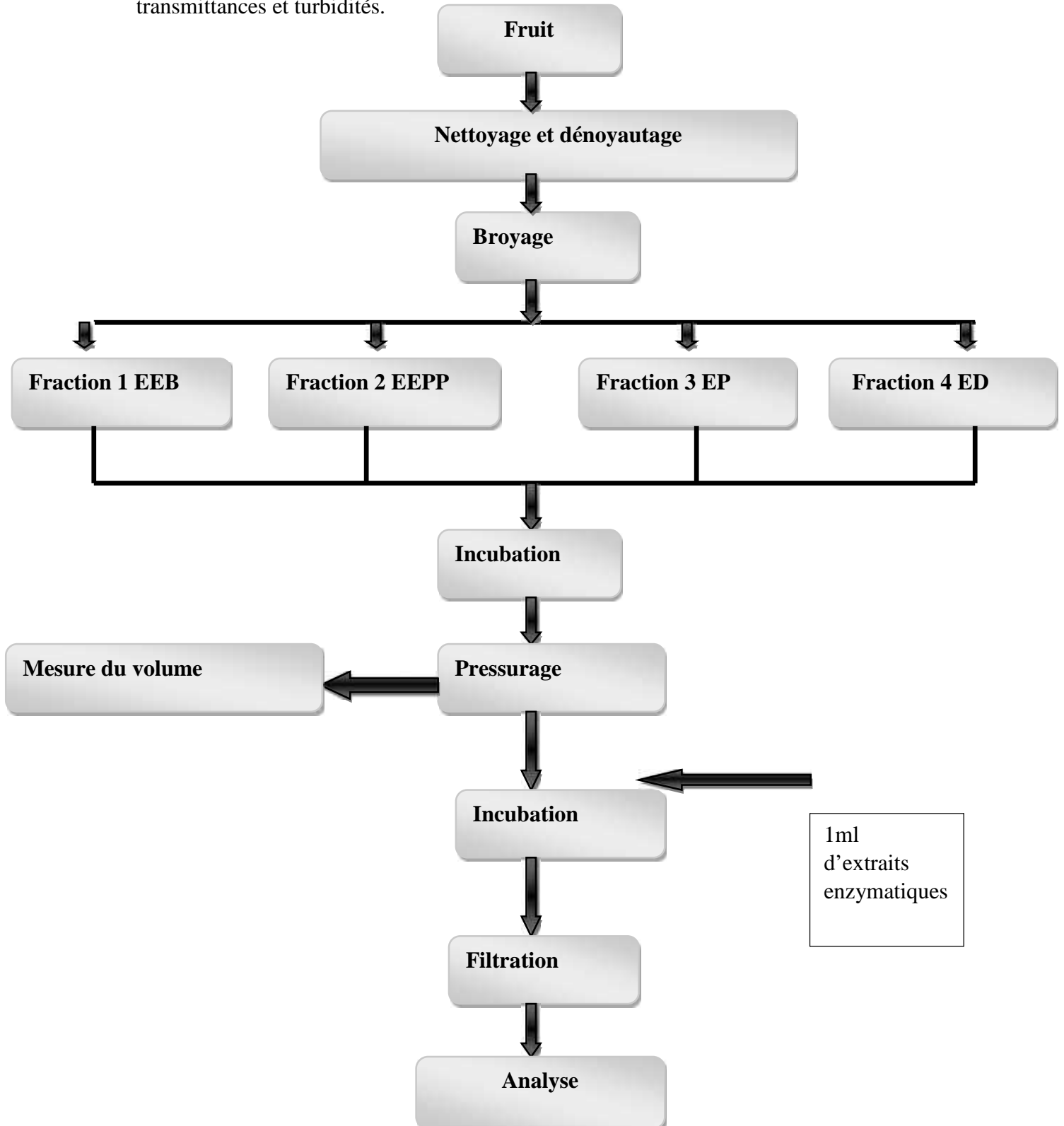


Figure 2: Diagramme appliqué pour production du jus d'abricot.

1 Détermination de la teneur en eau :

1.1 Teneur en eau dans les résidus avant la fermentation :

Tableau 1: Teneur en eau dans le résidu d'oranges.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne (%)
Matière sèche (%)	19.6	21.6	24	21.73± 1.79
Humidité (%)	80.4	78.4	76	78.26± 1.79

Tableau 2: Teneur en eau dans le milieu de fermentation.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne (%)
Matière sèche (%)	32.92	38.4	31.0	34.10± 3.13
Humidité (%)	67.08	61.6	69.0	65.89± 3.13

L'humidité dans les résidus d'oranges était de l'ordre de 78.26%, ce taux d'humidité dépend du taux d'extraction de jus, ce résultat est comparable à celui des résidus d'oranges Egyptienne, utilisés par (El sheikh et al.,2008), Présentant un taux d'humidité de l'ordre de 76.5%.



Figure 1: Résidus d'oranges avant fermentation.

L'humidité dans les milieux de fermentation est un facteur important pour le développement des moisissures et la biosynthèse et sécrétions des métabolites (**Ellaiah et al., 2002**). Une faible humidité peut réduire la solubilité des nutriments dans le substrat, le degré de gonflement et peut augmenter la tension d'eau. Par contre une humidité très élevée peut introduire la réduction de taux d'enzyme par des obstacles stériques qui empêche le développement des micro-organismes dans les pores (espace interstitiel) des résidus et cela empêche la circulation d'oxygène (**Lozane et al., 1985**). Les humidités optimales pour le développement des moisissures sont de 60% à 90% (w/w)

La production des pectinases par *Aspergillus* Cultivé à 60% d'humidité (RO) était 3.5 à 17 fois moins élevée que celle produite par *Aspergillus Niger* à 90% d'humidité (**Diomi et al., 2007 ; Elsheikhet al., 2008**), la teneur en eau optimal pour la production de pectinases par *Aspergillus niger* était 54.60% dans un milieu à base de résidu d'oranges (**Benmalek et Benchabane , 2018**).



Figure 2: Résidus d'oranges dans les milieux de fermentations.

2 Développement sur milieu PDA de l'Aspergillus :

Les moisissures sont blanchâtres les premières 24h, la plage d'ensemencement s'élargit en prenant une coloration jaune après 48h, les spores noirâtres apparaissent le 3eme jour. Le dénombrement a donnée $30. 10^5$ spores / ml pour cette fermentation.



Figure 3: 2^{ème} jour de culture



Figure 4: 3^{ème} jour de culture



Figure 5: 5^{ème} jour de culture

3 Dosages des protéines dans les extraits enzymatiques :

Le dosage des protéines a été déterminé par rapport à une courbe d'étalonnage d'Albumine bovine sérum (BSA) (figure 6).

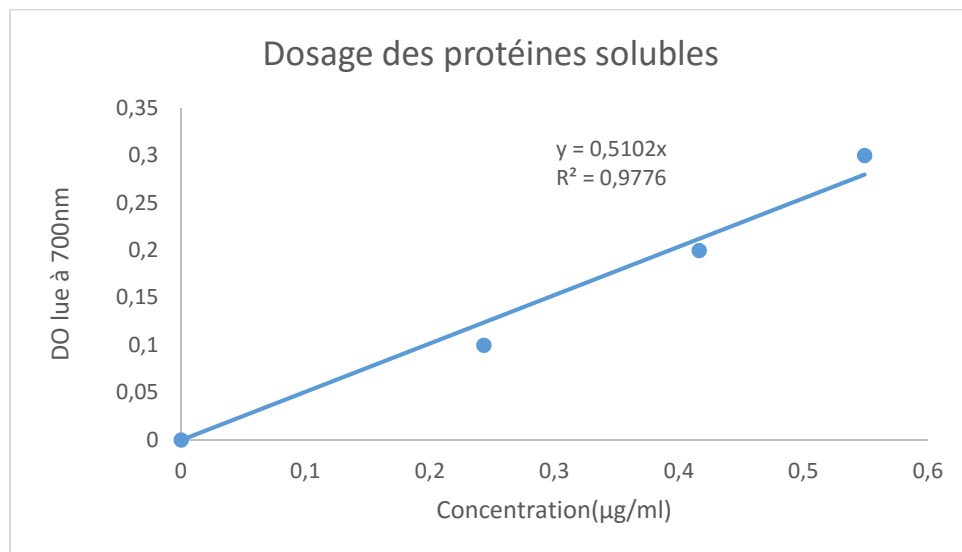


Figure 6: Courbe d'étalonnage de BSA.

3.1 Extrait enzymatique brut :

Tableau 3: Concentration des protéines solubles dans l'EEB.

	Densité optique	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Essai 1	0.818	32.06
Essai 2	0.715	28.02
Essai 3	0.736	28.84
Moyenne	0.756 ± 0.0444	29.62 ± 0.8718

3.2 Extrait enzymatique pré-purifié :

Tableau 4: Concentration des protéines solubles dans l'EEPP.

	Densité optique	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait prés purifié après dialyse	0.256	0.5017
Extrait prés purifié après concentration	1.59	3.116

La concentration en protéines dans les extraits enzymatique a diminué depuis l'EEB $29.62\mu\text{g/ml}$, jusqu'à l'EEPP $3.116\mu\text{g/ml}$, (tableaux 3 et 4). Cette diminution est due à la précipitation de certaines protéines contaminants sous l'action du sulfate d'ammonium, les protéines contaminants sont été éliminées par centrifugation.

Nous avons récupéré un volume de **150ml** d'extrait enzymatique pré-purifié après la précipitation et la centrifugation, cet extrait a été concentré par dialyse contre une solution de saccharose à 60%, le volume récupéré de EEPP concentré est de **90ml** dans la teneur en protéines était **3.116µg/ml**.



Figure 7: Extrait enzymatique dans un boudin de dialyse.



Figure 8: Boudin de dialyse dans une solution de saccharose.

4 Dosage des activités enzymatiques dans l'EEB et l'EEPP :

4.1 Activité polygalacturonasique :

Le tableau 5 présente l'action des extrais enzymatiques sur la viscosité d'une solution de pectine à 1% pH 4.2. Nous constatons une réduction importante dans la viscosité de la pectine sous l'effet de l'EEB qui a réduit la viscosité de la pectine jusqu'à 90,24% et l'EEPP qui a réduit la même solution de pectine jusqu'à 80,84%. La réduction de la viscosité a été accompagnée par une libération des groupements réducteurs dans le milieu réactionnel de l'EEB 25.9256UI, et qui ont été déterminés relativement à la courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique (figure 9).

Cela est dû à la présence des hydrolases qui ont dégradé la chaîne de la pectine responsable de son comportement visqueux.

D'après (Thibault, 1993), l'action des endo-PG_s provoquent d'une part l'apparition en quantité croissante des groupes réducteurs et d'une autre part une baisse progressive de la viscosité du milieu réactionnel. En coupant les liaisons (1-4) de la pectine (substrat), endo PG va entraîner une diminution de la longueur des chaînes des pectines occasionnant une baisse de la viscosité de la solution de substrat.

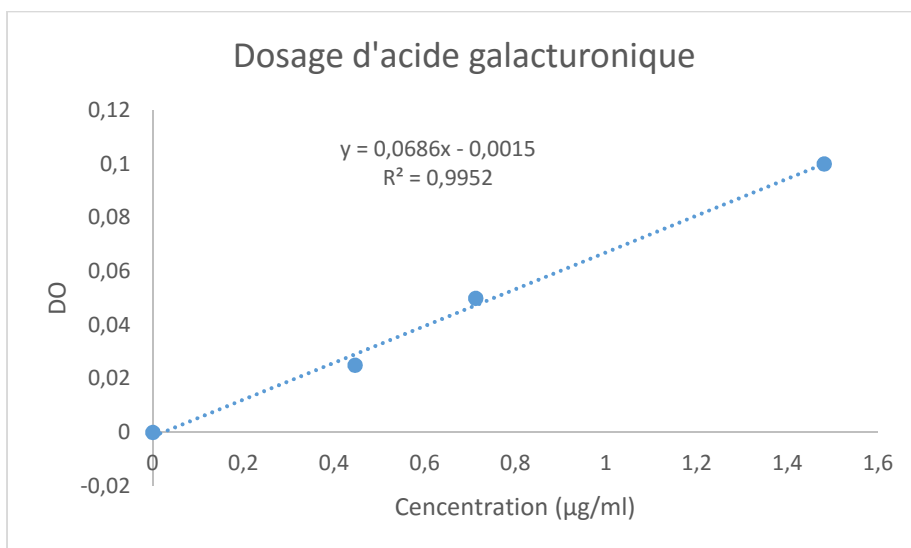


Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.

Tableau 5: Activité polygalaturonasiq.

Extraits	Groupement réducteurs formés (µmol/ml)	Activité exoPG (UI)	Diminution de la viscosité (%)	Activité endoPG (UI)
EEB	25.92	4.07	90.24	9.024
EEPP	/	/	80.84	8.084

On déduit par conséquence la présence de l'endopolygalacturonase ayant une activité de 9.024UI dans l'EEB et de 8.084UI dans l'EEPP. Ainsi que une activité exopolygalaturonasiq. ayant une valeur de 4.0740UI dans l'EEB.

L'activité de la pectine lyase dépend de la formation de doubles liaisons aux extrémités non réductrices des pectines (tableau 6).

Tableau 6: Activité pectine-lyase.

	Densité optique	Activité PL(UI)
Extrait brut	1.864	0.0129

La méthode la plus commode de suivre l'activité de la lyase est de mesurer l'augmentation dans l'absorbance à 235 nm due à la formation de D 4 :5 attaches doubles produits aux fins non-réductrices des produits non saturés. La lyase casse les liaisons du glycoside à C4 et simultanément et élimine l'H de C5, en produisant un D 4 : 5 non saturés.

L'activité de la pectine lyase est estimée par le taux d'enzymes nécessaires pour la libération d'une mole d'oligomères insaturés par unité de volume et par unité de temps. La densité optique du milieu réactionnel à 235 nm (EEB) est de 1.864 ce qui représente une activité de pectine lyase de 0.0129 UI.

5 Profil de purification des enzymes pectolitiques sur SéphadexG75 :

Le tracé de la densité optique à 280 nm de chaque fraction en fonction du volume d'élution (ou le nombre des fractions) nous a permis d'obtenir le profil de purification (figure 10).

Le profil de purification des enzymes sur séphadex a révélé deux bandes d'absorption avec un pic qui se situe à la 3^{ème} fraction avec un DO_{max} de 0.416 et un autre pic qui se situe à la 17^{ème} fraction avec un DO_{max} de 1.266, la fraction relative au premier pic est douée d'une activité pectine lyase à une teneur de 0.0021UI et la fraction relative au deuxième pic est douée d'une activité Endo-polygalacturonasique à une teneur de 7.833UI, l'action de l'EP relative à fraction 2 sur une solution de pectine à 1% à pH 4,2 a permis de diminuer de sa viscosité jusqu'à 78, 84% en 10 minutes avec libération de 14,84 μg /ml de groupements réducteurs dans le milieu réactionnel.

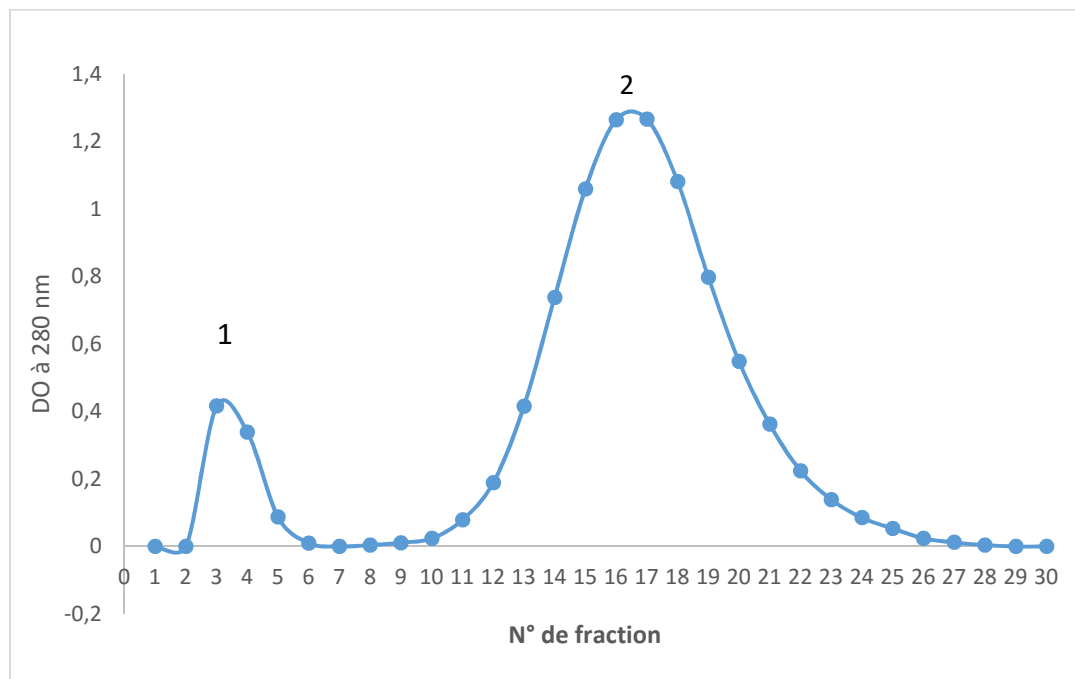


Figure 10: Courbe d'élution de l'EEPP sur Séphadex G75. (Débit : 0.84ml/min)



Figure 11: Extraits enzymatiques purifiés.

Tableau 7: Tableau de purification.

Extrait enzymatique	Activité enzymatique totale (UI)	Activité spécifique Totale (U/ μ g de protéines)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
EEB	EndoPG:2355.26 ExoPG:1087.78 PL:3.366	EndoPG : 0.0304 ExoPG : 0.14070 PL : 0.0004355	1	100
EEPP (endoPG)	727.56	2,594	85.172	30.890
EEP 2	22.0752	37.36492	1226.688	0.94
EEP 1	0.00588	0.009952	22.8518	0.17

On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique. L'activité est la quantité de la protéine exprimée non pas en termes de poids mais de capacité catalytique ou biologique. L'activité spécifique est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités (enzymatique ou autre) par poids de protéines totales. Plus l'activité spécifique est élevée, plus la protéine est pure. Il est fréquent d'obtenir des facteurs de purifications de l'ordre de 5000 fois et des rendements de l'ordre de 5%.

Le tableau de purification sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Il fait appel à des notions et à des termes précis. Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure. Normalement cette valeur est de plus en plus élevée au fur et à mesure des étapes. En effet la purification a justement pour but d'obtenir une protéine de plus en plus pure, ayant donc une préparation dont l'activité spécifique de plus en plus élevée. Le rendement de la purification est la proportion, en %, de la quantité de la protéine purifiée qui reste par rapport à la quantité initiale. Le rendement diminue à chaque étape puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel à chacune. Une purification est donc un "compromis" entre le désir d'obtenir une protéine la plus pure possible (facteur de purification élevé) en quantité maximale (rendement élevé). En effet, chaque étape supplémentaire, qui permet d'augmenter la pureté, cause des pertes de matériel, donc diminue le rendement. Au cours d'une purification typique le facteur de purification augmente au fur et à mesure des étapes tandis que, parallèlement de rendement diminue.

L'activité spécifique des enzymes pectinolytiques a augmentée après chaque étape de purification (tableau N°8), le facteur de purification a augmenté lui-même après chaque étape de purification, l'endoPG a été purifié avec un facteur de purification de 1226.82 et un rendement de 0.94%.

Nous constatons que la méthode de purification appliquée est adéquate pour l'endopolygalacturonase, par contre le facteur de purification de PL est de 22.87 avec un rendement de 0.17%, autres méthodes doivent être recherchées pour améliorer la purification de la pectine lyase.

6 Détermination du poids moléculaire des fractions purifiées :

La chromatographie sur colonne séphadex G 75 d'un mélange de protéines standards composé d'Albumine bovine sérum (BSA), dont le PM est 67Kda, chymosine dont le PM est de 35.6 et la trypsine inhibiteur dont le PM est de 20Kda, a révélé le graphe de figure n 12.

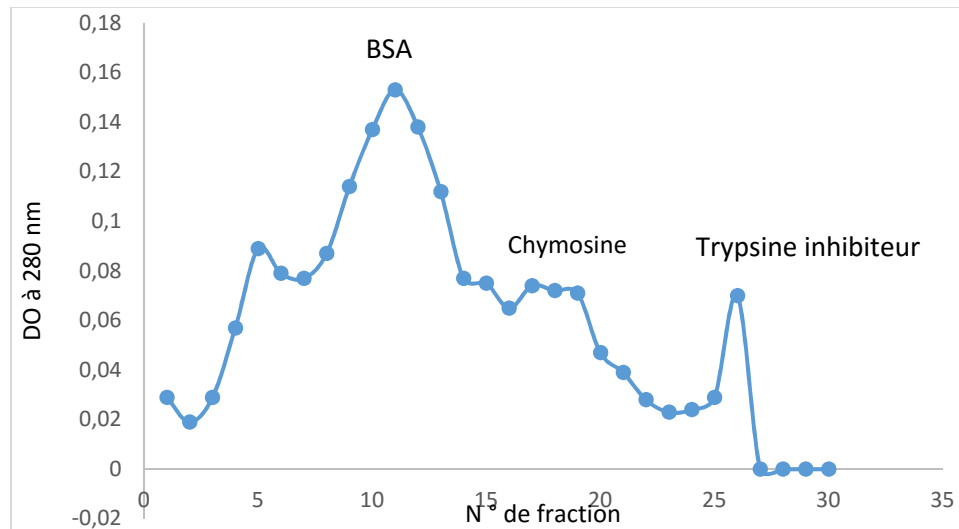


Figure 12: Courbe des protéines standards.

A partir de la courbe d'éluion des protéines standards ci-dessus, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du logarithme décimale des protéines standards en fonction de leurs volumes d'éluion correspondant (figure 13). Cette courbe nous permet de déduire le poids moléculaire des enzymes purifiées par extrapolation de leurs volumes d'éluion sur la droite de régression obtenue.

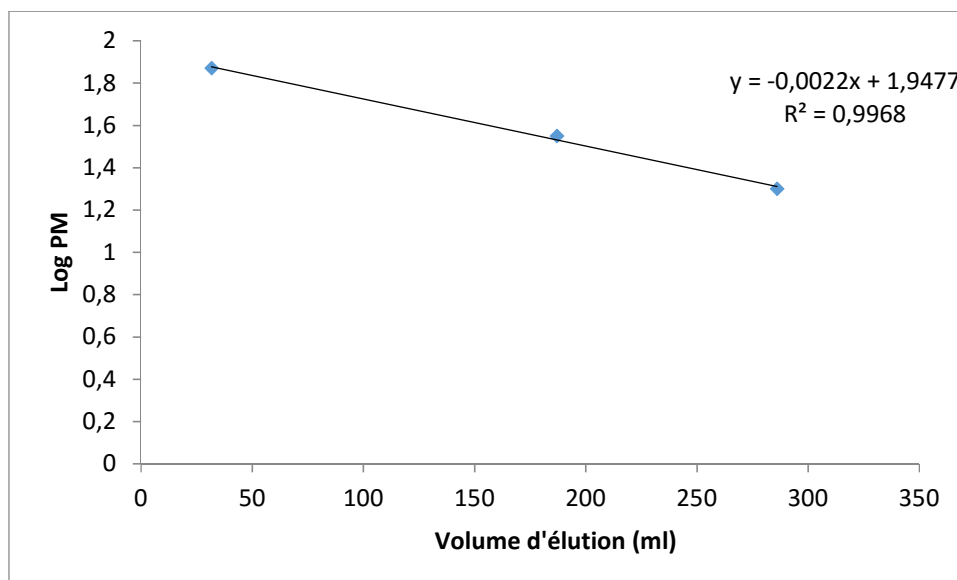


Figure 13: Courbe d'étalonnage des protéines standards. (Séphadex G75)

Le poids moléculaire des enzymes purifiées déduits de la courbe ci-dessus, sont illustrés par le tableau N°9.

Tableau 8: Poids moléculaires des enzymes récupérées.

Enzyme	Volume (ml)	Log (PM)	PM (Kda)
BSA	30.8	1.82	67
Chymosine	44.8	1.55	35.6
Trypsine inhibiteur	72.8	1.3	20
PL	8.4	1.92	83.17
Endo PG	47.6	1.85	70.79

Cette technique nous a permis de purifier deux enzymes PL et EndoPG, la PL se caractérise par un PM plus élevé (83.17Kda), elle quitte le gel la première à un volume d'éluion de 8.4ml. Le PM de l'endoPG qui a quitté le gel en deuxième lieu à un volume

d'élution de 47, 6 ml est de 70.79Kda. Le PM de l'EEP se situe dans l'intervalle signalé par Mohamed et al., 2009, qui ont rapporté que les PM de la majorité des enzymes pectinolytiques se situent entre 25 et 80 Kda.

7 Application des extraits enzymatiques sur les abricots :

La figure 14 montre le jus obtenu après macération de la purée d'abricot en présence des extraits enzymatiques:



Figure 14: Le jus obtenu par macération de la purée d'abricots.

Tableau 9: Volume de jus récupéré.

Extrait enzymatique	Volume de jus obtenu (ml)	Rendement (%)
EEB	89	59,33
EEPP	102	68,00
EEP	57	38,00
ED	45	31,38

Nous constatons une nette amélioration dans le rendement en jus de fruit par introduction des extraits enzymatiques: le meilleur rendement a été observé sous l'action de

l'EEPP (68 %) et l'EEB 59,33%, cela est dû peut être à la présence du complexe enzymatique composé de PME et PG qui réagissent en synergie pour le dégradation de la pectine de la paroi cellulaire. le volume du jus récupéré par macération par l'EEP est inférieur par rapport aux autres extraits enzymatiques, ce qui est dû probablement au manque de l'action synergique des enzymes; ou bien cela est dû à la quantité de l'enzyme qui est faible dans l'EEP sachant que les PL dégradent la pectine sans présence de PME. Dans certains travaux de Chauhan et al.,(2001) réalisées sur la macération enzymatique de la purée d'abricot, le rendement en jus maximale a été de l'ordre de 78% en utilisant les pectinases d'*Aspergillus niger* à 0,5% pendant 5 heures.

7.1 Caractéristiques du jus d'abricot obtenu

La transmittance est faible en présence des particules en suspension dans les solutions turbides, dans le cas contraire les solutions transmettent la lumière incidente et par conséquent la transmittance sera plus élevée et se rapproche de 100% en d'absences totales des particules en suspension.

Le jus le plus limpide est celui traité par l'extrait enzymatique brut, une clarification intéressante est observée sous l'action de l'EEP (transmittance = 30,3 %) suivi par l'EEPP. La variation de la turbidité est en antagonisme avec la transmittance, les faibles transmittances sont observées dans les solutions les plus turbides et vice versa (tableau 10).

Tableau 10: Caractéristiques optiques du jus clarifié par les extraits enzymatiques

Extrait enzymatique	Transmittance (%)	Turbidité (UN)
EEB	75	34,7
EEPP	11.4	233
EEP	30.3	105
ED	4.1	1672

La différence entre les différents jus obtenue est nettement visible comme c'est montré par la figure N°13.

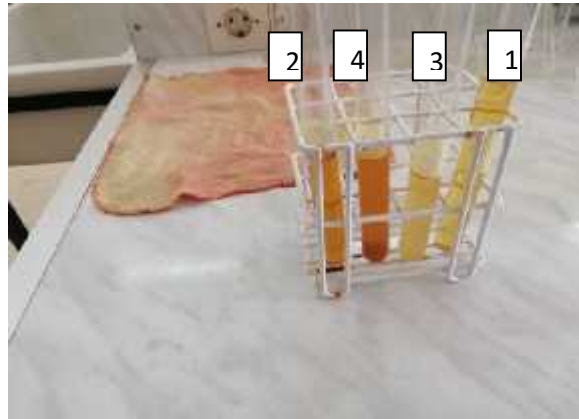


Figure 15: Action des extraits enzymatiques sur le jus d'abricot.

Conclusion générale

Dans l'aspect d'utilisation des résidus agro-alimentaires, nous avons accomplie une étude sur la production des enzymes pectinolytiques à partir des résidus d'oranges. Les résidus se représentent comme un très bon milieu de culture pour la croissance de *l'Aspergillus niger*. et la synthèse des enzymes pectinolytiques.

La stratégie de purification adaptée est efficace, elle nous a permis de purifier une polygalacturonase avec un facteur de 1226,68 et un rendement de 0,94% et une PL avec un facteur de purification de 22,85 et un rendement de 0,17%.

Ces enzymes s'appliquent bien pour la macération de la purée des abricots tel qu'elles ont amélioré le rendement en jus de fruit limpide qui peut être conservé sans modification spontanée dans son aspect extérieur.

En perspectives, nous souhaitons de trouver d'autres microorganismes qui produisent les enzymes d'intérêt dans l'industrie alimentaire, et de poursuivre la purification des autres enzymes come la PME, l'exoPG et la PL.

A

Antier, P. Minjares, A, Roussas, S, Rambaulte, M et Viniégra, G., (1993) : Pectinase hyperproducing mutant *Aspergillus niger* C28 B25 for solid state fermentation of coffee pulpe. *Enzymes microb. Technol* 15. 254-260.

AUDIGIE, C., (1982).Principe des méthodes d'analyses biochimique .Paris, Ed, 190p.

Albagnac, G, Patrick V. et Jean-Claude, M., (2002) : Technologies de transformation des fruits. Lavoisier. Paris Ed. Tec & Doc.

Aoussat, A., (1978) : Composition et formation d'un trouble protéo-pectique dans le jus de framboise dépectinisé. Thèse de docteur ingénieur, Université de Dijon.

B

Baississe, S., Hanachi, G., Fahloul, D. et Lekbir, A., (2010): Comparaison of structure and emulsifying activity of pectine extracted from apple pomace and apricot pulp ; *World J journal of Dairy and Food sciences* 5(1): 79-84.

Bestle, J M. et Jouany, J P., (1990) : La biomasse pariétale des fourrages et sa valorisation par les herbivores. INRA. *Pro. Anim*, 3 (1): 39-50.

Brudieux, V. (2007) : Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de docteur. Université de Limoges. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.

Belhamri, R., (2005) : Extraction des macromolécules pariétales des eaux de presse de betteraves sucrières étude de leur composition, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur effet sur le processsucrier. Thèse de docteur.

Bekhouche, F., (2006) : Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique.2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine.

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

Gauthier-Villars.

Bamby, F.M., Mnpeth, F.F., Pyle, DL., (1990): Endopolygalacturonases production from Khyveroniyosmarxianis 1 résolution purification and partial characterization of the enzyme. *Enzymemicro. Technol.* 12, 891-897.

Bousseboua, H. (2002) : Eliment de microbiologie générale. Edition de l'université Mentouri, Constantine (Algérie).

C

CASANOVA, A. (1989). Influence du substrat sur la production de pectinases d'*Aspergillus Niger* par fermentation en milieu solide. Projet de fin d'étude. Université de Technologie de compiepne. Mexico.

Combo, A. M.M., Aguedo, M. et Paquot, M. (2011) : Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Christensen, T.M., Nielser, J.E. ,Kriberg, J.D., Rasmusen, P. et Mikkelson, J.D., (2002):

Pectin methylestérase from orange fruits: Caractérisation and localization by in situ hybridization and immune-histochemistry. *Planta.* 206, 493-503.

Castilho, LR., Alves, T.L.M. et Medronho, RA., (1999) : Recovery of pectinolytic produced by solid State culture of *Aspergillusniger*. *Process biochem.* 34.181-186.

Castilho, L.R., Alves, T.L.M. et Medronho, R.A. (2000) : production and extraction of pectinase obtained by solide State fermentation of agro industrielresidus withe *Aspergillus Niger*. *Bioressource technol.* 71, 45-50.

Chauhan, S.K., Tayagui, S.M., et Singh,D (2001): Pectinolytic liquéfaction of apricot plum and mango pulps for juice extraction. *International journal for food properties.* 4 (1), 103-109.

D

Ducasse, MA.,(2009) : impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges –étude de l'évolution de ces composés en solution modèle vin. Thèse de doctorat ; Université de Montpellier II.

Dupy. P.,(1982): Use of enzymes in food technology. Technique et documentation. LAVOISIER. PARIS. 1982.

Denis, S., Tokuioshi,K., Da Silva MartineE., Da SilvaR., Gomes E. (2005):Production of pectinases by solide state fermentation with *péniciliumviridicatum* RFC3. Process biochemistry 40, 2885-2889

De. Gregrio, A., Mandulari, G., Arena, M., Nucito, F., Tripodo,M.M. et Cerrto,R.B. (2002) :Sepandcrude pectinases production by submerg state fermentation of lemonpulps. BioressourceThéchnology.83, 89-94.

Donaghy, J.A.,MC Kay, A.M.(1994): Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey.Biores. technol. 47, 25-28.

E

Etienne, E. (2002) : introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tec et Doc. Lavoisie. Paris

F

Faravash, R. S. etZokaie,F.A. (2008): The influence of acid volume, ethanol to extract ratio, and acid washing time on the yield of pectic substances extraction from peachpomace.

G

Guenap., N, Tarrado –Agrasseu, A, Lopez- Macias, C. etPastiaua, L., (2003): main characteristic and application of solide state fermentation. Electron. J. Environ. Agric. Food chem.2 (3), 343-350.

Garzon, C.G. etHaus, R.A., (1992): citus waste and alternative substrat for pectinase production in solid state culture. Bioressource.technol. 39.93-95.

H

Hasunuma, T. F. et Kabayashi, A., (2003). Méthanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus Niger* pectin methyl esterase in tobacco cells. *J. Biotechnol.* 106,45-52.

HadjTaieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdoullah, F. et Gargouri, A., (2002) :Hyper production of pectinases activities by fully constitutive mutant (CT1) of *penicillium occitanis*. *Enzymemicrobial Technol.* 30, 662-666.

Habibi, Y., (2004) :Contribution à l'étude morphologique, ultra structurale et chimiques de la figue de barbarie, les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modifications chimiques. Thèse de docteur. Université Joseph Fourier.

Hamdi, M., (1991) : Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de doctorat. Université de Provence Aix. Marseille I.

Hang, Y.D. et Woodams, C.C., (1994) : production of fungal polygalacturonase from apple pomace. *Lebensm. Wiss.U. Technol.* 27, 194-196.

S

Ismail, I.A., (1996): utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. *Process biochemistry.* 31. 645-650.

J

Jeanet, R., Croguennec, T., Schuck, P. et Brulé, G., (2007). Science des aliments. Biochimie, Microbiologie, Procédés, produits. Lavoisier. Paris.

K

Kamoun, P., (1977) : Appareil et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion, 2^{ème} Ed, Paris. 236p.

Khalil, K.E., Abd el bari,M.S., Hafiz,W.E. et Enstar, Y.A., (2002): production evaluation and utilization of date syrup concentrate (Debis). Egypt. J. foodsci, 30N°2 pp179-203.

Kosakov, A.V., Ukenev, O.N., Sokotova, L.M., Semenova, M.V., Sinistyana,O.A., (2006) :Used of preparation from fungal pectin lyase in the food industry. ISSN003-6838, Applied biochemestery.Vol 42 n°6 pp-598-602 © Maik “Nauba“ (interperiodica Russia 2006).

L

Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R.J. (1951): Proteine measurement with the Folin phenol réagent. Journal of biologychemistry. 139; 265-275.

Larreta–Garde, V., (1997). Enzymes en agroalimentaire.Lavoisier. Ed. Tec & Doc. Paris.

Lubertozzi, D. et Keasling, J.D., (2009):developing aspergillus as hoste for hétérologous expression. Biotechnology Advance. 27, 53-75.

M

Margo, P., Vaivaro, L., Chiosi, G.,Avanzo, C. etBalestra G.M.,(1994): Pectinoytic enzymes produced par pseudomonassyringaepv.Glycinea FEMS Microbiol.lett 117,1-6.

Mohamed, S.A., Al-Malki, A. El-R.,Kumosani, T.K.(2009): Characterization of a Polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. Australian Journal of Basic and Applied Sciences

N

Nagel, C.W., Waughn, R.H., (1961):The characteristic of polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*.Arc.Biochem.Biophys.93, 344-352.

Nagel, C.W. et Anderson, M.M., (1965):Action of a bacterialtranseleminase on normal and unsaturedologolacturonicacide. Arch. Biochem. Biophys.112-322.

P

Pathak,N. etSanwal, G.G., (1998): Multiples forms of polygalacturonases from banana fruits.phytochemi. 48, 249-255.

Pardey, A., Francis, F., Silva A. et Soccol,RC., (2004) :General aspect of SSF in: concise encyclopedia of bioessourcetechnology .Harvooth press Inc pp.702-708.

Poonam, S. etPandey,A., (2009): Biotechnology of agro-industriélrésidus utilization, DOI 10. 1007/978-1-40-20-9942-7-10.

R

Ralet,M. C., Lerouge,P. et Quéméner,B., (2008) : masse spectrometry for pectin structure analysis. Carbohydrates research journal 08-36.

RexovàBenkovà, L. etMarkovic, O., (1976): Pecticenzymes.Advances. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 33, pp: 323-385.

Roussos, S., (1987) : croissance de trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulase. Institut francais de recherche scientifique pour le développement en coopération. Edition de l'ORSTOM.

S

Sheykinejad, A., M. Heydariau et Homorzi F., (2008) : Strain improverment of aspergillussp for pectinolytic enzymes production. Journal biotechnology 1365. 290-344.

Sathyanarayana, N-Gummadi, Manog,N. et SunilKumar, D., (2007):Structure and biochemical properties of pectinase: Industrial enzymes, (eds) J. Polaima and AP Mac cube, 99-115.

Sathyanarayana, N-Gummadi, Manog, N., et Sunil Kumar, D., (2005) :microbial pectictranseliminases biotechnology 27 :451-458.

Soriano, M., Diaz, P. et Pastor, F.I.J., (2005): Pectinolytic system of two aerobic mesophilic bacterial strains with high activity on pectin. *Cun. Microbio.* 50, 114-118.

Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Berges, A.C. et Silva, D.O., (2001): Characterization of pectinase produced from endophytic strains isolated from coffee cherries. *Let. Appl. Microbiol.* 33, 117-121.

Sidi, A., Cochet, N., Ghose, T.K. et Tabault J. F., (1984) : Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. *Biotechnol. Lett.* 6. 723-728.

T

Tabuc, C., (2007) : Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti.

Tanabe, H., Kobayashi, Y., (1987): Plant tissue maceration caused by pectinolytic enzyme from *Erwinia Spindera* alkaline condition. *Agric. Biol. Chem.* 51(10) 2845-2846.

Tanabe, H., Kobayashi, Y. et Akamatsu A., (1987): Pretreatment of pectic waste water from orange canning by soft rot *Erwinia carotovora*. *J. Fermentation Technology. Technol.* 2845-2868.

THEUIL P. A., CLAISSE A.G., DUCHIRON.F (2011): Yeasts: An attractive source of pectinases From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry.*, **46**. 1525–1537.

W

Wilinska, A., Sofia, A.F., Bryjak, J. et Polacovic, M., (2007) : thermal inactivation of exogenous pectin methylesterase in apple and claud berry juices. *Journal of food engineering* 85.459-465.

Y

Yeoh, S., Shi J., et Langrish T.A.G. (2008): Desalination 218 ; 229-237

Z

Zheng, Z. et Shetty, K. (2000): solid-state production of polygalacturonase using fruits processing waste. *Process biotechnol.* 35. 825-830.

1. Préparation de la solution tampon acétate de sodium 0,1N , pH 4, 2

Solution A :acétate sodique ($C_2H_3O_2Na$) 0,1 N , 8,204 g /l.

Solution B :Acide acétique (CH_3COOH) 0,1N, 6,005g /l.

Solution C : Tampon acétate de sodium 0,1 M à PH 4, 2 : 23,9ml A+ (100- 23,9)ml de B

2. Dosage des sucres par la méthode de Somogui et Nilsson

2.1. Préparation des solutions A, B, C, D

❖ Solution A (Tarto-alcalin)

Dissoudre :

- 25 g de Na_2CO_3 ;
- 25 g de sel seignette ;
- 200 g de Na_2SO_4 ;
- 20 g de $NaHCO_3$.

dans 800 ml d'eau distillée, puis compléter à 1L.

❖ Solution B : (Cuivrique)

15 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dans 100 ml d'eau distillée, 2 gouttes d' H_2SO_4 concentré.

❖ Solution C

Se prépare par le mélange de 1 ml de solution B et 25 ml de solution A.

❖ Solution D

25 g de molybdate d'ammonium dans 450 ml d'eau, mélanger et ajouter 21 ml d' H_2SO_4 concentré. Ajouter 3 g d'arséniate de sodium dissoute dans 25 ml d'eau distillée,. Complété à 500 ml. Et joindre cette solution à la précédent si le réactif à une teinte ver d'âtre a ajouter quelques gouttes de solution de $K_2Cr_2O_7$ 0,05N jusqu'à obtention d'une coloration jaune d'or.

Dénombrement des spores.

La méthode consiste à un comptage des spores sous un microscope optique .Chaque comptage a été réalisé sur vingt cinq petits carrés. A l'aide d'une pipette: introduire quelques millilitres de la suspension entre la lame et la lamelle de la cellule de MALASSEZ; la concentration cellulaireest obtenue grâce à l'équation suivante:

$$X \left(\frac{s}{m} \right) = \frac{(n_u \quad d \quad s \quad m \quad c \quad c \quad é e)}{(n_u \quad d \quad p \quad c \quad é s \quad c \quad é s)} * \left(\frac{1}{V} \right)$$

Ou : V_p est le volume de petit carré en ml.

1. Dosage des protéines (Méthode de Lowry ,1951)

Solution étalon de protéine (Sérum Albumine) à 5g/l.

❖ Solution de Lowry A

- Na₂CO₃ 1g.
- Na OH (0.1 mol/l) 50ml.

❖ Solution de Lowry B

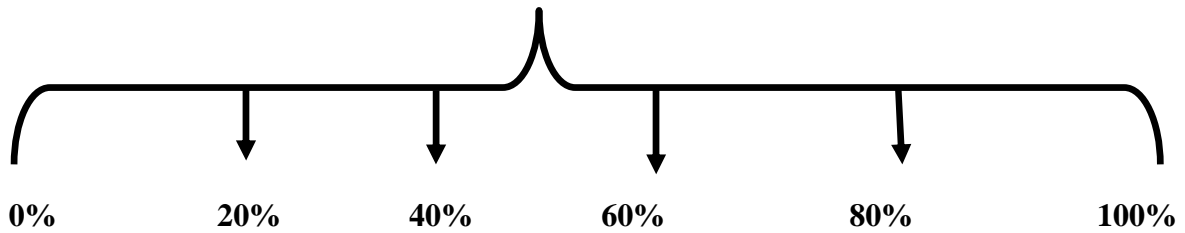
- CuSO₄, 5H₂O 25mg.
- Tartrate de K et Na 50mg.
- H₂O 5ml.

❖ Réactif de Lowry

- Mélanger le jour de la manipulation:
- 50 ml de solution A et 1ml de solution B.
- 50 ml de solution A et 5ml de solution B.

❖ Solution D

- Réactif de folin-ciocalteau dilué au 1/2 avec l'eau distillée.

Gamme d'étalonnage**Préparation de l'étalon de protéine (sérum albumine)****0,5g de BSA dans 100ml d'eau distillée****Préparation d'une solution fille de 10ml de la solution mère****5ml de solution cuivrique (Lowry A+B)****Agitation et attendre 10min****Ajouter 0,5ml de folin-ciocalteu dilué****Agiter et laisser 30min à l'obscurité****Mesure l'absorbance à 660nm****Diagramme de dosage des protéines par méthodes de Lowry**