

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université M'Hamed Bougara Boumerdes

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Technologie Alimentaire

Filière : Génie des Procédés

Option : Qualité et conservation des aliments

THEME

**Contribution a la production d'enzymes pectinolytiques par
Fermentation Sur Deux Milieux SOLIDES**

Présenté par :

Bouharoune karima.

Soutenu le : 15/12/2016

Jury:

President: M^r SEKOUR.B	(MAA)
Examineur: M^{mE} SMAILI	(MAM)
Examineur: M^{mE} AMAR .R	(MAA)
Promotrice: M^{me} HACHEML.N	(MAA)

Promotion 2016

الملخص :

هذه الدراسة هي مقارنة ما بين إنتاج الإنزيمات pectinolytique على وسطين صلبين مختلفين نخالة القمح وقشر الليمون. الأنشطة الإنزيمية التي تم الحصول عليها من قشر الليمون أعلى من تلك التي تم الحصول عليها في نخالة القمح، التنقية في مقتطفات إنزيم الخام عن طريق الترشيح هلام أسفرت اثنين polygalacturonases ذات أوزان جزيئية مختلفة في كل من مستخلصات أنزيم.

تم العثور على الوزن الجزيئي للإنزيمات (42.85 kda) (27.54kda) في قشر الليمون و (1.728kda) endo PG و exo PG في نخالة القمح على التوالي.

Résumé :

Cette étude est comparative entre La production d'enzymes pectinolytique sur deux milieux solide différent le son de blé et les écorces de citron ; les activités enzymatiques obtenues dans les écorces ont été plus élevées que celle obtenue dans le son de blé

La purification dans les extraits enzymatiques bruts par gel de filtration a permis d'obtenir deux polygalacturonases de poids moléculaire différents dans les deux extraits enzymatiques.

Les poids moléculaire des enzymes purifiées ont été trouvés de valeurs égales à (42.85 kda) (27.54kda) dans les ecorces de citron et (1.896 kda) (1.728 kda) dans le son de blé pour endo et exo PG respectivement.

Abstract :

This study is comparative between the production of pectinolytic enzymes on two different solid media the sound of wheat and lemon peel; The enzymatic activities obtained in the bark were higher than that obtained in the bran of wheat.

The purification in the crude enzymatic extracts by filtration gel made it possible to obtain two polygalacturonases of different molecular weights in the two enzymatic extracts.

The molecular weights of purified enzymes were found to be equal to (42.85 kda) (27.54 kda) in lemon peel and (1,896 kda) (1.728 kda) in wheat bran for endo and exo PG respectively.

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, ie tiens à remercier en premier lieu, Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage à fin de réaliser cette étude.

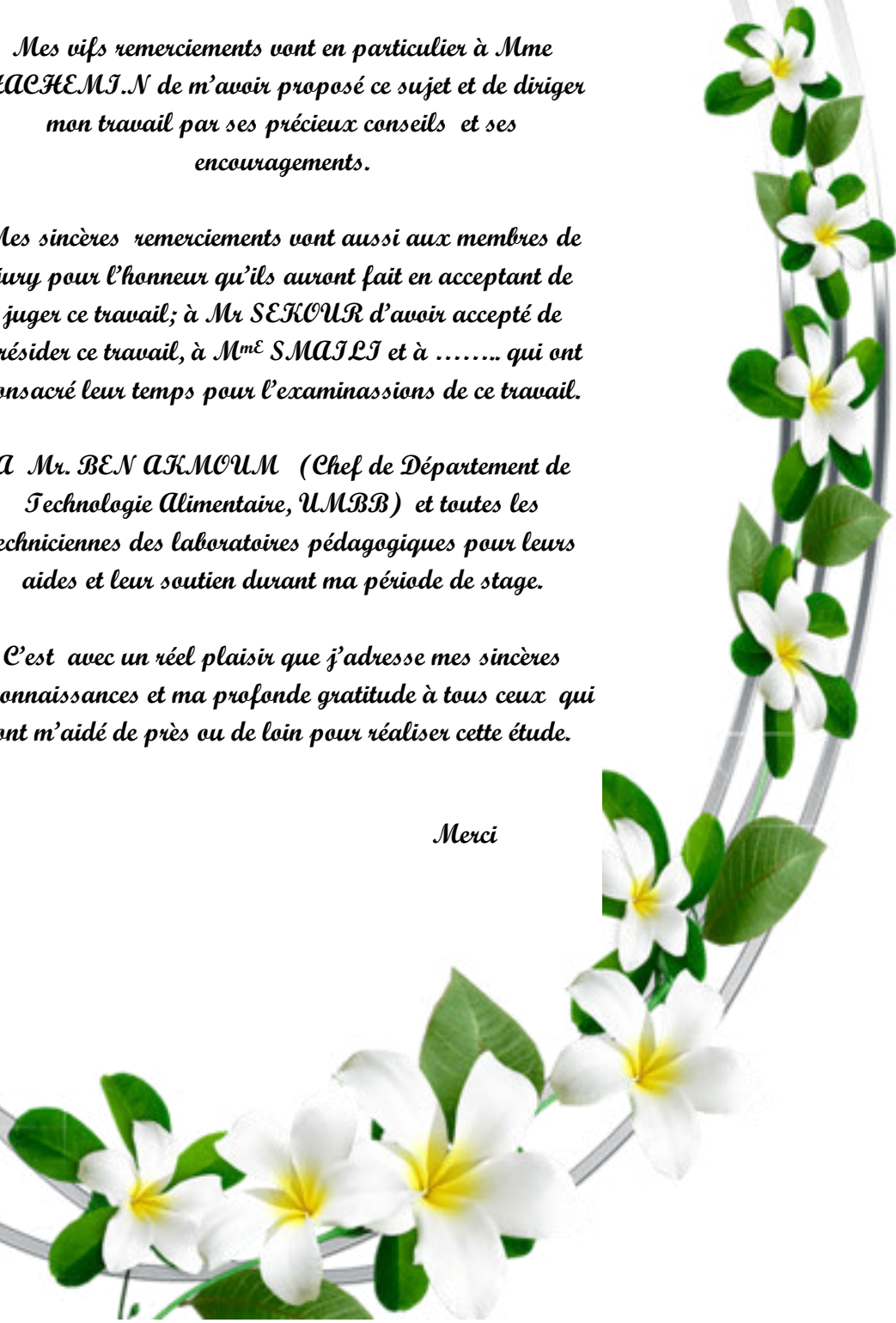
Mes vifs remerciements vont en particulier à Mme HACHEM.N de m'avoir proposé ce sujet et de diriger mon travail par ses précieux conseils et ses encouragements.

Mes sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail; à Mr SEKOUR d'avoir accepté de présider ce travail, à M^{me} SMAÏLI et à qui ont consacré leur temps pour l'examinassions de ce travail.

A Mr. BEN AKMOUM (Chef de Département de Technologie Alimentaire, UMBB) et toutes les techniciennes des laboratoires pédagogiques pour leurs aides et leur soutien durant ma période de stage.

C'est avec un réel plaisir que j'adresse mes sincères reconnaissances et ma profonde gratitude à tous ceux qui ont m'aidé de près ou de loin pour réaliser cette étude.

Merci



Dédicace

Je dédie ce travail à mes **CHERS PARENTS**, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que **DIEU** les bénisse.

A mes chers sœurs **NABILA ,SAMIA , NASSIMA** et mes chers frères **SALIM** et surtout à **MOHAAMED** ; tu es le meilleur frère qui existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A mon mari **SIDALI** avec tout mon amour
Je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant
Cette période.

A MA BELLE FAMILLE

Je vous remercie tout particulièrement pour votre soutien et affection. Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoin de mon affection et estime.

A tous mes amies
A tous mes collègues de promotion
A tous mes collègues de travaille
A tous ceux que j'aime.

KARIMA



Liste des abréviations

A: équivalent d'acide galacturonique produit par la réaction enzymatique

aw : Activity of Water.

BSA : Bovine Serum Albumin.

Da : Dalton.

d'A. niger : *Aspergillus Niger*

dm : degré de méthylation (%)

DNSA : l'acide dinitrosalicylique

EB : l'extrait brut .

E.C. : Enzyme Commission

EEPP : l'extrait enzymatique prépurifié

EP : l'extrait purifié

Exo-PG : exopolygalacturonase

Endo-PG : endopolygalacturonase

Fig : Figure.

FM : pectine faiblement méthylée

Hm : pectine hautement méthylée

MS : Matière Sèche

PDA : Potato Dextrose Agar.

PE : pectinestérases

PME : activité pectinéméthylstérase

pH : potentiel d'Hydrogène.

rpm : rotation par minute

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine.

UI : Unité Internationale

η : la viscosité

SA : sulfate d'ammonium

Liste des figures

Fig1 : catalysations des substrats par les enzymes.....	3
Fig2 : Représentation schématique d'une enzyme	4
Fig3 : Nomenclature des enzymes	4
Fig4 : mécanismes de dégradation de la chaîne homogalacturonate.....	6
Fig 5: Action des pectines-méthylestérases.....	7
Fig6 : Action des pectines-acétyl estérases.....	8
Fig 7 : les différentes voies de dégradation enzymatique des pectine.	8
Fig8 : Grandes étapes de fabrication des préparations commerciales.....	9
Fig 9 : <i>Aspergillus niger</i> sous un microscope.....	11
Fig 10: La récupération des résidus de citron.....	13
Fig11: schéma d'obtention de la matière première.....	14
Fig12 : le son de blé.....	14
Fig13 : des souches d' <i>Aspergillus niger</i> conservées.....	16
Fig14 : la revivification de souche d' <i>aspergillus niger</i>	16
Fig15 : inoculum obtenu à partir des boîtes pétri.....	17
Fig16 : préparation des milieux de fermentation.....	18
Fig17 : dialyse.....	22
Fig18 : Les boudins de dialyse	22
Fig19 : appareil de chromatographe	23
Fig20 : dénaturation des protéines	26
Fig 21: la séparation des protéines par l'électrophorèse.....	28
Fig 22 : la méthode de séparation des protéines par l'électrophorèse.....	31
Fig23 : Poudre des résidus de citron après séchage, broyage et tamisage.....	31
Fig24 : Son de blé.....	33
Fig 25 : Cinétique de croissance de <i>A.niger</i> sur milieu PDA.....	33
Fig 26: Préparation de l'inoculum.....	33

Fig27 : cellule de mallassez.....	34
Fig 28 : les milieux de culture après 10 j de la fermentation.....	34
Fig 29 :Les extrait brut obtenu.	34
Fig 30 : élution de l'extrait enzymatique pré – purifier des écorces de citron .(2ml par fraction de tube; débit 0.5ml/min).....	38
Fig 31 : Elution de l'extrait enzymatique pré – purifier de son de blé (débit: 0,5ml/min; 2ml par fraction de tube).....	39
Fig 32 : profil d'élution de la BSA.(2ml par fraction de tube, débit: 0,5/ml).....	42
Fig 33 : Profil d'élution des protéines standards (ovalbumine, trypsine), 2ml par fraction de tube; débit imposé: 0,5/ml).....	42
Fig 34: courbe d'étalonnage des protéines standards: (BSA, ovalbumine, trypsine).....	43
Fig 35 : Electrophorèse des extraits enzymatiques des écorces de citron: EC(enzyme commerciale), EnPG(endoPG), ExPG (exoPG), EBC(extrait brut concentré), ST (protéines standards).....	44
Fig 36: courbe d'étalonnage des protéines standards de l'electrophorese.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des enzymes.

Tableau 2 : Les principales origines des enzymes.

Tableau 3 : Classification des principales pectinases .

Tableau 4: la masse de sulfate d'ammonium ajouté pour à 90% de saturation.

Tableau 5 : Resultants des caractéristiques physico-chimiques du milieu de base de production.

Tableau 6 : Caractéristiques de l'extraits enzymatique brut.

Tableau7 : Caractéristiques des extraits pré purifiés.

Tableau 8 : Caractérisation des fractions obtenues par la purification de l'extrait écorces de citron.

Tableau 8 : Caractérisation des fractions obtenues par la purification de l'extrait de son de blé.

Tableau 10 : Tableau de purification de l'extrait enzymatique des écorces de citron.

Tableau 11 : Tableau de purification de l'extrait enzymatique du son de blé.

Tableau 12: Logarithme des poids moléculaires des protéines standards

Tableau 13 : poids moléculaire des enzymes purifiées par gel de filtration.

Tableau 14 :les valeurs de rapport frontal des protéines standard et logarithme de leur poids moléculaire .

Tableau 15 : Electrophorèse des extraits des écorces de citron.

Sommaire

Introduction générale.....	1
LA PARTIE THEORIQUE	
I.1. Généralités sur les enzymes	3
I.2. Structure des enzymes	3
I.3. Classification des enzymes	4
I.4. Applications des enzymes	5
I.5. Une enzyme alimentaire	5
I.6. Les enzymes pectolytiques	6
I.6.1. Classification des enzymes pectolytique	6
I.6.1.1 Les enzymes desesterifiantes	7
I.6.1.2 Les enzymes dépolymérisation	7
I.6.2 La production des enzymes industrielles	9
I.6.2.1. la fermentation	9
I.6.2.2. la séparation	9
I.6.2.3. la concentration et la purification la formulation	9
I.7. Utilisation de l'Aspergillus Niger dans la production des enzymes pectinolytiques...10	
I.7.1 Généralités	10
I.7.2 Le milieu	11
LA PARTIE PRATIQUE	
II. matériel végétal	13
II.1. Les écorces de citron	13
II.1.1 Préparation du matériel végétal	13
II.2. Le son de blé	14
II.3.1 Détermination de l'humidité du matériel végétal :(AFNOR ,1986)	14
II.3.2 Détermination des cendres.....	15
II.3.3 Détermination des protéines. (AFNOR, 1986)	15
III. Matériel microbiologique	15
III.1. revivification de souche d'Aspergillus niger	16
III.1.2 Préparation de l'inoculum	16
III.1.3. Dénombrement des spores dans l'inoculum	17
III.2. Préparation du milieu de fermentation (milieu de production d'enzymes)	17

III.2.1. Inoculation des milieux de culture	18
III.2.2. Fermentation.....	18
III.2.3. Extraction de l'enzyme	18
IV. Analyses physicochimiques des extraits enzymatiques brut.....	19
IV.1. Détermination du pH.....	19
IV.2. Détermination des protéines solubles (Lowry, 1951)	19
IV.3. Dosage de l'activité endopolygalacturonasique.....	19
IV.4. Dosage de l'activité de l'exopolygalacturonase	19
V. Purification de l'extrait enzymatique brut:	
V.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique	20
V.2. Dialyse et concentration de l'extrait	21
VI. séparation chromatographique (la purification par perméation sur gel)	22
VI.1. Principe de la gel de filtration	23
VI.2. Déroulement de la chromatographie sur gel de filtration Préparation du gel et Préparation du gel et remplissage de la colonne	24
VI.3. Analyse des fractions récupérées	25
VI.3.1 Détermination des poids moléculaire des enzymes	25
VII. Préparation des échantillon pour l'électrophorèse	
VII.1. concentration des échantillons	27
VII.2 Dénaturation des échantillons	27
VII.4. fixation des protéines et Coloration	29
VII.5. Décoloration des gels.....	29

RESULTATS ET DISCUSSION

VIII. matériel végétal :	31
VIII.1. Préparation de la matière biologique	31
VIII.2. Caractéristiques Physico Chimiques des milieux de base	32
VIII.3. Préparation et caractérisation du matériel microbiologique :	33
VIII.4. Préparation de l'inoculum :	33
XIV. Caractéristique de l'extrait enzymatique brut :	34
XIV.1. Caractérisation de l'extrait pré purifié :	37
XIV.2. La purification des extraits par la chromatographie sur colonne :	38
XIV.2.1. Tableaux de Purification	40
XIV.2.2. Détermination des poids moléculaire des enzymes pectinolytiques :	41

XIV.3. Electrophorèse SDS page des extraits enzymatiques :	43
Conclusion générale	47
Les annexes	
Références	



Introduction



Introduction :

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

Certaines enzymes sont utilisées pour les réactions de synthèse et la fabrication de certains composés chimiques. Tandis que d'autres enzymes sont utilisées dans les réactions de dégradation par rupture des liaisons chimiques, ce qui permet par conséquent la décomposition de certains composés biochimiques. Les enzymes accélèrent de millions de fois ces réactions d'où leurs noms de catalyseurs. **(Simon et Barry, 2005)**

Parmi les enzymes actuellement connues, une vingtaine est disponible à l'échelle technique pour des applications industrielles. Dans l'industrie alimentaire se sont les branches sucrières et laitières qui sont les plus grands consommateurs d'enzymes. Les enzymes principalement utilisées sont les enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères naturels tels que les amidons, les pectines, les celluloses et les protéines **(Werner et al. 2010)** parmi lesquelles se dégagent les enzymes pectinolytiques ou pectinases qui sont un groupe d'enzymes constitué d'estérases, de polygalacturonases et lyases qui agissent sur les substrats pectiques. Les pectinases comptent 25 % de vente d'enzymes alimentaires dans le monde; outre que l'industrie alimentaire, ces enzymes sont appliquées dans divers industries comme l'industries du textile et du papier, dans la fermentation du café et du thé, dans l'extraction des huiles et le traitement des eaux usées. **(Mehrnouche et al., 2014)**

Les pectinases produites par des moisissures (principalement *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*) permettent d'hydrolyser la pectine des fruits et d'éviter ainsi la formation de gel lorsque celui-ci est contre-indiqué (jus de fruits concentrés, par exemple). Ces enzymes permettent la clarification des jus de fruits, du vin, du vinaigre et des sirops. L'addition de pectinases dans des fruits écrasés aide à l'extraction du jus.

La production microbienne de pectinases est inductible par la composition du milieu de fermentation et notamment par la concentration en pectine (Hadj **Taeb et al., 2002**). Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes 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

Introduction générale

d'orange. Les pectines représentent environ 0,5 à 4 % du poids frais du matériel végétal (**Kashyap et al., 2001**), avec une masse moléculaire variant de 10 à 400 KDa suivant leur origine (**Sakai et al., 1993**). Plusieurs déchets industriels comme le son de blé, sucre de canne, pulpe de café, écorces d'agrumes, marc de pomme, graines de tournesol ont été utilisés pour la production des pectinases par les microorganismes (**said et al., 1991**). Les écorces d'agrumes qui sont les principaux résidus de l'industrie des agrumes, constituent 50% du poids frais du fruit, de par leur richesse en pectine et carbohydrates, elles peuvent constituer un outil de fabrication d'enzymes pectolytiques (**sadhana et al ,2006**).

Sur la base de ces données et les travaux précédents, notamment de mes anciens camarades, nous essayerons dans ce travail de :

- Produire les pectinases par des moisissures par fermentation sur milieu solide en utilisant les résidus de citron et le son de blé comme substrat de base.
- de poursuivre la purification des enzymes obtenues.



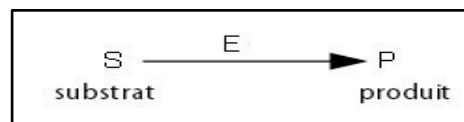
La partie théorique



I.1. Généralités sur les enzymes :

Les enzymes sont des macromolécules majoritairement de nature Protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série **L** unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 100 kDa (**Bergmeyer et al., 1979 ; Pelmont, 1995 ; Drouin,2005**).

Une enzyme est un catalyseur biologique, qui accélère des réactions biochimiques dans les conditions de températures et de milieux biologiques. En présence de son substrat, en concentration suffisante et dans des conditions physicochimiques adéquates de pH et de température (T°), l'enzyme (E) convertit ce substrat (S) , pour former un (des) produit(s) (p).



I.2. Structure des enzymes :

La spécificité des enzymes est généralement comparée à celle d'une clef qui n'ouvre qu'une seule porte. Chaque enzyme est spécifique d'un type de réaction (hydrolyse, décarboxylation, oxydation) ainsi que d'un substrat particulier (stéréochimie, conformation spatiale,..). Ainsi, l'enzyme est liée au substrat dans une combinaison appelée "complexe enzyme-substrat" (figure n°2) : elle est alors capable de catalyser la réaction, par exemple de couper en deux produits le substrat, avant de s'en séparer. (**M. Michel Moutounet.,2014**)

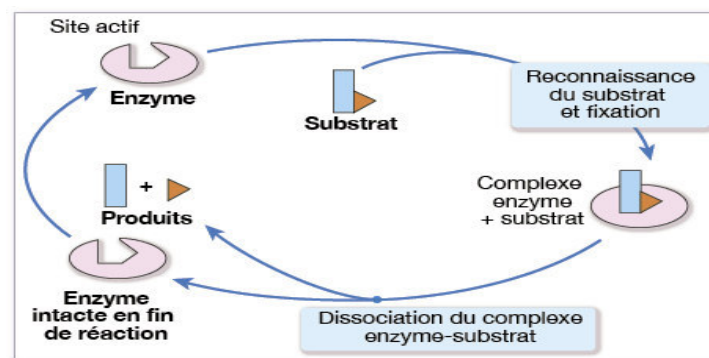


Fig 1 : Représentation schématique d'une enzyme .

I.3. Classification des enzymes :

selon la commission des ENZYMES DE L'I.U.B. (International Union of Biochemistry). Les enzymes se répartissent en six classes (tableau 1) environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (RAO et al ., 1998 ; ASSAMOI et al ., 2009).

Tableau 1 : Classification des enzymes.

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1. X. X. X	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2. X. X. X	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3. X. X. X	Hydrolases	hydrolyses
E.C.4. X. X. X	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5. X. X. X	Isomérases	isomrisation
E.C.6. X. X. X	ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

La Commission des enzymes (Enzyme Commission) a établi une classification qui attribue à chaque enzyme un nombre à quatre chiffres (E.C. X.X.X.X, Fig.3) en fonction :

- de la réaction chimique ;
- de la classe de réaction ;
- de la sous-classe ;
- des caractéristiques de l'enzyme.

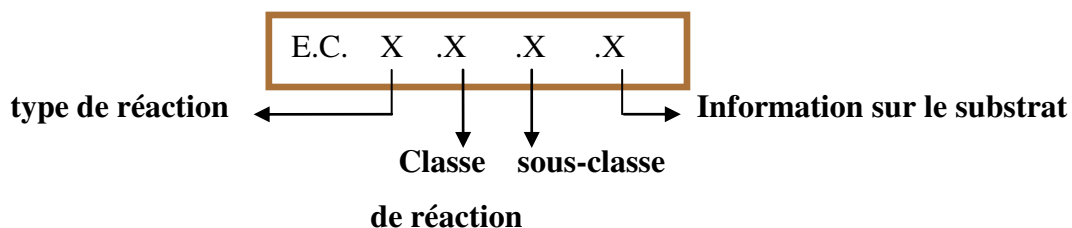


Fig. 2: Nomenclature des enzymes .

I.4. Applications des enzymes

Les préparations enzymatiques commerciales sont utilisées dans divers secteurs industriels :

- agroalimentaire : alimentation animale, production de boisson (jus de fruits, vins, brassage de bière), industrie laitière et fromagère, alimentation céréalière, panification, produits carnés, fabrication d'aliments à base de produits de la mer,
- industrie de fabrication du papier,
- industrie du textile, délavage des jeans,
- détergents ménagers et industriels...

I.5. Une enzyme alimentaire

Les enzymes alimentaires sont obtenues par extraction à partir de plantes ou d'animaux ou par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes (tableau n°2) ; elles sont ajoutées aux aliments pour exercer une fonction technologique dans la fabrication, la transformation, la préparation, le traitement, le conditionnement, le transport ou l'entreposage (stockage) de denrées alimentaires, y compris celles utilisées en tant que auxiliaires technologiques.

Tableau n° 2 : Les principales origines des enzymes.

L'origine	L'enzyme	Le nom d'espèce
Végétale	protéases pectinases, cellulases..	papaya, tomates, paille...
animale	Pepsine	l'estomac de presque tous les vertébrés
microbienne	Invertase,	Saccharomyces cerevisiae (levure)

I.6. Les enzymes pectolytiques :

Les enzymes pectinolytiques 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. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Figure 4) 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. *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (Jayani et al., 2005).

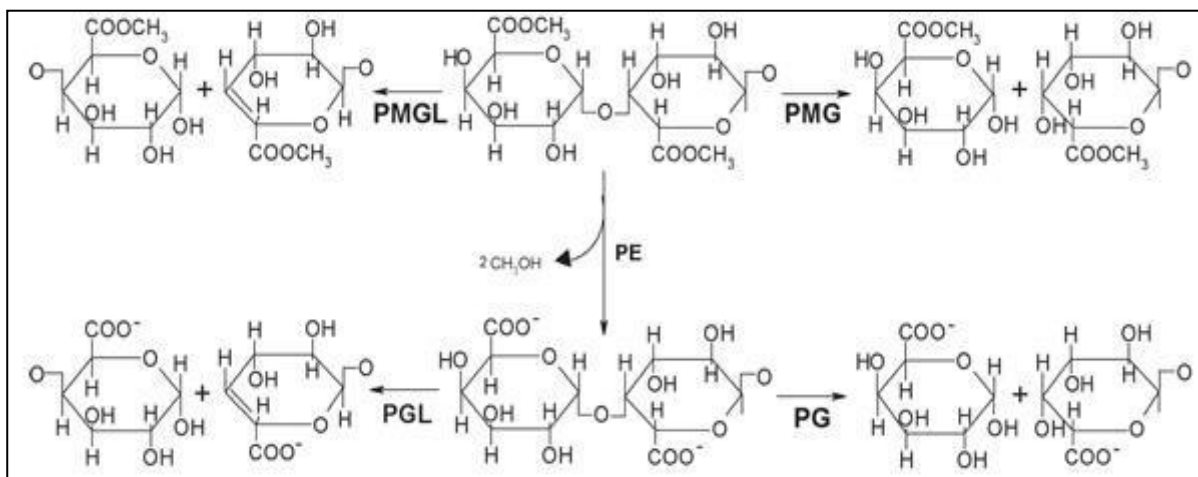


Fig 2: mécanismes de dégradation de la chaîne homogalacturonate.

Avec :

PMGL : polyméthylgalacturonate iyase , **PMG** : polyméthylgalacturonase, **PE** : pectinestérase, **PGL** : polugalacturonate iyase ,**PG** : polygalacturonases .

I.6.1. Classification des enzymes pectolytique :

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres et al., 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérases (polygalacturonases et lyases).(Tableau n°3)

Tableau 3 : Classification des principales pectinases .

Nom	N°	Type	Substrat	Produits	Autres
Pectine méthylestérase	EC 3.1.1.11	Hydrolase	Haut DM	Méthanol + GalA	Fongique (pH 4.5) ou plantes (pH 7)
Polygalacturonase					
endo	EC 3.2.1.15	Hydrolase	Pectate	Chaînes plus courtes, oligos	Viscosité; pH 4-5
exo	EC 3.2.1.67	Hydrolase	Pectate	Mono OU dimère	Extrémité non-réductrice
Pectine-lyase	EC 4.2.2.10	Lyase; endo	Haut DM	Chaînes plus courtes	pH opt: 6
Pectate-lyase					pH opt: 8-9
endo	EC 4.2.2.2	Lyase	DM bas		
exo	EC 4.2.2.9	Lyase		Dimères	

I.6.1.1 Les enzymes desesterifiantes :

• **Les pectines-méthylestérases ou pectinestérases** (PME ou PE, E.C. 3.1.1.11). Elles catalysent l'élimination des groupements méthoxyles fixés sur la pectine pour former de l'acide pectique et du méthanol par hydrolyse des liaisons esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique (Fig. 5). Ce mode d'action conduit à une distribution en bloc des groupements carboxyliques libérés et à une grande sensibilité des acides pectiques produits au Ca^{2+} (Khan et al., 1990)[5].

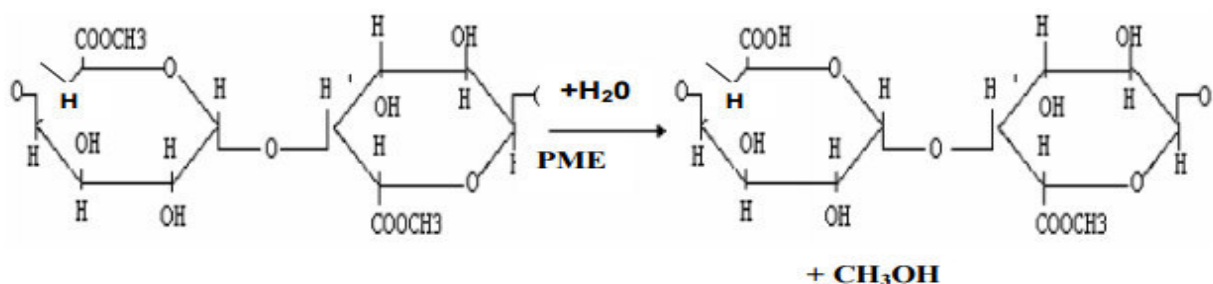


Fig 4: Action des pectines-méthylestérases

• **Les pectines-acétyllestérases** (PAE, E.C. 3.1.1.6) : Elles éliminent les acides estérifiés en C-2 ou C-3 des résidus AG [6].

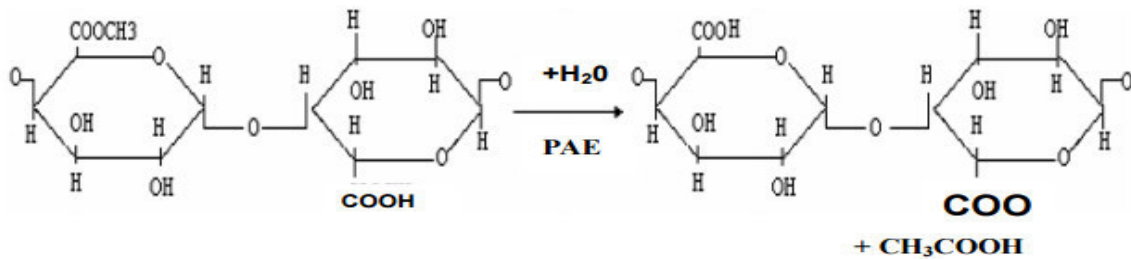


Fig 5 : Action des pectines-acétylases.

I.6.1.2 Les enzymes dépolymérisation:

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

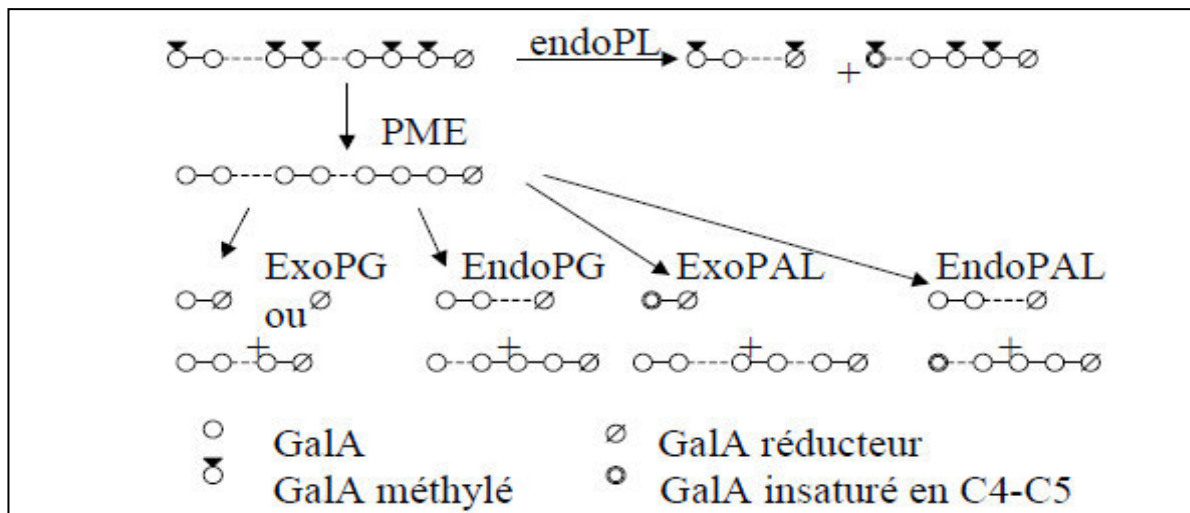


Fig 6 : les différentes voies de dégradation enzymatique des pectine (Tabuc, 2007).

Avec :

PME: pectineméthylestérase, **PE :** pectinestérases , **PAL :** pectate lyase, **PL :** pectine lyase
PG : polygalacturonase , GAL A : acide galacturonique .

I.6.2 La production des enzymes industrielles :

Si les enzymes sont présentes dans tous les organismes vivants, ce sont des bactéries et des champignons microscopiques qui sont les sources exploitables d'enzymes pour les industriels. Ces microorganismes sont prélevés dans des milieux naturels. Chaque producteur d'enzymes détient ses souches. Les enzymes pectolytiques sont issues principalement de microorganismes appartenant aux espèces *Aspergillus*.

Aspergillus niger, l'unique microorganisme utilisé pour la production d'enzymes pectolytiques, est capable de sécréter une vaste gamme d'activités avec différentes fonctions oenologiques du fait de la sélection de la source d'*A. niger* et du mode de production en milieu solide ou liquide. (M. Michel Moutounet., 2014), Les grandes étapes de fabrication sont représentées dans la figure n°



Fig7 : Grandes étapes de fabrication des préparations commerciales

♣ la fermentation :

Les enzymes sont produites par le microorganisme lorsqu'il est mis en conditions de fermentation. Les microorganismes sont mis en culture, dans un substrat liquide (fermentation immergée) ou sur un substrat solide (fermentation en milieu solide ou en surface). Les conditions de température, d'hygrométrie, de pH et de nutrition (facteurs de croissance) sont primordiales pour conduire la fermentation vers la formation des enzymes désirées.

♣ la séparation :

Les enzymes produites sont séparées du microorganisme de production, en général par floculation et filtration. Le liquide obtenu contenant les enzymes est ensuite soumis à des étapes de filtration.

♣ la concentration et la purification

Le liquide clarifié contenant les enzymes doit être concentré pour proposer un produit suffisamment actif. Cette concentration se fait à l'aide de technologies membranaires et/ou par évaporation. A ce stade, si nécessaire, le producteur procède à une étape de purification.

♣ la formulation

A l'issue de la phase de concentration, le producteur peut formuler, c'est-à-dire mettre le concentré enzymatique sous une forme stockable, commercialisable et adaptée à son utilisation industrielle. Lors de cette étape, le producteur peut aussi procéder au mélange d'enzymes de différentes fermentations. Les enzymes sont proposées soit sous forme de granulés soit sous forme liquide.[5]

I.7. Utilisation de *Aspergillus Niger* dans la production des enzymes pectinolytiques :

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles des espèces d'*Aspergillus* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward et al.,2006). Les acides organiques et les enzymes constituent les métabolites d'*Aspergillus* les plus importants.

I.7.1 Généralités

Les *Aspergilli* ont été décrits pour la première fois par Micheli en 1729. Le nom est dû à leur structure portant les spores ressemblant à l'*aspergillum*. Ce sont des champignons filamenteux, ou moisissures, ubiquitaires (Bennett 2009). Ils regroupent 180 espèces officiellement reconnues. Parmi les *Aspergilli*, *Aspergillus nidulans*, *niger*, *oryzae* et *fumigatus* sont les plus étudiés.

Aspergillus niger, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes. Aucune forme sexuée (téléomorphe) n'est connue.

Aspergillus niger est une espèce importante sur le plan économique car elle est utilisée en fermentation industrielle pour produire de l'acide citrique et gluconique ou des enzymes. En Chine, *A. niger* intervient dans la fermentation de produits alimentaires comme le vin de céréale ou le thé pu'er.

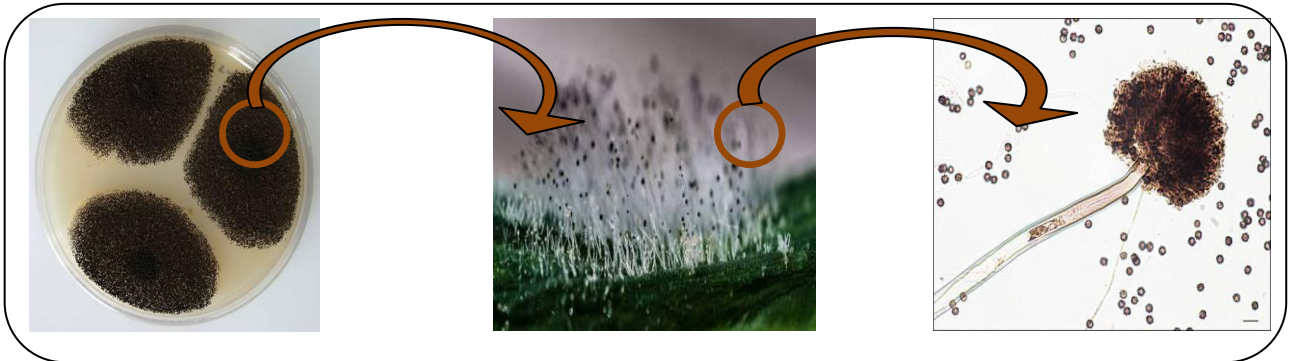


Fig 8 : *Aspergillums niger* sous un microscope

I.7.2 Le milieu :

Aspergillus niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau. Elle peut germer dans un milieu ayant une activité de l'eau de $a_w=0,77$ à la température de 35 °C . C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. Elle peut aussi vivre dans un environnement très humide (humidité relative de 90 à 100 %). (John et al ; 2009)

A. niger est une espèce mésophile dont les températures optimales de croissance¹ sont entre 11 et 42 °C . La température maximale est de 48 °C mais elle peut survivre à 60 °C . Les micro-ondes n'ont aucun effet sur les conidies (wikipédia .2016).



Matériel et méthodes



II. matériel végétal :

II.1. Les écorces de citron :

Les résidus de citron qui regroupent les écorces, les pépins ont été récupérés après extraction de leur jus dans un extracteur manuel. et stockés dans le congélateur.

Dans notre étude nous avons opté à travailler avec des écorces de citron séchées et tamisées au lieu des écorces fraîches, le séchage permet l'augmentation de la concentration en matières sèches et d'un autre coté il, diminue l'activité de l'eau ce qui prolonge la durée de conservation des résidus.



Fig 10: La récupération des résidus de citron

II.1.1 Préparation du matériel végétal :

Après décongélation, Les échantillons des écorces de citron ont été lavés trois fois avec l'eau distillée à 50° C afin d'éliminer les résidus solubles qui peuvent influencer la croissance microbienne et la qualité de l'extrait enzymatiques brut. Les résidus obtenus sont broyés à l'aide d'un broyeur (*Russell Hobbs*), puis séchées dans une étuve à circulation d'air à 50 °C pendant 2 jours (2880 minutes). (Bernardin et al, 2005).

- **Broyage du résidu sec :**

Un second broyage est réalisé après le séchage, la poudre obtenue est tamisée à l'aide d'un tamis pour obtenir des particules ayant un diamètre $\leq 0,4\text{nm}$ (400 μ). la farine obtenue est conservée dans un bécher couvert en plastique à sec. (figure n°11)

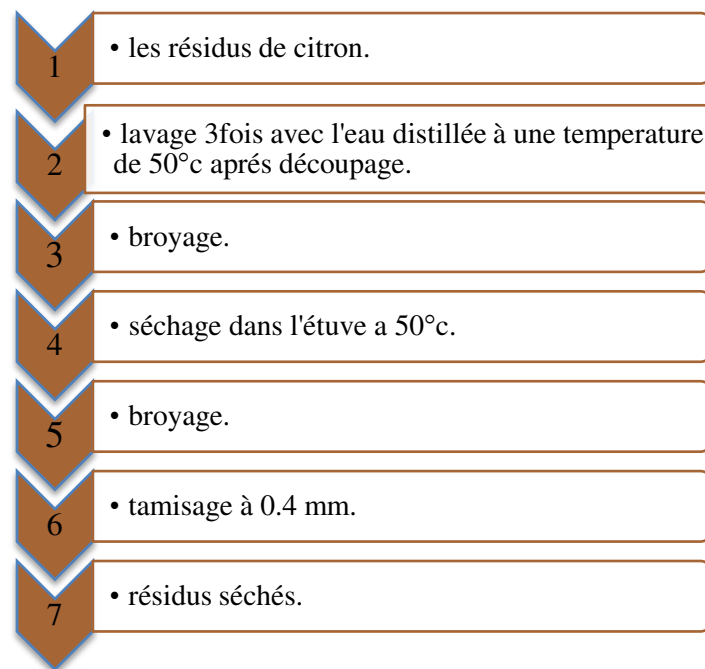


Fig11 : schéma d'obtention de la matière première
(Résidus séchés).

II.2. Le son de blé :

Le son de blé est essentiellement obtenu en tant que coproduit lors des procédés de fabrication de farine de blé, c'est pourquoi il est aussi appelé issues de meunerie. Il s'agit d'une fraction fine faite principalement de fragments d'enveloppes et de particules de grains dont la plus grande partie de l'albumen a été enlevée ; cette presque exclusive teneur en enveloppe impliquant une très forte concentration en fibres ,Le son de blé est relativement riche en protéines (14 à 19 %) avec un profil d'acides aminés mal équilibré. (Ngom, 2004).



Fig12 : le son de blé.

II.3.1 Détermination de l'humidité du matériel végétal :(AFNOR ,1986)

L'humidité est déterminée sur un échantillon de 5g par dessiccation à l'étuve à une température de 105°C pour les résidus de citron et 130° C pour le son de blé, jusqu'à l'obtention

d'un poids constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité, tout les essais ont été répétés trois fois.

L'humidité a été calculée d'après la formule suivante :

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

Avec : Ms : teneur en matière sèche %.

M2 : masse de capsule + la pris d'essai après séchage en g.

M1 : masse de capsule + la pris d'essai avant séchage en g.

M : masse de capsule vide.

$$\text{Humidité \%} = 100 - M_s$$

II.3.2 Détermination des cendres

Les cendres sont obtenues après incinération de 5 g du matériel végétal dans un four à moufle de type (*Wise therm*) à une température de 550°C. Pendant 6 heures.

Le résidu obtenu représente les cendres qui, par différence, donne la matière organique contenue dans l'échantillon. (AFNOR, 1980).

II.3.3 Détermination des protéines. (AFNOR, 1986)

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

III. Matériel microbiologique :

Pour cette étude, une souche de moisissure *Aspergillus niger* conservée dans des tubes inclinée sur une gélose sabouraud.



Fig13 : des souches *d'Aspergillus niger* conservé

III.1. revivification de souche *d'Aspergillus niger* :

Elle est réalisée par prélèvement de quelques spores ou un fragment mycélien à partir des tubes de conservation inclinés, que l'on transfère sur milieu gélosé à l'extrait de pomme de terre (PDA), préalablement préparé au laboratoire et coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. La culture fongique est incubée à 30°C pendant 5 jours (**Annexe A**).

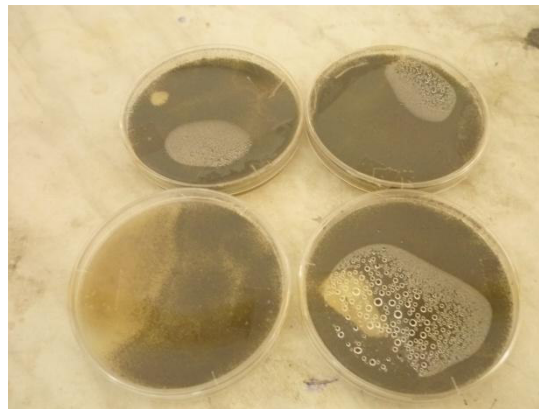


Fig14 : la revivification de souche d'aspergillus niger

III.1.2 Préparation de l'inoculum :

La récupération des spores s'effectue à partir des cultures *d'A. niger* sur milieu PDA après 5 jours de croissance, par l'addition d'une solution stérile de Tween 80 à 0,1% (10 ml/ boîte de Pétri). À l'aide d'une pipette pasteur stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose

afin de mettre en suspension les spores fongiques, qui sont filtrées par passage sur une gaze stérile entreposé sur un entonnoir. (AnnexeB)



Fig15 : inoculum obtenu a partir des boites pétri

III.1.3. Dénombrement des spores dans l'inoculum:

la concentration en microorganismes est réalisée par comptage des spores sur une cellule de Malassez , observées sous un microscope électronique.

III.2. Préparation du milieu de fermentation (milieu de production d'enzymes)

Le milieu de culture est préparé selon **Acuna-Arguelles et al.**, 1995 ; **Maldonado et al.**, 1998, qui ont utilisé les résidus d'oranges comme milieu de base pour la production des pectinases. La particularité de cette étude est l'utilisation des écorces de citron et le son de blé au lieu des écorces d'oranges, afin de déterminer l'influence de la source carbonée (utilisée comme milieu de base) sur la production d'enzymes pectolytiques.

à cet effet 10g du milieu de base sont introduites dans 3 erlenmeyers de 250 ml: dans le premier erlen meyer ont introduit 10 g de résidus de citron, le deuxième 5g résidus de citron et 5g de son de blé et dans le troisième erlen 10 g de son de blé. pour chaque erlen meyer est ajouté 0.5g de glucose, 0.3% de l'urée à, 0.65% de KH_2PO_4 , 1.26 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.014% de (Fe SO_4) , Mg SO_4 à 0.01% et 10 ml de l'eau distillée . Le milieu est stérilisé a 121°C pendant 20min dans un autoclave de type (Stream stériliser) et refroidi (Annexe c).



Fig16 : préparation des milieux de fermentation

III.2.1. Inoculation des milieux de culture :

Après refroidissement des milieux de cultures, les erlenmeyer sontensemés aseptiquement par 1 ml de suspension de spores (inoculum), ils sont agités et incubés dans une étuve à 30°C.

III.2.2. Fermentation

Les fermentations se sont déroulées sur milieu solide dans des erlenmeyers fermés par le coton cardé et placés dans l'étuve à 30 à 30° C pendant 5 jours.

III.2.3. Extraction de l'enzyme :

L'extraction consiste à la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, après la période d'incubation 50 ml d'eau distillée stérilisée et refroidie sont ajoutées dans chaque erlenmeyer, ces derniers sont agités énergiquement dans un agitateur pendant 30min, les contenus sont filtrés a travers une gaze stérile et centrifugés a 10000 tr/20min à 4c° dans une centrifugeuse. Le filtrat obtenu est l'extrait enzymatique brut (EB).

IV. Analyses physicochimiques des extraits enzymatiques bruts.

IV.1. Détermination du pH:

Le pH à été déterminé à l'aide d'un pH mètre (**Hanna 211**) par introduction l'électrode combinée en verre dans l'extrait enzymatique brut.

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

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions, la première est la réaction de Biuret où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la

protéine (complexe pourpre entre le biuret " $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ " et deux liaisons peptidiques consécutives en présence de cuivre en milieu alcalin), la deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu ce dernier à base de phosphomolybdate et de phosphotungstène, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes présents dans les protéines et se réduit en complexe bleu qui s'ajoute à celle de biuret. Cela engendre une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène et c'est la fixation de cuivre par chélation qui faciliterait le transfert d'électrons vers ce réactif. L'intensité de la couleur est déterminée par lecture colorimétrique à 660nm dans un spectrophotomètre

Le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de Bovin Sérum Albumine (BSA) à $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (annexe H).

IV.3. Dosage de l'activité endopolygalacturonasique :

Le principe est basé sur la réduction de fluidité d'une solution de pectine à 1% dans une solution tampon acétate de sodium pH 4,5. (Ghildyal et col, 1981)

Le mélange réactionnel constitué de 10 ml de pectine (1%) et 0,5 ml d'extrait enzymatique est incubé à 35 °C pendant 1h, la réaction est stoppée par l'ébullition du mélange à 90 °C puis refroidie à 20 °C. La fluidité est déterminée à l'aide d'un viscosimètre à écoulement de type (Fungilab). la viscosité spécifique du mélange est alors exprimée par la formule ci dessous:

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

t_0 : temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans la solution témoin;

t_ϵ : temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans l'échantillon

t_{ea} : temps d'écoulement (en secondes) de la bille dans l'eau distillée.

Un témoin a été testé dans les mêmes conditions.

IV.4. Dosage de l'activité de l'exopolygalacturonase

Le principe est basé sur la détermination des unités des sucres réducteurs libérés par hydrolyse de la liaison entre deux acides galacturoniques de la chaîne pectiques. Les groupements réducteurs apparus sont déterminés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNSA) décrite par Miller, 1954 (annexe n°); après incubation du mélange réactionnel constitué de pectine à 1% préparée dans une solution tampon acétate pH 5,5 et 0,5 ml d'extrait enzymatique à 45 °C pendant 1heure, la réaction est stoppée par ajout de 1 ml de réactif de DNS. Une unité

enzymatique est exprimée par la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole d'acide galacturonique par unité de volume et par unité de temps, elle est exprimée en $\mu\text{ mol/ min /ml}$ d'extrait et calculée par la formule ci-dessous:

$$\text{Activité exoPG (} \mu\text{ mol/ min /ml)} = (A \times 1000) / (212.12 \times 60 \times 0.5)$$

Où:

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

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

0.5: Volume de l'extrait (ml);

60: temps d'incubation (min).

V. Purification de l'extrait enzymatique brut:

V.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique :

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines contaminantes dans une solution contenant un mélange complexe de protéines. Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Cette quantité est celle nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de SA suffisante pour saturer cette solution à la température et au pH où on travaille. C'est pourquoi il s'agit bien du % de saturation (non pas du % de concentration en tant que tel). À cette concentration les protéines contaminantes, en fait une partie d'entre elles précipiteront sans entraîner la protéine désirée. Pour déterminer la quantité de SA à ajouter on utilise un tableau de saturation (annexe D) ou plus rarement un nomogramme (**Kamoun** 1986, **Dixon** 1953).

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

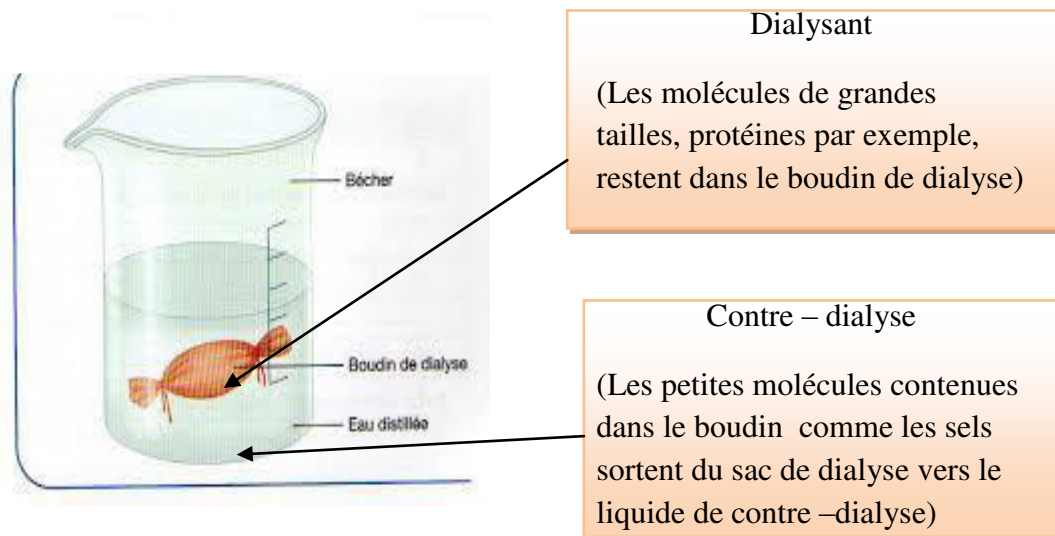
centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée, le culot est récupéré par sa dissolution dans un minimum d'eau distillée.

Tableau 4 : la masse de sulfate d'ammonium ajouté pour arrivé a 90%

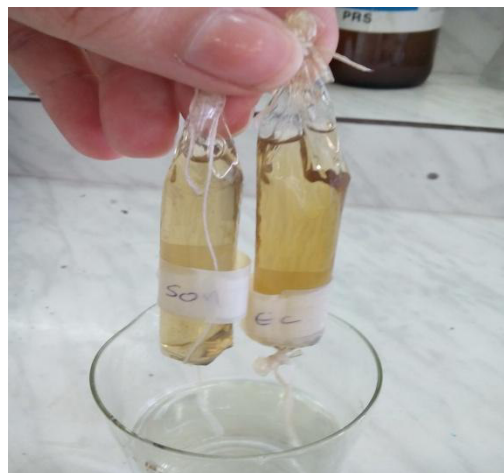
Pourcentage de saturation en sulfates d'ammonium (SA)	0 à 30%		30% à 90%			
	Solutions	Volumes (mL)	Grams de SA (g)	Volumes de surnageant (mL)	Grams de SA (g)	Volume De l'EPP (ml)
Extrait des écorces		86	15.136	84	37.716	26
Extrait de son de blé		86	15.136	85	38.165	26
Extrait des ecorces + Son		92	16.192	87	39.063	26

V.2. Dialyse et concentration de l'extrait :

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Les membranes de dialyse utilisées se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de « boudin » de dialyse. Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse (Figure 4) (Hainque et al., 2008).

**Fig17 : dialyse**

Après le dessalement par dialyse ; les fractions protéiques se retrouvent diluées dans un excès d'eau migrant dans les boudins, elles sont alors concentrées en recouvrant les boudins avec une solution de saccharose à 60% (matoub,2000). Après 10h. on récupère le concentré, ce dernier représente l'extrait enzymatique prépurifié (EEPP) qui est l'objet de purification chromatographique après dosage des protéines solubles et mise en évidence des activités enzymatiques.

**Fig18 :Les boudin de dialyse**

VI. séparation chromatographique (la purification par perméation sur gel) :

La purification permet d'avoir un maximum du rendement en enzyme avec un maximum de pureté possible et un maximum de son activité catalytique. (Hainique et al.,2008 ;cezard,2009)

VI.1. Principe de la gel de filtration

Les plus petites molécules peuvent pénétrer dans de nombreux pores, se répartissant entre le gel et la phase mobile, ce qui rend leur trajet plus lent à parcourir et les fait éluer en dernier. Les molécules de taille moyenne peuvent pénétrer seulement dans quelques pores, la répartition entre le gel et la phase mobile est plus rapide que pour les petites molécules, le trajet parcouru est moins long et elles sont éluées plus rapidement. Finalement, les grosses molécules ne peuvent pénétrer dans les pores du gel (elles sont exclues), il n'y a donc pas de répartition entre la phase mobile et le gel, leur trajet est donc réduit au minimum et elles sont éluées en premier.

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. (Durang et Monsan ,1974).

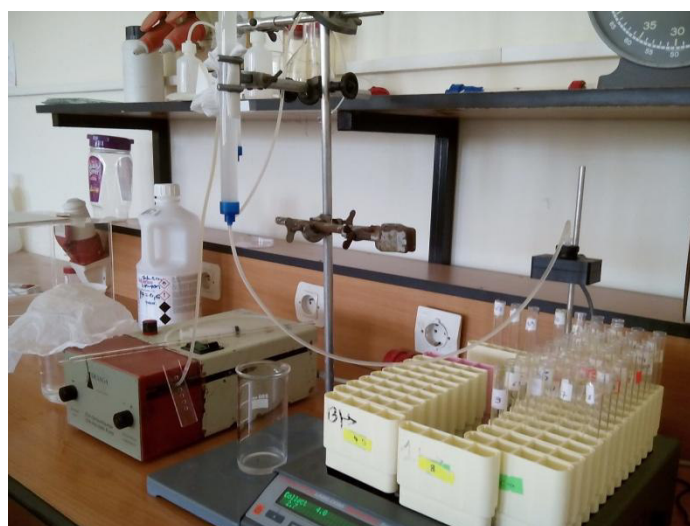


Fig19 : appareil de chromatographe .

➤ Matériel utilisé :

- Pompe (Desaga heidelberg)
- Collecteur de fraction (*sspectrum labs .com*) Spectra/Chrom® CF-2 Fraction Collector.
- Colonne en verre (QTY 10) de diamètre (d) égal à 1,5 cm et de hauteur (H) égal à 30 cm
- Spectrophotomètre (JASCO-V-530 UV-VIS SP)

➤ Réactifs utilisés

- Tampon acétate de sodium pH 4.2, 0.1N

- Gel séphadex G75: Le type de gel est choisi en fonction du domaine fractionnement dans lequel se trouvent les molécules à séparer.
- Protéines standard (BSA (67 Kda), Ovalbumine (43 Kda) et Trypsine inhibiteur (20 Kda)

VI.2. Déroulement de la chromatographie sur gel de filtration Préparation du gel et 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, le séphadex G 75 permet la séparation des protéines ayant un poids moléculaire compris entre 3000 kDa - 70 000kDa

La préparation des gels est une opération capitale : Une prise d'essai adéquate de gel est mise en suspension dans l'eau distillée et lavée 3 fois avant l'opération de gonflement qui doit être effectué dans un excès de solvant à température de laboratoire pendant 24 heures . l'indice de rétention ou volume d'eau en ml absorbée en g de gel sec est donné par la numérotation du gel (7,5 ml/g pour le séphadex G 75). Le chauffage à la température ambiante est préférable car ils évitent la formation des bulles d'air dans le gel quand ce dernier se réchauffe dans la colonne, ce qui pourrait modifier la régularité des débits sur la colonne. Un 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 seule phase.

➤ 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 du gel étant stabilisée en plaçant sur la colonne un adaptateur et un volume entre 0,5 à 1ml de l'extrait enzymatique est déposé sur la surface du gel dans la colonne à l'aide d'une pipette.

➤ Elution

L'éluion est réalisée par perfusion du tampon dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit (0.5ml /min), le débit imposé à la colonne doit toujours être inférieur au débit spontané de cette colonne. La densité optique (DO) des éluât recueillis à l'aide du collecteur de fraction à raison de 2ml par tube est lue à 280nm. On trace par conséquence la

courbe de la DO en fonction du volume d'élution. Les éluât recueillis correspondant à des pics d'absorption sont rassemblés séparément en fractions.

VI.3. Analyse des fractions récupérées

Sur chaque fraction récupérée, nous avons recherché les activités endo PG et exo PG ainsi que la teneur en protéines solubles dans les fractions qui présentent une activité pectinasiq. L'injection de l'enzyme pré purifiée est répétés plusieurs fois afin de récupérer les fractions actives qui représentent l'extrait purifié (EP).

VI.3.1 Détermination des poids moléculaire des enzymes :

- Injection de protéine standard :

Le gel de chromatographie Séperdex G75 a été calibré dans les mêmes conditions que l'EEPP avec Un volume de 1ml d'un mélange des protéines standard de poids moléculaire connu:

- Albumine bovine serum (BSA): 67 Kda

- Ovalbumine: 43 Kda

- Carbonic anhydrase: 29 Kda

- Trypsine inhibitor: 20 Kda

La densité optique de chaque fraction récupérée est lue contre le tampon à 280 nm.

➤ **Electrophorèse des fractions actives.**

L'électrophorèse 1D ou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) consiste à séparer les protéines selon leurs poids moléculaires, par migration de celles-ci sous l'effet d'un champ électrique dans un gel de polyacrylamide (**Laemmli, 1970**). La SDS-PAGE s'effectue en conditions dénaturantes, par utilisation d'un tampon Tris-Glycine contenant du SDS (tampon de migration ou tampon de Laemmli). (Figure 20)

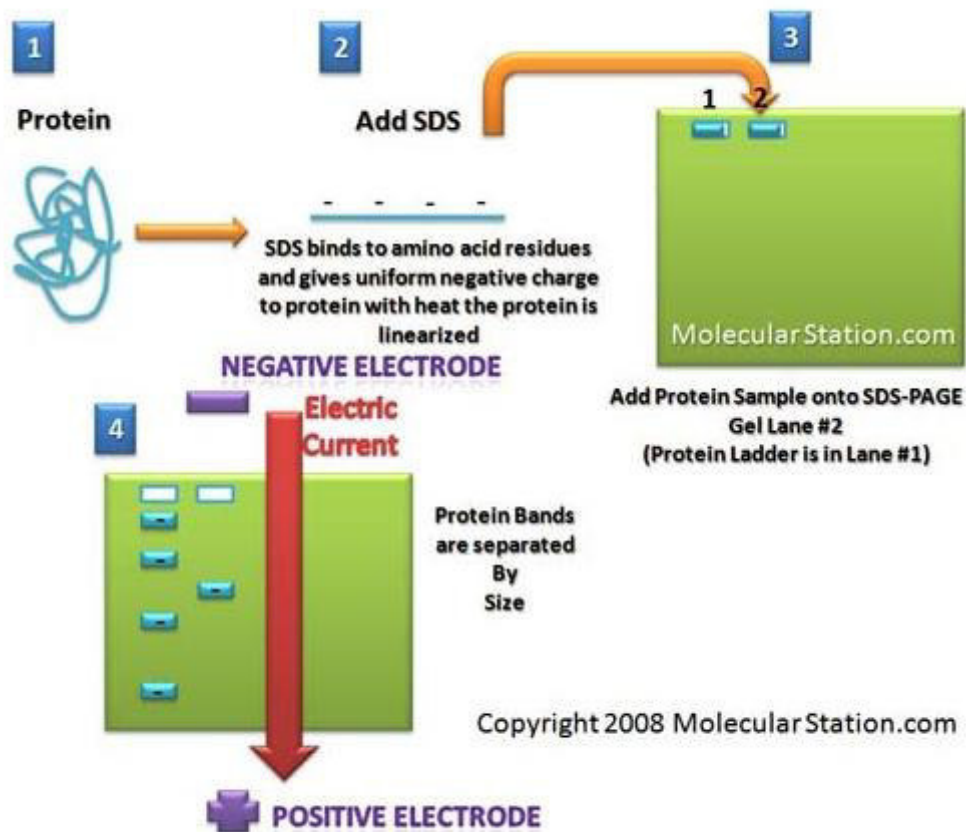


Fig 20: la dénaturation des protéine par SDS

Le SDS ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{-O-SO}_3\text{- Na}^+$) est un détergent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant leurs charges propres, et transformant donc les protéines en complexes anioniques. Ainsi, les protéines ont toutes le même rapport charge sur masse, et ne sont plus séparées en fonction de charges électriques uniformes. De plus, ces charges étant négatives, les protéines vont migrer selon leurs poids moléculaires, de la cathode (haut du gel) vers l'anode (bas du gel). Le SDS rompt aussi les liaisons hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes, déplie partiellement les protéines et les stabilise sous une forme déroulée.

La migration des protéines au cours de la SDS-PAGE s'effectue à l'intérieur d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Le polyacrylamide est un ensemble de macromolécules poreuses, résultant de la copolymérisation de 2 monomères : l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH-CONH}_2$) et le N,N'-méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH}=\text{CH}_2$) qui assure le pontage entre les chaînes d'acrylamide.

Le gel de polyacrylamide agit comme un tamis moléculaire retenant plus ou moins les

protéines en fonction de leur taille et de celle des pores. La distance de migration du polypeptide-SDS est proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Par conséquent, une protéine de bas poids moléculaire migre plus loin à travers les pores du gel qu'une protéine de poids moléculaire plus élevé. Plus ce gel est de grande taille, plus la résolution est importante en affichant des spots bien séparés.

Il est possible de modifier le taux de pontage du gel afin d'obtenir des gels de polyacrylamide de porosités différentes. Le diamètre des pores dépend de deux paramètres qui sont :

le pourcentage d'acrylamide total (acrylamide + bisacrylamide) dans le gel, noté T, et le pourcentage de bisacrylamide dans l'acrylamide total, noté C, la taille des pores diminuant lorsque T et/ou C augmentent.

Les valeurs de T et de C peuvent être calculées à partir des formules suivantes :

$$\% T = ((a + b) / v) \times 100 \quad \% C = (b / (a + b)) \times 100$$

Avec :

a (g) = masse d'acrylamide

b (g) = masse de bisacrylamide

v (mL) = volume total du mélange des différents constituant du gel

VII. Préparation des échantillon pour l'électrophorèse

VII.1. concentration des échantillons:

les fractions protéiques récupérées par permeation de gel sont concentrées par cryodessiccation dans un lyophilisateur afin d'avoir un taux de proteines superieure à 0,2 mg /ml.

VII.2 Dénaturation des échantillons

les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont les traitements thermiques, les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), et bien sur l'utilisation d'agents dénaturant

comme le SDS (sodium dodécyl sulfate). est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes. Non seulement, il dénature les protéines, mais il se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante, c'est à dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire. Or, le SDS est une molécule chargée négativement. En sa présence, toutes les protéines vont donc adopter la même forme (déroulées) avec une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire. On estime ainsi qu'il se fixe en moyenne environ deux molécules de SDS par acide aminé. Sauf cas particulier, la charge native est faible donc négligeable par rapport aux charges portées par le SDS. Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses). La séparation se fait donc uniquement en fonction de la masse moléculaire. Par voie de conséquence, l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non dénaturante. Autre avantage, l'utilisation d'un détergent permet de solubiliser les protéines hydrophobes, et en particulier les protéines membranaires, qui ne peuvent être séparées par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

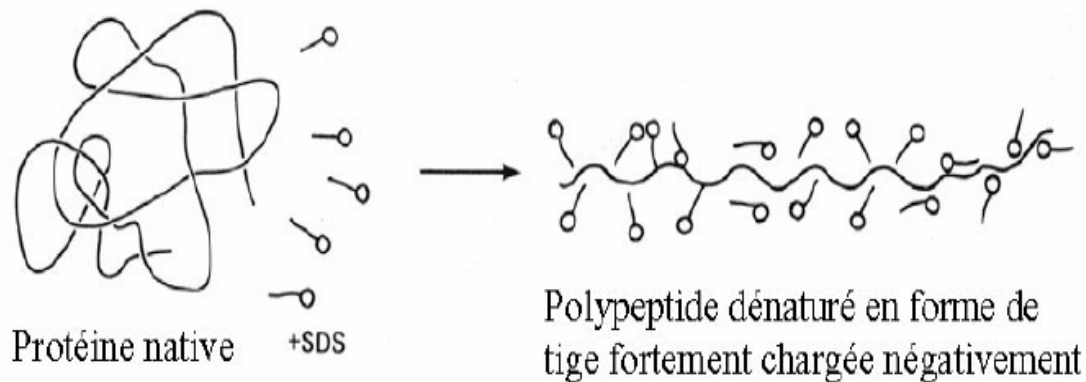


Fig 20 : dénaturation des protéines

VII.3. fixation des protéines et Coloration:

Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de coomassie R 2050 dans le méthanol et fixées par le TCA à 12% et l'acide acétique.

VII.4. Décoloration des gels :

La décoloration du gel a été réalisée par un mélange d'acide acétique, TCA 12% et le méthanol dans l'eau distillée..



Résultats et discussion



VIII. matériel végétal :

V111. 1. Préparation de la matière biologique :

les écorces d'agrumes sont connues par leurs richesse en pectine, cette dernière qui est un polysaccharide constituant majeure de la paroi de la cellule végétale, peut induire la synthèse des enzymes pectolytiques par les microorganismes comme il a été montré par les travaux précédents de (S. Ferradj ;2011)(N. Bouhadi, ;2013)(A. Ferhi et F. ZemourenE ; 2014) réalisés sur les écorces d'oranges. Peu de travaux ont été réalisés sur les écorces de citrons qui se caractérisent par leurs acidité élevées. Pour cette raison nous avons essayé de comparer la productivité des enzymes pectinolytiques à partir moisissures en utilisant les écorces de citron récupérées après extraction leurs jus (**figure n°23**) avec celle des écorces d'oranges



Fig23 : Poudre des résidus de citron après séchage, broyage et tamisage.

par ailleurs nous avons utilisé un autres déchets alimentaires ayant une acidité faible et pauvre en pectine qui est le son de blé provenant du marché local de la région de les isser (**figure n°24**).



Fig24 : Son de blé

Le son de blé est l'un des déchets agroindustriels les plus utilisés par les chercheurs pour la production des métabolites à valeur ajoutée à partir des microorganismes en milieu solide

Résultats et discussion

(Balkan et Ertan, 2010). Selon les statistiques du département d'agricultures des états unis (USDA), un total de 680, 419,000 tonnes de blé sont produites et 655,270,000 tonnes de blé ont été consommées dans la période de 2012 - 2013 dans le monde (Denir et Tair, 2014). étant donnée que d'environ 15 à 20 % (en poids) du son de blé ont été signalé à être mis en rebut dans le processus de production de la farine de blé, le son de blé peut être accepté comme un sous produit favorable pour la production microbienne d'enzymes appliquées dans les industries. (Dobrov *et al.*, 2007).

VIII.2. Caractéristiques Physico Chimiques des milieux de base

D'après les résultats des analyses physicochimiques des milieux de base rapportés dans le (tableau n° 5), nous constatons que le taux de la matière sèche est trop élevé dans le son de blé (90%), cette dernière est constituée majoritairement par les fibres alimentaires (66,12%) valeur reportée par (Denir et Tair, 2014) sur un son de blé ayant 90,64% de matière sèche. Bourdon *et al.* (1984) ont travaillé sur un son de blé ayant une matière sèche de 87% ; Ces différences de valeurs de la matière sèche peuvent être liées au mode et aux conditions de stockage ou à des facteurs qui se rapportent aux grains de blé dans la variabilité de la composition chimique.

la matière sèche des écorces de citons après séchage étant 91, 68% ce qui permettra le stockage des résidus avant leurs utilisations, d'après Gregorio *et al.* (2002) les fibres alimentaires totales sont de l'ordre de 32,9% dans les écorces de citron (par rapport à la matière sèche); cette valeur est trop faible par rapport à celle trouvées dans le son de blé. par contre la teneur en pectine est de l'ordre de 4,4 % (par rapport au produit frais) dans les écorces de citron et trouvée négligeable dans le son de blé.

Tab 5 : Résultats des caractéristiques physico-chimiques du milieu de base de production.

	Son de blé (%M.S.)	Ecorces de citron (%M.S.)
M.S	90	91.68
Cendres	6	1.7
Pectines	-	4.4 (% MF)
protéines	17	2.2
PH	6	3.5

%MF: par rapport à la matière fraîche

Résultats et discussion

La teneur en cendres est beaucoup plus élevée dans le son de blé que les écorces de citron. En ce qui concerne le taux de protéines dans le son, sa valeur moyenne de 17 % MS dépasse la gamme de valeurs observées par **Mac Masters *et al* (1978)** : 11,8 à 14,5 % MS. Cependant, elle est de même ordre que celle publiée par d'autres auteurs dont **Hubbell (1980)** et **Chyr (1987)** qui rapportent respectivement des teneurs de 16,47 et de 18,46 % MS. Dans les écorces de citrons le taux de protéines est beaucoup plus faible.

VIII.3. Préparation et caractérisation du matériel microbiologique :

La croissance des microorganismes pendant 5 jours dans les boîtes de pétri est représentée dans (la **figure n° 25**)

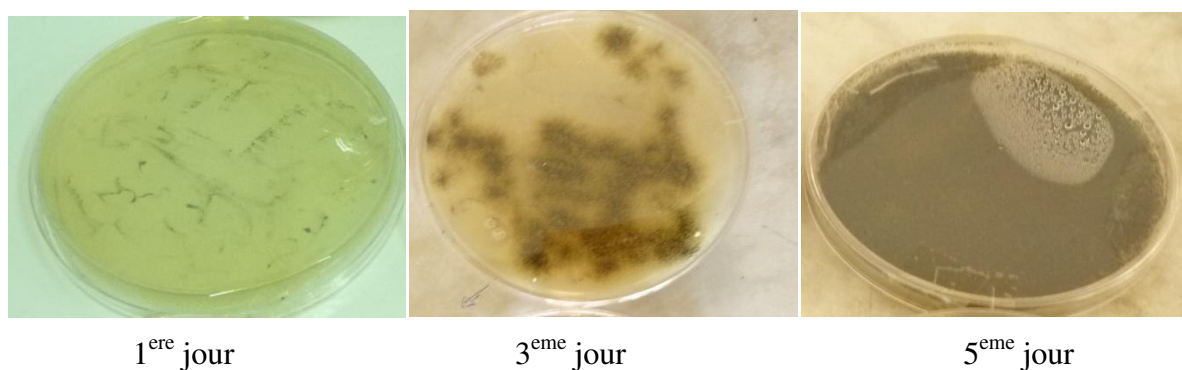


Fig 25 : Cinétique de croissance de *A.niger* sur milieu PDA

VIII.4. Préparation de l'inoculum :

La suspension en spores obtenue est représentée sur la (figure n°26)



Fig 26: Préparation de l'inoculum

Le dénombrement des spores sur la cellule de mallassez (**figure n° 27**) sous microscope a révélé un nombre de 10^7 spores /ml .



Fig27 : cellule de mallassez

XIV.1. Caractéristique de l'extrait enzymatique brut :

Après 10 jours de fermentation (**figure n° 28**) on observe la coloration noire sur toute la surface du milieu de culture complètement envahit par les moisissures.



Fig 28 : les milieux de culture après 10 j de la fermentation

Un volume de (86 ml) a été extrait de chaque erlenmeyer (**figure n°29**), les caractéristiques déterminées sur les extraits bruts sont représentées dans le (**tableau n°6**).



Fig 29 :Les extrait brut obtenu.

Résultats et discussion

Tab 6 : caractéristiques de l'extraits enzymatique brut.

	Son de blé	Ecorces de citron	Son de blé + écorces de citron
Act. Endo-PG (% RF/min)	1.4	1.7	1.6
Act. Exo - PG ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	0.3352	0.6266	0.4390
Protéines solubles		1.063	0.559
PH	03.51	02.20	02.90
Act.spécifique			
EndoPG		1,6	2,87
ExoPG		0,58	0.78

RF: réduction en fluidité.

Parmi les techniques de fermentation enzymatique, la fermentation à l'état solide est généralement préférée parce qu'elle permet la production d'enzymes brutes hautement concentrées, par conséquent, de faibles coûts pour l'extraction d'enzymes pures (De Gregorio et al.,2002). La biosynthèse des pectinases par des champignons et autres micro-organismes dépend de certains facteurs, parmi lesquels les composants du milieu nutritif, la température de culture, le pH initial du milieu, etc (Patil et Dayanand , 2006b). Dans notre étude comparative de production de pectinases en utilisant les écorces de citron et le son de blé , l'activité endo-PG est obtenue plus élevée dans les écorces de citron que le son de blé. En ce qui concerne l'activité exo-pg dans le son, sa valeur moyenne de **0.335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$** plus faible que la valeurs observées dans les écorces de citron **0.626 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$** , l'activité pectolytique totale est plus élevée dans l'extraits brut des écorces de citron (**53,83U**) par rapport à celle obtenue dans l'extrait enzymatique brut du son de blé (**23,81U**) cela s'explique par la richesse du citron en pectine, dans les travaux antérieurs de **Sampriya sharma et al., (2012)** ont observé aussi une activité pectinasique plus élevée dans les écorces d'oranges que le son de blé; or la présence d'une activité pectinasique dans l'extrait de son dont la teneur en pectine est négligeable peut s'expliquer par le pH initial du milieu de fermentation et la teneur élevée en protéines dans le son comme il a été montré par certains auteurs. La seule variable dans notre étude est le milieu de base qui diffère par sa composition biochimique notamment le pH initiale de fermentation qui était de l'ordre de 6 dans le milieu contenant le son de blé et 3,2 dans celui des écorces de citron. Le pH de la culture est l'un des paramètres

Résultats et discussion

d'environnement les plus importants qui influent sur la croissance des cellules microbiennes et la production d'enzymes. Chaque micro-organisme possède un pH optimal et unique intervalle de pH pour la croissance et l'activité. Les champignons filamenteux sont censés croître dans une large gamme de pH dans la culture à l'état solide, parce que le substrat solide possède une meilleure capacité de mise en mémoire tampon (**Shankar & Mulimani, 2007**). L'effet du pH initial sur la production d'enzymes a été étudié par **M. Anvari et G. Khayati, (2014)** en ajustant le pH du milieu de 5 à 8. Bien que le pH de 5 à 8 favorisait la production de pectinase, la production de pectinase maximale (136,9 U / g de substrat) a été observée lorsque le pH initial dans le milieu de croissance était de 6,0 . Cependant, la production de pectinase a fortement diminué de pH 6 à 7. Les conditions de pH varient d'une espèce à l'autre et même dans les différentes souches de la même espèce isolées à partir de différents habitats (**Wang et al., 2005**).

d'après ces auteurs ont signalé que la production de pectinase a été significativement affectée par les variations de pH; il est donc conclu des résultats expérimentaux que l'ajustement du pH initial du milieu de croissance est nécessaire pour le rendement de pectinases maximale par *Aspergillus sp.* Par ailleurs il a été signalé que le rapport C / N du milieu dans SSF a un impact important sur les propriétés physiques du substrat (**López Casas et al. 2003**). Dans l'étude menée par **M. Anvari et G. Khayati, (2014)**, l'effet de différents rapports C / N sur la production extracellulaire de pectinase par *A. niger* a été étudié. La production de pectinase la plus élevée (135,9 U / g) a été obtenue à C / N de 10: 1 et un très haut ou bas rapport C / N a entraîné un rendement relativement faible de la production d'enzymes. Cependant, l'activité de pectinase au rapport C / N de 10: 1 n'a pas été statistiquement différent de celui du rapport C / N de 20: 1. Ce résultat a montré que la limite tolérable C pour la production d'enzymes n'a pas été trop étroite. Une diminution du rendement enzyme a été observée avec de nouvelles augmentations de rapport C / N.

Cela donne à penser que, parmi d'autres facteurs physiques et chimiques, le rapport C / N est une autre importante qui doit être optimisée dans le composant principal du milieu.

L'effet des résidus agro-industriels différents sur la production de pectinase a été étudié en utilisant une variété de substrats solides, car ils agissent comme matrice de support et une source de nutriments pour la production d'enzymes. Les matériaux comme substrat pour la production d'enzymes pectolytiques sont peu coûteux, et non toxique. Parmi ceux-ci la paille de riz ont été trouvés pour être le meilleur substrat pour la production de pectinase que la paille de blé (15,5%) . De nombreux chercheurs ont signalé que les processus de SSF sont

Résultats et discussion

fortement influencés par la nature du substrat solide (Kashyap et al., 2003; Debing et al., 2006).

Plusieurs chercheurs ont étudié la production de pectinases extracellulaires par *Aspergillus sp.* en utilisant des substrats pectiques ou la pulpe de betterave à sucre, etc. la matière pectique induit la production des pectinases.

la production de pectinase *A. PTCC 5010* a été réalisée avec différents pulpe d'agrumes et les résultats ont montré que la production d'enzymes était dans la pulpe d'orange plus élevée que la pulpe de citron. La pulpe d'orange a une teneur élevée en protéines, notamment la pectine. Ceci indique que la pulpe d'orange pourrait être un inducteur approprié à comparer avec de la pulpe de citron pour la production de pectinase par fermentation en milieu solide. Patil & Dayanand (2006b) ont également rapporté une amélioration du rendement de pectinase par l'ajout d'écorce d'orange au substrat solide comme inducteur. Or la pectine lyase a été produite sur les écorces de citron après le 4^{ème} jour de fermentation avec une activité de 290 U/ml et après le 8^{ème} jour avec une activité de 185U/ml sur les écorces d'oranges par *A. Oryzae* (Koser et al., 2014). La production de pectine lyase par *A.niger* sur les écorces d'oranges après le 8^{ème} jour de fermentation a été déjà signalée par Ferradj, 2010.

XIV.2. Caractérisation de l'extrait pré purifié :

Après la précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse et concentration de l'extrait enzymatique, les activités enzymatiques dans les extraits pré purifiés sont représentées dans le (tableau n°7)

Tab. 7 : Caractéristiques des extraits pré purifiés.

	Son de blé	Ecorces de citron	Son de blé + écorces de citron
Act Endo-pg (% RF/min)	1.47	1.73	1.60
Act Exo – pg (µmol/min/ml)	0.752	0.564	0.666
protéines solubles (µg/ml)	0.824	0.497	0.717
PH	4.60	3.32	4.40
Activité spécifique endoPG	1,78	3,48	2,23
ExoPG	0.912	1.136	0.928

Résultats et discussion

D'après le tableau des résultats obtenu de l'extrait pré-purifié ; on observe une augmentation de Act-exo dans les milieux de fermentation et une diminution dans le taux des protéines, l'augmentation de l'activité spécifique des deux enzymes montre que les pectinases se trouvent de plus en plus en quantités importantes par rapport aux autres protéines.

XIV.3. La purification des extraits par la chromatographie sur colonne :

La séparation des protéines est réalisée par injection du tampon acétate (pH 4,2) dans la colonne (*QTY 10*) à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit 0.5ml /min, le débit imposé à la colonne doit toujours être inférieur au débit spontané de cette colonne. Le volume injecté de chaque extrait enzymatique pré-purifié dans la colonne est de 1ml.

les éluats sont recueillis à l'aide du collecteur de fraction à raison de 2ml par tube et leurs densités optiques (DO) à 280nm est lue contre le tampon d'éluion. On trace par conséquent la courbe de la DO en fonction des numéros des tubes ou en fonction du volume d'éluion :

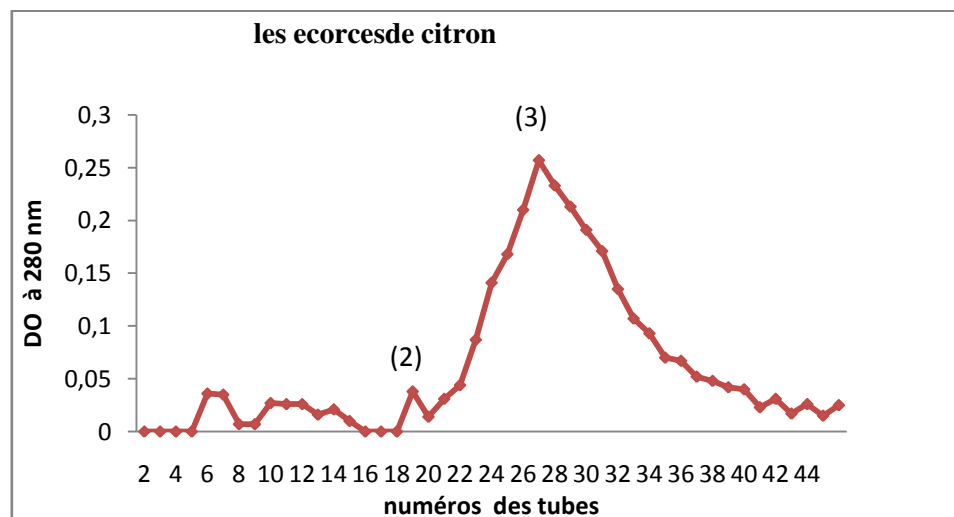


Fig 30 : éluion de l'extrait enzymatique pré – purifier des écorces de citron .(2ml par fraction de tube; débit 0.5ml/min)

Résultats et discussion

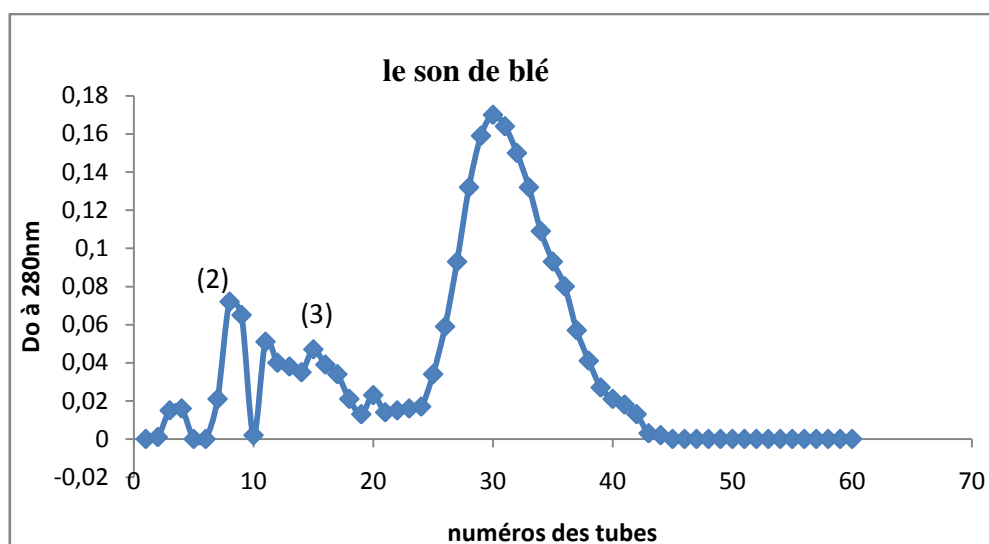


Fig 31 : Elution de l'extrait enzymatique pré – purifier de son de blé (débit: 0,5ml/min; 2ml par fraction de tube)

Les protéines de l'extrait pré purifié des écorces sont séparées sur colonne par gel de filtration séphadex G75. Le profil chromatographique obtenu (Figure30) montre l'existence de deux fractions actives (pic 2 et pic 3). Le pic 2 est doté d'une activité endopectinasique dont la valeur est de 0.520 (% RF/min) après 38 ml de volume d'élution, le pic 3 est doté d'une activité exopéctinasique de 0.181 ($\mu\text{mol/ml/min}$) après 60 ml de volume d'élution. Par la même méthodologie nous obtenons le profil des protéines du son de blé (figure 31) et nous obtenons 2 fractions actives dans le pic 2 (après 16 ml de volume d'élution) dont l'activité est de 0.476 (% RF/min) et dans le pic 3 (après 30 ml de volume d'élution) dont l'activité est de 0.097 ($\mu\text{mol/ml/min}$). Cependant le pic majeur dans la figure 31 ne présente aucune activité enzymatique.

Tab. 8 : Caractérisation des fractions obtenues par la purification de l'extrait écorces de citron.

	Act Endo-pg (% RF/min)	Act Exo – PG ($\mu\text{mol/min/ml}$)	Protéines solubles ($\mu\text{g/ml}$)	Activité spécifique
Pic 2	0.520	0.127	0.051	EndoPG :10.19 ExoPG :2.41
Pic 3	0.208	0.181	0.173	EndoPG :1.202 ExoPG :1.046

Résultats et discussion

Tab. 8 : Caractérisation des fractions obtenues par la purification de l'extrait de son de blé.

	Act Endo-pg (% RF/min)	Act Exo – pg ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	Protéines solubles ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Activité spécifique
Pic 2	0.476	0.018	0.054	EndoPG :10.19 ExoPG :2.41
Pic 3	0.119	0.097	0.099	EndoPG :1.202 ExoPG :1.046

XIV.3.1. Tableaux de Purification

Tab 10 : Tableau de purification de l'extrait enzymatique des écorces de citron.

Étape	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut (EB)	91.418	Endo:176.2 Exo: 53.836	Endo=1.927 Exo=0.588	1	100
Extrait pré-purifié (EPP) Fraction 30-90% de sel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.424	Endo=44.98 Exo=29.400	Endo=2.099 Exo=1.372	Endo=1.089 Exo=2.333	Endo=25.5 Exo=54,6
Filtration sur gel séphadex G75	Endo:0.51 Exo:2.574	Endo:5.2 Exo:4.706	Endo:10.19 Exo:1.828	Endo:4.854 Exo:1.332	Endo :11.56 Exo:16.006

Résultats et discussion

Tab 11 : Tableau de purification de l'extrait enzymatique du son de blé.

Étape	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut (EB)	-	-	-	-	-
Extrait prépurifié (EPP) Fraction 30-90% de sel $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.424	Endo :38.22 Exo :19.578	Endo :1.783 Exo :0.913	-	-
Chromatographie d'exclusion stérique séphadex G75	Endo:0.27 Exo:0.59	Endo: 2.38 Exo: 0.582	Endo :8.81 Exo:0.98	Endo:4.94 Exo:1.073	Endo:6.227 Exo:2.970

(Shashi kant *et al* ; 2013) ont purifié une polygalacturonase avec un facteur de purification d'une valeur de 6.52 et un rendement de 5.01% , dans une autre étude de purification de polygalacturonase à partir d'*aspergillus niger* un facteur de purification de 6.1 a été obtenu (Mohsen *et al* ., 2009) ; par ailleurs un facteur de 6.7 a été obtenu par des étapes classique de purification d'une polygalacturonase sur gel séphadex G75 (Dogan et Tari , 2008) de leurs coté (Bahajan dey *et al.*, 2014) ont obtenu un facteur de purification d'une valeur de 34,8 en deux étapes de purification : précipitation par sulfate d'ammonium et filtration sur gel séphadex G75. Gautan anard *et al* . ; 2016 ont purifié avec un facteur de 3.13 après précipitation a l'acétone et un facteur de 18.43 après élution sur gel séphadex G100.

XIV.3.2. Détermination des poids moléculaire des enzymes pectinolytiques :

Le profil des protéines standards obtenues (figure n°32) après l'injection progressive de 1ml de BSA (67 Kda) et un mélange de trypsine ovalbumine (20 Kda et 43 kda respectivement). La densité optique de chaque fraction est lue à 280 nm. il est important à signaler que les protéines standards ont été injectées séparément, après avoir obtenu un profil difficilement interprétable du mélange des trois protéines (Annexe n°G)

Résultats et discussion

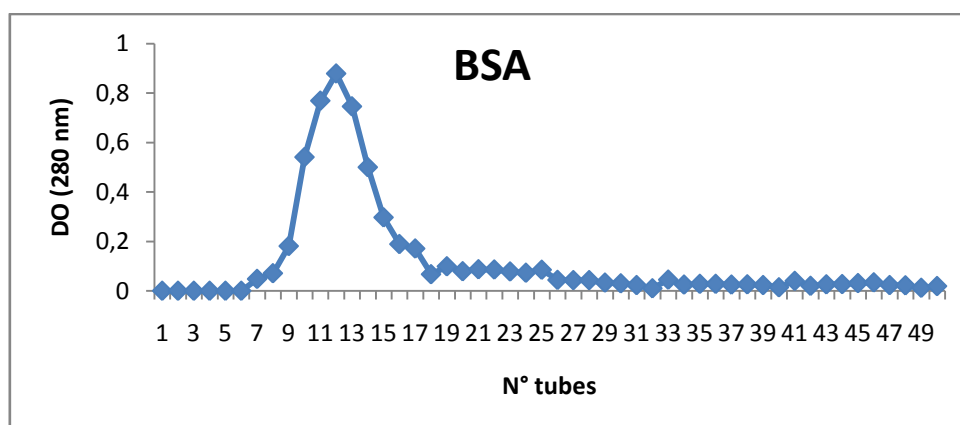


Fig 32 : Profil d'élution de la BSA.(2ml par fraction de tube, débit: 0,5/ml)

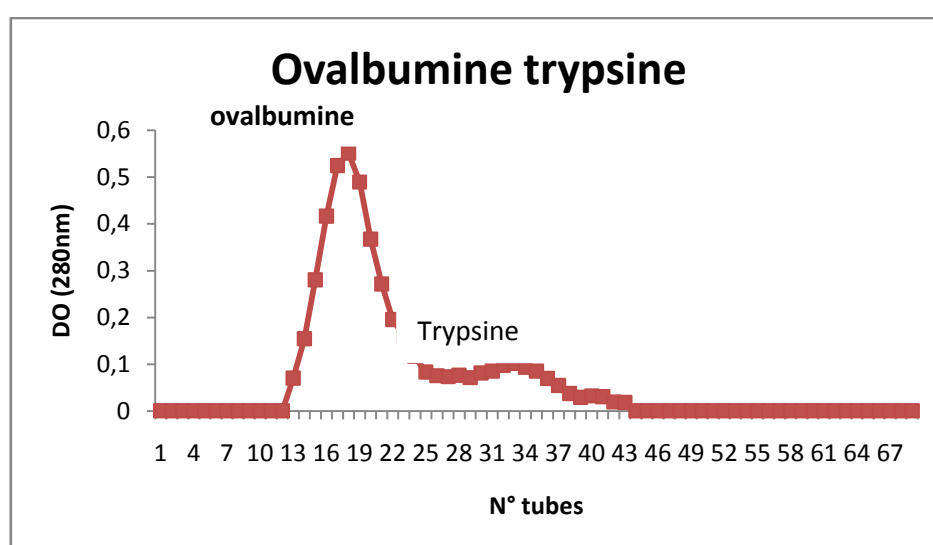


Fig 33 : Profil d'élution des protéines standards (ovalbumine, trypsine), 2ml par fraction de tube; débit imposé: 0,5/ml)

Les poids moléculaire avec le logarithme de chaque protéine sont représentés dans le tableau suivant :

Tab 12: Logarithme des poids moléculaires des protéines standards

protéines	poids moléculaire	volume	log PM
Trypsine inhibiteur	20	64	1,301
Ovalbumine	43	36	1,633
B,S,A	67	24	1,826

Résultats et discussion

La courbe d'étalonnage semi logarithmique des protéines standards en fonction des numéros des tubes est obtenue ci dessous:

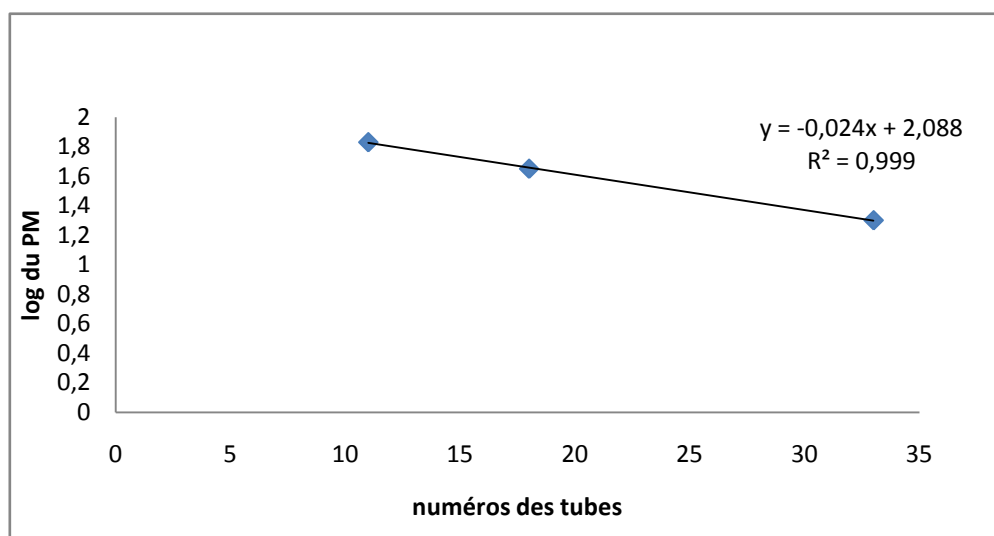


Fig 34: Courbe d'étalonnage des protéines standards: (*BSA, ovalbumine, trypsine*).

Donc d'après la courbe d'étalonnage des protéines standard on peut obtenir les poids moléculaires des deux enzymes pectinolytiques purifiées par la projection de numéro de tube sur l'axe de Lg (PM) ou à l'aide de l'équation de graphe .Les résultats obtenus sont montrés dans le (**tableau n°13**) suivant :

Tab 13 : Poids moléculaire des enzymes purifiées par gel de filtration.

	Log (PM)	PM
Les écorces de citron		
Endo PG	1.632	42.85
Exo PG	1.440	27.54
Son de blé		
Endo PG	1.896	78.70
Exo PG	1.728	53.45

XIV.4. Electrophorèse SDS page des extraits enzymatiques :

La migration des protéine a été faite dans un gel à l'aide d'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide), sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation.

Résultats et discussion

Les ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sont déplacés sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: les anions (chargés négativement) migrent vers l'anode (potentiel positif) et les cations (chargés positivement) migrent vers la cathode (potentiel négatif). Cela permet ainsi de les séparer et déterminer leurs poids moléculaires par calcul du rapport frontal.

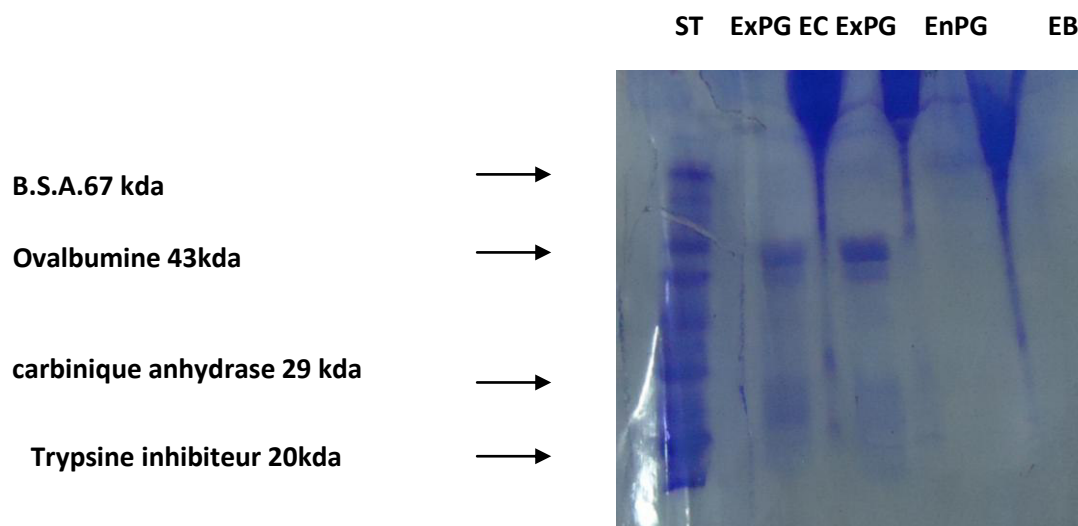


Fig. 35 : Electrophorèse des extraits enzymatiques des écorces de citron: EC(enzyme commerciale), EnPG(endoPG), ExPG (exoPG), EBC(extrait brut concentré), ST (protéines standards).

Les enzymes séparées sont apparues sous forme de bandes plus au moins intenses dont chacune correspond un rapport frontal (Rf) qui est le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration (tampon de migration). Le tableau suivant est obtenu dans la raison de tracé la courbe de rapport frontale en fonction de log PM.

Tab 14 : les valeurs de rapport frontal des protéines standard et logarithme de leur poids moléculaire

Protéine	Rapport frontal	Log PM
B.S.A	0,2	1,82
Ovalbumine	0,45	1,63
Carbonique anhydrase	0,65	1,46
Trypsine inhibiteur	0,75	1,30

Résultats et discussion

La séparation de l'enzymes commerciale par électrophorèse n'a pas montré une bonne séparation par contre les protéines standard ont été bien séparées, leurs rapports frontaux sont représentés dans le (tableau n°14), l'extrait brut montre 4 bandes dont les rapports frontaux sont :RF=1.6 , RF=2.4 et RF= 4.4.

La fraction de l'endo PG montre une seule bande claire (RF=1.1) par contre la fraction de l'exo PG montre une hétérogénéité qui ressemble à l'extrait brute , sa séparation par SDS page révèle deux bandes intenses RF=0,4 et RF=0,7 ; Peut être qu'il s'agit de dimères ou une hétérogénéités de pois moléculaires .

La droite $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{rapport frontal})$ permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue. La courbe obtenue est représentée dans la figure suivante :

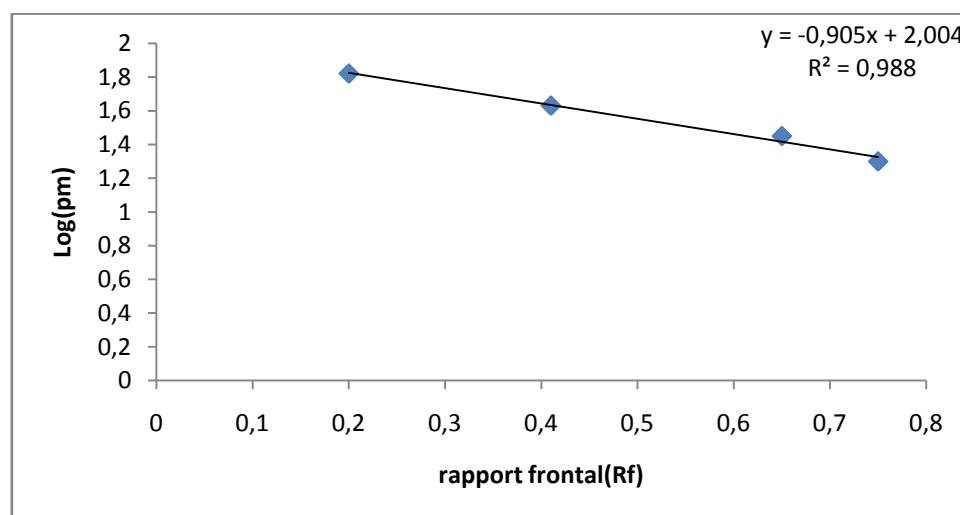


Fig n°36 Courbe d'étalonnage des protéines standards de l'électrophorèse.

Tab 15 : Electrophorèse des extraits des écorces de citron.

Protéine	Rapport frontal	Log PM	PM(Kda)
Exo PG1 (Fraction purifié sur G75)	0,40	1,64	43,65
Exo PG2 (extrait purifié sur G75)	0,70	1,37	23,44
Endo PG (extrait purifié sur G75)	0.18	1.84	69.18

Résultats et discussion

L' exopolygalacturonase purifiée a présenté deux bandes distinctes par SDS page; une bande de poids moléculaire de 43,65 Kda et l'autre 23,44 Kda (figure n°35).

L'analyse de SDS-page de la polygalacturonase purifiée par **(Gagan et Tari ;.2008)** a montré que l'enzyme est hétérodimère de 69 et 34 kda, le poids moléculaire de l'enzyme purifiée est estimé 106 kda . 3 formes de polygalacturonase ont été isolées et purifiées à partir des déchets de mangue, les poids natifs de PGI , PGII , PGIII ont été trouvés 120, 105, et 65kda respectivement , sur SDS page ces enzymes ont été trouvées : 60 ; 70 ,35 et 38 ,27 kda pour PGI. PGII et PGII respectivement.

Les enzymes secrétées par les microorganismes ont différents poids moléculaires par exemple la polygalacturonase de *Paeacilomyces variotti* a un poids moléculaire de 39,41 kda **(Singh et al . , 2008)**. L'enzyme secrétée par *Streptomyces erumpens* a PM de 63 kda **(Patil et al , ; 2006)**. Les PG de *Sclerotinia, sclerotium* sont de 82 et 56 kda **(Riou et al. ,1992)**, tandis que **(Tapati Bahaja dey et al . , 2014)** ont observé une seule bande sur SDS page de la PG purifiée sur G75 de poids moléculaire 30 kda. De leurs côtés (**Nagai et al.,2000**) ont purifié une EXO PG d'*aspergillus awamori* 41 kda et le poids moléculaire de l'Endo PG obtenu par **(Gautan anaid et al . , 20016)** sur SDS page était de 43 kda.



Conclusion générale



Conclusion générale

Conclusion générale

Dans cette étude comparative entre deux milieux de production d'enzymes pectinolytique par *Aspergillus Niger* qui sont les écorces de citron et le son de blé , on a pu constater que le microorganisme se développe bien sur les deux milieux de fermentation; l'activité enzymatique dans l'extrait brut des écorces de citron est plus élevée par rapport à celles obtenue dans l'extrait brut du son de blé .

Aussi cette étude nous a permis de valoriser deux sous produits de l'industrie alimentaire pour la production de métabolites a valeur ajoutées.

La gel de filtration nous permis d'isoler deux polygalacturonases de poids moléculaire différents; cependant par SDS page nous avons obtenu des poids moléculaires différents à ceux issus de la gel de filtration par conséquent nous pensons qu'il est préférable de refaire l'électrophorèse des enzymes sans ajout de mercaptoéthanol.

Le taux de purification obtenu est comparable à celui obtenu par certains travaux antérieurs, cela dit que la purification des enzymes pectolytiques par gel de filtration sur séphédex G75 est efficace.

En perspective nous souhaiterons améliorer le rendement de purification d'une manière à avoir plus de 50% d'enzymes purifiées, nous souhaiterons aussi de purifier la pectine méthylestérase et la pectine lyase et déterminer leurs poids moléculaires par des méthodes plus fines.

Références :

Acuna-Arguelles, M, Gutierrez-Rojas, M, Viniegra-Gonzalez, G, & Favela-Torres, E. (1994) Effect of water activity on exopectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnol Letts*, 16, 23-28

A. D e Gregorio, G. Mandalari, N. Arena, F. Nucita, M.M. Tripodo, R.B. Lo Curto. 2002. SCP and crude pectinase production by slurry- state fermentation of lemon pulps.bioressource technology 83, 89 - 94

A. Ferhi et F. ZemourenE ; 2014., memoire de fin d'etude pour l'obtention du diplôme master theme:CARACT2RISATION CHIMIQUE D'une polygalacturonase obtenue par culture *d'aspergillus niger sp*

AFNOR ,1986 les dossiers de la normalisation issn ,(2),8297 ,4827.

Anvari M, & Khayati G. 2009. Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* PTCC 1290 using Taguchi methodology. *Asian J. Chem.*, 21: 2131-2140.

Assamoi a.a destai j., thonart p ., (2009) aspects microbiologiques de la *penicillium canescens*. *Biotechnol . agron .soc.environ ., 13(2) ;281-294.*

Balkan, B., Ertan, F., 2010. The production of a new fungal alpha-amylase degradedthe raw starch by means of solid-state fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.*40, 213–228.

Bennett, J. W. (2009). "Aspergillus : a primer for the novice." *Medical Mycology:* 1-8.

Bergmeyer h.u., Principes de l'analyse enzymatique ; Paris, Technique et documentation (1979) .

Bourdon o., Perez J M., Bebas F., LECLERCQ B., LESSIRE M. et SAVEUR B. 1984 Les matières premières. Tables de composition. In alimentation des animaux monogastriques J.C. Blum édition INRA. Paris. PP 170-171.

Cezard F. (2009). *Biotechnologies en 26 fiches.* Dunod. Paris. (P : 82- 118- 120- 131).

CEZARD F.2009 . *biotechnologies en 26 fiches.* dunod .paris.(p : 35-36)

Carole L.Vignola . science et technologie de lait ;biotransformation de lait école polytechnique de Montréal, 2002., ;p176.

Chyr SC 1987 Tables of feed composition Taiwan.Taiwan livestock research institute. Tainan, Chine.

C. Riou, G. Freyssiner, M. Fevre, Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 578–583.244–250

Debing J, Peijun L, Stagnitti F, Xianzhe X, Li L. 2006. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 64:

De Gregorio A, Mandalari G, Arena N, Nucita F, Tripodo MM, LoCurto RB. 2002. SCP and crude pectinase production by slurry- state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technol.*, 83:89–94.

Demir, H., Tari, C. 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase inSSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products* 54, 302–309

Dobrev, G.T., Pishtiyski, I.G., Stanchev, V.S., Mircheva, R., 2007. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresour. Technol.* 98, 2671–2678.

Drouhin,2005 ., étude de production de protéases alcalines par ba cill us licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat, mémoire présentée pour l'obtention du grade de maître ès sciences .

Emmanuelle Lami - Août 2010 – article sur la nutrition.fr : Les caractéristiques du citron- Quelles sont les principales caractéristiques du citron ?

Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. & Vniegra-Gonzalez G., 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**(2), 221-227.

Gautam Anand ,Sangeeta Yadav,Dinesh Yadav.,Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber 3 biotech (2016) .201 doi 10.1007/5 13205

Hadj-Taieb N., Ayadi, M., Bouabdallah, F. and Gargouri, A. hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme Microb Technol*, 30 (5) (2002) 662-666.

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

Hubbell C H 1980 Feedstuffs analysis table. *Feedstuffs* 52: 42-47

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

John I. Pitt et Ailsa D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage*, Springer, 25 juillet 2009 (ISBN 9780387922072)

Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S. & Tewari R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, **77**, 215-227.

Kashyap DR, Soni SK, Tewari R. 2003. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresource Technol.*, **88**: 251–254.

KHAN, N.Q., ALBRECHT, H., RUTTKOWSKI, E., LOFFLER, F., GOTTSCHALK, M. and JANY, K. D. (1990). Nucleotide and derived amino acid sequence of a pectinesterase cDNA isolated from *Aspergillus niger* strain RH5344. *Nucleic Acids Research*. **18**, 4262 p.

Larpent-Gourgaud M., Sangleer J.J. (1992) –Biotechnologies : principes et méthodes – Collection Biosciences et techniques. Ed. Doin.Paris. 571 ; 61-64

Mac Masters C C, Hinton J J C and Bradbury D 1978 Microscopic structure and composition of the wheat kernel. In: Pomeranz Y, editor. *Wheat chemistry and Technology*, St Paul, MN, (USA). American Association of Cereal Chemists. 514p.

Masumeh Anvari et Gholam Khayati .The effect of citrus pulp type on pectinase production in solid state fermentation. Process evaluation and optimization by Taguchi Design of experimental (DOE) methodology . *J.Bio Sci. Biotech* 2014 3(3): 227-233.

M Dixon (1953) A nomogram for ammonium sulphate solutions, *Biochem. J.* **54**:457 [nomogramme de saturation de sulfate d'ammonium à température de la pièce, 22°C]- (1955) *Meth. Enzymol.* **1**:76-. [tableau de saturation de sulfate d'ammonium à température 25°C]

Mehrnouche A., Yazid M., Khanani Z. . Purification and characterization of thermal alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *Eur. Food Res. Technol.* (2014) **239**: 21-29

M. Michel Moutounet., 2014.terroir d'innovation. Institut français de la vigne et du vin *Enzymes en œnologie : Fabrication, réglementation, applications, Itinéraires n°26.*

Morris G.A., Foster T.J. & Harding S.E. (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydr. Polym.* **48**: 361- 367.

Nagai, M., T. Katsuragi, T. Terashita, K. Yoshikawa and T. Sakai. 2000. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience biotechnology and biochemistry* .**64**.1729.1732.

N Bouhadi, ;2013 .,memoire de fin d'etude pour l'obtention du diplôme master theme:

N. Dogan, C. Tari, Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties, *J. Biochem. Eng.* 39 (2008) 43–50

NGOM. S, 2004. Ébauche d'un référentiel sur la composition chimique et valeur nutritive des matières premières utilisables en alimentation des volailles au Sénégal. Doctorat de troisième cycle de chimie et biochimie des produits naturels. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

N. Patil, K. Patil, B. Chaudhari, S. Chincholkar, Production, purification of exo polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application, *Ind. J. Microbiol.* (2011), <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-011-0162-x>: 1-7.

Pelmont j ., enzymes: catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaires de Grenoble 1995 .

P Kamoun (1986) Appareils et méthodes en biochimie, 2e édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

P. Singh, U.N. Dwivedi, Purification and characterisation of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit, *Food Chem.* 111 (2008) 345–349

Patil SR, Dayanand A. 2006b. Exploration of regional agro wastes for the production of pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.*, 44: 289–292.

RAO M.B., tanksale am., ghatge m.s deshpande v.v ., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases .*microbiol.mol.biol.rev .,*

Ralet M.-C. et al., 2005. Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, **66**(15), 1832-1843. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S. & Tewari R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, **77**, 215-227.

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

Sadhana, n., yashdeep, p., divya , s., anand , n.; anil, k. (2006) production of polygalacturonase by immobilized cells of *aspergillus niger* using orange peel as inducer . *process biochemistry*, 41, 1136-1140.

Simon j. charnock , Barry Mc Cleary (2005) les enzymes: application industrielles et analytique (extrait de la revue œnologue) .

Said s., Fonseca M.J., Siesseve V. Pectinase production by *Penicillium frequentans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (1991) 6: 607-608 Doi 10. 1007/ BF00452841.

S. Ferradj ;2011., mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme master thème: obtention des enzymes pectinolytiques par bioconversion des résidus du jus d'oranges. Application a la clarification de jus de pommes

S.M. Mohsen, W.A. Bazaraa, K. Doukani, Purification and characterization of polygalacturonase *Aspergillus niger* U-86 and its use in clarification of pomegranate and grape juices, in: fourth Conference on Recent Technologies in, Agriculture, 2009, pp. 805–817.

S. Kar, R. Chandra Ray, Purification, characterization and application of thermostable exo-polygalacturonase from *Streptomyces erumpens* MTCC 7317, Food Biochem. 35 (2010) 133–147.

Shashi Kant, Anuja Vohra, Reena Gupta., Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. protéin expression and purification 87(2013)11_16

Safia Koser, Zahid Anwar, Zafar Iqbal, Awais Anjum, Tahir Aqil, Sajid Mehmood, Muhammad Irshad., Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7(2014) 327-332

Tabuc C. Flore Fongique De Differentes Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université

Tapati Bahaja dey, Sunita Adala, Patrali Bhattacharya, Rintu Banerjee. purification of polygalacturonase from *aspergillus awamori nakagawa* MICC 6652 and its application in apple juice clarifiats LWT. food science and technology 59(2014) . 591 -595.,

Wang R, Law RCS, Webb C. 2005. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. Process Biochem., 40: 217–227.

Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. Adv. Appl. Microbiol., 58; 1-55.

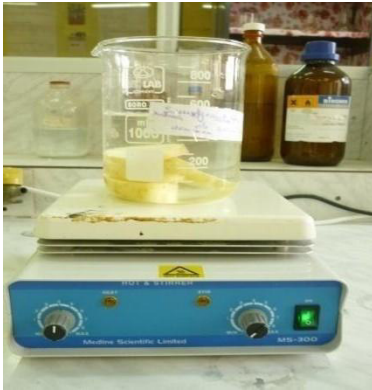


Les annexes



Annexe A

➤ Préparation de milieu PDA :



Ebullition de pomme de terre



Encrassage



Filtration



Solution obtenu



Stérilisation a 120°C pendant 15min



Matériels microbiologie



Boites pétries remplis avec la gélose



Boites pétri étalé avec des spores



Incubation des boites pétries pendant 5jours

Annexe B

Préparation de l'inoculum :



Culture d'*A. niger*



Stérilisation de la zone



**L'addition de solution
tween 80**



Grattage



Solution obtenu



Filtration



L'inoculum

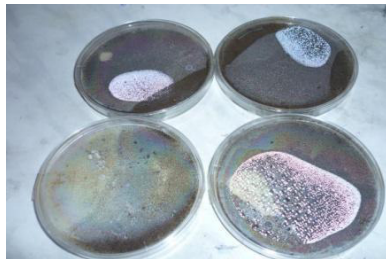
Annexe c



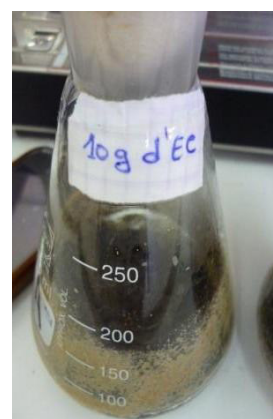
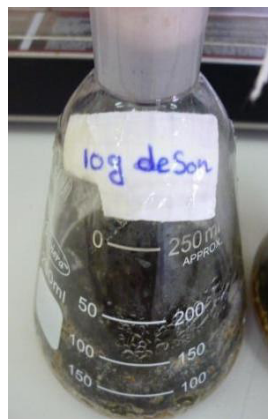
Les milieux de base



addition des sels minéraux et de la source azotée



ensemencement et incubation à 30°C



Les erlenmeyers après 5 jours de fermentation

ANNEXE D

**Final concentration of ammonium sulfate,
% saturation**

Initial concentration of ammonium sulfate, % saturation	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grams solid ammonium sulfate to be added to 1 l of solution																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

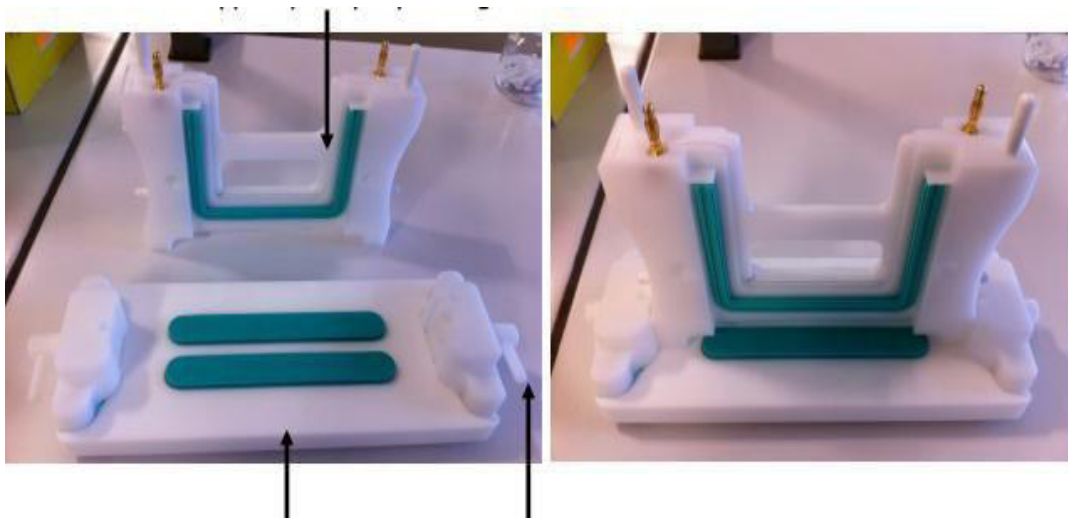
Tableaux n: Tableau de saturation du sulfate d'ammonium (25°C).

Annexe E

Préparation de la cuve d'électrophorèse:

- Placer le support de plaque de gel sur sa base. Verrouiller les deux loquets inférieurs pour une bonne stabilité :

Support pour plaque de gel

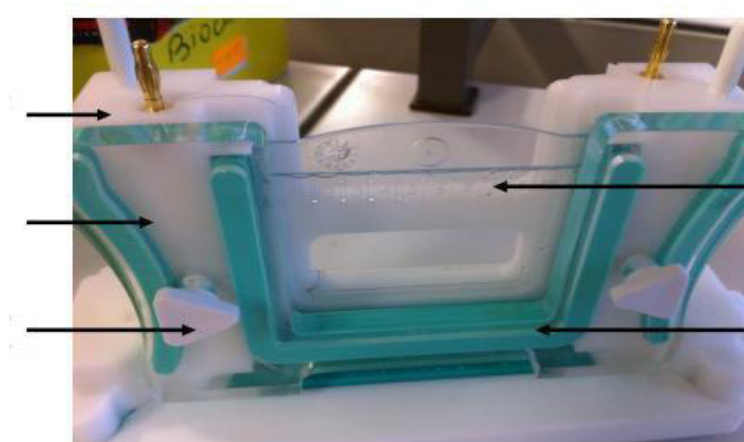


Base d'assemblage Loquets

Support

Plaque de
verrouillage

Vis de serrage



gel

Joints silicone

- Dissocier le support de la base d'assemblage, puis insérer le support + gel dans la cuve à électrophorèse. S'assurer que le support est correctement bloqué dans les ergots de guidage :



VII.3.2. Remplissage de la cuve :

- Remplir le compartiment intérieur (le gel et la plaque de barrage) avec 80 mL de tampon de migration pH 8,8.
- Remplir le compartiment principal de la cuve avec 1,5 L de tampon de migration pH 8, jusqu'à atteindre environ 5 cm en dessous de la limite de remplissage (Max fill).

Chargement du gel

- Le gel comporte en surface 10 puits matérialisés par des créneaux répartis sur la face supérieure du gel.

Dépôt des échantillons (nous avons déposé 15 μ l dans chaque puits)

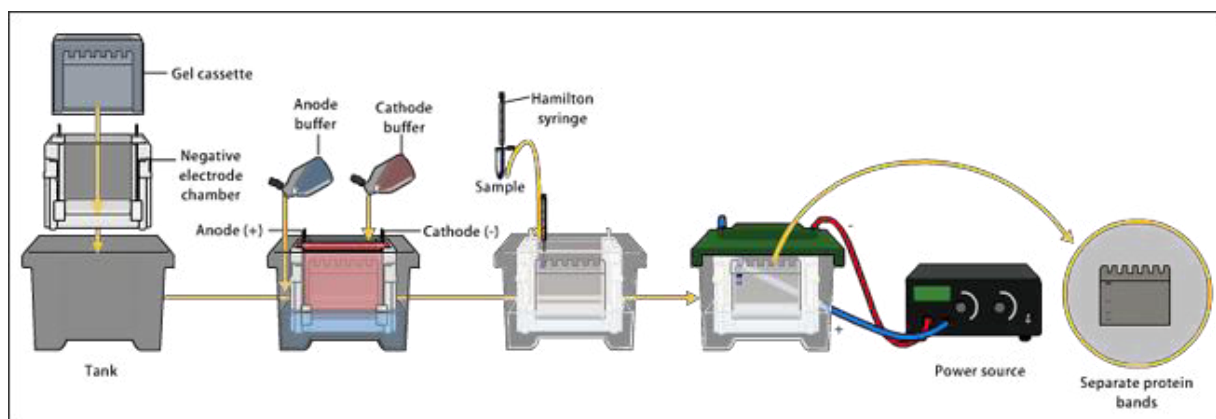


Fig 21: la séparation des protéines par l'électrophorèse

Annexe G

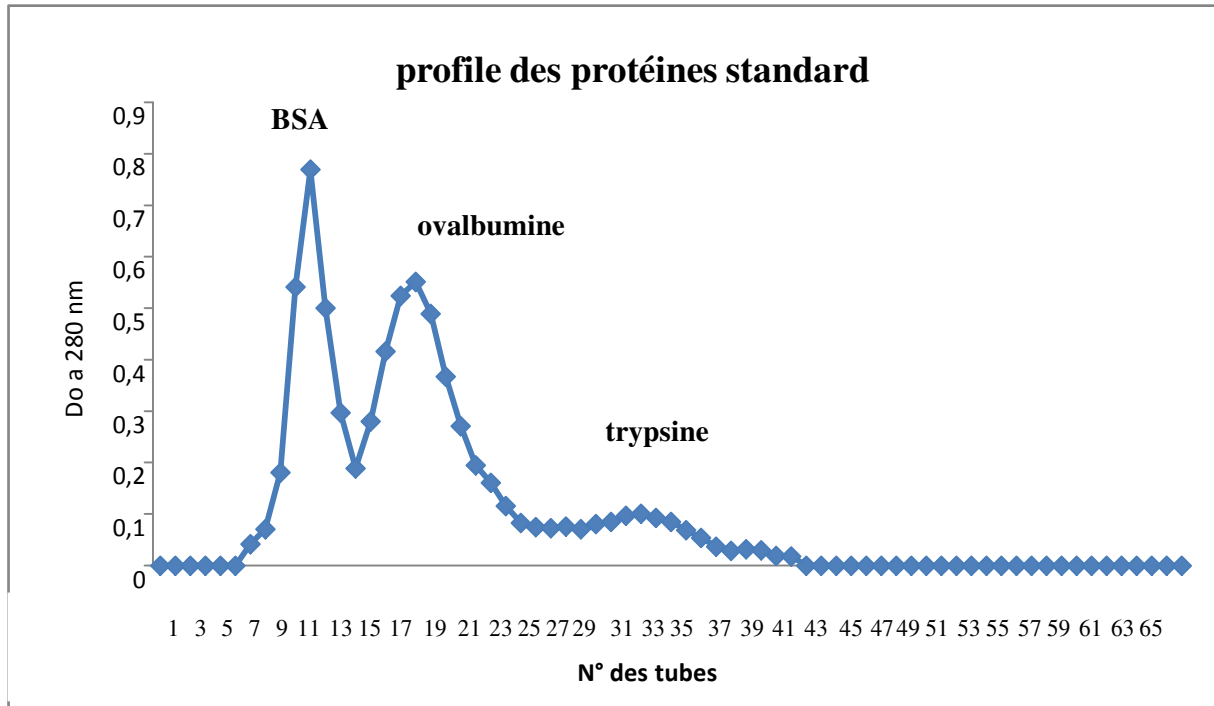


Fig 32 : profil d'élution de la BSA , Ovalbumine et trypsin .(2ml par fraction de tube, débit: 0,5/ml)

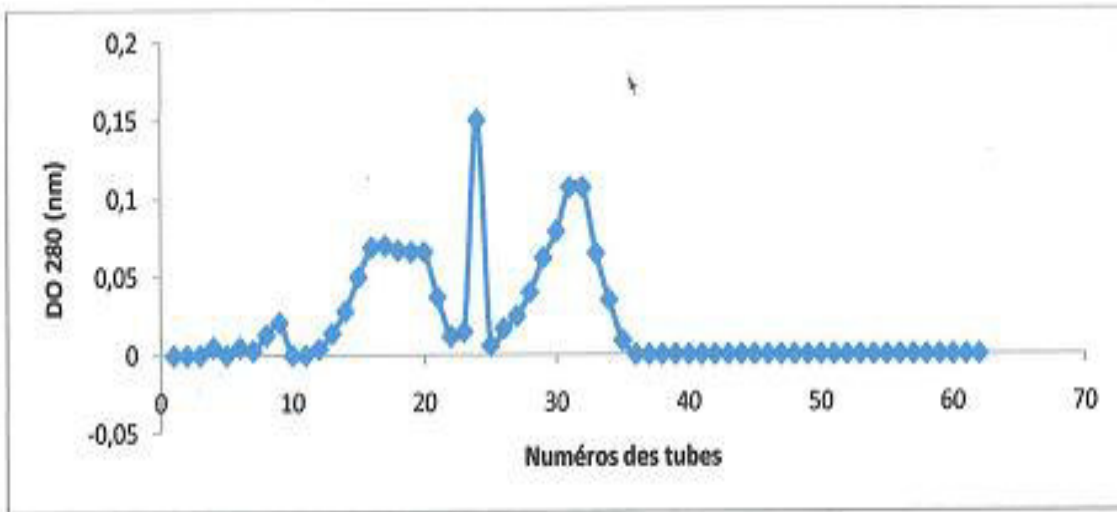


Figure. Profil des protéines standards: BSA, Ovalbumine, Trypsine, Carbonique anhydrase.

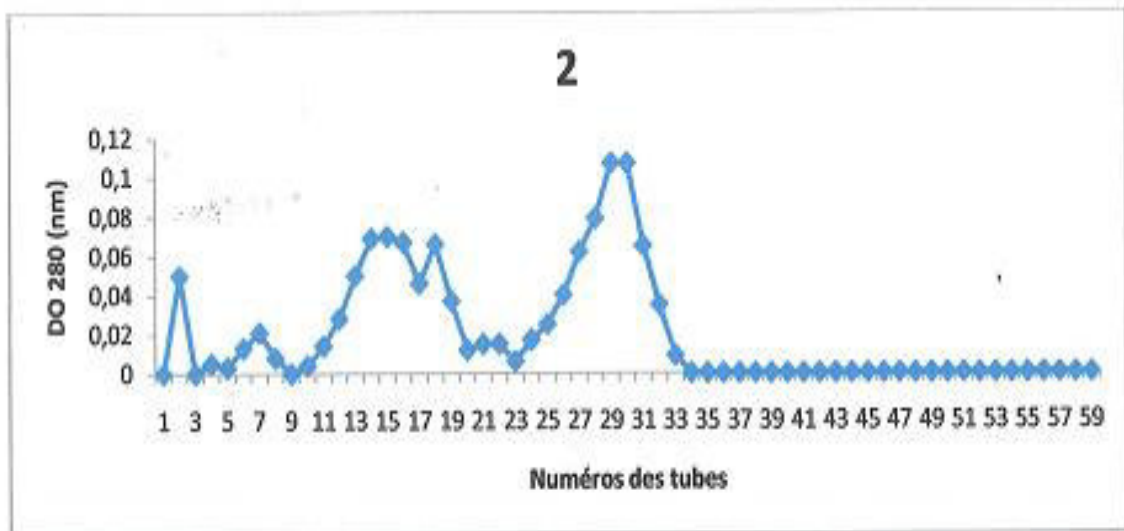


Figure. Profil des protéines standards: BSA, Ovalbumine.

Annexe H

Dosage des protéines (méthode de lowry ,1951) :

Solution étalon de protéine (sérum albumine) a 5g/l

solution de lowry A :

- Na₂CO₃ 1g
- Na OH (0.1mol/l) 50 ml

Solution de lowry B :

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

Réactif de lowry :

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

Solution D :

- réactif de folin –ciocalteau dilué au ½ avec l'eau distillé.

Gamme d'étalonnage :

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

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
L'eau distillé (ml)	10	8	6	4	2	0
BSA (ml)	0	2	4	6	8	10
Solution cuivrique (lowry A+B)	5 ml					
Agitation et attendre 10 min						
Folin – ciocalteu (dilue)	0.5 ml					
Agitation et laisser 30 min a l'obscurité						
Mesure l'absorbance a66nm						

Annexe I

Dozage de l'activité enzymatique par la méthode au DNSA :

Préparation des reactifs :

DNSA :

- 1 g de DNSA
- 20 ml de NaOH(2N)
- 50 ml d'eau distillée
- 30 g de tartrate double de sodium et de potassium
- Compléter a 100 ml avec l'eau distillée.

Solution substrat :

- 1 g pectine
- 100 ml de tampon acétate 0.1 M a PH 5,6

Courbe d'étalonnage :

- Préparation de la solution mère du glucose a 1g/l
 - 1 g du acide galacturonique dans 1 l d'eau distillée.
 - préparation les dilutions comme suivant.

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

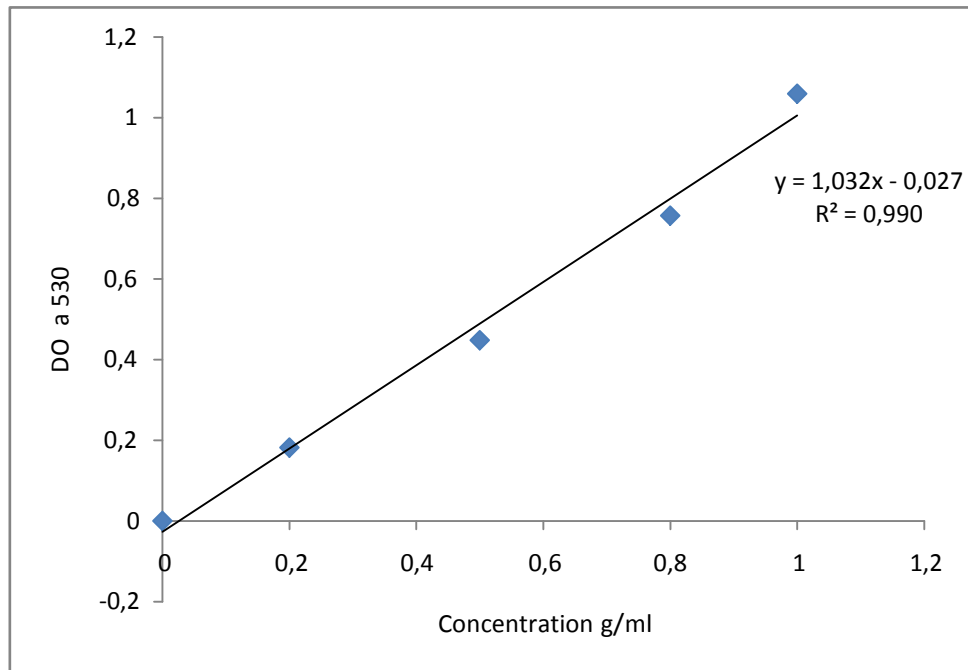


Fig : Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique