

N° Ordre.....FSI/UMBB/2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté des Sciences de l'Ingénieur

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

BENMALEK née HACHEMI Nabila

En Vue de l'obtention de diplôme de **DOCTORAT** en :

Filière : Génie des procédés

Option : Technologie Alimentaire

THEME :

**Obtention des préparas d'enzymes pectinolytiques à partir des moisissures :
application à l'extraction et à la clarification de jus de fruits.**

Devant le jury composé de :

M ^f Amar BENAKMOUM	MCA/A	UMBB	Président
Mme Karima YAHIAOUI	MCA/A	UMBB	Examinatrice
M ^f Malek AMIALI	Professeur	ENSA	Examinateur
M ^f Othmane BENCHABANE	MCA/A	ENSA	Examinateur
M ^f Abdelouahab NOUANI	Professeur	UMBB	Co-directeur thèse
M ^f Ahmed BENCHABANE	Professeur	ENSA	Directeur thèse

Année universitaire : 2018 /2019

Résumé

Les résidus d'agrumes et le son de blé ont été utilisés pour la production des enzymes pectinolytiques à faible coût en utilisant une nouvelle souche d'*Aspergillus niger*.

L'utilisation du procédé de la fermentation en milieu solide s'avère plus reproductible relativement à la fermentation submergée en utilisant les résidus d'oranges (RO) comme substrat, car ces derniers sont plus riches en carbohydrates et en pectine par rapport aux résidus de citron et au son de blé (5,9 %), (8,7%) respectivement. La cinétique de croissance du microorganisme a été analysée par microscopie à balayage électronique (MEB) et par détermination des activités enzymatiques en fonction du temps, l'activité enzymatique maximale a été obtenue après 5 jours de fermentation à 30°C. Les conditions optimales de production des pectinases par *Aspergillus niger* ont été déterminées en utilisant les RO séchés ayant une taille moyenne de particules de 0,5 µm, l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse nous a permis de prédire un milieu optimale constitué de 0,8% de glucose, 54% d'eau et 1,83% de sulfate d'ammonium, l'activité enzymatique optimale obtenue dans ces conditions est de 25,57 U/ml, après 5 jours de fermentation à une température de 30°. Les techniques de purification par fractionnement au sulfate d'ammonium, suivies par la chromatographie sur gel de filtration ont permis d'isoler une polygalacturonase d'un poids moléculaire de 63 kDa déterminé par SDS-Page. L'activité enzymatique optimale de la polygalacturonase se situe entre 30°C et 40°C et à un pH de 3,8. La constante de Michaelis (K_m) est de 0,33 mg/ml et la vitesse maximale V_{max} est de 26,66 U/ml en utilisant une pectine d'agrumes comme substrat.

L'application de la polygalacturonase pour la dépectinisation d'un jus de pomme a permis de réduire la turbidité dans le jus jusqu'à 89,53%, dans les conditions optimales contenant 1% de pectine, à une température de 40°C et pendant 120 min d'incubation.

Mots clés: Pectinases, Fermentation, Résidus, Dépectinisation

summary

Citrus residues and wheat bran products were used for the production of low pectinolytic enzymes using a new kind of *Aspergillus niger* strain.

The use of the solid-state fermentation process is more reproducible with respect to submerged fermentation using orange residues (RO) as a substrate, since the latter are rich in carbohydrates and pectin compared to the residues of lemon and wheat bran (5.9%), (8.7%), respectively. The microorganism kinetic growth was analyzed by electron scanning microscopy (ESM) and by the determination of the enzymatic activities as a function of time.

The maximal enzymatic activity was obtained after 5 days of fermentation at temperature of 30 ° C. The optimal conditions for the production of pectinases by *Aspergillus niger* were determined using dried RO with an average particle size of 0.5 µm. . The use of surface response methodology allowed us to predict the optimal medium condition which is consisting of 0.8% glucose, 54% water and 1.83% ammonium sulfate.. The optimal enzymatic activity obtained under these conditions is 25.57 U / ml, after 5 days of fermentation at a temperature of 30 °. The Ammonium sulfate fractionation purification followed by filtration gel chromatography, allow to polygalacturonase compound having a molecular weight of 63 kDa, which is determined by SDS-Page. The optimal enzymatic activity of the

polygalacturonas is between 30 ° C and 40 ° C temperature at pH of 3.8. The Michaelis constant (Km) is 0.33 mg / ml and the maximum speed (Vmax) is 26.66 U / ml using citrus pectin as substrate.

The application of polygalacturonase for apple juice depectinization reduced the turbidity in juice up to 89.53% under optimal conditions, containing 1% pectin, at 40 ° C temperature during incubation of 120 min duration.

Key words: Pectinases, Fermentation, Residues, Depectinization

ملخص

استخدمت بقايا الحمضيات ونخالة القمح في إنتاج إنزيمات منخفضة البكتين للإنزيمات باستخدام سلالة جديدة من فطر الرشاشيات النيجر *Aspergillus niger*. استخدام عملية التخمير في الحالة الصلبة أكثر استنتاجاً فيما يتعلق بالتخمير المغمور باستخدام المخلفات البرتقالية (RO) كركيزة ، لأن هذه الأخيرة أكثر ثراءً في الكربوهيدرات والبكتين مقارنة ببقايا نخالة الليمون والقمح (5.9٪) ، (8.7٪) على التوالي. تم تحليل حركية نمو الكائنات الحية الدقيقة من خلال الفحص المجهرى لمسح الإلكترون (SEM) وبتحديد الأنشطة الأنزيمية كدالة للوقت ، تم الحصول على النشاط الأنزيمي الأقصى بعد 5 أيام من التخمير عند 30 درجة مئوية. تم تحديد الظروف المثلى لإنتاج البكتينيزات بواسطة *Aspergillus niger* باستخدام RO المجفف بمتوسط حجم جسيم قدره 0.5 ميكرون ، مما أتاح لنا استخدام منهجية سطح الاستجابة للتنبؤ بوسط مثالي. يتكون من 0.8٪ من الجلوكوز ، 54٪ من الماء و 1.83٪ من كبريتات الأمونيوم ، والنشاط الأنزيمي الأمثل الذي تم الحصول عليه في ظل هذه الظروف هو 25.57 U / ml ، بعد 5 أيام من التخمير عند درجة حرارة 30 درجة مئوية. تقنيات تنقية تجزئة كبريتات الأمونيوم ، تليها كروماتوجرافيا هلام الترشيح ، polygalacturonase معزولة مع وزن جزيئي قدره 63 كيلو دالتون تحدها SDS- الصفحة. يتراوح النشاط الأنزيمي الأمثل لـ polygalacturonas بين 30 درجة مئوية و 40 درجة مئوية وعند درجة الحموضة 3.8. ثابت Michaelis (كم) هو 0.33 ملغ / مل والحد الأقصى للسرعة Vmax 26.66 U / ml باستخدام البكتين الحمضية كركيزة.

أدى تطبيق polygalacturonase لإفراز عصير التفاح إلى تقليل التعكر في العصير إلى 89.53٪ في ظل الظروف المثالية التي تحتوي على 1٪ البكتين عند درجة حرارة 40 درجة مئوية. خلال 120 دقيقة من الحضارة.

الكلمات المفتاحية: البكتيناز ، التخمير ، البقايا ، إزالة البكتين

Remerciements

Je remercie très chaleureusement mes directeurs de thèse Monsieur Ahmed Benchabane et Abdelouahab Nouani qui m'ont soutenue encouragée et épaulée durant la période de ce travail. Ce fut un énorme plaisir de travailler et d'échanger avec eux pendant la période du travail, je remercie monsieur A. Nouani de m'avoir orientée envers monsieur A. Benchabane qui m'a transmis généreusement son expérience et m'a fait bénéficiée de ces précieuses connaissances et ces travaux sur les substances pectiques, les enzymes pectinolytiques ou encore les résidus du jus d'orange . Merci à vous d'eux.

Toute ma gratitude à monsieur A. Nouani qui a insisté à publier l'article de cette thèse, je le remercie également pour sa disponibilité, et de m'avoir bénéficiée de ces connaissances sur la purification des enzymes et de m'avoir aidé à réaliser cette partie de travail en mettant à ma disposition le matériel nécessaire.

Je remercie également et chaleureusement monsieur Amar Benakmoum de bien accepter la présidence de ce jury. Egalement je remercie madame Karima Yahiaoui, Othmane Benchabane et Malek Amiali qui ont accepté de faire parti de ce jury et de lire ce manuscrit. J'ai apprécié leur amabilité, leurs questions enrichissantes et les nouvelles pistes de réflexion qu'ils m'ont proposée.

Je remercie toutes les personnes qui nous ont collaborés en particulier les enseignants de technologie alimentaire, leurs discussion fut toujours intéressante; en particulier je cite monsieurs Abdelkader Benchamma.

Mes remerciements vont à tout les étudiants masters et magisters qui ont travaillé avec ambition et sans trêve sur cette thématique.

Je remercie également tout les techniciens de laboratoire de l'université de M'hamed Bougara pour leurs patience et disponibilité durant la réalisation de ce travail, je cite en particulier les technicien de laboratoire du département de génie des procédés et de LRTA en particulier Mlle Karima Hidous. Sans oublier Mlle Samia Mezali de la FS qui nous a réalisé les expériences de spectrophotometrie IR, sans oublier également tout les techniciens de l'unité recherche de génie matériaux et le personnel du corps administratif et de la bibliothèque de la FSI qui nous ont accompagnés pendant les procédures de la soutenances.

Enfin je remercie tout mes amis et ma famille en particulier ma mère et mon père qui m'ont aussi longtemps éclairé le chemin de mon parcours, et je remercie mon mari qui m'a aussi longtemps soutenue et encouragée.

Liste des communications:

- 1) Communication orale internationale: Bioconversion of orange waste for pectinases production using *Aspergillus niger* under solid state fermentation (2015): 17th conference of world academy of science engineering and technology WASET, Turquie .
- 2) Communication orale nationale (2015): Production d'une polygalacturonase par bioconversion des résidus d'oranges. 1er séminaire nationale de l'environnement et la sécurité alimentaire, Biosec. Université de Boumerdes, Algérie.
- 3) Communication nationale par affiche (2016): Utilisation des moisissures pour la production des enzymes pectinolytiques par fermentation sur milieu solide. 2 èmes journées de biologie des systèmes microbiens. Ecole nationale de l'enseignement supérieure. Kouba, Algérie
- 4) Communication nationale par affiche (2018): Immobilisation des enzymes pectinolytiques par les alginates de sodium extraits des algues brunes (*Cystoseira caespitosa*) de la région côtière de Cap Djenet. 1ère école d'hiver de l'analyse de cycle de vie. Université de Boumerdes, Algérie
- 5) Communication nationale par affiche (2019): Immobilisation des enzymes pectinolytiques par les alginates de sodium extraits des algues brunes (*Cystoseira caespitosa*) de la plage de Cap Djenet en Algérie. Séminaire nationale sur la sécurité alimentaire et développement durable. Université de Babelzouar, Algérie.
- 6) Communication internationale par affiche (2019): Valorisation des résidus du jus d'oranges pour la production des pectinases par les moisissures. International congrès valorization of bioressources: application and impact on sustainable development. Université de Boumerdes, Algérie.
- 7) Participation aux journées internationales de bioinformatique.(JIBioinfo2019) . Université de Boumerdes , Algérie.
- 8) Communication par affiche (2020): Utilisation des moisissures pour la production des enzymes pectinolytiques par fermentation sur milieu solide. 1ère conférence virtuelle (webinaire). Université de Boumerdes, Algérie.

Liste des publications:

- 1) Publication Internationale (Sep, 2015): Bioconversion of orange waste for pectinases production using *Aspergillus niger* under solid state fermentation. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Bioengineering and Life Sciences. Vol:9, No:9, pp, 1004-1009.
- 2) Publication internationale (Mai, 2019): Statistical optimization of culture condition for endopolygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid orange waste. Research Journal of Biotechnology. Vol: 14, pp, 55-66.
- 3) Publication internationale : Valorization of brown algae (*Cystoseira caspitosa*) from local region in Algeria for sodium alginate extraction and their application in the immobilization of microbial pectinase. Algerian journal of environmatal science and technology (ALJEST), Vol: 5 n°4, pp 1155-1163.

Liste des Figures

Figure 1. Aperçu de la problématique: production microbienne des enzymes pectolytiques et leurs applications pour la clarification des jus de fruits	7
Figure 2. Schéma d'un grain de blé (Surjet 2015)	11
Figure 3. Coupe transversale d'une orange.....	15
Figure 4. Diagramme suivi pour l'obtention de l'extrait enzymatique brut (EEB)	17
Figure 5. Son de blé	18
Figure 6. Les résidus d'agrumes : (a) résidus de citron; (b) résidus d'oranges	18
Figure 7. <i>Aspergillus niger sp.</i> conservé sur milieu sabouraud en tube incliné	23
Figure 8. Description de la cellule de Mallassez.	24
Figure 9. Culture d' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu PDA	33
Figure 10. Vue microscopique à balayage électronique de l' <i>Aspergillus niger</i> cultivé sur milieu PDA en boîte de pétri (photos 1,2,3,4 et 5)	36
Figure 11. Dénombrement des spores sur cellule de Mallassez (photo originale)	36
Figure 12. Les milieux de culture après 5 jours de fermentation; RO: résidus d'oranges; RS: résidus de son; RC: résidus de citron.	37
Figure 13. Croissance mycélienne sur le matériel végétal en fermentation submergée; RO: résidus d'oranges; RC: résidus de citron et SB: son de blé.	39
Figure 14. Aspect des extraits enzymatiques (EEB)	40
Figure 15. Activité de l'endoPG en fonction des résidus dans la FMS et FMSb.....	42
Figure 16. Activité de l'exoPG en fonction des résidus dans la FMS et la FMSb.	43
Figure 17. Activité de la PME en fonction des résidus dans les deux modes de fermentation FMS et FMSb.....	43
Figure 18. Activité de la PL en fonction des résidus dans la FMS et la FMSb	43
Figure 19. Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide d'après Rahardjo et al. (2006):.....	50
Figure 20. Les différents compartiments de l'hyphe et leur constitution à son développement fonctionnel d'après Cooke and Whipps (1993).	51
Figure 21. Chemin vers l'optimum:.....	61
Figure 22. Démarche pour la construction d'un plan composite centré:.....	61
Figure 23. Exemple d'un plan rotatable à deux facteurs.....	62
Figure 24. Remise à l'échelle du plan composite centré.....	62
Figure 25. Domaine expérimental d'un plan à 4 facteurs: les points aux sommets représentent les expériences.	66
Figure 26. Les différentes fractions des résidus d'oranges tamisés; (a): 200µm; (b): 500 µm et (c): 800 µm.	68
Figure 27. Observation au microscope à balayage électronique des granules de la poudre d'orange séchée	68
Figure 28. Images microscopique des tamis de la poudre des résidus d'orange à différentes granulométries (200, 500, et 800 µm).....	70
Figure 29. Droite normale de Henry	74
Figure 30. Diagramme de Pareto.....	74
Figure 31. Tracé des valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour le modèle linéaire ajusté.....	76
Figure 32. Graphe des résidus	77
Figure 33. Diagramme de Pareto pour le modèle ajusté	78
Figure 34. Droite de Henry pour le modèle ajusté	78
Figure 35. Diagramme des effets principaux (moyenne des données) pour l'activité enzymatique.....	78
Figure 36. Diagramme d'interaction (moyenne des données) pour l'activité enzymatique	79
Figure 37. Les valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour le modèle quadratique.....	81
Figure 38. Graphe des résidus	82
Figure 39. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en eau et de la teneur en sulfate d'ammonium.....	84
Figure 40. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en sulfate d'ammonium et du glucose.....	85
Figure 41. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en eau et de la teneur en glucose.	86
Figure 42. Diagramme d'optimisation	88
Figure 43. Observation macroscopique du milieu de culture avant et après la période d'incubation	89
Figure 44. Cinétique de la croissance du microorganisme, suivie par microscopie à balayage électronique(photos: 1,2,3,4,5,6,7,9,10 et 11	95
Figure 45. (a): <i>Micrographie d'Aspergillus niger C28B25 en croissance dans une mousse de polyuréthane dans des conditions de fermentation à l'état solide après 6 heure de culture (100X). Micrographie de J. S. Romero-Gómez (résultats non publiés); (b): Schéma des flux isotropes d'oxygène et de substrat pour un granule d'Aspergillus niger, cultivé dans un flacon à shake. Micrographie de J. S. Romero-Gómez (résultats non publiés) (Viniégra-González and Favela-Torres 2006)</i>	96
Figure 46. Schéma de la croissance mycélienne selon Holker et Lenz (2005).	97
Figure 47. Suivi du pH en fonction du temps de fermentation.....	99

Figure 48. Suivi des protéines solubles en fonction du temps de fermentation.....	99
Figure 49. Activité endoPG en fonction du temps	101
Figure 50. Activité exoPG en fonction du temps	101
Figure 51. Activités de PL et PME en fonction du temps	102
Figure 52. Dialyse de l'extrait enzymatique brut.....	114
Figure 53. Principe de la chromatographie de gel de filtration	115
Figure 54. Principe de la chromatographie d'échange d'ions	117
Figure 55. Dénaturation des protéines par le SDS	119
Figure 56. Fractionnement des enzymes par le sulfate d'ammonium.....	123
Figure 57. Profil d'éluion sur l'échangeuse d'anion DEAE Séphadex A 25 d'EEPP (colonne QTY 1,5 x30 cm), tampon d'éluion acétate de sodium (0,1 M; pH 4,2), débit 1,2 ml/min, fraction de 3 ml).....	125
Figure 58. Profil d'éluion sur l'échangeuse de cations CM A 25 d'EEPP. (Colonne QTY10, 1,5x30 cm), tampon d'éluion acétate (0,1 M, pH 4,2), débit d'éluion: 1,2/min, fractions: 3ml.....	126
Figure 59. Profil d'éluion sur gel Séphadex G75 de la polygalacturonase. (Colonne QTY 10, 1,5x30 cm), tampon d'éluion acétate (0,1 M, pH 4,2), débit: 0,5 ml/min, fractions: 3ml	128
Figure 60. Profil d'éluion sur gel de filtration Séphadex G 75 des protéines standards (colonne QTY 10, 1,5x30 cm) , tampon acétate (0,1 M, pH 4,2), débit d'éluion (0,5ml/min), fractions de 2 ml;.....	131
Figure 61. Courbe d'étalonnage des protéines standards: (BSA, ovalbumine et trypsine)	132
Figure 62. Electrophorèse SDS-Page des fractions purifiées par gel de filtration	132
Figure 63. Courbe d'étalonnage des protéines standards (SDS-Page).....	133
Figure 64. Influence de la température sur les activités de l'endopolygalacturonase	136
Figure 65. Stabilité thermique de l'endoxygalacturonase.....	136
Figure 66. Influence du pH sur les activités de l'endopolygalacturonase.....	137
Figure 67. Influence des sels minéraux sur l'activité de l'endoPG	138
Figure 68. Vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.....	140
Figure 69. Représentation de Linweaver-Burk de l'inverse de l'activité enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en substrat.....	140
Figure 70. Maquette d'une partie de la paroi cellulaire végétale. <i>Les couches disposées orthogonalement de microfibrilles de cellulose (vertes) et de CLG [ici du xyloglucane (XG) et du glucuronoarabinoxylane (GAX)] forment un réseau, qui est noyé dans une matrice pectique contenant de l'homogalacturonane (HG), du rhamnogalacturonane I (RG-I) et du rhamnogalacturonane II (RG-II). La lamelle moyenne est riche en pectine et cimente les cellules adjacentes. (Somerville, et al. 2004)</i>	149
Figure 71. Substitution de l'acide galacturonique (Tilly 2014).	150
Figure 72. Interaction par insertion des ions Ca ²⁺ entre les groupes carboxyles non estérifiés des résidus galacturonosyle de deux chaînes HG (Pedrolli and Carmona 2009).....	150
Figure 73. Structure et définition de la pectine (Tilly 2014).....	151
Figure 74. Les éléments qui constituent une molécule de pectine (Voragen, et al. 2009)	152
Figure 75. Les modèles traditionnels du complexe de pectine:.....	153
Figure 76. Modèles non traditionnels complexes à base de pectine:.....	154
Figure 77. Structure primaire d'un homogalacturonane (Ridley, et al. 2001).....	155
Figure 78. (a): Squelette pectique qui montre le segment RG en zigzag; (b): Une proposition de structure pour le rhamnogalacturonane. les résidus de sucre dans la figure sont désignés comme R= rhamnose et U = galacturonique. N nombre indéterminé, probablement entre 4 et 10. (Yapo 2011).	156
Figure 79. Mécanisme d'inversion et de rétention de configuration obtenus lors de l'hydrolyse de polysaccharides par G-H (Pétera 2016)	159
Figure 80. Mode d'action du glucoside hydrolase (Pétera, 2017)	160
Figure 81. Enzyme pectinolytique en complexe avec PGA (Scavetta, et al. 1999).	161
Figure 82. Représentation schématique de la pectate lyase de la famille PL 1, quatre ions calcium sont chélatés dans le site actif et participent à la fixation du substrat (selon Scavetta, et al. (1999).	161
Figure 83. Endopolygalacturonase:.....	162
Figure 84. Mode d'action des enzymes pectolytiques	163
Figure 85. Classification des pectinases basée sur leurs réactions avec les différentes substances pectiques (Sakai, et al. 1993).	169
Figure 86. Mécanisme de dégradation enzymatique d'un trouble pectique.....	172
Figure 87. Illustration des différentes étapes du traitement enzymatique du jus de fruit	173
Figure 88. Déstabilisation du jus trouble	177
Figure 89. a): Coupe longitudinale et transversale d'une pomme; b) Section radiale du cortex de pomme	180
Figure 90. Extraction des substances pectiques	182
Figure 91. Utilisation des enzymes dégradant les polysaccharides dans la transformation des pommes. Procédé industriel (Larreta –Garde 1997).....	188

Figure 92. Procédé adopté pour la préparation du jus de pomme au laboratoire	189
Figure 93. Aspect e la pectine après extraction.....	193
Figure 94. Compariason entre le spectre infrarouge de la pectine obtenue et de la pectine commerciale (DE=70%.)	195
Figure 95. La viscosité réduite en fonction de la concentration en pectine.....	196
Figure 96. La contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement d'une pectine à 0,1 % dans une solution de NaCl et d'EDTA	198
Figure 97. Variation de la viscosité apparante en fonction du taux de cisaillement d'une pectine 0,1 % dans une solution de NaCl et d'EDTA	198
Figure 98. Profil d'élution de la pectine par chromatographie d'échange d'ions DEAE-Cellulose. Colonne QTY10 (1,5x15 cm), tampon d'élution acétate de sodium (0,1 M, pH4,2), débit: 1,2 ml/min, fraction: 3 ml	199
Figure 99. Chromatographie de filtration sur séphadex G100 de la pectine avant et après hydrolyse. (Colonne QTY10 1,5x30 cm), tampon acétate (0,1 M, pH 4,2) , débit 1,2 ml/min fraction: 3ml.....	202
Figure 100. Aspect visuel du jus brut obtenu par macération enzymatique des pommes en comparaison avec un jus témoin; (a): sans macération; (b) macération par l'EEB; macération par l'enzyme commerciale (EC).	202
Figure 101. Rendement en jus de pomme, a:jus de pomme témoin; b: jus de pommes traitées par l'EEB; c: jus traité de pommes traitées par EC.....	203
Figure 102. Aspect visuel du jus brut dépectinisé par l'EC (c), l'EEB (b) et l'EdoPG (d).....	203
Figure 104. Linéarité entre les valeurs observées et les valeurs prédites de la turbidité	207
Figure 103. Diagramme de Pareto.....	207
Figure 105. Diagramme des effets principaux pour la turbidité.....	208
Figure 106. Influence du volume de l'enzyme et de la température sur a turbidité du jus	209
Figure 107. Influence du temps et de la température sur la turbidité du jus.....	209
Figure 108. Influence du temps et du volume de l'enzyme sur la turbidité du jus.	209
Figure 109. Optimisation des conditions d'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme.....	211
Figure 110: Appareil de MALDI TOF MS	253
Figure 111: Spectre d'identification du microorganisme par MALDI -TOF -MS.....	255
Figure 112: Score d'identification de la souche.....	255
Figure 113. Courbe d'étalonnage du glucose (dosage des sucres réducteurs et totaux)	256
Figure 114. Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique (Dosage des substances pectiques dans les residus) .	256
Figure 115. Courbe d'étalonnage de la BSA (dosage des protéines solubles).....	257
Figure 116. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique (dosage de l'exoPG)	257
Figure 117. Courbe d'étalonnage de l'acide galaturonique (Dosage des substances pectiques dans les pommes	257
Figure 118. Courbe d'étalonnage d'arabinose.....	258
Figure 119. Réduction de la viscosité spécifique du mélange réactionnel en fonction du temps d'incubation	259
Figure 120. L'inverse de la viscosité en fonction du temps (FMS)	259
Figure 121. Réduction de la viscosité spécifique dans le milieu réactionnel en fonction du temps (FMSb)	260
Figure 122. L'inverse de la viscosité en fonction du temps (FMSb)	260
Figure 123. Etapes de purification par chromatographie sur gel de filtration	264
Figure 124. Dispositif employé dans le procédé de purification de l'EEPP par chromatographie sur colonne...	265
Figure 125. Principe de l'électrophorèse SDS-Page	265
Figure 126. Déroulement de l'électrophorèse SDS-Page	265

Liste des tableaux

Tableau 1. Valeurs nutritionnelles des résidus agroindustriels les plus abondants.....	9
Tableau 2. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases	10
Tableau 3. Principaux pays producteurs d'agrumes en mille tonnes (FAO 2005, 2013).....	14
Tableau 4. Bioprocédé pour la production des pectinases en utilisant les résidus d'agrumes comme substrat	16
Tableau 5. Composition biochimique des résidus agroindustriels	29
Tableau 6. Valeurs des activités enzymatiques dans les EEB	40
Tableau 7. Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide(Couto and Sanromán 2006; Holker and Lenz 2005; Raimbault 1998).....	49
Tableau 8. Matrice de planification des expériences du plan factoriel.....	65
Tableau 9. Table des variables et leurs niveaux de variation.	66
Tableau 10. Caractéristiques biochimiques des résidus d'oranges	67
Tableau 11. Les activités enzymatiques pour chaque essai du plan factoriel complet.....	71
Tableau 12. Estimation des effets et des coefficients pour l'activité enzymatique en unités codées.....	72
Tableau 13. Analyse de la variance de l'activité endoPG.....	73

Tableau 14. Estimation des effets et des coefficients pour l'activité enzymatique en unités codées pour le modèle ajusté	75
Tableau 15. Analyse de la variance pour 'activité en unités codées	75
Tableau 16. Analyse de la variance pour l'activité endoPG	81
Tableau 17. Différentes stratégies appliquées à la purification des pectinases produites par les <i>Aspergillus sp.</i>	112
Tableau 18. Diamètre et intervalles de fractionnement en poids moléculaire de Séphadex G75	115
Tableau 19. Durée minimum de gonflement du Séphadex G75.....	116
Tableau 20. Tableau de purification par 80 % de sulfate d'ammonium	123
Tableau 21. Tableau de purification par DEAE séphadex A 25(relativement à l'EEPP)	125
Tableau 22. Tableau de purification par CM séphadex A 25 (relativement à l'EEPP).....	126
Tableau 23. Tableau de purification sur gel Séphadex (relativement à l'EEPP)	129
Tableau 24. Tableau de purification global par gel de filtration	130
Tableau 25. Poids moléculaires des protéines standards et des enzymes purifiées	131
Tableau 26. Rapports frontaux des protéines standards dans le gel de polyacrylamide.....	133
Tableau 27. Poids moléculaires en kDa des extraits enzymatiques purifiés déterminés par SDS-PADE	134
Tableau 28. Caractéristiques de quelques endopolysaccharidases purifiées	142
Tableau 29. Liste des sociétés produisant des pectinases commerciales (données modifiées de Kashyap, et al. (2001).....	170
Tableau 30. Niveaux de variation des facteurs d'optimisation de la clarification du jus.....	190
Tableau 31. Teneurs en acide galacturonique dans les différentes fractions de pectine.....	191
Tableau 32. Caractéristiques de la pectine extraite	193
Tableau 33. Valeurs des viscosités réduites (η_{red}) et des viscosités spécifiques (η_{sp}) en fonction des concentrations en pectine	196
Tableau 34. Suivi des paramètres de productivité de l'hydrolyse enzymatique de la pectine	201
Tableau 35. Résultats comparatifs des analyses physicochimiques du jus de pomme obtenu avant et après traitement enzymatique	204
Tableau 36. Analyse de la variance.....	205
Tableau 37. Résultats de planification des expériences	206
Tableau 38. Classification extensive des pectinases (Jayani et al., 2005)	266

Abréviations et nomenclature

<p>$\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement (s^{-1}) $[\eta]$: Viscosité intrinsèque (dl/g) [S]: Substrat °C: Degrés celcius μ: Viscosité spécifique μ_{max}: Taux de croissance maximal A.niger: <i>Aspergillus niger</i> Act: Activité Activ spec: Activité spécifique AGal: Acide galacturonique Araf: Arabinofuranose Arg: Arginine a_w: Activité de l'eau BSA: Bovine albumine sérum C: Concentration Cd: Cendres Ce: Concentration en enzyme CM: Carboxyméthyl. C_{UG}: Concentration en groupements uroniques Cv: Taux de conversion D: Désirabilité composite d: Désirabilité individuelle DI: Dilution Da: Dalton. DE: degrés d'estérification.</p>	<p>FT-IR: Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de fourier Galp: galactopyranose GAX: Gluconoarabinoxylane GRAS: Généralement regardé comme sûr HG: Homogalacturonane HR: Humidité relative (%) i: Valeur prédite de la première réponse K: Nombre de facteurs Kc: Indice de constance K_H: Coefficient de Huggin K_L: Coefficient de transfert K_m: Constante de Michaelis-Menten (mg/ml) Li: Valeur acceptable la plus basse de la ième réponse m: Masse MaldiTOFMS: Assistant Laser Désorption Ionization, Time of Flight, masse spectrophotométrie. MIA: Matériel insoluble à l'éthanol MS: Matière sèche (%) MSR: Méthodologie de surface de réponse M_v: Masse moléculaire viscosimétrique (Da) n: Indice de comportement N_0 Nombre des essais au centre</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>DEAE: Diéthylaminoéthyle. DF degrés de liberté DM: Degrés de méthylation DNSA: Acide dinitrosalicylique DO: Densité optique DP: degrés de polymérisation EC: Enzyme commerciale EDTA: Ethylendiamine tétraacétique EEB: Extrait enzymatique brut EEPP: Extrait enzymatique prépurifié Endo-PG: Endopolygalacturonase EP: Rxttrait enzymatique purifié EPESS: Erreur de prédiction des sommes des carrés ES: Erreur standard ExoPG: Exopolygalacturonase FAE: Feruloyl estérase FAO: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture FML: Fermentation en milieu liquide FMS: Fermentation en milieu solide FMSb: Fermentation en milieu submergé Frucp: Furanopyranose FS: Fermentation solide FSm: Fermentation submergée RGI: Rhamnogalaturonane I RGII: Rhamnogalacturonane II Ri: Désirabilité pondérale pour la ième réponse RMN: Résonance magnétique nucléaire RO: Résidus d'oranges RRH: Rhamnogalacturone-rhamnogalacturohydrate RS: Résidus de son de blé SDS-Page: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophoresis. SmF submerged fermentation Sp.: espèces (species) SSE: Somme des carrés des erreurs SSF: solid state fermentation t: Temps TBA: Acide thiobarbiturique TEMED: Diméthylaminoéthane Ti: Valeur cible de la ième réponse Tr: Temps de réaction UF: unité factorielle UI: Unité internationale Ui: Valeur acceptable la plus élevée de la ième réponse</p>	<p>η_{appa}: Viscosité apparente (Pa.s) N_f: Nombre d'essais N_t: Teneur en azote total (%) N_a: Nombre des essais étoilés η_{red}: Viscosité réduite (dl/g) p: Pression partielle de vapeur d'eau P: Prise d'essai PDA: Potato dextrose Agar PE: Pectine estérase PEL: pectine lyase PG: Polygalacturonase PI: Point isoélectrique PL: pectine lyase. PLY: Pectate lyase PM: Poids moléculaire PME: Pectine méthylestérase P_{PD}: Productivité pectolytique dépolymérisante PRESS: Erreur de prédiction des sommes des carrés des résidus PSA: Persulfate d'ammonium PSE: Pectine soluble à l'eau PSHCL: Pectine soluble dans l'acide chlorhydrique PSO: Pctine soluble à l'oxalate Pu: Productibilité endopectolytique Qsp: Quantité suffisante pour R: Rhamnose R^2: Coefficient de regression RC: Rsidus de citron RF: Réduction de fluidité UN: Unite néphélométrique UV: Ultraviolet V: Volume V_{max}: Vitesse maxilae de réaction V_p: Volume des petits carrés W_i: Importance de ième réponse X: Concentration cellulaire x: Variable codée XG: Xyloglucane XGA: Xylogalacturonane X_{max}: Valeur maximale X_{min}: Valeur minimale Y: fonction Y_i: Valeur observée \hat{Y}_i: Vlaeur prédite B: Coefficients de l'équation de regression ϵ_i: Valeur résiduelle τ: Contrainte de cisaillement (Pa)</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Liste des communications

Liste des publications

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations et nomenclature

Introduction..... 1

CHAPITRE I:

Utilisation des Résidus Agroindustriels pour la Production des Pectinases. Cas des Résidus d'Agrumes et du Son de Blé

1	Travaux antérieurs.....	8
1.1	Utilisation du son de blé pour la production des pectinases.....	11
2	Utilisation des résidus d'agrumes pour la production des pectinases.....	12
3	Matériel et méthodes.....	17
3.1	Préparation du matériel et végétal.....	17
3.2	Analyses physicochimiques du matériel végétal.....	18
3.2.1	Détermination de la matière sèche.....	18
3.2.2	Détermination des cendres.....	19
3.2.3	Dosage des minéraux:.....	19
3.2.4	Détermination de l'azote total.....	19
3.2.5	Dosage et fractionnement des substances pectiques :.....	20
3.2.6	Dosage des sucres totaux et réducteurs:.....	21
3.2.7	Détermination du pH.....	22
3.3	Préparation du matériel microbiologique.....	23
3.3.1	Revivification de la souche:.....	23
3.3.2	Analyse du microorganisme par Matrix Assisted Laser Desorption ionization Time of flight (MALDI TOF MS).....	23
3.3.3	Préparation de la solution des spores.....	24
3.3.4	Préparation des milieux de fermentation :.....	24
3.3.5	Inoculation des milieux de fermentation :.....	25
3.3.6	Extraction des enzymes pectinolytiques :.....	25
3.4	Analyses physicochimiques des extraits enzymatiques brut.....	25
3.4.1	Détermination du pH:.....	25
3.4.2	Détermination des protéines solubles (Lowry, et al. 1951).....	25

3.4.3	Dosage de l'activité endopolygalacturonasique	26
3.4.4	Dosage de l'activité de l'exopolygalacturonase	27
3.4.5	Dosage de l'activité de la pectinéméthylestérase (PME):	27
3.4.6	Dosage de l'activité de la pectinolyase (PL):	28
4	Résultats et discussion.....	29
4.1	Caractérisation du matériel végétal.	29
4.2	Aspect du microorganisme après germination:	33
4.3	Croissance du microorganisme sur le matériel végétal.	37
4.4	Evolution de la biomasse (microorganisme) dans les milieux de fermentation submergée.	38
4.5	Caractérisation des extraits enzymatiques bruts.	39
4.6	Comparaison entre la synthèse des enzymes pectinolytiques dans le son de blé, résidus d'oranges et résidus de citron.....	41
4.7	Comparaison entre la production d'enzymes par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu submergé.	46
5	Conclusion.....	46

Chapitre II

Optimisation de Production des Pectinases par Fermentation en Milieu Solide en Utilisant les Résidus d'Oranges Séchés

6	Travaux antérieurs.....	49
6.1	Les paramètres influençant la production des pectinases en fermentation sur milieu solide.	51
6.1.1	Le substrat solide.....	51
6.1.2	La température du milieu.....	52
6.1.3	Le pH initial du milieu de fermentation	53
6.1.4	Influence de l'aération et de l'oxygène.....	54
6.1.5	Effet de la vitesse d'agitation	54
6.1.6	Influence de la teneur en humidité et activité de l'eau.....	55
6.1.7	Influence de la taille des particules.....	57
6.2	Optimisation de la production des pectinases en FMS.....	58
6.3	Méthode surface de réponse (MSR)	60
6.3.1	Détermination des variables indépendantes et leurs niveaux	60
6.3.2	Sélection du design expérimental, prédiction et vérification du modèle de l'équation..	62
7	Matériel et méthodes	64
7.1	Préparation des résidus d'oranges séchés.	64
7.2	Analyse granulométriques des résidus d'oranges séchées	64
7.3	Optimisation de production des pectinases dans les résidus d'oranges séchés par fermentation en milieu solide.	65

7.3.1	Utilisation du plan factoriel	65
7.3.2	Utilisation du plan composite centré.	66
7.4	Suivi de la fermentation dans les conditions optimales.....	67
8	Résultats et discussion.....	67
8.1	Caractérisation physique des broyats des résidus d'oranges.....	68
8.2	Analyse morphologique du substrat en utilisant la microscopie à balayage électronique.....	68
8.3	Analyse du plan factoriel.....	71
8.3.1	Criblage des coefficients influençant la production d'enzyme pectinolytique.	72
8.4	Optimisation de la production de l'endopolygalacturonase par le composite centré.....	80
8.5	Suivi de la fermentation en milieu solide dans les conditions optimales	89
8.5.1	Cinétique de croissance mycélienne dans le milieu de culture optimum.	89
8.5.2	Cinétique de la production des enzymes pectinolytique.....	98
9	Conclusion.....	103

Chapitre III

Purification et Caractérisation des Pectinases.

10	Travaux antérieurs.....	105
11	Matériel et méthodes.	113
11.1	Purification des enzymes pectinolytiques de l'EEB	113
11.1.1	Purification partielle de l'extrait enzymatique brut (EEB) par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.....	113
11.1.2	Dialyse:.....	113
11.1.3	Purification par chromatographie de gel de filtration séphadex (G75) de l'extrait enzymatique pré purifié (EEPP).....	114
11.1.4	Chromatographie d'échange d'ions de l'extrait enzymatique pré purifié (EEPP).	117
11.1.5	Purification par chromatographie sur DEAE-séphadex : (échange anions)	117
11.1.6	Purification par séphadex CMA25 (échangeur de cations)	118
11.1.7	Détermination du poids moléculaire des enzymes purifiées.	118
11.1.8	Electrophorèse SDS-PAGE des fractions actives.....	119
11.1.9	Caractérisation chimique des la fractions purifiées	122
12	Résultats et discussion.....	122
12.1	Purification partielle du complexe enzymatique par le sulfate d'ammonium.....	122
12.2	Purification du complexe enzymatique par chromatographie échangeuse d'ions	124
12.2.1	Purification par échangeuse d'anions DEAE Séphadex A25	124
12.2.2	Purification de l'EEPP par échangeuse de cations CMA25	126
12.3	Purification du complexe enzymatique par chromatographie de gel de filtration Séphadex G 75.....	127

12.4	Détermination du poids moléculaire des polygalacturonases purifiées par gel filtration Séphadex G 75.....	130
	Analyse des fractions issues du Séphadex G75 par électrophorèse SDS-PAGE	132
12.5	Caractérisation partielle de l'endopolygalacturonase purifiée.....	135
12.5.1	Etude de l'influence de la température sur l'activité de l'endopolygalacturonase et la stabilité de l'enzyme.	135
12.5.2	Influence du PH sur la stabilité de l'endopolygalacturonase	137
12.5.3	Influence des sels minéraux sur l'activité de l'endopolygalacturonase	138
12.5.4	Influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique de la polygalacturonase.....	140
13	Conclusion.....	143

Chapitre IV

Application de la Polygalacturonase à l'Hydrolyse du Trouble dans le Jus de Pomme

14	Généralités sur les hydrolases.	147
15	Pectine (substrat des enzymes pectinolytiques).....	148
15.1	Structure moléculaire des substances pectiques.....	151
15.1.1	L'Homogalacturonane	154
15.1.2	Rhamnogaacturonae de type I(RGI).....	155
15.1.3	Rhamnogalacturonane II (RGII).....	156
15.1.4	Xylogalacturonanes	157
15.1.5	Arabinanes.....	157
15.1.6	Galactanes	157
15.1.7	Arabinogalactanes	157
16	Les enzymes dégradants la pectine (Enzymes pectinolytiques).....	158
16.1	Mode d'action des pectinases.....	158
16.2	Classification des enzymes pectinolytiques	162
16.2.1	Protopectinases:.....	163
16.2.2	Enzymes dépolymérisantes:	163
16.2.3	Enzymes déméthoxylantes:	166
16.2.4	Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques	167
16.3	Application des enzymes pectinolytiques.....	170
16.4	Rôle des pectinases dans la production du jus de fruit des fruits.	171
17	Matériel et méthodes.	179
17.1	Préparation du fruit.....	179
17.2	Caractérisation physicochimique des pommes.....	180
17.3	Extraction des substances pectiques de la purée de pomme.....	181

17.3.1	Caractérisation des substances pectiques	182
17.3.2	Action de la polygalacturonase purifiée sur la solution pectique	187
17.3.3	Chromatographie de gel de filtration de la pectine avant et après hydrolyse	187
17.3.4	Aptitude de l'endopolygalacturonase à hydrolyser le trouble dans le jus de pomme. .	187
17.3.5	Préparation du jus de pomme.	188
17.3.6	Analyses physicochimiques des fractions des jus traités.....	190
17.3.7	Optimisation de la clarification enzymatique du jus de pomme.....	190
18	Résultats et discussion.....	191
18.1	Analyses du matériel végétal (la pomme).	191
18.2	Rendement d'extraction en pectine.....	192
18.3	Caractérisation physicochimique de la pectine	192
18.4	Spectroscopie infrarouge de la poudre de pectine obtenue	194
18.5	Teneur en protéines dans la pectine.....	195
18.6	Détermination du poids moléculaire viscosimétrique moyenne (PM)	196
18.7	Aspect rhéologique de la pectine extraite.....	197
18.8	Chromatographie de la pectine sur DEAE-cellulose échange d'anions	199
18.9	Hydrolyse de la pectine par l'endopolygalacturonase.....	199
18.10	Chromatographie de gel de filtration de la pectine avant et après hydrolyse.	201
18.11	Obtention du jus de pomme.....	202
18.12	Dépectinisation du jus brut.....	203
18.13	Optimisation de la clarification enzymatique du jus de pomme par la polygalacturonase purifiée	205
19	Conclusion.....	211

Chapitre V

Approche à l'immobilisation des pectinases obtenues par les alginates de sodium

Conclusion générale	222
Références bibliographiques	226
Annexe I . Analyse du microorganisme par MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrophotometry):.....	253
Annexe II. Les courbes d'étalonnage.....	256
Annexe III. Détermination de l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase et réduction de la viscosité du milieu réactionnel	259
Annexe IV. Analyse granulométrique.....	261
Annexe V. Purification des extraits enzymatiques et électrophorèse SDS-PAGE.....	264
Annexe VI. Classification des pectinases.....	266

Annexe VII. Diagramme d'obtention des alginates à partir des algues brunes et procédé d'immobilisation des enzymes.....	268
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Introduction

La paroi cellulaire des plantes est la plus grande source de biomasse dans la nature et est utilisée dans un large éventail de processus, qui reposent pour la plupart sur des méthodes mécaniques ou chimiques et beaucoup sont peu efficaces, très compliqués, agressifs pour l'environnement et coûteux. Par rapport aux procédés industriels couramment appliqués, l'utilisation d'enzymes présente des caractéristiques intéressantes telles qu'une stabilité et une activité élevées, une spécificité biocatalytique et une réduction des sous-produits indésirables (Lara-Marquez, et al. 2011). De même, les conditions de température, de pH et de pression requises sont modérées par rapport à celles utilisées dans les procédures chimiques; de plus, les enzymes sont biodégradables, propriété qui réduit les problèmes de toxicité chimique, est donc plus respectueuse de l'environnement et constitue une alternative viable en termes économiques (Hoondal, et al. 2002; MacCabe, et al. 2002). En raison des progrès biotechnologiques réalisés au cours des trois dernières décennies et de la demande croissante de remplacer et d'optimiser certains processus traditionnels impliquant des micro-organismes ou leurs enzymes, des enzymes telles que les cellulases, les hémicellulases et les pectinases sont continuellement étudiées car elles présentent des applications potentielles dans de nombreux domaines.

Les enzymes sont les composés bioactifs qui régulent de nombreux changements chimiques dans les tissus vivants. Les pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes apparentées qui hydrolysent les substances à base de pectine, présentes principalement dans les plantes (Sharma, et al. 2012). La pectine est l'un des composants principaux de la paroi cellulaire primaire des plantes, constituant principal de la lamelle moyenne. On la retrouve également dans les cellules en division et dans les zones de contact entre les cellules ayant une paroi cellulaire secondaire comprenant le xylème et les cellules fibreuses du tissu ligneux. La pectine représente environ 35% de la paroi cellulaire primaire des dicotylédones et des monocotylédones non graminés et elle représente 5 % de la paroi cellulaire des céréales. La teneur en pectine dans les parois secondaires est fortement réduite; Cependant, la pectine joue un rôle important dans la structure et la fonction des parois cellulaires primaires et secondaires. Les fonctions de la pectine dans les parois cellulaires sont diverses et comprennent la croissance et le développement des plantes, la morphogenèse, la défense, l'adhésion cellulaire, la structure de la paroi cellulaire, l'expansion cellulaire, la porosité, la liaison ionique, l'hydratation des graines, l'abscission des feuilles et le développement des fruits, entre autres (Mohnen 2008; Willats, et al. 2001). La pectine comprend des

polysaccharides riches en acide galacturonique (AGal) présents sous la forme de domaines structuraux liés par covalence: homogalacturonane (HG), xylogalacturonane (XGA), rhamnogalacturonane I (RG-I) et rhamnogalacturométhane I (RG-II). (Willats et al. 2001; Mohnen 2008). HG est le composant le plus abondant dans la pectine (65%). Il est formé de près de 100 résidus AGal reliés par des liaisons α -D-1,4 modifiables par estérification de méthyle dans C-6 ou par la présence de groupes acétyle dans O-2 et O-3 (Mohnen 2008). Le XGA est un squelette HG où 25 à 75% des unités A Gal sont substituées en C-3 par un résidu de xylose et occasionnellement par un second résidu de xylose en C-4 (Coenen, et al. 2007a; Mohnen 2008). Le RG-I, composé de 20 à 35% de pectine, est un polymère plus complexe constitué d'un squelette constitué d'unités répétitives du α -D-AGal-1,2- α -L-Rha-1-4-disaccharide, montrant entre 20 et 80% des résidus de rhamnose substitués par des chaînes latérales d'oligomères d'arabinose et de galactose de taille variable; des chaînes latérales de fucose et d'acide glucuronique sont également présentes (Willats et al. 2001; Mohnen 2008). Le RG-II est le domaine structural le plus complexe de la pectine et est formé par une chaîne principale de résidus AGal reliés par les liaisons α -D-1,4 contenant des chaînes latérales composées de 12 sucres différents (arabinose, galactose, xylose, fucose, acide acérique, acide glucuronique, apiose, etc.) (Mohnen 2008). Les domaines structuraux de la pectine interagissent entre eux et avec d'autres molécules telles que le calcium, le borate, les polyamines et les composés phénoliques, qui contribuent aux propriétés de la matrice de pectine. Les polymères qui composent la paroi des cellules végétales interagissent également par le biais de liaisons hydrogène avec des microfibrilles de cellulose, d'hémicellulose, de pectine et de polymères aromatiques de lignine, et avec de la pectine et des xyloglucanes ou xylanes par des liaisons covalentes (Popper and Fry 2008).

Les fruits et les légumes sont particulièrement riches en pectine qui représente une grande partie de leur biomasse (30%), dans les fruits immatures, la pectine insoluble sous forme de protopectine est liée aux microfibrilles de cellulose, conférant ainsi une rigidité à la paroi cellulaire. Au cours du processus de maturation, la pectine est modifiée par les pectinases végétales, ce qui la rend plus soluble, entraînant ainsi un ramollissement de la paroi cellulaire (Kashyap, et al. 2001). Le degré d'estérification de la pectine dépend de l'origine, du stade de croissance et du stade de maturité des fruits et légumes (Herron, et al. 2000). Les types de pectines sont classés en fonction de leur degré d'estérification en tant que faible, moyen /partiel et élevé lorsque la teneur en groupes esters est inférieure à 50%, comprise entre 50 et 70% et supérieure à 70%, respectivement (Ralet, et al. 2003).

En raison de sa structure complexe et hétérogène, la dégradation de la pectine nécessite l'action combinée de différentes enzymes classées selon leur mode d'action et le substrat sur lequel elles agissent. Ceux-ci comprennent les polygalacturonases (PG), qui dégradent le HG par hydrolyse des liaisons glycosidiques et sont classées comme endo-PG (PGA; EC 3.2.1.15) et exo-PG (XPG; EC 3.2.1.67) (Benen, et al. 2003; de Vries, et al. 2005). Des lyases telles que les pectate lyases (PLY; EC 4.2.2.9 et 4.2.2.2) et les pectine lyases (PEL; EC 4.2.2.10) catalysent respectivement la dégradation du polygalacturonate et de la pectine estérifiée par élimination du proton. générer une liaison non saturée entre les atomes de carbone C-4 et C-5 de l'extrémité non réductrice de la pectine. Les PLY sont spécifiques aux pectines non estérifiées et dépendent de Ca^{+2} , tandis que le PEL dégrade la pectine méthyl-estérifiée et ne dépendent pas de ce cation. Arg²³⁶ dans les PEL joue un rôle similaire à celui de Ca^{+2} (Herron et al. 2000). Les résidus acétyle, méthyle et féruloyle de la pectine sont éliminés par les pectines méthylestérases (PME; E.C.3.1.1.11), acétylestérases (AE; E.C. 3.1.1.6), ramnogalacturonan acétylestérases (RGAE; EC 3.1.1.) et les feruloyle-estérases (FAE; EC 3.1.1.73). L'activité de ces enzymes est importante pour la dégradation complète de la pectine, car elles favorisent l'activité d'autres enzymes. Par exemple, l'efficacité de la dégradation de la pectine par les PG et les PLY dépend largement de l'activité des PME (de Vries, et al. 2000; de Vries and Visser 2001a).

Les endorhamnogalacturonane hydrolases (RHG; EC 3.2.1.) Dégradent les liaisons α D-AGal-1,2- α L-Rha dans RG-I par hydrolyse, tandis que la rhamnogalacturonane lyase (RGL; EC 4.2.2.) Dégrade la liaison α L-Rha-1,4- α D-GalA par β -élimination. La rhamnogalacturonane rhamnohydrolase (RRH; E.C. 3.2.1.) Et le ramnogalacturonane galacturonohydrolase (RGH; E.C. 3.2.1.) Dégradent les oligosaccharides de l'extrémité non réductrice par une attaque exo (De Vries and Visser 2001b; Voragen, et al. 2001). En outre, deux nouvelles pectinases ont été trouvées capables de dégrader la XGA chez *Aspergillus tubingensis*: une exogalacturonase capable d'éliminer un disaccharide Xyl-GalA et une endoxylogalacturonane hydrolase qui clive sur des liaisons 1,4- α D-GalA dans XGA. D'autres enzymes accessoires agissant sur les chaînes latérales de RG-I et RG-II comprennent les endogalactanases (E.C.3.2.1.89), exogalactanases (EC 3.2.1.145), α - et β -galactosidases (EC 3.2.1.22 et 3.2.1.23), α L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), endoarabine-ases (EC 3.2.1.99) et les exoarabinases (EC 3.2.1.) (De Vries et Visser 2001).

Les enzymes qui dégradent la paroi des cellules végétales ont été largement étudiées pour leur potentiel biotechnologique; elles sont largement répandues dans les plantes supérieures et les microorganismes. Elles sont d'une importance primordiale pour les plantes car elles

contribuent à l'extension de la paroi cellulaire (Jayani, et al. 2005) et au ramollissement de certains tissus des plantes en particulier les fruits et légumes lors de la maturation et du stockage (Aguilar and Huitrón 1990; Sakai, et al. 1993). L'utilisation d'enzymes pectinolytiques est mise en œuvre dans divers processus de production, principalement dans l'industrie alimentaire. Dans la production de jus et de vin, les pectinases ont été utilisées pour améliorer le rendement, diminuer la viscosité, clarifier les jus et les rendre plus stables (Kashyap et al. 2001). Les enzymes utilisées pour la préparation des nectars, des aliments pour bébés sont générés par hydrolyse sélective des polysaccharides de la lamelle moyenne afin de préserver l'intégrité de la paroi cellulaire (Kashyap et al. 2001). Les préparations contenant des pectinases, des cellulases et des hémicellulases, utilisées pour l'extraction de l'huile d'olive, augmentent le rendement et la teneur en polyphénols et en vitamine E (Kashyap et al.2001). Pendant la fermentation du café et du thé, l'utilisation des enzymes pectinolytiques réduit le temps de fermentation (Amorim and Amorim 1977). Outre leur utilisation dans l'industrie alimentaire, les enzymes pectinolytiques sont utiles dans le traitement des textiles (Hoondal et al. 2002), dans les industries des pâtes et papiers (Bajpai 1999), dans le traitement de l'eau (Tanabe, et al. 1986) et comme outils d'analyse de polysaccharides de la paroi cellulaire végétale (Bauer, et al. 2006), entre autres applications. L'acide galacturonique, produit par l'action d'enzymes pectinolytiques, a diverses applications dans les industries, principalement les industries pharmaceutiques. Il est utilisé pour la production de vitamine C en tant qu'agent acide dans les industries alimentaires et en tant qu'agent de lessive en poudre dans les industries chimiques (Jahan, et al. 2017).

Sur le plan économique, l'utilisation d'extraits d'enzymes est une option viable si l'on tient compte du fait que les procédures de purification augmentent considérablement leur coût de production. Cependant, l'utilisation de préparations enzymatiques a été remise en question en raison de la présence de pectine méthylestérases libérant du méthanol, dont la concentration et les effets délétères sur le produit final restent indéterminés. Une autre objection est la présence dans les préparations commerciales d'autres activités enzymatiques indésirables qui pourraient être néfastes pour l'odeur finale du produit (Mantovani, et al. 2005).

Toutes fois, dans certains processus alimentaires, il est commode de n'utiliser qu'un seul type d'enzymes pectinolytiques, par exemple, la préparation de flocons de pomme de terre instantanés et de jus de carotte pour aliments pour bébés nécessite la macération, où les vitamines, la couleur et les arômes doivent être préservés et pour ces applications. les préparations qui contiennent principalement de l'activité polygalacturonase sont préférées. Plusieurs alternatives ont été suggérées pour obtenir des activités enzymatiques spécifiques.

Celles-ci incluent l'utilisation d'organismes produisant un seul type d'enzyme pectino-lytique, la recherche de conditions de fermentation permettant la production maximale de l'activité souhaitée et le fractionnement des extraits enzymatiques pour purifier l'enzyme souhaitée (Mantovani et al. 2005).

Dans la nature, les micro-organismes ont été dotés d'un vaste potentiel. Ils produisent une gamme d'enzymes, qui ont été exploités commercialement au fil des ans. Il a été rapporté que les enzymes microbiennes représentaient 25% des ventes mondiales totales d'enzymes (Jayani et al.2005). Les substances pectiques peuvent être converties au moyen de microorganismes ou de leurs enzymes en constituants monosaccharides ou oligosaccharides spécifiques sans production de sous-produits indésirables (Jahan, et al. 2017).

Les champignons filamenteux présentent des caractéristiques qui en font de bons modèles pour les applications industrielles. Parmi ceux-ci, il convient de noter la capacité de fermentation, la production de grandes quantités d'enzymes extracellulaires (par exemple, plusieurs grammes par litre dans des souches d'*Aspergillus*), la faisabilité de la culture et le faible coût de production de grands bioréacteurs (de Vries et Visser 2001). Les champignons filamenteux les plus fréquemment utilisés pour la production d'enzymes dégradant les polymères sont *Trichoderma reesei* et un certain nombre de souches d'*Aspergillus* et *Penicillium* (Lara-Marquez, et al. 2011). Les champignons filamenteux, en particulier *Aspergillus niger* (*A. niger*), sont les principaux producteurs d'enzymes pectiques acides, les produits d'*A. niger* ainsi que d'*Aspergillus sojae* et d'*Aspergillus oryzae* ont obtenu le statut GRAS (Général Considéré comme sain " generally regarded as safe"), ce qui a approuvé leur utilisation dans l'industrie alimentaire (Heerd, et al. 2012).

Habituellement, les microorganismes pectolytiques produisent une multiplicité d'enzymes pectinolytiques. L'analyse du génome d'*A. niger* a révélé 21 gènes appartenant à la famille 28 des glycosyl hydrolases, 39 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dépolymérisation du squelette pectinique et des gènes codant pour des activités enzymatiques pour la dégradation des chaînes latérales de pectine (Lara-Marquez, et al. 2011).

La production des pectinases occupe environ 10% de la fabrication totale de préparations enzymatiques, la production de ces enzymes est effectuée par fermentation à l'état solide et en fermentation submergée (FSm) (Rehman, et al. 2015). L'utilisation des procédés FS est intéressante pour la production de pectinases par les champignons, en raison de sa capacité à croître avec une faible activité de l'eau (a_w). Un tel système s'avère plus efficace dans la production de plusieurs enzymes et métabolites par les moisissures comme étant plus proches

leurs habitat naturel. Le procédé de fermentation à l'état solide offre plusieurs avantages potentiels par rapport au FSM, par exemple une concentration plus élevée en produits, une augmentation du rendement en enzyme, une plus grande résistance des microorganismes à la répression catabolique, une technologie de fermentation plus simple et une production réduite d'eaux usées (Pandey, et al. 1999; Viniegra-González, et al. 2003).

La recherche sur la sélection de substrats solides appropriés pour la FS a principalement porté sur les résidus agricoles et industriels en raison de leurs avantages potentiels pour les champignons filamenteux, capables de pénétrer dans les substrats solides les plus durs. Outre l'utilisation de ces déchets agro-industriels, ils fournissent des substrats alternatifs et source d'énergie par leur disponibilité et abondance et aide à résoudre les problèmes de pollution (Pandey 2003). Les sous-produits agricoles simples et économiques tels que le son de blé et l'écorce d'orange pourraient être utilisés de manière à fournir un soutien nutritionnel et physique lors de la culture sur substrat solide. Le son de blé, composé principalement de glucides non amylacés tels que les arabinoxylanes ou la cellulose, l'amidon et les protéines brutes, a été un substrat préféré pour la production d'enzymes pectinolytiques (Heerd 2012); L'écorce d'orange est le principal sous-produit de l'industrie de transformation des oranges et constitue environ 50% du poids du fruits frais. Ces écorces sont riches en pectine qui induit la synthèse des pectinases par les moisissures (Mamma, et al. 2008).

Cependant, il a été rapporté que le processus de fermentation est influencé par différents paramètres physico-chimiques tels que les sources de carbone et d'azote, les sels minéraux, le temps de fermentation, la température, le pH, les dimensions des particules et la teneur en eau, (Jacob and Prema 2006; Palaniyappan, et al. 2009).

La composition moyenne du milieu de fermentation doit être spécifiée individuellement pour chaque souche d'intérêt. On pensait qu'avec d'autres études d'optimisation utilisant des outils statistiques tels que la méthodologie de la surface de réponse (MSR), il était possible d'obtenir une augmentation supplémentaire des rendements en enzymes (Tari, et al. 2007). RSM a d'importantes applications dans le développement de la conception et la formulation de nouveaux produits, ainsi que dans l'amélioration de la conception des produits existants (Baş and Boyacı 2007). Cette méthodologie définit l'effet des variables indépendantes, seules ou combinées, sur le processus. En plus d'analyser l'effet des variables indépendantes, cette méthodologie expérimentale génère un modèle mathématique qui décrit le processus chimique ou biochimique (Baş and Boyacı 2007).

En variante, l'immobilisation d'enzymes sur des matrices solides a également été suggérée; cette stratégie offre plusieurs avantages par rapport à l'utilisation d'enzymes libres, à savoir

une activité et une stabilité élevées, la possibilité de les utiliser à des concentrations élevées et une accessibilité accrue au substrat, et par conséquent une réduction des temps de réaction. L'immobilisation permet également la récupération et la réutilisation des enzymes, en évitant sa présence dans le produit final, la possibilité d'utiliser des réactions multi-enzymes, (Lara-Marquez, et al. 2011).

À la lumière des faits susmentionnés, l'étude actuelle a été conçue pour utiliser les déchets agro-industriels en tant que source majeure de substrat pour la production de pectinase, par une nouvelle souche locale d'*A.niger* en fermentation à l'état solide ce qui réduira à terme le coût de production de la PGase à l'échelle commerciale. Les pectinases produites dans les conditions optimales ont été purifiées et appliquées à la clarification d'un jus de pomme (figure 1). Par conséquent, cette étude fournira des informations pouvant profiter à l'industrie des aliments et des enzymes.

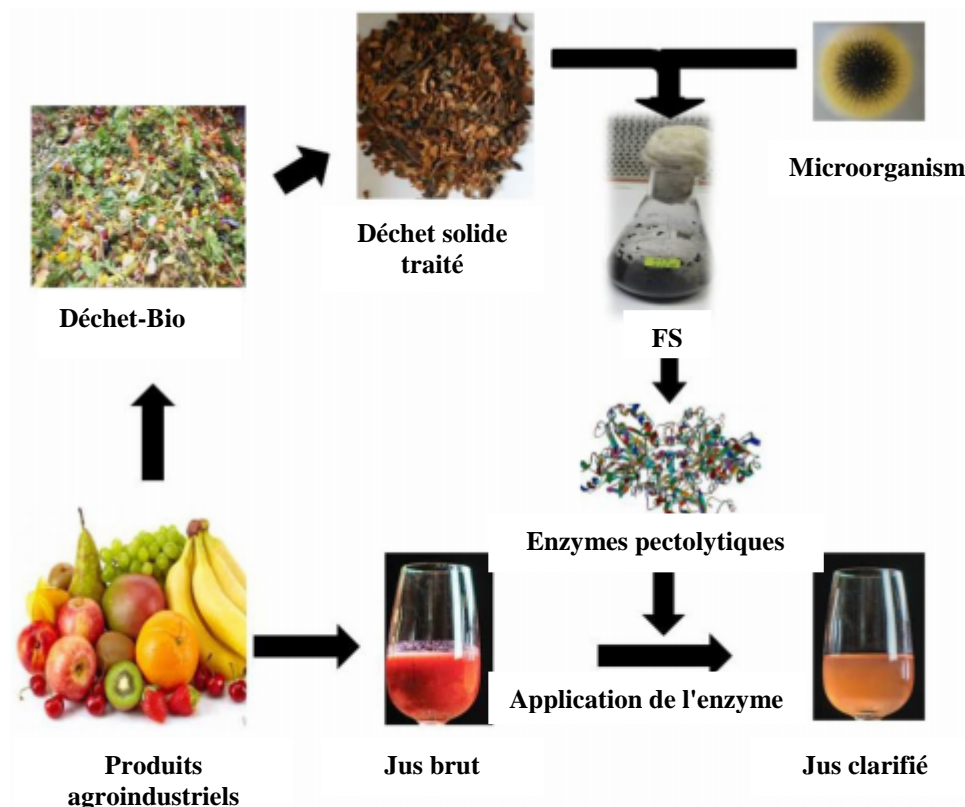


Figure 1. Aperçu de la problématique: production microbienne des enzymes pectolytiques et leurs applications pour la clarification des jus de fruits

CHAPITRE I:
Utilisation des Résidus Agroindustriels pour la
Production des Pectinases. Cas des Résidus
d'Agrumes et du Son de Blé

1 Travaux antérieurs

Des quantités énormes de résidus de déchets agro-industriels sont générées dans le monde entier lors du traitement de matières premières agricoles destinées à l'alimentation (Jahan, et al. 2017) . Celles-ci, à leur tour, imposent un lourd fardeau de demande biologique en oxygène sur l'environnement lorsqu'elles sont déversées (Landbo and Meyer 2004) . Ainsi, les résidus agro-industriels provenant de la transformation de la canne à sucre, de l'orange, du café, du blé et du riz constituent des matières premières appropriées pour la bioconversion en produits chimiques, y compris des enzymes par fermentation, ajoutant ainsi de la valeur à ce qui constitue normalement un déchet (Giese et al. 2008). D'autre part, les coûts de séchage, de stockage et d'expédition des sous-produits sont des facteurs économiquement limitant. Par conséquent, les sous-produits agro-industriels sont souvent utilisés comme aliments pour animaux ou comme engrais (Singh nee'Nigam and Pandey 2009).

Les résidus agroindustriels étant renouvelables et abondants (3,5 milliards de tonnes/an), ils présentent une matière première potentielle peu couteuse pour la production d'enzymes microbiennes (Robinson and Nigam 2003) Plusieurs tentatives ont été faites pour utiliser les déchets d'oranges, du marc du pomme et du marc de raisin et d'autres sous produits, afin de générer plusieurs produits à valeur ajoutée par le biais de transformations microbienne ou de modifications enzymatiques tels que les enzymes, le bioéthanol, les acides organiques, les hétéropolysaccharides, les arômes, des aliments enrichies en protéines, des oligosaccharides et des molécules biologiquement actives (Singh nee'Nigam and Pandey 2009).

L'application des résidus agroindustriels dans les bioprocédés permet de les utiliser à la fois comme source d'énergie pour la croissance et comme source carbonée pour la synthèse de la biomasse cellulaire et d'autres produits aidant ainsi à résoudre les problèmes de pollution lié à leurs élimination. Le substrat solide fournit non seulement les nutriments aux cultures microbiennes qui y poussent, mais sert également d'ancrage pour les cellules (Mahmood, et al. 1998). Le substrat solide idéal est celui qui fournit tous les nutriments nécessaires au micro-organisme. Cependant, certains des nutriments dans le substrat solide peuvent être disponibles à des concentrations sous-optimales, voire ne pas être présents dans les substrats . Dans de tels cas, il serait nécessaire de les compléter en externe pour améliorer la croissance et par la suite la production d'enzymes (Panda, et al. 1999b).

En général, les déchets d'agriculture et de transformation des aliments sont constitués de grandes quantités de matières organiques à haute valeur nutritive (tableau 1)

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Tableau 1. Valeurs nutritionnelles des résidus agroindustriels les plus abondants.

Composition	Pulpe de citron	Pulpe d'oranges	Son de blé	Pelure des raisins	Bagasse de sucre	Bagasse d'orange	Marc de pomme	Son de riz	Marc d'olive
Fibres bruts	25,78	NA	66,12	-	-	41,5	51,1%	10,10%	-
Protéines brutes	3,39	7,7	15,73	-	-	4,0	4,0%	12,26%	-
Sucres totaux	37,59	43,1	2,34	-	-	-	9,5-22%	43,29	-
Pectine	-	14,7	-	1,3	-	-	7,2%	-	5,8
Cellulose	-	16,7	-	25,9	35,2	-	6,8%	-	22,9
Hemicellulose	-	11,8	-	3,6	24,5	-	-	-	5,9
Amidon	-	-	-	-	-	7,1	-	-	-
Lignine	-	1,2	-	22,5	22,2	-	-	-	22,6
Cendres	3,1-4,0	1,2	3,24	6,5	20,9	2,6	0,5%	10,63	3,3
Humidité	7,00	2,31	9,36	5,6	-	9,9	10,8%	13%	3,4
Lipides	3,46	3,6	-	9,8	-	0,6	-	24,6%	15,9
Références	(De Gregorio, et al. 2002; Ruiz, et al. 2012)	(Zhou, et al. 2000)	(Demir and Tarı 2014)	(Sanchez, et al. 2015)	(Rezen de, et al. 2011)	(Romero -Lopez, et al. 2011)	(Shalini and Gupta 2009; Sudha, et al. 2007)	(Satter, et al. 2014)	Sanchez et al.(2015)

Comme il existe une demande croissante de pectinases pour diverses applications, sa production rentable sur des substrats de faible valeur devient importante pour les industries.

Les pectinases sont produites par des plantes, des insectes et des microorganismes saprophytes tels que des bactéries et des champignons (Patidar, et al. 2018) . Les principales sources de pectinases végétales sont les tomates et les oranges (Favela-Torres, et al. 2006). Parmi les sources animales, la polygalacturonase obtenue à partir d'extraits corporels du charançon du riz, *Sitophilus oryzae*, a été purifiée jusqu'à homogénéité apparente (Shen, et al. 1996) . Contrairement aux sources végétales et animales, les micro-organismes sont des sources attractives d'enzymes en raison de leur diversité et de la possibilité d'améliorer le rendement par des manipulations environnementales et génétiques, ainsi que de la courte durée de vie des micro-organismes (Patidar, et al. 2018). La production microbienne d'enzymes pectinolytiques provient principalement de champignons filamenteux, de levures et de bactéries filamenteuses et non filamenteuses (tableau 2). En règle générale, les enzymes fongiques sont de nature acide, tandis que les enzymes alcalines sont produites par des souches bactériennes. Les champignons filamenteux, en particulier *Aspergillus sp.*, sont la source la plus courante d'enzymes pectinolytiques du commerce, elles

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Tableau 2. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases

Microorganisme	Substrat	Référence
<i>Aspergillus niger</i>	Bagasse de la canne à sucre	(Maldonado and Saad 1998)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Son de blé	(Singh, et al. 1999)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Son de blé ou la bagasse des oranges ou la bagasse de la canne à sucre	(Martins, et al. 2002)
<i>Bacillus sp. DT7</i>	Son de blé	(Kashyap, et al. 2003)
<i>Fusarium moniliforme</i>	Son de blé et la pulpe des oranges	(Niture and Pant 2004)
<i>Moniliella sp.</i>	Bagasse de la canne à sucre, la bagasse des oranges et le son de blé	(Martin, et al. 2004)
<i>Penicillium sp.</i>	Bagasse de la canne à sucre, la bagasse des oranges et le son de blé.	(Martin, et al. 2004)
<i>Aspergillus niger</i>	Eau résiduaire des glutamate monodique et pulpe de betterave à sucre.	(Bai, et al. 2004)
<i>Streptomyces sp. RCK-SC</i>	Son de blé	(Kuhad, et al. 2004)
<i>Penicillium viridicatum</i>	La bagasse des oranges et son de blé	(Silva, et al. 2005)
<i>Bacillus gibsonii</i>	La pulpe de la betterave à sucre.	(Li, et al. 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Marc de pomme	(Joshi, et al. 2006)
<i>Aspergillus awamori</i>	Marc du raisins	(Botella, et al. 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé	(Dinu, et al. 2007)
<i>Streptomyces Lydicus</i>	Son de blé	(Jacob and Prema 2006)

elles sont produites au moyen de deux techniques différentes à savoir; la fermentation submergée (FSbm ou FMSb) et la fermentation à l'état solide (SSF ou FMS) (Castilho et al., 2000).

La condition de croissance dans la SSF se rapprochant d'avantage de l'habitat naturel des champignons filamenteux que dans la culture liquide, ces microorganismes sont donc capables de bien se développer sur un substrat solide et d'excréter de grandes quantités d'enzyme (Castilho et al. 2000).

Les pectinases bactériennes sont généralement de nature alcaline et conviennent parfaitement à des applications telles que le traitement de la fibre végétale, le traitement des eaux usées pectiques, la pâte à papier, etc. (Jayani, et al. 2005) . La production des pectinases bactérienne est généralement réalisée par FSm, car on pense généralement que le SSF

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

convient aux champignons. qui nécessitent une faible activité de l'eau (0,6) par rapport aux bactéries (0,95) (Patidar, et al. 2018). Le taux d'humidité élevé dans le milieu de fermentation augmente les risques de contamination par d'autres microbes (Jayani et al.,2005). Cependant, plusieurs chercheurs ont signalé une augmentation de la production d'enzymes par les souches bactériennes dans le cadre de la SSF, ce qui prouve que le processus de la SSF est également une meilleure option que le SmF pour les souches bactériennes. La production améliorée de pectinases alcalines et thermotolérante a été rapportée par *Bacillus sp.* DT7 sous SSF utilisant du son de blé (Kashyap et al. 2003). Un *Streptomyces alcalophile. RCK-SC*, capable de produire une pectinase alcaline thermostable, a été isolé d'échantillons de sol et dans une cellule immobilisée système contenant de la mousse de polyuréthane, la production d'enzymes a été améliorée par 32% comparativement aux cultures en ballon agité, en utilisant le son de blé comme substrat solide, avec un rapport substrat sur humidité de 1: 5 après 72 h d'incubation (Kuhad et al. 2004).

1.1 Utilisation du son de blé pour la production des pectinases.

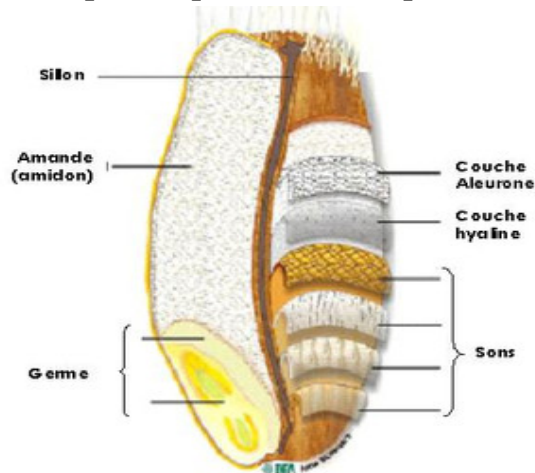


Figure 2. Schéma d'un grain de blé (Surjet 2015)

Le blé est un grain ancien et serait originaire du sud-ouest de l'Asie. Il est consommé comme aliment depuis plus de 12 000 ans. Considéré comme l'état-major de la vie, il jouait un rôle important sur le plan religieux et faisait partie des rituels sacrés de nombreuses cultures (Singh, et al. 2011). Le blé est une herbe de céréales de la famille des graminées (Poaceae) et du genre *Triticum*; on estime qu'environ un tiers de la population mondiale dépend du blé pour se nourrir (Demir and Tari 2014). Aujourd'hui, les principaux producteurs commerciaux de blé sont la Fédération de Russie, les États-Unis, la Chine, l'Inde, la France et le Canada (Patidar et al., 2018). Le son de blé est la couche externe dure des grains de blé et consiste en une combinaison d'aleurone et de péricarpe (Figure 2). Avec les germes, il fait partie

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

intégrante des grains entiers et est souvent produit comme sous-produit de la minoterie lors de la production de grains raffinés (Demir et Tari 2014). Le son de blé est composé de 8,12% de fibres, 15,7% de protéines, 65% d'azote, 4,57% de cendres et 16,7% de sucre total (5,22% de sucre réducteur) (Martins et al. 2002). Parmi les divers résidus agro-industriels, le son de blé est toutefois essentiel, car il est produit dans le monde entier en quantités énormes en tant que sous-produit important de l'industrie céréalière et a été utilisé le plus souvent comme substrat pour divers processus biotechnologiques (Pandey, et al. 1999). Selon les statistiques du Département de l'agriculture des États-Unis (USDA), un total de 655 270 000 tonnes de blé ont été produites et 680 419 000 tonnes de blé ont été consommées au cours de la période de 2012-2013 dans le monde (USDA, 2013) (Demir et Tari 2014). Comme environ 15 à 20% (en poids) de son de blé seraient rejetés dans le processus de production de farine de blé (Dobrev, et al. 2007) , le son de blé devient un sous-produit bon marché et facilement disponible, la production de pectinase à partir de son de blé pourrait être une affaire rentable (Kashyap et al., 2003). La production d'enzymes pectinolytiques à l'aide de son de blé est obtenue à l'aide de diverses cultures microbiennes telles que *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Streptomyces sp.*, *Streptomyces lydus*, *Thermoascus auriantacus*, *Penicillium viridicatum*, *Fusarium moniliforme*, *Bacillus sp.*, Etc., comme en témoigne le tableau 2. Selon des rapports récents, l' *Aspergillus carbonarius* est le principal producteur de pectinases fongiques, avec un rendement en enzyme de 480 U / g dans des conditions de SSF en utilisant le son de blé comme substrat (Singh et al., 1999). La production de polygalacturonase la plus élevée signalée dans la SSF provient de *Bacillus sp.* (23076 U / g) suivis de *Streptomyces sp.* (4857 U / g) (Kapoor and Kuhad 2002; Kuhad, et al. 2004) avec du son de blé comme substrat solide. Comme il ressort des rapports récents, que le son de blé est le substrat solide le plus puissant pour la production d'enzymes pectinolytiques par les champignons et les bactéries, avec ou sans la présence d'inducteurs d'enzymes.

Utilisation des résidus d'agrumes pour la production des pectinases.

La bagasse d'agrumes est la biomasse restante après l'extraction du jus d'agrumes à l'échelle industrielle. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale d'agrumes pour l'année 2005 était de 94,8 millions de tonnes métriques (base de données statistiques FAOSTAT-FAO, 2005) (Mamma, et al. 2008). Le genre agrume comprend plusieurs fruits importants (Bambidis and Robinson 2006) , les plus importants à l'échelle mondiale étant l'orange douce (*Citrus. sinensis*: 61,1% de la production mondiale d'agrumes), la mandarine (*Citrus. reticulata*: 19,9%), le citron et citron vert (*Citrus.*

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

limon et *Citrus. aurantifolia*: 12,1%) et pamplemousse (*Citrus. paradisi*:5,0%). Parmi les genres d'agrumes mineurs qui constituent la majeure partie des 2,0% restants, citons l'orange amère (*Citrus. quarantium*), le shaddock (*Citrus. grandis*) et le citron (*Citrus. medica*) . Le tableau 3 présente les principaux pays producteurs d'agrumes . Environ 20,6% de la production mondiale d'agrumes se trouve dans les pays méditerranéens (Espagne, Italie, Grèce, Égypte, Turquie et Maroc), le Brésil (20%), la Chine (16%) et les États-Unis (11%) représentant les pays producteurs d'agrumes (tableau 3).

D'après Mamma et al., (2008), Environ 27 millions de tonnes de la production totale d'agrumes pour l'année 2005 ont été transformées en jus, huiles essentielles et autres sous-produits (base de données statistiques FAOSTAT-FAO, 2005, 2013). Les agrumes sont principalement consommés par l'homme sous forme de fruits frais ou de jus de fruits transformés, soit réfrigérés, soit concentrés. Une fois le jus extrait du fruit, il reste un résidu composé de pericarpe (flavedo et albedo), de pulpe (résidu de sac à jus ou poils ou vésicules), de paroi du carpelle (membranes et cœurs) et de pépins ou graines, représentant 50% du poids des agrumes frais (Garzon and Hours 1992) .La transformation des agrumes produit environ 13,5 millions de tonnes de sous-produits solides (base de données statistiques FAOSTAT-FAO, 2005, 2013).

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Tableau 3. Principaux pays producteurs d'agrumes en mille tonnes (FAO 2005, 2013)

Pays	Total	Oranges	Tangerines	Citron et citron vert	Pamplemousse
USA	10498,5	8419,1	367,3	789,4	922,7
Grèce	861,0	763,2	59,7	31,5	6,6
Italie	3320,9	2105,1	611,6	597,5	6,8
Espagne	6181,3	2835,4	2500,4	809,5	36,0
Israël	639,9	184,2	122,8	68	264,9
Algérie	542,7	390,0	111,0	40,0	-
Maroc	1320,9	827,0	463,9	25,0	5,0
Tunisie	307,9	174,7	33,2	28,0	72,0
Égypte	2706,3	1759,3	612,6	331,4	3,0
Chypre	178,7	69,5	50,4	20,9	37,9
Liban	339,0	200,0	42,0	83,0	-
Turquie	2316,8	1040,0	500,0	670,0	106,8
Mexique	6910,0	4300,0	360,0	1890,0	360,0
Iran	3037,0	1900,0		1100,0	
Chine	15227,9	4462,0	8695,0		1903,0
Inde	4662,0	3100,0		1420,0	142,0
Indonésie	1311,7	1311,7			
Argentine	2670,0	770,0	430,0	1300,0	170,0
Bazille	18902,5	16565,0	1270,0	1000,0	67,5
Chili	312,0			170,0	
Colombie	330,0				
Equateur	305,1			38,3	
Pérou	754,0	315,5	172,0	220,0	47,0
Uruguay	242,2	124,1	77,3	33,5	
Venezuela	379,1	370,0			
Australie	716,1	571,0		35,0	15,1
Afrique du sud	1543,0	1113,0		180,0	250,0

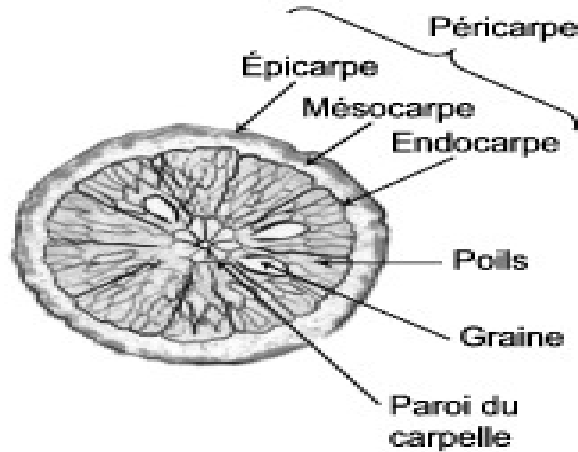


Figure 3. Coupe transversale d'une orange

Le contenu des sous-produits d'agrumes sont influencés par des facteurs tels que la source du fruit et le type de transformation (Bampidis et Robinson 2006). Les pulpes de citron et d'orange sont les principaux déchets produits par l'industrie des jus d'agrumes. Les pulpes de citron, essentiellement constituées de pectines, ressemblent à une crème homogène à partir de laquelle aucun jus supplémentaire ne peut être récupéré mécaniquement. Les pâtes ne peuvent être éliminées qu'après séchage car les pâtes à forte teneur en humidité peuvent subir une fermentation spontanée, ce qui pose des problèmes environnementaux. Le coût d'élimination des pulpes de citron est élevé car il ne peut pas être séché facilement et à moindre coût en un produit stable avec une teneur en humidité inférieure à 10%. À cet égard, une autre utilisation pratique des pâtes est la fermentation à l'état de suspension du matériau pour la production de pectinases (De Gregorio et al. 2002), en tant que valeur ajoutée du matériau et en tant que moyen économique de production d'enzymes. La bagasse d'orange est généralement séchée et commercialisée comme composant de l'alimentation animale. Étant donné que le coût de production de la bagasse séchée est élevé et que son prix de vente est bas, le processus ne peut être considéré que comme une méthode d'élimination des déchets (Mahmood et al. 1998). La boulette de bagasse à l'orange contient 11,8% de fibres, 6,4% de protéines, 63 % d'azote, 6,7% de cendres, 19% de sucre total (9% de sucre réducteur) et 0,1% de pectine (Martins et al. 2002). En plus de ce qui a été cité dans le tableau 2, les cultures microbiennes qui se sont avérées appropriées pour la production de pectinases utilisant de la bagasse d'orange comme matière première sont *Thermoascus aurantiacus*, *Penicillium sp.*, *Moniliella sp.*, *Penicillium viridicatum*, etc. (tableau 4).

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Tableau 4. Bioprocédé pour la production des pectinases en utilisant les résidus d'agrumes comme substrat

Enzyme	Microorganisme utilisé	Procédé	Référence
Pectinase	<i>Aspergillus foetidus</i> ATCC 16878	FMS	(Garzon and Hours 1992)
Alkaline pectinase	<i>Bacillus sp. MG-cp-2</i>	FML	(Kapoor et al. 2002)
Polygalacturonase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium oxysporium</i> F3, <i>A.niger</i> BTL, <i>Neurospora crassa</i> DSM1129; <i>Penicillium decumbens.</i> <i>A. niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> <i>Tubercularia vulgaris</i> <i>Penicillium vericatum</i> Rfc	FML FML FML FML FMS	(Maldonado, et al. 1986) (Mamma et al. 2008) (De Gregorio et al. 2002) (Fonseca and Said 1995) (Silva, et al. 2002)
Endopolygalacturonase	<i>Aspergillus sp. CH-Y-1043</i> <i>Auriobasidium pullulans</i> <i>A. niger</i> MTCC 281	FML FMS FMS	(Larios, et al. 1989) (Federici and Petruccioli 1985) (Dhillon, et al. 2004)
Pectine esterase	<i>Aspergillus sp.</i>	FMS	(Maldonado, et al. 1986)
Polygalacturonase lyase	<i>B. subtilis</i> strain 11089	FMS	(Mahmood, et al. 1998)
Pectate lyase	<i>F. oxysporum</i> F3, <i>A. niger</i> BTL, <i>N.crassa</i> DSM1129, <i>P.decumbens</i>	FMS	(Mamma, et al. 2008)

Matériel et méthodes

La méthodologie du travail adoptée dans cette partie est résumée selon le diagramme suivant:

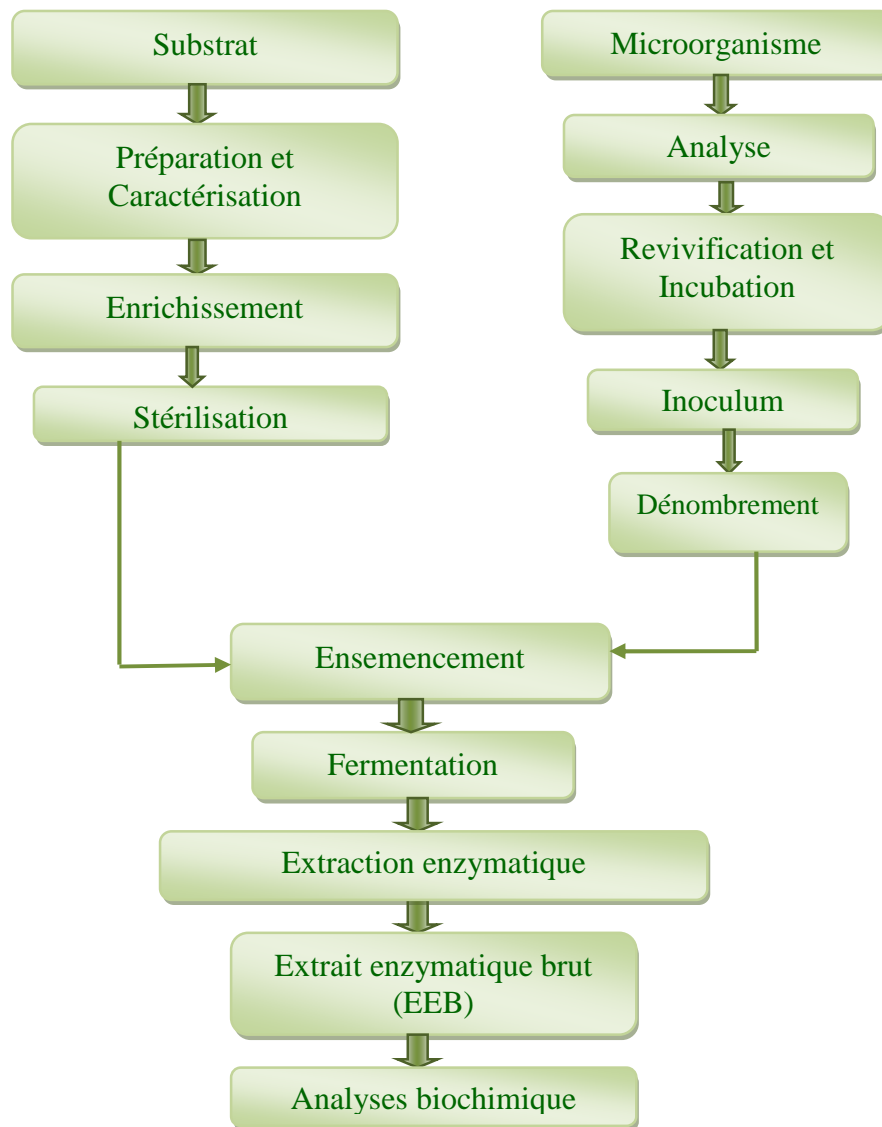


Figure 4. Diagramme suivi pour l'obtention de l'extrait enzymatique brut (EEB)

3.1 Préparation du matériel et végétal

- Le son de blé utilisé dans cette étude, est un sous-produit du broyage à sec de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) en farine, il est ramené des moulins traditionnels de la région d'elakhdaria située à l'est d'Alger en Algérie. Le son est constitué de particules fines de couleur brunâtre (figure 5), il a été utilisé sans aucune préparation préliminaire.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé



Figure 5. Son de blé

- Les résidus d'oranges et citrons (figure 6) sont obtenus après extraction des jus de fruit de saison qui ont été ramenés du marché local. Les résidus ont été d'abord blanchis à 90° C pendant 5 min, puis, lavés trois fois par l'eau distillée à 50 °C; après égouttage, les résidus sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique de ménage puis conservés au congélateur jusqu'à leurs utilisation.



(a)



(b)

Figure 6. Les résidus d'agrumes : (a) résidus de citron; (b) résidus d'oranges

3.2 Analyses physicochimiques du matériel végétal.

3.2.1 Détermination de la matière sèche.

L'humidité est déterminée sur un échantillon de 5g par dessiccation dans une capsule en porcelaine placée dans une étuve thermostatée à une température de 105°C pour les résidus d'agrumes et 130° C pour le son de blé, le séchage s'achève après obtention d'un poids constant. La différence des poids avant et après séchage correspond à la perte d'humidité et la masse restante représente la matière sèche.

$$MS\% = \frac{(m_2 - m)}{(m_1 - m)} \cdot 100$$

Avec : MS : teneur en matière sèche %.

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

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

m: masse de capsule vide.

$$\text{Humidité \%} = 100 - MS$$

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

3.2.2 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).

$$\text{MO \%} = [(m_1 - m_2)/p] * 100$$

MO% : matière organique

m_1 : masse de la capsule en porcelaine + prise d'essai

m_2 : masse de la capsule en porcelaine + cendres

P: masse de la prise d'essai

La teneur en cendre (Cd) est calculée comme suit:

$$\text{Cd} = 100 - \text{MO\%}$$

3.2.3 Dosage des minéraux:

Les cendres obtenues sont dissoutes dans 10 ml de HCl (12N), la solution ainsi obtenue est versée dans une fiole jaugée puis complétée à 100ml avec de l'eau distillée.

A partir de cette solution, le dosage des minéraux: le calcium, le sodium, le magnésium et le potassium, est effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique.

En absorption atomique la concentration est déduite de la mesure de l'absorption de la lumière par les atomes de l'élément restés à l'état fondamental lorsqu'ils sont éclairés par une source lumineuse convenable. La mesure de l'intensité lumineuse est faite à une longueur d'onde spécifique de l'élément à doser.

3.2.4 Détermination de l'azote total.

L'azote total est dosé par volumétrie après minéralisation selon la méthode de Kjeldhal décrite par Audigié et al. (1984). Ce dosage est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium par minéralisation sous l'action de l'acide sulfurique et la température en présence d'un catalyseur. Après refroidissement le minéralisât est mis dans un ballon de distillation, 50ml d'eau distillés sont alors automatiquement ajoutés ainsi que 50ml de lessive de soude (33%). après chauffage (barbotage). l'ammoniac (NH_3) dégagée est distillée automatiquement dans un bécher contenant 20ml d'acide sulfurique 0,1N est 2goutte d'indicateur de (Tachio, phénol- phtaléine). la fin de la distillation est versifiée à l'aide d'un papier pH.

Le dosage de l'azote récupéré est effectué par titrage de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à l'aide de l'acide borique jusqu'à coloration verte.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

La teneur en azote est déterminée par la formule suivante:

$$Nt = \frac{0,0014 * (V1 - V2) * 100}{P} * 6,25$$

Nt: est la teneur en azote exprimée en g/100g de substance à analyser.

V1: Volume de H₂SO₄ contenu dans le bécher de récupération.

V2: Volume de NaOH dépensé pour neutraliser l'excès de H₂SO₄ après la distillation.

0,0014: Coefficient de correspondance.

P: Le poids de la substance à analyser.

6,25: Coefficient de convention correspondant aux protéines végétales.

3.2.5 Dosage et fractionnement des substances pectiques :

Le dosage de ces substances est généralement réalisé par la détermination de leur teneur en acides galacturoniques. Sous forme libre, ces acides peuvent être dosés par voie enzymatique, mais cette méthode se prête difficilement aux analyses de routine des substances pectiques.

Le principe de la méthode utilisée est basé sur le chauffage en milieu acide concentrée, les substances pectiques qui sont totalement dépolymérisées et les oses obtenu (acide galacturonique est éventuellement hexoses, pentoses et méthyl pentoses) sont transformés en dérivés furfuriques (acide 5- formyl furoïque). Ces dérivés se condensent alors avec le méta-hydroxydiphényl (MDHP) pour former des complexes colorés dont le maximum d'absorption est situé entre 520-530 nm (Thibault 1979).

Le dosage des substance pectiques est réalisé après leurs extraction d'une manière séquentielle à partir du matériel insoluble dans l'alcool (MIA).

- **Obtention du MIA**

A 50g de chaque résidu sont ajoutés 100ml d'éthanol à 95%, le mélange est porté à ébullition pendant 3min , puis filtré sur un creuset en verre n°3 sous vide, le résidu est lavé à l'éthanol 80%. Les MIA sont alors séchées à l'étuve à température 35°C après les avoir broyés finement, ils sont conservés dans un dessiccateur.

- **Fractionnement des substances pectiques**

- (a) **Obtention des pectines solubles à l'eau (PSE):**

Un poids déterminé de MIA (50mg -100mg) est dissout dans 50ml d'eau distillée (20°C)

et agité de façon continue pendant 30 mn. Après centrifugation à 3000 tr/mn en 15 m filtration sur une toile en nylon très fine, le culot est repris. L'opération est répétée deux fois

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

comme précédemment mais avec des agitations de 15 mn. Les surnageants des 3 opérations sont alors réunis.

(b) Obtention des pectines solubles à l'oxalate (PSO)

Le résidu obtenu de la deuxième extractions des PSE subit les mêmes étapes mais en remplaçant l'eau par une solution d'oxalate d'ammonium à 1%. Les surnageant réunis constituent la pectine soluble à l'oxalate (PSO).

(c) Obtention des pectines solubles dans l'acide chlorhydrique 0.05 M (PSHCl)

Le résidu obtenu de la troisième extractions des PSO subit les mêmes étapes mais en remplaçant l'oxalate par une solution l'acide chlorhydrique 0.05 M. Les surnageant réunis constitue la pectine soluble à l'acide chlorhydrique 0.05 M (PSHCl).

• Dosage de l'acide galacturonique dans les différentes fractions pectiques

Tout d'abord toutes les solutions pectiques doivent être désestérifiées par NaOH à 0,05 N pendant 30 min. à température ambiante.

On verse dans un tube à essai en pyrex 1 ml de solution pectique, on ajoute 6 ml d'acide sulfurique concentré, on agite le tube dans un vortex et on recouvre d'un bouchon non hermétique. on chauffe ensuite dans un bain- marie à 85°C pendant 5 min.

Après refroidissement dans un bain de glace, 1 ml de réactif MDHP (0,04%) est ajouté. Après agitation au vortex, on attend le développement de la coloration pendant 25 mn. L'intensité de la couleur est alors déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 520 nm contre un blanc. La teneur en acide galacturonique est alors déterminée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie à partir d'une solution d'acide galacturonique à 0,1%.

Le pourcentage d'acide galacturonique dans chaque fraction est calculé come suit :

$$\text{AGal}\% = \frac{m_1}{m_0} * f * 0,91 * 100$$

Ou :

m₁ : La masse (µg) d'acide galacturonique lue sur la courbe d'étalonnage.

m₀ : La masse (µg) de l'échantillon de pectine analysée.

f : Facteur de dilution

0,91: facteur de conversion acide anhydrogalacturonique/acide galacturonique.

La somme des pectines extraites à l'eau, à l'oxalate et à l'acide, représente la pectine totale.

3.2.6 Dosage des sucres totaux et réducteurs:

La méthode appliquée pour le dosage des sures réducteurs est celle de Somogyi (1945) et Nelson (1945), . Cette méthode est basée sur les propriétés réductrices du glucose en milieu alcalin et à chaud.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Le réactif oxydant est un réactif cupro-alcalin, rendu faiblement alcalin par un mélange de carbonate et d'hydrogencarbonate. Le glucose est oxydé, et il se forme de l'oxyde cuivreux (quantitativement dans les conditions de la méthode). Ce dernier est dosé par colorimétrie, en réduisant un réactif arsénio-molybdique, avec formation d'un complexe bleu intense, stable et soluble (Audigié, et al. 1984)

Le dosage est réalisé sur une solution sucrée préparée à partir du matériel végétal.

- **Préparation de la solution sucrée.**

10 g du matériel végétal sont introduits dans un Erlenmeyer de 150 ml, auquel on ajoute 50 ml d'eau distillée tiède et on maintient le mélange en agitation magnétique pendant 5 min, après filtration du mélange, le résidu est récupéré pour refaire 2 fois l'extraction. Les filtrats des 3 extractions sont rassemblés dans une fiole jaugée qsp 250 ml.

- **Défécation**

A 20 ml de la solution sucrée on ajoute 2 ml de solution de ferrocyanure de potassium (150g/l), 2 ml d'acétate de zinc (à 300 g/l) et 100 ml d'eau distillée. le mélange est agité puis ajusté à 200 ml par l'eau distillée et laissé reposer pendant 15 min.

- **Dosage des sucres réducteurs.**

Dans un tube à essai en pyrex, on introduit 2 ml de solution sucrée et 2 ml d'une solution cuproalcaline, Le tube est couvert d'un tampon de coton et porté au bain-marie bouillant pendant 20 min, après avoir refroidi le tube pendant 10 min. On y ajoute 2 ml de réactif arsénomolybdique. On mélange le tube à essai par retournement et on complète chaque tube à 10 ml avec l'eau distillée bouillie et refroidie. On lit la densité optique à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en sucres réducteurs est déterminés à partir d'une courbe d'étalonnage de glucose à 20 mg/l préalablement établie.

- **Dosage des sucres totaux**

On prend 20 ml de la solution sucrée, on les met dans une fiole de 25 ml. On y ajoute 1 ml de HCl concentré, le tout est porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. On laisse refroidir et on neutralise par NaOH à 1N jusqu'à pH 6. On prélève 2 ml de la solution qu'on met dans un tube à essai et on opère comme pour les sucres réducteurs.

3.2.7 Détermination du pH.

Le pH est déterminé en mesurant la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre combinés plongées dans les solutions aqueuses du matériel végétal; ces dernières sont obtenues par macération d'une prise d'essai de 10 g du matériel végétal dans 100 ml d'eau

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

distillée chaude pendant 30 min, puis les mélanges sont filtrés et refroidis à température ambiante.

3.3 Préparation du matériel microbiologique

Pour cette étude, une souche de moisissure *Aspergillus niger sp.* appartenant à la collection de l'Institut Pasteur d'Alger a été utilisée(figure n°7)



Figure 7. *Aspergillus niger sp.* conservé sur milieu sabouraud en tube incliné

3.3.1 Revivification de la souche:

La revivification de la souche pour obtenir de jeunes mycélium est réalisée par repiquage et propagation sur un milieu PDA (Potato dextrose agar), ce milieu a été préparé en mettant en ébullition 200g de pomme de terre non épluchées dans 1 l d'eau pendant 1 heure, les pommes de terre sont ensuite écrasées dans l'eau d'ébullition, puis filtrées sur un tissu propre, on ajoute au filtrat 20 g de glucose et 20 g d'agar et on ajuste le mélange à 1 litre, le mélange est ensuite réparti dans des flacons de 250 ml et stérilisé à 115°C pendant 20 min puis refroidi. l'ensemencement est réalisé en surface à l'aide d'une anse en platine, les boîtes de petri ainsi ensemencées sont incubées à 30 ° C pendant 5 jours. Après germination des souches, les mycélium ont été observés au microscope électronique (*Philips ESEEM XL 30*)

3.3.2 Analyse du microorganisme par Matrix Assisted Laser Desorption ionization Time of flight (MALDI TOF MS)

Cette méthode est basée sur l'ionisation des échantillons, l'échantillon couvert d'une matrice ionisante est bombardé par un laser (337 nm, 20 Hz), étant désorbé de la plaque inerte, les particules ionisables sont accélérées dans un champs électrique en leurs imprimant un temps de vol dans un tube ou un vide poussé 10^{-10} bar est maintenu. la molécule désorbée projetée vers le détecteur , son temps de vol est proportionnel à sa masse (m) et sa charge (z) (Annexe1).

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

3.3.3 Préparation de la solution des spores.

La suspension de spores est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,01% de Tween 80 à la souche cultivée cinq jours sur PDA en boîte de Pétri. Les spores sont déboîtées superficiellement en utilisant une pipette Pasteur sous des conditions aseptiques.

L'inoculum ainsi obtenu est dénombré par un comptage de spores sous un microscope optique au grossissement x 40 en utilisant une cellule de MALASSEZ (figure n 8). Chaque comptage a été réalisé sur vingt cinq petits carrés. A l'aide d'une pipette on introduit quelques millilitres de la suspension entre la lame et la lamelle de la cellule de MALASSEZ; la concentration cellulaire est obtenue grâce à l'équation suivante:

$$X \left(\frac{\text{spores}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{nombre de spores moyennes comptées})}{(\text{nombre de petits carrés comptés})} * \left(\frac{1}{VP} \right)$$

Ou : VP est le volume de petit carré de la cellule en ml.

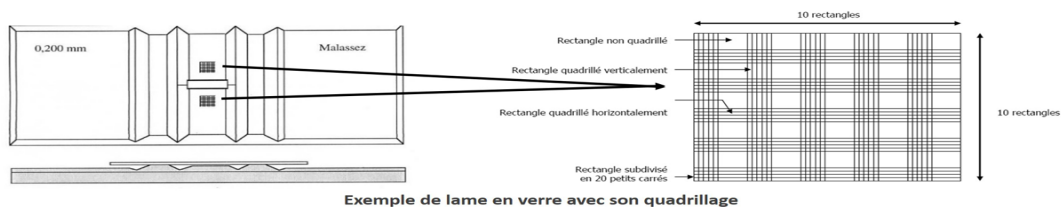


Figure 8. Description de la cellule de Malassez.

3.3.4 Préparation des milieux de fermentation :

Le milieu de culture de production des pectinases est préparé selon Acuña-Arguelles, et al. (1995) et Maldonado and Saad (1998), qui ont utilisé les résidus d'oranges comme milieu de base pour la production des pectinases. Dans cette étude le son de blé et les résidus de citron et des oranges sont utilisés séparément. Nous avons utilisé les deux techniques: fermentation en milieu solide et fermentation en milieu submergé:

à cet effet en fermentation solide 50g des résidus d'agrumes et 20 g de son de blé ont été introduits séparément dans des Erlenmeyers de 250 ml; dans chaque Erlenmeyer sont ajoutés 0.5g de glucose, et 5 ml d'une solution constituée de 0.3% d'urée, 0.65% de KH_2PO_4 , 1.26 % de $(NH_4)_2SO_4$, 0.014% de $(Fe SO_4)$, et 0.01% $Mg SO_4$; 20 à 30 ml d'eau distillée sont ajoutés au son de blé d'une manière à avoir le même taux d'humidité que les résidus d'agrumes.

Tandis que 150 ml d'eau distillée sont ajoutées en fermentation submergée dans les résidus d'agrumes et 70 ml d'eau distillée dans le son de blé. Les milieux ont été stérilisés à $121c^\circ$ pendant 20 min dans un autoclave de type (*Stream stériliser*), puis refroidis.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

3.3.5 Inoculation des milieux de fermentation :

Après refroidissement des Erlenmeyers contenant les milieux de fermentation, ces derniers sontensemencés aseptiquement par 1 ml de suspension de spores (inoculum), ils sont agités, fermés par le coton cardé et incubés dans un incubateur agitateur à 30°C pendant 5 jours.

Les fermentations se sont déroulées en triples en présence d'échantillons témoins inoculés par 1 ml d'eau distillée pour chaque type de fermentation et chaque type de résidus.

3.3.6 Extraction des enzymes pectinolytiques :

L'extraction consiste à la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, après la période d'incubation 100 ml d'eau distillée stérilisée et refroidie sont ajoutées dans chaque Erlenmeyer de la fermentation en milieu solide, ces derniers sont agités énergiquement dans un agitateur à secousse pendant 30min, les contenus sont filtrés à travers une gaze stérile et centrifugés a 10000 tr/20min à 4c° dans une centrifugeuse. les échantillons de fermentation submergée sont directement filtrés à travers une gaze stérile et centrifugés à 10000tr/min à 4°C. Les filtrats obtenus sont les extraits enzymatiques brut (EEB).

3.4 Analyses physicochimiques des extraits enzymatiques brut.

3.4.1 Détermination du pH:

Le pH à été déterminé à l'aide d'un pH mètre (*Hanna 211*) par introduction de l'électrode combinée en verre dans l'extrait enzymatique brut, les unités de pH sont lues directement sur l'écran de l'appareil.

3.4.2 Détermination des protéines solubles (Lowry, et al. 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 liaison 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 phosphotungstene, 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 .

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Dans un tube à essai, on introduit 1 ml d'EEB, on ajoute 5 ml de réactif de Lowry préparé extemporanément, après agitation, on ajoute 0,5 ml de réactif de folin ciocalteu dilué à 1/2, on agite et on laisse reposer 30 min à l'obscurité. La densité optique est mesurée à 600 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible.

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 5g .L⁻¹ .

3.4.3 Dosage de l'activité endopolygalacturonasique

La méthode adoptée repose sur le principe de la viscosimétrie. En coupant les liaisons α 1-4 de la pectine (substrat) l'endopolygalacturonase va entraîner une diminution de la longueur des chaînes de la pectine occasionnant une baisse de la viscosité de la solution.

Il est possible d'exprimer l'activité endopolygalacturonasique par calcul du pourcentage de baisse de viscosité ou de déterminer le temps nécessaire pour atteindre 50% de réduction de viscosité. Ce temps est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, mais la méthode la plus facile est celle mise au point par Thibault (1983) qui consiste à tracer l'inverse de la viscosité spécifique du milieu réactionnel en fonction du temps de la réaction ; la pente de la droite obtenue donne l'activité enzymatique.

Pour ce but nous avons préparé une série de béchers de 20 ml contenant le milieu réactionnel constitué de 0,5ml de l'extrait enzymatique et 10 ml de la solution de pectine à 1% préparée dans une solution tampon d'acétate sodique à pH 4.5 , le mélange est incubé à 30°C à des temps différents (2 min, 5min, 10min,15 min, 30 min, 45 min, 60 min), la réaction a été réalisée à différentes dilutions enzymatiques. la réaction est stoppée par chauffage du milieu à 90°C pendant 5 min. La viscosité du milieu est alors déterminée à 30°C à l'aide d'un viscosimètre à écoulement de type *Fungilab*. le pourcentage de réduction en viscosité est donné par la formule qui suit (Rangarajan, et al. 2010; Soares M.M.C.N., et al. 2001) :

$$\text{Pourcentage de réduction en viscosité (\%)} = ((t_0 - t_e) / (t_0 - t_{ea})) * 100$$

Où:

t₀: temps d'écoulement en secondes (s) de l'échantillon avant réaction;

t_e: temps d'écoulement en secondes (s) de l'échantillon;

t_{ea}: temps d'écoulement en secondes (s) de l'eau.

La viscosité spécifique est calculée comme suit: $\mu_{sp} = (\mu_0 - \mu) / \mu$

avec μ_0 est la viscosité de la solution et μ est la viscosité du solvant.

L'activité endopolygalacturonasique est exprimée par la formule suivante:

$$\text{Act (U/ml)} = \text{Tr} * \text{tan}\alpha. \text{DI} * 2$$

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Act : est l'activité de l'endopolygalacturonase (U/ml)

Tr : temps de la réaction (minutes).

DI: dilution de l'enzyme.

2: correspond à 0,5 ml d'enzyme ajoutée dans le milieu réactionnel.

3.4.4 Dosage de l'activité de l'exopolygalacturonase

Le principe est basé sur la détermination des unités réducteurs libérés par hydrolyse de la liaison entre deux acides galacturoniques de la chaîne pectiques. Les groupements réducteurs apparus sont dosés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNSA) décrite par Miller, (Miller 1959) le mélange réactionnel est constitué de 1 ml d'une solution de pectine à 1% préparée dans une solution tampon acétate pH 5,5) et de 0,5 ml d'extrait enzymatique, le mélange est incubé à une température de 45 °C pendant 1heure, la réaction est stoppée par ajout de 1 ml de réactif de DNSA.

Après avoir ajouté le réactif de DNSA dans le mélange réactionnel le tout est chauffé pendant 5 min à 90 °C puis immédiatement refroidi, puis dilué par 3 ml d'eau distillé. L'intensité de la couleur orange qui apparait est déterminée par lecture de l'absorbance à 530 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La teneur en groupements réducteurs est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préparée à partir de l'acide galacturonique à 0,1 g/l.

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 μ mol/ min /ml d'extrait et calculée par la formule ci-dessous (Soares M.M.C.N., et al. 2001):

$$\text{Activité exoPG (U /ml)} = (\text{AG} \times 1000) / (212.12 \times 60 \times 0.5)$$

Où:

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

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

0.5: Volume de l'extrait (ml);

60: temps d'incubation (min).

3.4.5 Dosage de l'activité de la pectinéméthylestérase (PME):

L'activité de la PME a été déterminée par titration des groupes carboxyliques libérés par la désésterification de la pectine (Sandri, et al. 2011).

Une solution de pectine à 0,5% dans NaCl à 0,1N à pH 4.5 et 0.5 ml d'extrait enzymatique, est incubée à 35°C pendant 60min en présence de 0,2 ml du vert de bromocrésol. L'activité de la PME est déterminée par mesure du taux des ions H⁺ libérés pendant la réaction par titration

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

avec NaOH à 0,02N. Une unité de pectinéméthylestérase est définie comme étant le taux d'enzyme qui libère un milliéquivalent d'ester hydrolysé par minute. L'activité de la PME s'exprime comme suit:

$$\text{Activité PME (U/ml)} = (V_1 * N) / (0,5 * 60)$$

Avec:

V₁: Volume de NaOH (ml);

0,5: Volume de l'extrait (ml);

60: temps d'incubation (min);

N: normalité de NaOH.

3.4.6 Dosage de l'activité de la pectinolyase (PL):

L'activité de la lyase se traduit par une dégradation des pectines hautement méthylées par β -élimination des acides galacturoniques méthylés. Il se crée ainsi un système de doubles liaisons conjuguées fortement délocalisées et absorbant dans l'ultraviolet d'après (Yadav, et al. 2008), il s'agit des 4-5 oligogalacturonates insaturés qui absorbent à 235 nm et dont le coefficient d'extinction moléculaire est de $5550 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. (Ladjama, et al. 2007).

Une autre méthode de dosage de pectine lyase a été décrite par (Pitt 1988) basée sur la réaction des 4-5 oligogalacturonates insaturés avec l'acide thiobarbiturique (TBA) en formant un chromogène orange dont le maximum d'absorption est à 550 nm et dont le coefficient d'extinction moléculaire est $5400 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Pour les deux méthodes, le mélange réactionnel est d'abord clarifié en précipitant les protéines et le substrat en excès par le sulfate de zinc (ZnSO_4): 5 ml de pectine à 0,1% dans une solution tampon Tris HCl pH 8,5 sont mélangées avec 1 ml d'EEB, 1 ml de CaCl_2 à 0,01 M et 3 ml d'eau distillée. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1 heure la réaction est terminée en ajoutant 4,5 ml de HCL à 0,01 N; puis 0,6 ml de sulfate de Zinc à 0,9% et 0,6 ml de NaOH à 0,5 M sont ajoutés au mélange, qui est ensuite centrifugé à 3000 tr /min pendant 10 min. La densité optique du filtrat est lue à 235 nm contre un blanc. Une unité d'activité enzymatique est la libération d'1 μmol des produits insaturés par minutes sous les conditions standards, elle est définie comme étant l'augmentation de l'absorbance par 0,1 par heure à 235 nm.

$$\text{Activité pectinolyase (U/ml)} = (\text{DO}_{235} \times 1000) / (5550 \times 60 \times 1)$$

5 ml du filtrat sont récupérés pour l'essai à l'acide thiobarbiturique; auquel est additionné 3 ml de TBA à 0,04 M, 2,5 ml de HCL à 0,1 M et 0,5 ml d'eau distillée; le mélange est chauffé à ébullition pendant 30 min puis refroidi à température ambiante, l'absorbance de la solution

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

colorées est mesurée à 550 nm contre un blanc. Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui a changé l'absorbance par 0,01 dans les conditions standards.

$$\text{Activité pectinLyase (U/ml)} = (\text{DO}_{550} * 1000) / (5400 * 60 * 5)$$

Pour tout les dosages des activités enzymatiques un blanc est préparé en parallèle en remplaçant l'extrait enzymatique (EEB) par l'EEB préalablement dénaturé par chauffage à ébullition pendant 10 min.

Résultats et discussion

4.1 Caractérisation du matériel végétal.

Le tableau n°5 regroupe les résultats des analyses physico chimiques réalisées sur le matériel végétal.

Tableau 5. Composition biochimique des résidus agroindustriels

Paramètre	Son de blé	Résidus de citron	Résidus d'oranges
Matière sèche (%)	90±0.06	26,5,±0.22	28,70±1.00
Sucres réducteurs (%)	0,52 ± 0.03	0,25±0.01	0,30 ±0.01
Sucres totaux (%)	6,0 ± 1.05	4,70 ±0.96	5,90 ±1.35
Cendres (%)	6 ±0.04	2.55±0.03	3.49±0.01
Potassium (mg/g)	10,6	5,78	10,46
Sodium (mg/g)	0.09	1.06	2.20
Calcium (mg/g)	0.82	18,51	6,89
Magnésium (mg/g)	6.12	1.50	1.27
Substances (%) pectiques	0.5±0.64	6,5 ±0,99	8,7 ± 0.73
PSE (%)	0.01	2,43	1.75
PSO (%)	0	0.87	1.99
PSHCL (%)	0.49	20,2	17,96
Protéines (%)	17±0.05	1,38 ± 0.03	3,6±0.05
pH	6,00	3,70	4,00

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

La pulpe fraîche ou pressée présente des teneurs élevées en eau (76 à 82%) et en sucres solubles. De ce fait, c'est un sous-produit périssable qui fermente rapidement et qui développe vite des moisissures (Rihani 1991).

Les substances pectiques sont essentiellement des acides pectiques et pectiniques et des protopectines, alors que la fraction des sucres hydrosolubles renferme surtout du saccharose. Cette composition est en fait très variable selon la variété et les proportions relatives des divers agrumes utilisés. A titre indicatif, les pulpes d'oranges sont plus pauvres en extrait éthéré, en minéraux et en parois et plus riches en matières azotées et en saccharose que les pulpes de citrons ou de pamplemousses (Rihani 1991), les résultats du tableau 5 concordent avec ces suppositions tel que les sucres totaux sont de l'ordre de 5,9% dans les résidus d'oranges et 4,7 % dans les résidus de citron. Les différences dans les proportions relatives des pépins, de l'écorce et des particules fines sont à l'origine de ces variations (Rihani 1991). par exemple les oranges récoltées en octobre contiennent plus de graines, et donc plus de protéines et d' extrait éthéré que ceux récoltés en avril (Rihani 1991).

Il est à noter que la teneur en sucre dans les résidus d'oranges qui correspond à 20,55% (MS) est relativement plus élevée à celle rapportée par Mahmood et al. (1998) soit un taux en sucres totaux égal à 15% (MS). Pour leur part, Gloria, et al. (2010) ont rapporté des taux de sucres totaux qui se situent entre 11,4 à 33,4%, à partir du fruit entier de deux variétés Tanzaniennes (*Valencia et Navel*).

Les valeurs du tableau n° 5 révèlent que les résidus d'agrumes utilisés sont fortement humidifiés (71,3%, 75,5%); l'eau qui reste dans les résidus dépend du taux d'extraction du jus, par conséquent, la teneur en matière sèche dans les résidus de citron correspond à ce qui a été signalé dans la littérature par Singh, et al. (2011), où la moyenne de la matière sèche se situait à 23% dans les résidus d'oranges fraîches et 21 % dans les résidus de citrons frais.

Les protéines, les minéraux et la fibre se trouvent principalement dans les couches externes du grain du blé, et le son est plus riche en ces nutriments que les grains entiers. Le son de blé est relativement riche en protéines (14-19%, parfois plus) et de minéraux (4-7% MS), notamment de calcium (0,07 à 0,2%) et de phosphore (0,9-1,3%). Sa teneur en huile (3-5%) est supérieure à celle du grain entier. Les teneurs en fibres et l'amidon sont inversement corrélées et extrêmement variables, car elles dépendent des quantités relatives des enveloppes, l'endosperme et d'autres fractions mélangées ensemble.

Nous constatons que le taux de la matière sèche est trop élevé dans le son de blé (90%) (tableau n°5), cette dernière est constituée majoritairement par les fibres alimentaires

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

(66,12%) valeur reportée par Demir and Tarı (2014) sur un son de blé ayant 90,64% de matière sèche. Blum (1989) a rapporté des valeurs de 87% de matières sèche dans le son de blé; 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.

Le taux des cendres qui représente les différents cations sous forme oxydée qui peuvent accélérer ou inhiber l'activité enzymatique, est plus élevé dans le son de blé (6%) par rapport aux résidus d'agrumes frais dont les valeurs étaient de l'ordre de 3,49% dans les résidus d'oranges et 2,55% dans les résidus de citron. peu de travaux ont été réalisés sur les résidus de citron par contre plusieurs ont été réalisées sur la caractérisation des résidus d'oranges; il est clair que la composition biochimique des produits végétaux varie selon la variété et l'espèce; Les résidus d'agrumes étudiés sont riches en carbohydrates qui constituent une source importante de carbone et d'énergie pour la croissance des microorganismes notamment *Aspergillus niger*. les hydrates de carbone dans les résidus d'agrumes fraîches varient de 5% à 10% d'après Singh (2011).

L'étude menée par El-Sheikh, et al. (2009) sur les résidus d'oranges fraîches égyptiennes râpées, en ce qui concerne le pourcentage de ses différents composants, a montré que ces résidus étaient fortement humidifiés (76,5% p / p) et riches en pectine, cellulose et hémicellulose (24.03, 15.84 et 31.13 (p / p %) respectivement), avec une faible teneur en lignine et en cendres (6,5 et 3,1%). Par rapport aux données actuelles, l'orange mexicaine a donné un rendement maximal en pectine extraite ne dépassant pas 20,44% (Ma, et al. 1993).

La teneur en pectine des résidus d'oranges égyptienne étant supérieure à celle de la population mexicaine, elle semble mieux convenir à la productivité des enzymes pectiques. Notamment les résidus d'oranges Algériennes que nous avons utilisés peuvent se situer dans la gamme des résidus convenable à la production des pectinases vue leur teneur élevée en pectine (9,5% dans les résidus de citron et 10, 7% dans les résidus d'oranges par rapport au produit frais), ce qui correspond à 30,31%, et 24,5% par rapport à la matière sèche des résidus d'oranges et citron respectivement. ces valeurs sont plus élevées à celle trouvées dans la littérature : 3,6% à 5,5% obtenue par (Renard C. M. G. C. and J.-F. 1993) , et 14,4% enregistrés par Mamma et al., (2008). La fraction pectique la plus élevée dans la variété algérienne est celle soluble dans l'acide chlorhydrique. La teneur en pectine dans le son est faible 0.5% comme il a été signalé dans les paragraphes précédents le son est riches en fibres alimentaires comme la cellulose et d'autres hydrates de carbone comme les sucres qui étaient de l'ordre de 6% et les sucres réducteurs de l'ordre de 0,5 %, cette valeur est inférieur par rapport à la valeur

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

rapportée par Demir et Tari (2014) qui est de l'ordre de 2,34 % de sucres réducteurs dans le son de blé tendre.

En ce qui concerne le taux de protéines dans le son, sa valeur moyenne est de 17 % , elle dépasse la gamme des valeurs observées par Mac Masters, et al. (1978): 11,8 à 14,5 % (MS), et elle dépasse 15, 73 % , cette valeur rapportée par Demir et Tari (2014). Cependant, elle est de même ordre que celle publiée par d'autres auteurs comme Hubbell (1980) et Chyr (1987) qui rapportent respectivement des teneurs de 16,47 et de 18,46 % (MS).

La teneur en protéines est plus faible dans les résidus d'agrumes ; 1,36 % dans les résidus de citron et 3,6% dans les résidus d'oranges.

Bien qu'il existe des différences dans l'acidité entre les jus d'espèces d'agrumes (oranges contre le citron par exemple), les pulpes résultantes ont des valeurs de pH similaires qui se situent dans la région 3,9 à 4 (Crawshaw 2003), c'est ce qui explique les valeurs de pH trouvés dans le tableau n°5 qui sont 3,7 dans les résidu de citron et 4 dans les résidus d'oranges. par contre le pH est plus élevé dans e son de blé, il est de l'ordre de 6, cette valeur est dans la gamme des valeurs cités dans la littérature notamment celle enregistrée par Demir et Tari (2014).

Le potassium sous forme de traces est nécessaire pour obtenir un taux élevé de croissance des cellules ainsi que la formation de produits désirés (Bauer, et al. 2010a).

La teneur des résidus d'orange en potassium est de l'ordre de 10,46 mg/g. (Mbogo, et al. 2010) ,ayant travaillé sur deux variétés d'oranges, ont signalé des valeurs comprises entre 162- 172 mg/l. Dans le jus d'orange, 145- 160 mg/100g de potassium ont été signalés par Topuz, et al. (2005), tandis que dans la pulpe la teneur moyenne en potassium est de l'ordre de 9, 3 mg/g (Singh 2011)

Le calcium joue le rôle de cofacteur ou d'activateur enzymatique, la thermo résistance de la spore est sous la dépendance étroite du calcium (Meyer, et al. 2004) . La teneur moyenne en Ca la plus élevée est celle observée dans les résidus de citron (18,1 mg/g) relativement aux résidus d'oranges dont la valeur est de 6,89 mg/g et de l'ordre de 0,82 mg/g dans le son de blé; dans la littérature la teneur en calcium est de l'ordre de 7,7 mg /g dans la pulpe d'agrumes fraîche et 1,4 mg /g dans le son (Singh 2011).

La teneur en sodium des résidus d' oranges est égale à 2,2 mg/g, et elle est égale à 1,06 dans les résidus de citrons, ces valeurs sont proches de la teneur moyenne en sodium dans la pulpe d'agrumes publiée par Singh (2011). Il est à noter que le sodium joue un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule (Meyer, et al. 2004) il est donc indispensable à la croissance.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Sa teneur est 0,09 mg/g dans le son de blé, notamment le son est pauvre en sodium sa teneur moyenne est 0,1 mg/g (Singh 2011).

Le magnésium joue aussi le rôle de cofacteur ou d'activateur enzymatique ; il est indispensable dans les milieux de culture en quantités infimes (Meyer et al. 2004).

La teneur en magnésium est de 1,27 mg/g dans les résidus d'oranges, 1,5 dans les résidus de citron tandis que la valeur la plus élevée est celle observée dans le son de blé qui est de l'ordre de 6,12 mg /g.

A partir de la composition chimique des résidus d'agrumes et du son de blé , on constate que ces résidus recèlent un milieu d'une grande valeur alimentaire (sucres totaux, sucres réducteurs, pectines, protéines, sels minéraux). Ces sous-produit agroindustriel peuvent donc être employé comme milieu de fermentation pour la production de pectinases.

La concentration des nutriments influe directement sur la vitesse de croissance des cellules ainsi que sur la formation des produits désirés. Si tous ces éléments sont disponibles en quantités suffisantes, la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale. Dans la plupart des cas pratiques, la croissance est limitée par la disponibilité de la source de carbone (Bauer, et al. 2010a).

4.2 Aspect du microorganisme après germination:

La figure 9 illustre la croissance de la souche d'*Aspergillus niger* cultivée sur milieu PDA. Les colonies d'*Aspergillus niger* sont granuleuses, blanches au début puis jaunes ; à maturité, elles deviennent noires. Plusieurs chercheurs ont confirmé que les *Aspergillus niger* sp. se développent bien sur le milieu PDA (Linde, et al. 2007; Palaniyappan, et al. 2009; Solís-Pereira, et al. 1993)

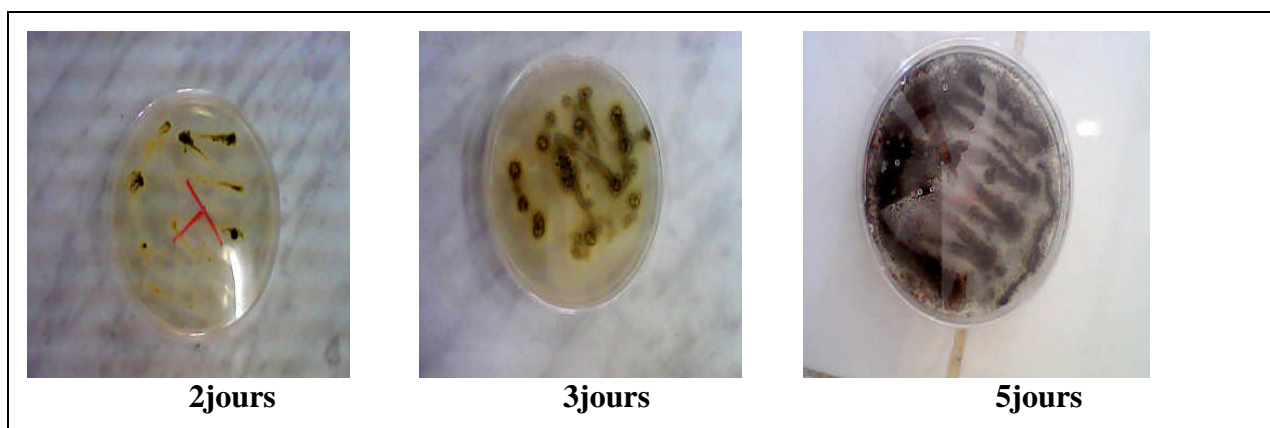
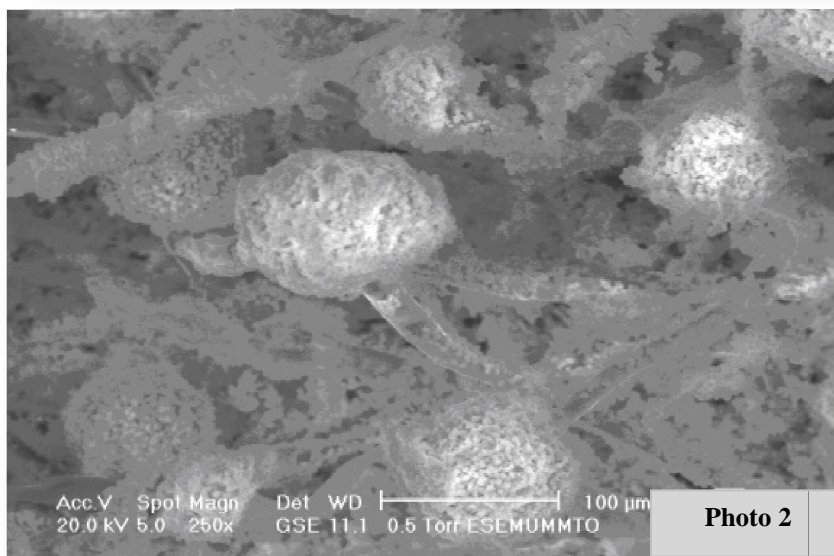
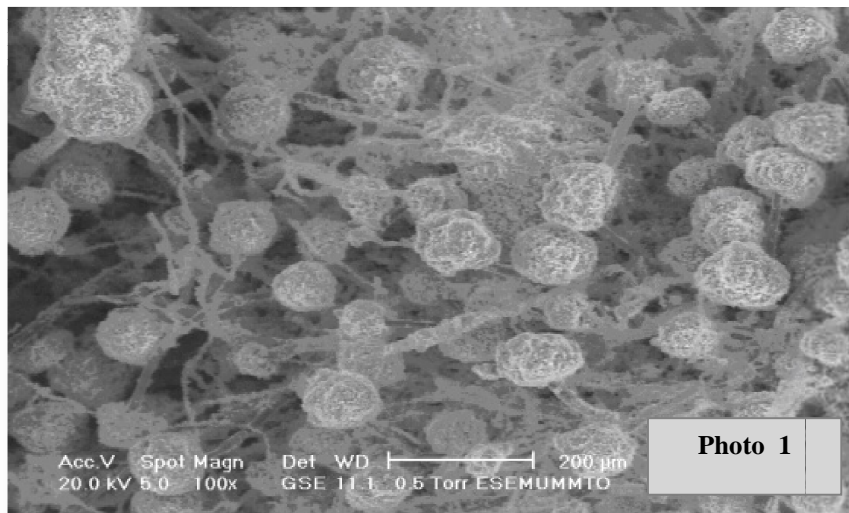


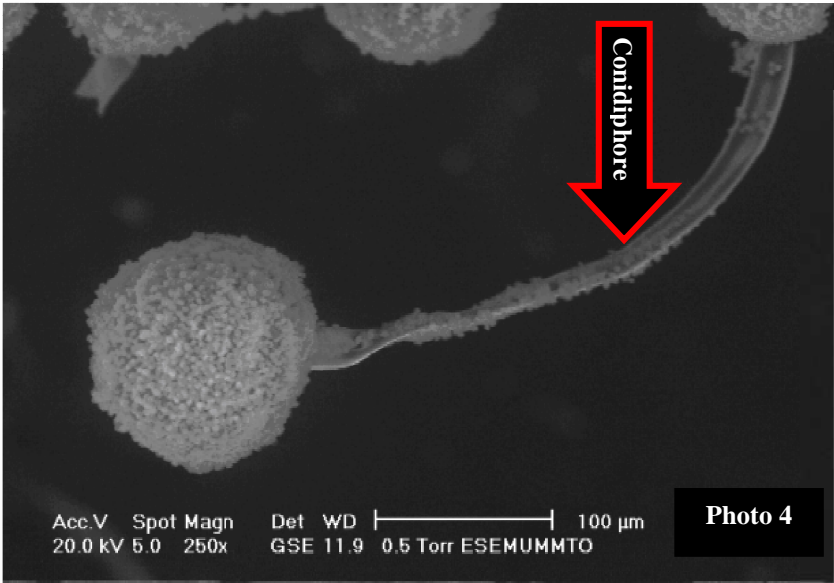
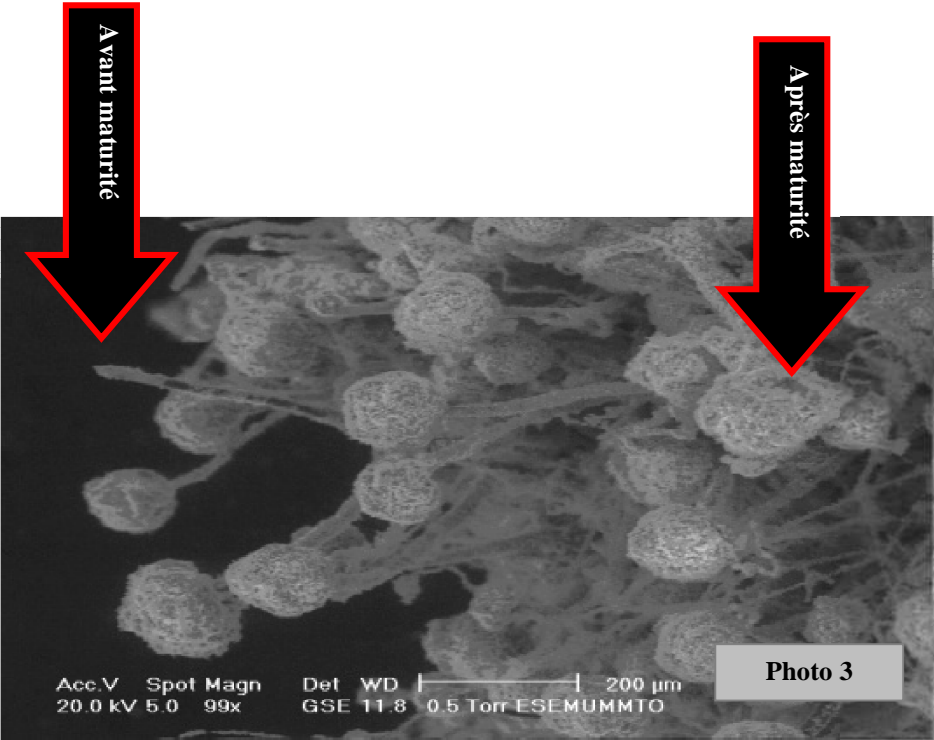
Figure 9. Culture d'*Aspergillus niger* sur milieu PDA

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Après repiquage et germination de la souche, cette dernière a été observée au microscope à balayage électronique électronique (photos 1,2,3,4 et5 de la figure 10).



Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé



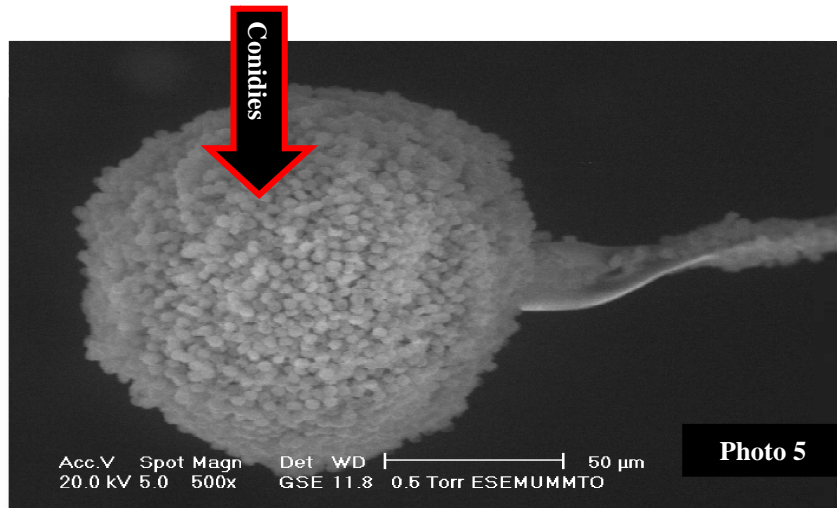


Figure 10. Vue microscopique à balayage électronique de l'*Aspergillus niger* cultivé sur milieu PDA en boîte de pétri (photos 1,2,3,4 et 5)

Les photos 1,2,3,4 et 5 montrent l'allure du mycélium après 5 jours d'incubation sur milieu PDA à 30 °C dans les boîtes de pétris, On observe aussi l'absence des contaminants dans le milieu. La tige filamenteuse ou conidiphore (photo 4) se fixe sur les hyphes (photo 1), portant les cellules conidiogènes (photo 5) ou conidies, avant maturité le conidiphore se termine par une extrémité ronflée (photo 3), à maturité cette extrémité devient globuleuse et parfaitement sphérique, elle peut mesurer 8 μm de diamètre, le conidiphore paraît libre sur la surface aérée. (photos 1,2,3,4 et 5). Les conidies ou spores libérées de la boîte de pétri sont mises en suspension dans l'eau distillée, puis les spores sont dénombrées sous microscope sur cellule de Mallassez (fig n°11); le nombre de spores était $6,2 * 10^5$ spores /ml.



Figure 11. Dénombrement des spores sur cellule de Mallassez (photo originale)

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

4.3 Croissance du microorganisme sur le matériel végétal.

Après 5 jours de fermentation (figure 12), on observe la surface des milieux de culture complètement envahit par les moisissures de couleur noire dont les spores s'étalent sur toutes la surface du milieu et les parois des l'Erlenmeyers.

Pendant la période de fermentation solide nous avons procédé quotidiennement à une agitation manuelle pour permettre aux microorganismes d'accéder à toute la quantité du substrat. Certaines observations ont été constatées durant la fermentation submergée, notamment le milieu de fermentation qui devient de plus en plus visqueux, puis il devient pâteux dans le cinquième jour de fermentation. à cet effet nous avons augmenté la vitesse d'agitation de l'incubateur agitateur, afin de permettre une aération efficace du milieu et d'augmenter les échanges gazeux entre le milieu de fermentation et le milieu extérieur.

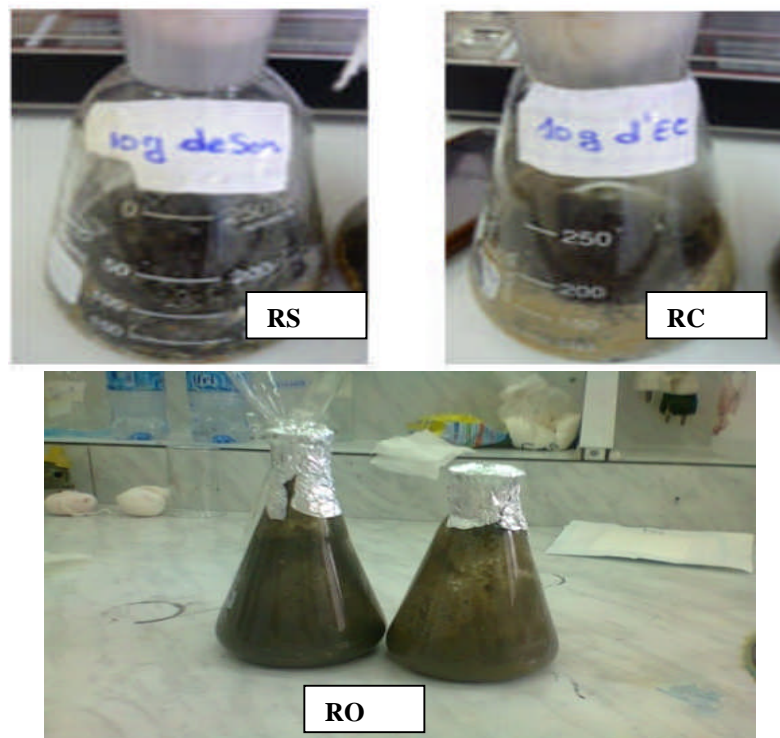


Figure 12. Les milieux de culture après 5 jours de frementation; RO: résidus d'oranges; RS: résidus de son; RC: résidus de citron.

En effet, dans le cas d'une fermentation accompagnée d'une modification importante dans les propriétés rhéologiques, une approche qui commence à être utilisée consiste à d'abord relier les propriétés rhéologiques du milieu à sa composition, par exemple à la concentration en microorganismes ou en polymères excrétés, puis corrélérer la diminution du K_L (coefficient de

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

transfert) à l'augmentation de la viscosité. Ce modèle de fermentation a été proposé par (Reuss 1983), pour la croissance sous forme dispersée du champignon filamenteux *Aspergillus Niger*. Il comporte d'abord une loi d'écoulement type pseudo-plastique pour caractériser l'évolution des propriétés rhéologiques du milieu.

$$\tau = K * \dot{\gamma}^n$$

Avec :

τ : la contrainte de cisaillement.

$\dot{\gamma}$: le taux de cisaillement.

Cette loi rhéologique fait intervenir deux paramètres :

L'indice de consistance Kc , et l'indice de comportement n , on définit une viscosité apparente n_{ap} fonction de la vitesse de cisaillement.

$$n_{ap} = Kc * \dot{\gamma}^{n-1}$$

Dans le modèle des relations sont proposées pour représenter la variation en fonction de la concentration cellulaire de ces deux paramètres rhéologiques (Engasser 1988):

$$Kc = 0,022 * X$$

4.4 Evolution de la biomasse (microorganisme) dans les milieux de fermentation submergée.

L'une des plus grandes difficultés de la fermentation solide, contrairement à la fermentation liquide, réside dans le dosage de la biomasse. La détermination directe de la biomasse en fermentation solide est très difficile à cause des contraintes pour séparer la biomasse microbienne du milieu de culture (Assamoi, et al. 2009).

C'est pour cette raison que nous avons procédé à une estimation de la biomasse dans les milieux de fermentation submergée par détermination de la matière sèche du gâteau obtenu après filtration de la totalité du milieu sur des filtres millipore de porosité 400 μ m. La croissance de la biomasse sur les trois résidus montre une phase de latence qui a duré 48 heures dans la moyenne pour les trois résidus (figure 13), un début de phase exponentielle est marqué par 5,3 g/l de biomasse dans les résidus d'oranges, 3,27g/l dans les résidus de citron et 5,6 g/l dans le son de blé; à la fin de la phase logarithmique, la biomasse atteint une valeur de 15,83 g/l dans les résidus d'oranges, 13,65g/6 dans le son de blé et 15, 92g/l dans les résidus de citron. Le taux de croissance maximum μ_{max} a été calculé selon la relation qui suit:

$$\frac{dx}{dt} = \mu dt$$

$\text{Log } x = \mu t + \text{Cst} = \mu t + \text{Log } x_0$ avec : x la biomasse au temps t et x_0 la biomasse à $t = 0$

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

$$\text{Log } x - \text{Log } x_0 = \text{Log } \frac{x}{x_0} = \mu t$$

Le taux de croissance maximale est de $0,2 \text{ h}^{-1}$ dans les résidus d'oranges, $0,012 \text{ h}^{-1}$ dans le son de blé et $0,024 \text{ h}^{-1}$ dans les résidus de citron.

Peu de travaux qui ont déterminé le taux de croissance des mycélium sur les résidus insolubles dans l'eau (comme la fermentation submergée) par la méthode de séchage du filtrat; vue qu'une partie de la biomasse peut s'introduire dans le filtrat. Par ailleurs certains auteurs comme (Schmidt, et al. 1995) ont étudié la croissance de l'*Aspergillus niger* en milieu liquide contenant la pectine comme source carbonée, le taux maximum de croissance obtenu était $0,16 \text{ h}^{-1}$.

A titre comparatif, on peut estimer que le taux de croissance le plus élevé est obtenu en utilisant les résidus d'oranges comme substrat, suivi par les résidus de citron et enfin le son de blé, par contre d'un point de vue macroscopique (figure n°12) il semble que le mycélium se cultive bien et d'une manière similaire sur les trois résidus utilisés.

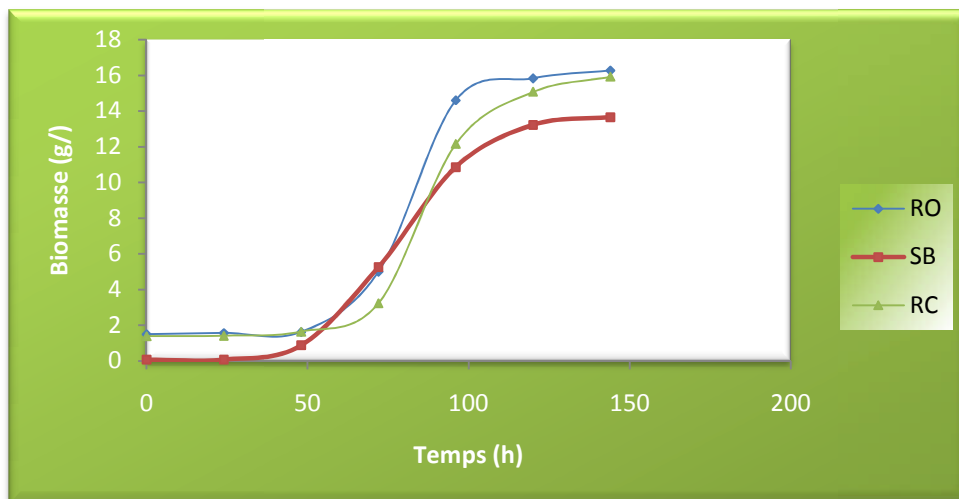


Figure 13. Croissance mycélienne sur le matériel végétal en fermentation submergée; RO: résidus d'oranges; RC: résidus de citron et SB: son de blé.

4.5 Caractérisation des extraits enzymatiques bruts.

Les extraits enzymatiques issus de la fermentation submergées étaient limpides comparativement aux extraits témoins dont la turbidité était 44 UN dans les résidus d'oranges, 42 UN dans les résidus de citron et 26UN dans les résidus de son des blé; après la période de fermentation la turbidité dans les extraits enzymatiques a baissé jusqu'à 11,85UN dans les résidus d'oranges, 10,5UN dans les résidus de citron et 10,23UN dans le son de blé; ces différences dans les valeurs des turbidités sont du peut être aux activités des enzymes hydrolytiques qui dégradent les particules responsables du trouble dans les extraits (figure 14).

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Les pH des extraits enzymatiques issus de la fermentation submergée et fermentation solide se rapprochent des valeurs, le pH est de l'ordre de 5,5 dans les extraits enzymatiques du son de blé et de l'ordre de 4,2 dans les extraits enzymatiques des résidus d'agrumes.



Figure 14. Aspect des extraits enzymatiques (EEB)

Tableau 6. Valeurs des activités enzymatiques dans les EEB

Parametre	Son de blé		Résidus de citron		Résidus d'oranges	
	FMSb	FMS	FMSb	F.MS	FMSb	FMS
Act. EndoPG (U/ml)	7,4±0.07	13,03 ± 0.05	7,44±0.07	8,2±0.069	8,26±0.05	23,8±0.01
Act. ExoPG (U/ml)	9,05±0.03	11,94±0.02	2,37±0.01	10,73±0.03	9,22±0.02	30±0.14
Act. PME (U/ml)	0,33±0.99	0,58±1.02	0,62±0.87	0,73±0.82	0,15±1.13	0,28±0.91
Act. PL (U/ml)	0,10±1.12	0,57±1.30	0,041±0.84	0,043±0.1.08	0,025±1.11	0,2±1.24
Protéines solubles (mg/ml)	40,27±0.03	65,97±0.00	6,48±0.01	7,83±0.00	8,5±0.02	19,4±0.001
Act spc endo PG (U/mg _{pr})	0.18	0,19	1,51	1,06	0,97	1,22
Act spc exoPG (U/mg _{pr})	0.22	0.18	0.36	1,37	1,07	1,54
Act spc PME (U/mg _{pr})	0,008	0,008	0,09	0,09	0,017	0,014
Act spc PL (U/mg _{pr})	0,002	0,008	0,006	0,005	0,002	0,001

U/mg_{pr}: unité par mg de protéines.

FMSB: fermentation en milieu submergé; **FMS**: Fermentation en milieu solide.

L'activité spécifique est égale à l'activité enzymatique (U/ml) / la teneur totale en protéines (mg/ml).

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

La biosynthèse des pectinases par des champignons et autres micro-organismes dépend de certains facteurs, parmi lesquels les composition du milieu nutritif, la température de culture, le pH initial du milieu, etc (Patil and Dayanand 2006). Dans notre étude comparative de production de pectinases en utilisant les résidus d'agrumes (citron et oranges) et résidus de céréales (son) de blé , les enzymes pectinolytiques ont été bien synthétisées dans les trois milieux de cultures (tableau n° 6), ces résidus agissent comme matrice de support et source de nutriments pour la production des pectinases.

On pense que la teneur en glucose du son de blé peut avoir facilité la croissance des champignons, en particulier lorsque les hyphes pénètrent dans le solide via les pores du substrat remplis de liquide, suivis de la synthèse de l'enzyme hydrolytique (Holker and Lenz 2005). Ismail (1996) a souligné que la bonne douceur et la faible cristallinité des écorces d'oranges râpés les prédisaient fortement pour la production de complexes multienzymatiques par biodégradation fongique. Il a été remarqué que la pulpe fraîche ou décongelée des résidus d'agrumes était d'avantage utilisée par les microorganismes pour la production des complexes enzymatiques par rapport à la pulpe séché, ce qui peut être attribué à l'effet profond de l'eau sur la structure de la cellulose (El Sheikh 2009). Browning (1963) a fait remarqué que la surface de la cellulose augmente considérablement lors du mouillage, par conséquent, cela augmente la sensibilité des matériaux cellulosiques à l'hydrolyse enzymatique ou acide, puis l'attaque microbienne.

4.6 Comparaison entre la synthèse des enzymes pectinolytiques dans le son de blé, résidus d'oranges et résidus de citron.

Les résultats rapportés dans le tableau n° 6 montrent que la production des pectinases dans les résidus d'oranges était la plus élevée, suivie par le son de blé puis les résidus de citron (figure n°15, 16, 17 et 18). Cette différence était nettement observée en fermentation solide (FMS) tel que l' endopolygalacturonase qui est 1,8 fois plus élevée dans les RO par rapport au son, et elle est 2,8 fois plus élevée par rapport au RC. L'extrait enzymatique des RO a réduit la viscosité d'une solution de pectine (à 1%) jusqu'à 83%, l'EEB du son de blé (Sb) a réduit la viscosité de la même solution de 75%, alors qu'une réduction de 64% a été obtenue par l'EEB des résidus de citron (RC). L'exopolygalacturonase a été aussi mieux synthétisées dans les résidus d'oranges (2,5 fois plus élevée par rapport au Sb), par contre on remarque que la lyase qui est une enzyme alcaline est produites en plus grandes quantités dans le Sb par rapport aux autres résidus, mais la différence de productivité de cette enzyme n'est pas assez considérable que celle observée pour l'endo PG et l'exo PG.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Des quantités différentes de pectinases ont été produites par plusieurs chercheurs en utilisant différents microorganismes ; *A.niger* (25 U/g) *P. italicum* (25 U/g) *P. frequentens* (3,4U/g), ces microorganismes ont été cultivés en FMS par Castilho, et al. (2000); Hours, et al. (1988) et Garzon and Hours (1992) respectivement; 35 U/g d'exopectinases ont été aussi produites en FMS par Solis-Pereyra, et al. (1996) en utilisant *A.niger*; Heerd, et al. (2012) ont pu obtenir 33,4 U/g d'endo PG , et 32,9 d'exo PG. Ismail (1996), a investi sur la production d'un complexe enzymatique contenant les pectinases, les xylanases, les cellulases et l' α amylase en utilisant six moisissures nommées *Aspergillus niger* (2,A), *Aspergillus niger* (A 20), *Aspergillus oryzae* (1911), *Memmoniella sp.*(6), *Penicillium chrysogenum* (3486) et *Penicillium oxalicum* (7), ces microorganismes ont été cultivés sur les résidus d'oranges comme seule source carbonée en FMSb. *L.A.niger* 20 a été le meilleur producteur d'enzymes: 56 U/ml de pectinases; 4,39U/ml de cellulases, 3,33 U/ml xylanases et 0,01 U/ml d' α amylase après 5 jours d'incubation à 30°C.

Dans les travaux antérieurs de Maller, et al. (2011) , le son de blé a été sélectionné comme meilleur substrat pour la production de la pectine lyase comparativement au marc de pomme et la pectine de citron. Une production élevée en polygalacturonase a été obtenue par Jahan, et al. (2017) dans un milieu contenant le son de blé à 1% à pH 7. La pectine lyase produite par *A. gigantus* avec des déchets d'oranges (Pedrolli and Carmona 2009) a également montré la plus forte activité dans des cultures âgées de 192 h. Plusieurs champignons montrent des niveaux élevés de production enzymatique dans la FMS; Cependant, cette fermentation nécessite une plus grande quantité de substrats. Par conséquent, des stratégies ont été développées visant à utiliser des substrats à faible coût pour induire la production d'enzymes par *A. niveus* (Maller et al. 2012); ce champignon avait une excellente production de PL dans cet état, jusqu'à 111 U / mL.

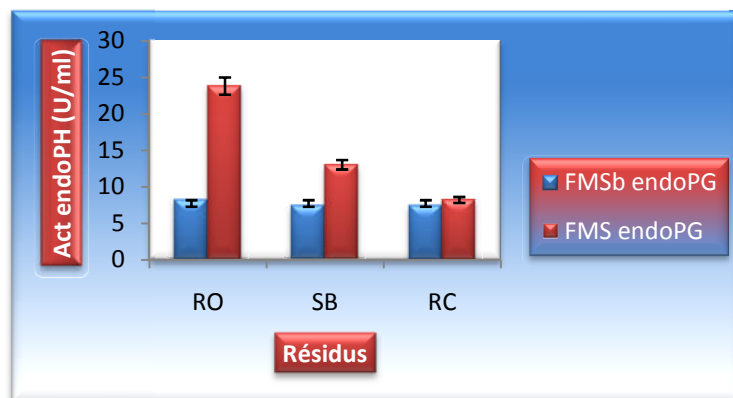


Figure 15. Activité de l'endoPG en fonction des résidus dans la FMS et FMSb

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

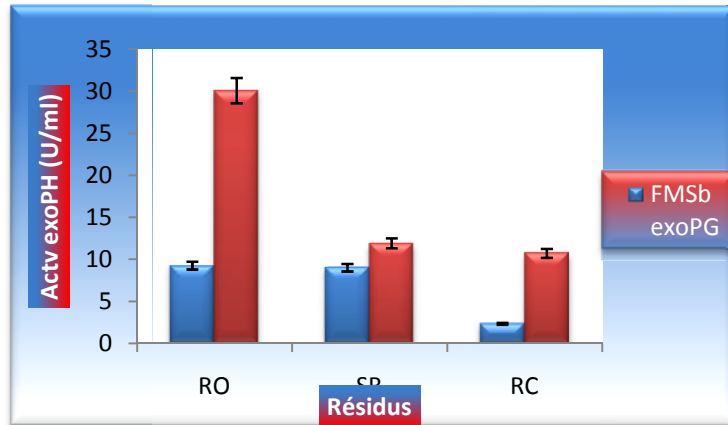


Figure 16. Activité de l'exoPG en fonction des résidus dans la FMS et la FMSb.

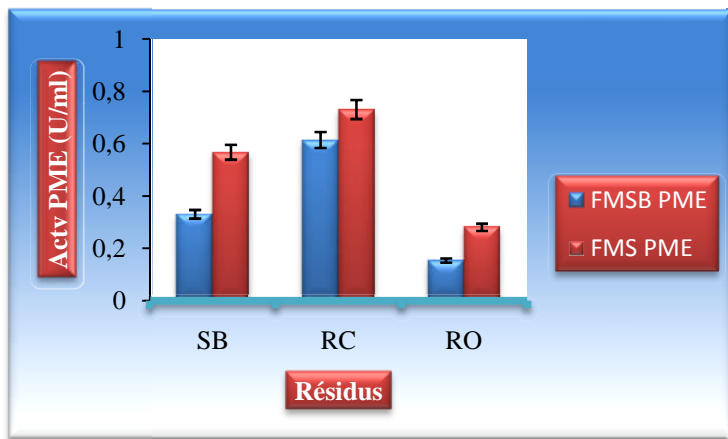


Figure 17. Activité de la PME en fonction des résidus dans les deux modes de fermentation FMS et FMSb

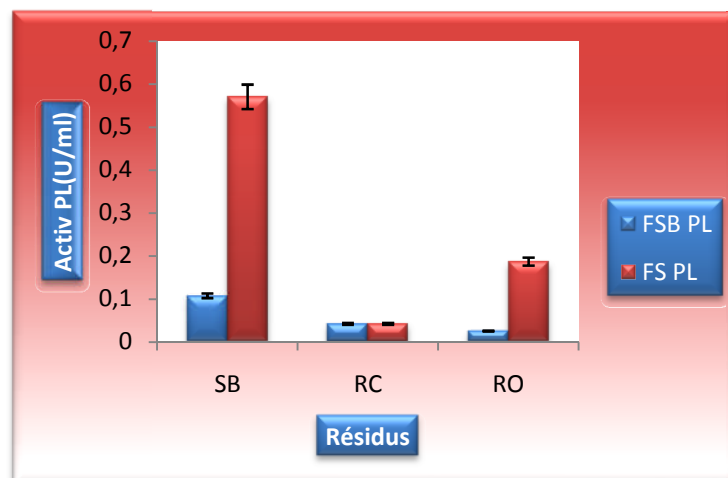


Figure 18. Activité de la PL en fonction des résidus dans la FMS et la FMSb

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Martin, et al. (2004) ont travaillé sur l'utilisation de la bagasse de canne à sucre mélangée avec le son de blé pour la production de la PL par *Moniliella sp SB9* et *Penicillium sp EGC5*. De plus, Silva, et al. (2005) ont décrit une production de PL de 41,30 U / mL par le *Penicillium viridicatum* en croissance dans le mélange de bagasse à l'orange et de son de blé. Auparavant, Silva, et al. (2002), avaient déjà rapporté que le meilleur substrat pour la production des pectinases est celui qui contient la pectine comme inducteur, dans leurs travaux un maximum de pectine lyase (2000 U/g) a été obtenu en utilisant un mélange de son de blé (riche en nutriments) et de résidus d'oranges (riches en pectine inductible); dans ce sens Shet, et al. (2018) ont montré que le mélange de paille de blé, résidus de citron et résidus d'oranges améliore la production de pectinases relativement à l'utilisation individuelle de ces résidus, l'activité obtenue en polygalacturonase était 5,38 U/ml. De leur côté, Sharma, et al. (2012) ont signalé que la production des polygalacturonases dans les résidus d'oranges est plus élevée que leur production dans le son de blé; cela peut être expliqué par le pH initial du milieu de fermentation et la teneur élevée en protéines et matières nutritives dans le son de blé. Il a été montré par certains auteurs comme Anvari and Khayati (2014) que le pH initial du milieu de culture est l'un des paramètres d'environnement les plus importants qui influent la croissance des cellules microbiennes et la production d'enzymes. 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. 2006).

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 and Mulimania 2007). L'effet du pH initial sur la production d'enzymes a été étudié par Anvari et Khayati, (2014) en ajustant le pH du milieu de 5 à 8. Bien que le pH de 5 à 8 favorisait la production de pectinases, 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 pectinases a fortement diminué à pH 7. D'après (Gummadi and Panda 2003), le pH optimal pour la production de pectinases par *A.niger* se situe à pH 4; Motwani, et al. (2013) ont estimé un pH de 3,5 pour la production de pectinases par *A.niger*; alors que Mrudula and Anitharaj (2011) ont estimé un pH de 5, et de leur côté Panda, et al. (2012), ont estimé un pH de 6 pour l'*A. flavus*. Mamma et al. (2007) ont rapporté qu'en se rapprochant de la neutralité (pH 7) d'autres enzymes hydrolytiques qui seront synthétisées comme les cellulases et xylanases.

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

Pa ailleurs il a été signalé que le rapport carbone sur azote (C / N) du milieu dans les fermentation en milieu solide (FMS) a un impact important sur les propriétés physiques du substrat (Casas Lopez, et al. 2003). Dans l'étude menée par Anvari et Khayati, (2014), l'effet de différents rapports C / N sur la production extracellulaire de pectinases par *A. niger* a été étudié. La production de pectinases la plus élevée (135,9 U / g) a été obtenue lorsque le rapport C / N était 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 pectinases au rapport C / N de 10: 1 n'a pas été statistiquement différente de celui du rapport C / N de 20: 1.

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

Dans les travaux d' Avari et Khayati (2014), 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 plus élevée dans la pulpe d'orange relativement à la pulpe de citron; d'après ces auteurs la pulpe d'orange a une teneur élevée en protéines, notamment la pectine, l'ajout de la pulpe d'oranges dans le milieu de base a fait augmenté la production en pectinases de 23%. Ceci indique que la pulpe d'orange pourrait être un inducteur approprié à comparer avec de la pulpe de citron pour la production des pectinases par fermentation en milieu solide. Aguilar and Huitrón (1990) avaient confirmé que la matière pectique induit la production de pectinases. Patil et Dayanand (2006b) ont également rapporté qu'une amélioration du rendement de pectinase peut être obtenue 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). Dans plusieurs travaux les résidus d'oranges ont été estimés comme substrat prometteur pour la production des pectinases à faible cout, à titre indicatif, dans les travaux de Sandhya and Kurup (2013), 287,22 (U/g) de pectinases ont été produites en utilisant les résidus d'oranges. Dans les travaux de Maller et al. (2011), en utilisant les résidus d'oranges, la production des pectinases a été améliorée 21 fois par rapport au milieu e base qui se constituait de pectine, et de 19 fois par rapport au milieu qui se constituait de glucose.

l'activité pectinasique spécifique est faible dans l'extrait enzymatique du Sb par rapport à celles obtenues dans les autres extraits (tableau n°6; cela signifie que d'autres enzymes majoritaires sont synthétisées par le microorganisme dans le milieu contenant le son de blé, c'est ce qui justifie la teneur élevée en protéines dans l'EEB du Sb. Par conséquent nous

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

considérons dans ce travail que les résidus d'oranges comme le meilleur substrat pour la production des pectinases par les *Aspergillus sp.*

4.7 Comparaison entre la production d'enzymes par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu submergé.

Dans les trois résidus (RO, RC et Sb) la production des pectinases est nettement plus élevée en FMS; elle est trois fois plus élevée dans les RO et une fois plus élevée dans les Sb. La production de pectinases par le *P. citrinum* en utilisant le son de blé comme source carbonée était 10 fois plus élevée par fermentation solide par rapport à la fermentation submergée (Mamma et al. 2007) de même Maldonado et al. (1998) avaient déjà montré que la production des pectinases par fermentation solide est 4 fois plus élevée que la fermentation liquide; la production de l'exoPG a été améliorée par la technique de fermentation solide dans les travaux de Solis Pereira et al., (1996), les mêmes observations ont été reproduites plus tard par Diaz-godinez, et al. (2001) .

D'après Solis Pereyra et al. (1996) la fermentation en milieu liquide est plus longue que la fermentation solide , ces auteurs ont décrit que les pectinases sont synthétisées après 48 heures à 72 heures en FMS, tandis qu'elles ne peuvent être obtenues qu'après 120heures en FMSb. Les observations de Trejo-Hernandez, et al. (1991) ont indiqué que l'ajout du saccharose améliore la production des pectinases en FMS, mais peut l'inhiber en milieu liquide par répression catabolique, dans les travaux de ces auteurs la production des pectinases en FMS était 10 fois mieux que FMSb. Effectivement plusieurs auteurs ont confirmé que la FMS est moins affectée par les répressions catabolique que la FMSb (Martin et al. 2004).

En plus des répressions catalytiques, l'existence de différences physiologiques entre la FMS et la FMSb est possible et peut être liée aux différents modes de production de pectinases pour chaque technique de fermentation (Maldonado et Saad 1998). En plus, l'agitation nécessaire pour l'homogénéisation des milieux liquides entraîne des contraintes de cisaillement que peu de souche mycéliens sont capable de supporter; en outre il n'ya pas de contraintes d'oxygénation en fermentation en milieu solide, le mycélium étant directement en contacte avec l'oxygène de l'air (Duchiron and Copinet 2011)

Il a été aussi rapporté que les pectinases produites par FMS sont plus stables et moins affectées par les variations de pH et de températures (Acuña-Argüelles, et al. 1994).

Conclusion

Les résidus d'oranges et de citron ainsi que le son de blé sont riche en matière organique et minérale, les résidus de citron et d'oranges sont particulièrement riches en substances

Chapitre I. Utilisation des résidus agroindustriels pour la production des pectinases. cas des résidus d'agrumes et du son de blé

pectiques et se caractérisent par un faible pH, tandis que le son de blé est particulièrement riche en protéines et fibres alimentaire, ces potentialités permettent aux microorganismes de se développer sur ces résidus en synthétisant des métabolites à faible cout par la biodégradation de la matière nutritive; ce qui permet de résoudre les problèmes environnementaux causés par ces résidus.

Le microorganisme utilisé pour la production des pectinases se développe bien sur les trois résidus, ces derniers constituent non seulement une source de nutriment mais un habitat naturel pour les microorganismes filamenteux comme *l'A.niger*; par conséquence cette étude nous a permis de confirmer que la fermentation en milieu solide s'adapte aux organismes mycéliens. la production des pectinases est plus élevée dans les résidus d'oranges par rapport aux deux autres résidus, l'utilisation de fermentation en milieu solide a amélioré la production de ces enzymes relativement à la fermentation en milieu submergé. Enfin nous estimons que *l'Aspergillus niger* utilisé est une nouvelle souche de microorganismes qui permet une production élevée en pectinases en utilisant les résidus d'oranges comme substrat en fermentation solide.

Chapitre II
Optimisation de Production des Pectinases par
Fermentation en Milieu Solide en Utilisant les
Résidus d'Oranges Séchés

Travaux antérieurs

Les premiers travaux sur la synthèse des pectinées par fermentation en milieu solide (FMS) étaient rapportés par Mushlkova, et al. (1978) en utilisant *A. awamori*, un peu plus tard, d'autres travaux ont été effectués par Ghildyal, et al. (1981), en utilisant le son de blé ensemencé avec *A. carbanerius* et qui ont obtenu des pectinases ayant des activités enzymatiques allant jusqu'à 120 U/g de substrat, mais ces travaux ne semblent pas avoir connu de suite, Oriol, et al. (1988).

Bien que la plupart des fabricants d'enzymes produisent des enzymes au moyen de techniques de fermentation en immersion (FMSb ou FML), il existe depuis peu un intérêt marqué pour l'utilisation de la fermentation à l'état solide (FMS ou FS) (Pandey, et al. 1999). La raison derrière ceci est citée par les avantages que cette technique (FMS) a sur FMSB (tableau 7). En ce qui concerne l'activité des pectinases, il en ressort que la FMS est plus rentable et que l'avenir inciterait à reconsidérer les applications de cette technique, ouvrant éventuellement de nouvelles branches de développement dans ce domaine (Ustok, et al. 2007).

Tableau 7. Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (Couto and Sanromán 2006; Holker and Lenz 2005; Raimbault 1998)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Faible cout. - Productivité plus élevée. - Meilleure circulation d'oxygène. - Les répressions cataboliques négligeables. - Absence de formation des mousses, donc non besoin d'anti mousses. - Il ressemble à l'habitat naturel de plusieurs microorganismes. - Moins d'effort pour le traitement en aval. - Technologie simple. - Demande d'énergie moindre pour le chauffage et la stérilisation. - Nécessite un volume de réacteur plus petit. - Moins de chances de contamination. - Fermentation de la matière insoluble dans l'eau. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté d'extrapolation à grande échelle. - Mélange non uniforme des nutriments. - Problèmes d'accumulation de chaleur. - Production élevée d'impuretés. - Le cout de récupération est plus élevée. - Contrôle difficile des paramètres du processus.

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais "solid-state fermentation ou SSF" est généralement

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre. C'est à dire que le substrat est humidifié par une fine couche d'eau qui entoure les particules, mais qui n'est pas suffisante pour former un mélange liquide, les proportions en poids d'eau/substrat en fermentation FMS sont généralement entre 1:1 jusqu'à 1:10 (Singh nee'Nigam and Pandey 2009). La FMS peut être définie comme un système avec une matrice de particules solides, une phase liquide qui leur est liée et une phase gazeuse piégée dans les particules. Les propriétés physiques de ce système, telles que le potentiel hydrique et la capacité de rétention d'eau (peuvent être utilisées comme indice d'aération) et la densité apparente (qui détermine le volume de l'espace poral) aident à définir les conditions de la fermentation à l'état solide (Singh nee'Nigam et Pandey, 2009). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Assamoi et ces collaborateurs (2009) ont expliqué la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide selon la proposition de Rahardjo, et al. (2006) illustrée par la figure 19.

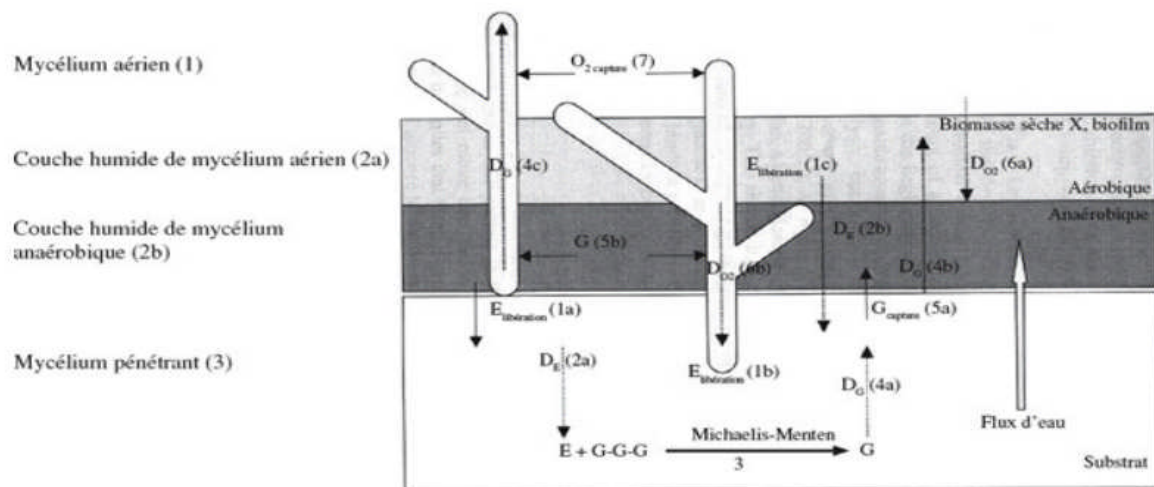


Figure 19. Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide d'après Rahardjo et al. (2006):

La libération d'enzymes hydrolytiques à l'interface du substrat; 1b: Libération d'enzymes hydrolytiques au bout des hyphes et le long du corps du champignon; 2a: diffusion des enzymes hydrolytiques dans la matrice du substrat; 2b: diffusion des enzymes hydrolytiques dans le biofilm; 3: hydrolyse de l'amidon par les enzymes suivant la cinétique de Michaelis- Menten en trois glucoses; 4a: diffusion du glucose dans la matrice du substrat; 4b: diffusion du glucose dans la matrice du bofilm, 4e: diffusion du glucose à travers les hyphes, 5a: diffusion du glucose dans le biofilm à à travers l'interface substrat- biomasse; 5b: glucose capté par les hyphes à travers l'eau du bofilm, 6b: difusion de l'oxygène à travers les hyphes; 7: oxygène capté par les mycéliums aériens

La colonisation du substrat par le champignon filamenteux se fait par extension des filaments appelés " hyphes " qui forment le mycélium. grâce à une solide structure de paroi cellulaire

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

aux extrémités et aux points de ramifications, ces filaments pénètrent la plus part des substrat à la recherche de leurs aliments (eau, ions substances nutritives etc..) à condition d'être toujours en aérobiose. L'accroissement des hyphes se fait par des extrémités (ou apex) où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et de dégradation du métabolisme dit "primaire", indispensable à la construction de la cellule du champignon (figure 20). Il y a en permanence des échanges entre l'intérieur et l'extérieur, échanges qui diminuent lorsqu'on s'éloigne des apex vers les régions les plus âgées. Ainsi, la moisissure secrète des exo enzymes hydrolytiques qui restent concentrées autour des zones de sécrétion permettant une progression plus efficace du mycélium dans le substrat (Duchiron and Copinet 2011).

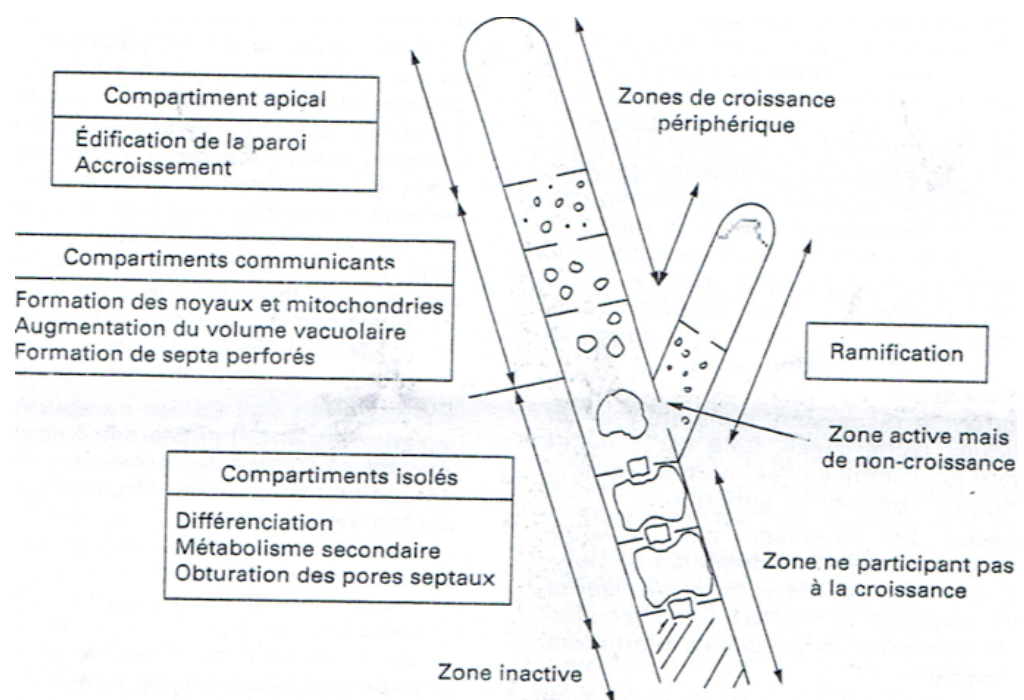


Figure 20. Les différents compartiments de l'hyphes et leur constitution à son développement fonctionnel **d'après** Cooke and Whipps (1993).

6.1 Les paramètres influençant la production des pectinases en fermentation sur milieu solide.

6.1.1 Le substrat solide

Les procédés de fermentations en milieu solide sont plus simples à mettre en place, mais bien plus difficiles à réguler que ceux en milieu liquide. Les substrats utilisés comme les coproduits notamment les résidus d'oranges sont insolubles dans l'eau, complexes et hétérogènes. Souvent, il est nécessaire de réaliser une préparation (par exemple : réduction de la taille des particules du substrat, complémentation en nutriments) et un prétraitement (par

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

exemple chauffage, destruction partielle de la flore autochtone) pour transformer le substrat brut en substrat accessible par le microorganisme (Duchiron and Copinet 2011). En fonction du substrat et du microorganismes utilisés, on adapte cette étape de transformation au procédé et on détermine les paramètres de développement du microorganisme (température, humidité, aération, pH) , le maintien de ces paramètres dépend aussi de l'équipement utilisé (Erlenmeyer, fermenteur).

En plus de ce qui a été cité dans le chapitre I, Les résidus d'oranges ont été utilisés de plusieurs façons pour la production des pectinases en fermentation solides: Dans un rapport récent, un mélange de pulpe d'agrumes (51,6%) et de bagasse de canne à sucre (48,4%) a été utilisé pour la production de pectinase par *A. oryzae* (Biz, et al. 2016). L'utilisation de zeste d'orange et de fibres de coco dans un rapport de 4: 1 a été rapportée dans la FMS pour la production des pectinases par l'isolât bactérien *Bacillus subtilis* SAV-21(Kaur and Gupta 2017). Poondla, et al. (2016) ont signalé que le gâteau d'écorce d'orange et de tourteau constituait un substrat solide important pour la production des pectinases par *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide de la méthode de surface de réponse. Biz et al. (2016) ont utilisé un réacteur à lit garni pour la production des pectinases en FMS en utilisant un pelage d'agrumes comme substrat solide. Un autre déchet d'agrumes, le marc d'orange, a été utilisé pour la production de pectinase par *A. niger* pa FMS (Mahmoodi, et al. 2017). Gayen and Ghosh (2011) ont utilisé le son de blé et la pelure d'orange dans un rapport de 1: 1 (p / p) pour la production de pectine méthylestérase par la FS.

6.1.2 La température du milieu

Patil and Dayanand (2006); Hendges, et al. (2011); Demir and Tari (2014); Barman, et al. (2015) et Wong, et al. (2016) ont obtenu la production maximale de polygalacturonase par les souches *d'Aspergillus* à 34°C-30°C, 37°C, 32°C,37°C et 33 ° C, respectivement. Jahan, et al. (2017) ont signalé une diminution de la production de pectinases jusqu'à 29 et 32% lorsque la fermentation était effectuée entre 40 et 45 ° C respectivement. Certains auteurs ont rapporté que l'influence de la température est associée à la croissance du microorganisme (Uzuner and Cekmecelioglu 2015) . Darah, et al. (2013) ont signalé que le taux de croissance fongique le plus élevé était à 30°C où la production enzymatique est maximale. Cependant, la température de production enzymatique et la température de croissance microbienne peuvent être différentes, comme indiqué par Demir et Tari (2014). Joshi, et al. (2006) ont signalé une température de production de 25 ° C pour une production maximale de pectine méthylestérase par *A. niger*. De même, Maldonado and Saad (1998) et Patidar, et al. (2016) ont utilisé une

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

température de 30 ° C pour une production maximale de pectine méthylestérase par *Aspergillus sp.*

Au cours de la fermentation solide , une élévation de la température dans la masse de fermentation due à un dégagement de chaleur métabolique peut aller de 20°C jusqu'à 80°C à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle respectivement, causant un assèchement de la culture et un abaissement de l' a_w et de la disponibilité des nutriments (Assamoi et al., 2008; Duchiron et Copinet, 2011). Plus le champignon filamenteux envahit le support, plus il génère de la chaleur via son métabolisme respiratoire; cette élévation de la température peut entraîner une dégradation des produits sécrétés dans le milieu et stopper la phase végétative de croissance. (Duchiron et Copinet, 2011). En outre la faible conductivité thermique du substrat et la non disponibilité d'eau libre qui facilite le transfert de chaleur dans le milieu, favorisent l'élévation de la température au dessus de la température d'incubation (Duchiron et Copinet , 2011).

6.1.3 Le pH initial du milieu de fermentation

Les activités métaboliques des microorganismes vont induire des modifications de pH dans le milieu de culture au cours du temps (acidification ou alcalinisation). Or, lorsque le substrat n'est ni agité ni homogénéisé pendant la fermentation, il semble difficile de contrôler le pH du milieu au cours du développement du microorganisme (Duchiron et Copinet, 2011). Les champignons filamenteux peuvent se développer dans un pH allant de 2 à 9 avec une gamme optimale de 3 à 6 (Duchiron et Copinet, 2011). Le pH acide favorise la croissance mycélienne alors qu'il ralentit le développement des bactérie, donc les risques de contamination du milieu seront diminués aux pH acides. La variation du pH dépend du type du microorganisme (Demir et Tari, 2014). Raimbault (1998) a rapporté qu'avec *l'Aspergillus niger sp. Penicilium sp. et Rhizopus sp.*, le pH chutera rapidement à 3, tandis que le *Trichoderma sp., Sporotricum sp., et Pleurotos sp.* gardent le pH stable entre 4 et 5. En revanche certains substrats solides ont des propriétés dites tampon, ils sont moins susceptibles aux variations du pH pendant les processus métaboliques. Cependant il est parfois nécessaire de formuler un milieu ayant une capacité tampon compatible avec la croissance et les activités métaboliques du microorganisme (Krishna 2005). Les chercheurs préfèrent taponner les milieux de fermentation solide par les mélanges adéquats de composés azotés (les sels d'ammonium, l'urée), les sels de calcium ou les bases.

En utilisant ces méthodes, (Mamma, et al. 2008) ont rapporté que le pH initial influe beaucoup la production de polylacturonase par *l'A. niger*, le pH optimum trouvé dans leurs

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

travail se situait entre 4 et 5. De leurs tours Patil and Dayanand (2006) ont trouvé un pH optimal pour la production de l'endopolygalacturonase par *A.niger DMF45* qui se situe à 6,5. El-Sheikh, et al. (2009), ont trouvé que le pH optimal de production de la PG par l'*A. niger sp.* cultivé sur les résidus d'oranges fraîches se situait de 5 à 5,5; tandis que celui enregistré par Martos, et al. (2009) était 4,5.

6.1.4 Influence de l'aération et de l'oxygène.

En fermentation solide, la conduction et le transfert de chaleur se font difficilement entre les substrats végétaux et l'air. L'aération devient donc un paramètre incontournable surtout s'il s'agit d'une culture fongique, car ces microorganismes aérobies ont besoin d'un apport continu en oxygène pour coloniser les substrats (Duchiron et Copinet, 2011). Le développement pourra se faire également à l'intérieur, entre particules de substrat, si l'air présent a une teneur suffisante en oxygène. L'aération va donc avoir deux rôles importants. Elle sert à l'apport d'oxygène pour le métabolisme aérobie et à l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, chaleur, vapeur d'eau et des composés volatils) (Chahal 1983; Tabak Henry and Bridge Cooke 1968).

L'aération d'un système de culture en milieu solide peut assécher le substrat si celle ci n'est pas couplée à un apport en eau. Il faut donc réguler la température et le débit du flux de l'air en fonction de la teneur en eau que l'on souhaite conserver dans le milieu de culture (Duchron et Copinet, 2011).

La régulation d'air doit tenir compte du développement mycélien en surface mais aussi dans le substrat. En effet, lorsque le champignon filamenteux se développe entre les particules de substrat, celui ci, produit de l'eau et consomme une partie du substrat, ce qui a pour conséquence de modifier la structure des particules qui forment la couche du substrat; on peut alors observer des changements dans la porosité du substrat et des tassements de la matrice avec la formation de "chemin préférentiel" pour réduire le passage de l'air. La présence d'eau supplémentaire et ces passages préférentiels peut réduire le passage de l'oxygène gazeux dans le substrat et donc réduire et voir stopper, la croissance de la moisissure (Duchiron et Copinet, 2011).

6.1.5 Effet de la vitesse d'agitation

Demir et Tari, (2014) ont corrélé positivement l'agitation à l'aération du milieu de fermentation solide; tel qu'ils ont signalé que l'agitation améliore le transfert d'humidité et les échanges gazeux.

Avec une fréquence d'agitation de 3 fois par jour, Demir et Tari (2014) ont observé une amélioration dans l'activité endopolygalacturonasique de 17,2 fois comparée à son activité dans le milieu statique. Une amélioration significative dans l'activité spécifique a aussi été obtenue (73,8%); ce qui facilite la purification de l'enzyme tout en évitant de passer par les étapes complexes de purification

6.1.6 Influence de la teneur en humidité et activité de l'eau.

D'après Oriol et al. (1988), l'eau en fermentation solide se trouve sous forme d'une :

- Zone monocouche où l'eau est fortement liée à la surface du solide et où l'enthalpie de vaporisation est très supérieure à celle de l'eau pure.
- Zone multicouche où les niveaux d'énergie diminuent et où l'eau est de moins en moins liée (enthalpie de vaporisation est presque égale à l'eau pure)
- Une zone dite de condensation capillaire qui correspond à l'eau libre.

Les travaux pionniers d'Oriol et al. (1988), ont montré l'importance cruciale de l'eau dans le processus de FMS, l'eau intervient dans les réactions nécessaires à la croissance du mycélium; elle intervient aussi en tant que véhicule des enzymes, des nutriments et des métabolites secondaires. Les techniques en résonance magnétique nucléaire (RMN) de proton permettent de définir un point de métabolisation d'un soluté, qui correspond à la quantité d'eau minimum présente dans un corps pour laquelle on commence à observer les phénomènes de solvations, ainsi le point de mobilisation de glucose dans le manioc de pomme de terre est de 22 g d'eau /100g d'amidon (Oriol et al. 1988).

Puisque l'activité biologique des microorganismes cesse en dessous d'une teneur en humidité d'environ 12%, cela établit la limite inférieure à laquelle la FMS peut avoir lieu; la limite supérieure est une fonction d'absorption et donc la teneur en humidité varie avec le type de matériau du substrat (Singh nee Nigam et Pandey, 2009). Par conséquent, les principaux facteurs clés déterminant les résultats des processus de la FMS sont la teneur en humidité et les taux d'humidité relative (Losane, et al. 1992).

Tout au long du processus de fermentation le niveau d'humidité subira des changements avec le développement du microorganisme (le phénomène de respiration conduit à la production d'eau; de plus l'aération et l'augmentation de la température du milieu peuvent conduire à l'assèchement du substrat). Ainsi la quantité d'eau devient insuffisante pour la diffusion des nutriments et des gaz, le métabolisme cellulaire ralenti ou s'arrête à cause de l'absence de substrat ou à cause d'une forte concentration en métabolites dans ou près de la cellule (Gervais, et al. 1988). Une quantité d'eau insuffisante ne permet pas non plus de maintenir les

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

propriétés fonctionnelles de certaines enzymes, à la perméabilité de la membrane plasmique ou le gonflement du substrat (Lozane, et al. 1985) . Des teneurs en humidité plus élevées que la teneur optimale en eau ont également des effets néfastes sur la croissance du microorganisme, puisqu'ils conduisent à l'agglomération des particules qui composent le substrat, et donc à la limitation du transfert de gaz (Growthaman, et al. 2001).

En général, la teneur en eau des fermentations en milieu solide varie de 30 à 85% (Raimbault 1998). Pour les bactéries, l'humidité contenue dans le substrat solide doit être supérieure à 70% et dans le cas des champignons filamenteux la teneur optimale est comprise entre 40% et 70% (Blandino, et al. 2002) . Cependant, selon la capacité de rétention en eau du substrat utilisé la teneur en eau est très fluctuante, tel qu' une culture d'*Aspergillus niger* sur substrat amylicés tel que le manioc (Raimbault and Alazard 1980) et le son de blé (Nishio, et al. 1979) a une teneur en eau optimale bien inférieure à la pulpe du café de l'ordre de 40 % contre 80 % ; aussi la bagasse de canne à sucre (Roussos, et al. 1991) ; Dans les travaux de Demir et Tari, (2014) la teneur optimale en eau pour la croissance de l'*Aspergillus sojae* était à 62 % dans un milieu à base de son de blé, l'activité spécifique de la polygalacturonase la plus élevée a été obtenue à des teneurs en humidités comprises entre 40 % et 50 %.. Les besoins en eau pour différentes espèces d'*Aspergillus* cultivées sur le tournesol asséchées étaient de 65 % (Patil et Dayanand, 2006); La teneur optimale était 70 % dans le son de blé (Freitas, et al. 2006) et 50 % dans le marc de pomme (Alcantara, et al. 2010).

Ces fluctuations dans la teneurs en eau optimale dépendent du substrat et de sa capacité d'absorption d'eau. C'est pourquoi certains auteurs définissent les besoins en eau des microorganismes en terme d'activité de l'eau. a_w .

L'activité de l'eau a_w est un paramètre thermodynamique défini en relation avec le potentiel chimique de l'eau (Duchiron et Copinet, 2011). elle peut être défini comme le rapport de la pression partielle de vapeurs d'eau dans le substrat (p) sur la pression partielle de vapeur d'eau pure (p_0) à la même température, elle est corrélée également à l'humidité relative (Duchiron et Copinet, 2011):

$$a_w = \frac{HR}{100} = \frac{p}{p_0}$$

La valeur a_w requise pour la FMS varie en fonction du microorganisme, mais il est généralement recommandé que cette a_w soit suffisante pour permettre la croissance du mycélium à travers les particules de substrat solides sans désintégration des particules (Nigam and Singh 1994). Selon ces auteurs, des microorganismes ayant une activités microbiennes à des valeurs de a_w faibles conviennent au processus FMS. Les bactéries se développent

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

principalement à des valeurs de a_w élevées d'environ 0,9, tandis que les levures se développent à des valeurs de 0,8 et les champignons filamenteux sont adaptables à des valeurs de a_w plus faibles comprises entre 0,6 et 0,7.

Acuua-Arguelles, et al. (1995) ont utilisé l'éthylène glycol, le sorbitol et le glycérol comme inhibiteurs de l'activité de l'eau pour étudier l'effet de l'activité de l'eau sur la Production des pectinases par *Aspergillus niger* CH4. L'éthylène glycol a déprimé l' a_w sans favoriser la croissance ni avoir une forte incidence sur la production des pectinases dans les cultures en boîtes de Pétri. Ce dépresseur a été utilisé pour évaluer l'influence de l'activité de l'eau sur la production d'exo-pectinase par FMS. Il a été constaté que bien que la production des pectinases diminue aux faibles valeurs de a_w , cette activité était présente à des valeurs de a_w aussi faibles que 0,90. L'activité spécifique a augmenté jusqu'à 4,5 fois par réduction de a_w de 0,98 à 0,90; Les groupes réducteurs se sont accumulés de manière extracellulaire suggérant un transport du sucre limitation à la suite d'une dépression.

6.1.7 Influence de la taille des particules

la taille des particules du substrat à utiliser est l'une des variables majeures du développement du processus en FMS (Singh nee'Nigam and Pandey 2009). Il a été rapporté que l'augmentation de la surface des fines particules favorise l'action des enzymes (Moloney, et al. 1984). Les particules plus petites fournissent une plus grande surface qui facilite le transfert de chaleur et les échange de gaz; les fines particules distribuent également une concentration d'humidité équivalente dans des films plus minces sur les surfaces externes exposées à l'environnement gazeux, avec la même fraction de volume vide (porosité) et la distribution de la taille des pores. Les pores internes conservent les mêmes rapports surface / volume par rapport aux surfaces solides, en tenant compte des considérations géométriques des particules sphériques. Il en résulte des concentrations de nutriments de surface plus élevées et la diffusion des nutriments se fait par des voies plus courtes sur les surfaces ainsi que dans les pores des substrats présentant une certaine tortuosité (Nigam et Pandey, 2009).

La croissance la plus importante des cultures fongiques a été stimulée par des substrats de plus petites tailles, une productivité enzymatique plus élevée dans la FMS a été réalisée avec des substrats contenant des particules de tailles mélangées allant de 180 μm à 1,4 mm. (Nigam et Pandey, 2009).

Cependant, les particules du substrat en FMS doivent être de taille appropriée mais ne doivent pas être trop petites afin d'éviter l'agglomération des particules; une taille de particule trop petite peut entraîner une densité de tassement plus étroite des substrats et l'espace vide entre

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

les particules devient considérablement réduit, et par conséquent cela peut devenir une limite inférieure de la taille des particules à laquelle le transfert de chaleur ou l'échange de gaz devient Limité.

Balkan and Ertan (2007) ont souligné que la taille optimale des particules des résidus agroindustriels, destinés à la production des enzymes, dépend du matériau lui-même.

Dans les travaux de Demir et Tari (2014), la sélection des particules du son de blé ayant des tailles allant de 150 μm à 250 μm , a augmenté la productivité en pectinases de 40%.

Patil et Dayanand (2006), ont sélectionné les particules des résidus de tournesol ayant une taille de 500 μm pour la production d'exopectinase en FMS.

6.2 Optimisation de la production des pectinases en FMS.

L'optimisation des conditions de culture est très importante car elle améliore la productivité, l'économie et la praticabilité du processus (Chen, et al. 2002; Souza and Roberto 1999). La stratégie d'une seule variable à la fois prend non seulement du temps, mais étant unidimensionnel, cela peut également donner lieu à une interprétation erronée des conditions optimales (Box, et al. 1978; Cochran and Cox 1957). La méthodologie de surface de réponse (MSR) a récemment attiré l'attention comme technique d'optimisation dans le domaine de l'analyse numérique est une technique statistique puissante (Box and Wilson 1951), cette méthode réduit la consommation de temps et de main d'œuvre et moins d'expériences sont nécessaires pour donner des résultats encore meilleurs. La caractéristique attrayante est que cette méthode prend toutes les interactions entre les variables indépendantes en compte et elle les quantifie (Sharma, et al. 2014). Sharma et ses collaborateurs (2011) ont signalé une augmentation de 4,2 fois dans la production des pectinases dans des conditions en culture submergées optimisée en utilisant MSR. En 2014 ces mêmes auteurs ont optimisé par la MSR les facteurs du temps d'incubation, teneur en humidité et la concentration en sulfate d'ammonium pour la production des pectinases alcalines et thermo tolérantes par une *Pseudozyma* sp. en utilisant les résidus d'agrumes en FMS (Bibi, et al. 2016) ont aussi utilisé la MSR pour optimiser les conditions de fermentation submergée pour la production des pectinases par le *Bacillus licheniformis*. Anvari and Khayati (2014), ont étudié par la méthode de table orthogonale de Taguchi l'influence de 4 facteurs (le pH initial du milieu de fermentation, type du substrat solide et de pulpe d'agrumes, le rapport source carbonée sur source azotée (C/N) et les différents niveaux de pulpe d'agrumes) sur la production des pectinases en FMS, il résulte de cette étude que la concentration en résidus d'oranges et le type du substrat solide sont les facteurs les plus influençant le système. En utilisant la MSR,

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

Li, et al. (2014b) ont constaté que la concentration en chlorure d'ammonium et la température d'incubation ainsi que leurs interaction sont les paramètres les plus influençant sur la production des pectinases par le *Penicillium oxalium* cultivé sur les écorces d'oranges; les valeurs optimales de ces facteurs étaient 36,5°C pour la température, 1,12 g/l pour le chlorure d'ammonium. Barman, et al. (2015), ont pu optimiser la température et le temps d'incubation (qui étaient 32,37°C, 65,82 h) en utilisant la MSR pour la production des pectinases par *A.niger* cultivé sur les peaux des bananes. Buyukkileci, et al. (2015) ont optimisé la concentration en écorces d'oranges, sulfate d'ammonium et la taille de l'inoculum pour la production d'exoPG en FMSB. Chen et al., 2014 ont pu améliorer la production de protpectinases jusqu'à 270 U/ml en utilisant la MSR par *A.oryzae* cultivé sur le marc de pommes. De leurs cotés, Martos et al., (2009) ont utilisé la MSR pour l'optimisation de la production d'une polygalacturonase et pectinmethléstérase ; les conditions optimales étaient: pH 4,1; 20g/l et 94 h de temps de fermentation. La production maximale des pectinases obtenue par Suresh and Viruthagiri (2010) en utilisant la MSR, était dans un milieu qui se composait de 90 % de son et 10% de sucre de bagasse de canne à sucre pendant 96 h à 40°C , pH 4. Les conditions de culture optimales obtenues par MSR pour la production des pectinases par le *Penicillium SPC- F-20* étaient 30°C, pH5, et 1% de pectine (Mathew, et al. 2008). La production des pectinases par des espèces d'*Aspergillus sojae* isolées a été optimisée en utilisant les plans d'expériences; les effets de la composition du milieu tel que l'inoculum, le niveau de l'humidité , la durée de l'incubation et la température ont été étudiés en FMS; l'utilisation des résidus agroindustriels a permis la mise en place d'un processus rentable et durable pour la production d'enzymes pectinolytiques, le rendement le plus élevé en pectinases a été obtenu par *A. sojae* ATCC20235 après 8 jours à 30 °C en appliquant 30% de pulpe de betterave à sucre en tant que substrat inducteur en combinaison avec le son de blé mouillé à 160% avec Hcl à 0,2M (Heerd, et al. 2012). Certains facteurs microbiologiques (l'âge de l'inoculum, l'âge des inclinés et la quantité de l'inoculum) ont été optimisé par la MSR pour la production des pectinases par *A.niger* (Panda, et al. 1999a). La synthèse des pectinaes par *Aspergillus niger NCIM548* a été amélioré de 40 % en optimisant la source azotée et la source carbonée (Nair and Panda 1997).

Le milieu de culture optimal pour la production des pectinases par les *Enterobacter sp. PSTB-1* se composait de NaNO₃ (2,0g/l); KCL (0,5g/l); KH₂PO₄ (1,0g/l); MgSO₄.7H₂O (0,5 g/l); 1g/ d'extrait de levure et 5 g/ l de résidus de mangues (Reddy and Saritha 2016).

6.3 Méthode surface de réponse (MSR)

La MSR est constituée d'un groupe de techniques statistiques et mathématiques pouvant être utilisés pour définir les relations entre la réponse et la variable indépendant. La MSR définit l'effet des variables indépendantes sur les processus. En plus des analyses des variables indépendante, cette méthodologie génère également un modèle mathématique. La représentation graphique du modèle mathématique a conduit à un terme de surface de réponse. La relation entre la réponse et la variables ou entrées est comme suit:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) + \varepsilon$$

y est la réponse; f est la fonction inconnue; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ dénotent les variables indépendantes appelées aussi variables naturelles. ε est l'erreur statistique que représentent autres sources de variables non prises au compte par f les sources incluent les effets tels que l'erreur de mesure (Baş and Boyacı 2007).

IL est possible de classer une étude expérimentale en utilisant la MSR en trois étapes; la première étape est le travail préliminaire dans lequel les paramètres et leurs niveaux sont déterminés; la seconde étape est la sélection du design expérimental et puis prédiction et vérification de l'équation du modèle; la troisième étape consiste à un tracé de surface de réponse et de contour de la réponse en fonction des paramètres indépendante et une détermination des points optimaux (Baş et Boyacı 2007).

6.3.1 Détermination des variables indépendantes et leurs niveaux

Les processus chimiques et biochimiques sont affectés par nombreux paramètres, car il n'est pas possible d'identifier les effets de tout les paramètres, il est alors nécessaire de sélectionner les paramètres ayant des effets majeurs. à ce effet, dans cette étape le plan factoriel est utilisé pour savoir quels sont les facteurs et interactions qui ont réellement une action sur la réponse.

Puis on détermine les niveaux des paramètres, cette étape est très importante et sensible, elle est liée directement à la réussite et la précision de l'optimisation (Baş et Boyacı 2007).

Les unités des paramètres généralement ne sont pas les mêmes, elles diffèrent l'une de l'autre, donc elles affecteront la réponse à des échelles différentes et non uniformes, pour soulever ce problème des unités, il est indispensable de normaliser les variable pour pouvoir faire une analyse de régression. La codification des variables permet de les faire varier de -1 à +1 afin qu'elles affectent tous la réponse uniformément (Baş et Boyacı 2007). L'équation qui suit permet de codifier les variables:

$$x = \frac{X - [X_{\max} + X_{\min}]/2}{[X_{\max} - X_{\min}]/2}$$

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

avec x est la variable codée et X_{max} , X_{min} sont les valeurs maximales et minimales pour les valeurs naturelles.

L'étude des facteurs influençant le modèle nous permet d'obtenir une équation du premier degré, cette équation est aussi capable de fournir une indication sur la direction vers laquelle se situe l'optimum (méthode de la ligne de plus grande pente, (figure 21). On réalise ensuite des expériences sur cette direction jusqu'à ce que la réponse y ne soit plus améliorée. Tant que l'équation du 1er degrés est applicable la ligne de plus grande pente est perpendiculaire au réseau des courbes d'isoreponses . Au voisinage de l'optimum l'équation du premier degrés n'est plus valable et la ligne de plus grande pente perd sa propriété, la localisation de l'optimum nécessite une autre démarche expérimentale d'ou l'établissement d'un nouveau plan. Enfin, à partir du meilleur point de cette droite de la plus grande pente, on s'efforce de mieux cerner l'optimum en réalisant un nouveau plan dont le domaine expérimental doit contenir l'optimum et spécialement conçu pour cette localisation ; les plans les plus fréquemment utilisés, sont les plans composites centrés (figure 22).

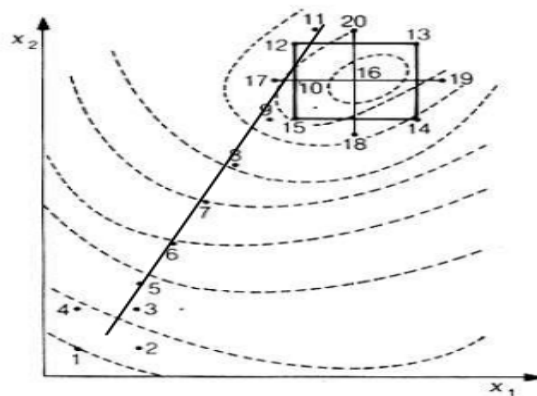


Figure 21. Chemin vers l'optimum:

Le plan factoriel 2^2 initiale correspond à 4 essais 1,2,3,4.; les essais 5,6,7,8,9,10,11, sont les essais des points expérimentaux de la ligne de plus grande pente; les essais numérotés de 12 à 20 sont ceux du composite centré pour localiser plus précisément l'optimum; le point 16 est le centre du domaine et lui correspond plusieurs répétitions.

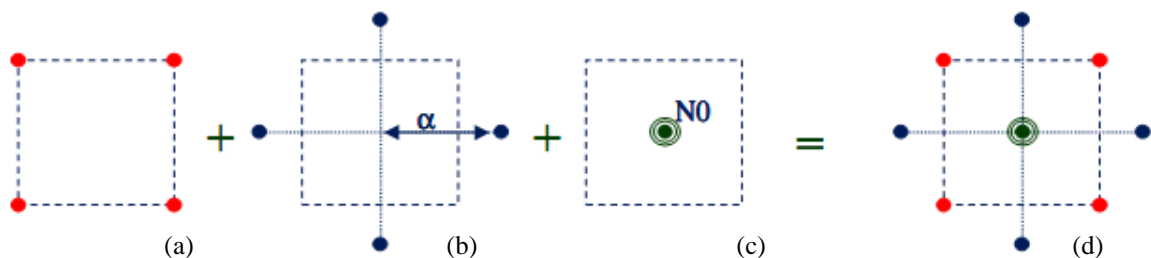


Figure 22. Démarche pour la construction d'un plan composite centré:

Exemple avec 2 facteurs; (a): plan factoriel à deux facteurs et deux niveaux; (b) ajout des essais dans les points étoiles; (c) ajout des essais aux points nuls dans le centre du domaine; (d) plan composite centré.

Le plan factoriel est formé de toutes les combinaisons des niveaux, minimum, milieu et maximum des facteurs (k), le nombre des essais dans le plan factoriel à deux niveaux (N_f) est 2^k , ainsi pour deux facteurs nous aurons 4 essais (figure 22 (a)).

Le nombre des essais étoiles (N_α) est égal à $2k$ (fig 22 (b)), se sont les points qui se situent à une distance α du centre du domaine. La valeur de α dépend des propriétés statistiques désirées pour le plan, ainsi pour un plan rotatable (le plus utilisé) $\alpha = \sqrt[4]{N_f}$; en prédiction α assure dans ce plan l'isovariance par rotation (rotatabilité) du plan pour l'estimation d'un modèle d'ordre 2 (figure 23).

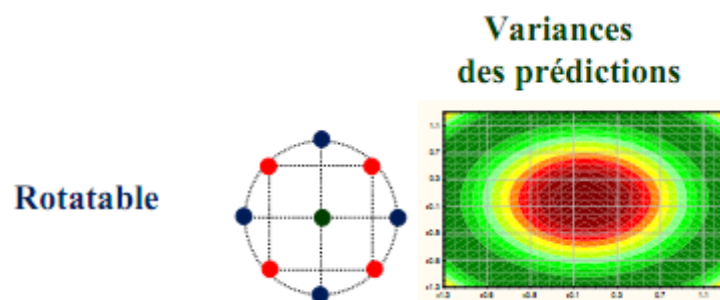


Figure 23. Exemple d'un plan rotatable à deux facteurs

Le nombre des essais aux points nuls est (N_0) varie de 4 à 8 essais selon les moyens de l'utilisateur, se sont les essais de répétitions au centre du domaine.

Un plan composite de base a ses essais sur les axes hors du domaine ($-\alpha, +\alpha$), il est usage de le remettre à l'échelle (figure 24).

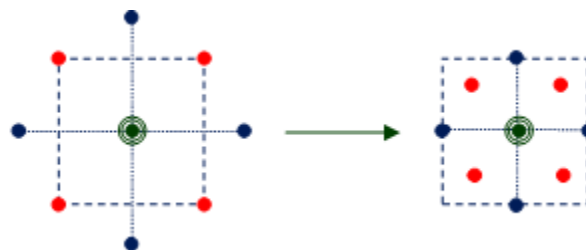


Figure 24. Remise à l'échelle du plan composite centré

6.3.2 Sélection du design expérimental, prédiction et vérification du modèle de l'équation.

Certains ordinateurs offrent des conditions optimales basées sur les critères spéciaux et les entrées de l'utilisateur, ces conceptions diffèrent les uns des autres par le choix des points expérimentaux, le nombre de blocks et de pistes.

Après sélection de la conception, l'équation du modèle et les coefficients de l'équation du modèle sont prédites. Le modèle utilisé en MSR est généralement complet quadratique "full quadratique équation". Le modèle du deuxième degrés peut être écrit comme suit: (Baş et Boyacı 2007)

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_{jj}^2 + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j$$

$\beta_0, \beta_j, \beta_{jj}$ et β_{ij} se sont les coefficients de régression; coefficient d'interception, linéaire, quadratique et coefficient d'interaction respectivement.

x_j, x_j se sont les variables indépendants en valeurs codées.

La matrice du modèle est donnée par le système d'équation suivant:

$$y = \beta x + \varepsilon$$

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2k} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \beta_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

Le système d'équation ci dessus est résolu par la méthode des moindres carrés qui est une méthode à régressions multiples. Dans la méthode des moindres carrés, on suppose que les erreurs aléatoires sont identiques et distribuées avec une moyenne nulle et une variance inconnue commune, elles sont indépendantes les unes des autres . La différence entre les valeurs observées et les valeurs prédites pour l'observation i est égale à $\varepsilon_i = Y_i - \tilde{Y}_i$ appelé résiduel.

Le critère de choix de la valeur des coefficients β_i est de minimiser la somme des carrés des résiduels qui sont aussi appelés la somme des carrés des erreurs notés SSE.

$$SSE = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum (Y_i - \tilde{Y}_i)^2$$

Les résiduels: $\varepsilon = y - x\beta$

Après avoir obtenu les coefficients de régression, l'estimation de la réponse peut aisément être calculée par le modèle de l'équation, puis on procède à la vérification de l'adéquation du modèle par le coefficient R^2 qui représente la capacité prédictive globale du modèle calculé à partir du PRESS, on vérifie aussi l'adéquation par l'analyse des résidus, les résidus d'échelle ou bien l'erreur des prédictions des sommes des carrés (EPSS), comme on peut avoir une estimation de l'adéquation du modèle par le tracé des résultats expérimentaux par rapport aux résultats prédictifs du modèle , dans le cas d'une bonne adéquation on obtient une droite qui passe par l'origine avec un angle de 45° (Baş et Boyaci 2007). Représentation graphique du modèle d'équation et détermination des opérations optimales.

La visualisation du modèle produit peut être obtenu par le tracé de la surface de réponse ou le tracé des contours. La surface de réponse est en trois dimensions montrant la relation entre les

réponses et les variables indépendantes. L'affichage de la surface en deux dimensions est appelé courbe de contours. Dans les tracés des contours les lignes de réponses constantes sont tracées dans les plans des variables indépendantes, les courbes des contours aident à visualiser la forme d'une surface de réponse. Parfois les courbes affichent les éclipses ou cercles, le centre du système est une référence au point maximale ou minimale du système. Le tracé du contour peut afficher une hyperbole ou parabole, dans ce cas le point fixe est appelé point de selle, il n'est ni le maximum ni le minimum.

Le point stationnaire (point minimum ou maximum) dans l'équation du second degré est le point où la première dérivée de la formule est égale à zéro.

$$y = f(x_1, x_2) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Le point stationnaire est calculé comme suit: dy/dx_1 , dy/dx_2 ,...

$$dy/dx_1 = \beta_1 + 2\beta_{11}x_1 + \beta_{12}x_2 = 0$$

$$dy/dx_2 = \beta_2 + 2\beta_{22}x_2 + \beta_{12}x_1 = 0$$

Le système d'équation est résolu pour trouver les valeurs de x_1 et x_2 . Le calcul de ces valeurs indique les valeurs codées des paramètres indépendants qui donnent la valeur la plus élevée ou la plus faible de la réponse. Pour l'optimisation le point stationnaire doit être déterminé dans la zone des points testés (Baş et Boyaci 2007).

Matériel et méthodes

7.1 Préparation des résidus d'oranges séchés.

Dans cette partie de travail les résidus d'oranges ont subi les mêmes traitements préliminaires que ceux déjà décrits dans le chapitre I, puis les résidus ont été séchés dans une étuve à circulation d'air à 50°C jusqu'au poids constant, puis broyés à l'aide d'un broyeur type "Roussell Hopps". La poudre obtenue a été analysée par microscopie à balayage électronique et par des analyses chimiques pour la détermination de la matière sèche, protéines et substances pectiques et cendres dont les méthodes sont décrites dans le chapitre I.

7.2 Analyse granulométriques des résidus d'oranges séchées

La poudre des résidus a été tamisée dans une tamiseuse de type *Endecotts (EFL 2000)* pour obtenir des particules ayant des diamètres compris entre 0,2 et 0,8 mm.

La granulométrie des différentes fractions a été déterminée à l'aide d'un granulomètre Type *Mastersizer 2000*; par diffraction laser, un faisceau laser passe à travers un échantillon de particules dispersées et l'intensité de la lumière diffusée est mesurée en fonction de l'angle. Les grosses particules diffractent de la lumière aux petits angles et les petites particules

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

diffraquent de faibles intensités aux grands angles. Les intensités diffractées sont ensuite analysées pour calculer la taille des particules en utilisant la théorie de diffusion de Mie. La taille des particules représente le diamètre de la sphère équivalente ayant même volume que la particule (Fournier, et al. 2012).

7.3 Optimisation de production des pectinases dans les résidus d'oranges séchés par fermentation en milieu solide.

Nous avons procédé à la production des pectinases en fermentation milieu solide par le protocole déjà décrit dans le chapitre précédant en remplaçant les résidus d'oranges frais par 10 g de résidus d'oranges séchés. Dans le but de déterminer les paramètres permettant une production maximale en pectinases nous avons préparé deux séries d'Erlenmeyers de 250 ml contenant le milieu de culture. Tous les paramètres étaient constants sauf la teneur en humidité, la teneur en sulfate d'ammonium, la teneur en glucose et la taille des particules du substrat qui étaient les variables d'optimisation. Les fermentations se sont déroulées en double pendant 7 jours. Un Erlenmeyer contenant un milieu de culture témoin a été préparé pour chaque essai.

7.3.1 Utilisation du plan factoriel

le plan expérimental utilisé est un plan factoriel complet à deux niveaux, ce qui donne

$$N_f = 2^4 \text{ essais (16 expériences)}$$

qui sont appelées aussi les expériences aux points noyaux, elles sont réparties selon la matrice de planification ci-dessous qui donne toutes les combinaisons expérimentales (tableau 8).

Tableau 8. Matrice de planification des expériences du plan factoriel

Facteurs N° d'essai	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1
3	1	-1	1	1
4	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1
6	-1	1	-1	1
7	1	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	1
9	1	1	1	-1
10	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1
12	-1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1

14	-1	1	-1	-1
15	1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1

Avec $x_1, x_2, x_3,$ et x_4 sont les variables en unités codées tel que $+1$ est le niveau supérieur du facteur et -1 est le niveau inférieur du facteur.

Le domaine du travail d'un tel plan (4 facteurs) est dans une échelle cartésienne à 4 dimension dont coordonnées sur les axes varient de -1 à $+1$ et s'intersectent à 0 , cette répartition forment un hypercube équidistant (figure n°25).

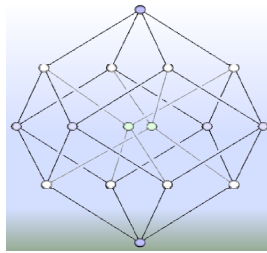


Figure 25. Domaine expérimental d'un plan à 4 facteurs: les points aux sommets représentent les expériences.

7.3.2 Utilisation du plan composite centré.

Pour la détermination de la surface de réponse nous avons utilisé un plan composite centré, dans ce cas nous avons ajouté aux expériences du plan factoriel précédent, les expériences étoilées (N_α) et les expériences aux point nul (N_0). Les valeurs des variables sont représentées par la table n° 9.

Tableau 9. Table des variables et leurs niveaux de variation.

Niveaux de variations des facteurs (variables x).						Intervalles de Variation
Facteurs	-2 ($-\alpha$)	-1 (Niveau bas)	0 (niveau central)	+1 (niveau haut)	+2 ($+\alpha$)	
$X_1(\mu\text{m})$	0,1	0,2	0,5	0,8	1,1	0,3
$X_2(\%)$	-5	0	5	10	15	5
$X_3(\%)$	-45	20	85	150	215	6
$X_4(\%)$	-0	0	1	2	3	1

-
-

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

- X1 : est la taille des particules (μm);
- X2: est la teneur en Glucose (%);
- X3: est la teneur en humidité (%);
- X4: est la teneur en sulfate d'ammonium (%).

Pour un plan rotatable à 4 facteurs: $\alpha = \sqrt[4]{2^4} = \sqrt[4]{16} = 2$

Le nombre des expériences total (N) pour le plan factoriel complet composite centré sera donc:

$$N = N_f + N_\alpha + N_0 = 2^4 + (4*2) + 7 = 16 + 8 + 7 = 31$$

Puisque les expériences sont réalisées en doubles on aura alors 62 expériences. Tous les calculs du plans factoriel composite centré ont été réalisés en utilisant le logiciel "Mintab" 14 et 17.

7.4 Suivi de la fermentation dans les conditions optimales.

Pour l'étude de la fermentation sur les résidus d'oranges en milieu solide, nous avons réalisé des fermentations dans des Erlenmeyers de 250 ml dans les conditions optimales, en présence d'Erlenmeyers témoins contenant le milieu de culture etensemencé en remplaçant le volume de l'inoculum par un volume d'eau distillée. Toutes les 24h, deux Erlenmeyers d'échantillons sont prélevés pour l'extraction de l'enzyme. L'extrait enzymatique recueilli était l'objet de détermination des activités des enzymes pectinolytiques et des protéines solubles. Tandis que le pellet était lyophilisé, puis analysé par microscopie à balayage électronique.

Résultats et discussion.

Relativement à la matière sèche, la composition biochimique des résidus d'oranges séchés (tableau n° 10) est proche de celle des résidus d'oranges frais. Comme il a été souligné par **Singh, et al. (2011)** la pulpe d'agrumes fraîche a une composition similaire à celle de la pulpe séchée, elle contient jusqu'à 40 % de fibres solubles (pectines) et les hydrates de carbone de 5 à 10%. La matière sèche qui est habituellement 88% (Sigh 2011), est élevée par rapport à celle observée dans ce travail; cela dépend peu être des conditions de stockage des résidus et de l'humidité relative de l'ambiance.

Tableau 10. Caractéristiques biochimiques des résidus d'oranges

Paramètre	MS (%)	Substances pectiques (%)	Azote total (%)	Sucres totaux (%)	Sucres réducteurs (%)	Cendres (%)
Valeur	73,00 ± 0,13	25,76 ± 1.27	5,90 ± 0.06	27,35 ± 0.98	2,50 ± 0.72	6,30 ± 0.047

8.1 Caractérisation physique des broyats des résidus d'oranges.

Pour obtenir une homogénéité dans les dimensions des particules, la poudre a été répartie en différentes fractions avec des particules ayant des diamètres compris entre 200 et 800 μm (figure 26). L'analyse granulométrique des différentes fraction (annexe 4) montre une dispersion volumique homogène dans les trois fraction issus des tamis à porosités 200 μm , 500 μm et 800 μm ; les tailles volumiques moyennes respectives des particules sont 360,070 μm ; 602,51 μm et 792,72 μm . les surfaces spécifiques moyennes des granules dans es trois fractions augmentent avec la diminution de la taille des particules, tels qu'elles sont de l'ordres de 0.025 m^2/g , 0,013 m^2/g et 0,008 m^2/g dans les tamisas de 200 μm , 500 μm et 800 μm respectivement.



Figure 26. Les différentes fractions des résidus d'oranges tamisés; (a): 200 μm ; (b): 500 μm et (c): 800 μm .

8.2 Analyse morphologique du substrat en utilisant la microscopie à balayage électronique.

Le broyage des résidus d'orange séchés a pour but de multiplier la surface utile pour la croissance du champignon dans un moindre volume. L'observation au microscope électronique à balayage (*Philips ESEM XL 30*) de la poudre des résidus d'orange avant tamisage est illustrée par la figure 27 .

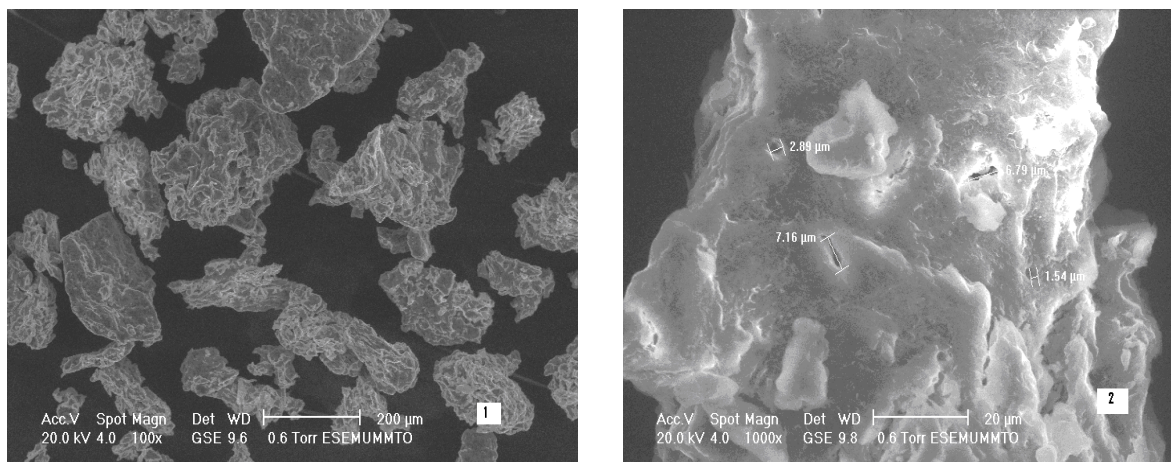
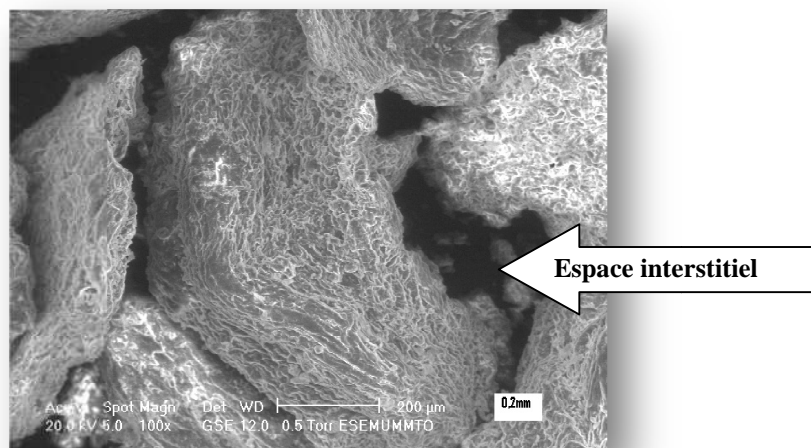
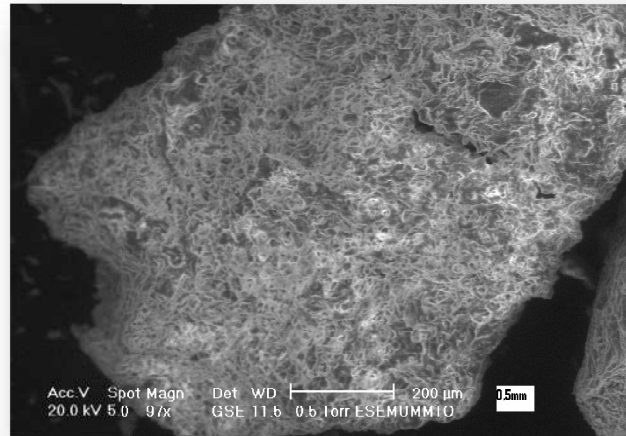


Figure 27. Observation au microscope à balayage électronique des granules de la poudre d'orange séchée

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

Après broyage, la poudre des résidus d'orange se présente sous forme de granules avec des formes hétérogènes ayant l'apparence de blocs plus ou moins anguleux (figure 27). Les irrégularités de surface forment des niches de différents diamètres (figure 27) ; ces niches sont favorables au maintien en place des spores et au développement des hyphes.



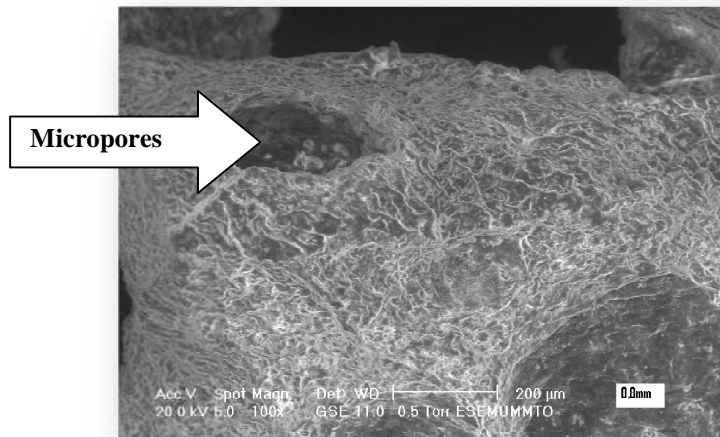


Figure 28. Images microscopique des tamis de la poudre des résidus d'orange à différentes granulométries (200, 500, et 800 μm)

L'observation montre que l'espace interstitiel entre les grains qui est nettement observé pour les grains de 0.2 mm de diamètres, augmente avec la diminution des dimensions des particules par contre le nombre des micropores augmente avec l'augmentation des dimensions des particules (figure 28). C'est **Oriol, et al. (1988)** qui a montré l'importance de la configuration du substrat et les conditions d'aération, ces deux paramètres déterminent plus tardivement le développement de conidiophores et la sporulation du champignon. Plus le diamètre des particules est important plus la vitesse de diffusion intra particulaire du substrat devient limité en fin de croissance. La surface spécifique du support accessible au champignon est un paramètre important à certaines valeurs, elle peut devenir une limite pour la de densité des hyphes (**Oriol 1987**).

8.3 Analyse du plan factoriel

Tableau 11. Les activités enzymatiques pour chaque essai du plan factoriel complet

N° d'essai	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	\bar{Y}
1	1	1	1	1	0,8	10	150	2	4,13
2	-1	1	1	1	0,2	10	150	2	10,17
3	1	-1	1	1	0,8	0	150	2	7,71
4	-1	-1	1	1	0,2	0	150	2	10,58
5	1	1	-1	1	0,8	10	20	2	16,66
6	-1	1	-1	1	0,2	10	20	2	13,83
7	1	-1	-1	1	0,8	0	20	2	42,33
8	-1	-1	-1	1	0,2	0	20	2	28,75
9	1	1	1	-1	0,8	10	150	0	1,71
10	-1	1	1	-1	0,2	10	150	0	2,79
11	1	-1	1	-1	0,8	0	150	0	1,57
12	-1	-1	1	-1	0,2	0	150	0	1,62
13	1	1	-1	-1	0,8	10	20	0	9,23
14	-1	1	-1	-1	0,2	10	20	0	7,66
15	1	-1	-1	-1	0,8	0	20	0	1,96
16	-1	-1	-1	-1	0,2	0	20	0	10,41
17	2	0	0	0	1,1	5	85	1	0,60
18	-2	0	0	0	0,1	5	85	1	2,17
19	0	2	0	0	0,5	15	85	1	6,09
20	0	-2	0	0	0,5	-5	85	1	6,59
21	0	0	2	0	0,5	5	215	1	21,19
22	0	0	-2	0	0,5	5	-45	1	5,37
23	0	0	0	2	0,5	5	85	3	9,33
24	0	0	0	-2	0,5	5	85	0	2,69
25	0	0	0	0	0,5	5	85	1	33,00
26	0	0	0	0	0,5	5	85	1	33,66
27	0	0	0	0	0,5	5	85	1	33,00
28	0	0	0	0	0,5	5	85	1	28,50
29	0	0	0	0	0,5	5	85	1	41,50
30	0	0	0	0	0,5	5	85	1	33,66
31	0	0	0	0	0,5	5	85	1	23,84

Après avoir ajouté les essais aux points étoilés et les essais aux points nuls, Les résultats de toutes les combinaisons des essais selon le plan factoriel complet établi, sont représentés par la matrice du tableau n°11. \bar{Y} est la moyenne des réponses, qui exprime la moyenne des activités endoPG de deux expériences pour chaque essai.

8.3.1 Criblage des coefficients influençant la production d'enzyme pectinolytique.

L'objet de l'analyse d'un plan est de sélectionner les facteurs ayant des effets importants. L'estimation des effets et des coefficients de l'activité pectinasique est générée par Minitab (tableau 12).

Tableau 12. Estimation des effets et des coefficients pour l'activité enzymatique en unités codées

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		10,469	0,2356	44,44	0,000
grnulo	-0,556	-0,278	0,2356	-1,18	0,256
glucose	-5,271	-2,635	0,2356	-11,19	0,000
humidité	-10,892	-5,446	0,2356	-23,12	0,000
(NH4)2SO4	12,581	6,290	0,2356	26,70	0,000
grnulo*glucose	-1,127	-0,563	0,2356	-2,39	0,029
grnulo*humidité	-1,936	-0,968	0,2356	-4,11	0,001
grnulo*(NH4)2SO4	2,452	1,226	0,2356	5,20	0,000
glucose*humidité	4,624	2,312	0,2356	9,81	0,000
glucose*(NH4)2SO4	-5,853	-2,927	0,2356	-12,42	0,000
humidité*(NH4)2SO4	-6,374	-3,187	0,2356	-13,53	0,000
grnulo*glucose*humidité	0,058	0,029	0,2356	0,12	0,903
grnulo*glucose*(NH4)2SO4	-2,374	-1,187	0,2356	-5,04	0,000
grnulo*humidité*(NH4)2SO4	-4,373	-2,187	0,2356	-9,28	0,000
glucose*humidité*(NH4)2SO4	4,547	2,273	0,2356	9,65	0,000
grnulo*glucose*humidité*(NH4)2SO4	1,816	0,908	0,2356	3,85	0,001

Dans ce tableau on trouve toutes les valeurs des coefficients des facteurs et les valeurs des coefficients d'interaction (coef), l'erreur standard est calculée pour chaque facteur (SE coef), p du tableau correspond à la probabilité d'obtenir une statistique de test au moins aussi extrême que celle réellement calculée à partir des essais, si l'hypothèse nulle est vraie. Si la valeur p est inférieure à un seuil de signification spécifié (ou alpha (α)) (généralement 0,10, 0,05 ou 0,01), la différence sera statistiquement significative et l'hypothèse nulle du test sera rejetée. ainsi nous obtenons deux coefficients dont le p est supérieur au seuil de α ($\alpha = 0,05$), qui sont la granulométrie et l'interaction entre la granulométrie, la teneur en glucose et la teneur en humidité.

Le coefficient de l'adéquation R^2 de la régression est un coefficient de détermination qui indique l'ampleur de la variation de la réponse expliquée par le modèle. Plus le R^2 est élevé, plus le modèle correspond aux données. La valeur de R^2 est égale à 99,24 % ce qui signifie que le modèle est adéquat.

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

L'analyse de la variance ANOVA (tableau 13), nous permet de déterminer l'adéquation des coefficients. Cette analyse répertorie les sources de variation, leurs degrés de liberté, la somme totale des carrés et les carrés moyens. Le tableau d'analyse de la variance comprend également les statistiques F et les valeurs p qui sont utilisés pour déterminer si les prédicateurs ou les facteurs sont significativement liés à la réponse.

Tableau 13. Analyse de la variance de l'activité endoPG

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	4	2439,95	2439,95	609,987	343,48	0,000
2-Way Interactions	6	858,44	858,44	143,073	80,56	0,000
3-Way Interactions	4	363,51	363,51	90,879	51,17	0,000
4-Way Interactions	1	26,37	26,37	26,372	14,85	0,001
Residual Error	16	28,41	28,41	1,776		
Pure Error	16	28,41	28,41	1,776		
Total	31	3716,69				

La table ANOVA est composée de :

- Source qui indique la source de variation, que ce soit à partir du facteur, de l'interaction ou de l'erreur. Le total est la somme de toutes les sources.
- DF - Degrés de liberté de chaque source. Si un facteur a deux niveaux, le degré de liberté est 1 (n-1).
- SS - somme des carrés entre les groupes (facteur) et la somme des carrés dans les groupes (erreur)
- MS - La moyenne des carrés est obtenue en divisant la somme des carrés par les degrés de liberté.
- F - Calcule en divisant le facteur MS par l'erreur MS; on peut comparer ce rapport à un F critique dans un tableau ou on peut utiliser la valeur p pour déterminer si un facteur est significatif.
- P - utilisé pour déterminer si un facteur est significatif; comparez généralement avec une valeur alpha de 0,05. La valeur p est inférieure à 0,05, alors les facteurs sont significatifs.
- **Digramme des effets**

Pour visualiser l'influence des facteurs (variables) sur l'activité enzymatique, Minitab génère la droite de Henry et le diagramme de Pareto (figures 29, 30)

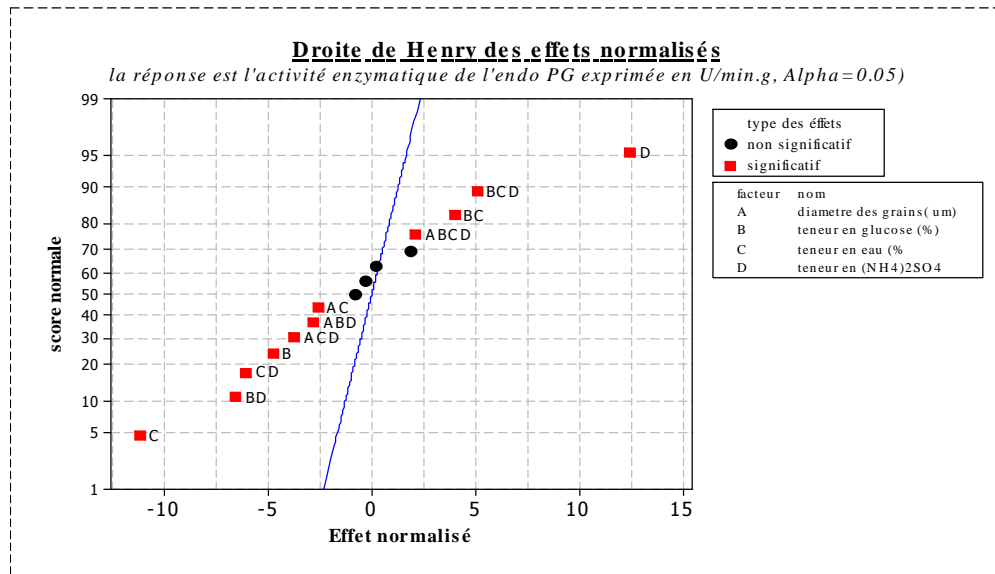


Figure 29. Droite normale de Henry

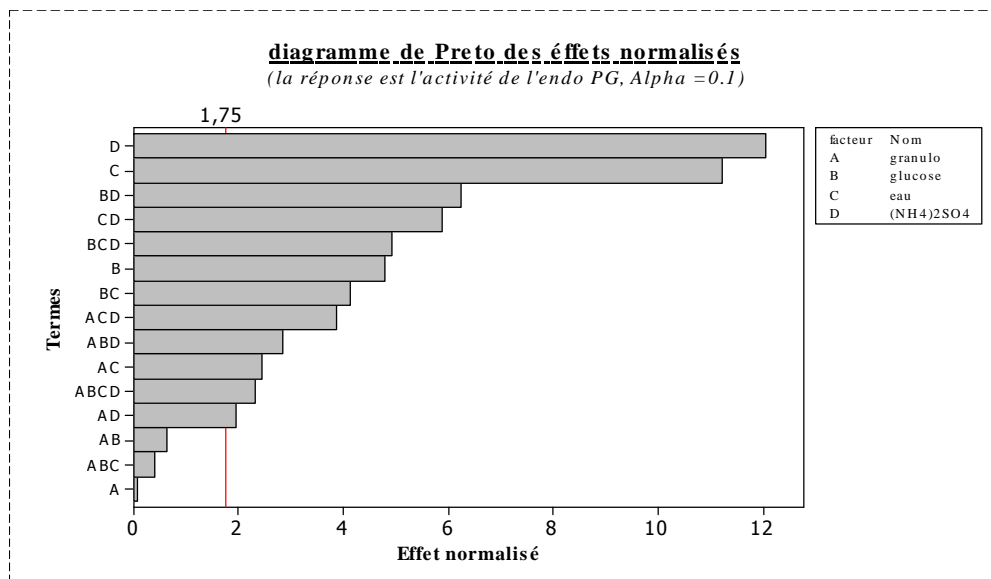


Figure 30. Diagramme de Pareto

Les effets actifs sont les effets significatifs ou important. Dans la droite de Henry, les effets significatifs ont tendance à s'éloigner de la droite. Ils sont plus éloignés de la droite d'ajustement et de valeurs plus importantes que les effets non significatifs qui, pour leur parts, sont généralement de valeur plus faible et centrés autour de zéro, la moyenne de l'ensemble des effets. La droite de Henry repère les effets inférieurs au niveau d' α choisi dans la boîte de dialogue de Minitab ($\alpha = 0.05$)

Le diagramme de Pareto des effets constitue également un outil utile pour déterminer les effets significatifs, ce diagramme utilise le même α que la droite de Henry pour déterminer l'importance des effets.

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

L'examen des diagrammes de Pareto et de Henri montre qu'il faut retenir trois facteurs influents (concentration en sulfate d'ammonium, l'humidité et la concentration en glucose) et 9 interactions (glucose-sulfate d'ammonium, humidité-sulfate d'ammonium, glucose-humidité- sulfate d'ammonium, glucose- humidité-granulométrie-humidité- sulfate d'ammonium, granulométrie- glucose- sulfate d'ammonium ...).

Cet examen montre également que la concentration de milieu de culture en glucose est peu influente. Le diamètre des graines de la poudre, est très faible et présente peu d'intérêt pour la production des pectinases dans les conditions de culture. Peut être que la production de l'endo PG est peu influencée par la gamme de taille des granule choisie pour cette étude.

• Ajustement du modèle (modèle abrégé)

L'ajustement du modèle consiste à établir un nouveau modèle comportant uniquement les termes que nous avons identifié comme significatifs d'après les résultats de l'ajustement du modèle complet. En d'autres termes, nous allons éliminer les effets non significatifs.

L'évaluation du modèle ajusté ou abrégé se fait par l'examen de la colonne de P (du tableau n°14) qui contient les valeurs de p pour chacun des termes du modèle. Une bonne norme d'évaluation du modèle consiste à vérifier que tout les termes ont une valeur de p inférieure au niveau d' α convenant à l'expérience. Si tel est le cas nous pouvons être sûrs que le modèle est bon. Ici $\alpha = 0.05$.

Tableau 14. Estimation des effets et des coefficients pour l'activité enzymatique en unités codées pour le modèle ajusté

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		10,469	0,6689	15,65	0,000
glucose	-5,271	-2,635	0,6689	-3,94	0,001
humidité	-10,892	-5,446	0,6689	-8,14	0,000
(NH ₄) ₂ SO ₄	12,581	6,290	0,6689	9,40	0,000
glucose*humidité	4,624	2,312	0,6689	3,46	0,002
glucose*(NH ₄) ₂ SO ₄	-5,853	-2,927	0,6689	-4,38	0,000
humidité*(NH ₄) ₂ SO ₄	-6,374	-3,187	0,6689	-4,76	0,000
glucose*humidité*(NH ₄) ₂ SO ₄	4,547	2,273	0,6689	3,40	0,002
S = 3,78376 R-Sq = 90,76% R-Sq(adj) = 88,06%					

Tableau 15. Analyse de la variance pour 'activité en unités codées

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	3	2437,48	2437,48	812,49	56,75	0,000
2-Way Interactions	3	770,21	770,21	256,74	17,93	0,000
3-Way Interactions	1	165,39	165,39	165,39	11,55	0,002
Residual Error	24	343,60	343,60	14,32		
Pure Error	24	343,60	343,60	14,32		
Total	31	3716,69				

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

Le tableau d'analyse de variance (tableau 15) résume les principaux effets et interactions. Minitab affiche à la fois les sommes séquentielles des carrés (Seq SS) et les sommes ajustées des carrés (Adj SS). Si le modèle est orthogonal et ne contient pas de covariables, celles-ci seront les mêmes. Voir Sommes des carrés ajustées et séquentielles pour une description des différences entre les valeurs.

Les coefficients en valeurs naturelles (non codées), nous permettent de visualiser l'équation linéaire du nouveau modèle contenant uniquement les coefficient significatif. Le explique à $R^2 = 90,76\%$.

$$\begin{aligned} \text{Activité} = & 6,89 + 0,048 \text{ glucose} - 0,0353 \text{ humidité} + 16,36 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \\ & 0,00012 \text{ glucose} * \text{humidité} - 1,180 \text{ glucose} * (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,0840 \text{ humidité} * (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \\ & + 0,00700 \text{ glucose} * \text{humidité} * (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \end{aligned}$$

Dans le tableau n°14 toutes les valeurs de p du modèle sont inférieure à 0.05, ce qui confirme que le modèle peut être retenu pour poursuivre l'exploration de la validation. Ce modèle est beaucoup plus simple et ajuste les données presque aussi bien que celui qui contient tout les termes. L'erreur résiduelle n'augmente que dans une faible proportion.

Nous vérifions aussi le modèle à l'aide du tracé des valeurs prédites en fonction des valeurs observées (figure 31) et à l'aide des graphiques des valeurs résiduelles (figure 32).

La droite de régression de la figure n° 31 met en relation les valeurs prédites par le modèle est les valeurs observées, cette relation montre une bonne régression avec une droite linéaire et positive qui explique à $R^2 = 88,2\%$. Le coefficient de corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs observées est positif, il est égal à 0,99 avec $p = 0.00$.

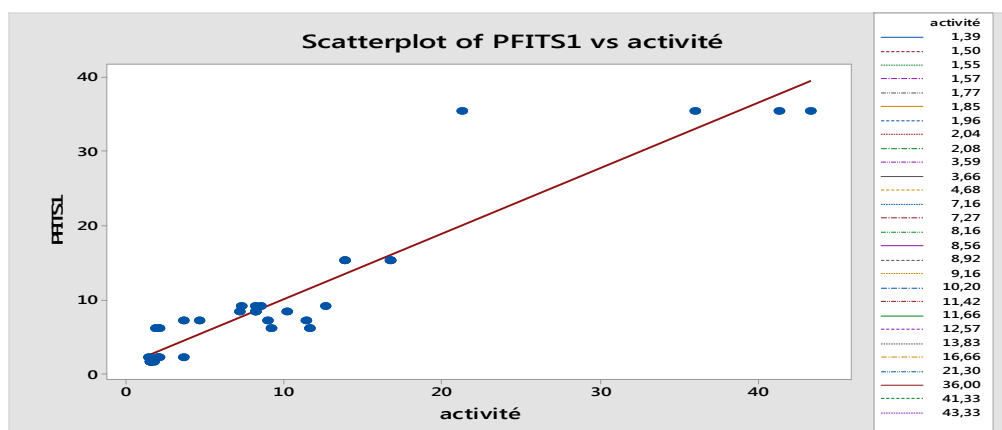


Figure 31. Tracé des valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour le modèle linéaire ajusté

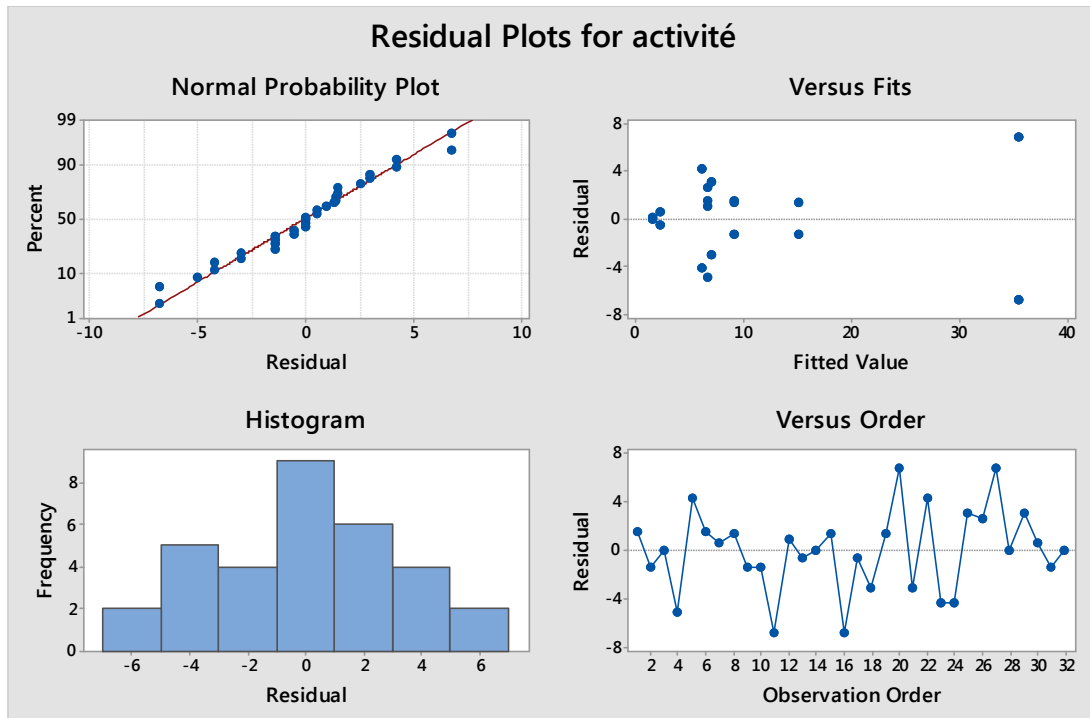


Figure 32. Graphe des résidus

Dans le graphique des résidus, les valeurs ajustées sont les résultats prévus par le modèle. Les valeurs résiduelles représentent les activités enzymatiques réelles moins les activités enzymatiques prévues. Ce graphique affiche le tracé de valeur résiduelle qui correspond à une bonne droite de Henry. Tandis qu'on perçoit une dispersion moyenne des points des deux côtés de Zéro, sur le tracé des valeurs résiduelles en fonction de l'ordre des données; les points ont tendance à une diminution en se rapprochant de 0. Cependant le diagramme des valeurs résiduelles en fonction des valeurs ajustées présente une bonne dispersion; ceci est observé aussi sur l'histogramme des valeurs résiduelles.

La droite de Henry et le diagramme de Pareto du modèle ajusté contiennent uniquement les coefficients importants qui sont la teneur en glucose (B); la teneur en humidité (C); la teneur en sulfate d'ammonium (D) et les facteurs d'interactions qui sont ((CD); (BD); (BC); et (BCD) (figures 43, 34).

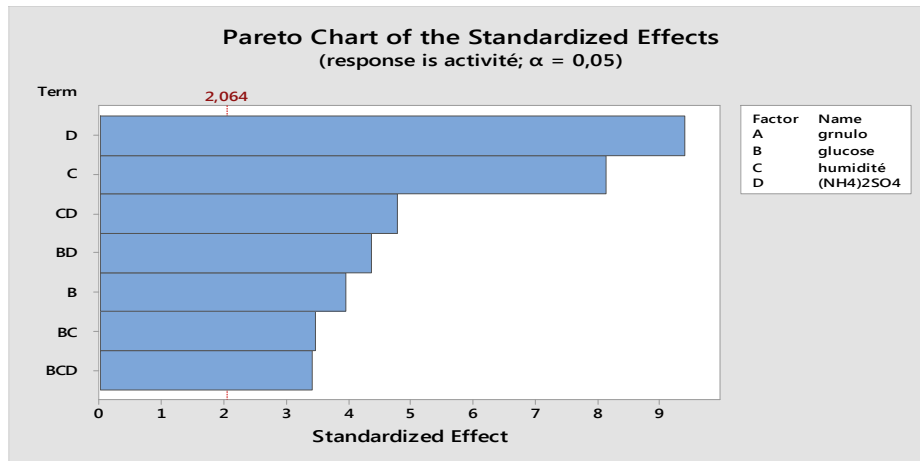


Figure 33. Diagramme de Pareto pour le modèle ajusté

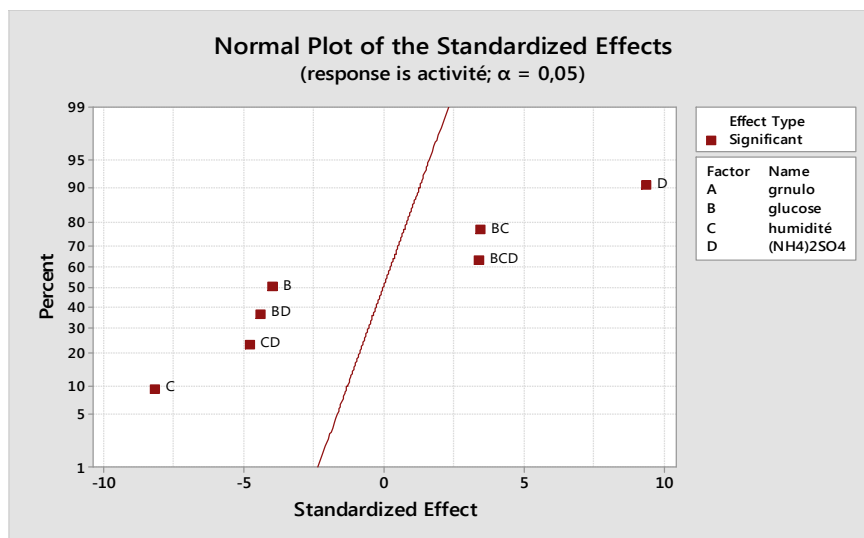


Figure 34. Droite de Henry pour le modèle ajusté

• Diagrammes des effets principaux dans modèle ajusté

L'effet quantifié de chaque coefficient est représenté dans le diagramme des effets principaux (figure 35)

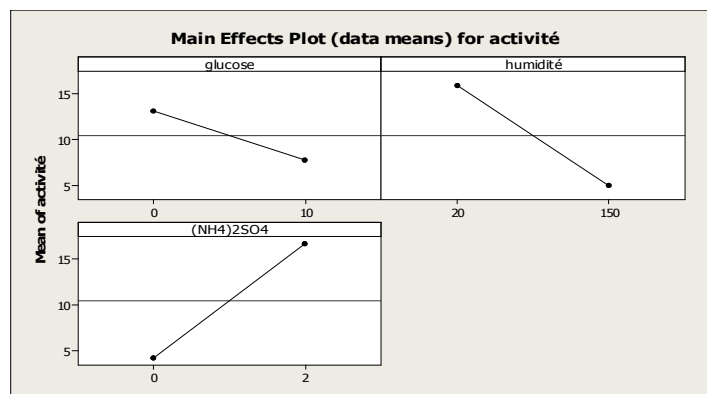


Figure 35. Diagramme des effets principaux (moyenne des données) pour l'activité enzymatique

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

D'après ce diagramme, il apparaît que le glucose possède un effet moins important que l'humidité et la concentration en sulfate d'ammonium sur le développement de l'activité enzymatique.

Par ailleurs, ce diagramme affiche trois tracés des effets principaux: l'un pour la concentration en glucose, l'autre pour l'humidité et le dernier pour la concentration en sulfate d'ammonium, il s'agit :

- de l'effet principal de la concentration en glucose qui est la différence entre le paramétrage minimum et le paramétrage maximum du graphique,
- de l'effet principal de l'humidité qui est la différence entre les deux catégories,
- de l'effet principal de la concentration en sulfate d'ammonium qui est la différence entre les deux valeurs.

A priori, il apparaît que le sulfate d'ammonium ait un effet principal plus important que le glucose et l'humidité.

Ainsi, la ligne joignant les réponses moyennes pour 2% et 0% de sulfate d'ammonium a une pente plus raide que la ligne joignant les réponses moyennes pour les paramétrages minimaux d'humidité et plus raide que la ligne joignant les réponses moyennes pour les paramétrages minimaux du glucose.

Toutefois, le sulfate semble affecter le développement de l'activité plus que l'humidité et plus que la présence de glucose.

En somme, un diagramme d'interaction montre l'impact exercé par la variation des valeurs d'un facteur sur un autre facteur (figure 36).

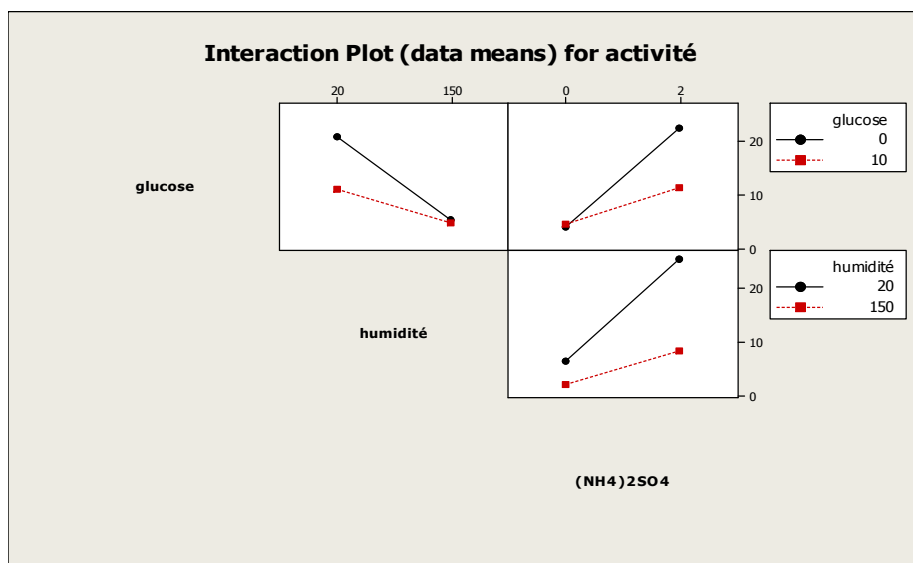


Figure 36. Diagramme d'interaction (moyenne des données) pour l'activité enzymatique

Il est très important d'évaluer les interactions car elles peuvent amplifier ou diminuer les effets principaux. L'interaction significative entre deux facteurs est mise en évidence par deux droites aux pentes nettement différentes.

Dans un diagramme d'interaction, l'axe des ordonnées (axe des y) s'affiche en unité de la variable de réponse (l'activité enzymatique, dans notre cas). L'axe des abscisses (axe des x) affiche les niveaux de la colonne du second facteur.

Les deux droites représentent les deux paramétrages (minimal et maximal) de chaque facteur. La réponse (l'activité enzymatique) est maximale quand l'humidité et le sulfate d'ammonium sont en paramétrage maximal ; par contre, quand le glucose est en paramétrage maximal et l'humidité en paramétrage maximal, l'activité diminue. Donc, seulement l'interaction glucose-humidité a un effet négatif sur l'activité.

8.4 Optimisation de la production de l'endopolygalacturonase par le composite centré

Les conceptions des composites centrés sont souvent recommandées lorsque le plan de conception nécessite une expérimentation séquentielle, car ces conceptions peuvent intégrer des informations provenant d'une expérience factorielle correctement planifiée. Les points factoriels et centraux peuvent constituer une étape préliminaire dans laquelle nous pouvons adapter un modèle (linéaire) du premier ordre, tout en fournissant des preuves de l'importance d'une contribution ou d'une courbure du second ordre.

Nous pouvons ensuite intégrer la partie factorielle de la conception dans une conception composite centrale adaptée à un modèle du second degré en ajoutant des points axiaux et centraux. Les conceptions composites centrales permettent une estimation efficace des termes quadratiques dans le modèle du second ordre, et il est également facile d'obtenir les propriétés de conception souhaitables du blocage orthogonal et de la rotatabilité.

En plus les conceptions bloquées orthogonalement permettent d'estimer indépendamment les termes du modèle et les effets de bloc et de minimiser la variation des coefficients de régression. Les conceptions rotatives offrent la propriété souhaitable de la variance de prévision constante en tous points équidistants du centre de conception, améliorant ainsi la qualité de la prévision.

Tous les résultats ont été présentés à la fois dans la même matrice en haut du plan factoriel (tableau n°11)

L'équation de régression du modèle quadratique en valeurs codées et en supprimant les facteurs insignifiants dans le modèle linéaire est la suivante:

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

$$Y = 26.211 - 1.4282x_2 - 2.356x_3 + 5.1064x_4 + 2.133x_2x_3 - 3.2016x_2x_4 - 3.0141x_3x_4 - 3.92x_2^2 - 1.544x_3^2 - 5.0417x_4^2$$

Cette équation en valeurs naturelles (unité non codées) est de la forme suivante:

$$\begin{aligned} \text{Activité endo PG} = & -12,07 + 1,332 \text{ Glucose} + 0,19 \text{ Humidité} + 21,69 (\text{NH}_4)_2\text{OH} \\ & + 0,014 \text{ Glucose} * \text{ Humidité} - 0,64 \text{ Glucose} * (\text{NH}_4)_2\text{OH} - 0,1 \text{ Humidité} * (\text{NH}_4)_2\text{OH} - \\ & 0,15 \text{ Glucose} * \text{ Glucose} - 0,0017 \text{ Humidité} * \text{ Humidité} - 0,100 \text{X} (\text{NH}_4)_2\text{OH} * (\text{NH}_4)_2\text{OH} \end{aligned}$$

L'analyse de la variance pour l'activité endoPG (tableau n°16) montre que tous les p (p des coefficients linéaires, des coefficients d'interaction et celui des coefficients quadratiques) sont inférieurs à 0.

Tableau 16. Analyse de la variance pour l'activité endoPG

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	5962,2	5962,2	425,87	4,76	0,000
Linear	4	1414,7	1475,4	368,86	4,12	0,006
Square	4	3691,8	3691,8	922,94	10,32	0,000
Interaction	6	855,7	855,7	142,62	1,59	0,170
Residual Error	47	4204,5	4204,5	89,46		
Lack-of-Fit	11	3049,9	3049,9	277,27	8,65	0,000
Pure Error	36	1154,6	1154,6	32,07		
Total	61	10166,7				

La relation entre les valeurs prédites et les valeurs observées du modèle quadratique du second degré (figure 37) forme une régression linéaire et positive, son coefficient de régression est 68,6%; les valeurs prédites de l'activité enzymatique se corrélaient aux valeurs observées avec un coefficient de corrélation positif qui est égal à 0,766 avec p = 0.00.

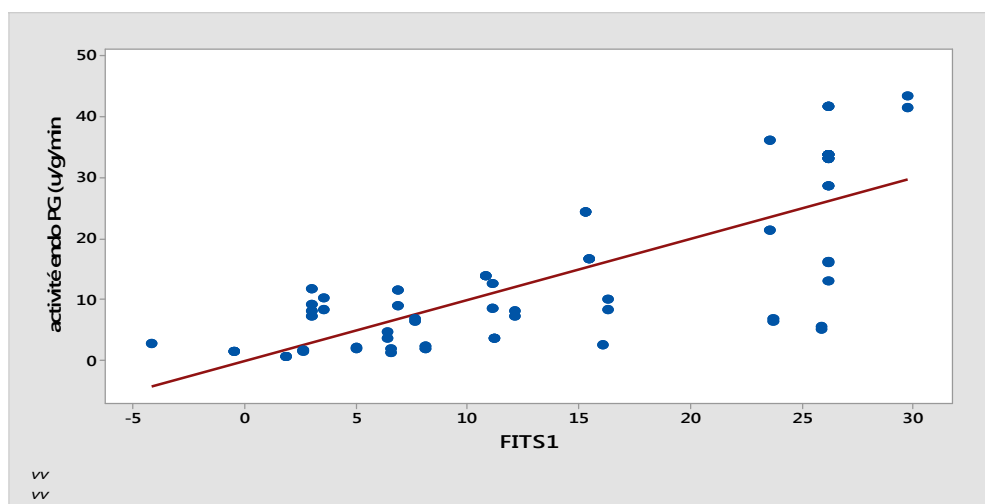


Figure 37. Les valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour le modèle quadratique

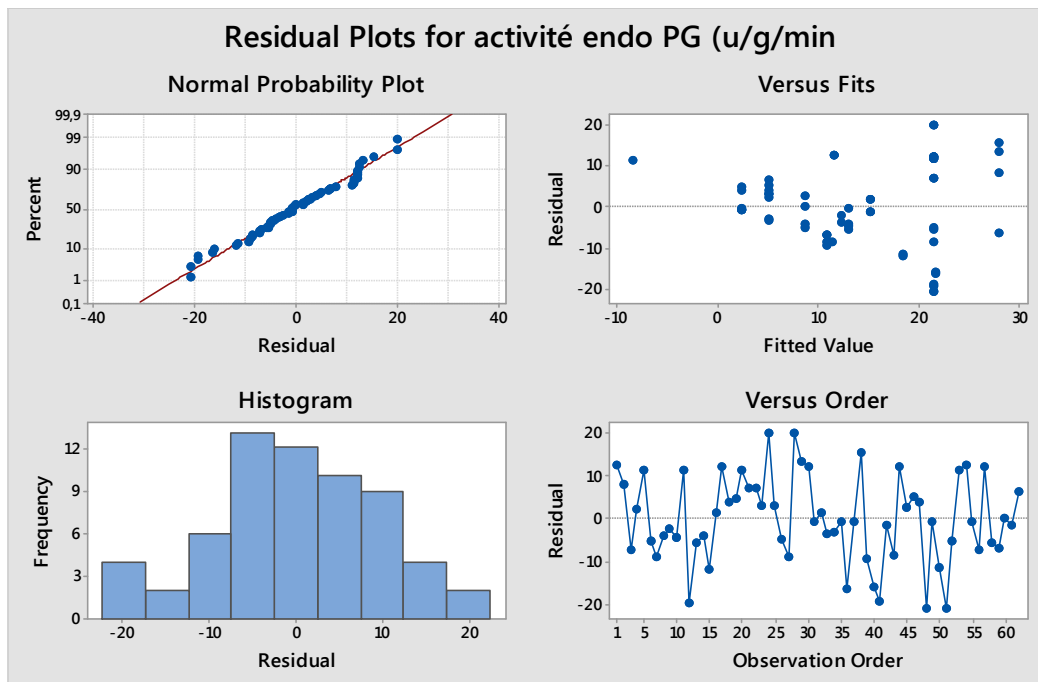


Figure 38. Graphe des résidus

L'analyse des résidus (figure 38) montre aussi une bonne dispersion des points sur la droite de Henry, et une bonne dispersion des points autour de la moyenne des résidus. L'erreur résiduelle n'augmente que dans une faible proportion.

L'analyse des résidus, l'analyse des valeurs prédites et l'analyse des p des coefficients nous permettent de conclure que le modèle quadratique du second degré ajuste les données à un degré satisfaisant et qui explique avec $R^2 = 68,6 \%$.

Cependant, l'objectif d'optimisation est de trouver les conditions dans lesquelles la multifonction de réponse s'écarte le moins possible de l'optimum idéal. La figure 39(a), montre une linéarité positive entre l'activité de l'endo-PG et la teneur en sulfate d'ammonium, l'activité enzymatique atteint sa valeur maximale de 29,69UF / ml. A des taux d'humidité élevés, l'activité de l'endo-PG en fonction du sulfate d'ammonium varie de manière concave et atteint un point optimal et quand la teneur en glucose et la taille granulaire ont été fixés à leur valeurs centrales. Les contours de la figure 39(b), visualisent la projection de la surface de réponse en deux dimensions; les contours montrent que les valeurs maximales des activités enzymatiques sont obtenues quand la teneur en eau est faible. Ce résultat est en contradiction avec les premiers travaux de Sato and Sudo (1999) qui ont montré que le taux spécifique de croissance des microorganismes en FMS augmente avec l'augmentation de l'humidité du milieu et l'humidité relative de l'air passant dans le fermenteur; Nishio, et al. (1979), rapportent une augmentation spécifique de la croissance de la biomasse et la synthèse

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

d'enzymes (hydrolases) par *A.niger* sur le son de blé lorsque l'humidité initiale augmente de 32% à 56%.

Sur la figure 40 (a) on observe que lorsque l'humidité est fixée à sa valeur centrale, l'activité de l'endo PG la plus élevée est de l'ordre de 25,98 UF / ml quand la teneur initiale en glucose est faible (<5%) . Cela est bien observé sur le tracé des contours (figure 40 (b)), qui montre des valeurs élevées en activités enzymatiques dans les régions à des teneurs en glucose inférieurs à 6% et à des teneurs élevées en sulfate d'ammonium.

L'effet de l'azote sur la production de pectinase a été également rapporté par Boccas, et al. (1994) et Aguilar and Huitrón (1990) . Ces auteurs ont montré que la teneur en sulfate d'ammonium inférieur à 0,16% n'avait aucun effet sur l'activité de la pectinase Patil and Dayanand (2006) ont rapporté que le sulfate d'ammonium à 0,3% est optimal pour la production d'enzymes pectinases par *Aspergillus niger*. Dans cette étude, l'activité endo-PG a enregistré une valeur optimale de 20 UF / ml avec 1% de sulfate d'ammonium et 5% de glucose. une humidité croissante dans le milieu devrait diminuer l'activité d'endo-PG (Fig. 41 (a)) Cela est aussi bien observé sur le tracé des contours de la figure 41 (b), tel que les activités les plus élevées sont obtenues à des faibles concentrations de glucose et de faibles teneurs en eau.

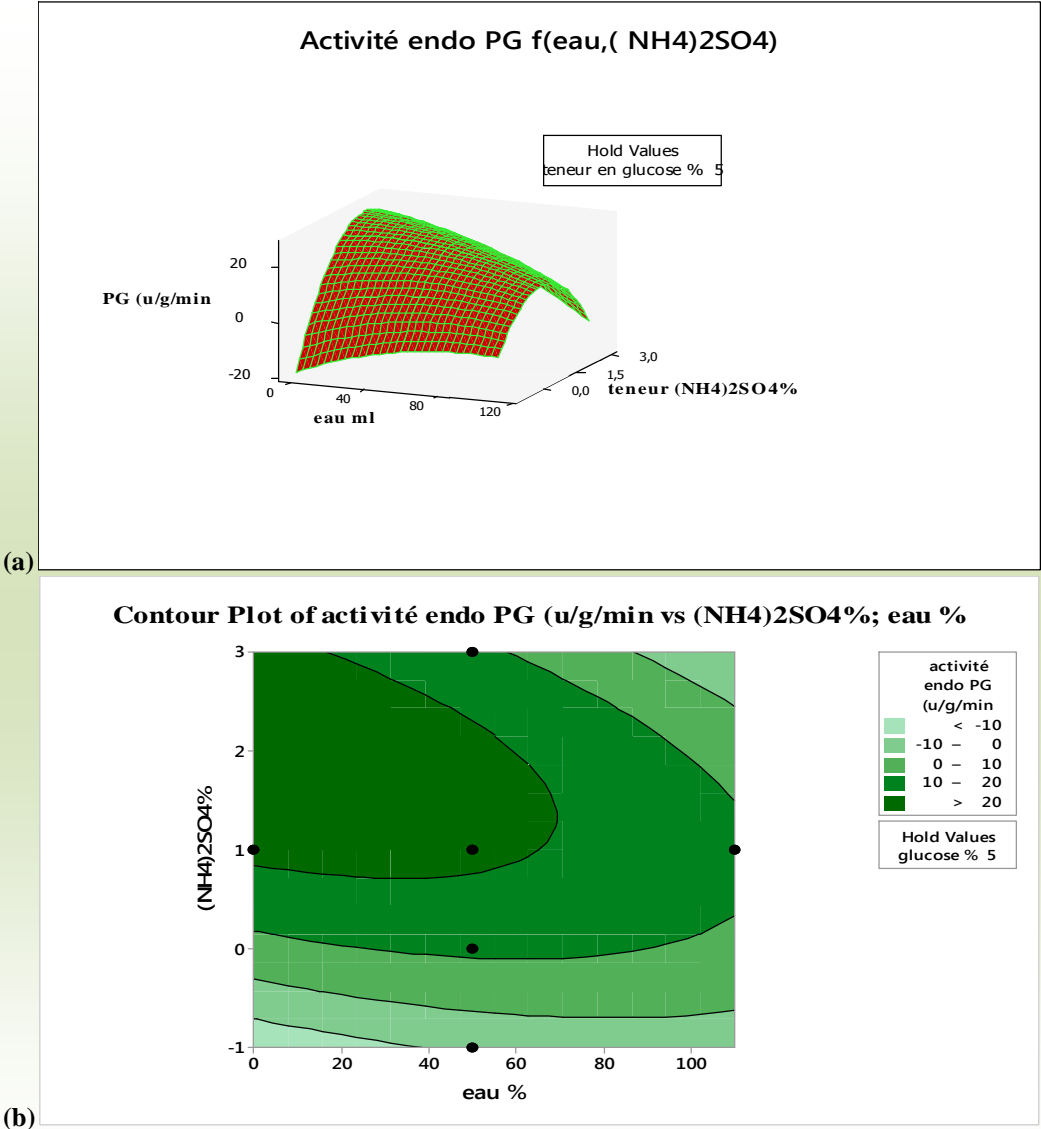


Figure 39. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en eau et de la teneur en sulfate d'ammonium

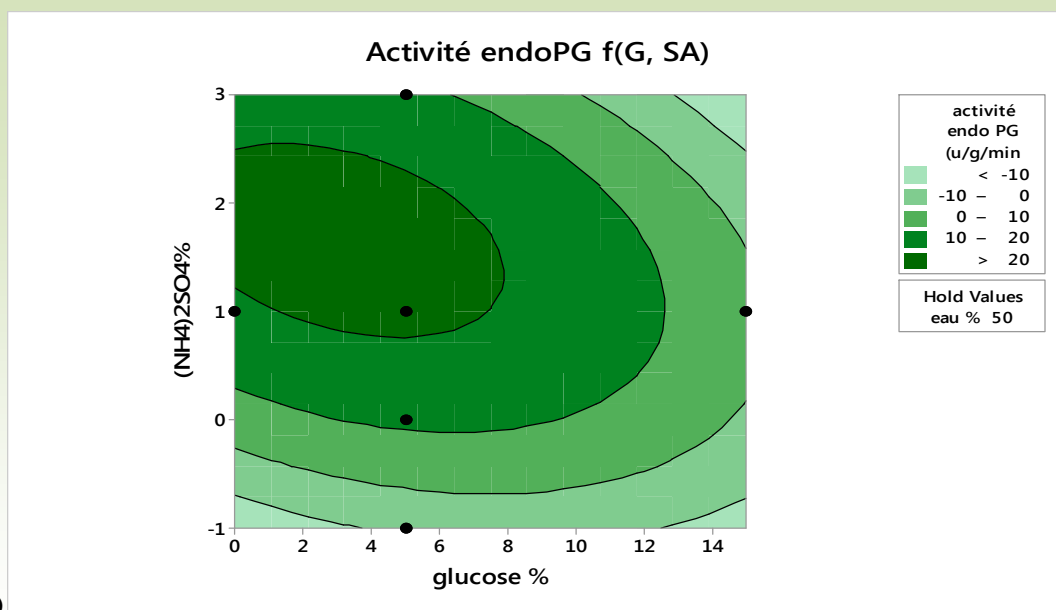
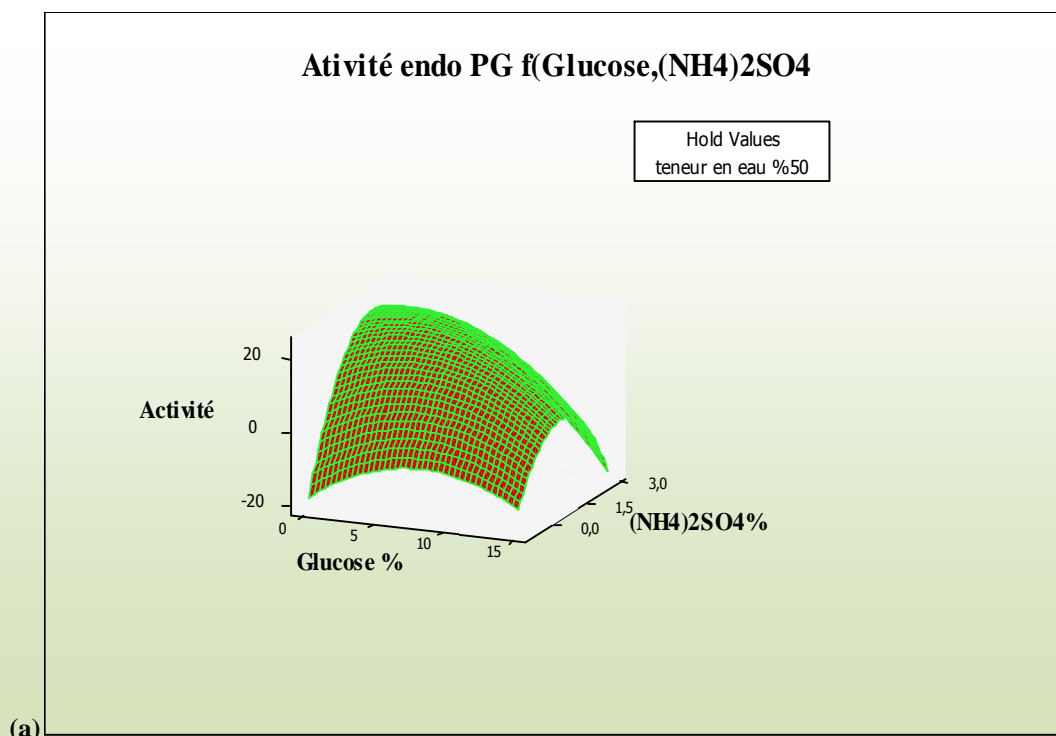


Figure 40. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en sulfate d'ammonium et du glucose

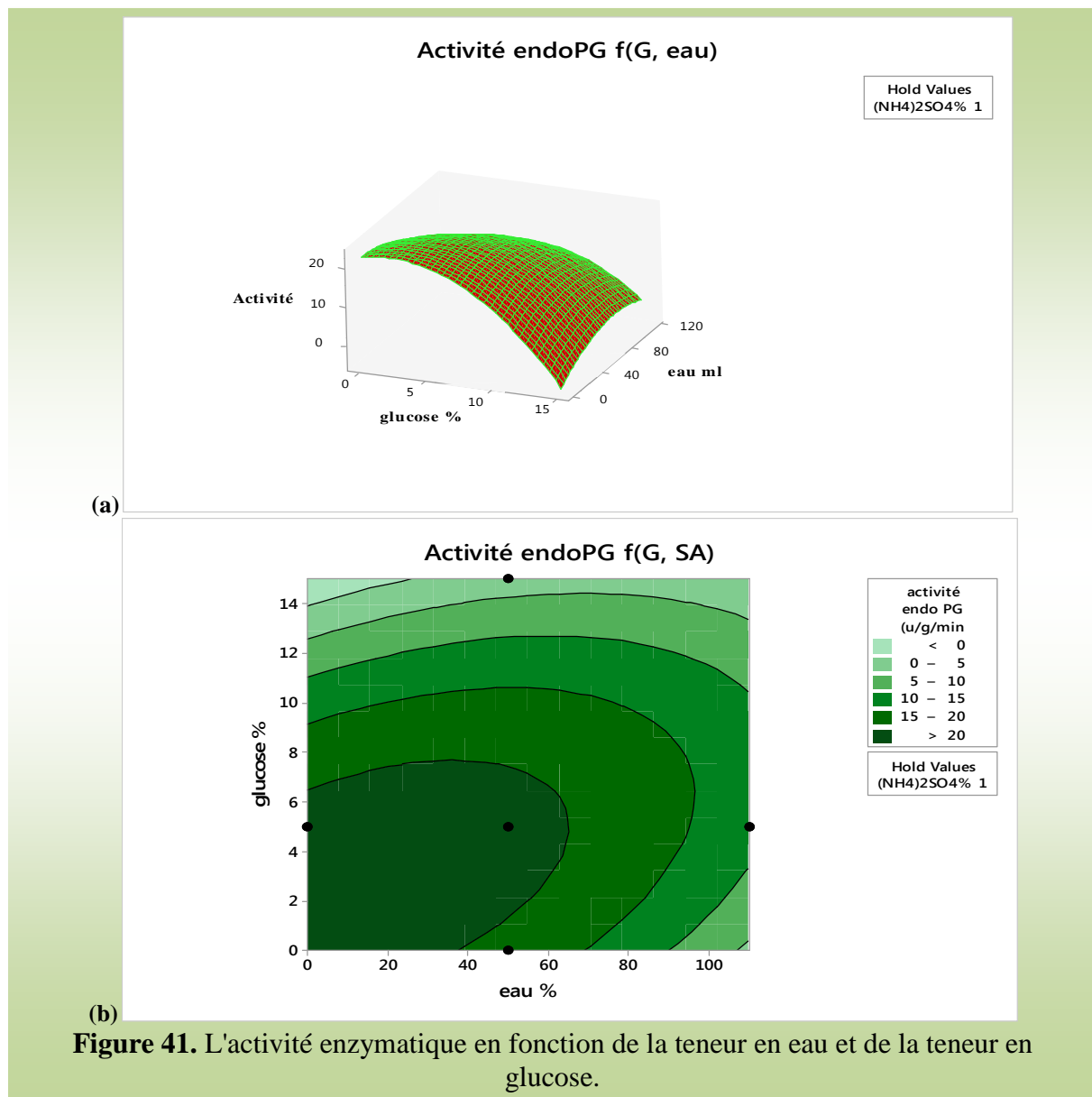


Figure 41. L'activité enzymatique en fonction de la teneur en eau et de la teneur en glucose.

L'optimisation de la réponse permet d'identifier des combinaisons de paramètres de variables d'entrée permettant d'optimiser conjointement une seule réponse ou un ensemble de réponses. Dans le modèle linéaire la valeur optimale prédite pour l'activité enzymatique était 35,6 U/ml à des teneurs très basses en eau (12%). Cette valeur d'humidité est proche de la valeur d'humidité critique de croissance de l'*Aspergillus niger* sur le manioc qui est de 13 % rapportée par Raimbault and Alazard (1980) . La valeur optimale que nous avons estimé par le modèle quadratique est de 25, 57 U/ml dans le milieu de culture contenant 0,85% de glucose, en ajoutant 54,63 ml d'eau (35% d'humidité) et 1,83% de (NH₄)₂OH (Figure n° 42) . L'optimisation conjointe doit satisfaire à l'exigence de toutes les réponses de l'ensemble qui se mesure par sa désirabilité composite «D». Le coefficient de désirabilité "D" est égal à

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

0,58 (figure 42). La réponse optimisée du logiciel Minitab calcule l'opportunité individuelle en utilisant une fonction d'opportunité (également appelée fonction de transfert d'utilité). L'opportunité individuelle (d_i) évalue la manière dont les paramètres optimisent une seule réponse; La désirabilité composite (D) évalue la manière dont les paramètres optimisent un ensemble de réponses. La désirabilité varie de zéro à un. C'est la sélection pondérale (comprise entre 0.1 et 10) pour déterminer la valeur sur laquelle on souhaite atteindre la valeur cible. La désirabilité composite est la moyenne géométrique pondérée des désirabilités individuelles pour les réponses. Le logiciel Minitab détermine les paramètres optimaux pour les variables d'entrée en maximisant l'opportunité de la composition.

La notation utilisée dans les formules est la suivante:

Dans le cas où on veut maximiser une réponse, l'opportunité est calculée comme suit:

$$\begin{aligned} d_i &= 0 && i < L_i \\ d_i &= ((i - L_i)/(T_i - L_i))^{r_i} && L_i \leq i \leq T_i \\ d_i &= 1 && i > T_i \end{aligned}$$

Et dans le cas où on veut minimiser la réponse, l'opportunité est calculée comme suit:

$$\begin{aligned} d_i &= 0 && i > U_i \\ d_i &= ((U_i - i)/(U_i - T_i))^{r_i} && T_i \leq i \leq U_i \\ d_i &= 1 && i < T_i \end{aligned}$$

La moyenne géométrique pondérée des possibilités individuelles. La formule de la désirabilité composite est la suivante:

$$D = (\prod(d_i^{w_i}))^{1/W}$$

où d_i = désirabilité individuelle pour la i ème réponse, w_i = importance de la i ème réponse, et $W = \sum w_i$.

Si l'importance est la même pour chaque réponse, la désirabilité composite est:

$$D = (d_1 * d_2 * \dots * d_n)^{1/n}$$

- i = Valeur prédite de la i ème réponse
- T_i = La valeur cible de la i ème réponse
- L_i = Valeur acceptable la plus basse de la i ème réponse
- U_i = Valeur acceptable la plus élevée de la i ème réponse
- d_i = désirabilité pour la i ème réponse
- D = désirabilité composite
- r_i = La désirabilité pondérale pour la i ème réponse
- w_i = Importance de la i ème réponse
- $W = \sum w_i$

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

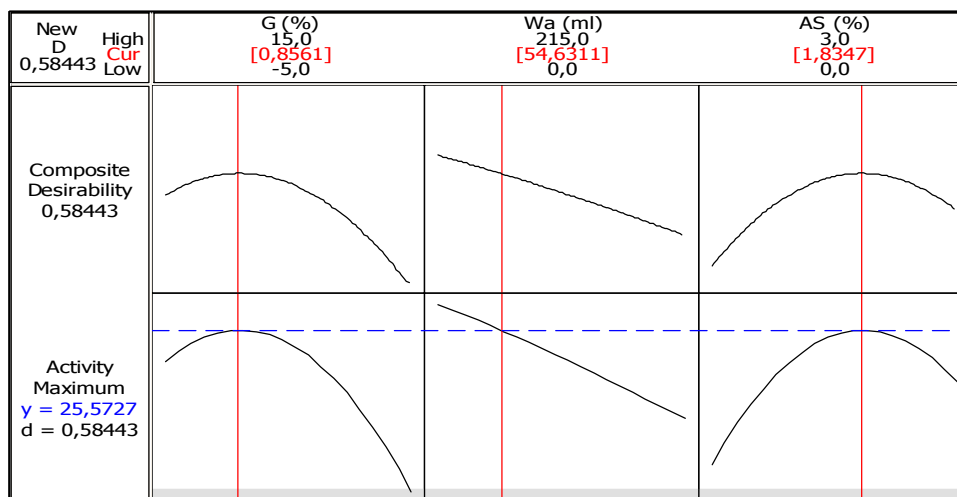


Figure 42. Diagramme d'optimisation

La figure ci dessus montre une réponse prédite composite de 25,57 (UF / ml) ($D = 0,58$) sous les conditions de milieu de culture contenant 1,98% de sulfate d'ammonium; 1,83% de glucose et 54,63 d'eau distillée. Dans ce milieu, l'activité endo-PG observée était de 32,4 (UF / ml) dans l'extrait enzymatique brut. Cette valeur correspond à 324 U/g et la valeur prédite correspond à 255,57 U/g de substrat; Ces valeurs sont élevées comparativement aux valeurs obtenues dans les écorces d'oranges fraîches (Chapitre 1) dont la moyenne était dans l'ordre de 39,66 U/g de substrat, nous pouvons estimer que l'optimisation de la fermentation en milieu solide a amélioré le rendement en endo PG 8,16 fois; l'activité spécifique a été également améliorée elle est de l'ordre de 2,02 U/ mg . Li, et al. (2014b) ont trouvé une activité endo-PG de 0,62 (U / ml) en utilisant la peau d'orange comme substrat. Autres études d'optimisation pour la production de endo PG réalisées par Rezazadeh Bari, et al. (2010) et Patil et Dayanand (2006), qui ont enregistré des activités enzymatiques d'environ 10,88 (UF / ml) et (19,8 UF / ml) respectivement dans des conditions optimales.

Les recherches de Linde, et al. (2007) prédisent qu'une augmentation de l'aération dans le milieu de fermentation augmentera la production d'enzyme endo-PG et réduira la production de pectine méthyl estérase, tandis que Nair and Panda (1997), ont rapporté que les conditions optimales pour la production de pectinase à partir de maïs étaient de 8 kg / m³ de sulfate d'ammonium; 31 kg / m³ de glucose et 20 kg / m³ de maïs. Buyukkileci, et al. (2011) a optimisé la production d'exo-PG à partir de son de blé, de zeste d'orange et de farine de maïs, en utilisant des micro-organismes *Aspergillus sojae* et la méthodologie RSM; la peau d'orange s'est avérée le meilleur substrat pour la production d'exo-PG, elle est également un bon substrat pour la production de endo PG, comme nous l'avons trouvé dans ce travail en utilisant le micro-organisme d'*Aspergillus niger*. Martos et al., (2009), ont optimiser un milieu

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

de culture pour une production maximale en polygalacturonase et une production minimale en pectinéméthyl estérase, cette dernière déméthyle la pectine en libérant le méthanol qui peut endommager la teneur en ester volatils responsables du parfum spécifique du fruit dans les jus, le milieu culture optimal contenait 20 g/l de pectine à pH 4,1.

8.5 Suivi de la fermentation en milieu solide dans les conditions optimales

8.5.1 Cinétique de croissance mycélienne dans le milieu de culture optimum.

Après 144 h de culture, les microorganismes se sont développés beaucoup plus sur la surface du milieu de culture (figure 43). L'absence de liquide interstitiel fait que c'est la géométrie du substrat qui oriente le développement apical et les ramifications dans toutes les directions de l'espace (Oriol 1987).

Dans le milieu de fermentation après quelques heures d'incubation, les spores se sont dispersées dans le milieu qui présente une surface assez irrégulière et accidentée et qui forme des niches favorable au maintien en place des spores. Sur la photo n°1 de la figure 44, on perçoit la spore encore en file, la spore en cours d'hydratation gonfle pour devenir parfaitement sphérique, après le 2^{ème} jours on remarque l'appariation du tube germinatif pour quelques spores. Cela devient plus intense le 3^{ème} jours d'incubation (photo n°5, figure 44), avec une hétérogénéité de volume et de régularité de spore qui paraissent moins volumineuse que celles cultivées sur milieu gélosé en boîte de pétri (chapitre I).

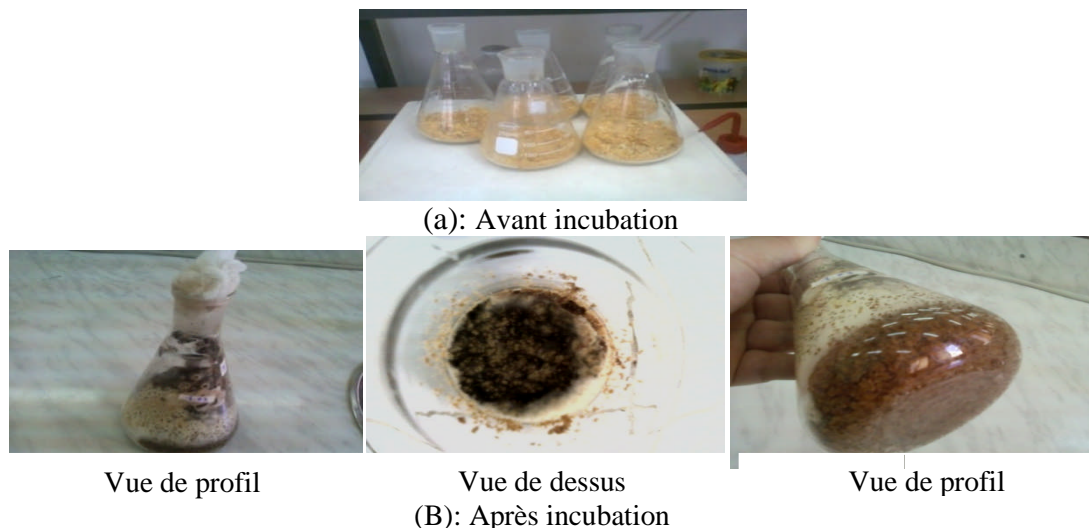
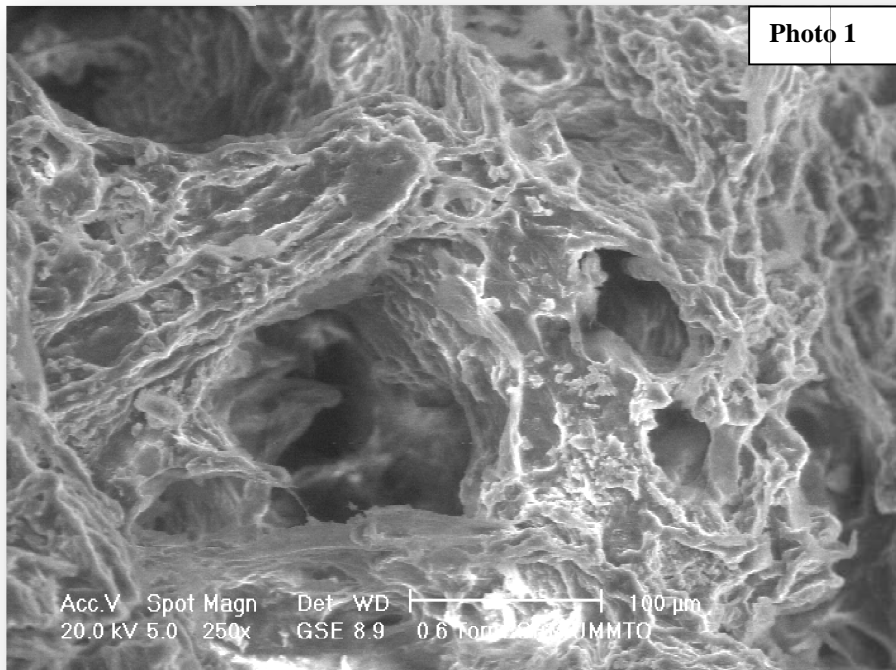
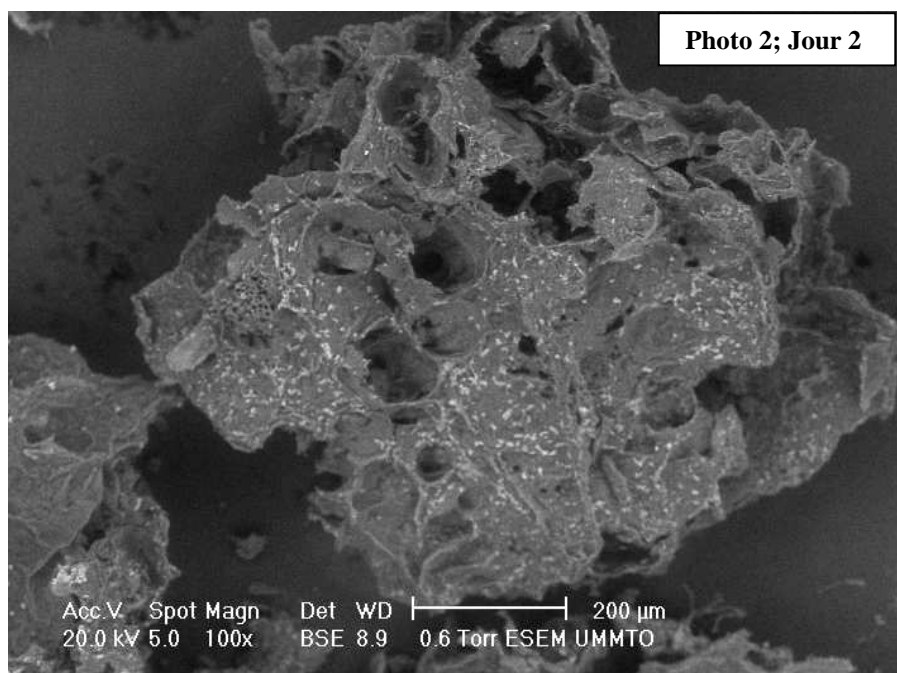


Figure 43. Observation macroscopique du milieu de culture avant et après la période d'incubation

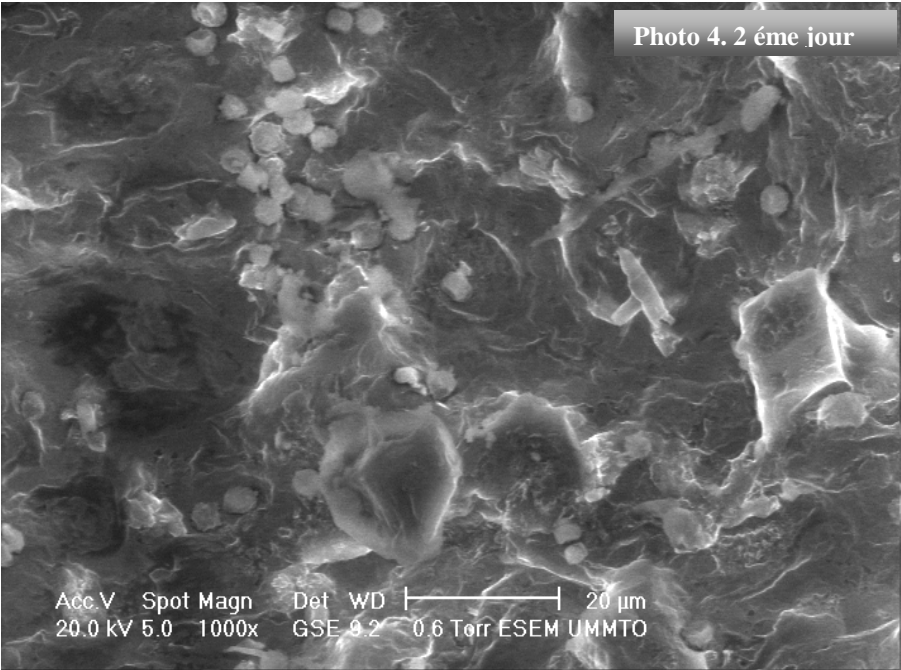
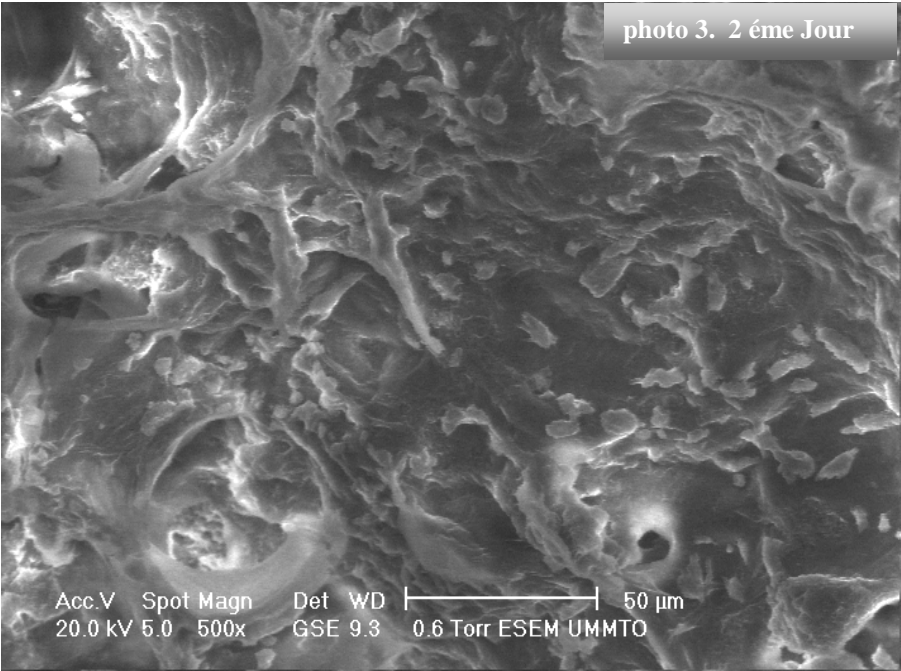
Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés



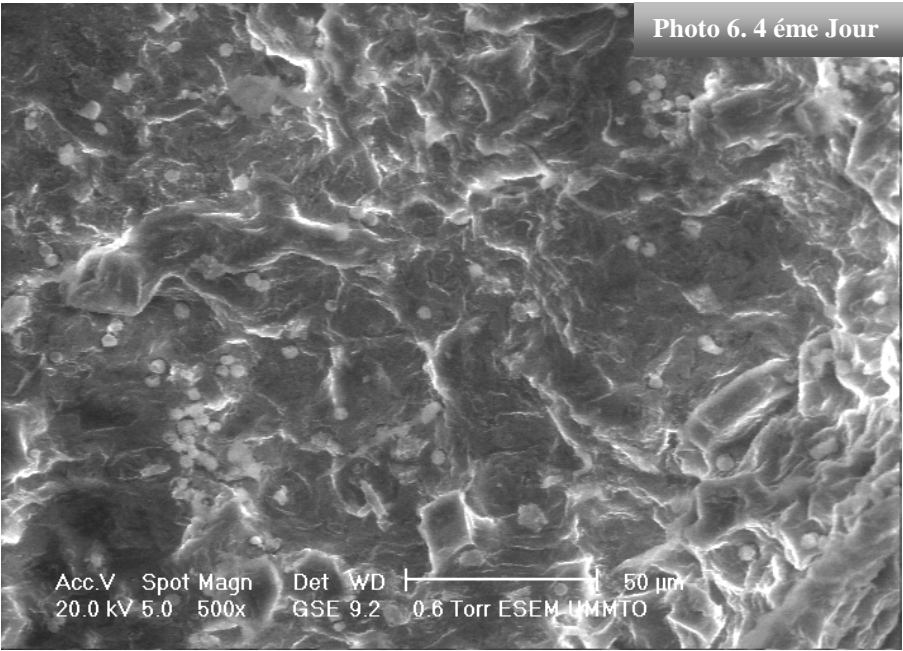
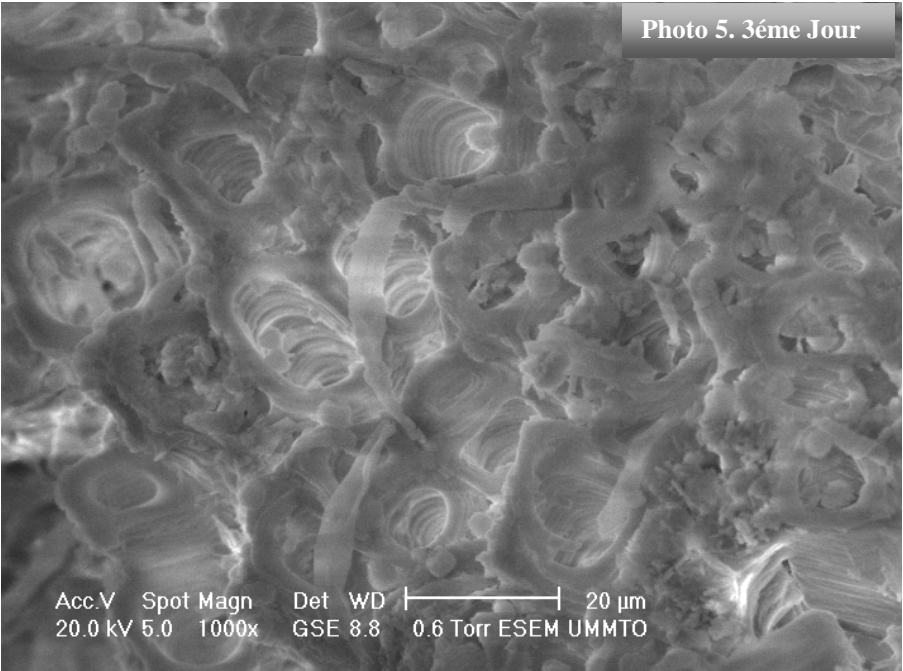
Quelques heures après l'ensemencement du milieu de culture

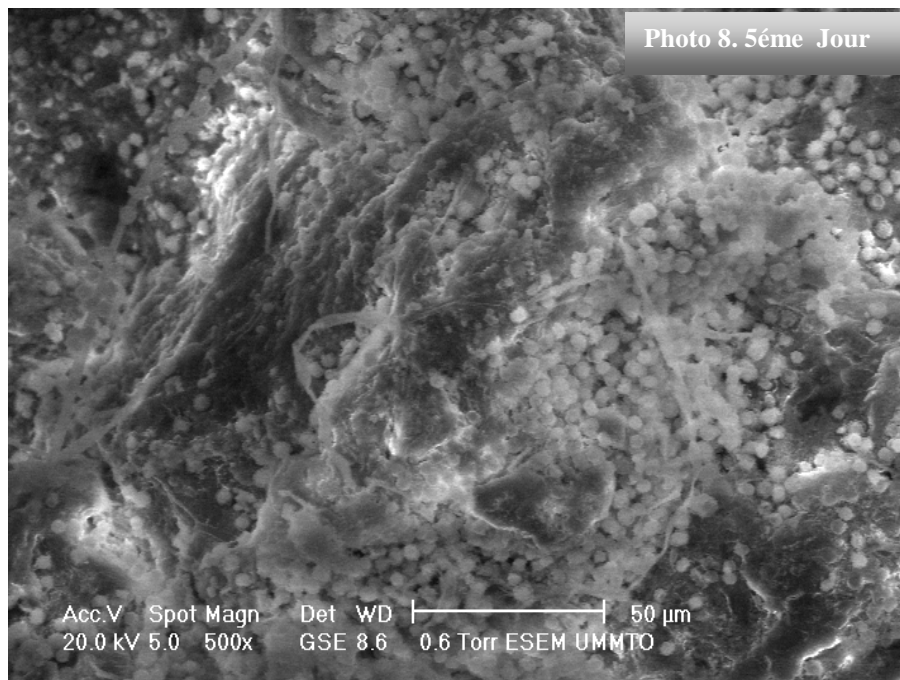
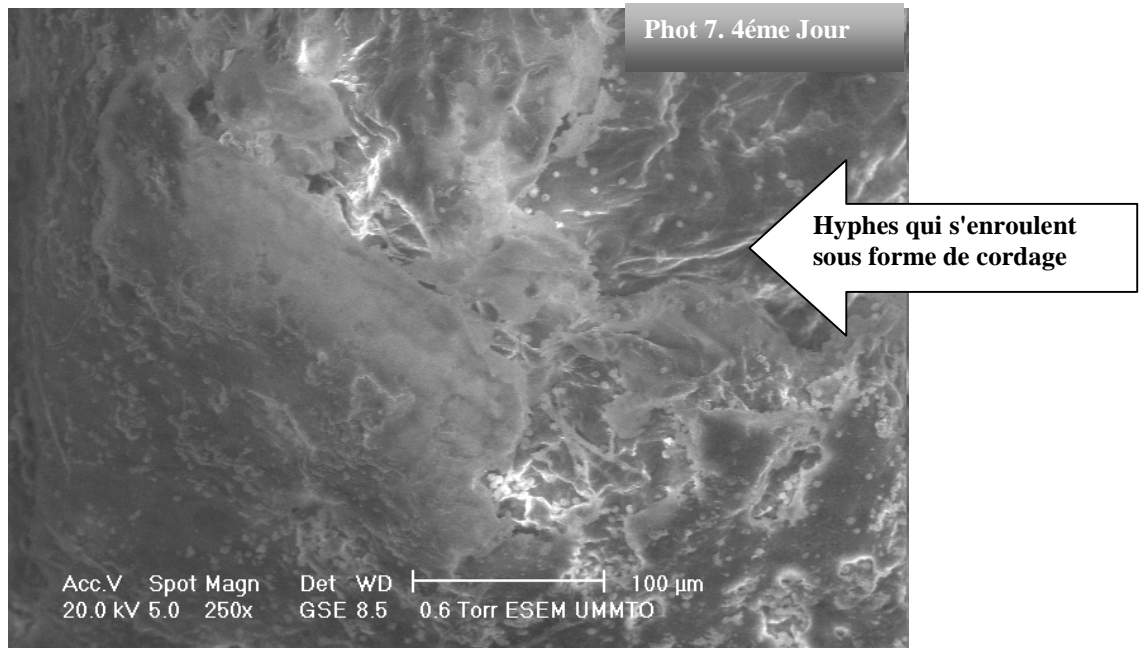


Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

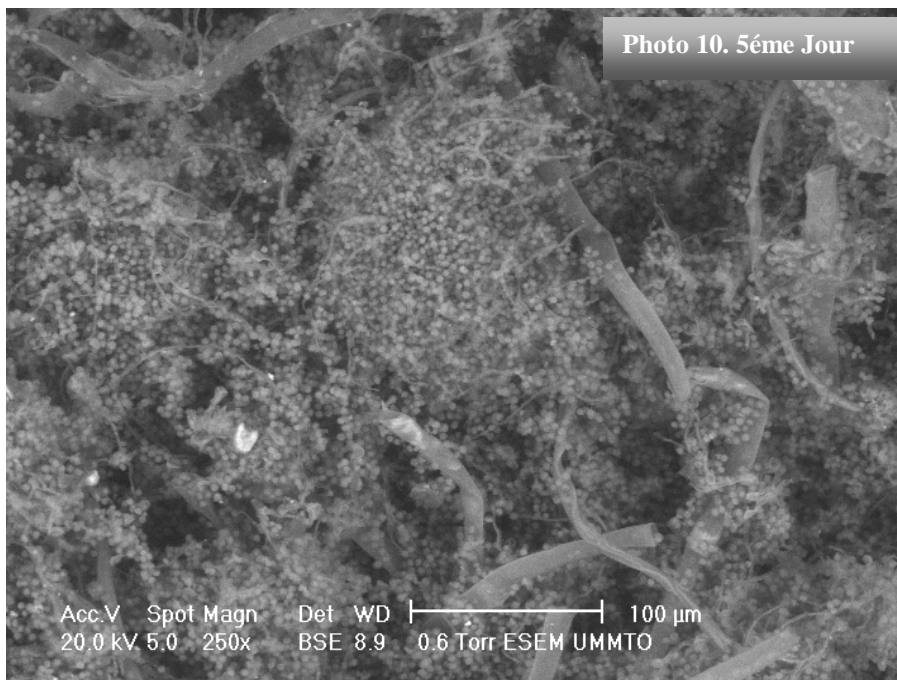
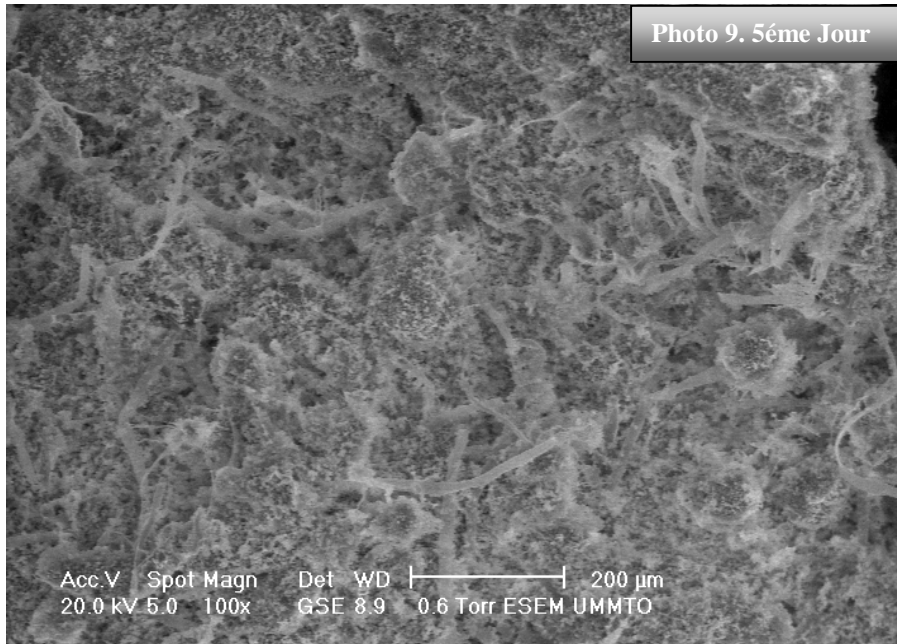


Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés





Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés



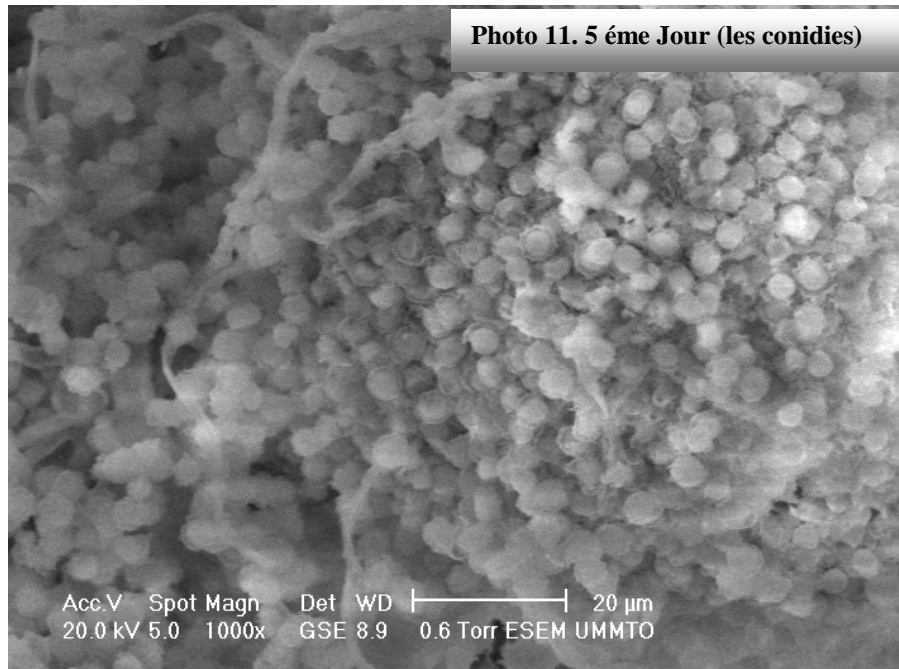


Figure 44. Cinétique de la croissance du microorganisme, suivie par microscopie à balayage électronique (photos: 1,2,3,4,5,6,7,9,10 et 11)

Nous observons aussi la ramification des hyphes qui conditionne le développement du champignon et par conséquent la colonisation du substrat. Dans le 4^{ème} jours (photo n°5, figure 44) le mycélium végétatif se ramifie et rampe à la surface des granules. Les ramifications jointes à la croissance linéaire aboutissent à une telle densité mycélienne que toute la surface du substrat est recouverte et n'est plus discernable (photo n°6 de la figure 44 (4^{ème} jours)). Il est mal aisé en raison de la chevelure mycélienne d'identifier les entrecroisements d'hyphes des ramifications latérales puis le substrat se présente sous forme de volume et non de simple plan.

On peut observer les hyphes qui peuvent s'enrouler pour former des cordages spiraux (photo n°7 de la figure 44). On peut observer plusieurs filaments accolés se dressant à la verticale, les filaments convergents à la base et forment comme les arcs boutants d'une colonne centrale. Les filaments assemblés forment ainsi un ensemble plus solide et plus rigide et peuvent constituer entre les granules de véritables ponts pouvant atteindre 100 µm de long.

Le dernier jour d'incubation, on ne voit qu'un enchevêtrement de filaments sous lequel le substrat disparaît complètement. La taille de mycélium est supérieure à **600 µm**.

Le conidiphore est parfaitement sphérique avec des conidies qui paraissent sur la surface, cette masse qui était assez solide et de couleur noire a été éjectée après lyophilisation, les résultats sont observés sur la photo n°8 qui montre la dispersion des conidies dans l'espace

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

La principale conclusion de l'étude microscopiques de la croissance microbienne en fermentation sur milieu solide, menée par Viniegra-González and Favela-Torres (2006), était la nécessité de rechercher de manière systématique le mécanisme physiologique que les agrégats microbiens peuvent avoir pour réguler la diffusion des substrats au sein du biofilm ou à travers les membranes cellulaires dans les systèmes SSF. ils ont présenté , un ensemble de modèles théoriques alternatifs où:

- (i) La diffusivité est supposé être homogène au sein de la biofilm,
- (ii) il est supposé changer en réponse à un excès en concentration de substrat ou
- (iii) il est supposé homogène dans le biofilm, mais en changeant la perméabilité des membranes cellulaires.

La résistance à la répression catabolique peut dépendre de la régulation de la diffusivité du substrat par l'un des deux derniers modèles, ou peut-être par une combinaison des deux. Ce type de mécanisme peut être partagé par différents types d'agrégats microbiens exposé à la diffusion de l'oxygène et du substrat, surtout si ils ont des trajectoires de diffusion différentes, le chemin de diffusion pour l'oxygène étant beaucoup plus court que le chemin de diffusion pour le substrat. Une façon possible d'explorer ce phénomène intéressant est l'utilisation des analyses microchimique des agrégats microbiens de telle sorte que la microheterogénéité de la composition chimique, porosité, tortuosité et la diffusivité peuvent être détectés et des modèles structurés de la fermentation à l'état solide peut être soutenue expérimentalement. Les modèles présentés ici indiquent la plausibilité de ce genre de raisonnement.

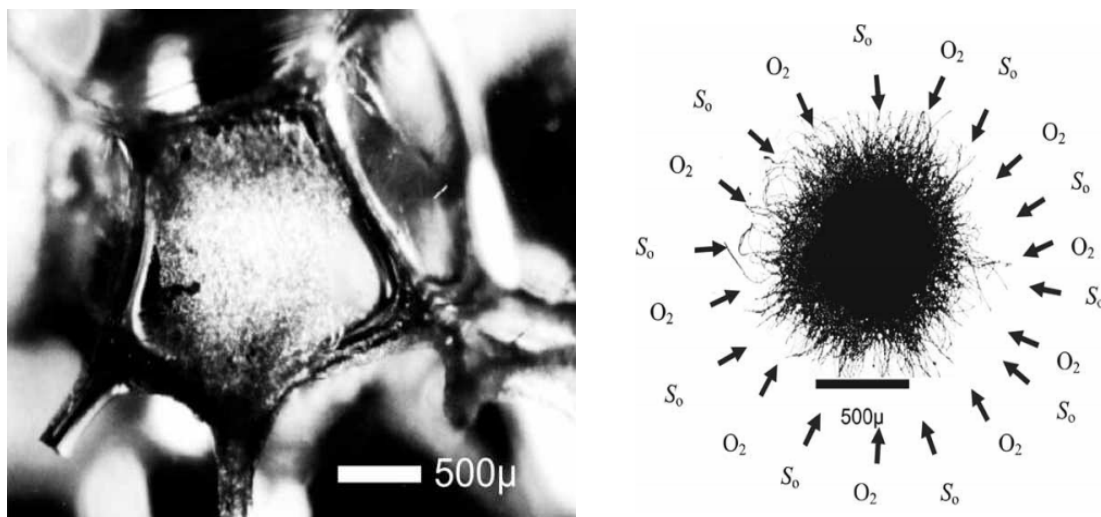


Figure 45. (a): Micrographie d'*Aspergillus niger* C28B25 en croissance dans une mousse de polyuréthane dans des conditions de fermentation à l'état solide après 6 heures de culture (100X). Micrographie de J. S. Romero-Gómez (résultats non publiés); (b): Schéma des flux isotropes d'oxygène et de substrat pour un granule d'*Aspergillus niger*, cultivé dans un flacon à shake. Micrographie de J. S. Romero-Gómez (résultats non publiés) (Viniegra-González and Favela-Torres 2006)

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

Holker and Lenz (2005) ont résumé les phénomènes qui se produisent pendant la croissance des mycéliums à l'échelle microscopique par le schéma de certains des processus qui se produisent à l'échelle microscopique pendant la fermentation à l'état solide (Heerd, et al.). Après la sporulation, des hyphes fongiques se développent dans un tapis mycélien (noir), qui s'étend sur la surface des particules qui composent le substrat solide (Finkler, et al. 2017). De la natte mycélienne, aérienne les hyphes font des saillies dans l'espace gazeux, tandis que d'autres pénètrent dans le substrat en se développant dans des pores remplis de liquide (figure 46). À des niveaux d'humidité normaux, les espaces vides entre les hyphes aériens sont plus susceptibles d'être remplis de gaz (g), tandis que les espaces vides dans le tapis mycélien et dans le substrat sont remplis de liquide (l). Les activités métaboliques indiquées se produisent principalement près de la surface du substrat et dans les pores; cependant, Les régions exposées du mycélium (par exemple les hyphes aériens) montrent également un métabolisme et il peut y avoir un transport de substances à partir du pénétrant aux hyphes aériens. Les enzymes hydrolytiques (bleu clair), qui sont produites par le mycélium, diffusent vers la matrice solide et catalysent la dégradation des macromolécules en unités plus petites (vert). Ces derniers sont absorbés par le champignon pour servir de nutriments.

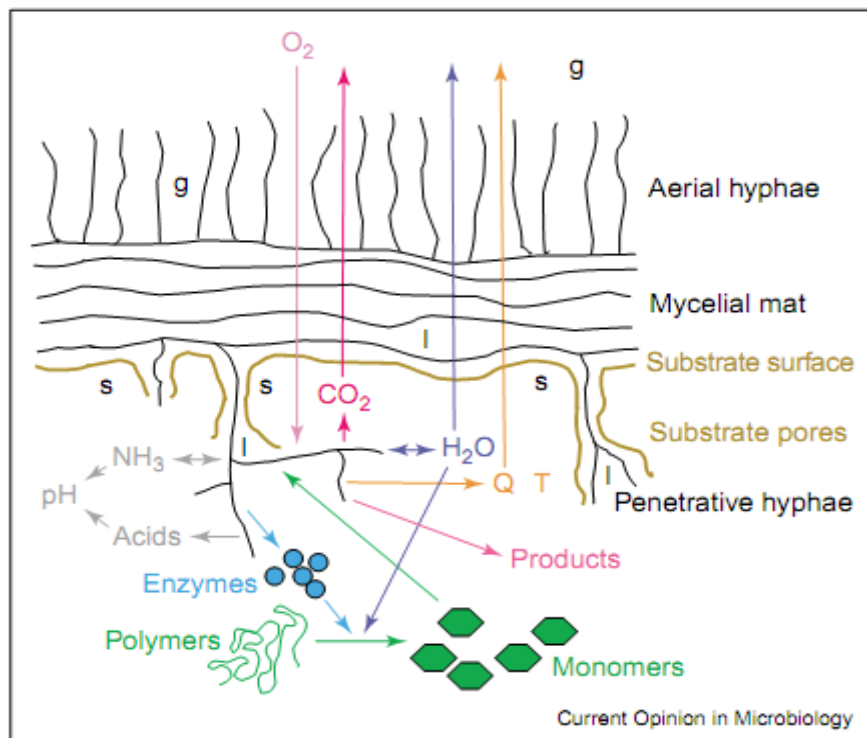


Figure 46. Schéma de la croissance mycélienne selon Holker et Lenz (2005).

O₂ est consommé et le CO₂ avec H₂O, s'évaporent et d'autres produits biochimiques intéressants sont produits pendant la fermentation. Par conséquent, des gradients se développent dans le biofilm, par exemple, la force d' O₂ de diffuser de la phase gazeuse dans

les régions les plus profondes du biofilm (lilas) et de la force du CO₂ de diffuser de ces régions à la phase gazeuse (Ralet, et al.). Le développement de chaleur (Q; orange) conduit à une augmentation rapide de la température (T), ce qui constitue un problème sérieux lors de la SSF. La chaleur est donc retiré du substrat non seulement par conduction mais aussi par évaporation, qui fait partie de l'équilibre complexe de l'eau dans le système (bleu foncé). Outre l'évaporation, l'équilibre hydrique comprend l'absorption d'eau par le mycélium au cours de la croissance, la consommation d'eau lors des réactions d'hydrolyse et la production d'eau par la respiration. Un autre facteur important, le pH local, pourrait être modifié en raison de la libération d'acides carbonés et l'échange d'ammoniac (gris). Les produits biochimiques d'intérêt (magenta) qui sont libérés dans la matrice solide et les liquides pendant la fermentation peuvent être absorbés par le solide et peuvent devoir être extraits pour une utilisation ultérieure à la fin du processus. Tout cela et de nombreux autres phénomènes peuvent fortement influencer sur les performances des processus en SSF.

8.5.2 Cinétique de la production des enzymes pectinolytique.

L'allure de la courbe de l'évolution du pH (figure n° 47) montre une diminution progressive de ce dernier jusqu'à une valeur de 2,48; à partir de 144 h de fermentation, le pH reprend son augmentation. Cette allure ressemble au profil de variation de pH typique décrit dans les travaux antérieurs (Fontana, et al. 2005; Solís-Pereira, et al. 1993); dans les travaux de Friedrich, et al. (1990), un abaissement de pH jusqu'à 2,6 a été observé après 7 jours de fermentation, puis le pH a augmenté jusqu'à 3.6. Schmidt, et al. (1995) et Fontana et al., (2005) ont rapporté que le pH diminue durant la phase logarithmique de croissance puis il se stabilise durant la germination et la formation des spores. Ces mêmes auteurs ont décrit que durant la phase de croissance, il y'a consommation des sulfates d'ammonium, ce qui diminue de l'alcalinité du milieu et par conséquent un abaissement du pH. En plus à la consommation de l'azote par le microorganisme durant la phase de croissance, Bellon-Maurel, et al. (2003) ont rapporté que la réduction du pH peut être due à l'excrétion de certains acides organique comme l'acide citrique acétique, lactique pendant l'assimilation de la matière organique par le microorganisme.

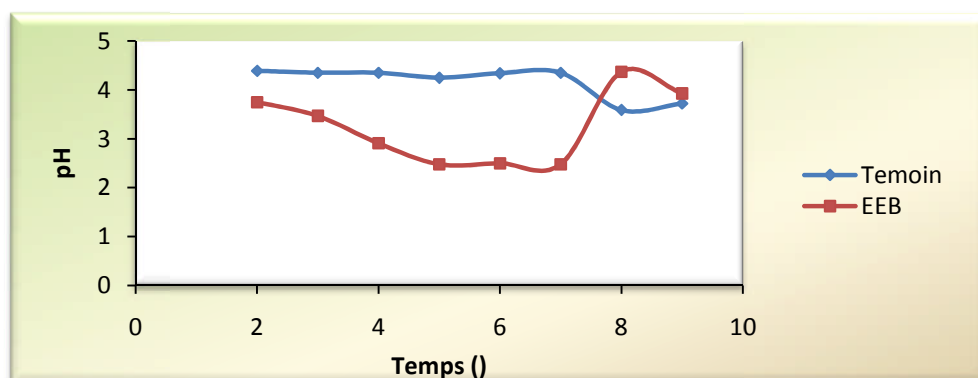


Figure 47. Suivi du pH en fonction du temps de fermentation

Le taux de protéines solubles dans les extraits enzymatiques bruts augmente pendant les premières 72 h de fermentation (figure 48), il passe de 4.6 mg/ml à 20,22 mg/ml. Cette augmentation peut être expliquée par la synthèse des enzymes. En effet ceci a été observé par Fontana et al., (2005), qui ont rapporté que la production des pectinases est associée à la croissance du microorganisme dans le milieu. Après 144 h de fermentation la teneur en protéines dans l'EEB remonte légèrement et a tendance à se stabiliser.

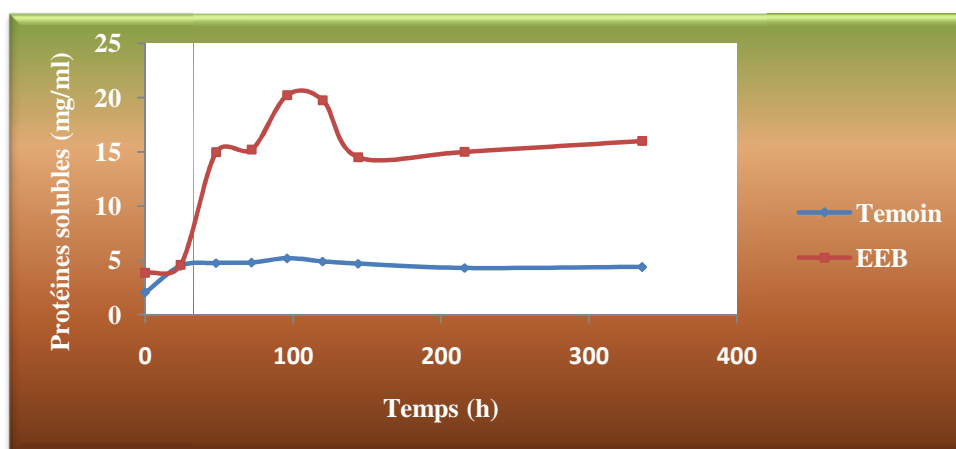


Figure 48. Suivi des protéines solubles en fonction du temps de fermentation

L'endo-polygalacturonase a un rôle principal dans l'hydrolyse des liaisons chimiques internes du polysaccharide et également dans toute l'activité pectolytique (Sandri, et al. 2011). L'activité endo-polygalacturonase est exprimée en unité de dépectinisation (U.D), c'est la quantité d'enzyme nécessaire pour que la viscosité d'une solution de pectine diminue de 50% (Patil et al.,2006). La valeur de la viscosité du témoin (sans extrait enzymatique) est égale à la viscosité initiale de la solution de pectine telle qu'elle a été préparée. L'allure de la courbe de production de l'endo PG sur milieu solide (figure 49) est similaire à celle obtenue par Acuna-Arguelles et al., (1995), Martins, et al. (2002) et Silva, et al. (2007) ; qui ont décrit que la

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

production des enzymes pectinolytiques commence à partir de 144h de fermentation et atteint son pic après 336h de fermentation. Dans ce travail, la production d'enzyme commence à partir de 48h et atteint son pic après 144h h de fermentation, après ce temps l'activité enzymatique demeure constante. L'activité enzymatique maximale est 32,41 U/ml qui correspond à une réduction de 97 % dans la viscosité de la solution pectique testée.

La cinétique de l'activité de l'exo-PG a permis de suivre l'évolution de la quantité de groupements réducteurs apparus pendant l'hydrolyse de la chaîne pectique du substrat.

Les valeurs des densités optiques des solutions à tester révèlent la quantité des sucres réducteurs présents dans le milieu, par conséquent on déduit les groupements réducteurs libérés lors de l'hydrolyse enzymatique par l'exopolygalacturonase.

La figure 50 montre l'évolution de l'activité exo-PG en fonction du temps de fermentation ; elle varie entre 1.2 U/ml et 35,02U /ml.

Suresh et al. (2010) ont utilisé la méthode du DNSA sur différents substrats, ils ont rapporté des valeurs comprises entre 22,12 et 162,5 U/ml pour l'activité de l' exo-PG produite par *Aspergillus carbonarius*.

De leur coté, Gewali, et al. (2007) ont signalé une activité d'exo-PG qui varie entre 0,8 et 13,25 U/ml alors que Kumar, et al. (2011) , Gomes, et al. (2011) et Heerd, et al. (2012) ont enregistré des activités de 51,82; 45 et 34,12 U/ml, respectivement.

Par ailleurs, l'activité de l'exo-PG produite par *Aspergillus niger* est de 142 U/ml alors que celle produite par *Aspergillus oryzae* est de 40 U/ml (Sandri, et al. 2011)

Les deux enzymes (endo-PG et exo-PG) peuvent réduire la viscosité du milieu réactionnel mais l'action de l'exo-PG engendre une augmentation du nombre de liaisons glucosidiques rompues plus important que l'endo-PG : une endo-PG provoque une baisse de 50% de viscosité alors que seulement 5 à 10% des liaisons sont rompues; en revanche, un nombre beaucoup plus important de liaisons, supérieur à 20%, doivent être coupées par une exo-PG pour atteindre la même baisse de viscosité (Baron and Thibault 1985). Ceci a été observé par Benchabane, et al. (2006) ,lors d'une étude sur l'évaluation de l'activité des polygalacturonases au cours de la maturité des dattes, où il a été relevé une baisse de la viscosité spécifique du milieu réactionnel de 18% correspondant à un pourcentage d'hydrolyse des pectines de 7%, en déduisant que les polygalacturonases de la datte seraient de type exo-PG.

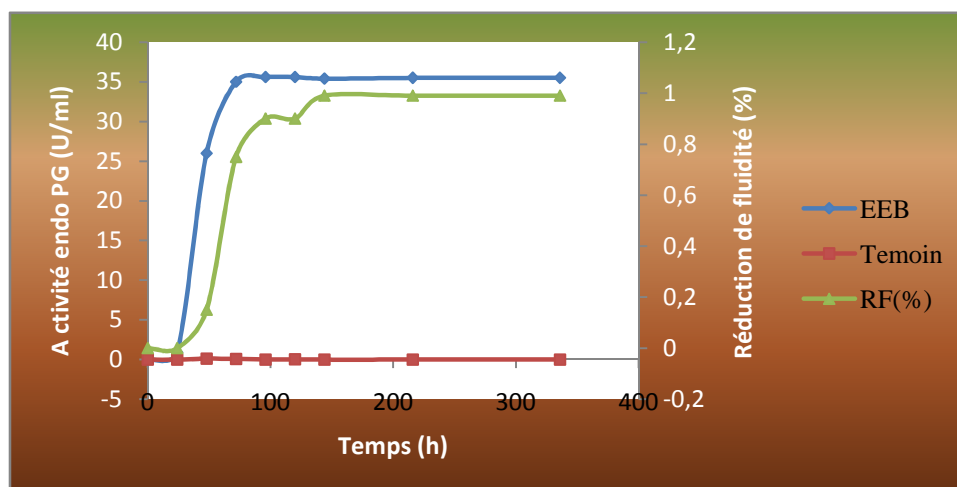


Figure 49. Activité endoPG en fonction du temps

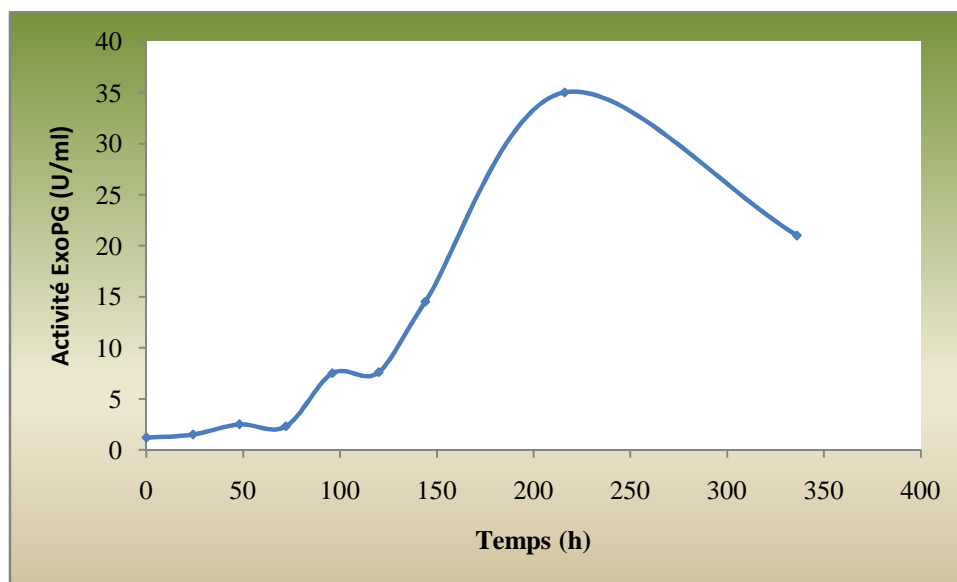


Figure 50. Activité exoPG en fonction du temps.

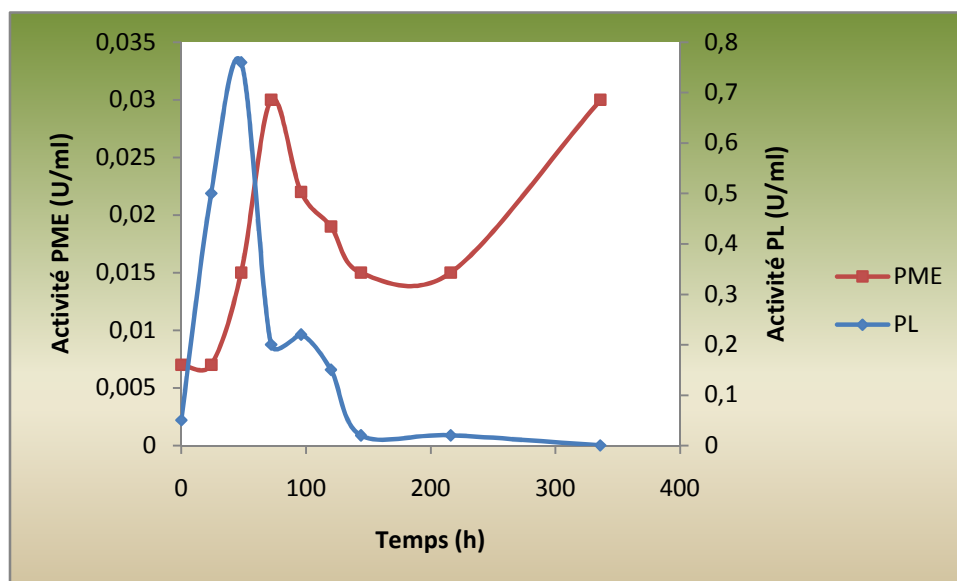


Figure 51. Activités de PL et PME en fonction du temps

Les pectinéméthylestérases ou pectinestérases (PME ou PE) 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 C₆ de l'acide galacturonique.

L'examen de la figure 51, montre une activité de la PME qui se situe dans la fourchette 0.007 – 0.03 U/ml. La valeur maximale de la PME est très proche à celle enregistrée par Sandri et al. (2011) qui ont trouvé une valeur égale à 0.03 U/ml produite par *Aspergillus niger* et 0,29 U/ml par *Aspergillus oryzae*. La valeur optimale de la PME qui est la minimale trouvée par Martos et al. (2009) était 0.22U/ml.

D'après les travaux de Semenova, et al. (2003) l'endoPG réagit en synergie avec la PME durant l'hydrolyse de la pectine hautement méthylée par contre un antagonisme a été remarqué entre la PL et la PME, cela a été constaté sur les courbes obtenues dans notre travail(figure51).

La PL diminue la viscosité du jus sans qu'il soit nécessaire de procéder à une déstérification préalable, qui précède généralement le clivage hydrolytique de la pectine. En outre, il permet la clarification du jus sans destruction des composants esters volatils, ce qui confère au produit un parfum de fruit spécifique et son utilisation ne génère pas de méthanol au cours du processus de fabrication (Maller, et al. 2011). L'allure du graphe de la figure n° 51 montre que le maximum d'activité de la pectine lyase était 0,76 après 48 heures de fermentation, après ce temps l'activité a brusquement baissé dans le milieu. *A. oryzae* a montré des perspectives

Chapitre II. Optimisation de production des pectinases par fermentation en milieu solide en utilisant les résidus d'oranges séchés

considérables pour la production des pectines lyases en FMS sur les écorces d'oranges un maximum d'activité a été obtenu à une valeur de 875U/ml (Koser, et al. 2014). Afifi, et al. (2002), ont rapporté une valeur de 0.042 U/ml en utilisant *Curvularia inaequalis* sur les résidus d'oranges comme substrat. De leurs parts Mantovani, et al. (2005) ont utilisé l'*A.niger CF4* pour la production de la lyase , ils ont pu obtenir un maximum d'activité de 18,8 U/ml. Zhao, et al. (2008) ont obtenu une teneur en PL de 620 U/ml en utilisant le *Bacillus subtilis*, Silva, et al. (2002) ont obtenu 60 U/ml de PL.

La synthèse des pectinases s'est produite durant la croissance du microorganisme (pendant les premières 48 heures) avant la phase de germination, ceci est en bonne allure avec les résultats des travaux antérieurs (Solís-Pereira, et al. 1993) .

En général, il nous semble que l'augmentation des activités enzymatiques est parallèle à l'abaissement du pH. En effet, L'activité enzymatique est très dépendante de la valeur du pH. Ceci s'explique par le rôle de la distribution des charges sur la molécule d'enzyme lors de l'attachement au substrat et lors du mécanisme catalytique (Bauer, et al. 2010b).

Conclusion

L'insolubilité totale des résidus d'orange, fait de la fermentation solide une technique potentiellement très intéressante pour les nouvelles valorisations par les procédés biologiques. Les résidus d'oranges séchés et broyés sont très condensés en matière nutritives relativement aux résidus frais, ce qui favorise la croissance rapide du microorganisme. Cependant les résidus frais se caractérisent par un tissu moelleux et non cristallin favorable à la croissance des moisissures. Malgré que le séchage peut induire des changements dans le tissu de la matière végétale, défavorables à la croissance des microorganismes (il peut causer le durcissement des granules par exemple), mais il reste la technique la plus utilisée pour le stockage de la matière.

L'étude de l'influence des facteurs de la fermentation en milieu solide sur la production des pectinases et la croissances des microorganismes est très importante. L'optimisation de ces facteurs peut améliorer la production des pectinases, ce qui peut avoir une incidence directe sur le cout de la production. La technique de la MSR est une technique rapide peu couteuse et s'adapte bien à l'optimisation des pectinases en FMS. Dans cette étude la MSR a permis d'améliorer le production plus de 8 fois en utilisant l'*Aspergillus niger* , cette espèce de microorganisme a montré une bonne capacité pour la production de ces enzymes en FMS. Dans les conditions optimales les activités enzymatiques spécifiques étaient améliorées, cela peut faciliter la purification de ces enzymes.

Chapitre III

Purification et Caractérisation des Pectinases.

Travaux antérieurs

Il est important de comprendre la nature et les propriétés des enzymes pour leur utilisation efficace (Pedrolli, et al. 2009). Les pectinases microbiennes doivent être purifiées pour une compréhension complète de leurs propriétés et de leurs études et de leur caractérisation (Shet, et al. 2018). L'analyse de l'activité enzymatique dans l'extrait brut n'indique pas s'il s'agit de la présence d'une action isolée ou un système multienzymatique travaillant en synergie pour la dégradation du substrat. La caractérisation des enzymes purifiées est une ligne de recherche importante car elle permet une distinction entre les composants du complexe enzymatique, sur les mécanismes de dégradation du substrat et sur les conditions optimales d'activité et la synthèse et régulation enzymatique (Pedrolli, et al. 2009). Toutes fois, la purification et la connaissance améliorée des propriétés des pectinases sont devenues essentielles pour leur utilisation en tant que produit biocatalyseur approprié et les appliquer dans divers domaines de recherche. Les pectinases provenant de diverses sources de micro-organismes ont été purifiées. Des exopectinases d'une souche d'*Aspergillus niger*, ont été isolées par élution sur DEAE cellulose avec un tampon acétate de sodium 0,2 M à pH 4,6, l'activité spécifique de l'enzyme purifiée a été multipliée par 209 fois et le rendement de purification était 8,6%. Une seconde pectinase qui a été isolée avec une activité spécifique multipliée par 205 fois, et avec un rendement de 1%. La purification partielle de polygalacturonase et d' α -L-arabinofuranosidase de *Sclerotinia fructigena*, a été réalisée en utilisant une chromatographie de filtration sur gel CM-Sephadex à échange d'ions (Fielding and Byrde 1969; Gadre, et al. 2003). Une endo-PG et une pectinesterase ont été séparées du filtrat de culture de *Trichoderma reesei* par chromatographie Sephadex (Rexová Benková and Markovic 1976). Une polygalacturonase de *Rhizopus stolonifer* a été purifiée jusqu'à 10 fois par précipitation à l'éthanol suivie par une chromatographie à échange d'ions CM-Sepharose 6B et une chromatographie à filtration sur gel Sephadex G-100 (Manachini, et al. 1987). Une PG et une PL d'*Aureobasidium Les pullulans LV10* ont été séparées par CM-Sepharose 6B suivi par une chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose et filtration sur gel sur Sephadex G-100 (Manachini, et al. 1988).

Une Pectinase de *Clostridium aetobutylicum* ID 91-36, un mutant UV, a été purifiée par chromatographie sur colonne d'échange de cations de Sepharose et éluée avec du NaCl (Seethaler and Hartmeier 1992), Une Endopectate lyase synthétisée par *Bacillus macerans* a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium suivie par une chromatographie sur DEAE-Sephadex A50 et chromatographie CM-cellulofine (Miyazaki 1991). De même des

Chapitre III. Purification et Caractérisation des Pectinases.

endopectates lyases I / IV ont été isolées du filtrat de culture d'*Erwinia carotovora* par chromatographie sur CM Sepharose CL 6B, filtration sur gel Sephadex S200 et focalisation isoélectrique (Tanabe, et al.).

deux enzyme pectinolytiques extracellulaires produites par *Sclerotinia sclerotiorum* ont été purifiées; une exopolygalacturonase (exoPG) et une exopolyméthylgalacturonase (exoPMG), elles ont été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium, puis chromatographie de gel de filtration et d' échange ionique, puis à nouveau par filtration sur gel , les deux enzymes ont des poids moléculaires de 66 kDa et 140 kDa respectivement, elles ont été caractérisées par détermination du séquençage des acides aminés et des études immunologiques des deux enzymes (Riou, et al. 1992) .

De nombreuses enzymes ont été purifiées par relargage au sulfate d'ammonium et précipitation à l'éthanol puis filtration sur gel sur Sephadex G-25. Une préparation homogène d'enzymes peut être obtenue en effectuant une chromatographie répétée sur une colonne de DEAE-cellulose. L'endopectate lyase produite à partir de *Bacillus macerans* a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium puis par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 et chromatographie sur CM cellulofine (Miyazaki 1991).

La purification de l'Endopectate lyase I-IV d'*Erwinia carotovora* a été effectuée par chromatographie sur CM Sepharose CL 6B, filtration sur gel Sephadex S-200 et focalisation isoélectrique (Shet, et al. 2018). La purification de la polygalacturonase de *Verticillium albo-atrum* a été réalisée par chromatographie sur colonnes de CM-cellulose et hydroxyapatite, par filtration sur gel et électrophorèse préparative (Shet, et al. 2018). La détermination des masses moléculaires de l'exopolygalacturonase et de la polygalacturonase d'*Aspergillus foetidus* EGEK145 a été réalisée et révélée à 54 et 31 kDa, respectivement (Taşkın and Eltem 2008)

Contreas-Esquivel and Voget (2004), ont purifié avec un facteur de 470 fois la PGI d'un extrait de culture d'*Aspergillus kawakii* et avec un taux de récupération de 8.6 % de l'activité initiale, cette opération a été réalisée en Trois étapes : précipitation à l'acétone, chromatographies sur colonne à Sepharose Q et Sephacryl S-100. la PG de *Thermoascus aurantiacus* était isolée avec un facteur de purification de 21 fois et avec un taux récupération de 24,6 %, par chromatographie de gel de filtration sur Sephadex G-75, suivie par une chromatographie sur SP-Sepharose à échange d'ions (Martins, et al. 2007). Celestino et ces collaborateurs (2006) ont purifié avec un facteur de 9,37 fois une pectinase produite par *Acrophialophora Nainiana* à partir de duquel une exopolygalacturonase et pectine lyase ont été récupérées après trois étapes de purification : filtration sur gel Sephacryl S-100, échange d'ions DEAE-Sepharose et une autre filtration sur gel sur Sephadex G-50 (Naidu and Panda

1998) . Kashyap, et al. (2000) ont développé une stratégie de purification pour l'isolement de la pectine lyase de *Bacille sp. DT7*. l'enzyme était précipitée avec le sulfate d'ammonium suivi par chromatographie sur colonne à DEAE-Sephacel et Sephadex G-150. la pectine lyase produite par *Aspergillus flavus* était purifiée avec un facteur de 58 et avec une récupération de 10.3 % de l'activité initiale, en Trois étapes: Fractionnement par le sulfate d'ammonium, chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Cellulose et gel de filtration sur Sephadex G-100. L'utilisation de la chromatographie par échange d'anions sur différents supports et de la chromatographie hydrophobe au phényl-Sepharose, a permis d'isoler cinq enzymes pectolytiques du milieu de culture liquide d'une souche mutante d'*Aspergillus japonicus*: deux endo polygalacturonases (I et II, 38 et 65 kD, pI 5,6 et 3,3), de la pectine lyase (50 kD, pI 3,8) et de deux pectinestérases (I et II) avec des poids moléculaires de (46 et 47 kD) et de même pH isoélectrique (pI 3,8). Les pectinestérases représentent apparemment deux isoformes de la même enzyme; toutes les enzymes purifiées étaient homogènes selon SDS PAGE et le gel de polyacrylamide IEF, à l'exception de endo polygalacturonase II qui a donné deux bandes sur la focalisation isoélectrique, mais une bande sur l'électrophorèse (Semenova, et al. 2003) .

La polygalacturonase de *Aspergillus flavus* était purifié avec une amélioration de 57,1 fois de son activité spécifique et un rendement de 54,9 %, après une ultrafiltration suivie par une chromatographies sur colonne de CM-Cellulose et Sephadex G-100 (Yadav, et al. 2008) . Comme indiqué, les techniques de chromatographie conventionnelles ont été efficacement utilisées pour purifier les enzymes pectinolytiques.

La polygalacturonase d'*Aspergillus niger* (MTCC 3323) a été purifiée par Kant et ses coéquipiers (Kant, et al. 2013b); l'enzyme a été précipitée avec de l'éthanol à 60% ce qui a entraîné une purification de 1,68 fois, puis L'enzyme était purifiée avec un facteur de 6,52 fois par chromatographie sur gel de Sephacryl S-200. L'analyse de l'enzyme purifiée par SDS – PAGE, a révélé un hétérodimère de 34 et 69 kDa. L'homogénéité de l'enzyme a été vérifiée par NATIVE-PAGE et son poids moléculaire était de 106 kDa. L'enzyme purifiée a montré un maximum d'activité en présence d'acide polygalacturonique à une température de 45 ° C, pH de 4,8.

Une polygalacturonase extracellulaire (PGase) de *Mucor rouxii* NRRL 1894 a été purifiée jusqu'à homogénéité par deux étapes chromatographiques en utilisant Sépharose-CM et Superdex 75. L'enzyme purifiée était un monomère de poids moléculaire de 43100 Da et d'un pI de 6. L'activité PGase optimale était à 35 ° C et à pH 4,5 (Saad, et al. 2007) . Jacob et son équipe, ont purifié une polygalacturonase produite par *Streptomyces lydicus* jusqu'à

homogénéité par ultrafiltration et par une combinaison de procédures chromatographiques d'échange d'ions et de filtration sur gel. L'enzyme purifiée était une exo-polygalacturonase d'un poids moléculaire de 43 kDa. L'enzyme était optimalement actif à 50 ° C et à pH 6,0. L'enzyme était stable à des pH allant de 4,0 à 7,0 et à une température de 45 ° C au moins pour 90 min (Jacob, et al. 2008b). L'enzyme pectinolytique thermo-alcaline de *Hylocereus polyrhizus* a été purifiée à 232,3 fois avec un rendement de 73,3%, par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie de filtration sur gel et chromatographie d'échange d'ions. L'application d'une chromatographie d'échange d'ion combinée à une électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a révélé que l'enzyme était monomère avec un poids moléculaire de 34,2 kDa. La pectinase présentait une grande spécificité vis-à-vis de l'acide polygalacturonique, de l'arabinane, du xylane (Amid, et al. 2014).

Li, et al. (2014a) ont déterminé les conditions optimales de purification d'une pectinase alcaline de *Bacillus subtilis*, en combinant les techniques de centrifugations, précipitation au sulfate d'ammonium et les techniques de chromatographiques d'échanges d'ions et de gel de filtration sur séphadex G75. La polygalacturonase (PG) de l'*Aspergillus niger* U-86 a été purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium suivie par filtration sur gel Sephadex G-75. Le résultat de l'étude a révélé une augmentation dans le pli de purification de 6,1 fois, le rendement en enzyme était de 64%. L'analyse par SDS-PAGE de la polygalacturonase purifiée a montré la présence de deux bandes avec des poids moléculaires de 36 et 38 kDa (Mohsen, et al. 2009). Khairnar, et al. (2009) pendant son étude sur la production de pectinase par différentes souches d'*Aspergillus niger* a rapporté que le degré le plus élevé de précipitations par le sulfate d'ammonium avait atteint 65%, une enzyme pectinolytique a été purifiée par chromatographie d'échange d'ions éluee avec différentes solutions pour déterminer le poids moléculaire de la protéine par SDS-Page qui était de l'ordre de 40 kDa.

Kobayashi et ses collaborateurs ont purifié la première exo-PG bactérienne de la souche *Bacillus sp* KSM-P443 à l'homogénéité. Cette enzyme libère exclusivement de l'acide monogalacturonique, de l'acide polygalacturonique (PGA), di-, tri-, acides tétra et pentagalacturoniques (Kobayashi, et al. 2001). Ils ont aussi déterminé la séquence N-terminale de l'enzyme et conclu qu'aucune séquence appariée avec d'autres pectinases n'a été rapportée à ce jour. Une endo-PG extracellulaire produite par *Aspergillus awamori* IFO 4033 était homogénéité et purifiée en utilisant la chromatographie sur colonne par échange de cations et par exclusion de taille (Nagai, et al. 2000). Sakamoto et ses collègues ont isolé une protopectinase-N (PPN) et une protopectinase-R (PPR) du filtrat de culture du *Bacillus subtilis* IFO 3134 (Sakamoto, et al. 1994). Ces enzymes ont été purifiées par chromatographie

Chapitre III. *Purification et Caractérisation des Pectinases.*

d'interaction hydrophobe sur butyl-toyopearl 650 M, chromatographie d'échange de cations sur CMtoyopearl 650 M et filtration sur gel de Sepharose . Ces enzymes se sont avérées stables sur une large gamme de pH et de températures. Une endopectate lyase produite par *Erwinia caratovara* FERM P-7576 a été sédimentée sélectivement avec un complexe lipidique lipopolysaccharidique produit de manière extracellulaire (Fukoka, et al. 1990). Les cellules sont isolées du bouillon par précipitation, et l'enzyme a été séparée par chromatographie sur gel, activité spécifique était 710 U / mg de protéine. Denis et leurs collègues ont étudié l'effet de la contrainte de cisaillement sur la purification de cinq isoenzymes de pectate lyase produites par *Erwinia chrysanthemi* 3937 dans un équipement d'ultrafiltration (Denis Silva, et al. 1990). L'activité n'a pas été affectée pendant 7 heures de pompage et 36% d'activité ont été perdues après 25 000 passages.

Depuis quelques années, des recherches vigoureuses ont été menées sur l'isolement et la caractérisation des pectinases. Des nouvelles matrices d'affinité avec amélioration des caractéristiques et des techniques de précipitation par affinité ont été développées pour la purification des pectinases. Récemment beaucoup de chercheurs ont concentré leurs efforts sur la modification chimique des pectinases et leurs performances catalytiques. Ces études sont utiles pour déterminer les résidus d'acides aminés clés responsables de la liaison du substrat, de l'action catalytique et des propriétés physico-chimiques ainsi que les conditions environnementales pour une hydrolyse maximale (Gummadi and Panda 2003).

De nouvelles matrices d'affinité ont été développées pour la purification des pectinases, qui possèdent une meilleure mécanique et stabilité chimique que celles réticulées avec de l'acide pectique (Lobarzewski, et al. 1985). Le filtrat de culture a été dessalé sur une colonne Sephadex G-25. Les supports utilisés étaient en verre silanisé à pores contrôlés, le gel de silice a été silanisé avec Le 5-aminopropyl triéthoxysilane. Tous les supports ont été activés avec du 3- (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide et les meilleurs résultats ont été obtenus avec des pores contrôlés sur verre silanisés. Mattiasson et ses collègues ont développé une technique de précipitation par affinité pour la séparation des protéines sélectives utilisant des ligands hétérobifonctionnels (Lobarzewski, et al. 1985). Ils ont utilisé une forme soluble du ligand pour la liaison par affinité, puis la précipitation a été induite pour séparer la protéine complexe. L'alginate a été utilisé comme ligand efficace pour les pectinases. Wu et ses collègues ont étudié le comportement de partitionnement de l'endo-PG vis à vis les protéines totales de *Kluveromyces marxianus* en bouillon de culture de polyéthylène glycol (PEG) et un systèmes aqueux à deux phases de PEG-phosphate de potassium(ATPS) (Wu, et al. 2000). La partition de l'enzyme et des protéines totales était dans la phase inférieure dans les deux

Chapitre III. *Purification et Caractérisation des Pectinases.*

systèmes. Depuis la teneur en enzyme dans les protéines totales du bouillon de culture était plus élevée, ils ont proposé que la séparation de l'endoPG était une concentration plutôt qu'une séparation. Une concentration efficace a été atteinte après recyclage des polymères et dialyse. Un ion métallique immobilisé sur une membrane de fibres creuses de polysulfone d'affinité avec une capacité élevée d'adsorption des protéines a été testé pour le fractionnement des enzymes pectinolytiques (Camperi, et al. 2000).. De même, Savary a développé une méthode simple et rapide permettant de séparer la PE de la PG et d'autres pectinases chez les préparations enzymatiques de la pomme de terre en utilisant la chromatographie de perfusion (Poros HS) (Savary 2001). La PE a été éluée à de faibles concentrations de sel (/ 80 mM NaCl) et la PG à fortes concentrations en sel (/ 300 mM de NaCl). Le développement de telles colonnes semblent prometteuses pour une stratégie de purification économique des pectinases.

Une étude de la littérature a montré que des travaux approfondis ont été effectués sur la purification de PG, PE et PGL et moins d'attention a été focalisée sur les protopectinases et les oligogalacturonases du PMG. axé sur la stabilité, la modification chimique et catalytique et performance des pectinases (Gummadi and Panda 2003).

Les polygalacturonases non acides produites par *Aspergillus kawachii* en milieu glucose / tryptone ont été adsorbées sur un microfiltre en fibre de verre, utilisé pour clarifier le bouillon de fermentation. L'adsorption maximale s'est produite à pH 3 dans des conditions de force ionique faible. L'activité adsorbée pourrait être facilement libérée avec une solution tampon à pH 5. Sur la base de ces observations, un processus de séparation a été mis au point qui vise à clarifier le bouillon de culture et en même temps, à concentrer les polygalacturonases non acides, ces dernières ont été concentrées 20 fois et purifiées avec un facteur de 100 au cours d'une étape de filtration unique. L'avantage pratique de récupérer des polygalacturonases par un processus de filtration réside dans la simplicité et l'efficacité de l'opération impliquée (Voget, et al. 2006).

Une exo-polygalacturonase produite par *Aspergillus sojae* ATCC 20235 a été purifiée par partitionnement en trois phases (TPP) technique de bioséparation utilisant une seule étape par rapport à la purification classique en plusieurs étapes. En utilisant cette technique, La solution enzymatique brut (pH 6,6) a été saturée à 30% (p / v) avec du sulfate d'ammonium et avec un rapport extrait brut / tert-butanol de 1: 1 (v / v) à 25 °C .24,5% d'activité enzymatique ont été récupérées avec un facteur de purification de 6,7. L'enzyme purifiée a été caractérisée en ce qui concerne son activité et son stabilité à diverses plages de pH et de température. Le pH et

Chapitre III. *Purification et Caractérisation des Pectinases.*

la température optimaux pour une activité maximale ont été déterminés à pH 4 et 55° C (Dogan and Tarib 2007).

Nakkeeran, et al. (2010) ont tenté de purifier une polygalacturonase (PG) à partir des cultures d'*Aspergillus carbonarius* obtenues par extraction au tampon acétate après une fermentation en milieu solide, par un procédé à membrane intégrée et une précipitation par affinité pour l'alginate. Les glucides ont été complètement éliminés (98% à 99%). La récupération de la PG était de 72% à 80% au cours du processus membranaire intégré. Dans des conditions optimales de précipitation par affinité, l'activité spécifique du PG augmentée à 2450 U / mg (4 fois) avec une élimination presque complète de les glucides et les composés colorants entraînant une récupération de PG de 61%. Les résultats ont suggéré que la précipitation par affinité était appropriée pour la purification du PG à partir de cultures à l'état solide et le potentiel de l'UF en tant que processus en une étape pour la manipulation de PG éluee (Nakkeeran et al., 2010).

Ces dernières années, des progrès considérables ont été accomplis dans la purification homogène des pectinases en utilisant différentes méthodes de purification (Shet et al., 2018). Outre l'apparition de nouvelles matrices d'affinité pour l'isolation des pectinases, des méthodes de purification précises améliorées telles que les techniques immunochimiques sont essentielles. L'endo-PG de *Trichosporon pencilillanum* a été cristallisée par diffusion à la vapeur en utilisant des gouttes de suspension en utilisant du sulfate d'ammonium comme précipitant et une analyse par rayons X (Shet et al., 2018). Une nouvelle pectinase (PECI) d'*Acrophialophora nainiana* a été purifiée et caractérisée à l'aide de MALDITOF, MS. Egalement des études avec dichroïsme circulaire étaient utilisées pour enquêter l'effet du pH du milieu sur l'inactivation de l'enzyme et ses changements structuraux de conformation (Niture 2008). L'application de l'analyse par ions MALDI TOF a été utilisée pour l'identification et la prédiction de la masse précise de polygalacturonase de *Fusarium graminearum* (Ortega, et al. 2014).

Les différentes stratégies appliquées pour la purification des pectinases produites par les espèces d'*Aspergillus* sont résumées dans le tableau n°17

Tableau 17. Différentes stratégies appliquées à la purification des pectinases produites par les *Aspergillus sp.*

Micoorganisme	Stratégie de purification	Facteur de purification	Masse molculaire	pH optimum	T°C Optimale	Références
<i>A.niger</i>	-Chromatographie sur gel d'agarose	3,3/22		4,1-,2		(Thibault and Mercier 1978)
<i>A.niger</i>	-Précipitation au sulfate d'ammonium _électrophocalisation préparative. -Chromatograpie échangeuse d'anion et exclusion stérique.	-0.02 (ExoPGI) -0.021 (ExoPGII)	- 82 (ExoPGI) - 56 (ExoPGII)	-3,4-3,8 (PGI) -3,4-4,2(PGII)	60	(Sakomoto, et al. 1994)
<i>A.kaxachii</i> <i>ATCC 20235</i>	- Concentration sous vide. -Précipitation à l'acétone - Spharose Q	470/50	60 kda	4.5	–	(Contreas-Esquivel and Voget 2004)
<i>A.sojae</i> <i>ATCC20235</i>	-3 phases de partitionnement	6,7/25,5	36 à 53	4	55	(Dogan and Tarib 2007)
<i>A. niger CFR 305</i>	-Charbon actif	4,0/80	-	4,5	50	(Murthy and Naidu 2011)
<i>A. carbonarius</i>	-Précipitation apr affinité à l'alaginate.	4/61	42	–	–	(Nakkeeran, et al. 2010)
<i>A.nigerCSTRF</i>	-Précipitation par sulfate d'ammonium - Séphadex G100 - G 50	- 28,19/69	79	4	35	(Juwon, et al. 2012)
<i>A.niger</i> <i>MTCC3323</i>	- Précipitation à l'éthanol. -Séphacryl 200, gel de filtration.	6,2/5.01	Hétérodimère de sous unité 34 et 36 kDa	4,8	45	(Kant, et al. 2013a)
<i>A.awamori IFO 4033</i>	- Echange de cations -Séphadex G75	349/3.04	41	5,0	40	(Nagai, et al. 2000)
<i>A.awamori nakazawa</i>	- Charbon actif	34,8/69,8	30	4,5	50	(Dey, et al. 2014)
<i>A. niger U-86</i>	-Précipitation au sulfate 'ammonium -Filtrartion sur gel séphadex G75	- 6,1/64	Hétérodimère 36 et 38 KDa	–	–	(Mohsen, et al. 2009)
<i>A.niger</i>	-Sulfate d'amonium 65% -Chromato. d'échange d'ions.	40 KDa	–	–	–	(Khairnar, et al. 2009)

D'après tout ces travaux on constate que la filtration sur gel Sephadex associée à d'autres méthodes avait été largement utilisée dans la purification des pectinases.

Le processus de purification des pectinases est souple et diversifié, les méthodes peuvent être combinées en fonction des circonstances particulières, mais la séparation primaire avec le sulfate d'ammonium et un solvant organique est nécessaire.

En revanche, Li, et al. (2014a) ont signalé que comparativement au fractionnement par le sulfate d'ammonium, le plus gros inconvénient de la précipitation aux solvants organiques était l'inactivation partielle de l'enzyme.

Matériel et méthodes.

11.1 Purification des enzymes pectinolytiques de l'EEB

La stratégie adoptée pour la purification des enzymes pectinolytiques est la suivante:

- Précipitation par le sulfate d'ammonium.
- Dialyse
- Chromatographie à échange d'ions (DEAE -Séhadex, CM A25)
- Chromatographie de gel de filtration Séhadex (G75, G100 et G 50)

11.1.1 Purification partielle de l'extrait enzymatique brut (EEB) par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

L'addition de sels minéraux (sulfates d'ammonium, sulfate de soude) à une solution protéique provoque l'insolubilisation des protéines. Chaque protéine pourra ainsi précipiter dans un certain intervalle (une fourchette) de concentration en sel (Kamoun 1977) . Cette technique consiste à ajouter à l'extrait enzymatique brut du sulfate d'ammonium provoquant ainsi une déshydratation et une précipitation des protéines, ce qui établira par voie de conséquence le phénomène de relargage.

L'avantage du relargage se manifeste dans la conservation de la conformation native des protéines qui peuvent être redissoutes habituellement sans dénaturation. Le choix est porté sur le sulfate d'ammonium pour sa solubilité dans l'eau et sa force ionique élevée (Kamoun 1977). Le fractionnement des protéines a été établi à 25 °C avec plusieurs concentrations en sulfate d'ammonium à savoir 30%, 50%, 70%, et 80%.

11.1.2 Dialyse:

C'est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse (Kamoun 1977). Les membranes de dialyse habituellement 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 (Kamoun 1977). Les membranes de dialyse contiennent les glycérides, composés sulfurés et métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer par trempage, cette opération qui se réalise extemporanément consiste à placer les membranes successivement une heure dans un mélange à volume égal d'éthanol et d'eau puis une heure dans une solution de bicarbonate de sodium 10mM, une heure dans une solution diluée d'ETA (éthylène diamine tétra acétate), puis deux heures dans l'eau distillée.

Le boudin de dialyse ainsi rempli par l'EEB est placé dans un récipient contenant l'eau distillée pendant 24h au frais à 4°C (figure 52); la conductivité électrique de la solution de trempage (eau distillée) est prélevée toutes les heures. On obtient ainsi un extrait enzymatique partiellement dessalé ; ce dernier est par la suite concentré par dialyse contre une solution de saccharose à 60%. Ainsi l'extrait enzymatique obtenu est l'extrait enzymatique prépurifié (EEPP). Le dosage des protéines solubles et le dosage des activités enzymatiques ont été réalisés sur l'EEPP.



Figure 52. Dialyse de l'extrait enzymatique brut

11.1.3 Purification par chromatographie de gel de filtration séphadex (G75) de l'extrait enzymatique pré purifié (EEPP).

La purification des préparations enzymatiques a été réalisée par chromatographie d'exclusion moléculaire (ou gel filtration). Le gel de filtration est une technique de chromatographie qui permet de séparer des molécules en fonction de leur tailles et de leur formes . On utilise des granules de gel poreux, le diamètre des pores étant une caractéristique de chaque type de gel. Cette méthode fréquemment utilisée dans la purification et la séparation des protéines qui sont éluées dans un ordre décroissant, les protéines de poids moléculaire élevé sont éluées tardivement. Les molécules quittent donc un gel Sephadex

placé dans une colonne de verre dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes. Les plus petites molécules de protéines pénètrent dans les grains de Sephadex, les plus grandes migrent donc plus vite vers le bas de la colonne (Figure n°53) ; à la sortie de la colonne de chromatographie l'élué peut être fractionné grâce à un collecteur de fractions dont la densité optique est lue à 280 nm dans un spectrophotomètre UV visible (*Type Shimadzu*)

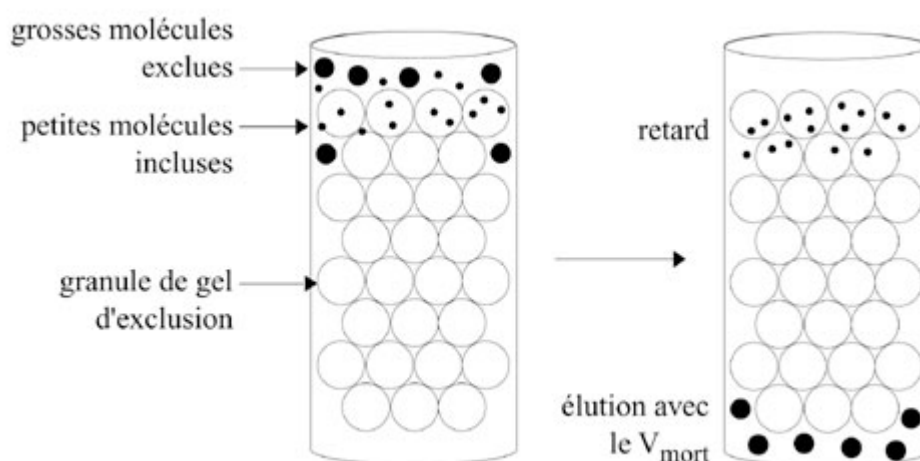


Figure 53. Principe de la chromatographie de gel de filtration

L'EEPP a été soumis à une chromatographie sur gel de filtration Séphadex G-75 , en utilisant un dispositif qui comprend (figure 54):

- Une colonne analytique type QTY5, de dimension 1,5 cm× 30cm.
- Une pompe péristaltique STA-Multipurpose model (DESAGA).
- Un collecteur de fraction Spectra chrom CF-2

• **Préparation des gels Séphadex**

La préparation des gels est une opération capitale. Les gels 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. Les Séphadex G75 ont les caractéristiques citées dans le tableau n°18.

Tableau 18. Diamètre et intervalles de fractionnement en poids moléculaire de Séphadex G75

Type du séphadex	Intervalles de fractionnement en poids moléculaire
G 75	3000 - 70 000

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 4°C pendant le temps indiqués par le tableau 19. Le chauffage à la température ambiante est préférable car il évite la formation des bulles d'air dans le gel quand ce dernier se réchauffe dans la colonne, la formation des bulles d'air dans le gel pourrait modifier la régularité des débits sur 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.

Tableau 19. Durée minimum de gonflement du Séphadex G75

Séphadex	Durée minimum de gonflement	
	A température de laboratoire	Au Bain –Marie bouillant
G75	24 heures	3heure

- **Stabilisation du gel et dépôt de l'échantillon (EPP).**

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 égale à zéro, la surface du gel étant stabilisée en plaçant sur la colonne un adaptateur, puis un volume entre 0,5 à 1ml d'EPP est déposé sur la surface du gel dans la colonne à l'aide d'une pipette ou micropipette.

- **Elution**

L'élution est réalisée par perfusion du tampon dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit (1,2ml /min), le débit imposé à la colonne doit toujours être inférieur au débit spontané de cette colonne. La densité optique des éluât recueillis à l'aide du collecteur de fraction à raison de 3ml par tube est lue à 280nm dans un spectrophotomètre UV- visible. On trace par conséquence la courbe DO en fonction du volume d'élution. Les éluâts correspondants à des pics d'absorption sont rassemblés séparément en fractions.

- **Analyse des fractions récupérées**

Sur chaque fraction récupérée sur le gel G75, nous avons recherché les activités endo PG, exo PG, PL et PME. La teneur en protéines solubles a été estimée par la méthode de Lowry sur les fractions qui présentent une activité pectinolytique. L'injection de l'enzyme pré purifiée est répétée plusieurs fois afin de récupérer une quantité suffisante des fractions actives.

11.1.4 Chromatographie d'échange d'ions de l'extrait enzymatique pré purifié (EPP).

Des protéines différentes se lient à l'échangeur d'ions avec des affinités différentes. Au fur et à mesure que la colonne est lavée, procédé appelé élution, les protéines ayant une affinité relativement faible pour l'échangeur d'ion migrent plus rapidement dans la colonne que celle qui se lient à l'échangeur avec des affinités supérieures. Ceci, parce que la progression d'une protéine donnée dans la colonne est retardée par rapport à celle du solvant, en raison des interactions entre les molécules de la protéine et l'échangeur d'ions. Plus l'affinité de liaison d'une protéine pour l'échangeur d'ions sera forte, plus la protéine sera retardée (figure n°54). Ainsi les protéines qui sont fortement liées à l'échangeur d'ions peuvent être éluées en remplaçant le tampon d'élution par un tampon de concentration salins supérieure (et/ou de pH différent), procédé appelé élution fractionnée. L'utilisation d'un collecteur de fractions permet d'obtenir la purification d'une protéine en ne gardant que les fractions de l'effluent de la colonne contenant la protéine souhaitée. Le dispositif de purification comprend en plus de celui de la chromatographie sur gel de filtration, un appareil de gradient contenant un réservoir de NaCl et un réservoir de tampon.

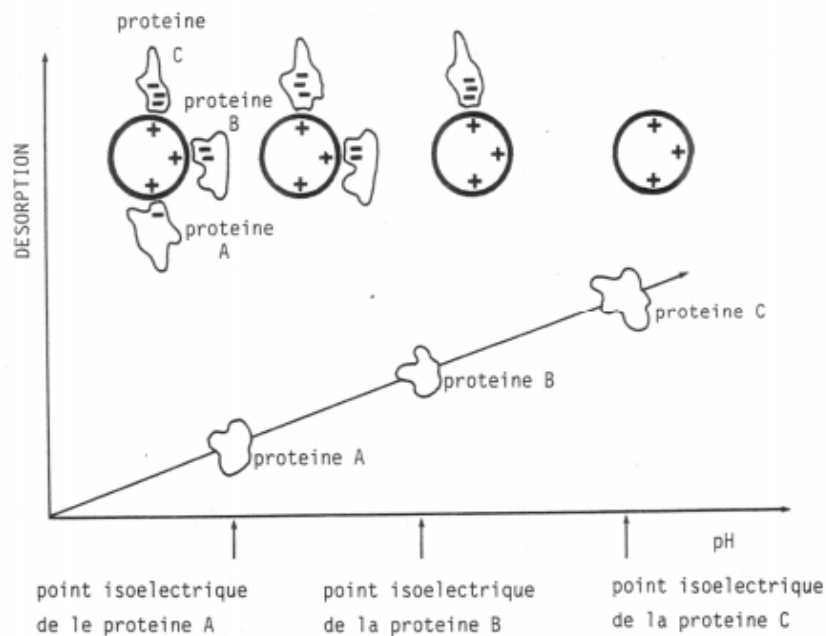


Figure 54. Principe de la chromatographie d'échange d'ions

11.1.5 Purification par chromatographie sur DEAE-séphadex : (échange anions)

La chromatographie échangeuse d'anions permet de séparer les protéines selon leurs charges, les protéines chargées négativement seront retenues. En revanche, les protéines chargées positivement seront éluées en premier. Les protéines retenues sur la phase stationnaire sont ensuite éluées en modifiant la force ionique de l'éluant (phase mobile). Dans cette expérience,

nous avons utilisé l'échangeur le diéthylaminoéthyl (DEAE –Séphadex), qui est une résine échangeuse d'anions.

A cet effet, nous avons appliqué sur une colonne analytique ou le gel est coulé et ensuite équilibré par passage d'environ 10 fois son volume avec du tampon acétate de sodium pH 4.2, Environ 0.5 ml d'extrait enzymatique pré purifié et déposé en haut de la colonne.

Le débit d'élution est maintenu constant. Des fractions de 1ml sont collectées par le passage sur la colonne à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl 100 ml à 0,02M et 100 ml de tampon acétate de sodium. Les fractions actives subissent une caractérisation en mesurant leur activité enzymatique et le dosage des protéines solubles.

Les fractions présentant une activité enzymatique obtenue par purification par échange d'anions sur DEAE-Séphadex sont rassemblées et par la suite concentrées dans des boudins de dialyse contre du saccharose ou concentré dans un lyophilisateur.

11.1.6 Purification par séphadex CMA25 (échangeur de cations)

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une purification par chromatographique sur colonne, en utilisant la carboxyméthyl- Séphadex (CMA25), une résine échangeuse de cations. Cette technique présente également l'avantage d'être non dénaturante. Le principe consiste à fixer les protéines par l'intermédiaire de leurs charges positives, sur les charges négatives de la CMA25, puis de les décrocher par passage de tampon acétate de sodium à 0.1M, PH 4.2 associé à un gradient linéaire de chlorure de sodium à 0.5M. Les fractions présentant une activité enzymatique issues de la colonne de CM A25 sont rassemblées et par la suite concentrées dans des boudins de dialyse contre du saccharose ou concentré dans lyophilisateur.

La recherche des activités enzymatique (PME, Endo PG, Exo PG et PL) a été effectuée au niveau de chaque pic. L'estimation des teneurs en protéines a été réalisée sur les fractions actives.

11.1.7 Détermination du poids moléculaire des enzymes purifiées.

Il existe une zone de poids moléculaire qui varie linéairement avec le logarithme du poids moléculaires connue. Cette méthode est également utilisable pour les peptides et pour des macromolécules non protéiques. Il est ainsi possible de déterminer le poids moléculaire d'une enzyme en mesurant son volume d'élution grâce à la mesure de son activité dans l'éluant, un étalonnage préalable de la colonne utilisée par une série d'enzyme de poids moléculaires connus permet d'obtenir, avec une bonne précision, le poids moléculaire étudiée (Kamoun 1977). Avec les mêmes conditions de l'injection de l'extrait enzymatique pré purifier, Nous

avons appliqué sur une colonne analytique où le gel est coulée et ensuit équilibré par passage d'environ 10 fois son volume avec le tampon acétate de sodium pH 5.4. environ 1ml de mélange des protéines standards: Sérum albumine bovine (BSA: 67kDa); Ovalbumine (43 kDa) et Trypsine (20kDa).

11.1.8 Electrophorèse SDS-PAGE 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).

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 (figure 55).

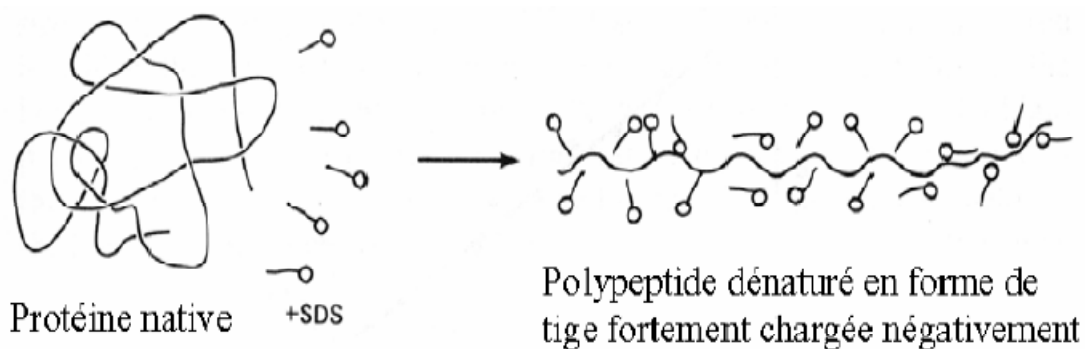


Figure 55. Dénaturation des protéines par de SDS

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 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$) et le N,N'- méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) qui assure le pontage entre les chaînes d'acrylamide. Le gel de polyacrylamide agit comme un

Chapitre III. *Purification et Caractérisation des Pectinases.*

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.

Cette technique a été réalisée en plusieurs étapes:

- Concentration des échantillons

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

- Dénaturation des échantillons

les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native.

A cet effet on ajoute à 10 µl d'extrait protéique 20 µl de solution tampon de dénaturation (Tampon de Laemmli), le mélange est chauffé à 90°C pendant 5 min.

Le tampon Laemmli pH 6,8 est préparé à 2% de SDS, par mélange de 0,5 ml de Tris HCl pH 6,8, 2 ml de SDS à 10%, 2 ml de glycérol, 0,5 ml de bleu de bromophénol à 0,5% et 4,8 ml d'eau distillée; avant utilisation on ajoute 50 µl de mercaptoéthanol à 950 µl de tampon.

- Condensation et migration des enzymes dénaturées

Le matériel d'électrophorèse se compose des plaques en verre, des pinces, des joints d'étanchéité de peigne et des espaceurs: On nettoie les plaques avant utilisation à l'aide d'eau puis avec de l'éthanol à 70%. On essuie les plaques à l'aide du papier sans laisser les fibres sur les faces où sera coulé le gel. On place le joint d'étanchéité sur la plaque. puis on met en place les espaceurs et la deuxième plaque en verre. L'ensemble est ensuite consolidé avec des pinces.

Le gel de séparation est préparé par mélange de 2,75 ml d'acrylamide bisacrylamide à 30%, 1,25 ml de tris-base pH 8,8, 1,3 ml d'eau distillée et extemporanément on ajoute à la solution 25 µl de persulfate d'ammonium (PSA) et 5 µl de Tetramethylethylenediamine (TEMED). puis

Chapitre III. *Purification et Caractérisation des Pectinases.*

le gel est rapidement coulé à l'aide d'une seringue entre les deux plaques en verre de dimensions 10cm*10cm.

Le gel de condensation est préparé par mélange de 3 ml d'acrylamide bisacrylamide à 30%, 2,5 ml de tris base pH 8,8, 0.1 ml de SDS à 10% et extemporanément on ajoute au mélange 0,1 ml de PSA et 0.004 ml de TEMED. Ensuite, cette solution ainsi préparée est coulée à l'aide d'une seringue sur le gel de séparation qui devrait être déjà gélifié. Une peigne est placée sur le gel afin de former les puits dans les quels on introduira les échantillons.

10 µl d'extrait enzymatique dénaturé sont pipetés et introduites dans les puits du gel de condensation dans le quel les enzymes se condensent et migrent vers le gel de séparation à l'aide du tampon de migration pH 8,3 qui immerge les plaques contenant le système de séparation soumis à un champs électrique de courant continu (Annexe 5).

Le tampon de migration pH 8,3 est préparé par mélange de 3,03 g de Tris base, 14,42 g de Glycine et 1g de SDS qsp 100 ml avec l'eau distillée.

- Révélation et fixation des protéines

Le gel est retiré des plaques puis placé sur un agitateur et coloré pendant 30 minutes dans une solution de coloration composée de bleu de coomassie R 250 (2,5%), le méthanol (45%), l'acide acétique (5%) et 10% de Trichloroacétique (TCA) et 40% d'eau distillée

- Décoloration du gel

La décoloration du gel a été réalisée par un mélange d'acide acétique (5%), TCA 10% et le méthanol (45%) et eau distillée 40%.

- Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire des fractions a été déterminé par SDS- PAGE par référence à une courbe d'étalonnage de protéines marqueurs dénaturées dans les mêmes conditions que les échantillons. La solution des protéines marqueurs est préparée par dissolution dans l'eau distillée de 0,1mg de sérum albumine bovine (BSA; 67 kDa), 0.2 mg de d'ovalbumine (43 kDa), de 0.4 mg d'anhydrase carbonique (29kDa) et de 0,1 mg d'inhibiteur de trypsine (20kDa) qsp 10 ml d'eau distillée.

11.1.9 Caractérisation chimique des la fractions purifiées

L'influence de la concentration en substrat, en sels minéraux ainsi que l'influence du pH et la température sur l'activité des fractions purifiées ont été déterminés. Toutes les analyses ont été réalisées en triples et en présence d'un témoin.

11.1.9.1 Influence de la température

L'effet de la température est déterminé par la mesure de l'activité pectinolytique résiduelle dans le mélange réactionnel d'extrait purifié et pectine à 1%, incubé pendant 30min à des températures variant de 25 à 75° C avec un pas de 10°C afin de déterminer la température optimale.

11.1.9.2 Influence du pH

La variation des activités pectinasiqes des extraits purifiés en fonction du pH à été étudiée par mesure des activités résiduelles du mélange réactionnel d'extraits purifié et une solution pectique préparée dans des tampons à différents pH allant de 2 à 8,8. et incubé aux températures optimales.

11.1.9.3 Influence de la concentration en substrat sur l'activité endo PG

L'activité de l'enzyme est mesurée en fonction des concentrations en pectine (Substrat) qui varient de 0, 2 à 1% aux pH et aux températures optimaux de la réaction; cette détermination permet de calculer les paramètres de la cinétique enzymatique comme la constante de Michaelis- Menten (Singh, et al.) et la vitesse maximale de la réaction (V_{max}).

11.1.9.4 Influence de la concentration en sels minéraux

L'effet des sels minéraux à été effectué en ajoutant au mélange réactionnel du NaCl, CaCl₂, BaCl₂ et l'E.D.T.A à des concentrations allant de 0 à 10 mmoles . ensuite les activités enzymatiques ont été déterminées pour chaque mélange après les avoir incubés aux températures optimales et pH optimums d'activité enzymatique.

Résultats et discussion

12.1 Purification partielle du complexe enzymatique par le sulfate d'ammonium

La purification partielle par le sulfate d'ammonium était réalisée à 25°C à des saturations en sel allant de 30% à 80%. La recherche des activités enzymatiques dans les précipités conséquents était réalisée par détermination du changement dans la viscosité du milieu réactionnel. Le graphe de la figure 56 montre la variation de la viscosité en fonction des concentrations en sulfates d'ammonium. On constate qu'avec le précipité la réduction en viscosité de la solution de pectine est significative à partir de 40% de saturation, la viscosité

continue à diminuer en augmentant la concentration en sulfate d'ammonium. En parallèle, les tests réalisés avec le surnageant montrent que la viscosité augmente avec l'augmentation de la saturation en sulfate d'ammonium. ce qui explique la disparition des pectinases soluble qui se sont précipitées dans le culot.

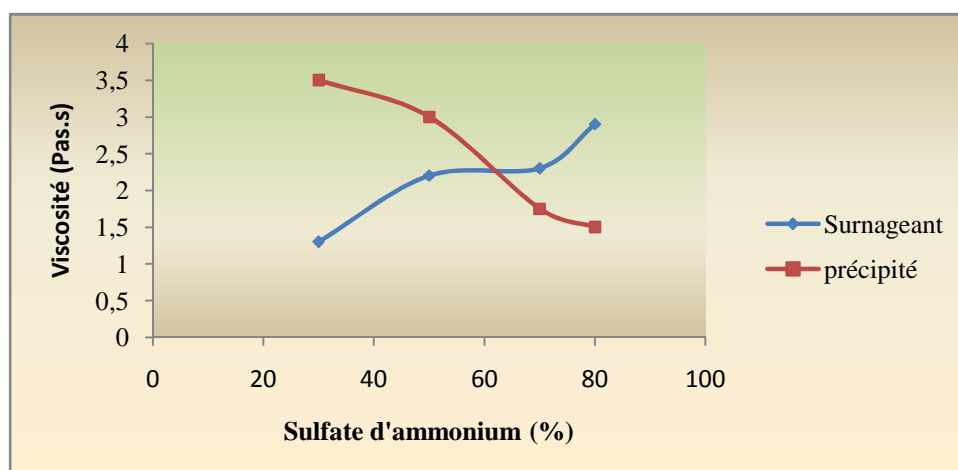


Figure 56. Fractionnement des enzymes par le sulfate d'ammonium

La teneur en protéines dans l'extrait enzymatique partiellement purifié sont de l'ordre de 7,5 mg/ml; cette teneur représente 37,09 % des protéines totales dans l'extrait brut; l'EEPP a réduit la viscosité de la solution de pectine de 95% avec apparition de 192,11 mg /ml de groupements réducteurs dans la solution. Les valeurs des activités enzymatiques sont représentées dans le tableau 20.

Tableau 20. Tableau de purification par 80 % de sulfate d'ammonium

Enzyme	EndoPG	ExoPG	PME	PL
Activité (U/ml)	31,6	30,19	0,18	0,2
Activité spécifique (U/mg de protéine)	4,34	4,02	0,024	0,026
Activité totale (U)	2512	2415,2	14,4	16
Purification	2,71	2,32	1,84	2,88
Rendement (%)	77,53	68,96	51,14	80

Dans cette étape de purification, l'activité spécifique de l'endoPG a été améliorée par un facteur de 2,71; l'activité spécifique de l'exoPG a été améliorée par un facteur de 2,32; l'activité de la PME a été améliorée par un facteur de 1,84 et l'activité de la PL a été améliorée par un facteur de 2,88 par rapport aux activités pectinolytiques spécifiques dans l'extrait brut,

dont les valeurs sont 1,6 U/mg, 1,73 U/mg, 0,013 U/mg et 0,009 U/mg respectivement et le volume total est 100ml. La moyenne des rendements de récupérations se situe dans la gamme des valeurs enregistrées par l'ensemble des chercheurs qui ont signalé l'importance du fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium; Motwani, et al. (2013) ont partiellement purifié les enzymes pectinolytiques d'*Aspergillus niger* par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation, ils ont observées que 68,64 % d'enzymes qui étaient récupérées leurs activités spécifiques étaient de l'ordre de 35,72U/mg. Le rendement de purification des pectinases par le sulfate d'ammonium était 88% et le facteur de purification 0,88 (Ramalingam, et al. 2013). L'activité spécifique des pectinases du *Bacillus sp (R2)* partiellement purifiées par Jagiasi (2013) était 4,24 U/mg avec un facteur de 4,24. Les pectinases marines produites par *Bacillus subtilis* ont été purifiées avec un facteur de 2,31 par Joshi, et al. (2015) en utilisant le sulfate d'ammonium.

12.2 Purification du complexe enzymatique par chromatographie échangeuse d'ions

Afin d'éluer des protéines liées sur une résine échangeuse d'ions, deux possibilités s'offrent au biochimiste: utiliser soit un gradient de pH, soit de sel (généralement du NaCl). Dans le cas où l'on a choisi d'utiliser un gradient de NaCl, on débute généralement avec un tampon de faible force ionique, par la suite on utilise une série de tampons dont la concentration en NaCl augmente graduellement. Les ions Na^+ ou Cl^- décrocheront les protéines de la colonne en neutralisant les charges négatives ou positives qui permettent aux protéines d'interagir avec la résine. Le résultat est l'élution des protéines selon leur densité de charge, en effet, afin d'être décrochées d'une colonne échangeuse de cations, les protéines possédant moins de charges positives nécessiteront moins d'ions Cl^- (donc une concentration de NaCl moins élevée) pour neutraliser leurs charges que des protéines possédant plus de charges positives. La même logique s'applique aux ions Na^+ lors de l'élution de protéines fixées à une résine échangeuse d'anions.

12.2.1 Purification par échangeuse d'anions DEAE Séphadex A25

Les protéines ont été d'abord éluées par le tampon acétate pH 4,2, puis par un gradient linéaire de chlorure de sodium à 0,5M, après avoir déposé 1 ml d'EEPP dans la colonne. Ainsi, nous avons récolté 60 fractions de 3 ml.

Le profil d'élution (figure n° 57), révèle 5 pics: deux pics ont été apparus par élution avec le tampon acétate et 3 pics qui ont été apparus après passage de NaCL 0,5 M.

Le pic (1) apparut au volume d'élution de 15 ml est doué d'une activité pectinasique; Le test de l'activité enzymatique sur une pectine d'agrumes (Sigma) à 1% a provoqué la baisse de sa

viscosité initiale de 33 %, le dosage des groupements uroniques dans le milieu a révélé l'apparition de 41,5 mg de groupements réducteurs.

Les endopolygalacturonases réduisent la viscosité initiale avec plus de 50 % avec libération de seulement de 5 à 10 % de groupements uroniques; en revanche avec les exo polygalacturonases les liaisons rompues sont plus de 20 % pour atteindre la même réduction en viscosité (Baron and Thibault 1985). Par conséquent, on déduit que les pectinases relatives au pic 1 peuvent être de type exopolygalacturonase dont l'activité est 6,52 UI.

Le pic 3 est dotée d'une très faible activité pectinasique de type pectine lyase d'une valeur de $8 * 10^{-3}$ UI. Le facteur de purification est de 1,22 pour l'exoPG et 0,73 pour la lyase relativement à l'étape précédente (fractionnement par le sulfate d'ammonium), la purification a augmenté faiblement pour la PG et a baissé pour la lyase (tableau 21); les rendements de purification nous semblent aussi faibles (0,88% pour l'exoPG et 0,15 % pour la lyase).

Tableau 21. Tableau de purification par DEAE séphadex A 25(relativement à l'EEPP)

Fraction	Activité (U)	Protéine (mg)	Act. spc.(U/mg)	Purification	Rendement (%)
5: (ExoPG)	19,56	3,96	4,93	1,22	0,80
33: (lyase)	0,024	1,26	0,019	0,73	0,15

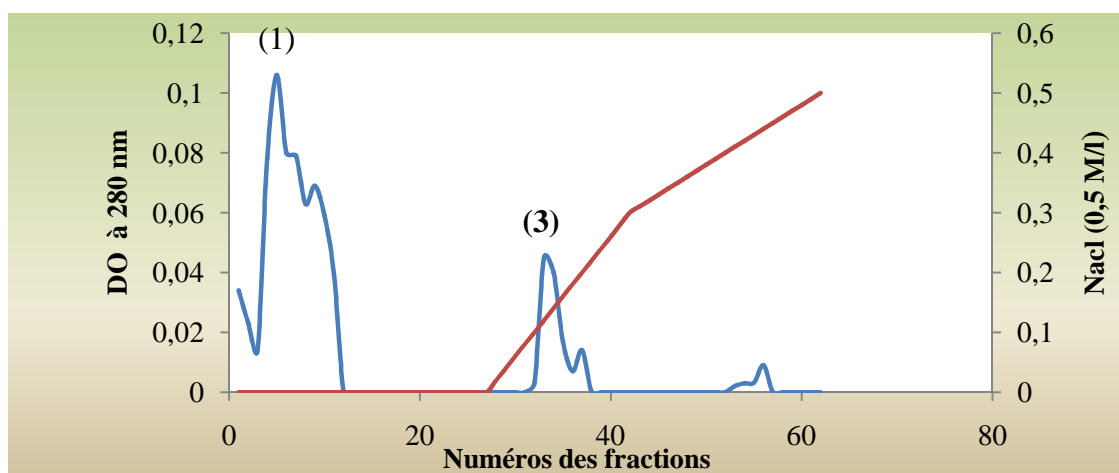


Figure 57. Profil d'éluion sur l'échangeuse d'anion DEAE Séphadex A 25 d'EEPP (colonne QTY 1,5 x30 cm), tampon d'éluion acétate de sodium (0,1 M; pH 4,2), débit 1,2 ml/min, fraction de 3 ml)

12.2.2 Purification de l'EEPP par échangeuse de cations CMA25

Le profil d'élution de chromatographie sur CM séphadex A25, après avoir déposé 1ml d'extrait enzymatique pré purifié est montré par la figure 58. L'élution avec la solution tampon acétate de sodium à 0.1M, pH 4.2, révèle l'apparition d'un seul pic, la fraction protéique éluée ne semble pas avoir été adsorbée par le gel. Les tests des activités enzymatiques de la fraction obtenue ont montré une réduction de 37,81 % de la viscosité initiale d'une solution de pectine à 1%, la libération des groupements uroniques n'a pas été détectée. On suppose que l'enzyme responsable de la réduction dans la viscosité initiale de la solution de pectine est de type endopolygalacturonase son activité enzymatique est de 13,73 U/ml. Son activité spécifique est égale à 28,02 U/mg, elle est plus élevée par rapport à l'activité spécifique dans l'EEPP et l'EEB, le facteur de purification calculé par rapport à l'étape précédente est 6,45, par contre on obtient une diminution considérable dans le rendement enzymatique, il est de l'ordre de 1,63% (tableau 22).

Tableau 22. Tableau de purification par CM séphadex A 25 (relativement à l'EEPP)

Fraction	Activité (U)	Protéines (mg)	Acti. spc. (U/mg)	Purification	Rendement
2: (EndoPG)	41,19	1,47	28,02	6,45	1,63%

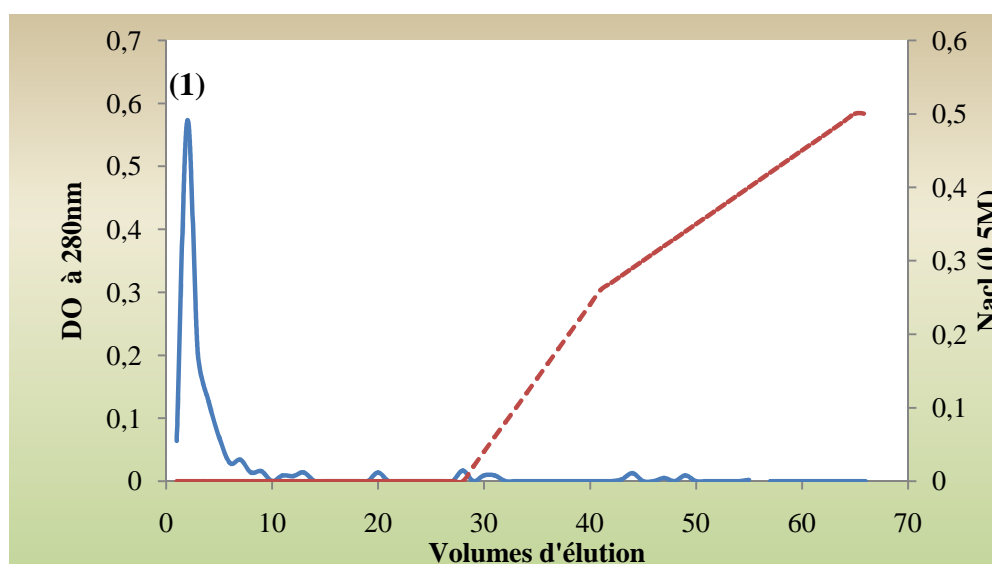


Figure 58. Profil d'élution sur l'échangeuse de cations CM A 25 d'EEPP. (Colonne QTY10, 1,5x30 cm), tampon d'élution acétate (0,1 M, pH 4,2), débit d'élution: 1,2/min, fractions: 3ml

L'allure du graphe de la chromatographie échangeuse d'anions DEAE séphadex (figure 57) ressemble à celui obtenu par certains chercheurs (Li, et al. 2014a) qui ont purifié 6,5 fois une pectine lyase en utilisant le DEAE sépharose équilibré par un tampon -glycine NaOH pH 8,6, la lyase a été éluée avant passage de NaCl, le rendement de purification était de 39,7% , ces valeurs sont plus élevées à celles obtenues dans la présente étude. De même Yadav, et al. (2008) ont purifié 18,64 fois une pectine lyase d'*A.flavus* avec un rendement de 12%, l'activité spécifique de la lyase était de l'ordre de 5,89 qui est élevée par rapport à ce que nous avons trouvé dans ce travail. De leurs cotés Jacob, et al. (2008a) ont purifié une polygalacturonase de *Streptomyces lydicus* avec un facteur de purification de 31,8 et un rendement de 67%. Aussi dans un travail de Dinu, et al. (2007) deux PL (PLI , PLII) et une PME qui ont été purifiées par chromatographie d'échange ionique, les activités spécifiques étaient 38,5, 339,5 et 170,9 respectivement et les facteurs de purifications 3,5 ; 30;6 et 9,6 alors que les rendements étaient 17,3%, 38,1% et 47,8%.

Massa, et al. (2007) ont purifié une endopolygalacturonase par chromatographie d'échange de cations sur S sépharose FF équilibrée par tapon acétate pH 3,3, l'activité spécifique de l'endoPG était 11,5, le facteur de purification était 3,2 ces valeurs sont inférieures à celle obtenue dans ce travail, mais le rendement de purification était 11,7%, cette valeur est supérieur à celle que nous avons obtenue.

Or une purification est un compromis entre le désir d'obtenir une protéine la plus pure possible (facteur de purification élevée) et en quantité maximale (rendement élevée).

12.3 Purification du complexe enzymatique par chromatographie de gel de filtration Séphadex G 75.

Le profil de la chromatographie sur gel de filtration Séphadex G75 de l'extrait enzymatique pré purifié , réalisé avec le dépôt de 0.5ml d'EEPP montre 2 pic d'adsorption bien distincts (figure 59).

Le pic (1) se caractérise par un maximum d'absorption optique de 0.06 (à 280 nm), qui se situe à la fraction 12 et à un volume d'élution de 24 ml. Les résultats des tests des activités pectinolytiques des fractions allant de 10 à 18 du pic 1, ont montré une baisse de 72,33 % dans la viscosité initiale du milieu réactionnel, la teneur en protéines dans l'ensemble de ces fractions actives est 0.09 mg/ml, nous estimons que l'enzyme pectinolytique responsable de la baisse de la viscosité du milieu réactionnel est une polygalacturonase de type

endopolygalacturonase, son activité est 26,84 U/ml , son activité spécifique est de 298,22 U/mg de protéines.

Le Pic (2) se caractérise par un maximum d'absorption optique (à 280 nm) de 0.21 qui se situe à la fraction 38 et un volume d'élution de 76 ml. Les résultats des tests des activités enzymatiques des fractions 31 à 45 sur une solution de pectine à 1% , ont montré une baisse de 20 % dans la viscosité initiale de la solution avec une libération de 12,37 mg /ml de groupements réducteurs dans le milieu réactionnel, la teneur en protéines dans l'ensemble des fractions actives du pic 2 est 0.495 mg /ml. L'enzyme responsable de la baisse dans la viscosité initiale de la solution de pectine avec libération des groupements réducteurs est une polygalacturonase. En se référant aux travaux de Baron and Thibault (1985) , cette polygalacturonase peut être de type exopolygalacturonase dont l'activité est de l'ordre de 1.94 U/ml, et l'activité spécifique est égale à 3.95 U/mg de protéines.

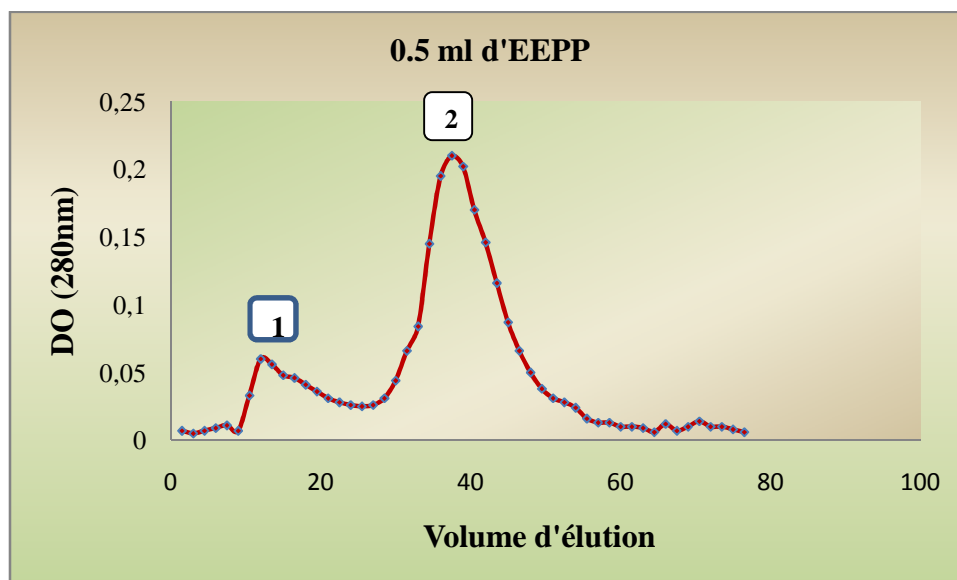


Figure 59. Profil d'élution sur gel Séphadex G75 de la polygalacturonase. (Colonne QTY 10, 1,5x30 cm), tampon d'élution acétate (0,1 M, pH 4,2), débit: 0,5 ml/min, fractions: 3ml

L'endopolygalacturonase a été purifiée 68,71 fois par rapport à l'extrait enzymatique prépurifié, et 186,38 fois par rapport à l'extrait enzymatique brut. Le rendement de purification a diminué jusqu'à 0,21 % (tableau 23).

L'exopolygalacturonase du pic 2 a été purifiée 0,98 fois par rapport à l'EEPP et 2,28 fois par rapport à l'EEB, le rendement de récupération est 0.01% (tableau 23)

Tableau 23. Tableau de purification sur gel Séphadex (relativement à l'EEPP)

Fraction	Activité (U)	Activ spc (U/mg)	Protéines (mg)	Facteur de purification	Rendement
Pic (1): EndoPG	536,8	298,22	0.09	68,71	0,21
Pic (2) ExoPG	38,8	3,95	0.495	0.98	0.01

L'activité spécifique de l'endopolygalacturonase relative au pic (1) est largement plus élevée, à celle issue de l'échangeur de carions CM A25; le facteur de purification est 68,71, par contre l'activité de exopolygalacturonase est légèrement plus faible à celle issue de l'échangeur d'anions DEAE- cellulose.

Le facteur de purification globale de l'endoPG par Séphadex G 75 est 186,38 avec un rendement 0.16%, le facteur de purification globale de l'exo PG par Séphadex G75 est 2,28 avec un rendement 0.01%.

La purification de l'endo PG par le séphadex G75 semble efficace, son activité spécifique et le facteur de purification sont plus élevés relativement à ceux obtenus par Kant, et al. (2013a) ; Sakomoto, et al. (1994); Thibault and Mercier (1978) ; Dogan and Tarib (2007) ; Mohsen (2009); Khaimar et al., (2009); Dey et al., (2014) et Anand, et al. (2016), ces derniers chercheurs ont purifié 18,43 fois une polygalacturonase d'*A.fumigatus* MTCC2584, ayant une activité spécifique de 38,9 U/mg et avec un rendement de 2,98 %. Par ailleurs, ces résultats sont plus faibles par rapport à ceux obtenus par Esquivel et Vorget (2004) et Nagai et al. 2000.

Tableau 24. Tableau de purification global par gel de filtration

	Protéines (mg)	Activité totale (U)	Activ spc (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
EB	2022	EndoPG: 3240	EndoPG:1,6	1	100
		ExoPG: 3502	Exo PG: 1,7		
EEPP	750	EndoPG: 2512	EndoPG: 4,34	EndoPG: 2,71	EndoPG:77,53
		ExoPG: 2415,2	Exo PG: 4,02	Exo PG: 2,32	Exo PG:68,9
EP	EndoPG: 0.09	EndoPG: 536,8	EndoPG: 298,2	EndoPG:186,3	EndoPG:0,16
	ExoPG: 0.49	ExoPG: 38,8	ExoPG: 3,95	ExoPG: 2,28	ExoPG: 0,01

12.4 Détermination du poids moléculaire des polygalacturonases purifiées par gel filtration Séphadex G 75.

La colonne utilisée pour la purification des pectinases par gel de filtration Séphadex G 75, a été équilibrée par passage des protéines standards de poids moléculaires connus (BSA, ovalbumine et trypsine inhibiteur) dans les mêmes conditions que l'élution de l'EEPP.

Le profil d'élution des protéines standards (figure 60) montre l'apparition de trois pics:

Le pic (1) est relatif à la protéine dont le poids moléculaire est le plus élevé, il est relatif à la BSA (67kDa), suivi de l'ovalbumine (43 kDa) du pic (2) et enfin la trypsine inhibiteur (20 kDa) du pic (3).

Le tracé du logarithme des poids moléculaires des protéines marqueurs en fonction de leurs volumes d'élutions, est une droite de pente négative (figure 61). sachant le volume d'élution des enzymes purifiées sur Séphdex G 75, on déduit leurs poids moléculaire (tableau 25).

Tableau 25. Poids moléculaires des protéines standards et des enzymes purifiées

protéines	Poids moléculaire (kDa)	volume d'élution 'ml'	log PM
Trypsine inhibiteur	20	64	1,301
Ovalbumine	43	36	1,633
B,S,A	67	24	1,826
EndoPG	63,09	24	1,8
ExoPG	57,54	76	1,76

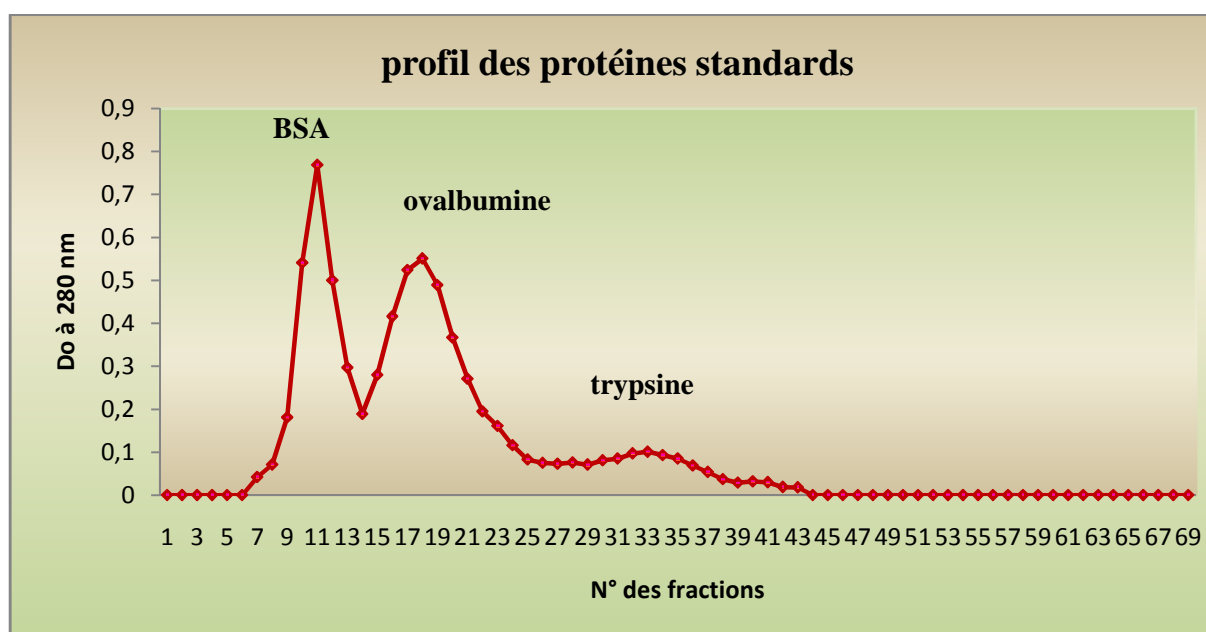


Figure 60. Profil d'élution sur gel de filtration Séphadex G 75 des protéines standards (colonne QTY 10, 1,5x30 cm), tampon acétate (0,1 M, pH 4,2), débit d'élution (0,5ml/min), fractions de 2 ml;

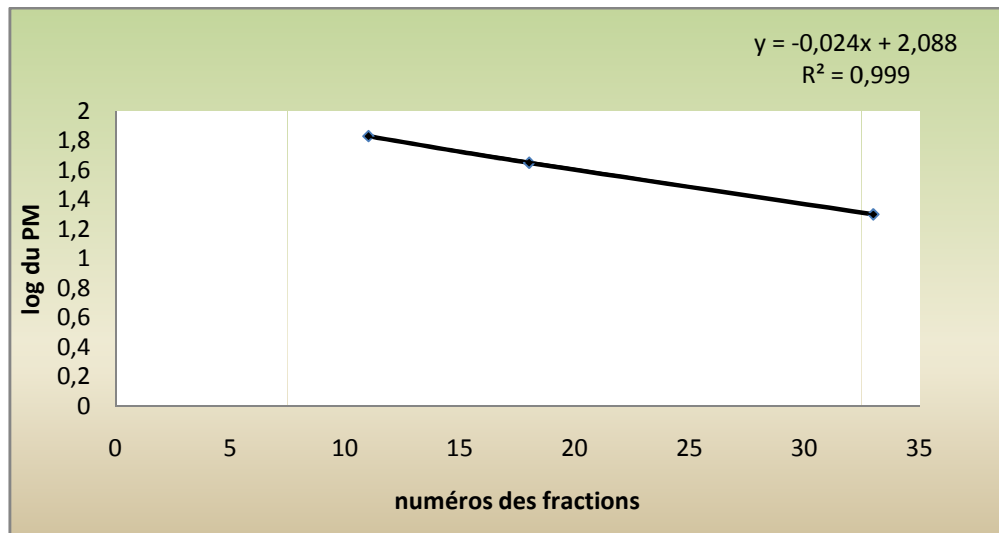


Figure 61. Courbe d'étalonnage des protéines standards: (*BSA, ovalbumine et trypsine*)

Analyse des fractions issues du Séphadex G75 par électrophorèse SDS-PAGE

Les protéines dénaturées par le SDS chargées négativement ont migré vers l'anode en bas du gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation (figure n°62).

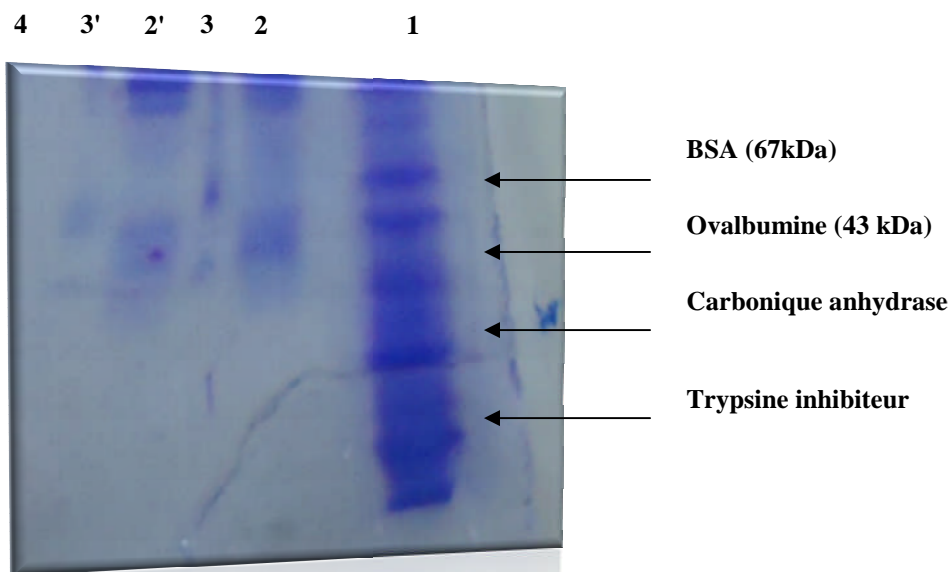


Figure 62. Electrophorèse SDS-Page des fractions purifiées par gel de filtration

Les enzymes séparées par SDS-PAGE, sont apparues sous forme de bandes plus au moins intenses de couleur bleu, la distance parcourue de chaque enzyme est caractérisée par son rapport frontal qui est le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration (tampon de migration). (figure n°62).

(1) est la colonne de migration du mélange des protéines standards qui ont été séparées en bandes, selon leurs poids moléculaires. Ainsi on reconnaît les protéines par leurs vitesses de migration, les protéines les plus légères se trouvent les premières en bas du gel et les protéines de poids moléculaires plus élevés sont retardées et se trouvent en haut de gel.

Le tableau ci-dessous est obtenu dans la raison de tracé de la courbe du rapport frontal en fonction de log PM.

Tableau 26. Rapports frontaux des protéines standards dans le gel de polyacrylamide

Protéine	Rapport frontal	Log PM	PM (kDa)
B.S.A	0,2	1,82	67
Ovalbumine	0,45	1,63	43
Carbonique anhydrase	0,65	1,46	29
Trypsine inhibiteur	0,75	1,30	20

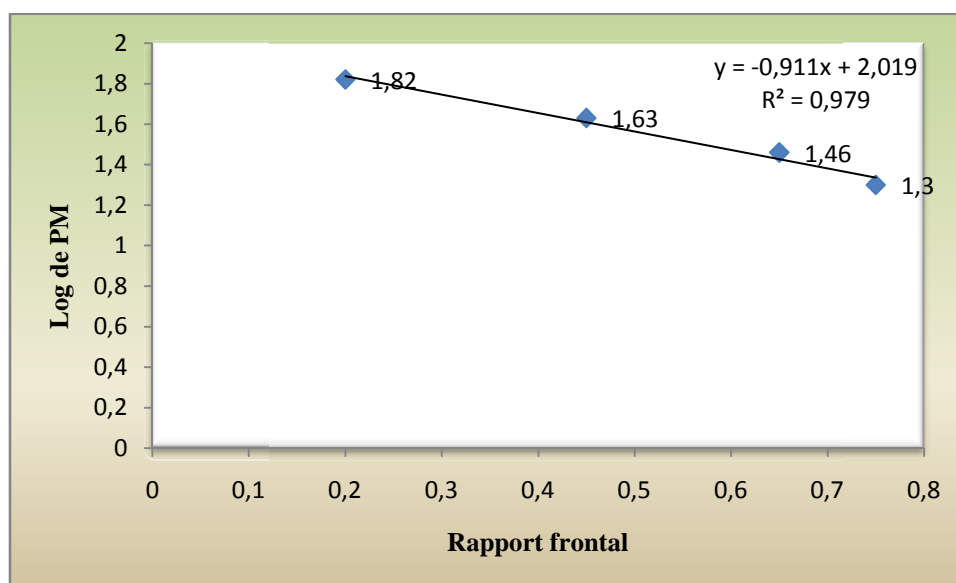


Figure 63. Courbe d'étalonnage des protéines standards (SDS-Page)

(2) et (2') sont l'endopolygalacturonase purifiée par le gel séphadex G 75, apparue en une bande large qui peut être composée de deux ou 3 bandes, son rapport frontal moyen est 0.24, son poids moléculaire est de 63 kDa (tableau 27). Ce résultat est très proche aux résultats obtenues par gel de filtration sur séphadex G 75, par conséquent nous pouvons confirmer la pureté de l'endopolygalacturonase obtenue.

(3) et (3') sont les colonnes de migration d'une enzyme commerciale d'*Aspergillus niger* "Sigma", on perçoit deux bandes: une de 67,5 kDa et l'autre de 59 kDa.

Chapitre III. Purification et Caractérisation des Pectinases.

La colonne (4) est celle de l'exopolygalacturonase purifiée par gel de filtration, aucune bande n'est apparue sur cette colonne de migration, cela peut être lié à la faible concentration en enzyme dans de l'extrait purifié.

Dans la littérature, certains chercheurs signalent que les endo PG et exoPG sont des dimères ou trimères et leurs analyse par SDS page révèle plus qu'une bande; d'autres chercheurs ont signaler que les deux enzymes sont homogènes, leurs analyses par SDS page révèle une seule bande pour chaque enzyme.

Comme Dogan et Tarib, (2007) cités par (Heerd, et al. 2012) qui ont purifié une exopolygalacturonase montrant deux bandes par SDS-Page de poids moléculaires de 36 et 53 kDa. Tari, et al. (2008) ont purifié une exopolygalacturonase qui a montré 3 bandes par SDS-Page de PM 36, 53, et 68 kDa.

d'autres chercheurs ont purifié des exoPG homogènes ayant une seule bande par SDS-Page comme Gupta S., et al. (2008) ; Silva, et al. (2007) ; Jacob, et al. (2008a), les PM des exoPG purifiées par ces chercheurs sont 54 kDa, 24 kDa et 43 kDa respectivement. Le PM de L'exoPG obtenu par gel de filtration est proche de celui enregistré par Sakamoto, et al. (2002) qui ont purifié à partir d'*A.niger* deux exopolygalacturonases de 56 kDa et 82 kDa.

Tableau 27. Poids moléculaires en kDa des extraits enzymatiques purifiés déterminés par SDS-PAGE

Enzyme purifiée	RF	PM (Da)
ExoPG	-	-
EdoPG	0.24	63

Les poids moléculaires des enzymes purifiées (tableau 27) que se soit déterminés par gel de filtration ou SDS-Page se situent dans la fourche des PM des polygalacturonases rapportés par plusieurs chercheurs.

Baron et Thibault, (1985) ont rapporté que les polygalacturonases synthétisées par les microorganismes ont été peu étudiées, sans doute parce qu'elles sont produites en faible quantité et leurs purifications est délicates . Les poids moléculaires déterminés par tamisage moléculaire sont estimés entre 55000-70000 pour les enzymes d'origine végétale.

Jayani, et al. (2005) ont signalé que le poids moléculaire des enzymes pectinolytiques microbiennes varie de 35 kDa à 79 kDa. de leurs cotés Mohamed, et al. (2009) qui ont rapporté que la majorité des polygalacturonases purifiées par les microorganismes ont des PM

entre 25kDa et 80 kDa, ont confirmé ce qui a été signalé par De Vries and Visser (2001b) à propos des polygalacturonases dont le PM varie de 35kDa à 80 kDa. Le PM le plus élevé était celui de la PG du *Bacillus sp.* 115,000 (Kobayashi, et al. 2001; Koboyashi, et al. 1999).

Mohsen, et al. (2014) ont purifié deux polygalacturonases de PM 53 kDa et 41 kDa.

Le PM de l'endoPG obtenu dans ce travail est proche du PM enregistré par Contreas-Esquevel et Vorget, (2004), 60 kDa et par Devi and Rao (1996) , 61 kDa. Les PM obtenus se rapprochent des PM de PG de *T. reesi* (66000et 63000) purifiées par Mohamedab, et al. (2003). Jayani et al., (2005) ont rapporté des PM de 38 et 61 kDa d'*A.niger*; 65 et 63 kDa d'*A. japonicus* et 63 et 79 kDa de *Penicillium frequentans*.

D'autres chercheurs ont enregistré des PM inférieurs comme Motwani, (2013) (32 kDa),; Mohsen et al., (2009) 36 kDa à 38 kDa; Khaimar et al., (2009) 40 kDa; (Dey, et al. 2014) 30 kDa. Semenova, et al. (2003) ont isolé deux polygalacturonases de PM 38 kDa et 65 kDa d'*A. japonicus*. Barman, et al. (2015) ont signalé que les PM des pectinases d'*A.niger* déterminés par SDS-Page varient de 34 kDa à 42 kDa.

D'après notre analyse bibliographique 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 (Patil, et al. 2012) . la pectinase secrétée par *Streptomyces erumpens* est d'un PM de 63 kda (Patil and Dayanand 2006). Les PG de *Sclerotinia, sclerotirum* sont de 82 et 56 kda (Riou et al. ,1992), tandis que (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 cotés (Nagai et al.,2000) ont aussi purifié une exoPG d'*Aspergillus awamori* 41 kDa .

12.5 Caractérisation partielle de l'endopolygalacturonase purifiée.

12.5.1 Etude de l'influence de la température sur l'activité de l'endopolygalacturonase et la stabilité de l'enzyme.

L'allure du graphe de figure 64, montre que l'activité résiduelle de la solution de pectine est stable entre 20 et 50°C à partir de cette température une chute d'activité jusqu'à une valeur de 22% par rapport à l'activité maximale est observée. La température optimale est estimée entre 30°C et 40°C. Ce résultat est proche de celui obtenu par Semenova et al., (2003) sur la caractérisation de l'endoPG de l'*A.japonicus* qui était 30°. La température optimale d'une endoPG d'*A. niger* est 45°C résultat obtenu par Singh and Rao (2002) l'endoPG d'*A. awamori* se caractérise par une température optimale de 45°C (Nagai et al., 2000) et celle de l'endo PG du *Mucor* est 45°C (Gadre, et al. 2003).

Certaines endoPG se caractérisent par des températures optimales plus élevées comme l'endoPG de *Thermococcus aurantiacus* dont la température optimale est 55°C (Martins, et al. 2007) et les endoPG de *A. carbonarius* dont les températures optimales sont entre 50° et 55 °C (Devi and Rao 1996).

l'endopolygalacturonase purifiée était stable à 4°C durant les 5 heures du test, et à 30°C l'enzyme était stable pendant 4 heures au delà une réduction dans l'activité a été observée (figure 65).

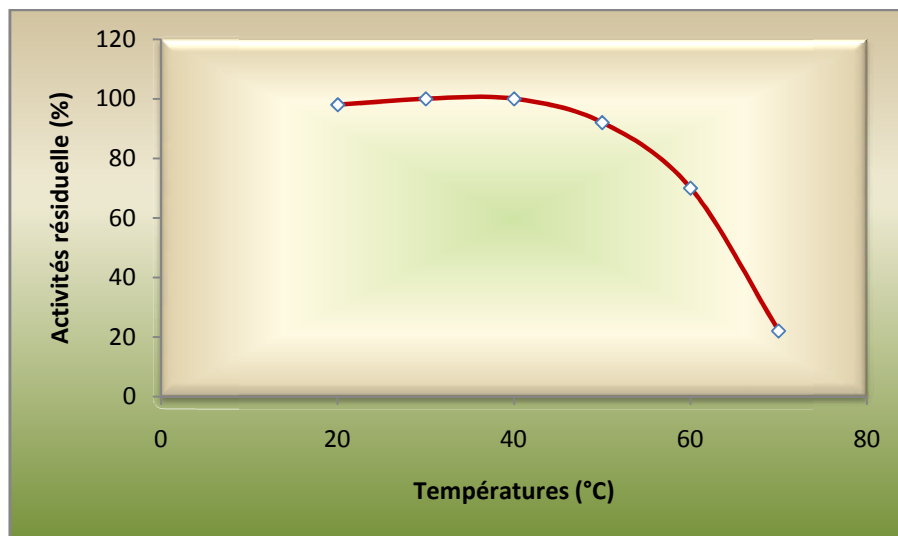


Figure 64. Influence de la température sur les activités de l'endopolygalacturonase

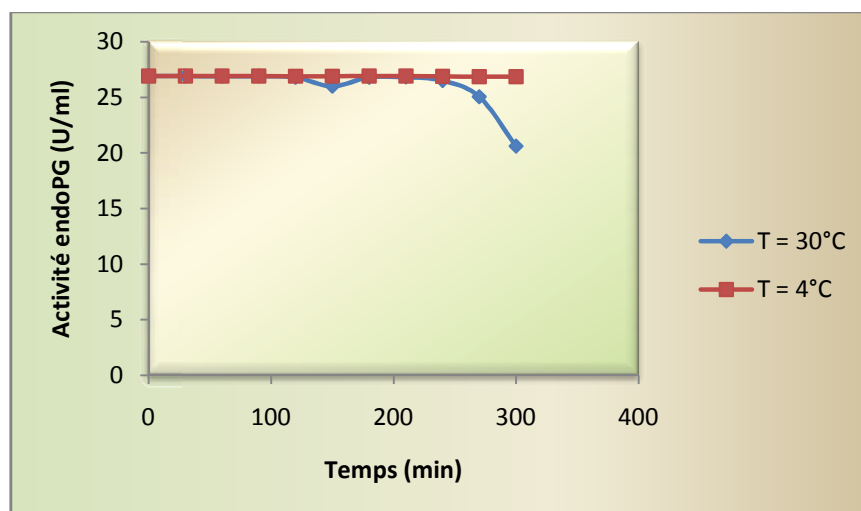


Figure 65. Stabilité thermique de l'endopolygalacturonase

12.5.2 Influence du PH sur la stabilité de l'endopolygalacturonase

L'activité enzymatique est très dépendante de la valeur du pH. Les domaines optimaux de pH sont caractéristiques des différentes enzymes. Le pH possède également un effet marqué sur la stabilité des enzymes. Généralement le domaine de stabilité est plus large que le domaine d'activité optimale de l'enzyme.

Le graphe de la figure 66, montre que l'activité résiduelle de l'enzyme augmente en se rapprochant au pH 4, au delà elle diminue progressivement jusqu'à 20% à pH 8,8. Le pH optimale est estimé à 3,8.

Les travaux de Semenova et al., (2003) sur les pectinases purifiées ont montrée que l'endo PG à deux isoformes endoPG I qui a un pH optimum de 3,8 et l'endoPG II qui a un pH optimum de 4,8. De leurs cotés Benen, et al. (2003) et (Singh and Rao 2002) ont estimé les pH optimaux des endoPG produites par 7 espèces de *Aspergillus niger*, dans le rang de 3,8 à 5.

L'effet du pH sur la structure et l'activité de la polygalacturonase est décrit par Jyothi, et al. (2005). Selon ces auteurs la conformation active de la PG est active à des pH entre 3.5 et 4.5, entre pH 5 et 7 des altérations de la structure secondaire et tertiaire auront lieu à cause de l'augmentation de la charge négative de la molécule dans les milieux neutres et basiques ce qui conduit à une répulsion entre les brins qui déstabilisent la matrice des liaisons hydrogène de l'enzyme.

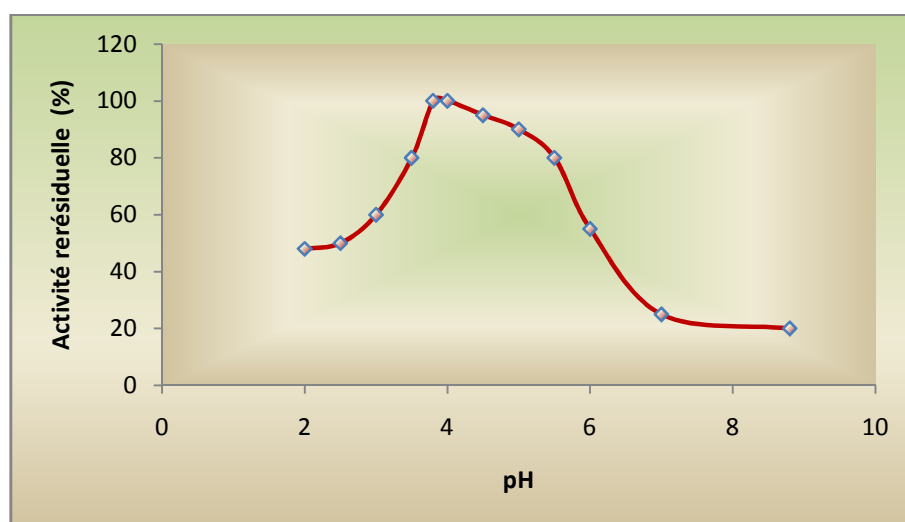


Figure 66. Influence du pH sur les activités de l'endopolygalacturonase

12.5.3 Influence des sels minéraux sur l'activité de l'endopolygalacturonase

Il est largement connue que certains ions métalliques sont inhibiteurs des enzymes et notamment les pectinases comme le Hg^{+2} et Cu^{+2} qui bloquent les groupements thiol des protéines (Silva, et al. 2007). En plus de cet effet le Cu^{++} induit la dépolymérisation des protéines en formant des ponts de His-Cu-His entre les peptides adjacentes (Silva, et al. 2007).

Cependant, La formation d'un complexe de chélate entre le substrat et les ions métalliques pourrait former un complexe substrat- métalenzyme plus stable et pourrait stabiliser la conformation catalytiquement active de la protéine (Jagiasi 2013).

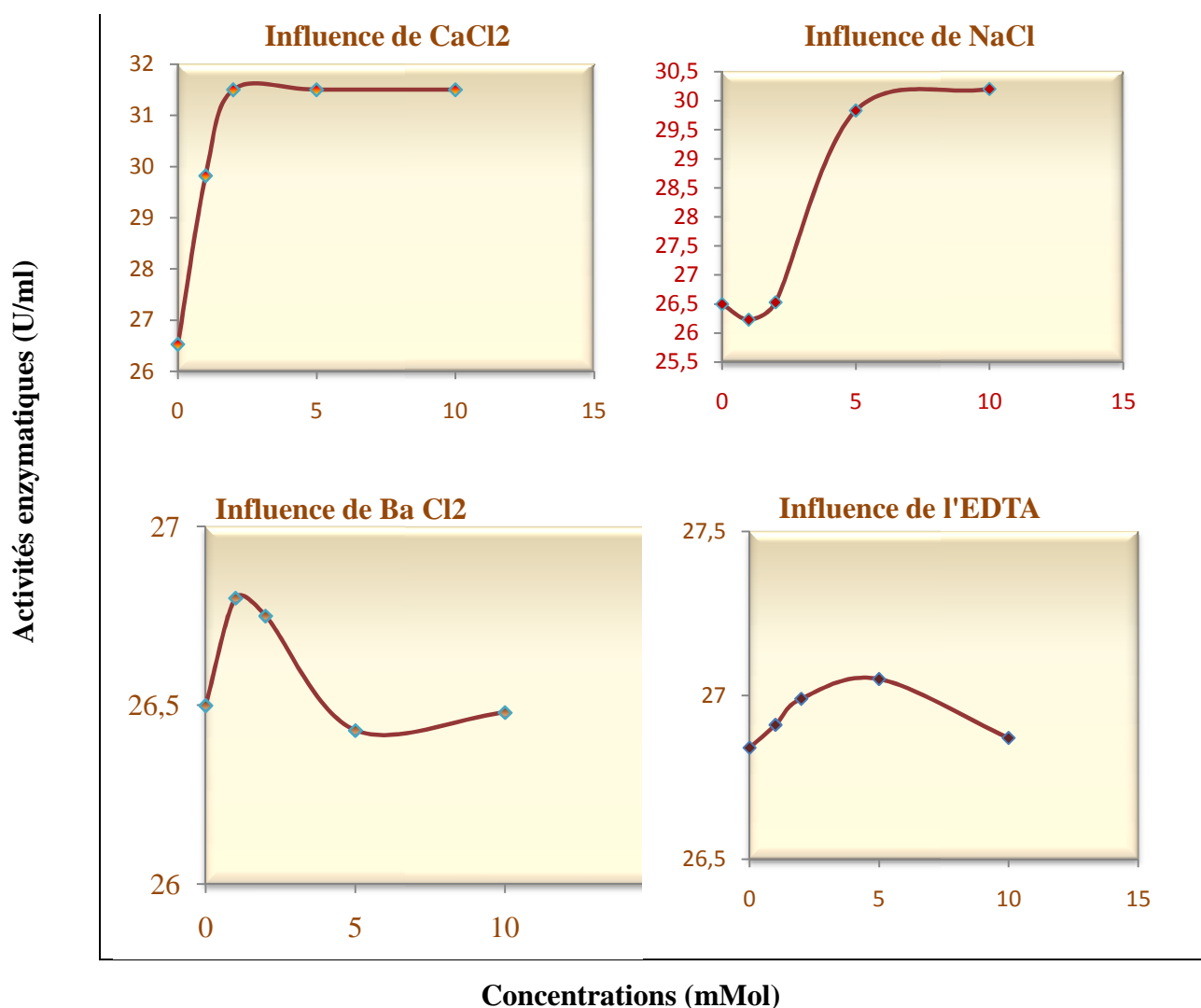


Figure 67. Influence des sels minéraux sur l'activité de l'endoPG

Sur la figure 67, Nous observons une amélioration dans l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase en présence de CaCl_2 dans le milieu à partir d'une concentration de 2 mMol; la même observation est constatée en présence de NaCl à partir de 5 mMol. Une légère amélioration dans l'activité enzymatique est observée en présence de BaCl_2 à 1 mMol, mais à partir de 2 mMol le BaCl_2 ne semble pas avoir une influence sur l'activité enzymatique. En présence d'EDTA une légère augmentation est observée à une concentration de 5 mMol dans le milieu; il nous semble que l'EDTA n'a pas d'influence significative sur l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase. L'EDTA est un chélateur qui complexe les cations bivalents, il les empêche en fait d'agir comme activateurs, la plus parts des PG sont actives par les ions monovalents. En effet l'EDTA est un inhibiteur des lyases activées par les ions calcium (Fenghour, et al. 2002). Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Thibault and Mercier (1978), et ceux obtenus par Sakai, et al. (1993). La polygalacturonase du *Bacillus MG-CP-2* a été stimulée en présence de CaCl_2 . (Kapoor, et al. 2000). Quand à Mohamed, et al. (2006), ils ont rapporté qu'en présence de CaCl_2 , l'activité endopolygalacturonasique a été améliorée jusqu'à 66,7 % et en présence de BaCl_2 l'activité enzymatique a été stimulée jusqu'à 96%. L'effet de Ba^{+2} a été aussi déterminé sur la PG d'*Aspergillus Carbonarius* (Devi and Rao 1996), tel que l'activité d'une espèce de PG (PGI) augmente, mais diminue de 22% pour les autres isoformes de PGII.

De leurs cotés Denis Silva et al., (2007), ont rapporté que l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase peut être augmentée jusqu'à 96% en présence de fortes concentrations de Ba^{+2} et peut augmenter de 12% en présence de Na^+ à des pH acides. Il est connu que la plus part des polygalacturonases isolées de divers microorganismes sont activés par la présence de chlorure de sodium dans le milieu réactionnel (Rexová Benková and Markovic 1976).

D'après Baron et Thibault (1985), à des concentrations inférieures à 10^{-3}M , les sels monovalents et divalents sont activateurs par contre à des fortes concentrations ces sels deviennent inhibiteurs.

Généralement tous les cations ont montré une augmentation ou réduction partielle des activités des polygalacturonases seulement le Mn^{+2} et Cu^{+2} qui inhibent complètement l'activité de polygalacturonases (Mohamed et al. 2006).

12.5.4 Influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique de la polygalacturonase.

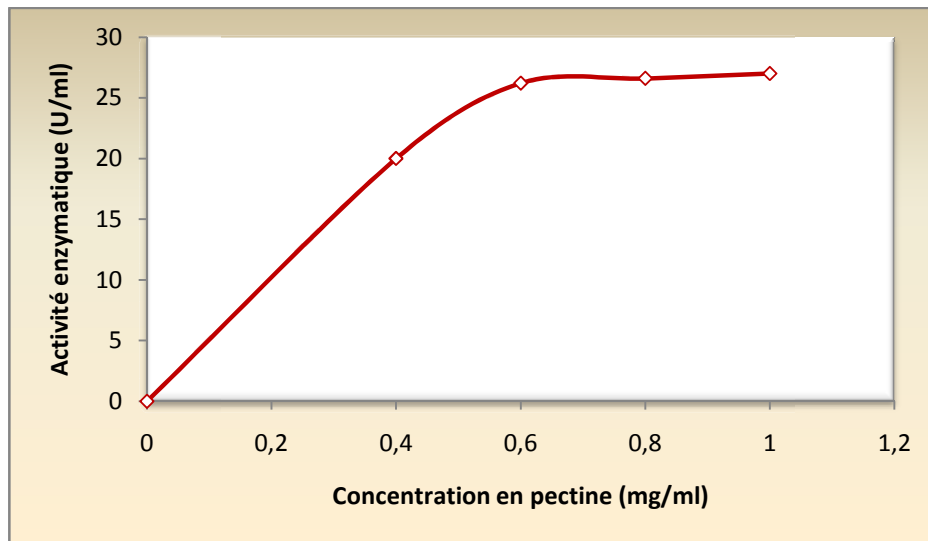


Figure 68. Vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

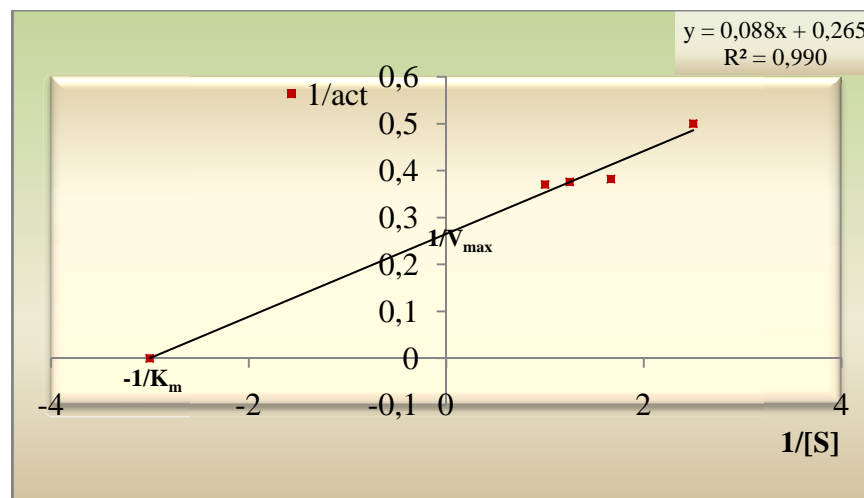


Figure 69. Représentation de Linweaver-Burk de l'inverse de l'activité enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en substrat

Nous observons sur le graphe de la figure 68, l'activité enzymatique qui évolue avec l'augmentation de la concentration en substrat, la vitesse d'évolution de l'activité enzymatique devient faible en se rapprochant des concentrations de 0,5 mg /ml, au-delà, l'activité enzymatique ne change pas avec l'augmentation de la concentration en substrat et la vitesse de la réaction devient donc stationnaire en fonction de la concentration en pectine utilisée. Cette allure de graphe est traduite par l'équation de Michaelis-Menten ci dessous:

$$V_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Avec: V_i est la vitesse initiale de la réaction; V_{\max} est la vitesse maximale de la réaction, c'est l'activité enzymatique maximale et K_m est la constante de Michaelis-Menten qui exprime l'affinité de l'enzyme envers le substrat, les faibles valeurs de K_m signifient que l'enzyme a une bonne affinité pour son substrat, K_m se détermine graphiquement par extrapolation de la demi vitesse maximale sur l'axe des abscisses. Les deux paramètres de la réaction enzymatique K_m et V_{\max} peuvent être déterminés graphiquement par la représentation graphique de Lineweaver- Burk , qui consiste à un tracé de l'inverse de la vitesse de la réaction (dans notre cas c'est l'inverse de l'activité enzymatique) en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. La fonction qui en résulte est une droite linéaire dont le point d'intersection avec l'axe des ordonnées est l'inverse de la vitesse maximale, et le point d'intersection avec l'axe des abscisses et l'inverse de la constante de Michaelis en valeurs négatives (figure 69).

L'affinité de l'endopolygalacturonase pour son substrat dépend du type de la pectine utilisée et de son degré de méthylation. Pour la pectine que nous avons utilisé (pectine d'agrumes de Sigma), K_m est égal à 0,33 mg/ml et V_{\max} est égale à 26,66 mU/ml. Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature; Gummadi, et al. (2007) qui ont rapporté que le K_m des endopolygalacturonases pour les pectates varie entre 0,14 et 2,7mg/ml.

Le résultat de K_m trouvé dans cette étude se rapproche aussi de celui trouvé par Thibault (1983), dont les valeurs sont 0,44 mg/ml pour K_m et 239 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pour V_{\max} .

Le K_m de l'endopolygalacturonase du *Mucor rouxii*, est égale à 1,88 et son V_{\max} est égale à 0,045 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ (Saad et al., 2007). Les endopolygalacturonases du *Penicillium frequentans* et du *Saccharomyces* ont des K_m de 2,7 mg/ml et 4,2 mg/ml respectivement (Anand et al., 2006). Le K_m et le V_{\max} du *P. cestreatus* sont de l'ordre de 1,33 mg/ml et 28,6 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ en utilisant la pectine comme substrat (Kant et al., 2013). Ces valeurs paraissent plus élevées relativement à l'endopolygalacturonase de cette étude. Les propriétés de quelques endopolygalacturonases purifiées sont reportées dans le tableau 28 ci dessous.

Tableau 28. Caractéristiques de quelques endopolygalacturonases purifiées

Source de PGase	Poids moléculaire (kDa)	pI	Activité spécifique (Umg ⁻¹)	Km	T° optimale	pH optimum	Références
<i>Aspergillus japonicus</i>	38	5,6	-	-	30	4.0-5.5	(Semenova et al. 2003)
<i>Mucor flavus</i>	65	3,3	-	-	30	4.5-5.5	(Gadre et al.2003)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	40	8,3	-	-	45	3,5-5,5	(Gadre et al.2003)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	35	5,9	5890	0,13	55	5	(Martin et al.2007)
<i>Aspergillus niger</i>	615 38	- -	3750	0,72	45	3-4,6	(Singh et al. 2002)
<i>Aspergillus awamori</i>	41	6,1	487	-	40	5	(Nagai, et al. 2000)
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	42	6,7	-	-	40-50	3-4	(Belarbi, et al. 2000)
<i>Stereum purpureum</i>	42 44 46	8,5 8,5 8,5	488 416 457	- - -	- - -	5.0 5.0 5.0	(Reymond, et al. 1994)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	496 496 496 496	6,3 6 6,3 5,7	102,6 102 107,8 97,6	- - - -	- - - -	- - - -	(Barnby, et al. 1990)
<i>Burkholderia</i>	45	8	-	0,49	40-50	3,5	(Massa, et al. 2007)
<i>Mucor Rouxii</i>	43,1	6	-	1,8 8	34	4,5	(Saad, et al. 2007)
<i>A.carbonarius</i>	61 42 47	- - -	- - -	- - -	55 50 55	4,0 4,1 4,3	(Devi and Rao 1996)
<i>S. cerevisiae</i>	39	-	-	-	45	5,5	(Ganivors, et al. 2000)
<i>A.kawachi</i>	31	-	-	-	45	4,5	(Esquevel et Vorget, 2004)
<i>R. oryzae</i>	31	-	-	-	45	4,5	(Saito, et al. 2004)
<i>Kuyveromyces fragilis</i>	33	5,6	-	-	30	5	(Sakai, et al. 1984)
<i>Aureobasidiumpu lluans.</i>	42	6	-	-	-	4,5	(Sakai and Takaoka 1985)
<i>A.nigerURM4645</i>	-	-	-	-	50	5	(Maciel, et al. 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	63 57,54	- -	- -	0,3 -	30-45 -	3,5-4,5 -	Ce travail

Conclusion

Nous avons constaté d'après l'analyse bibliographique que beaucoup de recherches qui ont été développées sur l'étude et la purification des enzymes pectinolytiques qui dégradent la zone lisse du polysaccharide (homogalacturonane) de la pectine, mais peu de recherches qui ont été menées sur la purification des enzymes dégradant la chaîne hérissée (rhamnogalacturonane), peut être que c'est dû à la difficulté d'obtenir les substrats appropriés pour l'étude de la dégradation des rhamnogalacturonanes I et II.

La stratégie de la purification des pectinases appliquée dans cette étude, était rapide et peu coûteuse, elle nous a permis d'isoler une endopolygalacturonase intéressante de poids moléculaire 63 kDa en deux étapes: fractionnement par le sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, suivi par une chromatographie sur gel de filtration Séphadex G75.

L'application de l'extrait partiellement purifié à la chromatographie d'échange d'ions, nous a permis aussi d'isoler 3 pectinases: une lyase, une exopolygalacturonase et une endopolygalacturonase.

Le profil d'élution par chromatographie a révélé peu de pic, La majorité d'entre eux sont doués d'une activité pectinasique, cela nous indique que le milieu de culture utilisé était spécifique à la production des pectinases, la pectine des résidus d'oranges induit en priorité la production des pectinases en milieu acide.

L'analyse de la polygalacturonase purifiée a montré que cette enzyme est stable à 4°C et 30°C pendant 4 heures; l'activité optimale de l'enzyme est entre 30°C et 40°C et à pH 3,8. Ces propriétés de l'enzyme intéressent son utilisation dans l'industrie de boisson, notamment pour la clarification enzymatique des jus des fruits et la macération de ces derniers.

Chapitre IV
Application de la Polygalacturonase à
l'Hydrolyse du Trouble dans le Jus de Pomme

Généralités sur les hydrolases.

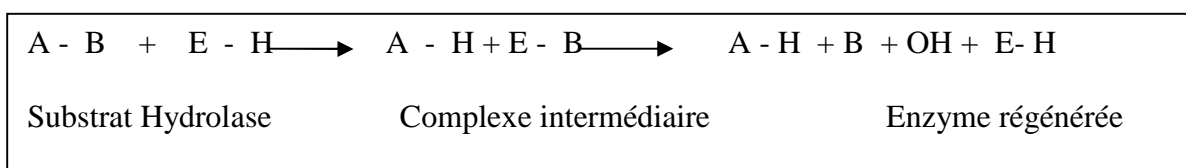
Les enzymes sont des protéines qui, en raison de leurs propriétés spécifiques, participent à la synthèse des molécules. Elles peuvent accélérer certaines réactions chimiques par des facteurs de cent millions. Dans des conditions particulières, elles rendent possible de nombreux processus. Elles sont utilisées comme produits finaux, mais aussi comme agents de fabrication industrielle Assamoi, et al. (2009).

Les enzymes sont divisées en six principales classes, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent : les oxydoréductases , les transférases , les hydrolases , les lyases , les isomérases (EC 5) et les ligases (EC 6).

Elles sont désignées par un nom systématique (indiquant la nature du ou des substrats, le type de réaction catalysée), un numéro d'ordre à quatre chiffres, précédé de E.C. (= Enzyme Commission) et dont le premier chiffre indique la classe, le deuxième la sous-classe, le troisième la sous-sous-classe, le quatrième le numéro d'ordre dans la sous-sous-classe (Assamoi, et al. 2009).

soixante quinze pourcent des enzymes sont des hydrolases (amylases, cellulases, hémicellulases, pectinases). Au niveau commercial, les protéases sont les plus importantes (environ 40 % du total des ventes), viennent ensuite les hydrolase (Assamoi, et al. 2009).

Les hydrolyses sont catalysées soit par des protons en milieu fortement acide ou par des ions hydroxyle en milieu alcalin ou bien par des hydrolases en milieu neutre. Tous les organismes vivants possèdent des hydrolases qui permettent la dégradation de leurs macromolécules constitutives : amidon, cellulose, protéines, lipides... Ces hydrolases interviennent spontanément dans les matières premières si les conditions sont favorables; quelques-unes sont utilisées industriellement sous forme de préparation purifiée (amylases, cellulases, pectinases, lipases, protéases...). Les hydrolases abaissent l'énergie d'activation du processus. Elles ne font intervenir l'eau qu'après une série d'échanges d'électrons et de protons entre l'enzyme et le substrat. Le mécanisme le plu répandu passe par la formation d'un complexe intermédiaire entre l'enzyme et le substrat selon le schéma général suivant (Lorien 1998) (Lorien 1998):



Pectine (substrat des enzymes pectinolytiques)

La pectine fut décrite pour la première fois par Braconnot en 1825 à partir des fruits, elle fut nommée pectine de Grec "*Pectos*" ce qui signifie les propriétés fondamentales des pectines pour former des gels avec les ions de calcium (Braconnot 1825). L'analyse de cette molécule a permis de constater qu'il ne s'agissait pas d'une entité ou molécule, mais d'une famille de polysaccharides complexes de mêmes propriétés mais de structures diverses (Ridley, et al. 2001); on les a appelés substances pectiques.

Les substances pectiques sont des constituants majeurs de la paroi végétale, elles sont présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire de la membrane végétale (figure 70). Elles sont fréquemment associées à la cellulose, à l'hémicellulose et à la lignine et peuvent être trouvées dans différents tissus, elles 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 d'orange. Les pectines représentent 30% de la masse des parois primaires (Pérez.S, et al. 2003.) et elles 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). Les substances pectiques sont connues pour contribuer à la fois à l'adhésion entre les cellules et à la résistance mécanique de la paroi cellulaire, grâce à leur capacité à former des gels stabilisants, et jouent également un rôle important dans la croissance des cellules végétales .

En plus de ces importantes fonctions physiologiques, ces polysaccharides structurels jouent également un rôle important dans de nombreux domaines (Pagan A., et al. ; Pagan J., et al. 2001). Ils sont impliqués dans les interactions entre plantes et agents pathogènes; la quantité et la nature de la pectine sont déterminantes pour la texture des fruits et des légumes pendant leur croissance, leur maturation, leur stockage et leur transformation; comme ils sont extraits commercialement, ils sont appliqués comme additifs dans de nombreux domaines, comme stabilisants, épaississants, et principalement en tant qu'agents gélifiants; ils ont un rôle important en tant que fibre nutritionnelle et pourraient avoir des propriétés thérapeutiques intéressantes. (Jayani, et al. 2005). Toutes les substances pectiques se caractérisent par une forte teneur en acide galacturonique (Galc. A), liés par des liaisons α -(1-4) des résidus galacturoniques.

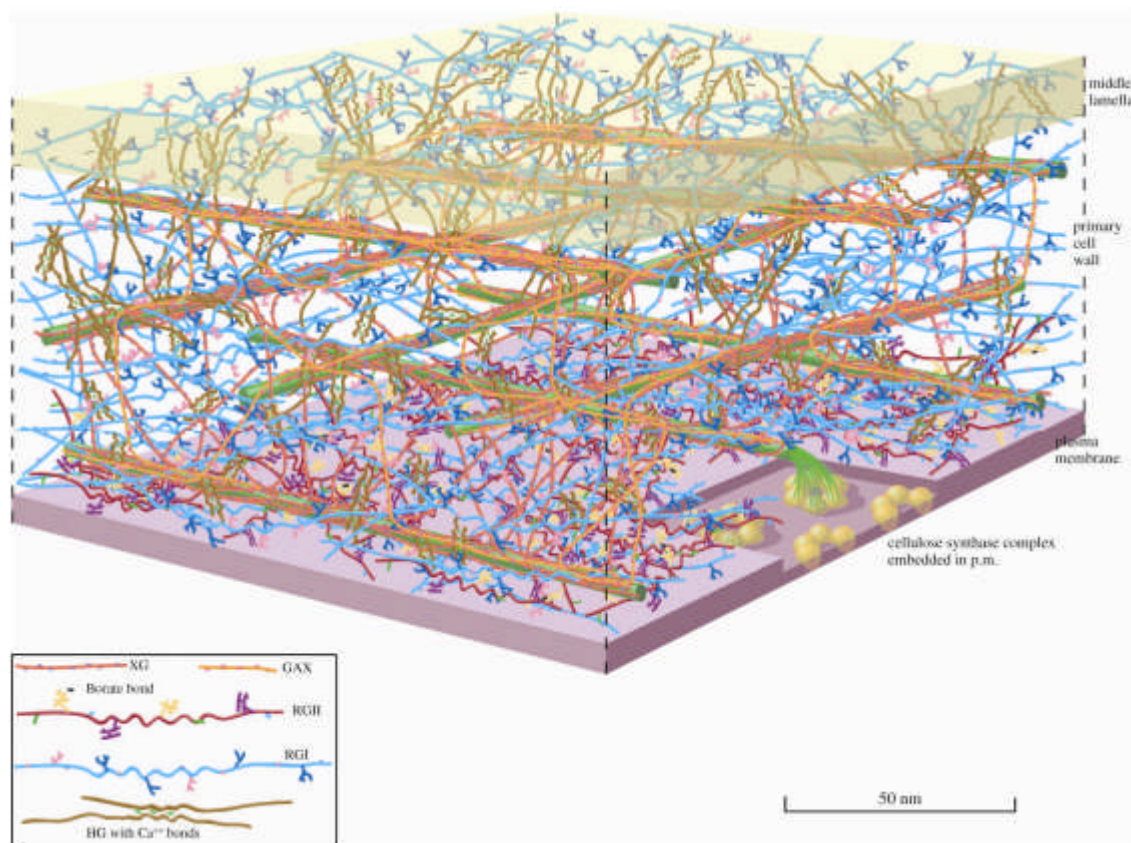


Figure 70. Maquette d'une partie de la paroi cellulaire végétale. Les couches disposées orthogonalement de microfibrilles de cellulose (vertes) et de CLG [ici du xyloglucane (XG) et du glucuronoarabinoxylane (GAX)] forment un réseau, qui est noyé dans une matrice pectique contenant de l'homogalacturonane (HG), du rhamnoglacturonane I (RG-I) et du rhamnoglacturonone II (RG-II). La lamelle moyenne est riche en pectine et cimente les cellules adjacentes. (Somerville, et al. 2004)

Les substances pectiques présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques du fait de leur caractère polyélectrolyte. Ce caractère leur confère la capacité de s'associer entre elles et de former des gels en présence de cations divalents tels que le calcium (Figure 72). Généralement, les pectines sont caractérisées par leur degré de méthylation (DM) défini comme étant le pourcentage de groupements carboxyles estérifiés par le méthanol. Contrairement à l'acétyléstérification, la méthylestérification est en proportion considérable dans les pectines natives (figure 71).

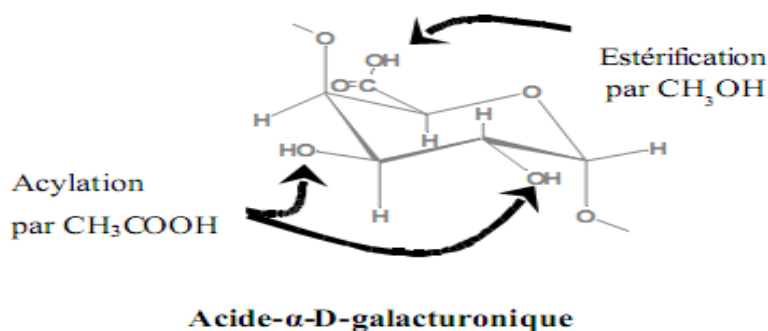


Figure 71. Substitution de l'acide galacturonique (Tilly 2014).

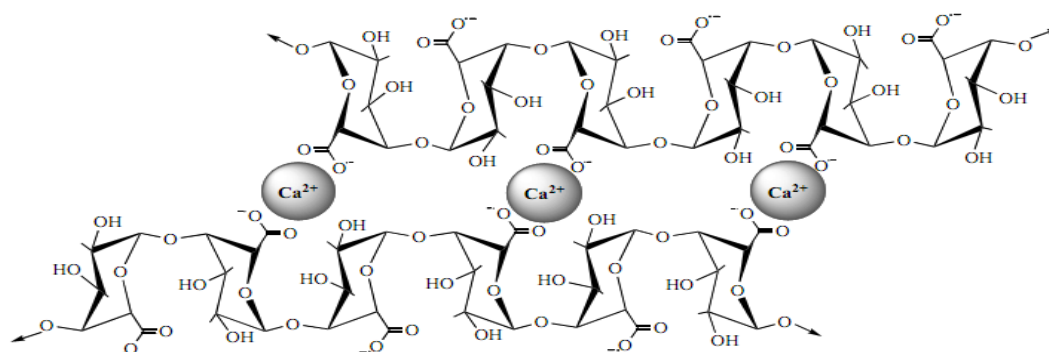


Figure 72. Interaction par insertion des ions Ca^{2+} entre les groupes carboxyles non estérifiés des résidus galacturonosyle de deux chaînes HG (Pedrolli and Carmona 2009)

Selon la société chimique américaine, les substances pectiques sont classées en 4 groupes : protopectines, acide pectique, acide pectinique et pectine (Sharma, et al. 2013).

- Protopectine: Unités de galacturonates liés par liaison α (1-4) glycosidique, les groupements carboxyliques sont hautement estérifiés par le méthanol, elles peuvent être liées aux cations bivalents Ca^{++} . Elles sont insolubles dans l'eau, leurs degrés d'estérification est supérieur à 90 %, les produits de leurs hydrolyse sont l'acide pectique et la pectine.

- Pectines (polyméthylgalacturonate): Unités de galacturonates liés par liaison glycosidique en α (1-4), les groupements carboxyliques, sont estérifiés par le méthanol. elles sont solubles dans l'eau, leurs degré d'estérification est entre 75% et 90%, les sels de la pectine sont appelés pectates.

- Acide pectinique: Unité de galacturonate liées par liaison glycosidique en α (1-4), les groupements carboxyliques faiblement méthylés sont estérifiés par le méthanol. Les sels d'acide pectinique sont les pectates. Elles sont solubles dans l'eau, leurs degrés

d'estérification est entre 0% et 75%.

• Acide pectique: Unité de galacturonate liées par liaison glycosidique en α (1-4). Les sels d'acide pectique sont appelés pectates. Elles sont solubles dans l'eau, leurs degrés d'estérification est 0% (figure 73).

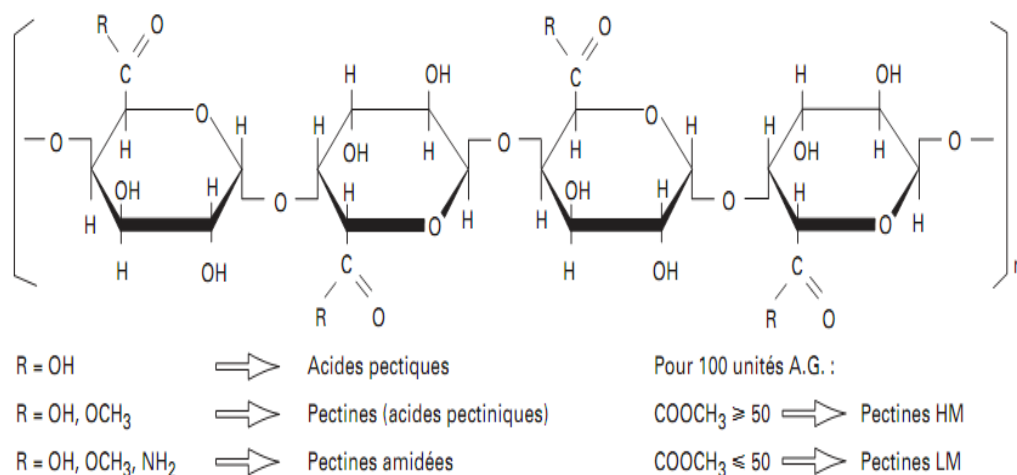


Figure 73. Structure et définition de la pectine (Tilly 2014)

15.1 Structure moléculaire des substances pectiques.

Les pectines sont composées de différents polysaccharides à savoir, les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes (figure 74) Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts, à savoir l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II (RG-I et RG-II) (Combo, et al. 2011).

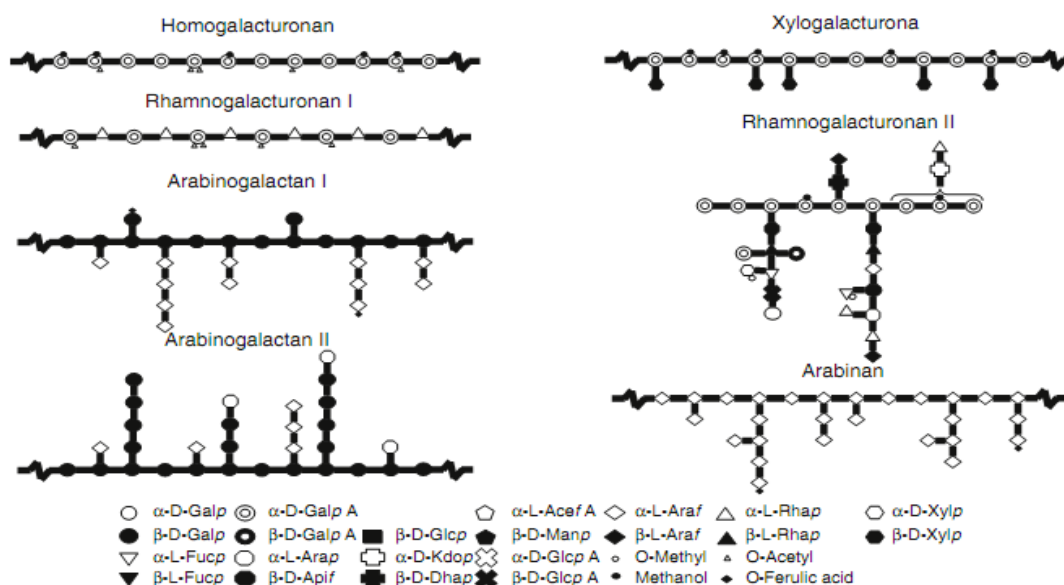


Figure 74. Les éléments qui constituent une molécule de pectine (Voragen, et al. 2009)

Les polysaccharides pectiques natifs (protopectines) présents dans les parois des cellules végétales ont des caractéristiques structurales complexes, y compris une diversité de sucres neutres qui se lient aux principaux épines dorsales du galacturonate et divers degrés de ramification. Cependant, les pectines commerciales sont généralement moins complexes du point de vue structurel en raison des changements structurels et de la rupture lors des processus d'extraction industrielle. (Stephen, et al. 2006)

La variabilité structurale des pectines en fait l'un des polysaccharides pariétaux les plus complexes (Figure 75 a, b). Pérez a divisé les pectines en deux sous-catégories : (i) les substances pectiques acides (homogalacturonane, rhamnogalacturonane de types I et II et, (ii) les substances pectiques neutres (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) associées de manière covalente aux rhamnogalacturonanes au sein de la macromolécule pectique (Pérez.S, et al. 2003.). L'organisation de ces sous-catégories pectiques est aujourd'hui remise en question. Le modèle longtemps admis décrit une alternance de zone « lisses » (HG) et de zones « hérissées » (RG-I) substituées par des chaînes latérales d'oses neutres (Voragen, et al. 1995). Ces dernières années Vincken, et al. (2003) ont suggéré que la chaîne principale pectique était en réalité une zone RG sur laquelle seraient substituées des chaînes latérales d'oses neutres mais également des zones HG figure 76). A ce jour, l'organisation complexe des polymères pectiques n'est donc pas encore totalement élucidée. (Yapo, 2011).

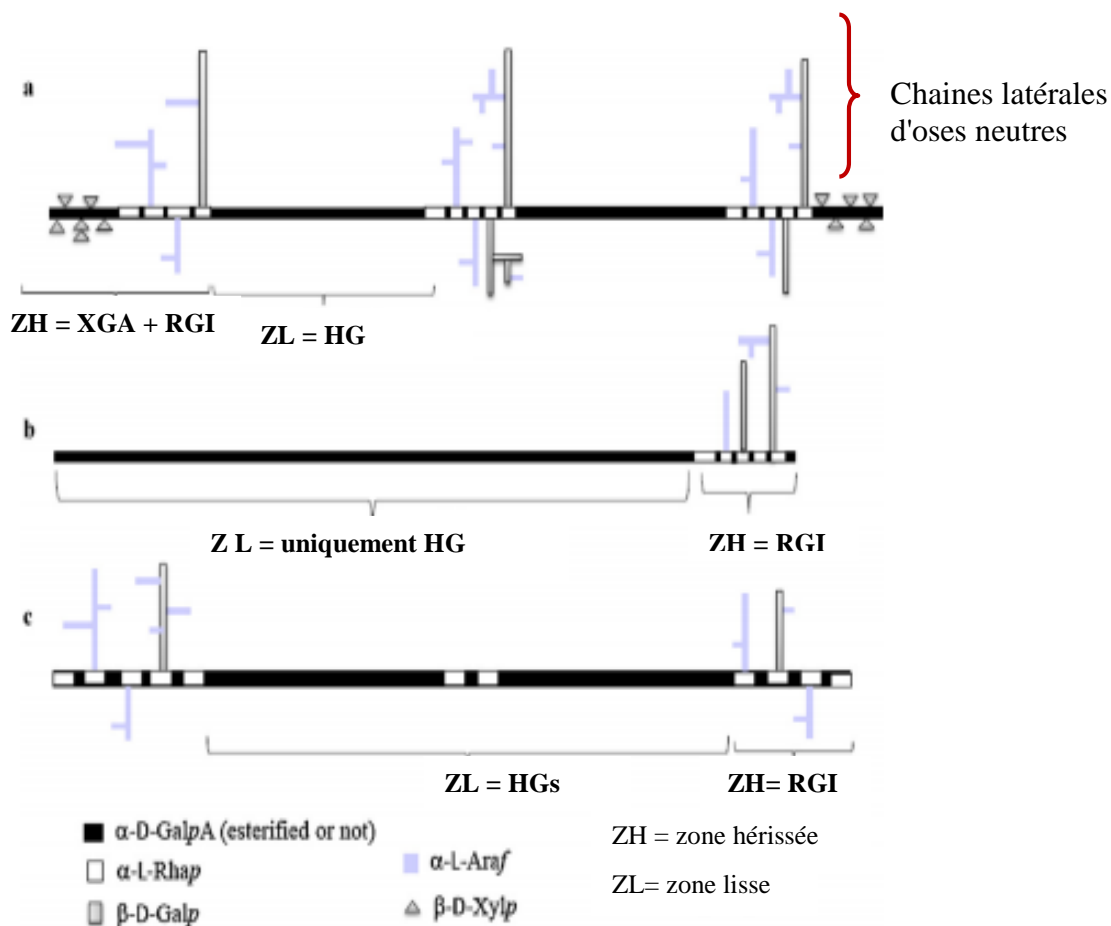


Figure 75. Les modèles traditionnels du complexe de pectine:

montrant un squelette linéaire global constitué de HG non ramifié et du noyau de RG-I neutre ramifié en sucre, et le noyau de galacturonane de XGA (le cas échéant) (a) en fonction des caractéristiques structurales de diverses pectines de pomme selon à (Voragen, et al. 1995) et affiné en ce qui concerne la position de XGA dans la région HR, en prenant en compte les travaux récents de (Coenen, et al. 2007b) et (b) sur la base des caractéristiques structurales de la pectine d'agrumes du commerce (Zhan, et al. 1998) et (c) sur la base des caractéristiques structurales de la pectine de betterave à sucre (extraite à l'acide) et de la pectine de houblon (Oosterveld, et al. 2002).

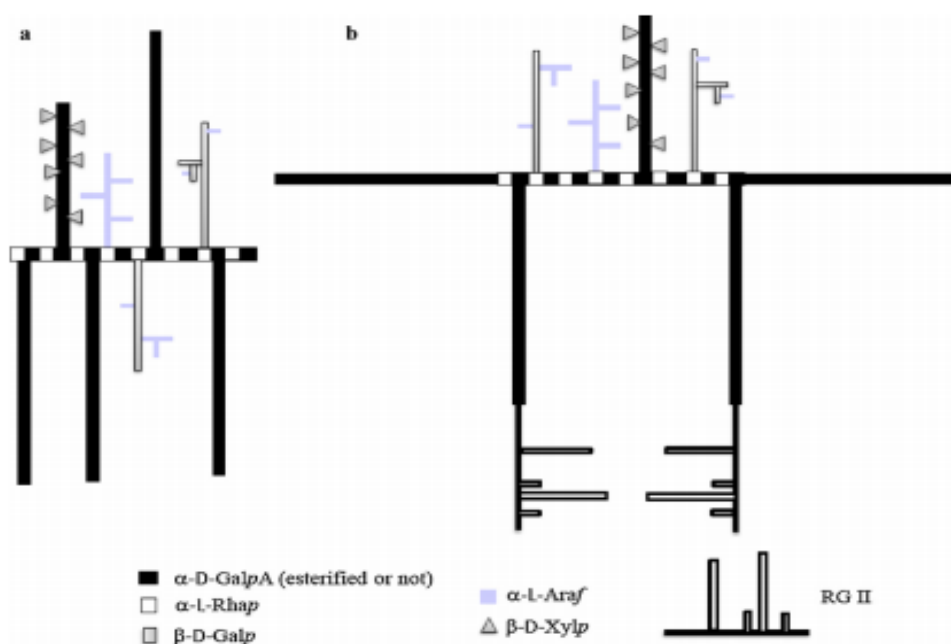


Figure 76. Modèles non traditionnels complexes à base de pectine:

a) le modèle de «l'épine dorsale RG-I» d'après (Vincken, et al. 2003) montrant un squelette exclusif de RG-I et le positionnement de HG et XGA en tant que chaînes latérales de RG-I avec les chaînes latérales de sucre neutre (arabinane, arabinogalactane I et éventuellement arabinogalactane II). L'orientation ainsi que la position des chaînes latérales sur le squelette du RG-I est arbitraire; b) le modèle de type "entité vivante", proposé ici sur la base de données structurales et macromoléculaires obtenues par hydrolyse modérée en acide (MAH) et deux dégradations enzymatiques différentes (polygalacturonase et rhamnogalacturonase) de IEC et extraites douces Pectine purifiée par SEC (AEPP) issue du MCG à base de zeste de fruit de la passion jaune. Dans ce dernier modèle, l'épine dorsale globale du complexe de pectines est supposée être composée de deux blocs HG non ramifiés par noyau RG-I, qui sont connectés en alternance. Les deux éléments HG de la chaîne principale peuvent prendre une position horizontale et verticale (vers le haut et vers le bas) en raison de la flexibilité des unités -l-Rha liées (1 → 2) par lesquelles elles sont attachées au noyau RG-I. Les autres blocs HG seraient positionnés comme des chaînes latérales (vers le bas) du noyau RG-I, alors que les polymères neutres (arabinane, galactane et / ou arabinogalactane) et (le cas échéant) des SG autres que RG-II (par exemple XGA) seraient positionnés en tant que chaînes latérales (vers le haut). Il ne pouvait pas être exclu que certains des groupes de chaînes secondaires latérales puissent être liés aux chaînes principales, donnant ainsi naissance à des groupes ramifiés tels que récemment signalés à partir de diverses pectines. Les points de ramification des chaînes latérales vers le noyau RG-I, ainsi que leur orientation, ne sont pas connus avec certitude, bien que cela puisse être comme indiqué. Deux RG-II distincts les blocs seraient liés aux extrémités réductrices de deux blocs HG distincts et orientés de manière à faciliter la formation de dRG-II-B. (Yapo 2011).

15.1.1 L'Homogalacturonane

Les homogalacturonanes appelés aussi zone lisse représentent 57 à 69 % de la pectine. Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturonique reliés entre eux par des liaisons α -(1-4) et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être partiellement O-méthylées en position C₆ et /ou O-acéthylées en position C₂/ou C₃. (figure 77). Le degré d'estérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction. Les fonctions carboxyles que portent en C₆ les acides galacturoniques, en fait des polyanions et des échangeurs d'ions

pouvant capter des molécules électriquement chargées dans la paroi (Na^+ , K^+ , Ca^{++} ...). En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (Combo, et al. 2011); (Yapo 2011).

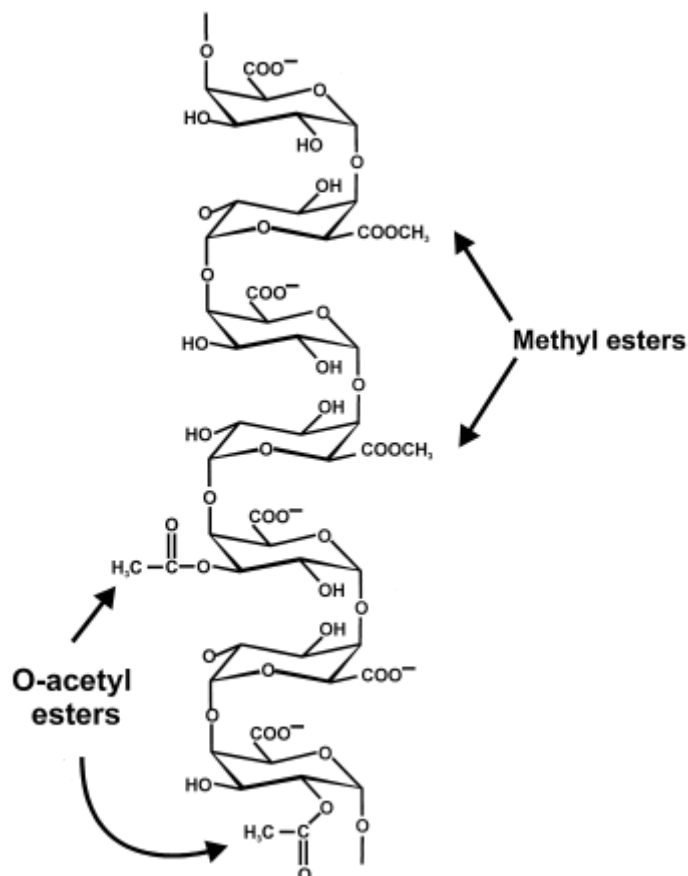


Figure 77. Structure primaire d'un homogalacturonane (Ridley, et al. 2001).

15.1.2 Rhamnogaacturonaes de type I(RGI)

Egalement appelé zone hérissée, le rhamnose fait partie de la chaîne principale, son taux dépend de l'origine de la pectine. Le RG représente environ 7 à 15% de la pectine dans laquelle 20 à 80 % d'unités sont substituées, les RGI ont un degré de polymérisation (DP) d'environ 1000 il a été schématiquement représenté comme étant composé d'une séquence HG d'un DP de 8 en alternance avec le trisaccharide [Rha- (1 → 4) -GalA- (1 → 2) - Rha]. La macromolécule aurait une forme en zigzag d'un angle de 90° de l'axe de la chaîne pectique d'où le nom du coude pectique donné à cette région, du fait de la flexibilité des unités (1 → 2) -Rha dans des unités autrement linéaires (1 → 4)-d-galacturonane et le Rha ont formé un

point de ramification en forme de Y par substitution de la position O-4 par une chaîne latérale de galactane linéaire. (Fig. 78).(Ridley, et al. (2001); Combo, et al. (2011; (Yapo 2011));

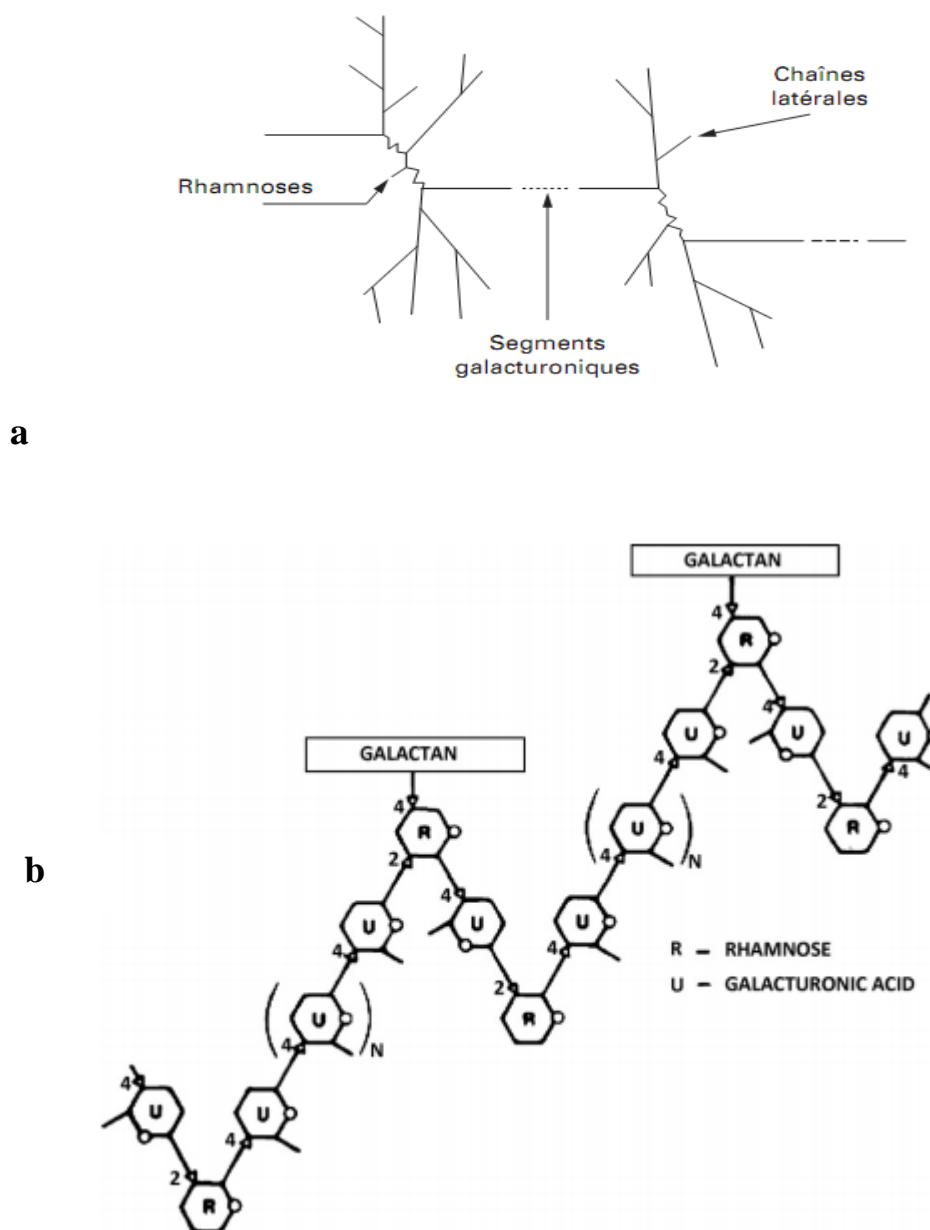


Figure 78. (a): Squelette pectique qui montre le segment RG en zigzag; (b): Une proposition de structure pour le rhamnogalacturonane. les résidus de sucre dans la figure sont désignés comme R= rhamnose et U = galacturonique. N nombre indéterminé, probablement entre 4 et 10. (Yapo 2011).

15.1.3 Rhamnogalacturonane II (RGII).

Le RG-II est un galacturonane substitué qui représente 10 à 11 % de la pectine et dont la structure complexe est très conservée au sein des espèces végétales. Avec un DP d'environ 60 , le RG-II comprend au moins huit résidus d'acides galacturoniques liés en 1-4 constituant la

chaîne principale, sur laquelle sont greffés quatre complexes glycosidiques différents. Ces complexes glycosidiques sont composés d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de fucopyranose, d'apiofuranose et de galactopyranose et d'autres sucres inhabituels tels que le Dha : acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique, le Kdo : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique et l'acide acérique. Il contient également des sucres méthylés rarement observés comme le 2-O-méthylxylose et le 2-O-méthylfucose. Le RG-II se présente principalement sous la forme d'un dimère dans la paroi cellulaire des plantes par l'établissement de liaison covalente de diester de bore. Cette liaison est formée entre le OH-2 et le OH-3 des résidus β -D-apiofuranose de chaque sous-unité monomérique de RG-II. En outre, il a été montré que seul le résidu apiofuranose de chaque chaîne latérale A participe à cette dimérisation). (Ridley, et al. (2001); Combo, et al., (2011) ; Yapo (2011).

15.1.4 Xylogalacturonanes

La chaîne principale est un homogalacturonane tandis que la chaîne latérale est constituée d'une seule unité xylose liée en position O-3 des résidus acide galacturonique (Voragen, et al. 1995) .

15.1.5 Arabinanes

Les arabinanes constituent les chaînes latérales les plus répandues des pectines. Elles présentent une composition glucidique homogène et moins complexe. En effet, elles sont constituées uniquement d'unités α -L-arabinofuranose, liées entre elles par des liaisons α -(1 \rightarrow 5), et qui peuvent être substituées en position O-3 et/ou O-2 par un autre α -L- arabinofuranose (Voragen, et al. 1995).

15.1.6 Galactanes

Les galactanes ne contenant que des résidus galactopyranose sont de loin les plus rares dans le monde végétal ou difficilement extractibles sans dégradation. Il s'agit d'un homopolymère formé d'unités galactopyranose liées β -(1 \rightarrow 4). Ce squelette peut porter un seul résidu galactose en position O-6 (Voragen, et al. 2009).

15.1.7 Arabinogalactanes

Si les galactanes pures sont peu répandues dans la nature, les parois végétales contiennent des galactanes plus au moins ramifiées par des résidus arabinose appelées arabinogalactanes. D'un point de vue structural, on en distingue deux classes. D'une part, les arabinogalactanes de type I, naturellement associées au squelette pectique, notamment aux rhamnogalacturonanes. Elles sont constituées de chaînes linéaires d'unités D-galactopyranose liées β -(1 \rightarrow 4), sur lesquelles sont attachées en position O-3

des unités D-galatopyranose et des unités L-arabinofuranose liées (1→5) (Voragen, et al. 2009)..

Les enzymes dégradants la pectine (Enzymes pectinolytiques).

Les substances pectiques sont omniprésentes dans le règne végétal et leur utilisation efficace pourrait renforcer la compétitivité économique des processus de bio-conversion destinés à concurrencer les processus industriels conventionnels. Par conséquent, de nos jours, un intérêt important pour la dégradation des substances pectiques par les pectinases a été généré (Sharma et al., 2013).

Les pectinases sont un groupe complexe et diversifié d'enzymes impliquées dans la dégradation des substances pectiques. La diversité des formes de substances pectiques dans les cellules végétales explique probablement l'existence de diverses formes de ces enzymes.. Les pectinases agissent comme des agents de recyclage du carbone dans la nature en dégradant les substances pectiques en galacturonanes saturés et insaturés, qui sont ensuite catabolisés en 5-céto-4-désoxy-uronate et enfin au pyruvate et au 3-phosphoglyceraldéhyde. Les pectinases de champignons phytopathogènes tels que *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea* jouent également un rôle essentiel dans la pathogénicité ou la virulence des plantes en dégradant les composés pectiques présents dans la paroi cellulaire. Les pectinases, en particulier la polygalacturonase, jouent un rôle majeur dans la dégradation de la pectine au cours des dernières étapes de la maturation des fruits. La polyméthylgalacturonase (PMG), la polygalacturonase (PG), la pectine lyase (Oshi, et al.), la polygalacturonate lyase (PGL) et la pectinestérase (PME) sont des pectinases d'importance industrielle (Gummadi et al., 2007).

16.1 Mode d'action des pectinases.

Les pectinases sont des glycosides hydrolases (G-H) qui fonctionnent selon deux mécanismes de type acide/base, entraînant une rétention ou une inversion de configuration du carbone anomérique du site d'hydrolyse. Le mécanisme d'inversion se déroule en une seule étape (substitution nucléophile) qui implique la participation d'un acide ou d'une base dans la catalyse avec l'attaque d'une molécule nucléophile, l'eau. Le mécanisme de rétention se déroule en 2 étapes selon un mécanisme de double-déplacement permettant la formation d'un glycoside-enzyme intermédiaire qui est ensuite hydrolysé par l'ion oxocarbone. (Figure 79) (Davies G.J. and B. 2002). La réaction se poursuit par la formation d'un groupe hydroxyle à partir d'une molécule d'eau sur le carbonium et d'un proton sur le nucléophile. (Péreta, 2016).

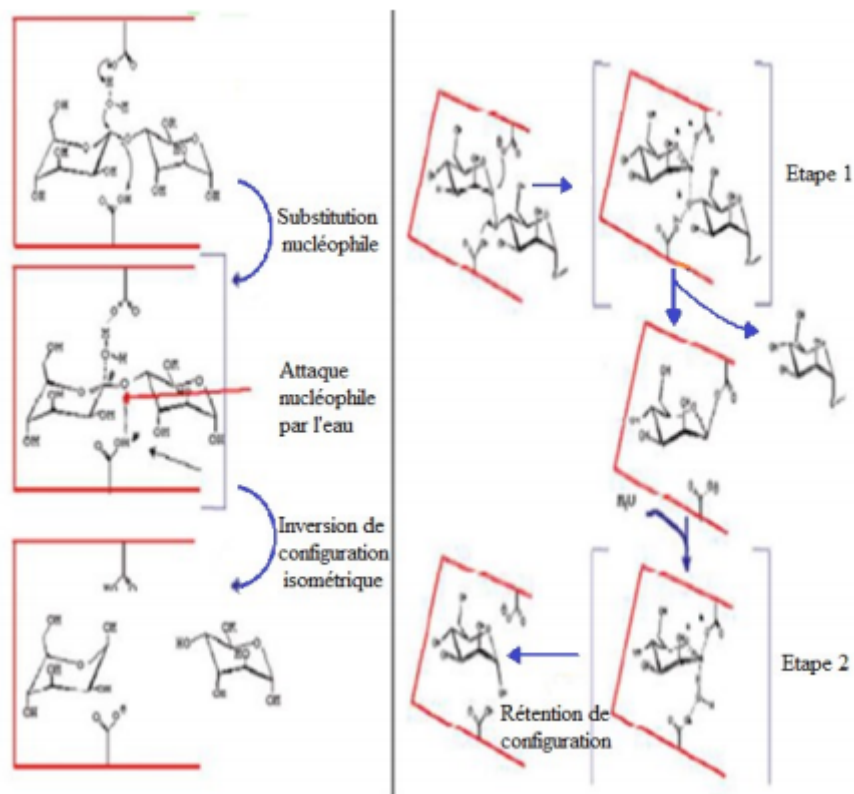


Figure 79. Mécanisme d'inversion et de rétention de configuration obtenus lors de l'hydrolyse des polysaccharides par G-H (Pétera 2016)

Malgré la grande diversité des familles de GH, la topologie de leur site actif peut être classée en trois catégories selon leur forme (sillon, tunnel ou poche). La topologie du site actif reflète le mode d'action d'une enzyme. Au sein d'une même famille de GH, des enzymes peuvent avoir des sites actifs avec des géométries différentes et donc des modes d'action différents. La relation entre la topologie du site actif et le mode d'action des enzymes a été particulièrement étudiée dans le cas des cellulases : (Pétera, 2017)

- **le type «endo»** Ces enzymes hydrolysent de façon aléatoire des liaisons à l'intérieur des chaînes polysaccharidiques, générateur de nouvelles chaînes plus courtes et libéral ainsi de nouvelles extrémités. Le site actif de ces enzymes possède une topologie ouverte plusieurs résidus glucidiques. Une chaîne se positionne dans le sillon du site actif et la liaison Glycosidique est ensuite clivée (figure.80)

- **le type «exo»** Cette théorie est destinée aux enzymes qui évoluent le long de la chaîne glucidique. Ces enzymes hydrolysent de façon progressive les chaînes à partir d'une extrémité, libérant ainsi des mono ou disaccharides. On parle alors de mode d'action de type «exo», ce mécanisme est dit processif. Enfin, certaines enzymes sont capables d'ouvrir leur site temporairement actif pour attaquer de façon «endo» une liaison glycosidique à l'intérieur

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

d'une chaîne, puis de dégrader cette dernière, à partir des extrémités qui vient de générer. Ces enzymes sont appelées endoprocessives.

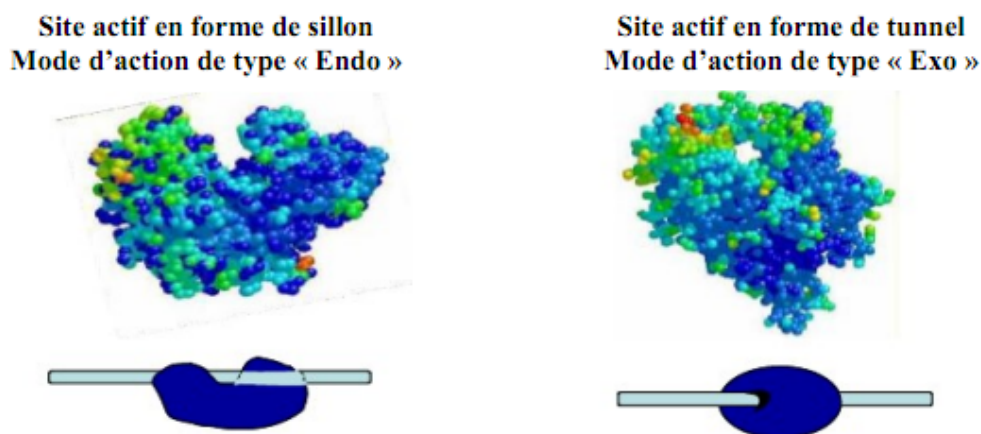


Figure 80. Mode d'action du glucoside hydrolase (Pétera, 2017)

Les pectinases ont été classées de manière générale en acides et en protéines. des groupes alcalins sur la base des exigences de pH pour une activité enzymatique optimale. Les pectinases sont codées par une grande famille multigénique présentant des voies d'expression divergentes avec une spécialisation fonctionnelle. Ces familles multigéniques sont liées en tandem et résultent de la duplication de gènes.

Il a été rapporté que l'acide polygalacturonique et l'acide D-galacturonique induisent l'expression de gènes codant pour la polygalacturonase, la pectine lyase et la pectine méthyl estérase, tandis que le glucose est réputé pour repousser l'expression de ces gènes. La principale protéine répressive catabolite du carbone (Cre A) est la protéine candidate impliquée dans la répression. Des études de détection de protons ont révélé la présence d'une séquence conservée 5'-TYATTGGTG-GAA-3' dans des pectinases impliquées dans l'activation de l'expression génique et l'identification de la séquence CCCTGA chez *Aspergillus niger* (Maldonado and Saad 1998). Le site actif de la pectinase contient les résidus His223 et Asp201. His223 agit comme donneur de protons, tandis que Asp201 agit comme un site nucléophile. Le mécanisme de catalyse de la pectinase commence par la liaison du substrat du côté de la liaison glycosidique sensible via une liaison hydrogène multiple et fournit la déformation et la distorsion appropriées pour localiser les substrats sur le site actif de l'enzyme. His223 transfère un proton à une liaison glycosidique susceptible de se rompre, ce qui entraîne la rupture de la liaison glycosidique libérant le premier produit et une nouvelle liaison covalente se forme entre le substrat et le site actif du nucléophile Asp201,

Chapitre IV. *Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme*

tandis qu'un autre résidu Asp202 localise une molécule d'eau pour une attaque nucléophile afin de libérer le second produit et rétablir le site actif de l'enzyme (Kohli and Gupta 2015).

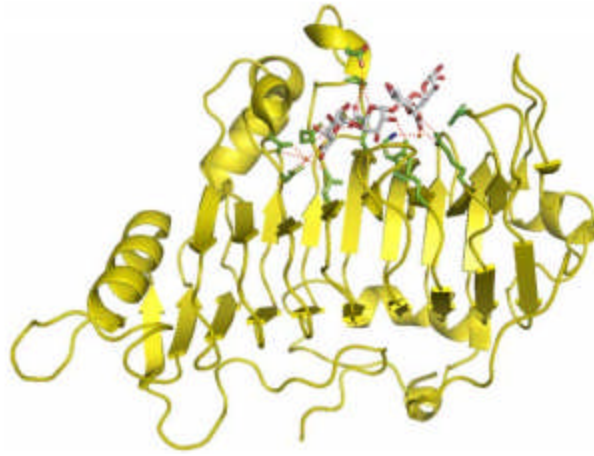


Figure 81. Enzyme pectinolytique en complexe avec PGA (Scavetta, et al. 1999).

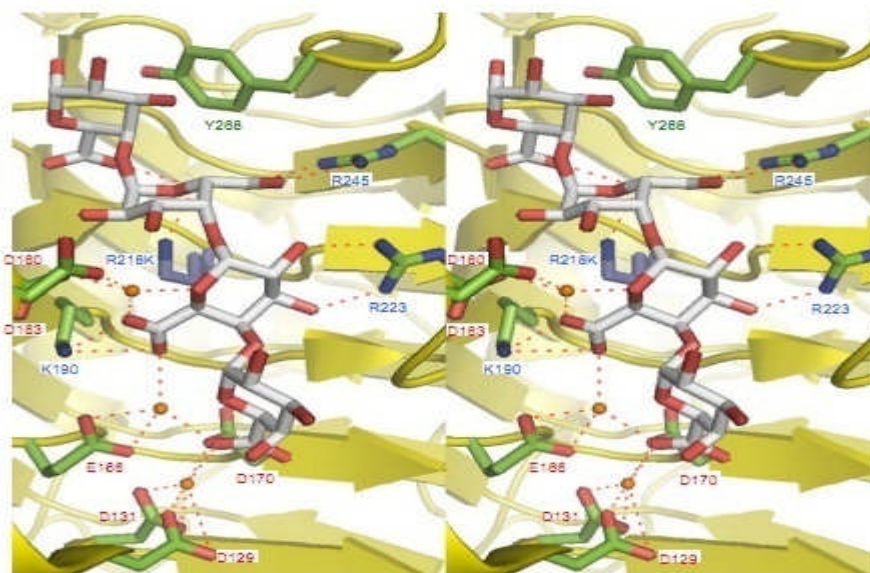


Figure 82. Représentation schématique de la pectate lyase de la famille PL 1, quatre ions calcium sont chélatés dans le site actif et participent à la fixation du substrat (selon Scavetta, et al. (1999).

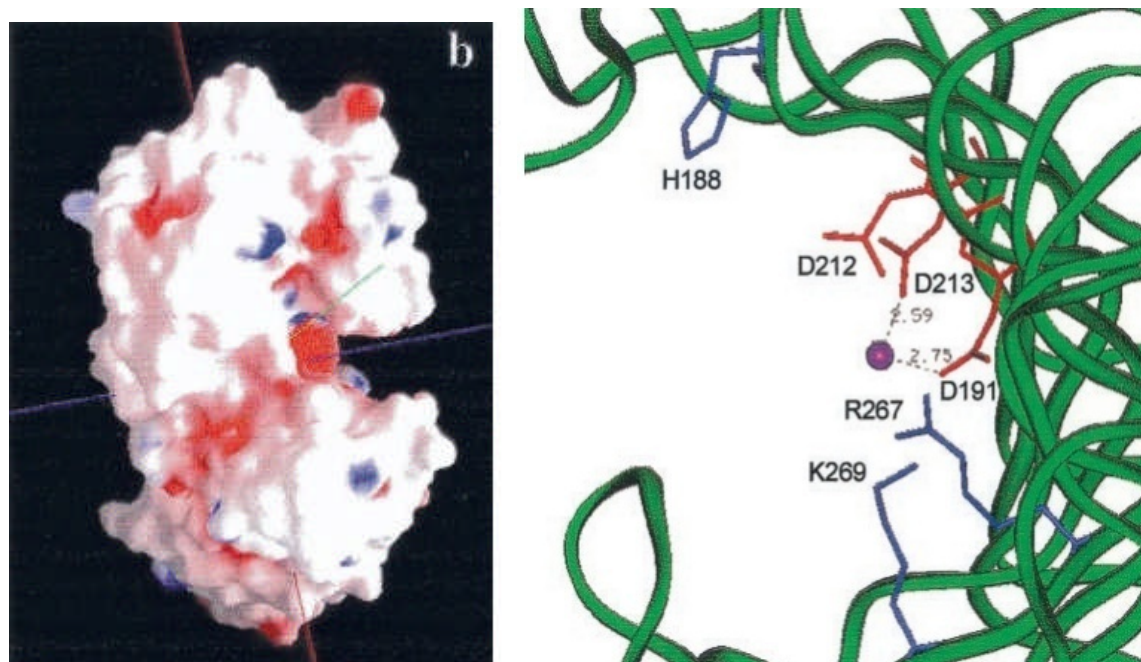


Figure 83. Endopolygalacturonase:

(a) Représentation de la surface potentielle électrostatique. Le modèle est orienté pour mettre en évidence le site actif putatif. Les charges négatives sont indiquées en rouge, les charges positives en bleu. (b) Vue d'ensemble du site actif de PG. Selon la proposition mécanisme d'action, trois acides aspartiques catalysent la réaction; D212 est l'acide général, donnant un proton à l'oxygène glycosydique; D191 et D213 activer une molécule d'eau (représentée en magenta) qui effectue un traitement nucléophile attaque au carbone anomérique. K269 et R267 sont nécessaires pour la liaison du substrat et sont impliqués dans la liaison PGIP-2 avec H188. (Selon Federici, et al. (2001))

16.2 Classification des enzymes pectinolytiques

d'après Combo, et al. (2011) Le terme « enzyme pectolytiques » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectolytiques. Les pectinases sont classées en fonction de leur substrat et de leur mode de réaction enzymatique (Fig. 84). Il existe essentiellement trois types d'enzymes pectiques: la pectinestérase, qui élimine uniquement les résidus méthoxyle de la pectine, une gamme d'enzymes dépolymérisantes (Demir N., et al.), et la protopectinase, qui solubilise la protopectine pour former de la pectine (Tableau 29 de l'annexe 6). Les pectinases se distinguent sous trois rubriques (Commission enzymatique, 1944) selon les critères suivants: Si le substrat préféré est la pectine, l'acide pectique ou l'oligo-D-galacturonate; qu'elles agissent par transélimination ou hydrolyse, et si le clivage est aléatoire (endo, liquéfiant, ou dépolymérisant) ou de bout en bout (enzymes exo- ou saccharifiantes). Les modes d'action des différents types d'enzymes pectiques sont illustrés par la figure 85 et l'annexe 6.

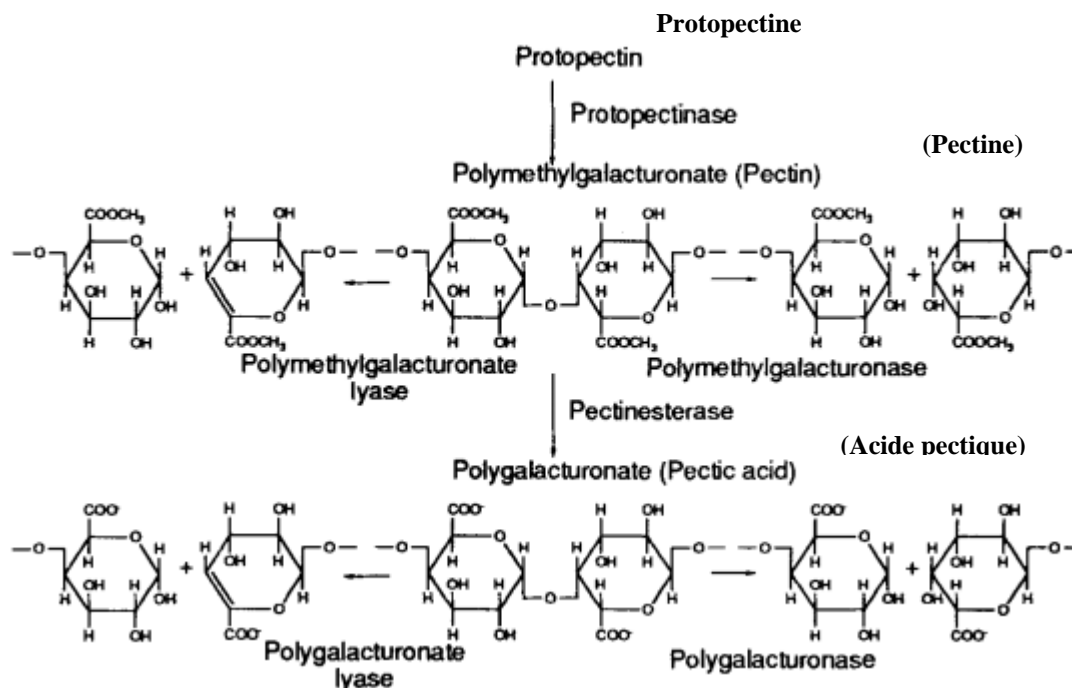


Figure 84. Mode d'action des enzymes pectolytiques

16.2.1 Protopectinases:

Les protopectinases ou pectinosinases (PPase) sont les enzymes qui catalysent la solubilisation de la protopectine pour produire une pectine soluble hautement polymérisée. Sur la base de leur mécanisme de réaction, les protopectinases sont classées en deux types, à savoir le type A et le type B. Une protopectinase de type A réagit avec le site interne, c'est-à-dire la région d'acide polygalacturonique de la protopectine, alors que la protopectinase de type B réagit sur le site externe, c'est-à-dire sur les chaînes polysaccharidiques pouvant relier la chaîne d'acide polygalacturonique et les constituants de la paroi cellulaire (Sakai, et al. 1993).

16.2.2 Enzymes dépolymérisantes:

Ces enzymes rompent les liaisons α -(1,4) dans la chaîne principale de la pectine telle que:

16.2.2.1 Polygalacturonases:

sont les enzymes pectinolytiques qui catalysent le clivage hydrolytique de la chaîne d'acide polygalacturonique avec l'introduction de l'eau sur le pont de l'oxygène. Les PGases impliquées dans l'hydrolyse de substances pectiques sont de deux types, à savoir les endo-polygalacturonases et les exo-polygalacturonases:

- **Endo-PG:** Egalement connue sous le nom de poly (1,4- α -D-galacturonide) glycanohydridine, catalyse l'hydrolyse aléatoire des liaisons α - 1,4-glycosidiques dans l'acide

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

pectique. Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. On apprécie cette activité en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine). La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités « endo » et « exo ». Ainsi, avec une endo-PG, la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues. Avec une exo-PG, le même abaissement de la viscosité n'est observé qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (Sakai et al., 1993 ; Jayani et al., 2005). Les endo-PG sont produites par divers micro-organismes tels que des bactéries, des levures et des moisissures. Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines HM, l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acide galacturoniques non méthylés. Toutefois, lorsque le DM augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai et al., 1993).

- Dans l'attaque sur de simples chaînes ou chaîne unique, une première liaison est hydrolysée au hasard au sein du polymère, puis en glissant le long de la chaîne, l'enzyme l'hydrolyse totalement. Les oligomères de très faible degré de polymérisation (DP) issues des dégradations successives apparaissent dès le début de la réaction. Ce type d'attaque a été observé chez la PG-I d'*Aspergillus aculeatus* (Sakai et al., 1993).

- Dans l'attaque multi chaînes, l'enzyme s'associe au hasard avec le substrat pour former complexe enzyme-substrat (ES). Après la catalyse de la liaison glycosidique, l'enzyme se sépare du polymère et le complexe ES se forme ailleurs indépendamment du premier. Ce mécanisme libère des oligomères de degré de polymérisation (DP) élevé qui seront par la suite dégradés en oligomères de DP de plus en plus faible (Barbier and Thibault 1981).

- Dans l'attaque multiple, les deux précédents mécanismes se combinent pour dégrader les chaînes du polymère les unes après les autres. Le complexe enzyme substrat (ES) se forme au hasard, l'enzyme coupe la liaison et le complexe (ES) se reforme ailleurs sur la même chaîne. Ce mécanisme permet la libération rapide d'oligomères de petits DP; leurs modes d'actions se caractérisent par une chute rapide de la viscosité du substrat en solution. (Barbier and Thibault 1981; Baron and Thibault 1985)

- ***l'exo-PG***: également connue sous le nom de poly (1,4-L' α -D-galacturonide) galacturonohydrolases catalyse l'hydrolyse de manière séquentielle des liaisons α -1,4-

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

glycosidiques sur l'acide pectique (Kashyap, et al. 2001): les polyméthyl-galacturonases (PMGL) catalysent le clivage hydrolytique des liaisons α -1,4-glycosidiques dans le squelette de la pectine, de préférence du 6-méthyl-D-galacturonate formant de la pectine, hautement estérifié (Jayani, et al. 2005). Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. On distingue deux types : les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique. Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action. Les exo PG agissent généralement à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les AGla ne sont pas estérifiés. Leur action le long de la chaîne peut être bloquée par la présence d'un ester méthylique, de résidus de rhamnose ou de chaînes latérales d'oses neutres. (Baron and Thibault 1985)

16.2.2.2 Lyases:

Les lyases ou transéliminases sont les enzymes qui effectuent une décomposition non hydrolytique de pectates ou de pectinates par scission trans-préliminaire (β élimination) du polymère pectique (Sakai et al. 1993; Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005; Pedrolli et al. 2009). Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petites tailles. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur la base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent. Les PGL sont produites par plusieurs bactéries et quelques moisissures pathogènes, en général les endo-PGL se trouvent plus abondantes que les exo-PGL. Les PMGL sont produites par *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli* et *Pichia pinus*. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectolytiques. Les PGL sont activées par les ions Ca^{2+} et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que Mg^{2+} , Co^{2+} et Sr^{2+} . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA. Les PMGL sont par contre actives en l'absence d'ions Ca^{2+} , mais la présence de Ca^{2+} ou celle d'autres cations les stimule. Les PMGL sont les seules dépolymérasés capables de dégrader les pectines HM sans action préalable d'autres enzymes (Jayani et al., 2005). Elles sont classées comme endo-pectate trans- liminase (pectate lyase, PGL) et endo-pectine transiminase (pectine lyase, PL), (Combo 2011):

- **Pectate lyase:** coupe les liaisons glycosidiques de préférence sur l'acide polygalacturonique formant un produit insaturé par réaction de transélimination. Les pectate lyases sont classées comme endo-PGL qui agit de manière aléatoire sur le substrat et exo-PGL qui catalyse le clivage du substrat de l'extrémité non réductrice.
- **Pectine lyase:** catalyse le clivage aléatoire de la pectine, de préférence une pectine fortement estérifiée, produisant des méthyloligogalacturonates insaturés par transélimination des liaisons glycosidiques.

16.2.3 Enzymes déméthoxylantes:

telles que la pectinestérase: la pectinestérase (PE), souvent appelée pectine méthylestérase, pectase, pectine méthoxylase, pectine déméthoxylase et pectolipère est un acide carboxylique estérase et appartient au groupe hydrolase des enzyme. Elle catalyse la désestérification des liaisons ester méthylique du squelette galacturonane des substances pectiques pour libérer les pectines acides et le méthanol (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005; Pedrolli et al. 2009). L'action de la polygalacturonase, de la pectine méthyl esterase et de la pectine lyase conduit à une dégradation importante des pectines de la lamelle moyenne et de la paroi cellulaire, et cette propriété des pectinases les rend utiles dans diverses applications industrielles (Gummadi et al.,2007). L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani et al., 2005). Les PE sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et elles peuvent être extraites de divers fruits tels que la banane, l'orange, la tomate, la papaye et la pomme. Mais elles peuvent être aussi produites par des champignons, des bactéries et des levures. Les PE des végétaux, très spécifiques des esters méthyliques des acides pectiques, sont mieux connues que celles d'origine fongique et bactérienne. Leur pH optimum est compris entre 7 et 8, alors que les PE fongiques et bactériennes sont plus actives à pH 4-5. Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai et al., 1993). Beaucoup de travaux ont été menés sur les propriétés physico-chimiques et cinétiques des PE, cependant leur mode d'action n'est toujours pas bien élucidé. Selon Jayani et al. (2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PE fongiques agissent au hasard suivant un mécanisme « multi-chaîne » par lequel l'enzyme forme un complexe enzyme-substrat, se dissocie après la réaction et

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

s'associe à nouveau avec une autre molécule du substrat pour enlever les groupes méthyles. En revanche, les PE des végétaux tendent à agir à l'extrémité non réductrice ou à côté d'un groupe carboxyle libre le long de la molécule par un mécanisme « unichaine » où le substrat est progressivement déméthylé jusqu'à ce que l'enzyme atteigne l'extrémité de la chaîne ou un résidu qui bloque sa progression pour se dissocier du complexe enzyme-substrat. Un troisième mode d'action a été évoqué : il s'agit d'un mécanisme d'attaque multiple qui est un mécanisme intermédiaire aux deux premiers. Dans ce cas, l'enzyme catalyse la transformation d'un nombre moyen de résidus pour chaque complexe enzyme-substrat formé. La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations (Ca^{2+} , Na^+) pourrait contrecarrer cette inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai et al., 1993).

16.2.4 Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques

L'amélioration des connaissances sur les différences structurales entre la chaîne principale des régions « lisses » et « hérissées » de la pectine a permis de découvrir de nouvelles enzymes impliquées dans la dégradation des chaînes latérales des substances pectiques. Ces enzymes purifiées ont également acquis une importance en tant qu'outils analytiques dans les études structurales en raison de leur grande spécificité. Une série d'enzymes, toutes hautement spécifiques pour la région « hérissée » de la pectine, a été purifiée et caractérisée. Parmi ces enzymes, il y a lieu de citer les rhamnogalacturonases, les arabinanases et les galactanases. (Combo et al, 2015)

- **Rhamnogalacturonases:** La rhamnogalacturonase isolée à partir d'*Aspergillus aculeatus* est spécifique du squelette rhamnogalacturonique au niveau de départ des zones « hérissées » où il existe une alternance d'unités rhamnosés et galacturoniques. Deux endo-rhamnogalacturonases (RhgA, RGase A) et deux exo-rhamnogalacturonases (RG-rhamnhydrolase, RG-galacturonohydrolase) ont été isolées chez cette moisissure. Ces enzymes sont freinées dans leur action par la présence de groupements acétyles (Combo et al., 2011). Les produits libérés par cette enzyme sont des oligomères linéaires composés d'une alternance de rhamnose et d'acide galacturonique (4 à 6 résidus) avec des résidus galactoses connectés à certains ou à tous les résidus rhamnose (Schols H.A., et al. 1995).

- **Arabinanases:** Les arabinanases sont des enzymes capables d'hydrolyser les arabinanes, mais aussi les chaînes latérales d'arabinose présentes dans les arabinoxyanes et les arabinogalactanes. Dans la nature, différents micro-organismes secrètent des endo-arabinanases (EC 3.2.1.99) et des arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) pour la dégradation des polysaccharides contenant l'arabinose. Cependant, la plupart des préparations enzymatiques commerciales contenant des activités arabinanases sont obtenues à partir des moisissures, comme par exemple *Aspergillus niger*. Cette moisissure secrète deux arabinofuranosidases (AbfA et AbfB) et une endo-arabinanase. L'arabinofuranosidase de type A agit seulement sur les petites chaînes de résidus arabinose liés par des liaisons α -(1-5), tandis que le type B hydrolyse les liaisons α -(1-5), α -(1-3) et α -(1-2) des résidus arabinoses. À la différence de certaines arabinofuranosidases, l'arabinofuranohydrolase d'*Aspergillus awamori* est incapable de libérer l'arabinose de la pectine, mais est fortement spécifique des résidus d'arabinose liés au xylane. L'endo-arabinanase agit au hasard sur les liaisons α -(1-5) des polysaccharides d'arabinane qui sont présents dans les chaînes latérales de la pectine. Cette enzyme augmente fortement l'efficacité de la dégradation des arabinanes et influence l'action des arabinofuranosidases. Jusqu'ici, seulement une exoarabinanase a été purifiée d'*Aspergillus*. Cette enzyme libère principalement de l'arabinobiose et peu d'arabinotriose (Combo et al.2001).

- **Galactanase:** Les galactanases sont impliquées dans la dégradation des polysaccharides des plantes en général et des pectines en particulier. Deux types de chaînes arabinogalactanes sont présents dans la pectine. Le type I se compose d'unités galactose liées par des liaisons β -(1-4), alors que le type II contient des résidus galactose liés par des liaisons β -(1-3) qui peuvent être substitués avec des résidus galactose en β -(1-6). De plus, les deux types d'arabinogalactanes peuvent être substitués avec une chaîne d'arabinofuranose en α -(1-3). Parallèlement aux deux types d'arabinogalactanes, il existe deux types de galactanases : les endo- β -1,4-galactanases et les exo- β -1,3-galactanases. La différence entre ces enzymes réside dans leur capacité à hydrolyser les liaisons β -(1-3), β -(1-4) ou β -(1-6) entre les résidus de galactose. Les endo- β -1,4-galactanases sont actives sur les galactanes et les arabinogalactanes de type I, libérant ainsi des galacto-oligosaccharides. Les endo- β -1,4-galactanases bactériennes libèrent principalement du galactotriose et du galactotétraose, bien que certaines libèrent aussi du galactobiose . Les exo- β -1,3-galactanases sont actives sur les arabinogalactanes de type II où elles hydrolysent spécifiquement les liaisons β -(1-3)

(Combo et al. 2001).

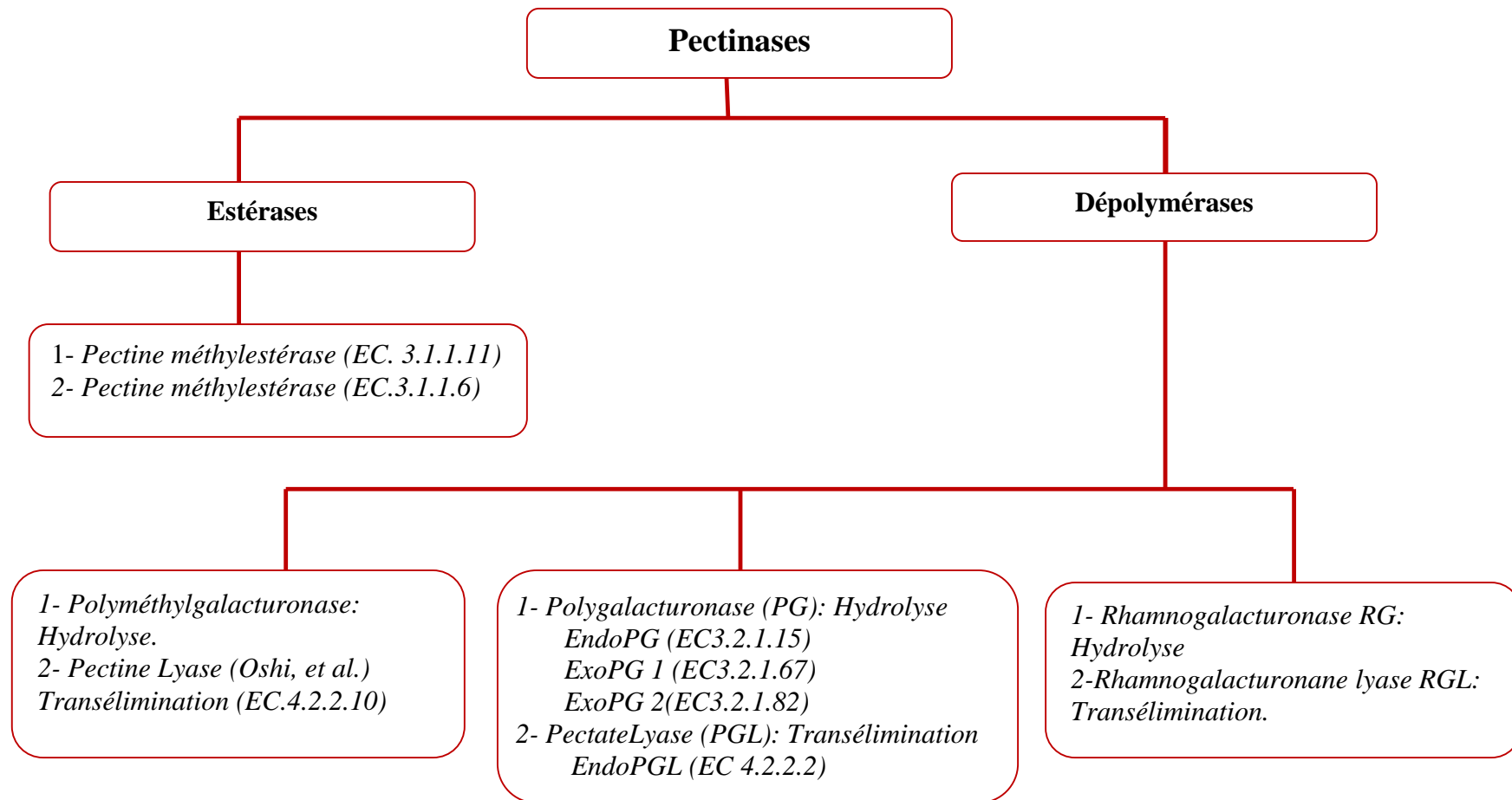


Figure 85. Classification des pectinases basée sur leurs réactions avec les différentes substances pectiques (Sakai, et al. 1993).

16.3 Application des enzymes pectinolytiques

L'application commerciale des pectinases a été observée pour la première fois en 1930 par Kertesz lors de la clarification d'un jus de pomme (Kertesz 1930). De nos jours plusieurs sociétés à travers le monde produisent les pectinases. Les pectinases microbiennes sont des hydrolases qui représentent 25% des ventes mondiales d'enzymes alimentaires (Sharma, et al. 2012). La production d'enzymes pectinolytiques occupe 10% des manufactures de production d'enzymes, les préparations d'enzymes pectinolytiques les plus connues sont celles produites par voie microbienne d'*Aspergillus niger* et *awamori* (De Gregorio, et al. 2002). dans le tableau 30 on trouve quelques enzymes pectonlytiques du commerce.

Tableau 29. Liste des sociétés produisant des pectinases commerciales (données modifiées de Kashyap, et al. (2001))

Nom commercial du produit	Fabricant
Pectinase	Biocon Pvt Ltd, Inde
Pectolase	Grinsteelvaeket, Danemark
Pectinase Mash	Novozyme, Danemark
Ultazyme	Ciba-Geigy A.G., Suisse
Klerzyme	Clarizyme Wallerstein, Co., Etats -Unis
MaxLiq	Danisco, Denmark
Scfase	Kikkoman Shoyu, Co., Japan
Pectinex	Schweizerische Ferment, A.G., Suisse
Pectinex Ultra SP-L et Pectinex CLEAR	Novo Nordisk Ferment Ltd., Suisse
Pectinol	Rohm, GmbH, Allemagne de l'Ouest
Ly Pecllyve PR	Lyven, France
Panzym	C.H. Boehringer Sohn, Allemagne de l'Ouest
Rapidase	Societe Rapidase, S.A., France
Food Grade Pectinase	Unikbio Biotech Ltd., Chine
Solpect L 60	Varuna Biocell Pvt. Ltd., Inde

Les enzymes pectolytiques présentent un outil écologique de la nature qui sont largement utilisées dans divers domaines, de plus la catalyse enzymatique est préférée aux autres méthodes chimiques, car elle est plus spécifique, moins agressive et économise de l'énergie (Garg, et al. 2016).

Les pectinases acides sont principalement produites par les moisissures en particulier *Aspergillus niger*, elles sont utilisées dans le traitement enzymatique des fruits comme la macération pour produire les purées, et dans l'extraction et la clarification des jus de fruits. Les pectinases alcalines sont généralement produites par des bactéries, en particulier des espèces de *Bacillus*, mais sont également produites par certains champignons filamenteux et levures; elles peuvent être utilisées dans les prétraitements des eaux usées provenant du

Chapitre IV. *Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme*

traitement des légumes qui contiennent des résidus de pectine; dans le traitement de fibres textiles telles que le lin, le jute et le chanvre, dans la fermentation du café et du thé, l'extraction d'huile végétale et le blanchiment de la pâte à papier et le recyclage de vieux papier.(Kohli and Gupta 2015; Pedrolli and Carmona 2009);.

16.4 Rôle des pectinases dans la production du jus de fruit des fruits.

Les jus d'une grande variété des fruits tels que pomme, poire, prune, mangue, banane, raisin, abricot, orange, goyave, papaye, fraise, framboise et mûre peuvent être extraits pour produire des boissons naturelles. Cependant, comme il a été déjà décrit la paroi des cellules du fruit est une structure complexe de polymères entrelacés composée de faisceaux de microfibrilles de cellulose cristallines noyées dans un gel aqueux d'hémicellulose et de pectine. En conséquence, l'utilisation de pectinases, de cellulases et d'hémicellulases (collectivement appelées enzymes de macération) a été jugée utile pour la l'extraction et la clarification des jus de fruits et de jus de légumes.

Les pectinases dégradent la pectine et d'autres composants de poids moléculaire élevé dans la paroi cellulaire, entraînant une augmentation du rendement en jus et une diminution de la viscosité, donnant ainsi un aspect cristallin au produit final avec une réduction du temps de filtration allant jusqu'à 50%. (Sharma, et al. 2013)

En effet les matières pectiques représentent environ $0,5 \pm 4\%$ du poids de la matière fraîche. Lorsque le tissu est broyé, la pectine se trouve dans la phase liquide (pectine soluble), ce qui provoque une augmentation de la viscosité et des particules de pulpe, tandis que les autres molécules de pectine restent liées à la cellulose au moyen de chaînes latérales d'hémicellulose, facilitant ainsi rétention d'eau. Le broyage mécanique des fruits riches en pectine donne un jus de fruit de haute viscosité, qui reste lié à la pulpe sous la forme d'une masse. Il est difficile d'extraire ce jus en pressant ou en utilisant d'autres méthodes mécaniques. Avec l'ajout de pectinases, la viscosité du jus de fruit diminue, la capacité de compression de la pulpe s'améliore, la structure de la gelée se désintègre et le jus de fruit est facilement obtenu et avec des rendements plus élevés (Kashyap et al.2001)

Le jus de presse brut est riche en particules insolubles, composées principalement de substances pectiques. Ces particules sont appelées "particules nuageuses" qui forment le trouble dans le jus. Dans ces particules, un noyau de protéine avec une charge de surface positive est recouvert de molécules de pectine chargées négativement. Cette charge négative amène les molécules de pectine à se repousser (figure 86) . Les pectinases dégradent cette pectine et exposent une partie de la protéine chargée positivement dessous, réduisant ainsi la

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

répulsion électrostatique entre les particules du nuage, ce qui provoque l'agrégation de ces particules en particules plus grosses. Ces particules plus grosses finissent par se déposer, mais pour améliorer le processus, il est possible d'ajouter des agents de gonflement tels que la gélatine, le tanin ou la bentonite (un type d'argile). Les levures et autres microbes, qui pourraient avoir contaminé le jus, sont également précipités par la cuisson. Ce qui reste est un jus transparent mais nullement clair. Une seconde centrifugation et une filtration ultérieure sont nécessaires pour obtenir le jus limpide que beaucoup de consommateurs préfèrent. (Kashyap, et al. 2001).

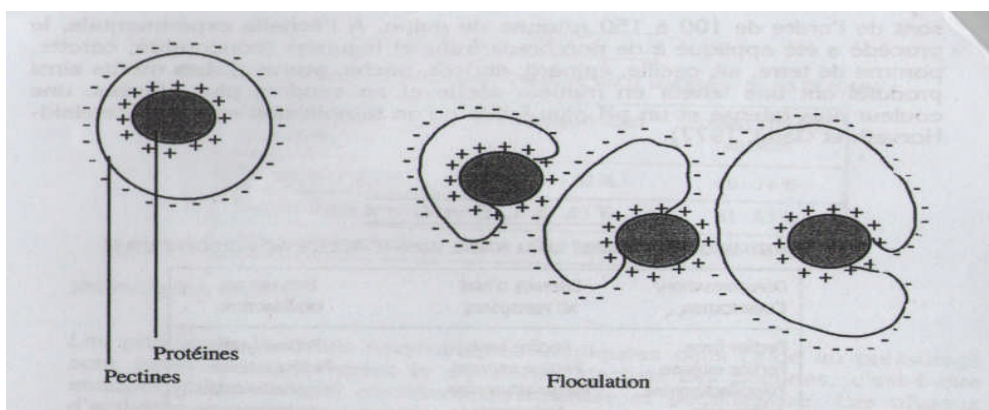


Figure 86. Mécanisme de dégradation enzymatique d'un trouble pectique

Pour l'extraction des jus, il est nécessaire d'agir en amont du pressurage par des actions physiques et/ou enzymatiques afin d'augmenter le rendement en facilitant l'extraction par une déstructuration maximale du fruit, et/ou en aval pour supprimer le trouble et obtenir des jus clarifiés. Le traitement industriel du jus de fruits avec les pectinases est décrit dans le diagramme de la figure 87, il comprend les étapes suivantes:

a) L'épluchage: c'est la première étape du traitement des fruits et des légumes pour l'extraction du jus. Les méthodes conventionnelles de pelage (chimique, mécanique, à la vapeur et à froid) entraînent de fortes pertes de pelage et endommagent la chair, nuisant ainsi à la qualité du fruit. L'épluchage enzymatique est donc une alternative plus récente (Pagan A., et al. 2006) Les principaux avantages de l'épluchage enzymatique sont la bonne qualité du produit fini, et la réduction des déchets industriels.

Toker et Bayindirli (2003) ont utilisé des enzymes commerciales (enzyme concentrée avec les activités pectinase, hémicellulase et cellulase) pour l'épluchage enzymatique des abricots, des nectarines et des pêches (fruits à noyau), ils ont observé que l'épluchage enzymatique réussissait à des températures modérément élevées, concluant que cette technique pourrait être une alternative au pelage mécanique ou chimique des fruits à noyau. De même, Pagan et ses

collaborateurs (2006) ont optimisé les conditions de température et de concentration de la préparation enzymatique (polygalacturonases, hémicellulases et arabinases) pour le pelage des oranges ils ont conclu qu' en traitant le fruit avec une concentration de pectinase de 5,0 ml par

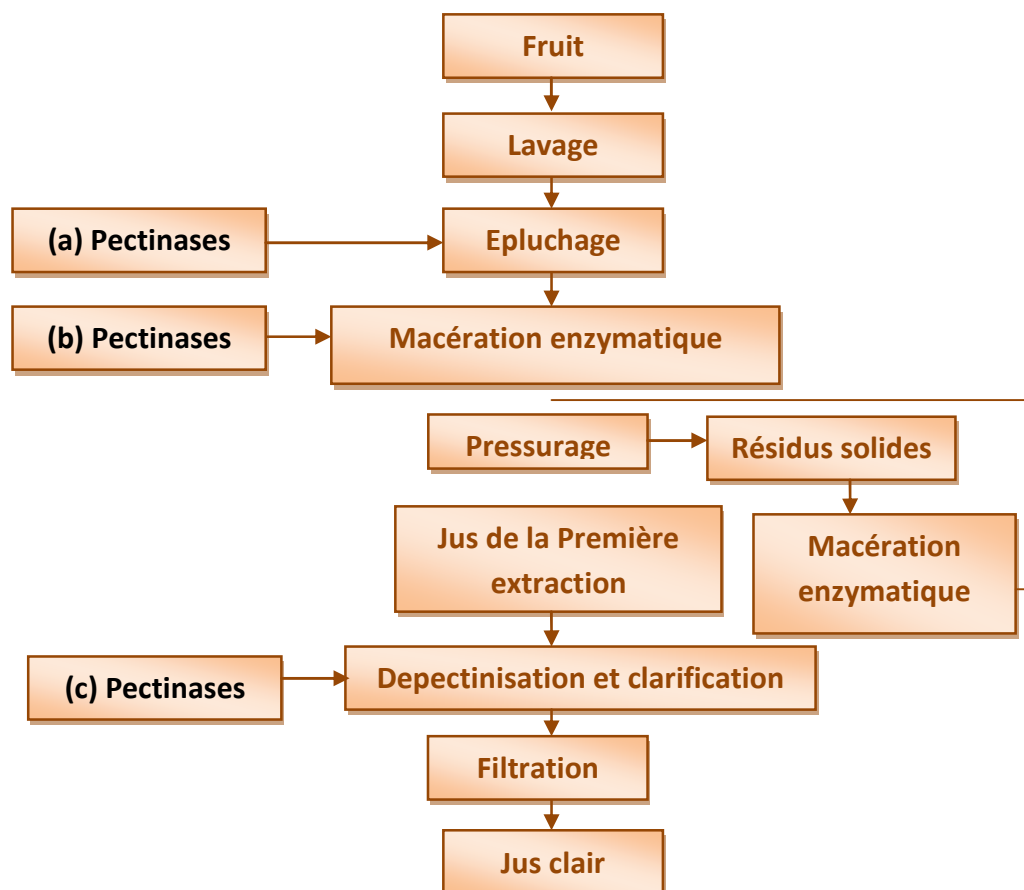


Figure 87. Illustration des différentes étapes du traitement enzymatique du jus de fruit

30 g pour 28 min à 40,4 ° C, on peut entraîner une perte maximale du poids, indiquant une bonne efficacité du pelage. Dans un autre rapport, Pretel et son groupe ont observé qu'il est possible de peler différentes variétés d'orange avec des pectinases à 40 ° C. (Pretel M.T., et al. 2007b; Pretel M.T., et al. 2007a)

b. Macération enzymatique:

Dans le processus d'extraction du jus, les pectinases peuvent être utilisées pour obtenir un rendement plus élevé en sucre et en solides solubles, ce qui entraîne un rendement en jus plus élevé (Ribiero D.S., et al. 2010). La corrélation entre la dégradation des pectines et le rendement en jus a été établie par Shalom Tyagi et al. (Singh, et al.) dans la liquéfaction des jus de prunes. Dans la production du raisin blanc et du jus de raisin rouge, les pectinases jouent un rôle important dans la dépectinisation pour augmenter le rendement en jus avec l'extraction la

Chapitre IV. *Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme*

plus élevée du pigment naturellement présent dans le raisin. A ce propos, le traitement aux pectinases augmente également le contenu phénolique et antioxydant des jus de fruits dont les avantages potentiels pour la santé humaine ont été reconnus ces dernières années (Sharma et al. 2013). Landbo and Meyer (2004) ont indiqué que l'utilisation d'enzymes pectinolytiques améliorait le rendement, le taux d'anthocyanes, le taux total de composés phénoliques ainsi que la limpidité du jus de cassis. Dans un autre rapport, Markowski et ses coauteurs (2009) ont appliqué deux enzymes pectinolytiques du commerce au traitement du jus de pomme et ont constaté une augmentation de la teneur en composés phénoliques. Ces composants phénoliques jouent un rôle contributif important en tant qu'antioxydant, ce qui est important pour le maintien de la santé et la protection contre les maladies coronariennes et certains cancers (Miller and Rice-Evans 1997). La teneur en composés phénoliques était supérieure jusqu'à 15% dans les échantillons traités aux enzymes, ce qui suggère que la boisson au fruit traité par l'enzyme est riche en capacité antioxydante par rapport à la boisson produite sans traitement enzymatique (Aliaa, et al. 2010).

En général, plus de 95% des solides solubles du fruit peuvent être extraits par traitement enzymatique qui, autrement, causerait un trouble. En réduisant la viscosité de la purée de fruits et en améliorant la séparation solide / liquide, les pectinases augmentent également l'extraction de la couleur et le volume du jus (Rashmi R., et al. 2008). De plus, la macération enzymatique entraîne également des modifications subtiles mais généralement bénéfiques du goût des jus de fruits. Demir N., et al. (2001) ont observé que le traitement à la pectinase de la purée de carottes diminuait sa viscosité 90 à 6,5 poises, alors que la teneur en matière sèche et le rendement total ont été augmentés en raison de la dégradation des polysaccharides. Dans la production de raisin blanc et de jus de raisin rouge, les pectinases jouent un rôle important dans la dépectinisation pour augmenter le rendement en jus. Dzagbe and Djokoto (2006) ont traité 200 g de purée de papaye avec différentes doses d'extrait d'enzyme pectique et ont observé une augmentation rapide du débit du jus en vrac. De manière intéressante, Oliviera et ses co-auteurs (2006) ont observé que la transformation du jus de pomme par liquéfaction enzymatique donnait 83,5% de sucres avec 16,5% de grignons tandis que le traitement par pressage donnait un rendement de 64,5% de sucres avec 35,5% de grignons, démontrant ainsi que le processus de liquéfaction enzymatique présente un avantage pratique par rapport au processus d'extraction en pressant en minimisant la production de marc, le principal facteur qui explique la rétention d'eau élevée dans les systèmes d'extraction classiques, fournissant ainsi une technologie propre pour le traitement du jus de pomme. Dans un autre rapport, Lieu

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

et Le (2010) ont observé que le traitement enzymatique après traitement au sonication du moût de raisin le rendement d'extraction augmentait de 7,3% et le temps de traitement réduisait quatre fois. De même, plusieurs rapports font état d'une récupération et d'une clarification améliorées des jus de dattes, de pêches, de prunes, d'abricots et d'ananas (Abbes, et al. 2011; Oshi, et al. 2011; Tran P.P.T. and V.V.M. 2011).

Soares et ses collègues (2001) ont signalé que le traitement par les pectinases améliorait considérablement le rendement en jus de fruits (poire, goyave, banane, papaye) et de légumes (carotte, betterave) et que le matériel végétal était pressé plus facilement que le témoin, ainsi, le poids sec résiduel de résidus solides a diminué entre 5 et 64% . Le rendement obtenu à partir des carottes broyées traitées avec une solution d'enzyme de souches de *Bacillus Ar1.2*, *Ega16* et *Ega22* était de 40 à 50 ml de jus pour 100 g de matière, soit deux fois plus que le contrôle (20 ml / 100 g).

Selon Brown et Ough (1981), les pectinases utilisées dans la macération du jus de raisin ont augmenté la clarté et ont facilité la filtrabilité du jus de 100%. Yusof and Ibrahim (1994) ont constaté que plus la quantité d'enzyme utilisée était grande et plus la durée d'incubation est longue, plus le rendement en jus était élevé. Ils ont constaté une augmentation de 41% de jus avec un traitement enzymatique par rapport à l'échantillon de corossol non traité. Selon Gailing, et al. (2000), le traitement de la pulpe de fruit avec une pectinase a également montré une augmentation du volume de jus de fruit de banane, de raisin et de pomme. Shah (2007) a traité de la pulpe de litchi avec divers niveaux de concentration de enzymes hydrolytiques à savoir. pectinase (0-0,133% p / p), cellulase (0-0,266% p / p) et hémicellulase (0-0,20% p / p) pour différentes durées (30 à 150 min) à 45 ° C. Ils ont constaté que les conditions optimales de traitement enzymatique de la pulpe à 0,076% (p / p) de pectinase, à 0,138% (p / p) de cellulase, à 0,107% (p / p) et à l'hémicellulase à un temps d'incubation de 106,5 min permettaient d'améliorer le rendement maximal.

Tochi, et al. (2009) ont étudié deux préparations enzymatiques commerciales (provenant d'*Aspergillus niger*), une pectinase et une pectinase liquide / hémicellulases ou en combinaison à un taux de 0,03% (p / p) dans l'extraction du jus d'ananas à 35, 37,5 et 40 ° C pendant 30 min. ils ont enregistré le pourcentage le plus élevé de récupération de jus de 94,93 ± 1,466 dans un mélange combiné des deux enzymes à une température de 40 ° C contre une valeur de contrôle de 69,89 ± 1,628. Oszmianski, et al. (2009) ont étudié l'effet du traitement enzymatique de purée de pommes sur le rendement en jus, ils ont indiqué que le rendement en

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

jus obtenu par traitement enzymatique de pommes variait de 92,3 à 95,3% et qu'il augmentait de manière significative par rapport au témoin sans traitement enzymatique.

Srivastava and Tyagi (2013) lors de leur enquête sur l'effet de l'hydrolyse enzymatique sur le rendement en jus de la pulpe de pomme (*Malus domestica*), ont indiqué que le volume maximal de 23,7 ml avait été obtenu par l'association de pectinase et d'amylase et que l'activité maximale de la pectinase avait amélioré le rendement en jus de pomme jusqu'à 34 ml / 50 g et 25 ml / 50 g à pH 5,5 et à une température (45-50 ° C) respectivement. L'ajout de l'amylase permet de dégrader l'amidon qui peut contribuer à la formation du trouble dans le jus issus des pomme non mures; ces derniers peuvent contenir jusqu'à 15% d'amidon qui peut être décomposé en utilisant une amylase (à proprement parler, une amyloglucosidase) active au pH du jus de pomme, ajouté en même temps que les pectinases (Kashyap et al. 2001).

Robin, et al. (2013) ont étudié l'effet de la température d'incubation (35–55 ° C) et du temps d'incubation (210-540 min), de la concentration en cellulase (6–15 mg / 50g de pulpe de prune) et la concentration en pectinase (de 1-2,5 mg / 50g de pulpe) sur le rendement en jus, la viscosité et la limpidité du jus. Ils ont signalé que le rendement maximum en jus (85,5%) avait été obtenu à la température d'incubation de 45 ° C, la durée d'incubation de 375 min, la concentration de cellulase était de 10,5 mg / 50g et la concentration était de pectinase de 3,25 mg / 50g, ce qui avait augmenté le rendement en jus jusqu'à 21,4% au maximum par rapport au pruneau non traité par les enzymes. Bhardwaj and Garg (2014) dans leur enquête sur la production et la purification de pectinase à partir de *Bacillus sp. MBRL576* et son application à l'extraction de jus ont indiqué que la pulpe de pomme, de banane et de carotte traitée avec de la pectinase de *Bacillus sp. MBRL576* a montré de meilleures caractéristiques de pressage et de rendement en jus qui était supérieur à 133%. Les jus obtenus par traitement enzymatique avaient une viscosité inférieure à celle des jus non traités, probablement en raison de la réduction de la teneur en pectine. Ahmed B., et al. (2014), au cours de leur étude, ont ajouté des pectinases à différentes concentrations (500, 1 000 et 1 500 mg.kg⁻¹) au fruit de goyave, du jacquier et pomme; ils les ont incubé pendant 1,5, 2,0 et 2,5 h dans un agitateur témoin à 150 tr / min et à une température de 50 ° C. Comme résultat, ils ont signalé l'augmentation du taux d'extraction et le rendement dans les trois fruits.

c) Clarification:

Dans les jus troubles, il est nécessaire que le trouble ou l'opalescence reste homogène pour préserver les qualités organoleptiques de ce type de jus, comme la couleur et la sensation du jus en bouche. Le trouble est attribué à une suspension de particules composée de pectines,

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

protéines, lipides, hémicellulose, cellulose et d'autres composants mineurs. L'accident le plus fréquemment observé dans les jus de fruits naturellement troubles est leur clarification spontanée au cours du stockage. Sous l'action de la PME endogène, les pectines solubles gélifient sous formes de pectinates de calcium emprisonnant les particules en suspension. Puis le gel se rétracte par synérèse laissant exsuder un sérum limpide donnant un aspect biphasique au jus (figure 88). La clarification sera achevée lorsque les pectines ont atteint un degré de méthylation proche à 40% pour les jus de pomme (Jeantet, et al. 2007).



Figure 88. Déstabilisation du jus trouble

Le trouble causé par la présence des pectines dans le jus de fruits est l'un des problèmes majeures rencontrés dans l'industrie des boissons. Le traitement enzymatique pour dégrader les particules qui constituent le trouble, conduit à augmenter la limpidité du jus (Albagnac, et al. 2002). L'augmentation de la concentration enzymatique augmente le taux de clarification en exposant une partie de la protéine chargée positivement en dessous. Cela provoque une réduction de la répulsion électrostatique entre les particules du nuage, ce qui amène ces particules à s'agréger en particules les plus grosses et à se déposer (Sin H., et al. 2006)..

Plusieurs auteurs ont utilisé avec succès des enzymes pectinolytiques pour la clarification des jus de fruits.(Yannan, et al. 2012) au cours de leur étude sur la production de pectinase à partir de zeste de mangue utilisant *Aspergillus foetidus* et son application à la transformation du jus de mangue ont observé une clarification maximale d'environ ($92,5 \pm 0,26\%$) à une température d'environ 40°C et 150 minutes d'incubation sur de la pulpe de mangue .

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

Singh, et al. (2003) ont clarifié le jus de pomme en utilisant une enzyme pectinolytique et de la gélatine. Lee et ses collaborateurs (2006) ont optimisé les conditions pour la clarification enzymatique du jus de banane et ont amélioré la clarté (viscosité et turbidité réduites) du jus traité aux enzymes. Sin et son équipe (2006) ont utilisé l'enzyme pectolytiques pour clarifier le jus de sapodille et ont recommandé une concentrations enzymatique optimale de 0,1% à 40 ° C pendant 120 min pour une clarification efficace. Dans un autre rapport, Rai et ses collaborateurs (2007) ont étudié l'effet de diverses méthodes de prétraitement sur la clarification du jus de mosambi et ont observé que le flux maximum du perméat lors de l'ultrafiltration était observé avec un traitement enzymatique suivi d'une adsorption à l'aide de la bentonite. De même, Kareem S.O. and A.A. (2007) ont clarifié le jus d'orange à l'aide de pectinase fongique brute et ont obtenu une réduction de 51% de la viscosité du jus traité avec un rendement de 97% par rapport au rendement de 73% du jus non traité. Liew Abdullah et son groupe (2014) ont établi les conditions optimales pour le traitement enzymatique du jus de fruit de carambole et ont signalé qu'une concentration d'enzyme de 0,1% à 30 ° C pendant 20 min donnait la plus grande clarté du jus par rapport au témoin. Pinelo et ses co-auteurs (2010) ont conclu que la pectine contribue au développement de la turbidité lors du stockage à froid du jus de cerise. Ainsi, l'utilisation de pectinases aidera à augmenter la clarté du jus de cerise. Vijayanand et son groupe (2010) ont optimisé la clarification de la pulpe de litchi avec différentes doses de pectinase. L'enzyme a facilité l'élimination des solides insolubles et a augmenté l'extraction du jus. Une augmentation d'environ 25% dans la récupération du jus d'ananas a été obtenue lorsqu'un mélange de deux enzymes du commerce, la pectinase et l'hémicellulase, était utilisé à une température d'extraction de 40 ° C contre un contrôle (Tochi, et al. 2009). Nakkeeran et ses coauteurs ont utilisé la polygalcalononase produite à partir d'*Aspergillus carbonarius* pour l'extraction et la clarification du jus de pomme, ils ont obtenu de meilleurs rendements et clarté (diminution de la viscosité) dans le jus traité par voie enzymatique que du jus non traité (Nakkeeran, et al. 2011). Yuan et ses collègues (2011) ont montré que l'addition d'endo-PG 1 de *Penicillium sp.* et une pectate lyase commerciale ont augmenté l'efficacité de la clarification du jus en réduisant la viscosité intrinsèque du jus de pomme de 33,1% (Yuan P., et al. 2011). Dans un autre rapport, Diaz et son groupe ont utilisé l'exo-polygalacturonase pour clarifier le moût de raisin tel qu'ils ont réussi à réduire la turbidité de 97,5% (2011). Une amélioration significative des scores de couleur et de clarté des jus de prune, de pêche, de poire et d'abricot a été obtenue avec la pectinase d'*A. niger* (Oshi, et al. 2011). Sandri et ses collaborateurs (2011) ont utilisé des pectinases fongiques

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

pour clarifier les jus de pomme, de palmier butia, de myrtille et de raisin et ont obtenu une meilleure clarification du jus traité aux enzymes que du jus non traité.

Saranraj P., et al. (2014) ont rapporté que des niveaux de pectinase allant de 1000 à 2000 U/ l de jus pendant 1 à 3 heures sont nécessaires pour clarifier trois jus de pomme différents.

Minh (2014) dans son étude sur l'application de pectinase dans l'extraction enzymatique et la clarification du jus de pomme de rose rouge (*Syzygium malaccensis*), a exploré l'efficacité de

Pectinex 3XL dans le procédé du traitement enzymatique de la pomme. Ils ont signalé que Pectinex 3XL à une concentration de 0,03%, et la température de 40 ° C en 80 minutes sont les paramètres optimaux pour la clarification du jus de pomme rose. Dey, et al. (2014), lors de leur étude sur l'application de la polygalacturonase et de l' α -amylase décolorées et partiellement purifiées dans le jus de pomme, ont précisé qu'en présence de 1% de polygalacturonase provenant d'écorces de mosambi (9,87 U / mL) et 0,4% d' α -amylase (899 U / mL), la pureté maximale (% $T_{660nm} = 97,0\%$) dans le jus a été atteinte après 2h d'incubation à 50 ° C en présence de 10 mM de CaCl₂. Tapre and Jain (2014) ont rapporté que les conditions optimales de clarification du jus de banane étaient à une concentration de 0,12% d'enzyme, et à une température de 38,84 ° C après une incubation de 136,52 min. La clarté du jus de banane était portée à $84,56 \pm 3,07\%$. Ahmed B., et al. (2014) ont signalé que les clartés maximales atteinte de l'ordre de 0,723, 0,868 et 0,811 étaient observé dans les jus de goyave, de jacquier et de pomme de pin après 2,5 heures d'incubation.

Matériel et méthodes.

Cette partie du travail concerne l'aptitude de la polygalacturonase purifiée à hydrolyser le trouble dans le jus de fruit. En premier lieu, on étudie l'action de la polygalacturonase sur la pectine extraite du fruit, puis on étudie son aptitude à hydrolyser le trouble dans le jus. Le fruit utilisé est la pomme variété *Golden* ramené du marché local.

17.1 Préparation du fruit

La pomme est le fruit du pommier commun, *Malus domestica*, de la famille des Rosacées (sous famille des Pomoïdés). D'un point de vue botanique, La pomme est une baie, c'est-à-dire un fruit charnu sans noyau dur.(Chassagne-Berces, et al. 2013)

La pomme (figure 89) est constituée, de la périphérie vers le centre de:

- L'épicarpe ou cuticule : surface du fruit en contact avec le milieu extérieur (2-7 % du poids total) ;
- Le mésocarpe ou parenchyme : chair comestible du fruit (92-97 % du poids total) ;

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

- l'endocarpe : renferme les pépins (0,05 à 1 % du poids total).

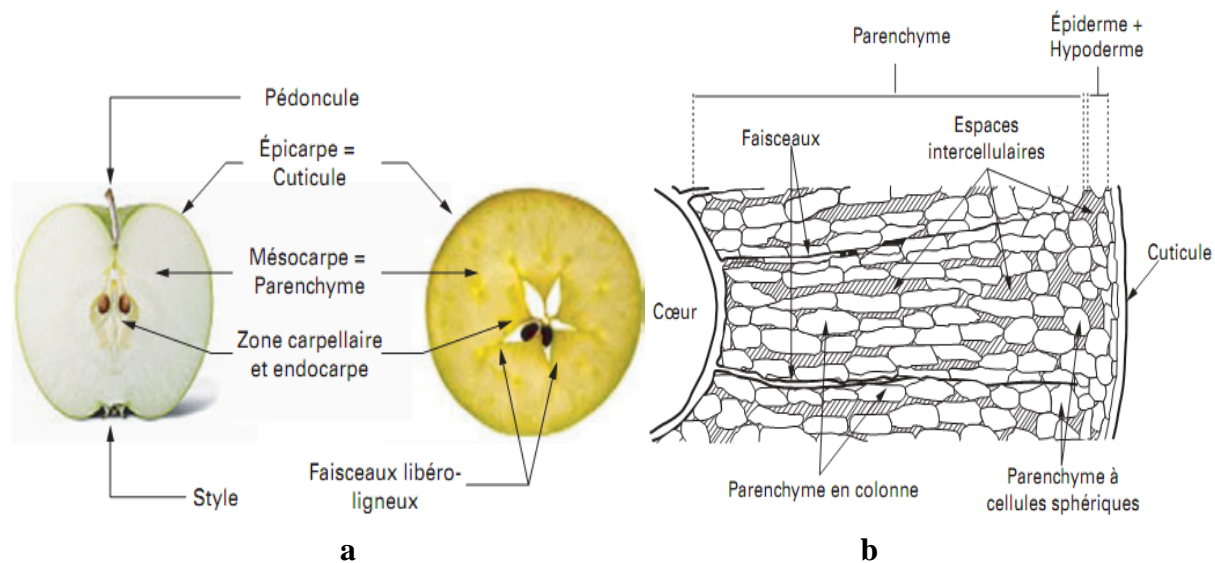


Figure 89. a) Coupe longitudinale et transversale d'une pomme; b) Section radiale du cortex de pomme

Les parois cellulaires de pommes sont essentiellement constituées de pectines et de cellulose; elles contiennent environ 70 à 80% de polysaccharides dont 25 à 28% d'acide galacturonique, élément de base des pectines, et 26 à 33% de cellulose en termes de matière sèche. La cellulose, l'hémicellulose et les pectines sont les principaux polysaccharides pariétaux composant les fibres alimentaires de la pomme (Chassagne-Berces, et al. 2013).

Les pommes ont été utilisées dans ce travail pour l'extraction de la pectine et pour l'extraction du jus. Avant l'extraction des pectines certains traitements de préparation sont nécessaires pour la matière première, (lavage, blanchiment, broyage, pressage, congélation).

17.2 Caractérisation physicochimique des pommes.

Pour la caractérisation chimique des pommes, nous avons déterminé:

- la teneur en humidité par séchage d'une prise d'essai des pommes broyées jusqu'au poids constant selon la méthode AFNOR décrite dans le paragraphe (2.2) du chapitre I.

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

- La teneur en substances pectiques a été déterminée selon la méthode AFNOR, (1980) dont le principe repose sur l'obtention d'un insoluble alcoolique, puis extraction et fractionnement des substances pectiques, ces dernières peuvent être dosées dans chaque fraction par détermination colorimétrique de l'acide galacturonique après formation d'un dérivé furfurique par action de l'acide sulfurique concentré à chaud et formation d'un complexe coloré avec le méthylhydroxydiphényl (MHDP). le protocole expérimental est décrit dans le paragraphe 2.2.5 du chapitre I.

17.3 Extraction des substances pectiques de la purée de pomme

Le protocole suivi pour l'extraction des substances pectiques a été décrit par Benchabane (1984). Il est à rappeler que, dans la purée des pommes, les pectines se trouvent à l'état de protopectines. Ces dernières, macérées en milieu acide, et à chaud, libèrent les pectines (figure 90)..

- Solubilisation: La solubilisation des pectines a été effectuée par chauffage à 80°C en milieu acide pH 2 avec agitation continue d'un mélange purée de pommes eau d'un rapport (1:5).

- Filtration: Cette opération est effectuée aussitôt la solubilisation arrêtée, avant refroidissement et augmentation de la viscosité; La filtration est réalisée, à chaud, à travers un tissu disposé dans un *Büchner*. Ce dispositif de filtration baigne dans la glace pilée pour abaisser la température; le jus pectique est conservé pendant une nuit au réfrigérateur à 4°C pour éviter la dégradation des pectines à des températures élevées.

- Purification- Concentration

Après un séjour d'une nuit au réfrigérateur et sédimentation des particules en suspension, le jus pectique trouble est clarifié par centrifugation (3000tr/min ; 10 min) le surnageant clair est concentré sous vide (50°C) au 1/5 dans un rotavapore. Après ajustement du PH à 4-4,2 le jus pectique concentré est stocké à 4°C.

- Précipitation à l'alcool

A un volume de jus pectique concentré, on ajoute deux volumes d'éthanol à 96%. Le pH du mélange est ramené entre 0,7 et 1 par ajout d'acide chlorhydrique concentré. Le jus pectique concentré est ajouté avec précaution à l'alcool acidulé, sous agitation. Cette dernière est maintenue pendant 30min, après ajustement du pH. Après un séjour de 30min au réfrigérateur, le précipité obtenu est filtré à travers un tissu en coton, pressé à la main, puis redispersé dans un minimum d'eau distillée puis précipité une deuxième fois dans l'éthanol. La filtration et le pressage effectués, le précipité est suspendu dans l'éthanol à 80° puis à 60°,

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

puis filtré dans un *Büchner* (tissu). Ce lavage est répété cinq fois ; au cinquième lavage, le filtrat est exempt de chlorures. Un dernier lavage à l'acétone pur est réalisé pour éliminer toutes traces d'acide chlorhydrique et d'alcool absorbé par les pectines. D'autres parts, ce lavage à l'acétone facilite le durcissement et l'émiettement des pectines (Cready 1970).

- Séchage et stockage des pectines

Les pectines sont séchées dans une étuve sous-vide à une température de 50°C pendant 16 h environ. Après pulvérisation dans un mortier pilon les pectines en poudre sont stockées dans des flacons bruns sous dessiccateur.

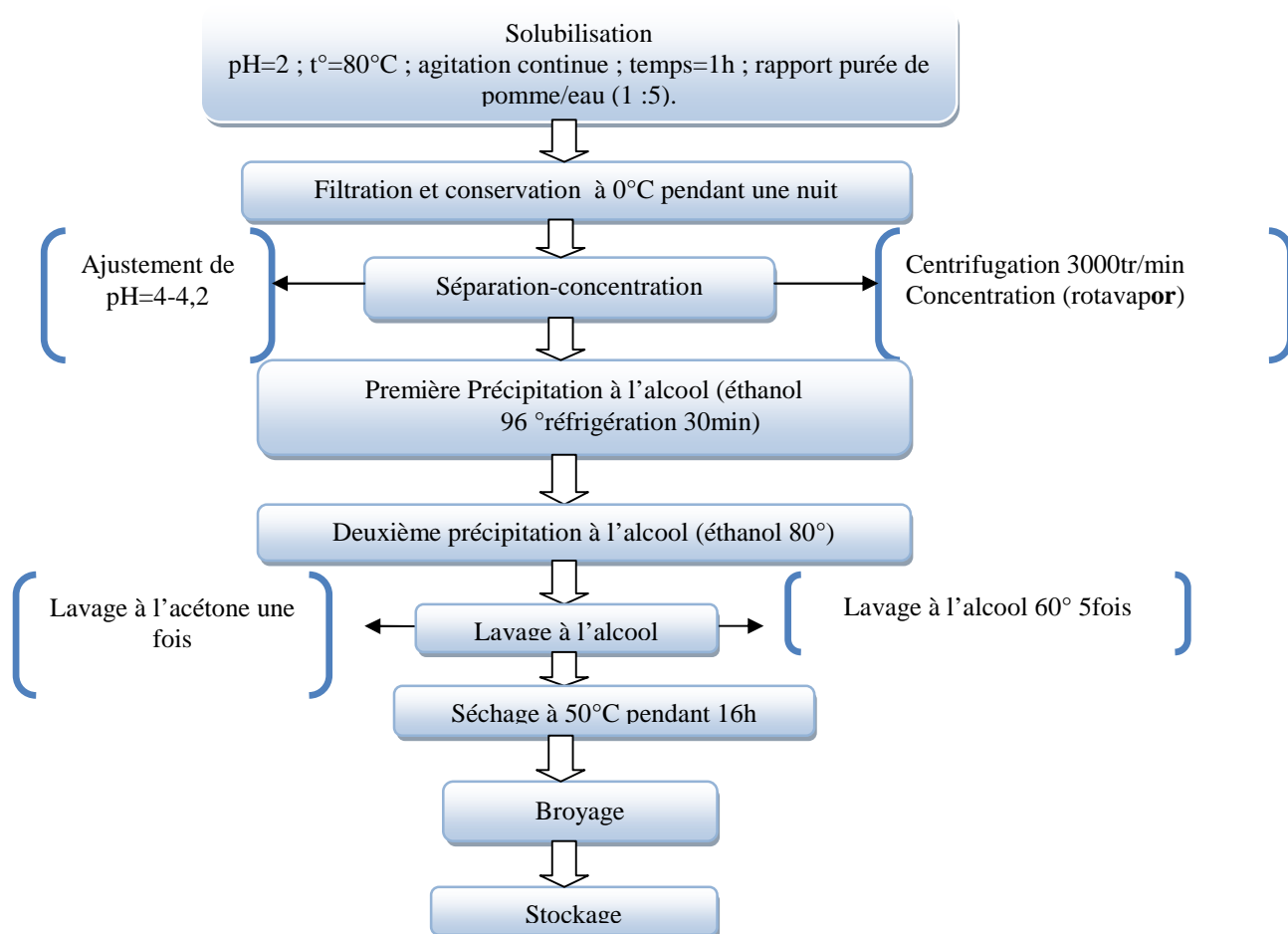


Figure 90. Extraction des substances pectiques

17.3.1 Caractérisation des substances pectiques

Une solution de pectine à 1 % a été préparé par dissolution de 1 g de pectine dans 100 ml d'eau distillée, maintenue en agitation magnétique pendant deux heures. Cette solution pectique était analysée pour le dosage de l'acide galacturonique, le dosage des oses neutres et la détermination du degré d'estérification.

17.3.1.1 Rendements d'extraction

Le rendement en pourcent est déterminé en rapportant la masse des substances pectiques extraites à la masse de la prise d'essai.

17.3.1.2 Dosage de l'acide galacturonique

La méthode utilisée pour réaliser le dosage de l'acide galacturonique est décrite par. (Thibault 1979) dans le paragraphe (2.2.5) du chapitre I. Après désestification, les substances pectiques sont hydrolysées en acides galacturoniques en milieu acide concentré (H_2SO_4 à chaud ($92^\circ C$)). Ceux-ci sont transformés en dérivés furfuriques (acide 5- formyl-furoïque) qui se condensent avec le MDHP pour former un complexe coloré absorbant à 520 nm; l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en acide galacturonique de façon linéaire entre 0 et 100 $\mu g/ml$.

17.3.1.3 Détermination du degré d'estérification (DE)

Le degré d'estérification est déterminé par titrimétrie des groupes carboxyles estérifiés en trois étapes: (Aoussat 1978)

- Libération des groupes carboxyles liés aux cations.
- Dosage par la soude des groupes carboxyliques libérés.
- Saponification des groupes carboxyliques méthylés.

a) Titration des groupes carboxyles non estérifiés:

Une prise d'essai e 20 ml de la solution pectique à 1 % est acidifiée par 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (12 N), ce qui ajuste la solution à la normalité. Le déplacement des cations des groupements carboxyliques (acide faible) par l'acide chlorhydrique (acide fort s'effectue à la température ambiante pendant 30 min. Puis, les pectines sont précipitées par addition de 160 ml d'éthanol à 95° , et séparées par filtration . Les pectines sont lavées par l'éthanol pour éliminer les traces d'acide chlorhydrique, ce que l'on vérifie par l'addition d'une solution de nitrate d'argent. Elle sont transvasées dans le même bécher avec 60 ml d'eau chaude exempte de CO_2 et titré par NaOH N/20 jusqu'à neutralité, (titration A).

b) Titration de tout les carboxyles estérifiés et non estérifiés.

On saponifie la même prise pendant 2 heures avec 10 ml de soude N/10. Un équivalent de HCl est ajouté et les contenus sont titrés en retour avec la soude N/20 jusqu'à neutralité (Titration B). Le degrés d'estérification est exprimé par le pourcentage des groupes carboxyliques estérifiés par rapport aux groupes carboxyliques totaux, soit par la rapport:

$$DE = \frac{B - A}{B} \times 100$$

17.3.1.4 Dosage des protéines

La teneur en protéines de pectine de pomme est déterminée suivant la méthode de Kjeldahl (Audigié 1984).

17.3.1.5 Détermination du poids moléculaire viscosimétrique moyen (Owens, et al. 1946):

Les mesures de viscosité en milieu dilué indiquent que la viscosité réduite varie avec la concentration du soluté, suivant la relation de HUGGINS :

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H * C * [\eta]^2$$

Avec

η_{red} = Viscosité réduite

$[\eta]$ = Viscosité intrinsèque en dl/g ;

K_H = Coefficient de Huggins, en général inférieur à 0,9 ;

C = Concentration de soluté en g/dl.

La viscosité spécifique et la viscosité réduite des solutions sont déterminées selon les relations suivantes:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_s}{t_s} \quad \text{et} \quad \eta_{red} = \frac{\eta_s}{C}$$

t = Temps d'écoulement de la solution(s) ;

t_s = Temps d'écoulement de solvant(s).

La viscosité intrinsèque sera donc obtenue par extrapolation de a concentration nulle :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/C$$

Or, on constate que dans le cas des solutions aqueuses de pectines, la dilution accroît fortement η_{sp}/C , ce qui rend impossible cette extrapolation.

En effet, les pectines étant des poly électrolytes, les molécules s'entourent de solvant et les ions compensateurs ce répartissent sur un plus grand volume autour du poly électrolyte, de sorte que la neutralisation des charges est atténuée et des répulsions entre molécules apparaissent, d'où un accroissement de la viscosité aux faibles concentration en milieu aqueux. L'apport de sel neutre (Na Cls) tend à réduire ces répulsions par augmentation de la force ionique du milieu, et le comportement de la pectine devient celui d'un polymère neutre.

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

On adjoint également au solvant de l'EDTA de manière à éviter la formation d'agrégats de molécules pectiques par complexation avec des cations divalents (Owens *et al.*, 1946s).

La viscosité est liée à la masse moléculaire moyenne viscosimétrique par la relation de MARK- HOUWINK :

$$[\eta] = K * M^a$$

Avec:

$[\eta]$: est la viscosité intrinsèque (dl/g)

K et a sont des constantes empiriques caractéristiques du milieu et du polymère ; dans le cas des pectines Owens et al. (1946) ont établie la relation suivantes:.

$$[\eta] = 1.4 \cdot 10^{-6} * M^{1,34}$$

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un viscosimètre à écoulement (temps de chute du solvant = 94s) dans un bain thermostat à 30°C. Les solutions de pectine sont préparées dans l'eau distillée contenant NaCl à 0,155M et EDTA à 0,005M.

17.3.1.6 Analyse du spectre infrarouge de la pectine

La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon. Le domaine infrarouge est la région du spectre située entre le visible et les micro-ondes. Ce domaine est découpé en trois parties : le proche infrarouge, le moyen infrarouge et le lointain infrarouge. Dans le cas présent, le domaine de l'infrarouge considéré est celui du moyen infrarouge qui s'étend de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} . Pour qu'une absorption d'énergie puisse avoir lieu, il faut que la fréquence de l'onde lumineuse (nombre d'onde) soit égale à la fréquence de vibration de la liaison moléculaire. (Gnanasambandam and Proctor 2000).

Chaque liaison moléculaire a sa fréquence de vibration propre, la mesure de l'absorbance permet d'obtenir des renseignements sur la nature du groupement chimique et sa proportion. Gnanasambandam and Proctor (2000) ont déterminé le degré d'estérification de la pectine d'abricot par infrarouge à transformé de fourrier (FTIR) en calculant la surface du pic correspondant à transition du groupement ester par référence au spectre IR d'une pectine dont les degrés de méthylation est connu.

Pour préparer l'échantillon on utilise la méthode du pastillage de petite quantité de pectine broyée finement avec le K Br. La pastille est obtenue à l'aide d'une pastilleuse, cette pastille est alors fixée sur le port-échantillon et l'ensemble est introduit dans le spectromètre, la prise

Chapitre IV. *Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme*

des spectres a été réalisée à l'aide d'un infrarouge à transformée de fourrier type *JASCO FT/IR-4100* avec un facteur de résolution 4 cm^{-1} et un nombre de scan 40.

17.3.1.7 Comportement rhéologique de la pectine

La rhéologie désigne la science de la déformation et de l'écoulement de la matière. La caractérisation rhéologique d'un échantillon consiste soit à appliquer une contrainte (σ) et à mesurer sa déformation (γ), soit à lui appliquer une déformation et à mesurer la contrainte correspondante (Scher 2015). La contrainte est la force appliquée par unité de surface du fluide considéré. Le test de rhéologie à été réalisé à l'aide d'un rhéomètre rotatif à contrainte imposée (IR 2000 TA) équipé d'un module à cylindres coaxiaux avec un rotor cylindrique d'une hauteur de 42mm et diamètre 14mm. 0,1g de pectine sont alors dissouts dans 100ml de Na CL et l'EDTA agitée pendant 8h puis filtrée, cette solution a été gardée 24 heures à température ambiante avant d'être analysée.

17.3.1.8 Chromatographie sur l'échanges d'ions (DEAE –cellulose) de la pectine

Les celluloses échangeuses d'ions sont utilisées pour la séparation chromatographique des macromolécules possédant de nombreux groupements fonctionnels chargés électriquement et qui se comportent comme des polyélectrolytes (protéines, acides nucléiques, pectines) (Kamoun 1977). La chromatographie sur DEAE-cellulose permet se fractionner les pectines de même structure primaire en fonction de leur degré d'estérification, cette méthode à été mise en œuvre par (Baker and Bruemmer 1969). Les pectines, par leur charge négative, peuvent se fixer sur un échangeuses ionique (De Vries and Visser 2001b). Ce type de chromatographie présent plusieurs intérêts.il permet de séparer les molécules neutres des molécules acides et en conséquence de quantifier la pureté des pectines analysées. Le DEAE cellulose a été traité par precyclage, par Agitation magnétique douce de 10g de DEAE cellulose avec 150ml d'H Cl 0,5N ; Après 30m, le gel est filtré sur un Büchner muni d'un filtre (Whatman n°4), puis lavé avec de l'eau distillée jusqu'au pH 4 des eaux de lavage.

Chapitre IV. *Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme*

Après avoir coulé le gel dans une colonne analytique type QTY5, de dimension 1,5 cm×30cm, la colonne a été équilibrée par passage d'environ 200 ml du tampon acétate de sodium 0.05M, pH 4,2. Ensuite 0,5ml de solution de pectine est déposée sur la surface du gel en haut de la colonne de DEAE-cellulose. Les composés chargés ont été élués par passage de 160 ml d'un gradient d'acétate croissant de 0,05 M à 1M. La teneur en acide galacturonique et les oses neutres ont été déterminés dans les éluats collectés par fraction de 3ml avec un débit d'élution de 1 ml/min.

17.3.2 Action de la polygalacturonase purifiée sur la solution pectique

L'objectif est de tester l'action de l'endopolygalacturonase purifiée sur la pectine extraite des pommes. a cet effet, 0,2g de pectine de pomme obtenue au laboratoire sont dissoute dans 100ml d'une solution tampon acétate pH 4,2 le mélange est maintenue en agitation pendant 3heures a température ambiante, ensuite 2ml de l'endoPG purifiée ont été ajoutée à cette solution colloïdale, le mélange est maintenu en agitation thermostatée à 45°C pendant 2h. Toutes les 15min un volume adéquat de 10 ml est prélevé, chauffé à 90°C pendant 5min pour inactivation de l'enzyme et suivie d'un refroidissement rapide. La viscosité spécifique, les oses neutres et l'acide galacturonique sont déterminés sur chaque prélèvement.

17.3.3 Chromatographie de gel de filtration de la pectine avant et après hydrolyse

La pectine en solution (avant et après hydrolyse) a été d'abord précipitée par l'éthanol à 95 °, et mise au repos pendant 4 heures à 4°C, le coagulum formé est lavé 3 fois par l'éthanol à 70 % , au dernier lavage le coagulum est récupéré par filtration sur verre fritté n°4, puis le coagulum est redissout dans une solution tampon pH 4,2. les deux solution de pectine ainsi préparées sont fractionnées par chromatographie de filtration sur gel séphadex G100.

Le domaine de fractionnement du gel Séphadex G 100 pour les pepetides et les protéines globulaires est entre 4000-150000. Le gel a été d'abord préparé par gonflement dans l'eau distillée peçant 3 jours, puis coulé dans une colonne QTY 5 (1,5 cm x30 cm) comme décrit dans le chapitre III paragraphe 2.1.3. L'élution est réalisée par perfusion d'une solution tampon acétate pH 4,2; les éluats sont récupérés par fractions de 3 ml, la teneur en acide galacturonique est alors déterminée dans chaque fraction par la méthode de MDHP.

17.3.4 Aptitude de l'endopolygalacturonase à hydrolyser le trouble dans le jus de pomme.

La norme générale codex (CODEX STAN 247-2005) définit le jus de fruits comme le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

degré de maturation approprié et frais ou conservés dans des conditions saines conformément aux dispositions pertinentes de la commission du Codex alimentaires.

Le jus de pomme est généralement fabriqué avec des pommes acide afin d'obtenir un jus désaltérant, mais il est possible de faire des jus de pomme douces en vue de mélange avec d'autres jus. La consommation et la production de jus de pomme ont connu une croissance continue depuis 20 ans. De nombreux produits sont disponibles sur le marché selon le procédé et la matière première utilisés. On retrouve le jus clarifié qui est transparent et dans lequel on ne retrouve aucune particule en suspension, le jus dit opalescent ou non clarifié, la pulpe de jus est mélangée au jus de pomme avec des extraits d'autres jus (Kaushal and Joshi 1995).

Bien qu'il y ait eu une forte augmentation dans la consommation de jus opalescents et de nectars depuis quelques années, les jus clarifiés représentent encore 26% du marché et leur proportion continue d'augmenter. La production d'un jus de pomme clair nécessite l'enlèvement des matières en suspensions et la prévention du développement de la sédimentation après l'embouteillage.

17.3.5 Préparation du jus de pomme.

Le jus de pomme est préparé au laboratoire à partir des pomme utilisées pour l'extraction de la pectine étudiée. Nous avons adopté un procédé qui se rapproche du procédé industriel (figure 91) résumé par le diagramme de la figure 92.

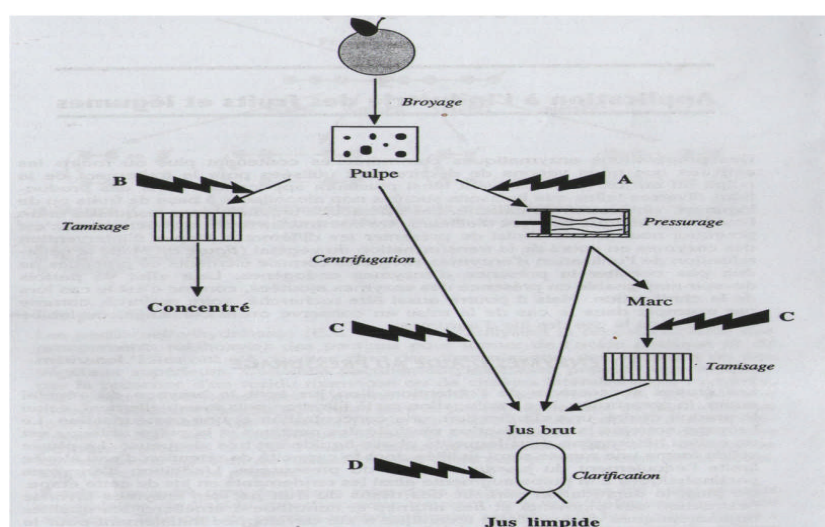


Figure 91. Utilisation des enzymes dégradant les polysaccharides dans la transformation des pommes. Procédé industriel (Larreta –Garde 1997).

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

500 g de pommes sont lavées, nettoyées blanchies pendant 5 min, puis broyées en présence de l'acide citrique, ce dernier est ajouter pour prévenir le brunissement enzymatique dans le jus. L'endo PG est ajoutée à une proportion de 1/100 (enzyme /jus), le broyat est ainsi incubé à 35°C pendant 1 heure, puis il est mis dans un tissu en jersey, puis pressé. le liquide obtenu est le jus brut dont le volume est mesuré. le liquide est réparti en 4 échantillons dans des tubes à essais: pour le premier échantillon est ajouté l'extrait enzymatique brut (EEB), pour le deuxième est ajoutée l'endoPG , pour le troisième est ajoutée l'enzyme commerciale et le quatrième échantillon sert de témoin dans lequel le volume de l'extraits enzymatiques est remplacé par l'eau distillée. Toutes les opérations sont déroulées en triples. L'étape de macération est réalisée avec et sans enzymes de macération: elle est réalisée en présence d'enzyme commerciale (EC), en présence de l'EEB et en présence d'eau distillée à la place des enzymes, ce dernier essai sert de témoin.

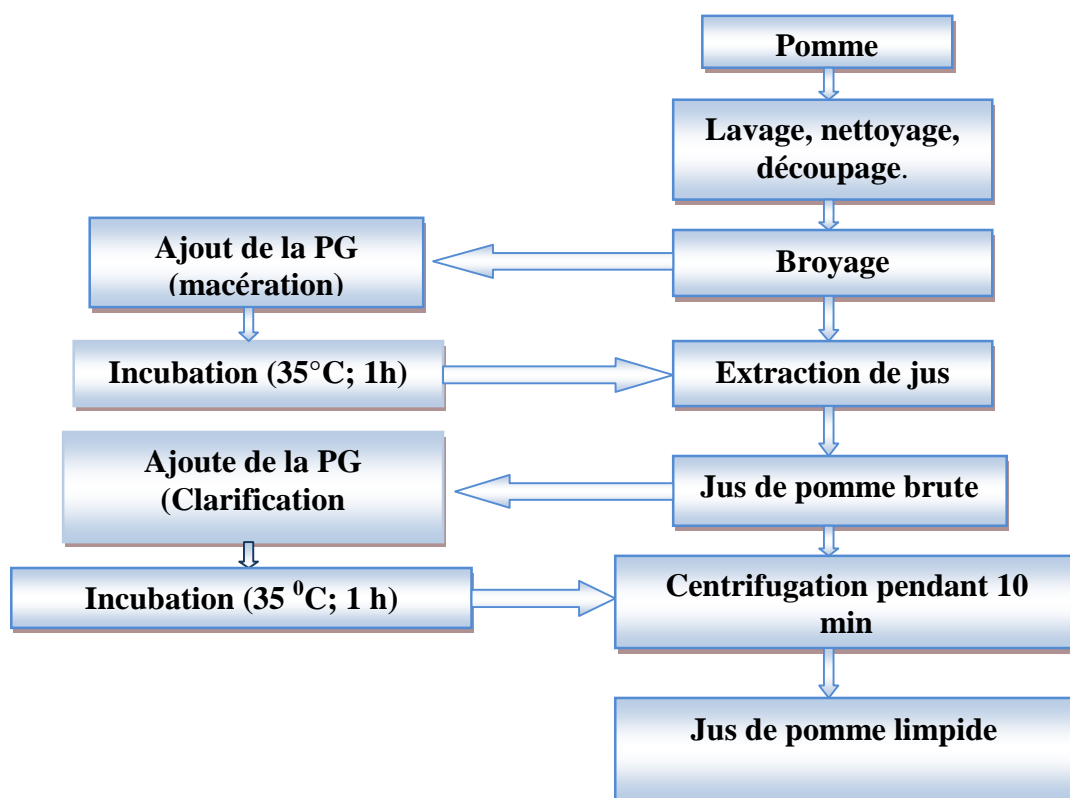


Figure 92. Procédé adopté pour la préparation du jus de pomme au laboratoire

17.3.6 Analyses physicochimiques des fractions des jus traités.

17.3.6.1 Mesure de la turbidité:

On appelle troubles une phase dispersée qui diffuse la lumière. Ce trouble, dû à une suspension de flocons de densité voisine de celle du jus de pomme, décante lentement et se redisperse à la moindre agitation. L'intensité de la lumière diffusée dans le jus est sensiblement proportionnelle à la quantité de trouble présente. La néphélométrie est donc la technique de mesure de troubles dont l'importance peut s'exprimer en unité de diffusion ou unité néphélométrique (UN) (Aoussat 1978). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un turbidimètre de laboratoire type *Hanna*, tel que les résultats sont directement affichés sur l'écran de l'appareil.

17.3.6.2 Détermination du °Brix:

Les solides solubles sont déterminés avec un réfractomètre portatif électronique de type *Atago* qui affiche directement le résultat sur l'écran de l'appareil en (%).

17.3.6.3 Mesure de la densité optique à 420 nm:

La mesure de la DO du jus à 420 nm permet d'avoir une estimation sur l'intensité de la couleur brune causée par les débris cellulaires et les particules colloïdales présentes en suspension dans le jus, la lecture de densité optique à 420 nm a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre de type *Jasco. V-530*.

17.3.7 Optimisation de la clarification enzymatique du jus de pomme

Un plan d'expérience à deux niveaux et trois facteurs a été utilisé pour déterminer, la quantité de l'enzyme à utiliser, le temps et la température d'incubation optimales pour la clarification enzymatique du jus (Tableau n°30).

Tableau 30. Niveaux de variation des facteurs d'optimisation de la clarification du jus

Niveau	- α	Niveau infér	Niveau	Niveau supér	+ α	Intervalle
facteur	-1,68	-1	cent 0	+1	+1,68	Δx
Temps (min)	4,8	15	30	45	55,2	15
Température (°C)	18,2	25	35	45	51,8	10
Enzyme (ml)	0,08	0,25	0,5	0,75	0,92	0,25

Résultats et discussion

18.1 Analyses du matériel végétal (la pomme).

La teneur en eau dans les pommes était 81,46 %, on peut dire que ce fruit est juteux et peut être destiné à du jus. En effet la composante principale de la cellule végétale est l'eau, elle représente 70 à 90 % de la masse ou du volume. La plus parts des autres composantes sont des polysaccharides telles que la cellulose, hémicellulose et la pectine qui constituent la paroi cellulaire végétale (Gidley, et al. 2002). Les parois cellulaires des pommes sont essentiellement constituées de pectines et de cellulose qui sont les principaux polysaccharides pariétaux composants les fibres alimentaires des pommes, elles constituent environ 70 à 80 % de polysaccharides dont 25 à 28 % d'acide galacturonique élément de base de pectine et 26 à 33% de cellulose en terme de matière sèche (Colin-Henrion, et al. 2009). Dans ce travail la teneur en poids sec du matériel insoluble à l'alcool était en moyenne 2.30 g / 100 du fruit frais. La répartition des polysaccharides pariétaux estimée par les MIA était hétérogène dans la pomme. Ainsi avec une teneur moyenne de 5,6g/100g de produit frais, l'épiderme est le plus riche en paroi végétale avec une teneur moyenne de 5 g /100g de fruit frais, la zone la plus pauvre est le parenchyme avec une teneur de 1,5 g de MIA/100g de produit frais. Bien qu'étant plus pauvre en paroi végétale, le parenchyme est le tissu qui en poids est le plus important 84 g / 100g de fruit frais par rapport à l'épiderme 4g /100g (Massiot, et al. 1994).

La teneur en substances pectiques est représentée par le pourcentage de l'acide galacturonique (AGal) dans la matière végétale (tableau n° 31):

Le pourcentage le plus élevé en acide galacturonique est dans la fraction des substances pectiques solubles dans l'acide chlorhydrique (PSH), suivie par la pectine soluble dans l'oxalate (PSO) et la pectine soluble dans l'eau (PSE); la teneur totale de l'acide galacturonique dans les trois fractions est 15,08 % cette valeur représente la teneur en subsatances pectiques.

Tableau 31. Teneurs en acide galacturonique dans les différentes fractions de pectine

Fraction	PSE	PSO	PSH
Teneur en AGal (%)	1,65	2,85	11,3

La teneur en substances pectiques dans cette variété de pomme enregistrée dans ce travail, est comparable à celle citée dans la littérature par Chandel, et al. (2016) qui ont rapporté 14,66 % (MS); de leurs cotés Prasanna, et al. (2007) ont rapporté que le pourcentage des substances pectiques varient entre 0.5 % et 1.6 % dans la pulpe et de 1.5% à 2.5% dans le marc de

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

pomme par rapport au produit frais. Les pomme entières sont particulièrement riches en fibres 3 à g /100g, cette teneur les positionne devant la banane (2 g/100g) et l'orange (1,8g/100g). Ces fibres sont notamment à l'origine des effets bénéfiques de la consommation des pommes (Brisset Munoz Espinosa 2012)

Toutes fois, cette valeur déterminées dans ce travail représente la teneur en substances pectiques solubles, protopectines et acide pectiques qui se retrouvent principalement dans la pulpe; du moment où les substances cellulosiques qui se localisent dans la peau et la lignine qui se localise au centre du fruit dans les pépins ont été éliminées lors la préparation du fruit.

18.2 Rendement d'extraction en pectine

A partir de 500 g de pomme fraîches 9 g de substances pectiques ont été extraites en moyenne, la matière sèche étant 18,54 % , donc le rendement sera 9,7 % par rapport à la matière sèche, l'extraction a été réalisée plusieurs fois et la moyenne en rendement était 11,16%. Ce rendement est proche de celui trouvé par certains auteurs dans leurs travaux sur les pectines des pommes comme Fissore, et al. (2009) qui ont rapporté un rendement en pectine de 11,7g/100g relatif à la matière sèche (MS) pour les pommes, 13, 4 % pour les poires et 3,88 % pour le marc de carotte.

$$\text{Rendement}\% = \frac{\text{Masse de la pectine sèche}}{\text{Masse de la matière première sèche}} \times 100$$

Koubala, et al. (2008), le meilleur agent d'extraction pour un bon rendement en pectine à teneurs élevée en acide galacturonique est le H Cl qui provoque une hydrolyse partielle de la protopectine à un pH de 1,5.

D'après certains auteurs le rendement en pectine dépend du type du fruit, de sa maturité et de la variété de la matières premières, ainsi que des méthodes de traitements préliminaires et le processus d'extraction (Fissore, et al. 2009; Singh, et al.) , d'autres auteurs ont précisé que les conditions d'extraction telles que la température, le temps d'extraction, le pH, les types de solvants d'extraction et temps de solubilisation influent fortement sur le rendement en pectine. Yeoh S., et al. (2008)

18.3 Caractérisation physicochimique de la pectine

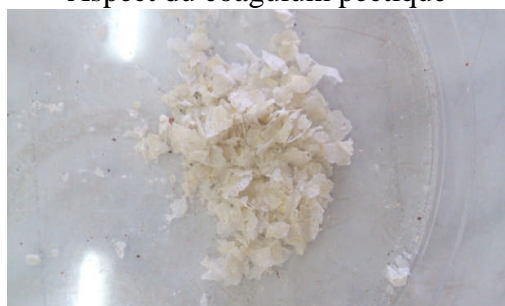
L' ajout de l'éthanol absolu au jus pectique fait apparaître un coagulum fibreux (figure 107), qui reste en suspension dans la solution alcoolique et qui floccule à la surface du solvant après un temps de repos à 4°C. Ce coagulum représente la matière insoluble à l'éthanol (MIA).

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

Après lavage et séchage du coagulum, on obtient une pectine blanchâtre comme c'est déjà montré dans la figure 93.



Aspect du coagulum pectique



Coagulum après séchage

Figure 93. Aspect e la pectine après extraction

Tableau 32. Caractéristiques de la pectine extraite

Caractéristique	Valeur
Teneur en acide galacturonique (%)	52,30
Degrés d'estérification (%)	33,33
Poids moléculaire viscosimétrique (Da)	61267,20
Teneur en protéines (%)	2,4

D'prés le tableau 32, la teneur en acide galacturonique (52,20 %) est inférieure aux valeurs citées dans la bibliographie pour la pectine des pommes qui varient de 72% à 76,2 % (Thibault 1983).

La teneur en AGal est directement influencée par le degré de maturité des fruits, elle atteint des valeurs très élevées au dernier stade de maturation des fruits. Comme elle peut être influencée par le traitement thermique des pommes comme le blanchiment et par les conditions d'extraction comme le pH, le solvant utilisé et le temps d'extraction.(Lo, et al. 2002)

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

Le degré d'estérification de la pectine obtenue est 33,33% déterminé par méthode titrimétrique. cette valeur montre que la pectine obtenue est faiblement méthylée, par ailleurs les pectines des pommes se caractérisent par un degré de méthylation DM élevé (85%) (Thibault 1983). Mais cette valeur se rapproche des valeurs rapportées par Chandel, et al. (2016), lors de leurs étude sur les méthodes d'extraction des pectines de pommes dont le degrés d'estérification (DE) se situait entre 56,76% et 61,88 % et la teneur en acide galacturonique variait entre 36,42% et 43, 21%.

18.4 Spectroscopie infrarouge de la poudre de pectine obtenue

La mesure de l'absorbance permet d'obtenir des renseignements sur la nature des groupements chimiques et leurs proportions; Le spectre infrarouge consiste à l'enregistrement de la variation de l'intensité du rayonnement infrarouge après son interaction avec l'échantillon, en fonction de la fréquence celle-ci exprimée en cm^{-1} (nombre de variation par seconde) représente les bandes d'absorption sous forme des pics correspondant aux vibrations d'étirement des liaisons des substances pectiques (Gnanasambandam and Proctor 2000) Cette méthode est rapide et pratique pour la recherche de groupes fonctionnels de polysaccharides, elle permet de déterminer l'identité du polysaccharide, à ce effet la pectine est analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) en comparaison avec une pectine commerciale dont le degrés d'estérification est connu (74 %) . Les spectres FT-IR des pectines étudiées sont présentés dans la Fig.94 . Nous avons constaté que les spectres présentent des similitudes dans leurs modèles d'absorption dans les régions allant de 3000cm^{-1} à 4000cm^{-1} et de 900cm^{-1} à 1900cm^{-1} . Les spectres FT-IR dans la plage de longueur d'onde de 950 à 1200cm^{-1} sont considérés comme la région de l'empreinte digitale des carbohydrates, car il permettent l'identification de groupes chimiques majeurs dans les polysaccharides (Černá, et al. 2003). Les similitudes des spectres de pectine extraites avec celles de la pectine commerciale dans La région de l'expression «empreinte digitale» suggère que l'extrait est un produit efficace. Les deux spectres étaient similaires, montrant des bandes caractéristiques à 3440cm^{-1} correspondant aux vibrations (O-H), cette bande est plus large dans le spectre de la pectine extraite, cela est du peut être à la présence d'un taux élevé en humidité, (en général l'humidité dans les pectines du commerce est de 12 %); à 2930cm^{-1} c'est la région des vibrations des liaisons (C-H); à 1740cm^{-1} c'est la fréquence de vibration du groupement (C=O) COOMe, on observe que son intensité est plus élevée dans le spectre de la pectine dont de degrés de méthylation est 74 %; à 1640cm^{-1} c' est la fréquence des vibrations asymétrique des groupements carboxyliques (COO) la bande caractéristique de cette vibration est observée

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

dans les deux spectres, mais elle est plus large dans le spectre caractéristique de la pectine commerciale; à 1435 cm^{-1} c'est les vibrations symétriques d'étirement des groupements acide carboxylique (COO^-); à 1240 cm^{-1} c'est les vibrations symétriques de OH ; à 1145 cm^{-1} c'est la vibration COC cyclique glycosidique ; 1100 correspond aux vibrations de la liaison (C-C). (Zouambia, et al.). (Faravash and Ashtiani 2008) ont mentionné que les vibrations d'étirement caractéristiques des liaisons esters méthyliques ($\text{C}=\text{O}$) estérifiés se situent dans l'intervalle des fréquences allant de 1760 cm^{-1} à 17405 cm^{-1} , et l'intervalle de 1640 cm^{-1} à 1620 cm^{-1} correspond à la vibration d'extension asymétrique d'étirement du groupement (COO). En comparant les deux spectres on perçoit que l'intensité des bandes d'absorption dans ces régions sont plus faibles dans le spectre de pectine extraites, par conséquent on peut conclure que son degrés d'estérification est plus faible relativement à la pectine commerciale; cette conclusion est en conformité avec le résultat de DE déterminé par titrimétrie dont la valeur est de 33 %.

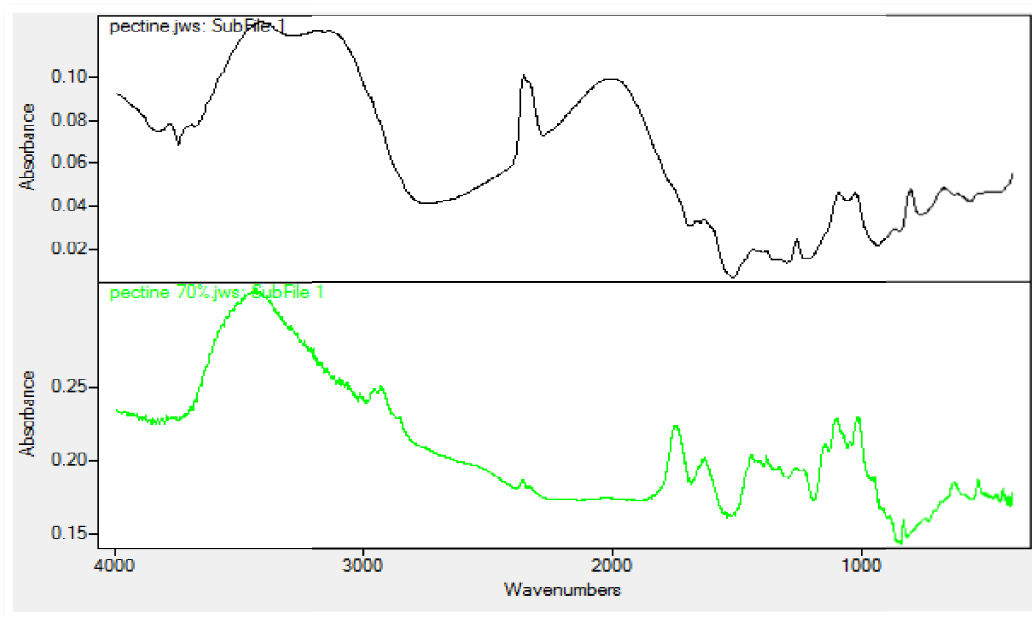


Figure 94. Compariason entre le spectre infrarouge de la pectine obtenue et de la pectine commercial (DE=70%.)

18.5 Teneur en protéines dans la pectine

La teneur en protéine dans les pectines des pommes est de l'ordre 2,4%. Cette valeur est proche de la limite supérieure fixée par le FAO qui est de l'ordre de 2,5% (Herbstreith and Fox 2006) . Les pectines extraites du marcs des pommes par Massiot and Renard (1997) ont présenté des teneurs en protéines allant de 2,1 à 7,5 %, alors que celles obtenues par Schieber, et al. (2003) sont de l'ordre de 4 %.

18.6 Détermination du poids moléculaire viscosimétrique moyenne (PM)

Le poids moléculaire est également un facteur important dans la fonctionnalité de la pectine. La capacité d'augmenter la viscosité d'une solution et la résistance de gel tendent à augmenter en fonction du poids moléculaire de la pectine. Les valeurs des viscosités relatives, spécifiques et réduites en fonction des concentrations des solutions pectiques diluées sont illustrées dans le tableau 33. D'après la courbe de la figure n°95, on relève la viscosité intrinsèque qui est égale à 3,643 d'où la masse moléculaire viscosimétrique moyenne :

$$M_v = \sqrt[1,34]{\frac{3,643}{1,4 * 10^{-6}}}$$

Tableau 33. Valeurs des viscosités réduites (η_{red}) et des viscosités spécifiques (η_{sp}) en fonction des concentrations en pectine

η_{sp}	Concentration (g/dl)	η_{red} (dl/g)
6,85	1	6,85
3,1	0,5	6,2
0,85	0,2	4,25
0,4	0,1	4
0,17	0,05	3,5

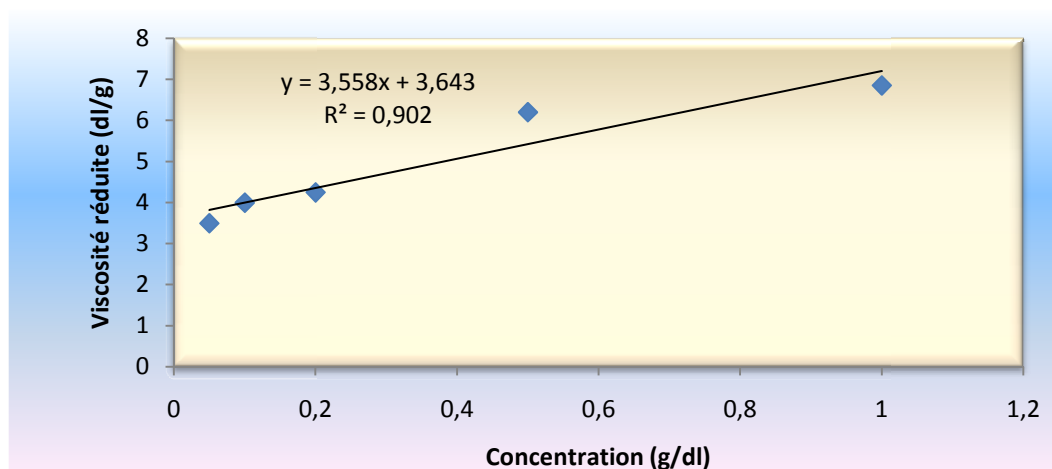


Figure 95. La viscosité réduite en fonction de la concentration en pectine

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

La masse moléculaire viscosimétrique moyenne obtenues par la relation est de l'ordre 61,26 K Da, cette valeur est dans la fourche des valeurs signalées par certains auteurs; Selon (Ralet M.-C., et al. 2005; Sakai, et al. 1993) le poids moléculaire des pectines varie de 10 à 400 KDa suivant leur origines et leur mode d'extraction ainsi que de la technique employée pour le mesurer. Les préparations en pectines sont généralement hétérogènes par leurs poids moléculaires, et on ne mesure qu'un poids moléculaire moyen. mais la valeur obtenue dans ce travail est plus faible à ce qui a été rapporté par Jayani, et al. (2005) qui ont noté que le poids moléculaire de pectines dans les pommes varie de 200 à 360 K Da, de 25 à 35 K Da dans les pectines des poires et prunes et de 40 à 50K Da dans les pectines des oranges et le marc des betteraves.

18.7 Aspect rhéologique de la pectine extraite

L'objectif est de voir le comportement rhéologique de la solution de pectine à faible concentration. Sous l'action d'une contrainte les matériaux se déforment, si on appliquant une contrainte sur le fluide en mouvement à une vitesse fixe et on mesure le taux de cisaillement: on déduit le coefficient de proportionnalité η qui est une propriété matérielle du fluide que l'on appelle viscosité dynamique, elle s'exprime par la formule suivante ci dessous:

$$\tau = \eta \dot{\gamma}$$

τ : est la Contrainte appliquée ;

η : viscosité dynamique ;

$\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement

Dans le cas des fluides newtoniens η est constante , par contre pour les fluides non newtoniens η n'est pas constante, elle dépend du taux de cisaillement elle est appelée viscosité apparente η_{app} .:

$$\eta_{app} = K \dot{\gamma}^n$$

L'équation ci dessus est l'équation constitutive de fluide dite de type loi de puissance d'ostwald-de waele; on définit K comme la constante de consistance (Pa .sⁿ) et n est l'indice d'écoulement ou de comportement.

D'après le graphe de la figure 96, la variation de la contrainte en fonction du taux de cisaillement évolue d'une manière linéaire dans les trois solutions de pectines (pectine dans NaCl , pectine dans EDTA et pectine dans Nacl et EDTA), les deux solutions se comportent comme un fluide newtonien à cette concentration (0,1%). D'après Stephen, et al. (2006), les solutions diluées de pectine (0,5%) montrent un comportement newtonien classique. Dépendamment toutes fois du DE, pH et la force ionique.

Chapitre IV. Application de la polygalacturonose à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

La viscosité apparente chute rapidement quand le taux de cisaillement passe de 0 à 120 (1/s), puis elle se stabilise et atteint le plateau newtonien (figure 97). Le model appliqué est un écoulement 1D de type couette plan $\dot{\gamma} = \frac{d\eta}{dy}$, les déformations dans ce type d'écoulement étant réversibles. La contrainte appliquée paraît insuffisantes pour provoquer des perturbations intermoléculaires irrégulières.

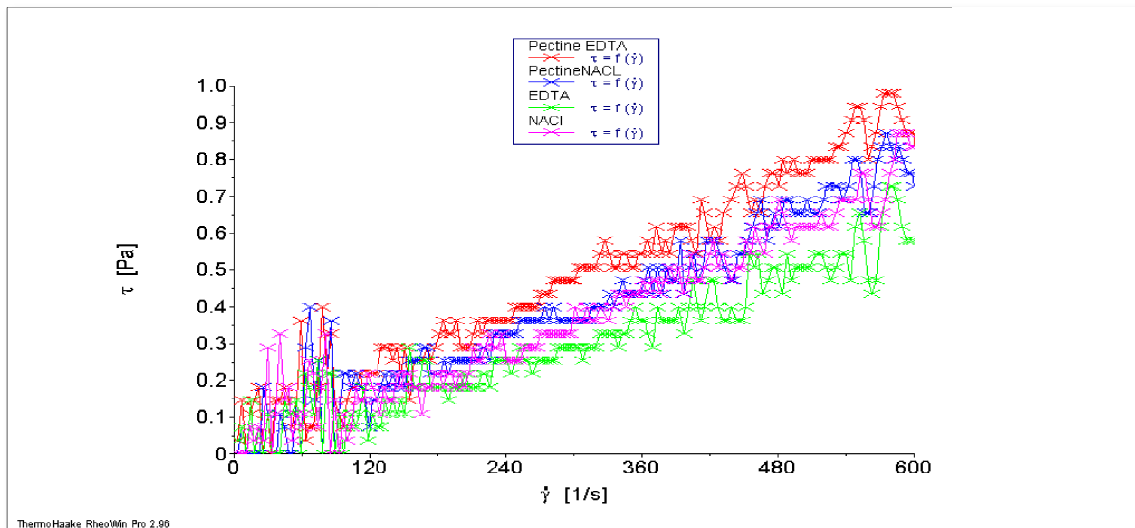


Figure 96. La contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement d'une pectine à 0,1 % dans une solution de NaCl et d'EDTA

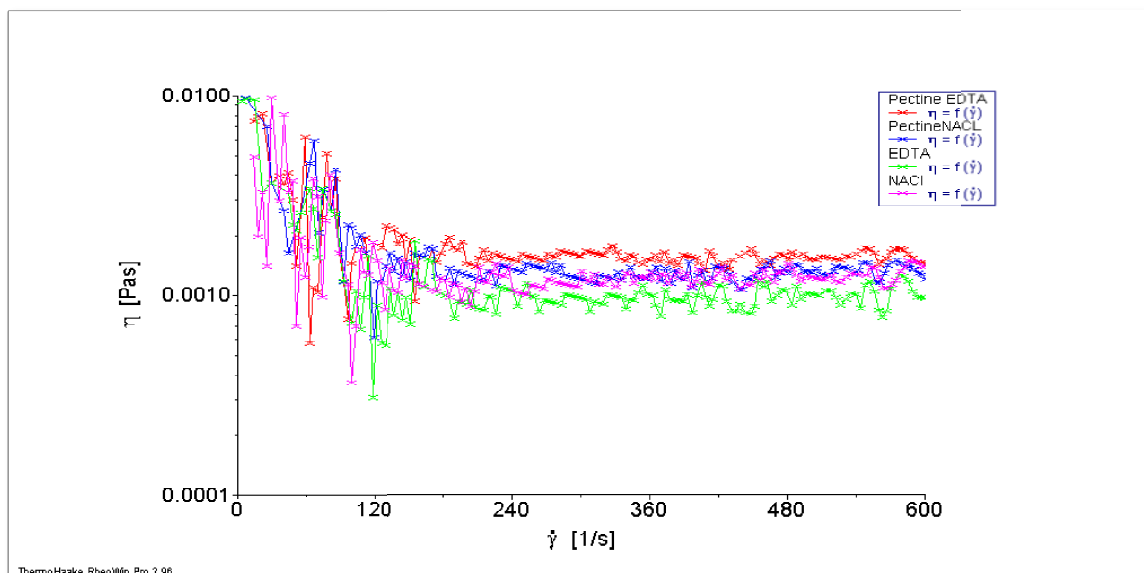


Figure 97. Variation de la viscosité apparante en fonction du taux de cisaillement d'une pectine 0,1 % dans une solution de NaCl et d'EDTA

18.8 Chromatographie de la pectine sur DEAE-cellulose échange d'anions

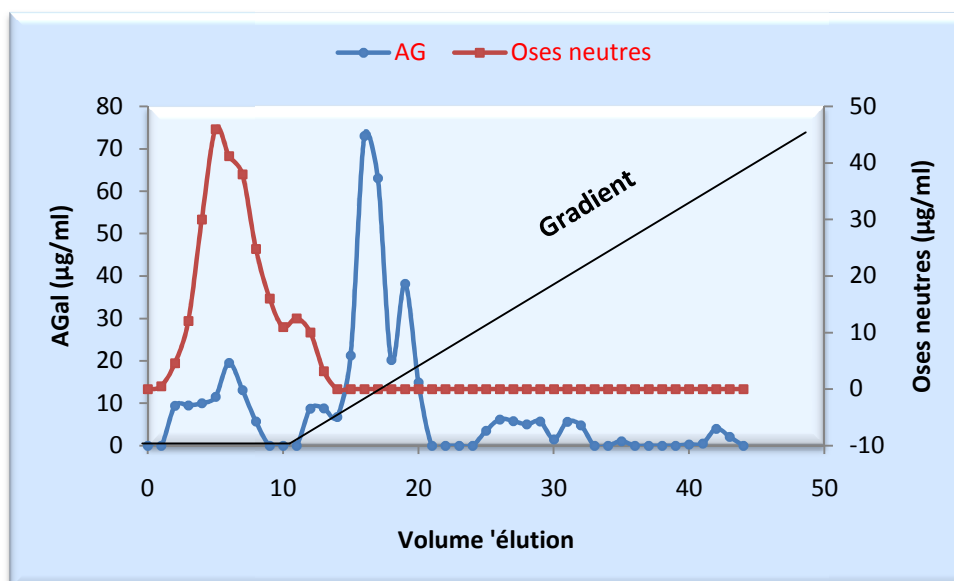


Figure 98. Profil d'élution de la pectine par chromatographie d'échange d'ions DEAE-Cellulose. Colonne QTY10 (1,5x15 cm), tampon d'élution acétate de sodium (0,1 M, pH4,2), débit: 1,2 ml/min, fraction: 3 ml

Le profil d'élution de la pectine par chromatographie à échange d'ions (figure 98) montre plusieurs fractions dont deux sont bien distinctes. La première fraction est éluée entre 0 et 10 ml aux faibles forces ioniques (0.05 M), cette fraction est celle qui n'a pas été adsorbée par le gel de DEAE cellulose, la concentration des oses neutres est élevée dans cette fraction, c'est la fraction neutres non chargée; l'autre fraction est majoritaire, elle apparait après désorption par le tampon à une force ionique de 0.2 M après un volume d'élution de 15 ml, cette fraction est riche en acide galacturonique et pauvre en oses neutres, c'est la fraction acide chargée négativement de la pectine. Ce profil se rapproche dans sa ressemblance aux profils de chromatographie des pectines par échange d'ions décrits dans la littérature (Aoussat 1978; Barbier and Thibault 1981; Benchabane 1984) .

18.9 Hydrolyse de la pectine par l'endopolygalacturonase.

la pectine en solution à 0,1 % dans le tampon acétate a été hydrolysée par l'endopolygalacturonase purifiée ayant une activité de 26,84 U/ml et une activité spécifique de 298,22 U/mg de protéines. L'analyse des fractions prélevées toutes les 15 minutes (tableau 34), montre la réduction brutale de la viscosité spécifique(η_{sp}) dans les 30 premières minutes de la réaction. Cette chute s'accompagne de production de groupements réducteurs qui

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

révèlent l'augmentation de l'hydrolyse et la réduction du poids moléculaire. Nous nous sommes inspiré des travaux de Rodriguez-Nogales, et al. (2007) pour calculer le taux de conversion de réacteur (C_v), la productibilité endopectolytique (P_u) et la productivité pectolytique dépolymérisante (P_{PD}); ces paramètres sont des facteurs cruciales dans l'application industrielle des enzymes et la productivité du processus; ces paramètres ont été calculées par les équations suivantes:

$$C_v = \frac{\text{viscosité spécifique initiale} - \text{viscosité spécifique au temps } t}{\text{viscosité spécifique initiale}}$$

$$P_u = \frac{\text{viscosité spécifique initiale} - \text{viscosité spécifique au temps } t}{\text{concentration en enzyme}}$$

$$P_{PD} = \frac{C_{GU}}{C_e} ; \quad \text{Avec}$$

C_{GU} qui est la concentration en groupements uroniques dans le milieu réactionnel et C_e est la concentration enzymatique.

Nous observons dans le tableau n° 34 que les trois paramètres sont proportionnels au temps de la réaction, on peut dire que ces paramètres dépendent de la cinétique de la réaction. Le taux de conversion du réacteur initiale (C_v) évolue considérablement dans les 30 premières minutes, le maximum de conversion est de 65,6 % après une heure de réaction avec maximum de productivité endopectolytique (P_u) qui est égal à 27,11 mg enzyme⁻¹ /ml. Tandis que la productivité pectolytique dépolymérisante continue à évoluer, à la fin de la réaction elle atteint une valeur de 1,66. Ces paramètres donnent une idée sur la quantité d'enzymes nécessaire à mettre en œuvre pour une meilleure productivité, en effet dans ces conditions 1 mg d'enzyme est suffisant à dégrader la pectine en 30 minutes en solution modèle.

Rodriguez-Nogales, et al. (2007) ont rapporté que la conversion maximale du réacteur et la concentration en sucres réducteurs ont été atteintes avec la concentration la plus élevée en enzyme (0,06%), tandis qu'à la concentration la plus basse (0,03%), des valeurs de productivité optimales (P_u et P_{PD}) ont été détectées. Les conditions optimales obtenues étaient 0,03% et 0,7% de concentration d'enzyme et de substrat respectivement, 46 ° C de température, une heure d'incubation et un pH de 4,8; dans ces conditions, la conversion du réacteur et la productivité endopectinolytique étaient 61% et 7,2 mg 1 ml⁻¹, respectivement.

Tableau 34. Suivi des paramètres de productivité de l'hydrolyse enzymatique de la pectine

Temps (min)	η_{sp}	$C_{GU}(\text{mg/ml})$	P_{PD}	$C_v (\%)$	P_u
0	2.75	0,007	0.077	0,00	0,00
15	2.12	0,02	0.22	16,8	7,00
30	1.25	0,10	1.11	40	16,66
45	0.50	0,12	1,33	60	25,00
60	0.31	0,13	1,44	65,6	27,11
75	0.31	0,13	1,44	65,6	27,11
90	0.31	0,14	1,55	65,6	27,11
105	0.31	0,15	1,66	65,6	27,11

18.10 Chromatographie de gel de filtration de la pectine avant et après hydrolyse.

La solution de pectine hydrolysée a été précipitée par ajout de l'éthanol 95%, le coagulum formé a été lavé trois fois par l'éthanol à 70 %, puis redissout dans une solution tampon acétate pH 4,2. 1 ml de cette solution pectique est déposé en haut de la colonne garnie du gel séphadex G100 et équilibrée par le tampon acétate. l'élution de la pectine hydrolysée révèle l'apparition de plusieurs pics dont la teneur en acides galacturonique ne dépasse pas 21 μg /ml (figure 100). La chromatographie de cette solution avant hydrolyse revèle un pic majoritaire dont la teneur en acide galacturonique est 55,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ce pic est apparu au début de l'élution, la fraction pectique relative à ce pic est de taille plus importante, un autre pic dont la teneur en acide galacturonique est 21,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ qui apparait au volume d'élution de 71 ml (figure 100). Il nous paraît que les fractions pectiques de la solution après hydrolyse sont de tailles moins importantes que la fraction élue avant hydrolyse. En se référant aux travaux laborieux de Thibault (1983), on déduit qu'il s'agit des oligomères de tailles différentes produits de la dégradation de la chaîne pectique. La fraction de pectine relative au pic majoritaire avant hydrolyse a été dégradée par l'endoPG en produisant des polymères de petites tailles qui apparaissent à des volumes d'élutions différents dans le graphe d'élution de la pectine après hydrolyse.

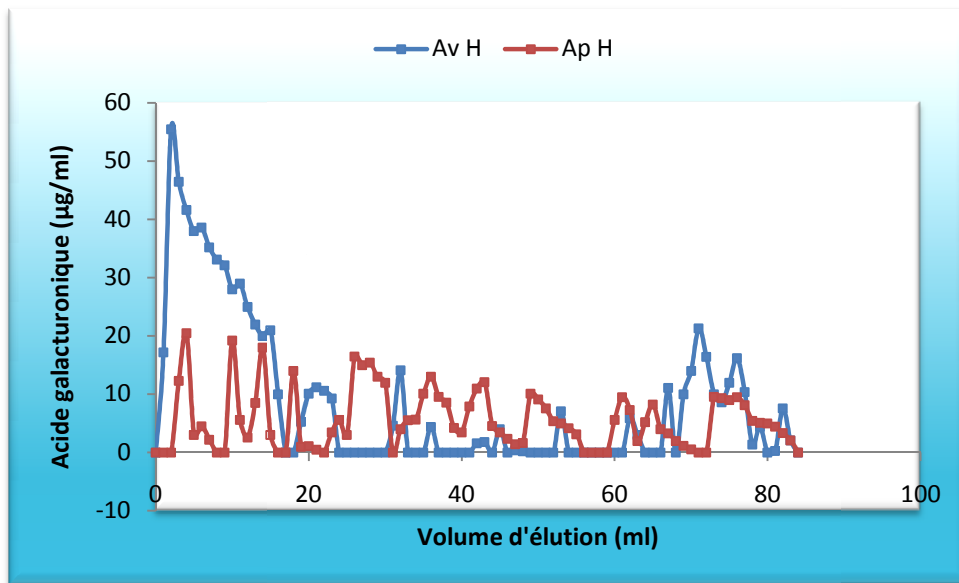


Figure 99. Chromatographie de filtration sur séphadex G100 de la pectine avant et après hydrolyse. (Colonne QTY10 1,5x30 cm), tampon acétate (0,1 M, pH 4,2) , débit 1,2 ml/min fraction: 3ml.

18.11 Obtention du jus de pomme

Le jus brut obtenu avec et sans macération par les enzymes pectolytiques est représenté par la figure (100). L'aspect visuel des jus montre que le jus brut obtenu par macération enzymatique de la pulpe en utilisant l'enzyme commerciale d'*A.niger* provenant de *Sigma* (c) est plus diaphane que le jus brut non traité (a) , ce dernier est plus opaque et d'une couleur brune plus intense. Le jus issu du fruit traité par l'EEB (b) nous paraît plus clair que le jus brut mais aussi opaque relativement au jus des pommes traitées par l'EC.

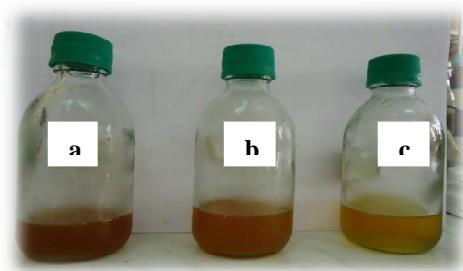


Figure 100. Aspect visuel du jus brut obtenu par macération enzymatique des pommes en comparaison avec un jus témoin; (a): sans macération; (b) macération par l'EEB; macération par l'enzyme commerciale (EC).

A priori, il y a une amélioration considérable dans le rendement en jus pommes traitées par l'enzyme commerciale (EC) par rapport au jus témoin et au jus de pommes traitées par l'EEB (figure 101). Cette différence dans l'aspect et dans le rendement peut être expliquée par l'action synergique des enzymes pectolytiques pour la dégradation de la pectine dans la paroi

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

cellulaire. Pilnik and Voragen (1993) ont rapporté que la dégradation des pectines conduit à l'augmentation du jus. Sachant que l'enzyme commerciale est composée d'un mélange d'enzymes pectolytiques purifiées comme la PME, EndoPG et PL qui réagissent en synergie pour la dégradation de la molécule complexe de la pectine dans la paroi cellulaire, par conséquent le rendement en jus est plus élevé et plus translucide.

Dans l'EEB ces enzymes sont présentes, mais les activités de certaines étaient faibles, en plus la présence d'autres substances dans l'extrait brut peuvent ralentir l'action synergique des enzymes pectolytiques détectées. L'hydrolyse des substances pectiques dépend de plusieurs variables comme le type de l'enzyme hydrolytique, la température et le pH, ces paramètres nécessitent une optimisation pour une meilleure extraction en jus (Jacob, et al. 2008c). les conditions optimale d'extraction du jus du fruit de goyave étaient à une quantité d'enzyme de 0,7 mg/10 g, une température de 43°C et une macération pendant 7 heures (Kaur, et al. 2008). De leurs cotés Oszmianski, et al. (2011) ont rapporté que le rendement en jus obtenu lors du traitement enzymatique de la pomme variaient de 92,3% à 95,3% en employant Pectinex XXL et Pectinex Ultra SPL, ce qui est nettement supérieur au rendement du témoin sans traitement enzymatique (81,8%). Le traitement des carottes la papaye, les bananes et les poires par l'extrait enzymatique brut du *Bacillus sp.* a montré une amélioration considérable dans le rendement en jus (Soares M.M.C.N., et al. 2001)

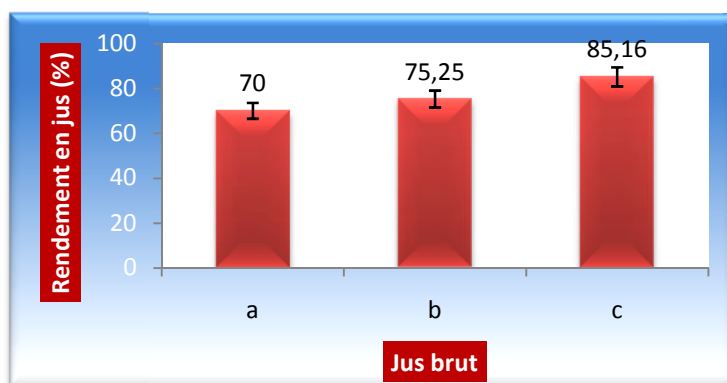


Figure 101. Rendement en jus de pomme, a: jus de pomme témoin; b: jus de pommes traitées par l'EEB; c: jus traité de pommes traitées par EC

18.12 Dépectinisation du jus brut

L'essai de dépectinisation du jus brut par l'endoPG (EP) a montré une amélioration significative dans la clarté et dans l'odorat du jus, relativement au jus brut témoin et au jus traité par l'EEB (figure 102). L'action de l'endoPG sur la pectine dans le jus de pomme nous semble plus importante relativement à l'action de l'EEB sur ce jus. cela peut s'expliquer par

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

l'activité spécifique élevée de l'endoPG purifiée, par son mode d'action aléatoire et par la nature de la pectine présente dans le jus de pomme. En effet l'action de l'endoPG est plus efficace autant que le degré d'estérification de la pectine est faible, dans ce travail le degré d'estérification de la pectine extraite des pommes était 33,33 %. En outre nous supposons que la pectine eut pu être desestérifiée pendant le traitement enzymatique de macération des pommes.

Les caractéristiques physicochimique du jus clarifié par l'EC, par l'endoPG et par l'extrait brut sont représentées par tableau n°35.

Tableau 35. Résultats comparatifs des analyses physicochimiques du jus de pomme obtenu avant et après traitement enzymatique

paramètre	⁰ Brix (%)	PH	Turbidité (UN)	DO à 420nm
Jus témoin	12,20 %	4,15	44,10	2,20
Jus traité par l'EC	12,50 %	3,38	0,50	0,52
Jus traité par l'endoPG	11,65 %	3,45	4,62	0,58
Jus traité par l'EEB	13,20 %	3,75	13,8	0,92

Nous n'avons pas observé de différences significatives dans le brix des jus clarifiés. Nous observons une légère différence entre le pH des jus clarifiés par les enzymes et le jus témoin; les jus clarifiés sont légèrement plus acides que le jus témoin, le pH est 3,38, 3,45 et 3,75 dans les jus clarifiés par l'EC, l'endoPG et l'EEB respectivement contre 4,15 dans le jus témoin. Cette différence peut être attribuée à la présence des résidus d'acides galacturoniques non estérifiés dans le milieu. Nakkeeran, et al. (2011) a rapporté que le pH dans le jus témoin est 4,05; les pH relevés pour le jus traité par des pectinases produites par fermentation sur milieu liquide et solide sont de 3,82 et 3,81. De son côté, le jus de pomme traité par des enzymes commerciales a un pH de 3,55. L'action des pectinases n'engendre pas une grande variation du pH dans le jus; ce qui permet de sauvegarder les valeurs optimales du pH de ce dernier pour une meilleure conservation.

Par contre une différence considérable est observée dans la turbidité: 0,5 UN, 4,62 UN et 13,8 UN dans le jus traité par l'EC, par l'endoPG et par l'EEB respectivement contre une turbidité initiale de 44,1UN dans le jus brut. Cette diminution dans la turbidité est expliquée par la dégradation des particules en suspension qui formaient le trouble dans le jus.

La mesure de la densité optique à 420 nm permet la mesure de la clarté et la couleur brune du jus: plus le jus est clair plus la DO est basse. Toutes fois les particules en suspension dérangent l'absorption de la lumière. Selon le tableau n° 35, la DO du jus témoin (2,2) est

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

nettement supérieure à celle du jus traité par l'extrait enzymatique brut (0,92) qui est à son tour légèrement plus trouble que le jus clarifié par l'enzyme commerciale (DO = 0,58); le jus traité par la polygalacturonase purifiée est aussi limpide que le jus traité par l'EC, sa densité optique est 0,58.

Nous estimons que l'endopolygalacturonase purifiée peut être utilisée pour la clarification des jus de fruits acides, dans le cas où la nature de la pectine dans le jus est moyennement ou faiblement estérifiée.

18.13 Optimisation de la clarification enzymatique du jus de pomme par la polygalacturonase purifiée

L'étude de la clarification du jus de pomme par l'extrait enzymatique purifié de polygalacturonase a été menée en variant trois paramètres; le temps de la réaction d'hydrolyse, le volume de l'extrait enzymatique et la température de la réaction, en utilisant un plan factoriel complet à deux niveaux, la réponse de l'analyse factorielle est la turbidité du jus filtré. La planification des expériences par la combinaison des facteurs selon le plan factoriel complet (tableau 37) donne 20 essais à réaliser, 8 essais noyaux, 6 essais aux points étoilés et 6 essais au centre ($N = 2^3 + 3 \cdot 2 + 6$). L'analyse du plan factoriel dans le domaine des expériences noyaux, montre que tous les facteurs sont significatifs, cela est montré par le diagramme de Pareto de la figure 103, et l'analyse de la variance ANOVA ci-dessous (tableau 36).

Tableau 36. Analyse de la variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	0,281244	0,040178	2142,81	0,000
Linear	3	0,099819	0,033273	1774,56	0,000
température	1	0,009506	0,009506	507,00	0,000
dilution	1	0,088506	0,088506	4720,33	0,000
temps	1	0,001806	0,001806	96,33	0,000
2-Way Interactions	3	0,179619	0,059873	3193,22	0,000
température*dilution	1	0,028056	0,028056	1496,33	0,000
température*temps	1	0,146306	0,146306	7803,00	0,000
dilution*temps	1	0,005256	0,005256	280,33	0,000
3-Way Interactions	1	0,001806	0,001806	96,33	0,000
température*dilution*temps	1	0,001806	0,001806	96,33	0,000
Error	8	0,000150	0,000019		
Total	15	0,281394			

L'analyse de la variance montre que tous les coefficients sont importants ($p < 0,05$) et la valeur de F est élevée (2142,81).

Tableau 37. Résultats de planification des expériences

N°	Facteurs enodées			Facteurs en valeurs naturelles			Réponses	
	X ₁	X ₂	X ₃	T° (c)	EndPG ml	Temps (mn)	Turbidité (UN)	Turbidité (UN)
				X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	1	1	1	45	0,75	45	0,65	0,65
2	1	1	-1	45	0,75	15	0,92	0,92
3	1	-1	1	45	0,25	45	0,94	0,94
4	1	-1	-1	45	0,25	15	1,10	1,09
5	-1	1	1	25	0,75	45	1,00	0,99
6	-1	1	-1	25	0,75	15	0,84	0,84
7	-1	-1	1	25	0,25	45	1,08	1,07
8	-1	-1	-1	25	0,25	15	0,89	0,89
9	-1,68	0	0	18,2	0,5	30	1,11	1,12
10	+1,68	0	0	51,8	0,5	30	1,40	1,90
11	0	-1,68	0	35	0,08	30	1,21	1,20
12	0	+1,68	0	35	0,92	30	0,98	0,98
13	0	0	-1,68	35	0,5	4,6	1,13	1,11
14	0	0	+1,68	35	0,5	55,2	0,71	0,71
15	0	0	0	35	0,5	30	1,03	1,00
16	0	0	0	35	0,5	30	0,91	1,00
17	0	0	0	35	0,5	30	1,03	1,02
18	0	0	0	35	0,5	30	1,02	1,01
19	0	0	0	35	0,5	30	0,95	0,95
20	0	0	0	35	0,5	30	0,81	0,98

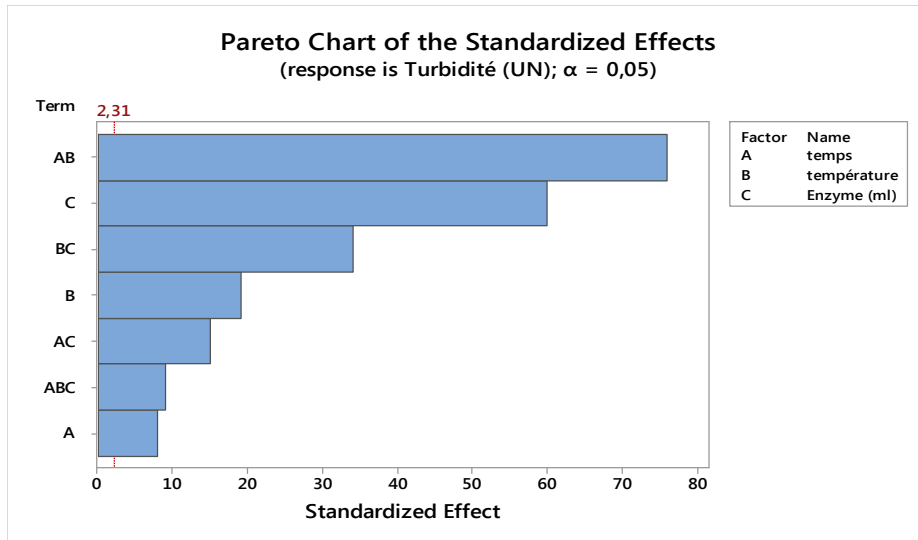


Figure 103. Diagramme de Pareto

La relation entre la réponse turbidité est les facteurs (température, temps de réaction, et volume d'endoPG) est une régression linéaire avec un coefficient de régression $R^2 = 99,95 \%$:

$$\text{Turbidité } (\bar{Y}) = 0,2947 + 0,020813 \text{ température} + 0,1363 \text{ dilution} + 0,019063 \text{ temps} \\ - 0,008250 \text{ température} * \text{dilution} - 0,000496 \text{ température} * \text{temps} \\ + 0,00508 \text{ dilution} * \text{temps} - 0,000283 \text{ température} * \text{dilution} * \text{temp}$$

La relation entre les valeurs observées et les valeurs prédites est mise en évidence avec la droite de régression linéaire dont le coefficient $R^2 = 99,9 \%$. (figure 104)

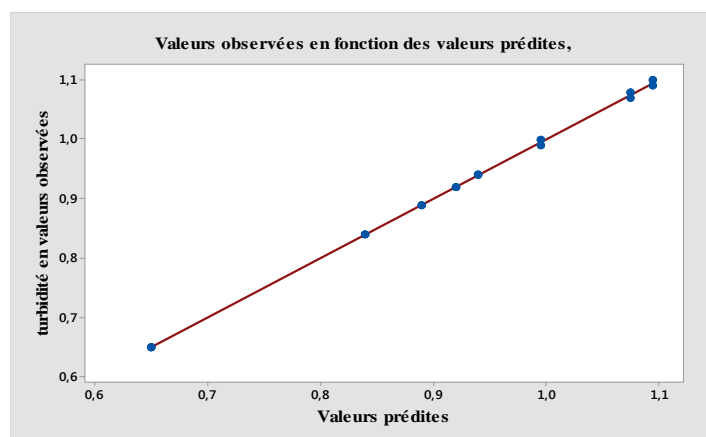


Figure 104. Linéarité entre les valeurs observées et les valeurs prédites de la turbidité

D'après le diagramme des effets principaux (figure 105), il apparaît que le volume d'enzyme mis en œuvre pour la réaction possède un effet plus important que la température et temps de la réaction sur la turbidité du jus filtré. Ce résultat est en accord avec les résultats de Kaur, et al. (2008) qui ont rapporté que la concentration enzymatique dans le milieu réactionnel est la variable la plus importante qui influe la clarification en jus et le rendement en jus.

Ainsi, la ligne joignant les réponses moyennes pour 0,25ml et 0,75ml de polygalacturonase a une pente plus raide que la ligne joignant les réponses moyennes pour les paramétrages minimaux la température et le temps d'hydrolyse.

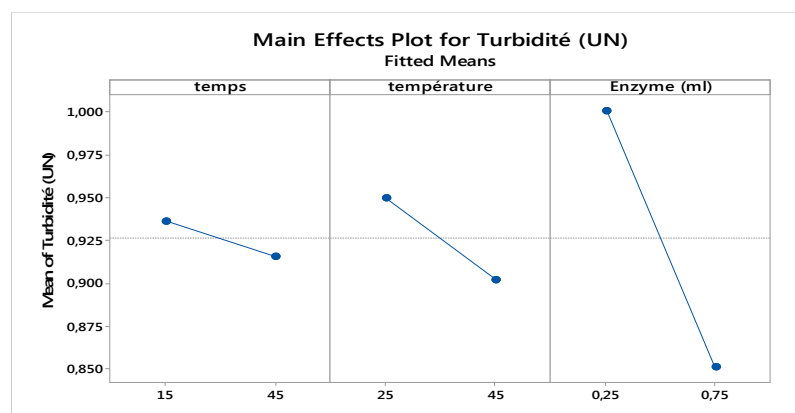


Figure 105. Diagramme des effets principaux pour la turbidité

L'effet interactif linéaire entre la température et le volume d'enzyme ajouté est montré par la figure (106). On observe que la turbidité est minimale quand la quantité d'enzyme et la température sont élevées; La clarté du jus augmente avec l'augmentation de la température. L'effet interactif entre la température et le temps d'hydrolyse est bien observé sur la figure 107 telque, l'augmentation du temps et la diminution de la température entraînent l'augmentation de la turbidité. Une incubation prolongée à haute température n' a pas été préférée; cela peut être dû au fait que la durée d'incubation prolongée peut entraîner la formation de particules brume constituées de protéines – glucides ou d'un complexe protéines-tanins; De même, lorsque la température de traitement est très proche de la température d'activité optimale de l'enzyme, la dégradation des substances pectiques peut être plus rapide que la floculation et la sédimentation (Jacob, et al. 2008c). lorse que la température est 35°C on observe une regression linéaire entre la tutbidité et la quantité d'enzyme ajoutée (figure 108), la vlaeur maximale de a clarté du jus est obtenue quand la quantité d'enzyme est maximale. La manière dont le temps a influencé la turbidité du jus nous semble en accordances avec les propriétés de

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

la polygalacturonase déterminées dans ce travail; telque l'hydrolyse de la pectine a été observée pendant les 30 premières minutes, au delà l'importance du temps devient négligeable.

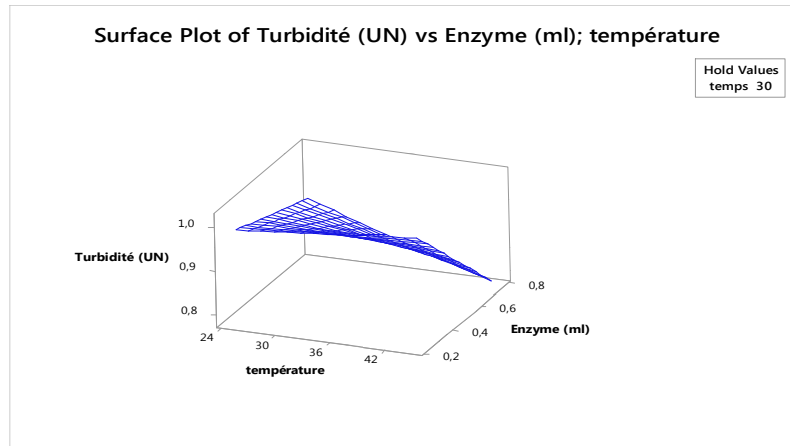


Figure 106. Influence du volume de l'enzyme et de la température sur a turbidité du jus

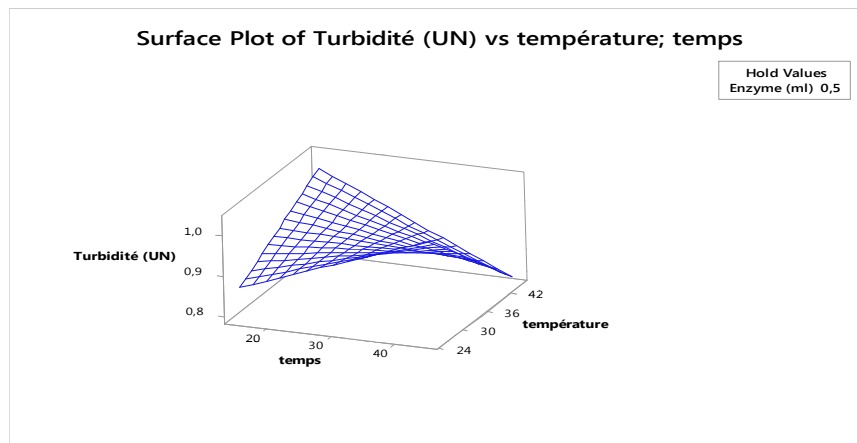


Figure 107. Influence du temps et de la température sur la turbidité du jus

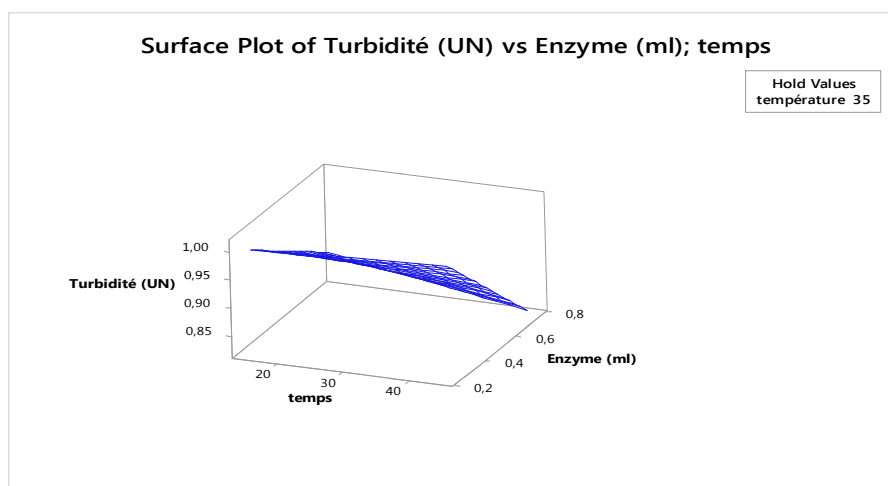


Figure 108. Influence du temps et du volume de l'enzyme sur la turbidité du jus.

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

L'utilisation du plan composite centré par le moyen de Minitab 17 nous a permis d'optimiser les conditions d'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme. Les résultats montrés par le diagramme d'optimisation (figure 109), révèlent la valeur optimale de la turbidité qui est 0,40 (UN), le coefficient de désirabilité (d) est égal à 1, ce qui signifie que toutes les réponses se situent dans les limites acceptables, c'est le cas idéal de l'optimisation. Les conditions de clarification optimales calculées par Minitab sont :

- Température: 40°C
- Temps: 55,22 min
- Enzyme : 0,9 ml

La température optimale de l'hydrolyse du trouble dans le jus par la polygalacturonase est dans la fourchette des températures optimales d'activité de la polygalacturonase, obtenues lors de la caractérisation de cette enzyme en utilisant la pectine d'agrumes comme substrat (Chapitre III), les températures optimales de son activité se situent entre 30°C et 40 °C .

Le temps optimal calculé par Minitab nous paraît satisfaisant, et correspond aux propriétés de l'endoPG dont son action sur la pectine est rapide pendant les 30 premières minutes.

La quantité d'enzyme de 0,9 ml correspond à une activité de 25,95 U, cette quantité d'enzyme a permis la dépectinisation 100 ml de jus de jus de pomme. Jacob, et al. (2008c), ont appliqué une polygalacturonase produite par les *Streptomyces lydius* à la clarification du jus de fruit du sapodille, en utilisant le plan de Box-Behken, ils ont obtenu un modèle significatif qui montre l'influence du temps, la température et la quantité d'enzyme sur la turbidité du jus. Les conditions optimales étaient à 34°C, pendant 70 min et à une concentration d'enzyme de 1,15 U. Les conditions optimales de clarification du jus de sapodille par pectinex d'*A.niger*, étaient à 40°C pendant un temps d'inubation de 120 min et une concentration enzymatique de 0,1 % (Sin H., et al. 2006). Il a été signalé que les conditions optimales de clarification du jus de banane en employant pectinex Ultra PL-L sont à 43,2 °C pendant 80 min avec une concentration enzymatique de 0,084%.

Chapitre IV. Application de la polygalacturonase à l'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

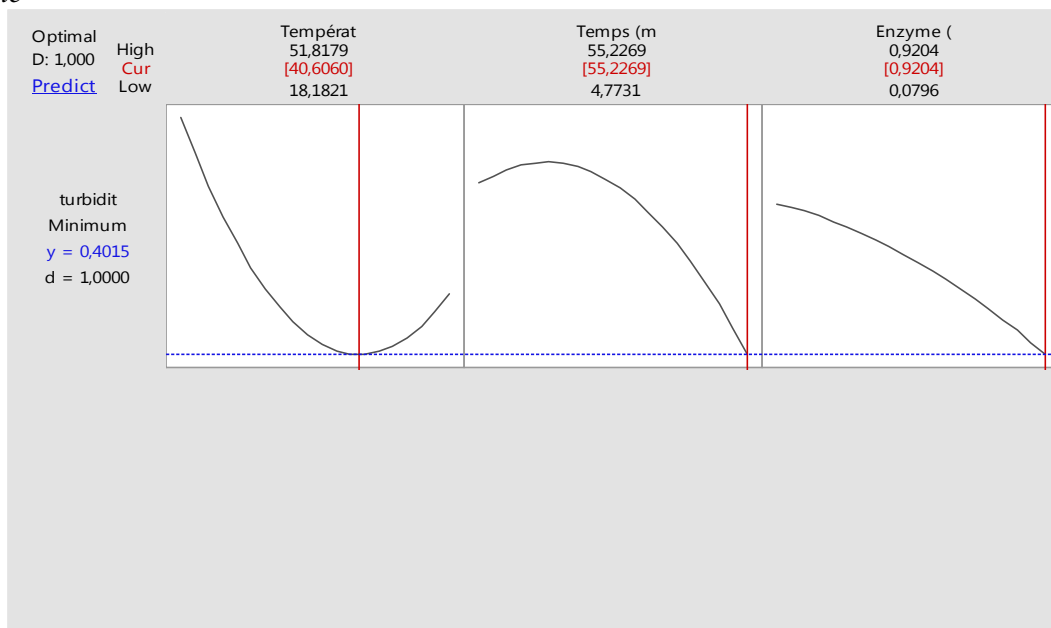


Figure 109. Optimisation des conditions d'hydrolyse du trouble dans le jus de pomme

Conclusion

L'action de la polygalacturonase purifiée sur la pectine extraite des pommes était déterminante. Cette enzyme a des propriétés intéressantes, elle a été appliquée avec succès pour la clarification du jus de pomme. Les conditions réactionnelle de la PG dans le jus (milieu complexe) concordent avec ses conditions réactionnelle dans la solution de pectine (milieu modèle).

Les méthodes statistiques comme le plan factoriel complet présentent un outil efficace et rapide pour l'optimisation des conditions de clarification enzymatique du jus. Les résultats de l'optimisation des facteurs de clarification du jus sont en bonne accordance avec les propriétés de l'enzyme et avec les propriétés chimique du jus qui ne nécessit pas d'être ajusté pour l'action enzymatique.

Pour une conclusion capitale nous souhaitons en perspective de compléter cette étude par la mise en œuvre de l'action synergique de la PG avec les autres enzymes (PME, PL)

Chapitre V

**Approche à l'immobilisation des pectinases
obtenues par les alginates de sodium**

Valorization of brown algae (*Cystoseira caespitosa*) from local region in Algeria for sodium alginate extraction and their application in the immobilization of microbial pectinases

N. Hachemi-Benmalek*¹, A. Nouani¹, A. Benchabane²

¹Food Technology Research Laboratory of Boumerdes University (Algeria).

² Research Laboratory of Food Technology and Humain Nutrition of higher National School of Agronomie.

* Corresponding author: hachemi.nabila@yahoo.fr; Tel: 0773982513

ARTICLE INFO

Article History:

Received : 15/04/2019

Accepted : 03/08/2019

Key Words:

Immobilization;
Alginate;
Pectinolytic enzymes.

ABSTRACT/RESUME

Abstract: Sodium alginate were extracted from brown algae (*Cystoseira Caespitosa*) collected from Algerian Mediterranean coast. the physicochemical characteristic of sodium alginate showed that the average yield was 12% and the average molecular masse was 9000Da calculated using intrinsic viscosity data. Fourier transform infrared spectroscopy was used to characterize the extracted powder of sodium alginate, COO⁻ and C-O-C were evident in the finger print region, the ratio of guluronic acid (G) / mannuronic acid (M) was recorded to be 0.91. This polysaccharide were used to immobilize crude pectinolytic enzymes synthesized by a strain of *Aspergillus niger* sp. The immobilization was carried out by dropwise introduction of alginate-enzyme mixture into a 0.2M CaCl₂ solution, by this technique, alginates shrinking in the form of spherical beads. The calcium alginate beads have been analyzed using scanning electron microscopy (SEM), observation under SEM showed that the beads have a rough surface and the enzymes were successfully included in the beads. The immobilization efficiency was about 83.9% and the immobilized enzyme could be reused in 4 cycles keeping 42,14% of its initial activity. The beads were successfully used for apple juice clarification.

I. Introduction

Pectic substances refer to a complex class of carbohydrate polymer composed of galacturonic acid, a carbohydrate uronic acid linked through α -1-4-glycosidic linkage and widely found in primary cell walls and middle lamella of higher plants [1]. Pectinases is a generic term used for the complex group of enzymes that catalyze the hydrolysis of pectin breaking α -1-4-glycosidic linkage of galacturonic acid to reduce the viscosity which is responsible to cause turbidity

and undesirable cloudiness in the fruit juice. Pectinases are widely used in the food industry for the clarification of fruit and vegetable juices as well as in the wine industries [2]. Despite the high catalytic properties of pectinase, the use of the free enzyme still presents certain problems such as low stability, product recovery and repeated continuous use [3].

Enzymatic immobilization is the only means of support for overcoming these problems, which not only improves the catalytic properties of the enzyme, but allows for continuous reuse of an

expensive enzyme to make it economically viable for industrial applications [4].

The immobilization of the enzymes is generally carried out by three main methods (i) covalent binding to a support (support), (ii) adsorption of enzyme molecules on a support material and (iii) entrapment or encapsulation of enzyme in polymer matrices. Both covalent bonding and adsorption methods have disadvantages in that they have the potential to affect the substrate binding site of the enzyme and enhance the limitation of diffusion to the enzyme which ultimately results in decreased enzymatic activity [5]. Entrapment is a one-step process in which the chances of lost activity are comparatively low. Different synthetic and non-synthetic polymers such as polyacrylamide, agar and alginate have been used for the entrapment of enzymes as well as cells [6], [7]. The appeal of insoluble calcium alginate beads has been shown to be the most effective approach due to biocompatibility, low cost, availability and resistance to microbial contamination compared to other methods [8]. Calcium alginate beads have been reported to be one of the most potent carriers compared to others for the immobilization of different enzymes [9]. Alginate derived from brown algae is widely used to form gels in which enzymes can be attached by chemical crosslinking agents [10]. Pectinases were immobilized in alginate by single inclusion [11]. However, its residual activity was slightly lower or had a lower stability making it difficult to use on an industrial scale.

The objective of this work is twofold, it consists first in producing microbial free at low cost, then immobilizing them on a support of sodium alginate produced locally from the macroalgae very available on the Algerian coast. This experimental approach allows reuse of immobilized pectinases.

II. Material and methods

A. Plant Material Preparation and Extraction of Sodium Alginates.

The algae used are of the genus *Cystoseira* harvested in January and February 2017 at the beach of Cap Djenat (located in east of Algiers) by manual pulling. The algae samples are cleaned, sorted, washed, dried and then ground to obtain fine powder.

The extraction of sodium alginates from the algal powder was carried out according to the protocol described by [12]. The previously weighed algal powder was partially depigmented by immersion in chloroform for 24 hours, this operation was followed by leaching in 0.5N sulfuric acid for 6 hours, in this stage of preparation, the insoluble alginate salts located in

the cell of algae transforms to insoluble alginic acid, while the calcium, sodium and magnesium ions are released as sulphates and removed by the washings. The alginates are released into the aqueous phase as soluble sodium alginate after carbonation by immersing the leached algal material in a 4% sodium carbonate solution for six hours with gentle agitation at a temperature not exceeding 50 °C. The carbonation process is followed by flocculation and flotation to separate the sodium alginate solution from the particles of suspended algal material. Finally, the alginates are precipitated by acidic ethanol at pH 2 and the alginate precipitate is recovered by filtration and then dried by lyophilization.

B. physicochemical characterization of alginate

The water content in the sodium alginates was determined by drying portion of 1 g in an oven at 105 °C to constant weight and the ash content was determined by mineralization of this portion in a muffle furnace at 600 °C for 6 hours. The average viscometric molecular mass M_v of the alginates was determined by the Mark Houwink equation (equ.1)

$$[\eta] = 1,60 \times 10^{-2} M_v^{0,748} \quad (1)$$

Where $[\eta]$ is the intrinsic viscosity. This is the limit of the reduced viscosity of the solution when the concentration tends to 0. It is determined by plotting the reduced viscosity of a series of dilutions of the alginate solution as a function of their respective concentrations.

The sodium alginate powder was also analyzed by infrared absorption spectrophotometry. The spectra (IR) were recorded using a Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) type Shimadzu 8400.

The absorption range of the wavenumber radiations comprised between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} makes it possible to reveal the presence of certain characteristic functional groups.

C. Microbial Synthesis of Pectinolytic Enzymes.

The synthesis of pectinolytic enzymes was carried by fermentation according to the technique described by [13]. The fermentation was monitored in 250 ml Erlenmeyer flasks containing the culture medium which is composed of 10 g of citrus peel, 1 g of pectin, 1 ml of $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.1 ml of KH_2PO_4 , 1 ml of FeSO_4 , 0,01 g of urea and 10 ml of distilled water. After sterilization of flasks at 120 °C for 15 minutes, the culture medium was seeded with 1 ml of inoculums of *Aspergillus niger sp.* previously prepared according to [14]. The flasks were incubated at 30 °C for 10 days; The enzyme was extracted by adding 50 ml of sterile

distilled water to each Erlenmeyer. Flasks were agitated at a speed of 400 rpm / min for 30 minutes, the contents were filtered through a sterile gauze and centrifuged at 10000 rpm for 20 min at 4 ° C. The filtrate obtained was the crude enzymatic extract (EEB) used for the immobilization after its chemical analysis.

The soluble protein in crude enzyme was determined by Lowry method [15] using bovine serum albumin (BSA) as standard and the pectinolytic enzyme activity was determined by using 1% (w/v) citrus pectin as a substrate. One unit (U) of pectinase activity was defined as the amount of enzyme producing 1 μmol galacturonic acid per min at 40°C and pH 4,5. The galacturonic acid content was quantified by dinitrosalicylic acid (DNSA) method.

D. Immobilization of Pectinases by Sodium Alginate.

Five ml of a 0.4% of sodium alginate solution prepared in buffer solution at pH 4,5, was mixed with the same volume of enzyme extract (EEB) and gently stirred several time . The mixture was added dropwise into 0,2M CaCl₂ solution using syringe. In the presence of calcium, the alginates shrink as beads. Latter the alginate beads were transferred into another 0.2 M CaCl₂ Solution and incubated for 1 hour at 4°C. After this, the alginate beads are recovered by filtration and washed several times until the absorbance of the washings at 280 nm was zero.

E. Characterization of alginate beads

The morphology of the beads was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The amount of enzyme protein loaded into alginate beads was evaluated by subtracting the residual protein content in the solution from the initial protein content. The protein content was quantified by lowry method [15]. The pectinase activity in the beads was determined as it was described previously in paragraph II. 3.

The efficiency of the immobilization (E_i) was determined by equation 2:

$$E_i\% = \frac{A_L - A_S}{A_L} * 100 \quad (2)$$

Where A_L is the total activity of the crude free enzyme used for immobilization and A_S denotes the total activity in supernatant of the CaCl₂ solution.

The yield of immobilization was determined by equation 3:

$$Y_i\% = \frac{A_{IE}}{A_{IT}} * 100 \quad (3)$$

where Y_i is the yield of immobilization (%), A_{IE} is the total experimental activity of the immobilized enzyme (calculated considering the total mass of immobilized enzyme) and A_{IT} is

the total theoretical activity of the immobilized enzyme (A_{IT} = A_L - A_S).

The operational stability (OS) of the immobilized enzyme was determined after successive batch cycles of defined amount of the immobilized extract on the hydrolysis of citric pectin. The reaction time for each batch cycle was 5 min. The activity of the first cycle was considered as 100%. After each cycle, the bead containing pectinases were removed from medium and washed with distilled water and sodium acetate buffer.

F. Clarification of an Apple Juice.

The juice was extracted from apples purchased from local market using a household juice extractor, the juice was centrifuged at 3000rpm for 15 min and then filtered. The transmittance of the filtrate was measured at 660 nm using a visible UV spectrophotometer type Jasco V 530. The juice was heated at 50 °C and introduced into a column sizing 100 mm in height and 10 mm in diameter, using a peristaltic pump at a constant flow rate of 0.75 ml / min. The column was filled with calcium alginate beads. At the outlet of the column, fractions of juice were collected. each fraction was centrifuged and analyzed by reading its transmittance at 660 nm.

III. Results and discussion.

III. 1. Characterization of Plant Material

The macroscopic analysis of harvested brown algae has shown that it is *Cystoseira caspitosa* which belongs to the family of *fucal cystoseiraceae* of the class of *pheophyceae* which are *ochrophytes*. They vary in size from 8 cm to 12 cm, the outer morphology observed from a magnifying glass has shown that the species is composed of several axes, the thallus is branched and thorny, carrying an encrusting base and a short trunk carrying primary and secondary branches, the ultimate branches have the shape of thorns, (fig.1).

The moisture content in the algae reported by Bouchaud et al., [16] is 11% whereas that found in brown algae in this study varies between 10 and 35%. This difference in value in moisture is due to the storage conditions and the species of algae used. The average ash content was found to be 24.15%, this content is in the range reported by several authors [17] who found values that typically ranged from 8% to 40%.



Figure 1. Brown algae used; a: before harvest; b: after harvest.

III. 2. Characterization of Sodium Alginates

The sodium alginates are obtained in the form of a white powder which tends towards brown (fig. 2). This color is relatively lighter compared to the color of alginates extracted from *Sargassum duplicatum* by Indriani et al., [18].

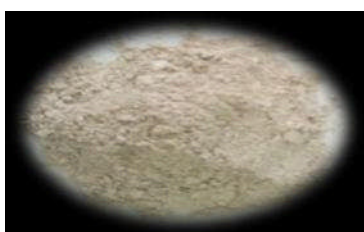


Figure 2. Sodium Alginate Powder Obtained

The Extraction and dehydration methods influence the color of alginates, which may contain traces of colored pigments. The extraction yield obtained is 16%; according to Romo et al., [19] and Loareg et al., [20] the alginate content in brown algae varies from 10 to 45% (relatively to dry matter). This difference varies according to the species considered, the physiological state of the algae, the period of harvest, also the age of the plant, or the extraction methods and the solutions used for their precipitation. The moisture content in the alginates was 4%, this value depends on the intensity and duration of drying and the storage conditions of the material. The ash content is 36%, a value close to those found by several authors who have worked on different varieties of brown algae. Values of 30% and 30.6% were reported by Sari-Chmayssen et al., [12] and Bi et al., [21], respectively, whose work focused on *Sagassum terranium*.

The average viscosimetric molecular mass of alginates recorded is 9000 Da, this value is low compared to that found by several authors, [22], [21]. Indeed, the average molecular mass of commercial alginates varies between 32,000 and 200,000 Da. According to Cho et al., [23], the conventional process for extracting alginates makes it possible to extract only the water-

soluble alginates, which corresponds to a yield of less than 10%. In addition, these water-soluble alginates have rheological qualities much lower than the alginates resulting from an alkaline extraction, in terms of ability to form gels and viscosity in aqueous solution. These differences can be explained by a large difference in mean molecular weights: 800 kDa for alginates from alkaline extraction and 12-45 kDa for alginates that have been pretreated with strong acids.

Table 1. Physicochemical Characteristics of Sodium Alginates.

Parameter	Value
Moisture (%)	4
Ash(%)	36
Viscosimetric molecular mass Mv (Da)	9000
Yield(%)	16 %

III. 3. Infrared Spectrophotometry of Sodium Alginates

The Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrum of alginate extracted from brown algae (Figure 3) contains a broad absorption band, the maximum of which is observed at 3433 cm⁻¹, this band is characteristic of hydroxyl group (OH), a weaker signal at 2924 cm⁻¹ is attributed to the stretching vibrations of the C-H bonds. The presence of two strong peaks at 1637 cm⁻¹ and 1418 cm⁻¹ is assigned to asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxyl groups of alginate (COO). The anomeric region of Carbohydrate, between 950 and 750 cm⁻¹, is the most discussed in the literature [24]. In the 948 cm⁻¹ region, the C-O stretching vibrations of the uronic acid residues appear while under our experimental conditions a peak at 993 cm⁻¹ is observed in our spectrum. The guluronic units give a band at approximately 1030 cm⁻¹, while the mannanuronic units originate a band at 1093 cm⁻¹ [25]. According to other authors [26], the characteristic peak of the mannanuronic group appears at 1125 cm⁻¹ and that of the guluronic group appears at 1030 cm⁻¹. Indeed, in this work a broad band appears between 1020 and 1239 cm⁻¹, it is characteristic of the CO-bonding osidic while the peaks which appear at 1122.41cm⁻¹ and 1113.81cm⁻¹ can be assigned to mannanuronic and guluronic acid respectively.

The physicochemical properties of alginate solutions and gels in aqueous media depend on their structure and the proportion of mannanuronic

residues with respect to guluronic residues (ratio noted M / G) as well as the number of and the length of the blocks MM, GG and MG. The most commonly used technique for calculating this ratio is the nuclear magnetic resonance (NMR). Several authors also try to estimate this ratio by means of infrared spectroscopy [26]. In the same way we estimate the ratio M / G by calculating the ratio of the absorbances at the frequencies 1122.41 cm⁻¹ and 1113.81 cm⁻¹ corresponding to the mannuronic and guluronic acid respectively. This ratio is found to be equal to 0.97, this value is close to 0.99 found by Bekattmania et al., [26] during infrared spectroscopic analysis of *Dictyopteris* species from Morocco.

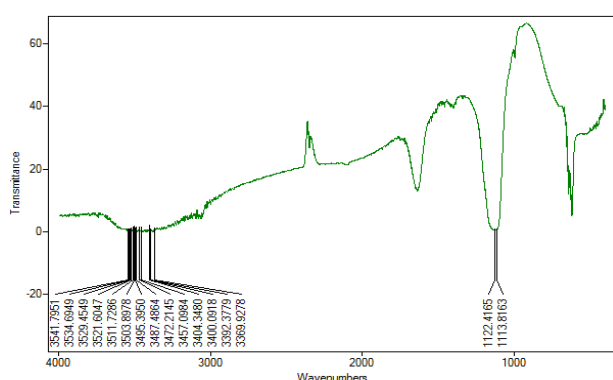


Figure 3. FTIR spectrum of alginate powder extracted from algae.

III. 4. Characterization of the Enzymatic Extract Brut (EEB)

After 10 days of incubation of the Erlenmeyer flasks at 30 ° C., the surface of the culture medium was completely covered by the characteristic black spores of the microorganism. The extraction of pectinases gave an EEB characterized by a soluble protein level equal to 63.82 mg / ml and an enzymatic activity equal to 395 U / ml which remains high compared to that observed by Suresh et al., [27]. Indeed, these authors used the DNSA method, and reported values between 22.12 and 162.5 U / ml for exo-PG activity produced by *Aspergillus carbonarius*. Otherwise, the exo-PG activity produced by *Aspergillus niger* was 142 U / ml whereas that produced by *Aspergillus oryzae* was 40 U / ml [28].

III.5. Study of Immobilization of Pectinolytic Enzymes by Calcium Alginate.

The enzyme immobilization technique gave spherical beads 0.5 cm in diameter (FIG.4). The

soluble protein level in the alginate beads was in the order of 11750 µg / mg. A pectinolytic activity in these beads confirms the entrapment of the enzymes by the calcium alginate polysaccharide. In fact, a value of 392.23 U / mg of polygalacturonase was obtained, a value close to the pectinolytic activity of free enzymes in the EEB.



Figure 4. Formation of alginate / pectinolytic enzyme beads.

immobilization efficiency and yield were 83.98% and 116.5% respectively. In previous work of Bustamante et al., [29], the immobilization efficiency of pectinases on a matrix composed of alginate / gelatin / calcium oxalate was 61.7% with the yield was 127%. Regarding the operational stability of the immobilized enzymes at each reaction cycle, a new amount of substrate was added for a new batch reaction until a residual activity of less than 50% was obtained, the same reactions conditions were used for a batches. The immobilized pectinase retained more than 54.82% residual activity on its second cycle and 42.14% during the fourth cycle of use (fig.5). In the work of Bustamante et al., [29], the immobilized derivative obtained using AGOCa as the immobilization support showed the best results, 42.38% of residual activity after 10 cycles of use. Relative activities of 46.33 and 44.89% were obtained after 8 and 7 cycles respectively for the alginate/oxalate and alginate/Calcium matrices. The loss of activity of entrapped enzyme is ma be due to leakage of enzyme from calcium alginate beads as results of washing of beads at the end of each cycle, in addition to possible conformational changes and mechanical damage after repeated cycles [30].

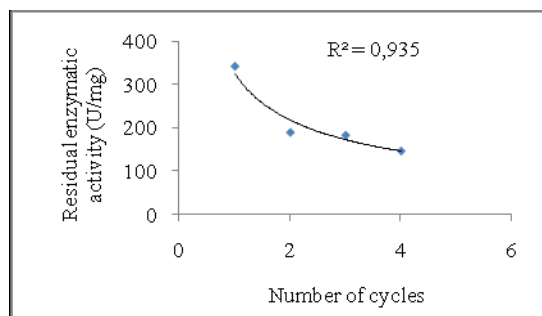


Figure 5. Operational stability of immobilized enzymes

III. 6. Morphological Study of Calcium Alginate beads

The pores of the calcium alginate beads were clearly observed in the calcium alginate grain micrographs at different magnification scales (Figure 6 (a), (b)). In photos (c) and (d) of Figure 4, the pores were coated with dense enzyme particles.

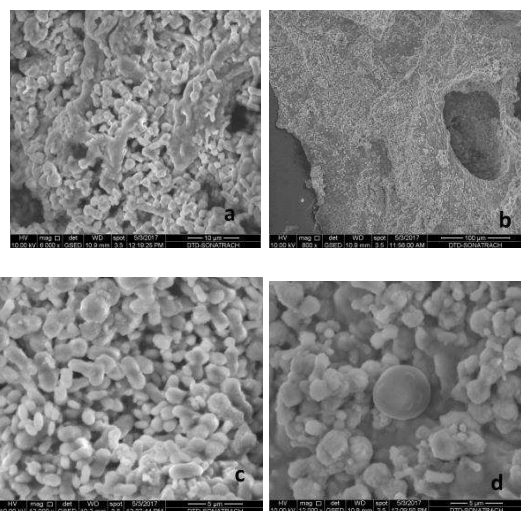


Figure 6. Scanning electron microscopic analysis of immobilized enzyme alginate

III. 7. Clarification of apple juice by immobilized enzymes

The transmittance at 660 nm of cloud apple juice increased from 2% to 88.6% in the clarified juice obtained at the outlet of the column.

This difference is due to the enzymatic hydrolysis of the pectins responsible of the cloud in the juice (FIG 7). These results are similar to those obtained by Hachemi et al., [14] during the clarification. of an apple juice by the free pectinases synthesized by the same microorganism which was cultivated on orange peels. Preliminary work on clarification of apple juice by immobilized pectinases reported a 45% transmittance in clarified juice [31].



Figure 7. Clarification of apple juice by the immobilized pectinolytic enzymes: (a) raw juice, (b) clarified juice.

These particles are similar to those observed by Rehman et al., [30]. The structural morphology of the calcium alginate beads is maintained after immobilization and the immobilized pectinases appear as black objects in the pores of the calcium alginates.

IV. Conclusion

This study allowed us to exploit the brown algae of a coastal region located east of Algiers in Algeria for the production of sodium

alginates. This biomaterial has been found suitable for the immobilization of pectinolytic enzymes by simple inclusion. The immobilized enzymes could be used more than four times for the enzymatic hydrolysis of pectic disorders. The enzymatic activity of the free pectinases synthesized by the microorganism was mostly preserved after their immobilization by the alginates and the immobilization efficiency was 83.89%. Moreover, the scanning electron microscopic analysis of the alginate beads after immobilization clearly showed the dense particles of enzymes that cover the pore of sodium alginates.

V. References

1. Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohen, D. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, (2001) 929–967
2. Kashyap, D.R.; Voha, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. Application of pectinases in commercial sector: a review. *Bioresou. Technol.* 77 (2001) 215–227.
3. Sheldon, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349, (2007) 1289–1307.
4. Mateo, C.; Plomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez Lafuente, R.; Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization technique. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, (2007) 1451–1463.
5. Bautista, F. M.; Bravo, M. C.; Campelo, J. M. A. Garcia, D. Luna, J. M. Marinas, J. Romero, " Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous AlPO₄ and other

- inorganic supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 72, (1998) 249–254.
6. Qader, S. A. U.; Aman, A. Low molecular weight dextran: Immobilization of cells of *Leuconostoc mesenteroides* KIBGE HA1 on calcium alginate beads. *Carbohydrate Polymer*, 87 (2012) 2589–2592.
7. Tuoping, Li.; Suhong, Li.; Wang, Na.; Lirui, T. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemist.*, 109 (2008) 703–708.
8. Smidsrod O.; Skjak-Brk, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnol.*, 8 (1990) 71–78.
9. Sadhukhan, R.; Roy, S. K.; Chakrabarty, S. L. Immobilization of α -amylase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Enzy. and Microb. Technol.*, 15, (1993) 801–804.
10. Gotoha, T.; Matsushima, K.; Kikuchi, K. Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. *Chemosphere*, 55(2003) 135–140.
11. Busto, M.D.; García-Tramontín, K.E.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. Preparation and properties of an immobilized pectinase for the treatment of fruit juices. *Biores. Technol.*, 97 (2006) 1477–1483.
12. Sari-Chmayssem, N.; Taha, S.; Mawlawi, H.; Benvegnu, T. Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties. *Journal of Appl. Phycol.*, 28, (2016) 1915–1929.
13. Acuna-Arguelles, M.E.; Gutierrez-Rogas, M.; Viniegra-Gonzalez, G.; Favela-Torres, E. Production and properties of three pectinolytic activity produced by *Aspergillus Niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, (1995) 808–814.
14. Hachemi, N.; Nouani, A.; Benchabane, A. Bioconversion of oranges wastes for pectinase production using *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Int. J. of Biolog., Biomolec., Agricult., Food and Biotechnol. engineer.* 9 (2015) 999–1004.
15. Lowry, O.M.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biology chemistry*, 139 (1991) 265–275.
16. Bouchaud, L.; Foubert, J.; Leblay, M.; Menager, Y.; Metz, S. La transformation des algues marines Bio en Bretagne. *Inter Bio Bretagne vous informe e point sr.* (2012)1–4.
17. Macartin, P.; Gill, Cl.; Books, M.; Campell, R.; Rowland, I.R. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Review.* 65, (2007) 5355–43.
18. Indriani, D.J.; Brudianto, E. A study of extraction and characterization of alginates obtained from brown macroalgae *Sargassum duplicatum* *Sargassum cassifolium* from Indonesia. *Dent. J.*, 46 (2013), 65–70.
19. Romo, S.; Perez-Marting, C. The use of immobilization in alginate beads for long term storage of *Pseudonabaena Galeato* (*Cyanobacteria*) in the laboratory. *Journal of phycol.*, 33(1997) 1073–1076.
20. Kloareg, B.; Quatrano, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharide. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review.* 26 (1998) 259–315.
21. Bi, F.; Mahmoud, S.J.; Arman, M.; Taj, N.; Iqbal, S. Physicochemical characterization and ionic studies of sodium alginate from *Sargassum tenarium* (brown algae). *phys. and chem. liq., an Inter. J.*, 45 (2007) 4536–461.
22. Theo, E.; Christian, N.O. Analyse des polysaccharides. *Techniques de l'ingenieur.* TA4 (2008) P3326.
23. Cho, S.Y.; Kang, H.J.; Joo, D.S.; Lee, L.S.; Kim, S.M. A comparative study on physical properties and gel formation abilities of hot water extractable material, water soluble alginate and alkali soluble alginate extracted from *Laminaria-japonica*, *Korean journal of fisheries and aquatic sciences.* 32 (1999) 774–778.
24. M. Mathlouthi, J.L. Koenig, “Vibrational spectra of carbohydrates,” *Adv Carbohydr. Chem. Biochem.*, vol. 44, pp. 7–89, 1986.
25. Sinha, S.; Astani, A.; Ghosh, T.; Schnitzler, P.; Ray, B. Polysaccharides from *Sargassum tenerimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochemistry*, 71(2010) 2352–42.
26. Belattmania, Z.; Zrid, R.; Reani, A.; Elatouani, S.; Sabbar, E.M.; Mourtadi, A.; El Moznine, R.; Cherkaoui, O.; Bentiss, F.; Sabour, B. Spectroscopic and rheological characterization of sodium alginate extracted from three Phaeophyceae seaweeds (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* and *Halopteris scoparia*) from El Jadida shoreline – Morocco (Caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates de sodium extraits de trois algues marines Phaeophyceae (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* et *Halopteris scoparia*) de la côte d'El Jadida – Maroc). *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 1654–1662.
27. Suresh, B. et Viruthagiri, T. Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Ind. J. of Sci. and Technol.*, 3 (2010) 867–870.
28. Sandri, I.G.; Fontana, R.C.; Barfknecht, D.M.; Silveira, M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Sci. and Technol.*, 44 (2011) 2217–2222.
29. Bustamante-Vargas, C. D.; Oliveira, Valduga, V.; Venquiaruto, L.; Paroul, N.; Backes, G.; Dallago, R. Biometric Mineralization of the Alginate/Gelatine /Calcium Oxalate Matrix for immobilization of pectinase: Influence of Matrix on the pectinolytic Activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 176 (2016) 2050–2057.
30. Rehman, H.U.; Aman, A.; Silipo, A.; Qader, S.A.; Molinaro, U.L.; Ansari, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate support”, *Food chemistry* 139 (2013) 1081–1086.

31. Chauhn, S.; Vohra, A.; Lakhanpal, A.; Gupta, R. Immobilisation of commercial pectinase (polygalacturonase) on celite and its application in jus clarification. *J. of Food Process. and Preser.*, 39 (2015) 1-7.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Les résidus d'oranges et de citron et le son de blé sont riches en matière organique et minérale, les résidus de citron et d'oranges sont particulièrement riches en substances pectiques et se caractérisent par un faible pH, tandis que le son de blé est particulièrement riche en protéines et fibres alimentaire, ces potentialités permettent aux microorganismes de se développer sur ces résidus en synthétisant des métabolites à faible cout par la biodégradation de la matière nutritive; ce qui permet de résoudre les problèmes environnementaux causés par ces résidus.

Le microorganisme utilisé pour la production des pectinases se développe bien sur les trois résidus, qui constituent non seulement une source de nutriments mais un habitat naturel pour les microorganismes filamenteux comme *A.niger*, par conséquent cette étude nous a permis de confirmer que la fermentation en milieu solide s'adapte à ce type de microorganismes mycéliens. la production des pectinases est plus élevée dans les résidus d'oranges par rapport aux deux autres résidus, l'utilisation de fermentation en milieu solide a amélioré la production de ces enzymes relativement à la fermentation en milieu submergée.

Nous estimons que *Aspergillus niger* utilisé est une nouvelle souche de microorganismes qui permet une production élevée en pectinases en utilisant les résidus d'oranges comme substrat en fermentation solide.

L'insolubilité totale des résidus d'orange, fait de la fermentation solide une technique potentiellement très intéressante pour les nouvelles valorisations par les procédés biologiques. Les résidus d'oranges séchés et broyés sont très condensés en matière nutritives relativement aux résidus frais, ce qui favorise la croissance rapide du microorganisme. Cependant les résidus frais se caractérisent par un tissu moelleux et non cristallin favorable à la croissance des moisissures. Malgré que le séchage peut induire des changements dans le tissu de la matière végétale, défavorables à la croissance des microorganismes (il peut causer le durcissement des granules par exemple), mais il reste la technique la plus utilisée pour le stockage de la matière.

L'étude de l'influence des facteurs de la fermentation en milieu solide sur la production des pectinases et la croissances des microorganismes est très importante. L'optimisation de ces facteurs peut améliorer la production des pectinases, ce qui peut avoir une incidence directe sur le cout de la production. La technique de la MSR est une technique rapide peu couteuse et s'adapte bien à l'optimisation des pectinases en FMS. Dans cette étude la MSR a permis d'améliorer le production plus de 8 fois en utilisant *Aspergillus niger* , cette espèce de microorganisme a montré une bonne capacité pour la production de ces enzymes en FMS.

Dans les conditions optimales les activités enzymatiques spécifiques étaient améliorées, cela peut faciliter la purification de ces enzymes.

Nous avons constaté d'après l'analyse bibliographique que beaucoup de recherches qui ont été développées sur l'étude et la purification des enzymes pectinolytiques qui dégradent la zone lisse du polysaccharide (homogalacturonane) de la pectine, mais peu de recherches qui ont été menées sur la purification des enzymes dégradant la chaîne hérissée (rhamnogalacturonane), peut être que c'est dû à la difficulté d'obtenir les substrats appropriés pour l'étude de la dégradation des rhamnogalacturonanes I et II.

La stratégie de la purification des pectinases appliquée dans cette étude, était rapide et peu coûteuse, elle nous a permis d'isoler une endopolygalacturonase intéressante de poids moléculaire 63 kDa en deux étapes: fractionnement par le sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, suivi par une chromatographie sur gel de filtration Séphadex G75.

L'application de l'extrait partiellement purifié à la chromatographie d'échange d'ions, nous a permis aussi d'isoler 3 pectinases: une lyase, une exopolygalacturonase et une endopolygalacturonase.

Le profil d'élution par chromatographie a révélé peu de pic, La majorité d'entre eux sont doués d'une activité pectinase, cela nous indique que le milieu de culture utilisé était spécifique à la production des pectinases, la pectine des résidus d'oranges induit en priorité la production des pectinases en milieu acide, enfin nous pouvons conclure à ce propos que le choix d'un milieu de culture approprié pour la production des enzymes inductibles est une première étape de purification de ces enzymes.

L'analyse de la polygalacturonase purifiée a montré que cette enzyme est stable à 4°C et 30°C pendant 4 heures; l'activité optimale de l'enzyme est entre 30°C et 40°C et à pH 3,8. Ces propriétés de l'enzyme intéressent son utilisation dans l'industrie de boisson, notamment pour la clarification enzymatique des jus des fruits et la macération de ces derniers.

Effectivement, la polygalacturonase purifiée a été appliquée avec succès pour la clarification du jus de pomme. Les conditions réactionnelles de la PG dans le jus (milieu complexe) concordent avec ses conditions réactionnelles dans la solution de pectine (milieu modèle).

L'immobilisation enzymatique représente un moyen de soutien qui augmente non seulement les propriétés catalytiques de l'enzyme, mais permet également une réutilisation continue d'une enzyme coûteuse pour la rendre économiquement viable pour les applications industrielles. En effet l'efficacité de l'immobilisation des enzymes pectinolytiques par

inclusion dans les alginates de sodium est de l'ordre de 83,98%. L'aptitude des perles d'alginate à enzymes immobilisée à la clarification d'un jus de pomme est nettement considérable, Nous estimons que les enzymes immobilisées sont plus efficaces et plus rapides relativement aux enzymes libres. L'agent d'immobilisation utilisé les alginates sont très disponibles dans la nature, son utilisation nous a permis à la fois d'immobiliser les enzymes pectinolytiques et de valoriser les algues brunes par extraction de ce polyssacharide qui est un constituant principal de leurs paroi cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Références bibliographiques

- Abbes, F., et al.
2011 Date syrup: effect of hydrolytic enzymes (pectinase/cellulase) on physicochemical characteristics, sensory and functional properties. *LWT- Food Sci Technol* 44:1827–1834
- Acuña-Argüelles, M, et al.
1994 Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters* 16(1):23-28.
- Acuña-Argüelles, M. E., et al.
1995 Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(5):808-814.
- Afifi, A.F., E.M. FAWZI, and M.A. FOAAD
2002 Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 on orange peels waste, solid state culture. *Annals of Microbiology* 52:287-297.
- AFNOR
1980 Association française de normalisation *In* Produits dérivés de fruits et légumes. Paris.
- Aguilar, G., and C. Huitrón
1990 Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus sp. CH-Y-1043* on different carbon source. *Biotechnology Letters* 12(9):655-660.
- Ahmed B., et al.
2014 Extraction and standardization of selected fruit juices by enzymatic process. . *Peak Journal of Food Science and Technology*, 2(18-27):18.
- Albagnac, G., Patrick V., and M. Jean-Claude
2002 Technologies de transformation des fruits. . Paris France.
- Alcantara, S. R., F. A. C. Amlmeida, and F. L. H. da Silva
2010 Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: Water activity and influence of nitrogen source. *Chemical engineering Transactions* 20:121-126.
- Aliaa, A.R.N., M.K.S. Mazlina, and F.S. Taip
2010 Impact of commercial pectolytic enzymes on selected properties of white dragon fruit juice. *J Inst Eng Malays* 71:25–31.
- Amid, M., Y. Manap, and K. Zohdi
2014 Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizu*. *European Food Research and Technology* 239:21-29.
- Amorim, H.V., and V.L. Amorim
1977 Coffee enzymes and coffee quality. Volume 47. Washington: ACS Symposium Serie.
- Anand, G., S. Yadav, and D. Yadav
2016 Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber. *3 Biotech* 6(2):201.
- Anvari, M., and G. Khayati
2014 The effect of citrus pulp type on pectinase production in solid-state fermentation: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Journal of Bioscience and Biotechnology* 3(3):227-233.

- Aoussat, A.
1978 Composition et formation d'un trouble protéo-pectique dans le jus de framboise dépectinisé., Thèse. Institut national de la recherche agronomique Faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon.
- Assamoi, A. A., J. Destain, and P. Thonart
2009 Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. BASE 13(2):1-21.
- Audigié, CL., J. Figarella, and F. (1984). Manipulations d'analyse biochimique. Doin éditeur-Paris. 275p. Zonszain
1984 Manipulations d'analyse biochimique. Volume 4. Paris: DOIN RDITEURS.
- Bai, Z. H., et al.
2004 Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. Bioresource Technology 95(1):49-52.
- Bajpai, P.
1999 Application of enzymes in the pulp and paper industry. . Biotechnology Progress 15:147-157.
- Baker, R. A., and J. H. Bruemmer
1969 Cloud stability in the absence of various orange juice soluble components. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 82:215-220.
- Balkan, B., and F. Ertan
2007 Production of A-amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-state Fermentation by using Some Agricultural By-products. . Food Technology and Biotechnology 45:439-442.
- Bambidis, V.A., and P.H. Robinson
2006 Citrus by-products as ruminant feeds: A review. Animal feed science and technology 128(3-4):175-217.
- Barbier, M., and J.F. Thibault
1981 Pectic substances of cherry fruits. Phytochemistry, 21(1):111-115.
- Barman, S., et al.
2015 Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. Journal of Food Science and Technology 52(6):3579-89.
- Barnby, F.M., F.F. Morpeth, and D.L. Pyle
1990 Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. . Enzyme Microbial Technol 12:891-897.
- Baron, A., and J.F. Thibault
1985 Les enzymes pectolytiques. *In* Les hydrolases et les dépolymérase- Enzymes d'interet industriel. Gauthier-Villars, ed. Pp. 144-163. Biochimie appliquée. Paris: Bordas.
- Baş, D., and İ. H. Boyacı
2007 Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering 78(3):836-845.
- Bauer, S., et al.
2006 Development and application of a suite of polysaccharidedegrading enzymes for analyzing plant cell walls. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:11417–11422.
- Bauer, W. J., et al.

- 2010a principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Lausanne: PPUR Presses polytechniques et universitaires Romaines.
- Bauer, W. J., R. Badoud, and L. Löliger
2010b Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Amazon France: PPUR Presses polytechniques.
- Belarbi, A., et al.
2000 Study of some physico-chemical characteristics of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase: a possible use in baverage industry. *Journal of Industrial Microbiology et Biotechnology* 24:296-300.
- Bellon-Maurel, V., O. Orliac, and P. Christen
2003 Sensors and Measurements in Solid State Fermentation: A Review. . *Process Biochemistry* 38:881-896.
- Benchabane, A
1984 Extraction et appreciation des substances pectiques à partir des résidus de fabrication des jus d'orange et de pomelo., Intitut national agronomique d'Alger, Institut national agronomique d'Alger.
- Benchabane, A., et al.
2006 Evaluation des pectines et des activités polygalacturonases au cours de la aturation de la datte *Deglet-nour*. *Sciences des aliments* 26:237-250.
- Benen, J.A.E., et al.
2003 Mode of action analysis and structure – function relationships of *Aspergillus niger* pectinolytic enzymes. . Dordrecht: Kluwer.
- Bhardwaj, V., and N. Garg
2014 Production, purification of pectinase from *Bacillus* sp. MBRL576 isolate and its application in extraction of juice. *International Journal of Science and Researc* 3:648-652.
- Bibi, N., S. Ali, and R. Tabassum
2016 Statistical Optimization of Pectinase Biosynthesis from Orange Peel by *Bacillus licheniformis* Using Submerged Fermentation. *Waste and Biomass Valorization* 7(3):467-481.
- Biz, A., et al.
2016 Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering journal* 111:54-62.
- Blandino, T., S. Iqbalsyah, and Pandiell A.
2002 Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(2):164-169.
- Blum, J.-C.-A.
1989 Elevage des Monogastriques. L'alimentation des animaux monogastriques : porc, lapin, volailles. Paris.
- Boccas, F., et al.
1994 Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of food science and technology-mysore* 31:22-22.
- Botella, C., et al.
2005 Hydrolytic enzyme production by *Asergillus awamori* on grape pomace *Biochem Engineering* 16:100-106.
- Box, G.E.P., W.G. Hunter, and J.S. Hunter
1978 *Statistics for Experimenters*. New York.
- Box, G.E.P., and K.B. Wilson

- 1951 On the experimental design for attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society B* 13:1-45.
- Braconnot, H
1825 *Anales de chimie et de physique-Anals of chemistry and physics.* 28:173-178.
- Brisset Munoz Espinosa, L.C.
2012 *Texture de la purée de pomme : influence de la structure sur les propriétés rhéologiques et la perception sensorielle - effet du traitement mécanique., Almrntation et nutrition, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)*
- Brown, M. R., and Ough C.S
1981. A comparison of activity and effects of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32:272-276.
- Browning, B.L.
1963 *The Chemistry of Wood.* *Science* 142(3599):1564.
- Buyukkileci, A. O., M. F. Lahore, and C. Tari
2015 Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38(4):749-60.
- Buyukkileci, A. O., C. Tari, and M. Fernandez-Lahore
2011 Enhanced production of exo-polygalacturonase from agro-based products by *Aspergillus sojae*. *BioResources* 6(3):3452-3468.
- Camperi, SA., M. Grasselli, and O. Cascone
2000 High-speed pectic enzyme fractionation by immobilized metal ion affinity membranes. *Bioseparation* 9:173-177.
- Casas Lopez, J.L., et al.
2003 Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology* 33:270-277.
- Castilho, L.R., R.A. Medronho, and T.L.M. Alves
2000 Production and extraction of pectinases obtained by solid-state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol* 71:45-50.
- Celestino, SMC., et al.
2006 Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology*, 123:33-42.
- Černá, M., et al.
2003 Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers* 51(4):383-389.
- Chahal, D. S.
1983 Growth characteristics of micro-organisms in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulase production. *American chemical society symposium* 207:421-442.
- Chandel, V., et al.
2016 Standardization of eco-friendly technique for extraction of pectin from apple pomace *Indian Journal of Natural Products and Resources* 7(1):69-73
- Chassagne-Berces, S., F. Fonseca, and M. Marin
2013 Congélation des produits végétaux-maitriser la qualité des fruits congelés *In* *Technique de l'ingénieur*. Pp. 1-28, Vol. F 6277. Paris.
- Chen, Q. H., G. Q. He, and A. M. A. Mokhtar

- 2002 Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus sp. EL31410* with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 30(5):667-672.
- Chyr, S.C.
1987 Tables of feed composition Taiwan. *In* Taiwan livestock research institute. . Tainan, Chine.
- Cochran, W. G., and G. M. Cox
1957 *Experimental Designs*. New York: Wiley.
- Coenen, G., et al.
2007a Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* 70:224-235.
- Coenen, G. J., et al.
2007b Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*. 70:224-235.
- Colin-Henrion, M., et al.
2009 Instrumental and sensory characterisation of industrially processed applesauces. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89:1508-1518.
- Combo, A.M., M. Aguedo, and M. Paquot
2011 Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(1):153-164.
- Contreas-Esquivel, J.C., and C.E. J Biotechnol Voget
2004 Purification and partial characterization of na acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii*. *Journal of Biotechnology* 8:110-121.
- Cooke, R. C., and J.M. Whipps
1993 *Ecophysiology of fungi*. *In* Blackwell Scientific. Pp. 337.
- Couto, S. R., and Ma Á. Sanromán
2006 Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3):291-302.
- Crawshaw, R.
2003 Co-product feeds: animal feeds from the food and drinks industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(4):362-362
- Cready, M.C.
1970 *Pectin*. New York and London.
- Darah, I., M. M. J. Taufiq, and S. H. Lim
2013 Pomelo Citrus grandis (L.) osbeck peel as an economical alternative substrate for fungal pectinase production. *Food Science and Biotechnology* 22(6):1683-1690.
- Davies G.J., and Henrissat B.
2002 Structural enzymology of carbohydrate-active enzymes : implications for the post-genomic era. *Biochemical Society Transactions* 30:291-287.
- De Gregorio, A, et al.
2002 SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology* 83(2):89-94.
- de Vries, R.P., et al.
2000 Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 327:401-410.
- de Vries, R.P., et al.
2005 The value of genome sequences in the rapid identification of novel genes encoding specific plant cell wall degrading enzymes. *Current genomics* 6:157-187.
- de Vries, R.P., and J. Visser

- 2001a *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:497-522.
- De Vries, R.P., and J. Visser
2001b *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology review* 65:497-522.
- Demir, H., and C. Tari
2014 Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products* 54:302-309.
- Demir N., et al.
2001 The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of food engineering* 47:275-280.
- Denis Silva, et al.
1990 Factors affecting pectatelyase activity during membrane filtration. *Biotechnol Tech* 4:127 - 132.
- Devi, N.A., and A.G.A. Rao
1996 Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzyme and Microbial Technology*. 18(1):59-65.
- Dey, T. B., et al.
2014 Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT - Food Science and Technology* 59(1):591-595.
- Dhillon, S. S., et al.
2004 Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *International Journal of Environmental Studies* 61(2):199-210.
- Diaz-godinez, G., et al.
2001 Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology et Biotechnology* 26(5):271-275.
- Diaz A.B., et al.
2011 Applicability of enzymatic extracts obtained by solidstate fermentation on grape pomace and orange peels mixtures in must clarification. *LWT - Food Science and Technology* 44:840–846.
- Dinu, D., et al.
2007 Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of Biotechnology* 131:128–137.
- Dobrev, G.T., et al.
2007 Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design *Biresour Tecnol* 98:2671-2678.
- Dogan, N., and C. Tarib
2007 Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *In Biotechnology and Bioengineering Programme*, . Izmir, Turkey: Izmir Institute of Technology,.
- Duchiron, F., and E. Copinet
2011 Fermentation en milieu solide (FMS). *In Techniques de l'ingénieur*. Pp. 13, Vol. Doc. BIO 620 France.
- Dzogbe, V.P., and D.K. Djokoto

- 2006 Combined effects of enzyme dosage and retention time on papaya juice extraction with the aid of pectic enzymes-a preliminary report. *Journal of Food Biochemistry* 30:117-122.
- El-Sheikh, M.M., et al.
2009 Effective technological pectinases by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the Egyptian orange juice industry scraps. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63(1):12-18.
- Engasser, J-M.
1988 *Biotechnologie: Modélisation des processus de fermentation*. Volume 3. Paris: Scriban, R.
- Faravash, R. S., and F. Z. Ashtiani
2008 The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. *Food hydrocolloids* 22(1):196-202, .
- Favela-Torres, E., T. Volke-Sepúlveda, and G. Viniegra-González
2006 Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology* 44:221-227.
- Federici, F., and M. Petruccioli
1985 Growth and polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange peel waste. *Microbiology Aliments Nutrition* 3:39-46.
- Federici, L., et al.
2001 Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23):13425-30.
- Fenghour, H., A. Ladjama, and Z. Taibi
2002 Recherche de l'Activité Pectinolytique Chez 22 Souches de Champignons Microscopiques Isolées d'un Sol de la Region'El Kala. *Technologies Avancées* 14.
- Fielding, AH., and RJ. Byrde
1969 The partial purification and properties of Endopolygalacturonane and α -L-Arabinofuranosidase secreted by *Sclerotinia fructigena*. *J Gen Microbiol.*:58:84.
- Finkler, Anelize Terezinha Jung, et al.
2017 Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 121:1-12.
- Fissore, E.N., et al.
2009 Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin-enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). *Journal of Food Engineering* 93:293-301.
- Fonseca, M.J.V., and S. Said
1995 Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:174-177.
- Fontana, R. C., S. Salvador, and M. M. Silveira
2005 Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(8):371-7.
- Fournier, J., et al.
2012 Analyse granulométrique principe et méthodes. *In* Centre national de la recherche scientifique: école pratique et hautes études.
- Freitas, P.M.N., et al.

- 2006 Production and partial characterization of polygalacturonase production by thermophilic *Monascus* sp. N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp. N12 on solid state fermentation. . *Brazilian Journal of Microbiology* 37:302-306.
- Friedrich, J., A. Cimerman, and W. Steiner
1990 Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II-trihydrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33:377-381.
- Fukoka, S., et al.
1990 Facile isolation of endopectate lyase from *Erwinia carotovora* based on electrostatic interaction. *Appl Biochem Biotechnol* 26:239-248.
- Gadre, RV., et al.
2003 Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor fl avus*. . *Enzyme Microb Technology* 32:321-330.
- Gailing, M. F., A. Guibert, and D. Combes
2000 Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. *Bioprocess Engineering* 22:69-74.
- Ganivors, A., et al.
2000 Purification and characterization of acidic endo polygalacturonase encoded by the PGL-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* . . *FEMS Microbiology Letters* 1831:131-135
- Garg, G., et al.
2016 Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6(1):47.
- Garzon, C.G., and R.A. Hours
1992 Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Bioresource Technology* 39(1):93-95.
- Gayen, S., and U. Ghosh
2011 Pectinmethylesterase Production from mixed agro- wastes by *Penicillium notatum* NCIM. 923 in *Solid-State fermentation. Bioremediation and Biodegradation* 2:1-4.
- Gervais, P., et al.
1988 Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering* 31:457-463.
- Gewali, B. M., et al.
2007 Studies on polygalacturonase from *Aspergillus flavus* *Scientific World* 5(5):19-22.
- Ghildyal, N. P., et al.
1981 Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *Journal of Food Science and Technology* 18:244-257.
- Gidley, M. J., E. Chanliaud, and S. eds. pp. 39-46. Whitney
2002 Influence of polysaccharide composition on the structure and properties of cellulose-based composites. In *Plant biopolymer science*. Manchester, UK, : The Royal Society of Chemistry.
- Gloria, M. P., E. B. Mubofu, and O. C. Chande
2010 Post harvest changes in physico-chemical properties and levels of some inorganic elements in off vine ripened orange (*Citrus sinensis*) fruits cv(Navel and Valencia) of Tanzania. *African Journal of Biotechnology* 9(12):1809-1815,.
- Gnanasambandam, G., and A. Proctor

- 2000 Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 68.
- Gomes, J., et al.
2011 Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioproducts Processing* 89(4):281-287.
- Growthaman, M.K., C. Krishna, and M. Moo-Young
2001 Fungal solid state fermentation - An overview. Volume 1. Netherlands: Khachatourians, G.G. et Arora, D.K.
- Gummadi, S. N., and T. Panda
2003 Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochemistry* 38(7):987-996.
- Gummadi, S.N., N. N Kumar, and S.D. KUMAR
2007 Structural And biochemical properties of pectinases. *In Industrial Enzymes*, . J.P.a.A.P. MacCabe, ed. Pp. 99-115. India.
- Gupta S., et al.
2008 Production and recovery of an alkaline exopolygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Bioresour Technol* 99:937–945.
- Heerd, D., C. Tari, and M. Fernandez-Lahore
2014 Microbial strain improvement for enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus sojae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(17):7471-81.
- Heerd, D., et al.
2012 Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus spp.* in solid-state fermentation: A comparative study. *Food and Bioproducts Processing* 90(2):102-110.
- Hendges, D. H., et al.
2011 Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54:253-258.
- Herbstreith, and Fox
2006 From Fruits to Pectin. H.F.K. Pektin-Fabriken, ed. Pp. . Germany.
- Herron, S.R., et al.
2000 Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *In Proceedings of the National Academy of Sciences*. Pp. 8762–8769, Vol. 97. USA.
- Holker, U., and J. Lenz
2005 Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* 8(3):301-6.
- Hoondal, G., et al.
2002 Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 59:409-418.
- Hours, R.A., C.E. Voget, and R.J. Ertola
1988 Some factories affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. *Biological Wastes* 24:147-157.
- Hubbell, C. H.
1980 Feedstuffs analysis table. *In Feedstuffs*. Pp. 42-47, Vol. 52.
- Ismail, Ab-M. S.
1996 Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochemistry* 31(7):645-650.
- Jacob, N., C. Asha Poorna, and P. Prema
2008a Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology* 99(14):6697-6701.

- Jacob, N., et al.
2008b Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiol Res* 163(5):538-44.
- Jacob, N., and P. Prema
2006 Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology and Biotechnology* 44(2):263-267.
- Jacob, N., R. K. Sukumaran, and P. Prema
2008c Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice: a statistical perspective. *Appl Biochem Biotechnol* 151(2-3):353-63.
- Jagiassi, S. R. .
2013 Production of bacterial pectinase from agro- industrial wastes, . *In National conference on biodiversity: Status and challenges in conservation-*. Pp. 77-87. FAVEA.
- Jahan, N., et al.
2017 Utilization of agro waste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. *Heliyon* 3(6):e00330.
- Jayani, R. S., S. Saxena, and R. and Gupta
2005 Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biotechnology* 40:2931-2944.
- Jeanette, R., et al.
2007 *Science des aliments*. . Paris France: Lavoisier.
- Joshi, M., M. Nerurkar, and R. Adivarekar
2015 Characterization, kinetic, and thermodynamic studies of marine pectinase from *Bacillus subtilis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, . *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3):205-220.
- Joshi, V.K., M. Parmar, and Rana N. S.
2006 Pectin Esterase Production From Apple Pomace in Solid-State and Submerged Fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 44(2):253-256.
- Juwon, A.D., Akinyosoye F. A., and O.A. Kayode
2012 Purification, Characterization and Application of Polygalacturonase from *Aspergillus niger* CSTRF *Malaysian Journal of Microbiology* 8(3):175-183.
- Jyothi, T.C., S.A. Singh, and A.G.A. Rao
2005 The contribution of ionic interactions to the conformational stability and function of polygalacturonase from *A. niger*. *International Journal of Biol. Macromol.* 36:310-317.
- Kamoun, P.
1977 *Appareils et Méthodes en Biochimie*. 20, rue de Vaugirard, 75006 Paris.
- Kant, S., A. Vohra, and A. Gupta
2013a Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification* 87(1):11-16.
- Kant, S., A. Vohra, and R. Gupta
2013b Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expr Purif* 87(1):11-6.
- Kapoor, M., et al.
2000 Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MGcp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. . *Process Biochemistry* 36:803-807.
- Kapoor, M., and R.C. Kuhad

- 2002 Improved polygalacturonase production from *Bacillus sp.* MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Applied Microbiology* 34(5):317-322.
- Kareem S.O., and Adebawale A.A.
2007 Clarification of orange juice by crude fungal pectinase from citrus peel. *Niger Food J* 25(1).
- Kashyap, D R., et al.
2001 Application of Pectinase in the Commercial Sector: a review. *Bioresource Technology* 77:215-227.
- Kashyap, D.R., et al.
2000 Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp.* DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12:177-282.
- Kashyap, D.R., S.K. Soni, and R. Tewari
2003 Enhanced production of polygalacturonase by *Bacillus sp.* DT7 using solid state fermentation *Bioresour Technology* 88:251-254.
- Kaur, S. J, and V. K. Gupta
2017 Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 67(4): 333–342.
- Kaur, S., et al.
2008 Optimization of enzymatic hydrolysis pretreatment conditions for enhanced juice recovery from guava fruit using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* 2(1):96-100.
- Kaushal, N.K., and V.K. Joshi
1995 Preparation and evaluation of apple pomace Indian food packer:17-24.
- Kertesz, Z.
1930 A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice, . Geneva: Us Patent.
- Khairnar, Y., et al.
2009 Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. *International Journal of Microbiology Research* 1(2):13-17.
- Kobayashi, T., et al.
2001 Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology* 29:70-75.
- Koboyashi, et al.
1999 Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:72-75.
- Kohli, Pooja, and Reena Gupta
2015 Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(3):279-285.
- Koser, S., et al.
2014 Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(3):327-332.
- Koubala, B. B., et al.
2008 Physico chemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*:1202-1207.
- Krishna, C.
2005 Solid state fermentation systems—an overview. *Critical Review in Biotechnology* 25:1-30.

- Kuhad, R.C., M. Kapoor, and R. Rustaga
2004 Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces sp. RCK-SC* by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(3):257-263.
- Kumar, D. P., et al.
2011 Production of pectinase enzyme by *Aspergillus niger* using *Ficus religiosa* leaves in solid state fermentation. *International Journal of Pharmacy and Technology* 3(1):1351-1359.
- Ladjama, A., Z. Taibi, and R. Meddour
2007 Production of pectinolytic enzymes using *Streptomyces* strains isolated from palm grove soil in Biskra area (Algeria). *In African Crop Science Conference Proceeding*. Pp. 1155-1158, Vol. 8. Egypt: African Crop Science Society.
- Landbo, A-K. , and A.S. Meyer
2004 Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innov Food Sci Emerg Technol* 5:503-513.
- Lara-Marquez, A., et al.
2011 Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnol Lett* 33(5):859-68.
- Larios, G., J.M. Garcia, and C. Huiton
1989 Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp. CH-Y-1043*. *Biotechnology Letters* 11(10):729-734.
- Larreta –Garde, V.
1997 *Enzymes en agroalimentaire*.Lavoisier. Paris.
- Lee W.C., et al.
2006 Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *J Food Engineering* 73 55–63.
- Li, Ming, et al.
2014a Purification of Alkaline Pectinase in Engineering *Bacillus subtilis*. 251:1419-1430.
- Li, P-J., et al.
2014b Optimizing Production of Pectinase from Orange Peel by *Penicillium oxalicum PJ02* Using Response Surface Methodology. *Waste and Biomass Valorization* 6(1):13-22.
- Li, Z., et al.
2005 Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1483-1486.
- Lieu L.N., Le V.V.M., and
2010 Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrason Sonochem Ultrason Sonochemistry* 17:273-279.
- Liew, Shan Qin, Nyuk Ling Chin, and Yus Aniza Yusof
2014 Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2:231-236.
- Linde, G. A., et al.
2007 Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(3):557-562.
- Lo, C.M., et al.

- 2002 Blanching Effects on the Chemical Composition and the Cellular Distribution of Pectins in Carrots. *Journal of food Science (JFS) : Food Chemistry and Toxicology*, 67:3321-3328.
- Lobarzewski, J., et al.
1985 New matrices for the purification of pectinases by affinity chromatography. . *Biochem Biophys Res Commun* 131:66-74.
- Lorien, Denis
1998 Modifications biochimiques des constituants alimentaires. *Technique de l'ingénieur F.3-400:1-20*.
- Losane, B.K., et al.
1992 Scale-up stratégies solid state fermentation systems *Process Biochemistry* 27(5):259-273.
- Lowry, Oliver H, et al.
1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem* 193(1):265-275.
- Lozane, B. K., et al.
1985 Engineering aspects of solid-state fermentation *Enzyme and Microbial Technology* 7(6):258-265.
- Ma, E., C. Qu. Cervera, and G. M. Mejia Sanchez
1993 Integrated utilization of orange peel. *Bioresource technology* 44(1):61-63.
- Mac Masters, C. C., J. J. C. Hinton, and D. Bradbury
1978 Microscopic structure and composition of the wheat kernel. St Paul, MN, (USA): American Association of Cereal Chemists.
- MacCabe, A.P., et al.
2002 Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of biotechnology* 96:43-54.
- Maciel, M.H.C., et al.
2011 Production and characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology* 10(13):2469-2475.
- Mahmood, A.U., J. Greenman, and A. H. Scragg
1998 Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. . *Enzyme and Microbial Technology* 22:130-137.
- Mahmoodi, M., D. G. Najafpour, and M. Mohammadi
2017 Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology* 54(12):4123-4128.
- Maldonado, M., A. Navarro, and D. Calleri
1986 Production of pectinases by *Aspergillus sp.* using differently pretreated lemon peel as the carbon source. *Biotechnology letters* 8(7):501-504.
- Maldonado, M.C., and A.M. Saad
1998 Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Microbiol. Biotechnol.* . 20:34–38.
- Maller, A., et al.
2011 Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enzyme Research* 2011:6.
- Mamma, D., E. Kourtoglou, and P. Christakopoulos
2008 Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology* 99(7):2373-2383.
- Manachini, P.L., M.G. Fortina, and C. Parini

- 1987 Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. . Biotechnology Letter 9:221-224.
- Manachini, P.L., C. Parini, and M.C. Fortina
1988 Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans*, LV10. . Enzyme Microbiology and Biotechnology. 10:682/685.
- Mantovani, C. F., M. P. Geimba, and A. Brandelli
2005 Enzymatic Clarification of Fruit Juices by Fungal Pectin Lyase. Food Biotechnology 19(3):173-181.
- Markowski, J., M. Mieszczakowska, and W. Pocharski
2009 Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. Int J Food Sci Technol 44:1002–1010
- Martin, N., et al.
2004 Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. Engineering and Technology 47(5): 813-819.
- Martins, Silva, and Gomes. Leite
2007 Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Antonie van Leeuwenhoek 91:291-299.
- Martins, E.S., et al.
2002 Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *thermoascus auriantiacus*. Process Biochemistry 37:949-954.
- Martos, M. A., et al.
2009 Production of Pectinases by *A. niger*: Influence of Fermentation Conditions Brazilian Archives of Biology and Technology 52(3):567-572.
- Massa, C., et al.
2007 Isolation, heterologous expression and characterization of an endopolygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia*. . Protein Expression and Purification 54:300-308.
- Massiot, p., A. Baron, and J.F. Drilleau
1994 Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides from different tissue zones of apple. Carbohydrate Polymers 25:145–154.
- Massiot, P., and C. M. G. C. Renard
1997 Composition, physico-chemical properties and enzymatic degradation of fibres prepared from different tissues of apple. Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie 30:800-806.
- Mathew, A., et al.
2008 Optimization of culture conditions for the production of thermostable polygalacturonase by *Penicillium SPC-F 20*. Indian Journal of Microbiology and Biotechnology 35:1001-1005.
- Mbogo, G. P., E. B. Mubofu, and C. C. Othman
2010 Post harvest changes in physico-chemical properties and levels of some inorganic elements in off vine ripened orange (*Citrus sinensis*) fruits cv (Navel and Valencia) of Tanzania. African Journal of Biotechnology 9(12):1809-1815.
- Meyer, A., J. DEIANA, and A. BERNARD
2004 Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Volume 2.
- Miller, G. L.
1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry 31:426-428.

- Miller, N.J., and C.A. Rice-Evans
1997 The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60:331–337.
- Minh, N. P.
2014 Enzymatic pectinase application in extraction and purification of juice turbidity from red rose apple pulp (*Syzygium malaccensis*) *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 1(4):45-51.
- Miyazaki, Y.
1991 Purification and characterization of an endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:25-30.
- Mohamed, S. A., et al.
2006 Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J Biotechnol* 127(1):54-64.
- Mohamed, S.A., A. El-R. Al-Malki, and T.K. Kumosani
2009 Characterization of a Polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2770-2777
- Mohamedab, S.A., T.M.I.E. Christensena, and J.D. Mikkelsen
2003 New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. *Carbohydrate Research*. 338(6):515-524.
- Mohnen, D.
2008 Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266-277.
- Mohsen, L. Y., J-A El J. Al-Janabi, and M. J. Jebor
2014 Production and Characterization of Exopolygalacturonase for *Fusarium oxysporum* and *F. sacchari*. *International Journal of Science and Research* 5(1):2319-7064
- Mohsen, S.M., W.A. Bazaraa, and K. Doukani
2009 Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices *In Conference on Recent Technologies in Agriculture*. Pp. 805-817.
- Moloney, A. P., et al.
1984 Enzymatic saccharification of sugar beet pulp. *Biotechnology Bioengineering* 26:714-718.
- Motwani, D. R., V.G. Meshram, and V.S. Jambhulkar
2013 Partial characterization of pectinase produced by *Aspergillus niger* grown on wheat bran. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(12):345-365.
- Mrudula, S., and R. Anitharaj
2011 Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Glob. J. Biotechnol. Biochem* 6(2):64-71.
- Murthy, P.S., and M.M. Eur J Appl Sci 3:130-139. Naidu
2011 Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. *European journal of applied science* 3:130-139.
- Mushlkova, L. H., L. S. Loc lakova, and V. L. Jarovenko
1978 Pectinase production by *Aspergillus awamori* 16 by solid substrate fermentation. *Microbial Synthesis* 1:25-28.
- Nagai, M., et al.

- 2000 Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience Biotechnology Biochem* 64:1729-1732.
- Naidu, GSN., and T. Panda
1998 Production of pectolytic enzymes – a review. . *Bioprocess Engineering* 19:355-61.
- Nair, S.R., and T. Panda
1997 Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering* 16(3):169-173.
- Nakkeeran, E., R. Subramanian, and S. Umesh-Kumar
2010 Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. *J Biosci Bioeng* 109(2):101-6.
- Nakkeeran, E., S. Umesh-Kumar, and R. Subramanian
2011 *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresour Technol* 102(3):3293-7.
- Nelson, N.
1945 A photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *Journal of Biological chemistry* 153:375-380.
- Nigam, P., and D. Singh
1994 Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology* 34(6):405-423.
- Nishio, N., K. Ai, and S. Nagai
1979 Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal Microbiology ang Biotechnology* 8:263-270.
- Niture, S.F., and A. Pant
2004 Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiology research* 159(3):305-314.
- Niture, SK.
2008 Comparative biochemical and structural characterization of fungal polygalacturonases. *Biologia* 63(1): 1-19.
- Oliveira K.F., et al.
2006 Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. . *Journal of Applied Microbiology* 100:633–640
- Oosterveld, A., A. G. J. Voragen, and H. A Schols
2002 Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. . *Carbohydrate Polymers* 49:407–413.
- .
Oriol, E.
1987 Croissance de l'*A.niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau., Institut national de science appliquée de Toulouse, Toulouse.
- Oriol, E., et al.
1988 Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27(5-6):498-503.
- Ortega, L.M., et al.
2014 Production, characterization and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*. . *Basic Microbiology journal* 54:5170-5177.
- Oshi, V., M. Parmar, and N. Rana

- 2011 Purification, characterization of pectinase produced from apple pomace and its evaluation in the fruit juice extraction and clarification. . Indian Journal of Natural Products and Resources 2(2):189–197
- Oszmianski, J., A. Wojdylo, and J. Kolniak
2011 Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. Food Chem 127(2):623-31.
- Oszmianski, J., A. Wojdylo, and J. Kolniak
2009 Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juices. . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(15):7078-7085.
- Owens, H.S., et al.
1946 Shape and size of pectinic acid molecules from viscosimetric measurements. Journal American society 68:1628-1632.
- Pagan A., et al.
2006 Orange peel degradation and enzyme recovery in the enzymatic peeling process. . Interntional Journal of Food Scie Technology 41:113-120.
- Pagan J., et al.
2001 Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. Food Res Int 34: 605–612.
- Palaniyappan, M.V., et al.
2009 Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281. African Journal of Biotechnology 8(4):682-686.
- Panda, S. S., et al.
2012 Pectinolytic and Cellulolytic Activity of Soil Fungal Isolates From Similipal Bioreserve Forest. World Environment 2(2):1-3.
- Panda, T., G. Naidu, and J. Sinha
1999a Multiresponse Analysis of Microbiological Parameters Affecting the Production of Pectolytic Enzymes by *Aspergillus niger*: A Statistical View. . Process Biochemistry 35:187-195.
- Panda, T., G.S.N. Naidu, and J. Sinha
1999b Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. Process Biochemistry 35(1):187-195.
- Pandey, A.
2003 Solid-state fermentation Biochemical Engineering journal 13:81-84.
- Pandey, A., et al.
1999 Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. . Current science 77:149-162.
- Patidar, M. K., et al.
2018 Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. 3 Biotech 8(4):199.
- Patidar, M.K., et al.
2016 Papaya peelvalorization for production of acidic pectin methylesterase by *Aspergillus tubingensis* and its application fo fruit juice clarification. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 16:58-67.
- Patil, N. P., et al.

- 2012 Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and Its Application. Indian J Microbiol 52(2):240-6.
- Patil, S. R., and A. Dayanand
2006 Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. Bioresour Technol 97(16):2054-8.
- Pedrolli, D. B., and E. C. Carmona
2009 Pectin lyase from *Aspergillus giganteus*: Comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. Applied Biochemistry and Microbiology 45(6):610-616.
- Pedrolli, D.B., et al.
2009 Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes The Open Biotechnology Journal 3(9):9-18.
- Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., and and Doco T.
2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function., Biochimie 85 : : 109-121. .
- Pétera, B
2016 Extration et caractérisaton (Structurale et Physiquo-Chimique) de polysaccharides hydrosolubles issus de *Cereus triangularis.*, ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT Blaise Pascal.
- Pilnik, W., and A.G.J. Voragen
1993 Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture. New York: Academic Press.
- Pinelo M., Zeuner B., and Meyer A.S.
2010 Juice clari fication by protease and pectinase treatments indicate new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. Food Bioprod Process 88:259–265.
- Pitt, D.
1988 Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. Methods in Enzymology 161:350-354.
- Poondla, V., et al.
2016 Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 6:40-50.
- Popper, Z.A., and S.C. Fry
2008 Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. Planta 227:781-794.
- Prasanna, V., T.N. Prabha, and R. N. Tharanathan
2007 Fruit ripening phenomena--anoverview. Food science and Ntrition 47:1-19.
- Pretel M.T., et al.
2007b Optimization of vacuum infusion and incubation time for enzymatic peeling of Thompson and Mollar oranges. LWT - Food Science and Technology 40:12-22.
- Pretel M.T., et al.
2007a Optimization of vacuum infusion and incubation time for enzymatic peeling of Thomson and Mollar oranges. . LWT - Food Science and Technology 40:12-22.
- Rahardjo, Y.S.P., Tramper J., and Rinzema A.
2006 Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. Biotechnology Advances 24(2):161-179.
- Rai P., et al.

- 2007 Effect of various pre-treatment methods on permeate flux and quality during ultra filtration of mosambi juice. . J Food Engineering 78:561–568
- Raimbault, M.
1998 General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology 1(3):9.
- Raimbault, M., and D. Alazard
1980 Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 9(3):199-209.
- Ralet M.-C., et al.
2005 Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. Phytochemistry 66(15):1832-1843.
- Ralet, M. C., P. Lerouge, and B. Quemener
2009 Mass spectrometry for pectin structure analysis. Carbohydr Res 344(14):1798-807.
- Ralet, M.C., et al.
2003 Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. Biochemistry Engineering Journal 16:191-201.
- Ramalingam, P., et al.
2013 Partial purification and characterization of cellulase, pectinase and xylanase from *Penicillium chrysogenum*. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology 5(5):48-59.
- Rangarajan, V., et al.
2010 Pectinase Production from Orange Peel Extract and Dried Orange Peel Solid as Substrates Using *Aspergillus niger*. International journal of Biotechnology and Biochemistry 6(3):445-453.
- Rashmi R., et al.
2008 Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds. . journal of applied biosciences 9:378–384
- Reddy, M. P., and K. V. Saritha
2016 Effects of the culture media optimization on pectinase production by *Enterobacter sp. PSTB-1*. 3 Biotech 6(2):207.
- Rehman, Haneef Ur, et al.
2015 Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. Food Hydrocolloids 43:819-824.
- Renard C. M. G. C., and Thibault J.-F.
1993 Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. Carbohydrate Research. 244:99-114.
- Reuss, M.
1983 Mathematical models of coupled oxygen transfer and microbial kinetics in bioreactors Pergamon.
- Rexová Benková, L., and O. Markovic
1976 Pectic enzymes. Advances. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 33:323-385.
- Reymond, P., et al.
1994 Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* GENE 08051 146 233-237.
- Rezazadeh Bari, M., M. Alizadeh, and F. Farbeh

- 2010 Optimizing endopectinase production from date pomace by *Aspergillus niger* PC5 using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing* 88(1):67-72.
- Rezende, C.A., et al.
2011 Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels* 4:54-72.
- Ribiero D.S., et al.
2010 Enzymes in juice processing: a review. *Journal of Food Science Technology* 45:635–641.
- Ridley, B.L., M.A. O'Neill, and D and Mohnen
2001 Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(929):967.
- Rihani, N.
1991 Valeur alimentaire et utilisation des sous produits des agrumes en alimentation animale. Fourages et sous -produits méditerranéens, Zaragoza, 1991. Vol. Série A . Séminaire Méditerranéen. CIHEAM.
- Riou, C., F. Georges, and F. Michel
1992 Purification and characterization of a β -galactosidase from *Scler Otinia Sclerotiorum*. *Microbiology letters* 95:37-41.
- Robin, K., et al.
2013 Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for enhanced juice recovery with optimum quality from alu bukhara (*Prunus domestica* l.)fruit. *Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 11(2):50-67.
- Robinson, T., and P. Nigam
2003 Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:113-125.
- Rodríguez-Nogales, M.J., et al.
2007 Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. *Food Chemistry* 101:634-642.
- Romero-Lopez, M.R., et al.
2011 Fiber concentrate from orange (*Citrus sinensis* L.) bagasse: characterization and application as bakery product ingredient. *International J. Mol. Scien* 12:2174-2186.
- Roussos, S., et al.
1991 Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques* 5:415-420.
- Ruiz, H.A., et al.
2012 Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering journal* 65:90–95.
- Saad, N., et al.
2007 Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. *Enzyme and Microbial Technology* 41:800-805.
- Saito, K., N. Takakuwa, and Y. Oda

- 2004 Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. . Microbiology Research 159:83-86.
- Sakai, K., M. Okushima, and S. Yoshitake
1984 Purification, Crystallization and Some Properties of Endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. Agricultural and Biological Chemistry 48(8):1951-1961.
- Sakai, T., et al.
1993 Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. . Adv. Appl. Microbiol. 39:213-279.
- Sakai, T., and A. Takaoka
1985 Purification, Crystallization, and Some Properties of Endo-poly-galacturonase from *Aureobasidium pullulans*. Agricultural and Biological Chemistry 89(2): 449-458.
- Sakamoto, T., et al.
2002 Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. .Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General 1572(1):10-18.
- Sakamoto, T., R.A. Hours, and T. Sakai
1994 Purification, characterization and production of two pectic-transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. . Bioscience Biotechnology Biochem 58:353/358. .
- Sanchez, S.R., et al.
2015 Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. . 38 Bioprocess and Biosystems Engineering:587–593.
- Sandhya, R., and G. Kurup
2013 Screening and isolation of pectinase from fruit and vegetable wastes and the use of orange waste as a substrate for pectinase production. Research Journal of Biological Sciences 2(9):34-39.
- Sandri, I.G., et al.
2011 Clarification of fruit juices by fungal pectinases. LWT - Food Science and Technology 44(10):2217-2222.
- Saranraj P., Naidu M.A., and
2014 Microbial Pectinases: A Review Global J Trad Med Sys 3(1):1 - 9.
- Sato, K., and S. Sudo
1999 Smal-scalsolid state fermentation. Washington: ASM press.
- Satter, M A., et al.
2014 Nutritional composition and stablization of local variety rice brant *BRR1-28*. International Journal of Science and Technology 3:306-313.
- Savary, BJ.
2001 Perfusion chromatography separation of the tomato fruit-specific pectin methylesterase from a semipurified commercial enzyme preparation. . Preparative Biochemistry and Biotechnology 31:241-258.
- Scavetta, R. D., et al.
1999 Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. Plant Cell 11(6):1081-1092.
- Scher, J.
2015 Rhéologie, texture et texturation des Spectrométrie de masse - Principe et appareillage produits alimentaires Pp. 1-16, Vol. f3300. France.
- Schieber, A., et al.
2003 A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. Innovative Food Science and Emerging Technologies 4:99-107.

- Schmidt, O., et al.
1995 Experimental and theoretical investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *A. niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:424-430.
- Schols H.A., et al.
1995 A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr. Res* 279:265-279.
- Seethaler, D., and W. Hartmeier
1992 Purification and properties of pectolytic enzymes of flocculent strain of *Clostridium acetobutylicum*. *In DECHEMA-Biotechnol Conf Pp.* 213-216, Vol. 5.
- Semenova, M.V., et al.
2003 Isolation and Properties of Pectinases from the Fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry* 68:559-569.
- Shah, N.
2007 Optimization of an enzyme assisted process for juice extraction and clarification from litchis (*Litchi chinensis* sonn). *International Journal of Food Engineering* 3(3):1-17.
- Shalini, R., and D.K. Gupta
2009 Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology* 47:365-371.
- Shankar, S.K., and V.H. Mulimania
2007 β -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology* 98(4):958-961.
- Sharma, Abha, et al.
2013 *Microbial Pectinases and Their Applications*. 107-124.
- Sharma, N., M. Rathore, and M. Sharma
2012 Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1):45-60.
- Sharma, S., R. P. Mandhan, and J. Sharma
2011 Utilization of agro-industrial residues for pectinase production by the novel strain *Pseudozyma sp. SPJ* under solid state cultivation. *Annals of Microbiology* 62(1):169-176.
- Sharma, S., J. Sharma, and R. P. Mandhan
2014 Lucrative pectinase production by novel strain *Pseudozyma sp. SPJ* with statistical optimization techniques using agro-industrial residues. *Frontiers in Biology* 9(4):317-323.
- Shen, Z., J.C. Reese, and G.R. Reeck
1996 Purification and characterization of polygalacturonase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (*Coleoptera: Curculionidae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(5):427-433.
- Shet, A.R., S.V. Desai, and S. Achappa
2018 Pectinolytic Enzymes: Classification, Production, Purification and Applications. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* 4(3):337-348.
- Silva, D., et al.
2002 Pectinase production by *Penicillium viridicatum RFC3* by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology* 33(4):318-324.
- Silva, D., et al.

- 2007 Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. . Process Biochemistry 42(2007):1237-1243.
- Silva, D., et al.
2005 Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. Process Biochemistry 40(8):2885-2889.
- Sin H., Yusof S., Sheikh Abdul Hamid N., and Rahman R.A.
2006 Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. J Food Engineering 73:313–319.
- Singh nee Nigam, P., and A. Pandey
2009 Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Pp. 197-221: Springer.
- Singh, S., R. Gupta, and Singh SA.
2003 Apple juice clarification using fungal pectinolytic enzyme and gelatin. . Indian J Biotechnol 3:573–576.
- Singh, S., et al.
2011 In vitro methane emission from Indian dry roughages in relation to chemical composition. In Feedipedia. Current science. Pp. 57-65, Vol. 101.
- Singh, S.A., H. Plattner, and H. Diekmann
1999 Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus sp.* Enzyme and Microbial Technology 25:420–425.
- Singh, S.A., and AGA. Rao
2002 A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. Biotechnology and Applied Biochemistry 35:115-123.
- Soares M.M.C.N., et al.
2001 Pectinolytic enzyme production by *Bacillus species* and their potential application on juice extraction. . Journal of Microbiology and Biotechnology 17:79–82.
- Solís-Pereira, S., et al.
1993 Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology 39(1):36-41.
- Solis-Pereyra, S., et al.
1996 Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12(3):257-60.
- Somerville, C., et al.
2004 Toward a systems approach to understanding plant cell walls. Science 306(2206):2211.
- Somogyi, M.
1945 A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological chemistry 160:61-73.
- Souza, M. O., and I.C. Roberto
1999 Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology 52:768-772.
- Srivastava, S., and K.S. Tyagi

- 2013 Effect of enzymatic hydrolysis on the juice yield from apple fruit (*Malus domestica*) pulp. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(4):299-306.
- Stephen, Alistair M., Glyn O. Phillips, and Peter A. Williams
2006 *Food Polysaccharides and Their Applications*. London.
- Sudha, M.L., V. Baskaran, and K. Leelavathi
2007 Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry* 104:686-692.
- Suresh, B., and T. Viruthagiri
2010 Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology* 3(8):867-870.
- Surjet, A.
2015 Développement des blés de qualité supérieure pour une meilleure alimentation *In Agriculture /Agroalimentaire sûre, saine et durable*. INRA. L.p.d. compétitivité, ed. INRA France.
- Tabak Henry, H., and W.N. Bridge Cooke
1968 The effects of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi. *The Botanical Review* 334:126-252.
- Tanabe, H., Y. Kobayashi, and I. Akamatsu
1986 Pretreatment of pectic wastewater from orange canning by soft-rot *Erwinia carotovora*. *Journal of Fermentation Technology* 64:265–268.
- Tanabe, H., et al.
Isolation and fundamental properties of exo pectate lyase p1 isozymes from *Erwinia carotovora*. *Agricultural Biological Chemistry* 8:2113.
- Tapre, A. R., and R.K. Jain
2014 Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal* 21(2):447-453.
- Tari, C., N. Dogan, and N. Gogus
2008 Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry* 111:824-829.
- Tari, C., N. Gogus, and F. Tokatli
2007 Optimization of biomass, pellets size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and microbial technology* 40:1108-1116.
- Taşkın, Evrim, and Rengin Eltem
2008 The Enhancement of Polygalacturonase and Polymethylgalacturonase Production on Solid-State Conditions by *Aspergillus foetidus*. *Food Biotechnology* 22(3):203-217.
- Thibault, J-F., and CH. Mercier
1978 *Aspergillus niger* endopolygalacturonase. I. Studies on purification by agarose gel chromatography. *Journal of solid-phase biochemistry* 2(4):295-304.
- Thibault, J. F.
1983 Etude structurale de substances pectiques à l'aide d'une endopolygalacturonase d'*Aspergillus niger*: Purification, propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme., Doctorat d'état Es-Sciences spécialité biochimie macromoléculaire, Université de Nante.
- Thibault, J.F.
1979 Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méthahydroxydiphényl. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 21, 247–251 21:247-251.

- Tilly, G.
2014 Pectine. *In* Techniques de l'ingénieur, Vol. F-5000. France.
- Tochi, B. N., et al.
2009 The influence of pectinase and pectinase/hemicellulases enzyme preparations on percentage pineapple juice recovery, particulates and sensory attributes. *Pakistan Journal of Nutrition* 8:1184-89.
- Toker, I., and A. Bayindirli
2003 Enzymatic peeling of apricots, nectarines and peaches. *LWT - Food Science and Technology* 36:215–221.
- Topuz, A., et al.
2005 Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering* 66:519-523.
- Tran P.P.T., and Le V.V.M.
2011 Effects of ultrasound on catalytic efficiency of pectinase preparation during the treatment of pineapple mash in juice processing. *International food research journal* 18:347–354
- Trejo-Hernandez, M.R., et al.
1991 Production of pectinase by *Aspergillus niger* by solid state fermentation on support. *Micología neotropical aplicada* 4:49-62.
- Ustok, F. I., C. Tari, and N. Gogus
2007 Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology* 127(2):322-34.
- Uzuner, S., and D. Cekmecelioglu
2015 Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 113:62-67.
- Vijayanand P., Kulkarni S.G., and Prathibha G.V.
2010 Effect of pectinase treatment and concentration of litchi juice on quality characteristics of litchi juice. *J Food Science Technology* 47:235–239.
- Vincken, J. P., et al.
2003 If homogalacturonan were a side chain of rhamno- galaturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132:1781–1789.
- Viniegra-González, G., and E. Favela-Torres
2006 Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression? *Food Technology Biotechnology* 44(3):397-406.
- Viniegra-González, G., et al.
2003 Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13:157-167.
- Voget, C.E., C. E. Vita, and J.C. Contreras Esquivel
2006 One-step concentration and partial purification of *Aspergillus kawachi* non-acidic polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters. *Biotechnology Letters* 28:233-239.
- Voragen, A. G. J., et al.
2009 Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* 20, :263–275.
- Voragen, A. G. J., et al.
1995 Pectins. New York: Marcel Dekker.
- Voragen, A.G.J., G. Beldman, and H. Schols

- 2001 Chemistry and enzymology of pectins. Oxford: Blackwell Science,.
- Wang, X-J., J-G. Bai, and Y-X. . Liang
2006 Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:533-540.
- Willats, W.G., et al.
2001 Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47:9-27.
- Wong, L. Y., et al.
2016 Efficacy of *Aspergillus fumigatus* R6 Pectinase in Enzymatic Retting of Kenaf. *Bioresources* 11(4):10030-10041.
- Wu, YT., et al.
2000 Recovery of endopolygalacturonase using polyethylene glycol-salt aqueous twophase extraction with polymer recycling. . *Bioseparation* 9:247/54. .
- Yadav, S., et al.
2008 Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry* 43:547-552.
- Yannan, S. K., S. Varakumar, and O.V.S.wine Reddy
2012 Evaluation of antioxidant and sensory properties of mango (*Mangifera indica* L.). *Food Technology and Biotechnology* 5(3):359-367.
- Yapo, Beda M.
2011 Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* 86(2):373-385.
- Yeoh S., Shi J., and Angrish T.A.G.
2008 Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination* 218:229-237.
- Yuan P., et al.
2011 A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clari fication. *Food Chemistry* 129:1369–1375
- Yusof, S., and N. Food Chemistry Ibrahim
1994 Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment. 51:83-88.
- Zhan, D., P. Janssen, and A. J. andMort
1998 Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. . *Carbohydrate Research*. 308:373-380.
- Zhao, Q., et al.
2008 Expression of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(2607):9784-9785.
- Zhou, Y., J. Du, and G. T. Tsao
2000 Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84(1-9):779-789.
- Zouambia, Y., et al.
A new approach for pectin extraction: Electromagnetic induction heating. *Arabian Journal of Chemistry* 10(4):480-487.

ANNEXES

Annexe I . Analyse du microorganisme par MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrophotometry):

Matériel:

- Appareil de Maldi tof MS (figure110,a)
- Plaque inerte (figure 110,b)
- PC (figure 110,c)

Réactifs:

- Ethanol absolu
- Acide formique 70%
- Acétonitrile
- Acide α -cyano-4-hydroxycinamique (HCCA) 10% (acide trifluoroacétique)

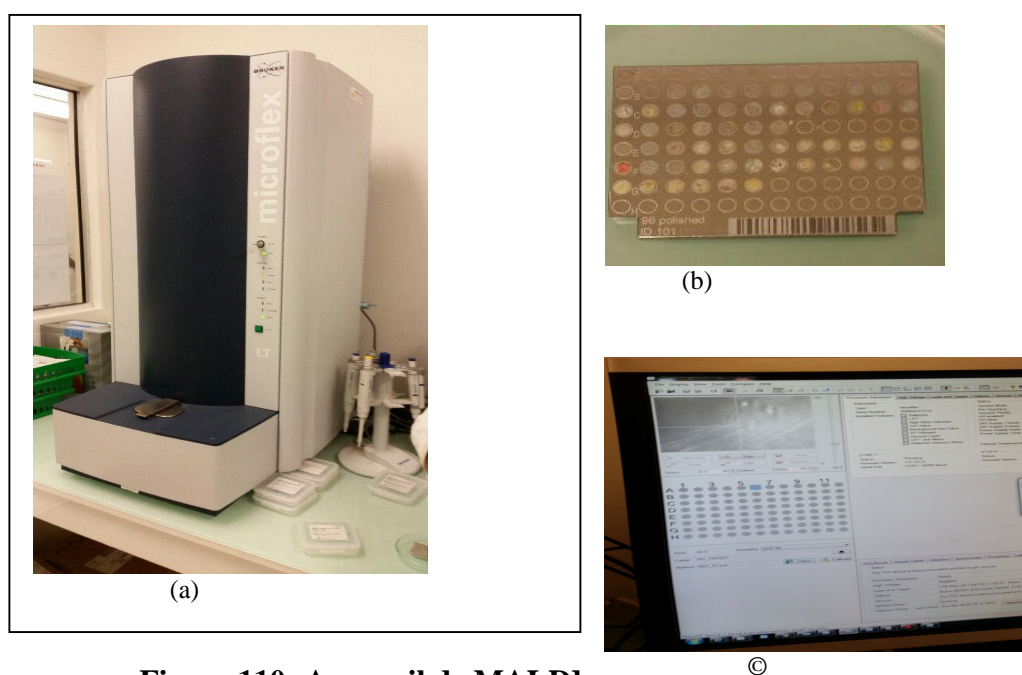
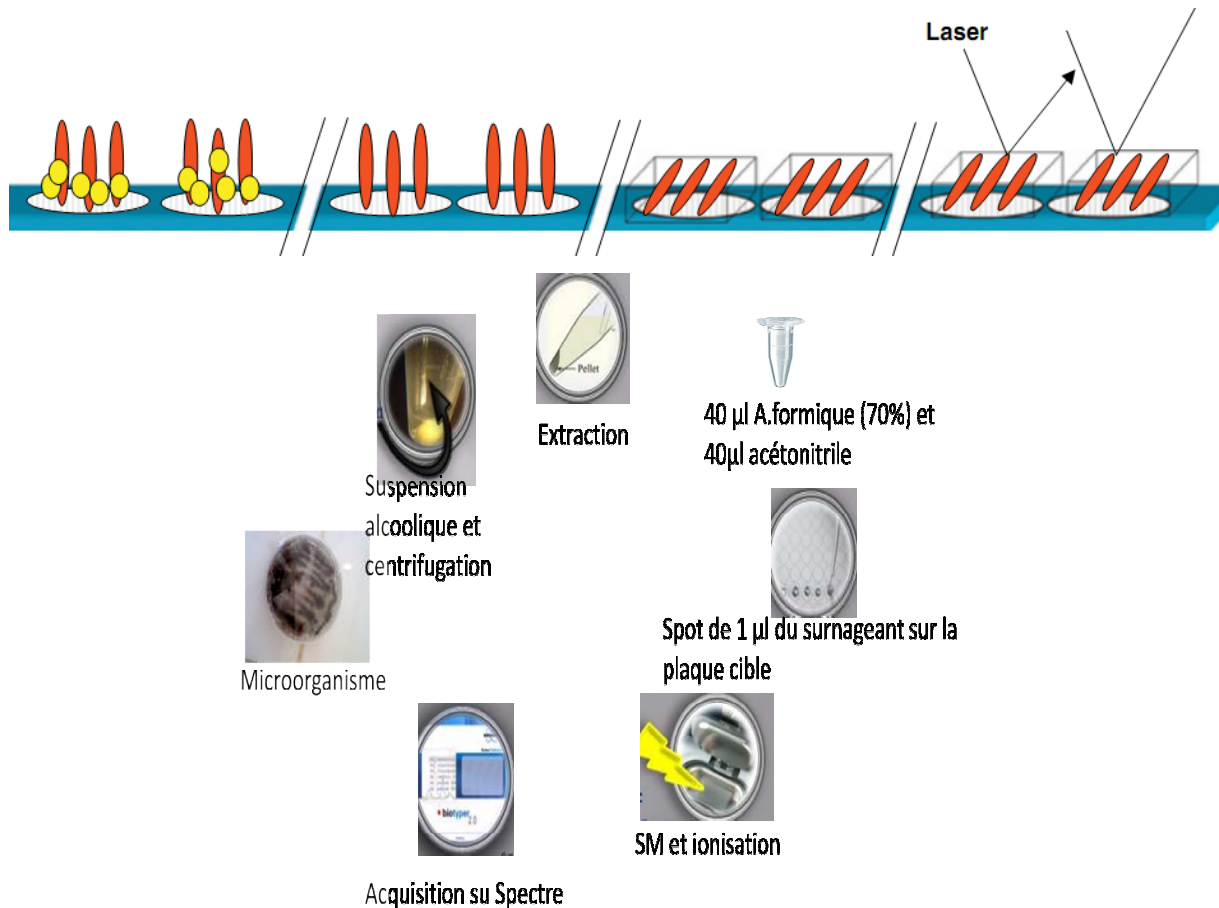


Figure 110: Appareil de MALDI

Mode opératoire

On procède d'abord à l'extraction par suspension des spores dans une solution alcoolique, après centrifugation de cette dernière le culot conséquent est dissout dans 40 μ l dans l'acide formique à 70% et 40 μ l d'acétonitrile. 1 μ l de cette solution sera déposé sur la plaque, cette dernière sera placée dans l'appareil puis bombardée par les tirs laser (337 nm, 20 Hz) manuellement à l'aide de la souris de l'appareil. Les particules ionisables désorbées de la

plaque s'accélèrent dans un champs électrique en leurs imprimant un temps de vol. Les particules ionisées sont projetées vers le détecteur qui est un spectre de masse. Leurs temps de vol est proportionnel à leurs charge et leurs masse, alors l'obtention d'un spectre représentatif est conservée si le ratio signal/bruit de fond est satisfaisant. Par comparaison du spectre avec le spectre de la banque des données on identifie la souche du microorganisme avec un score.



Obtention du spectre

Le spectre obtenu est représenté par a figure 111. le score d'identification de la souche est négatif (figure 112)

Annexes

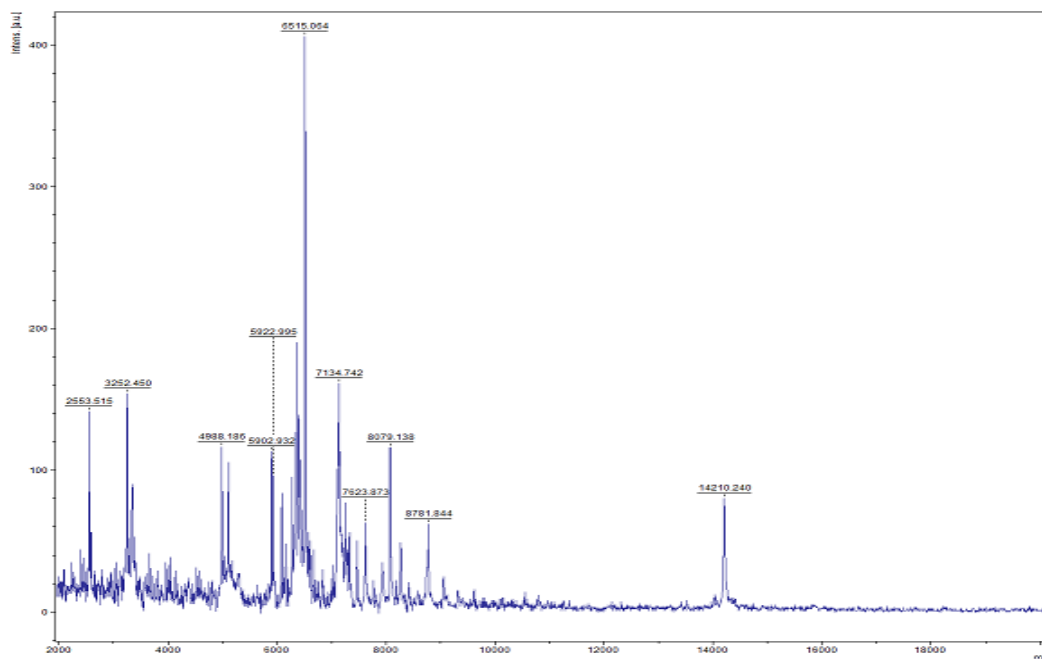


Figure 111: Spectre d'identification du microorganismepar MALDI -TOF -MS

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (-)	no peaks found	< 0	-
2 (-)	no peaks found	< 0	-
3 (-)	no peaks found	< 0	-
4 (-)	no peaks found	< 0	-
5 (-)	no peaks found	< 0	-

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+ + +)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(+ +)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Figure 112: Score d'identification de la souche

Annexe II. Les courbes d'étalonnage

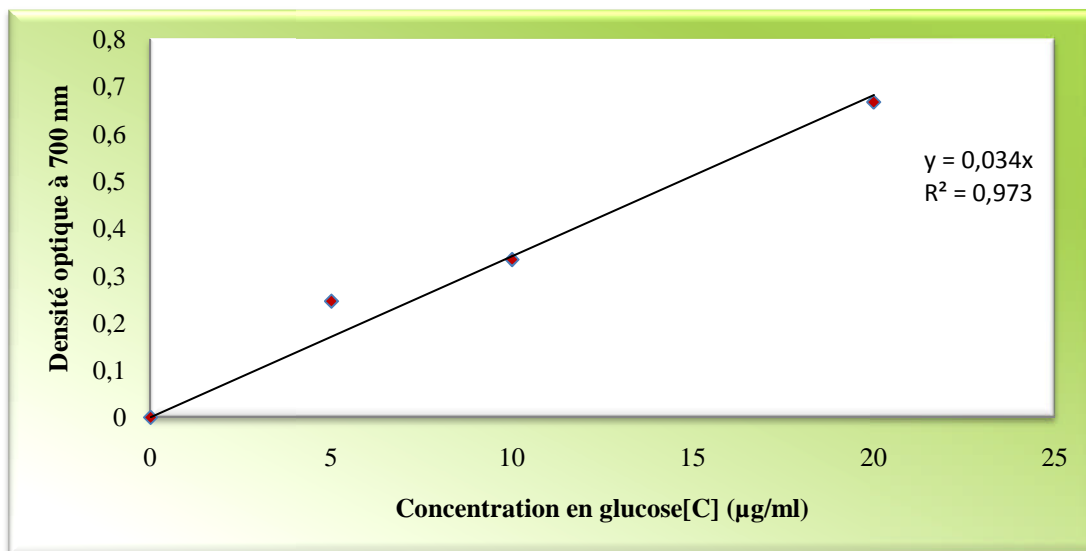


Figure 113. Courbe d'étalonnage du glucose (dosage des sucres réducteurs et totaux)

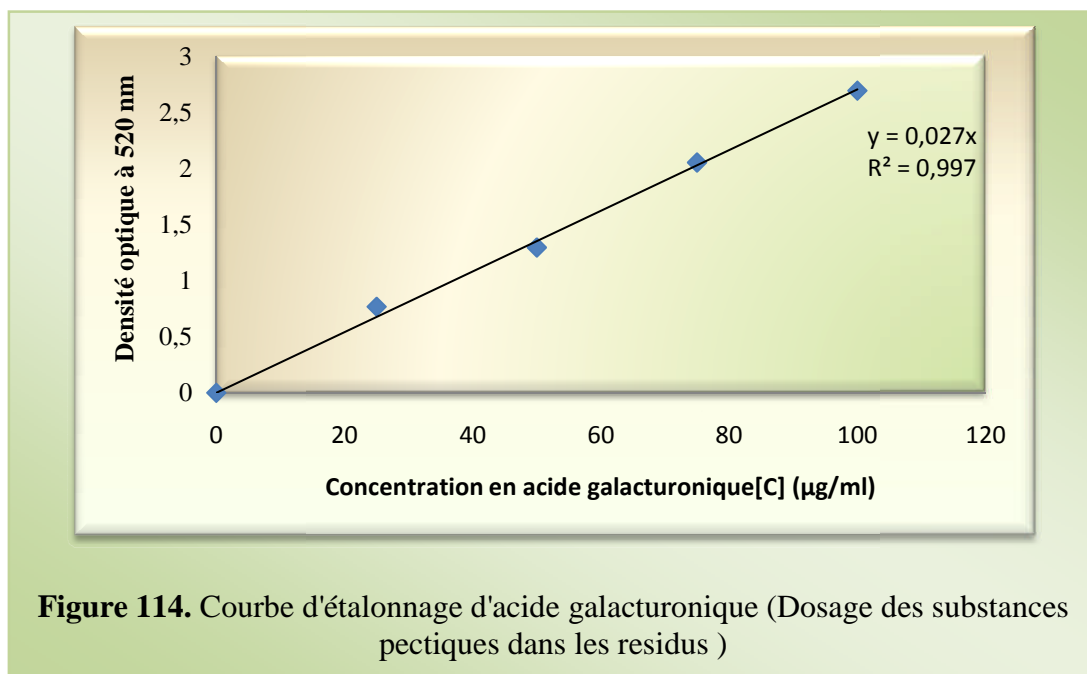


Figure 114. Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique (Dosage des substances pectiques dans les résidus)

Annexes

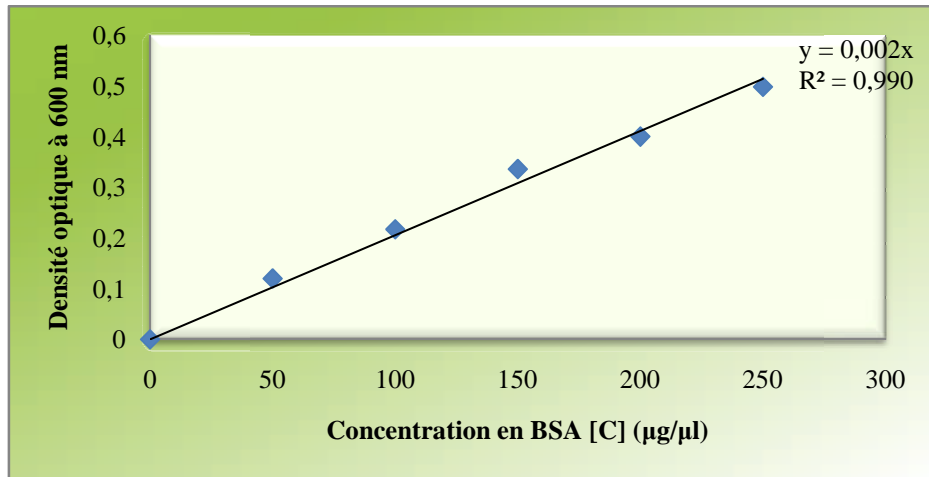


Figure 115. Courbe d'étalonnage de la BSA (dosage des protéines solubles)

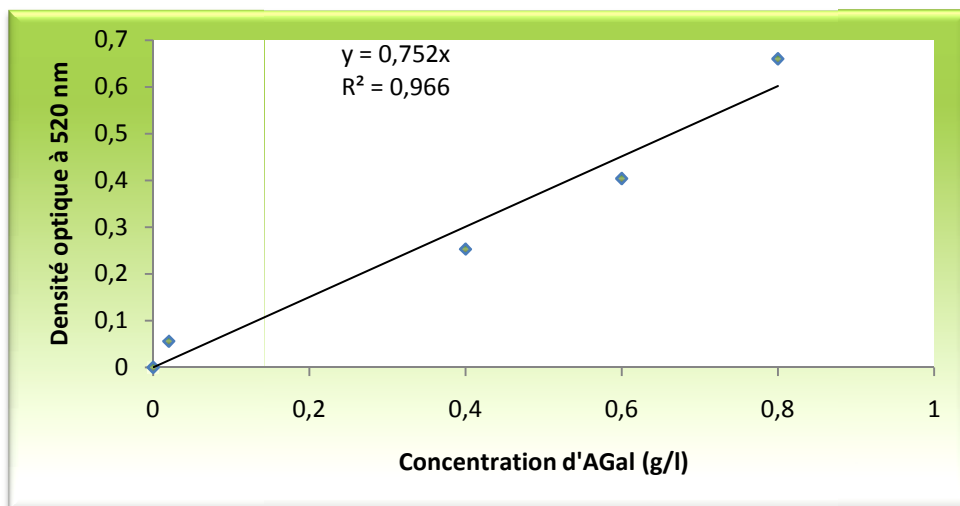


Figure 116. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique (dosage de l'exoPG)

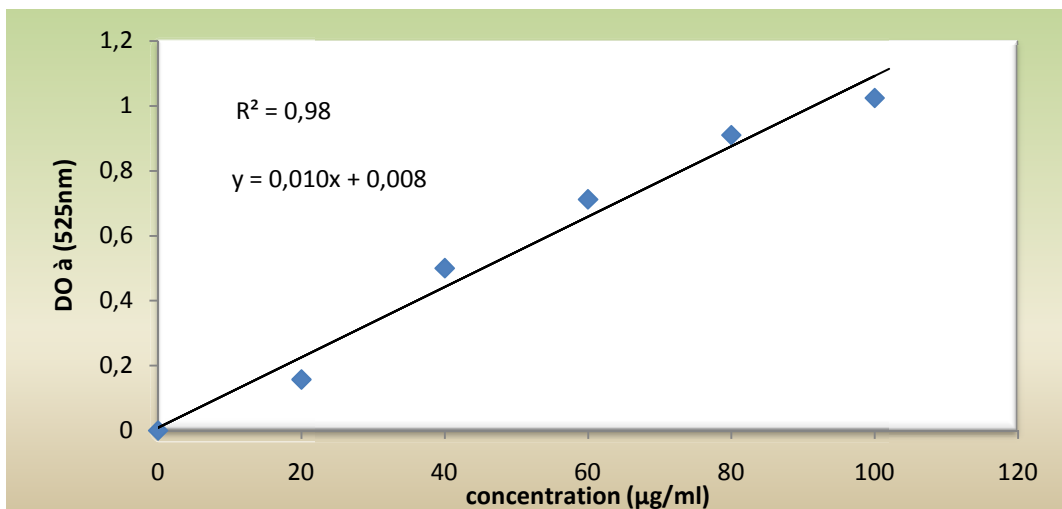


Figure 117. Courbe d'étalonnage de l'acide galaturonique (Dosage des substances pectiques dans les pommes)

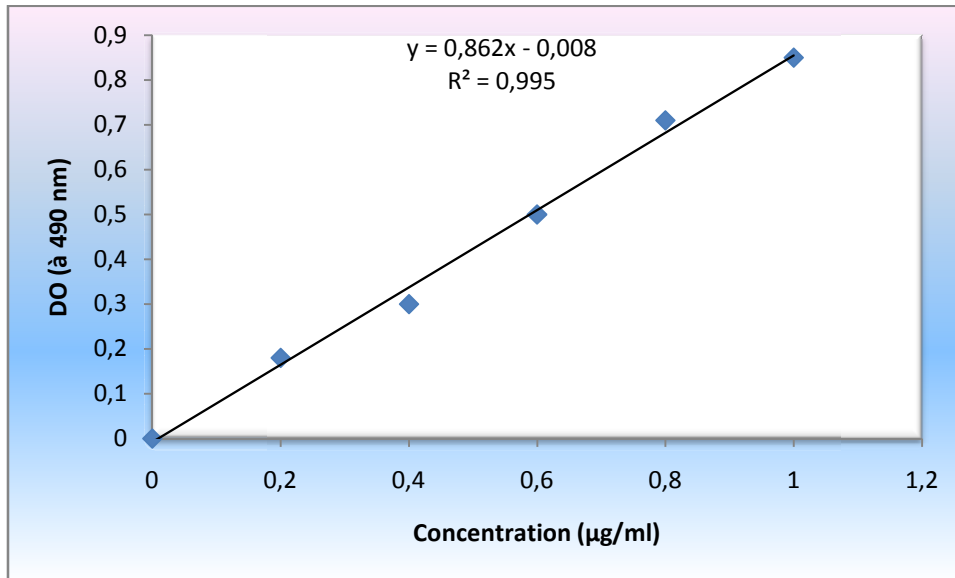


Figure 118. Courbe d'étalonnage d'arabinose

Annexe III. Détermination de l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase et réduction de la viscosité du milieu réactionnel

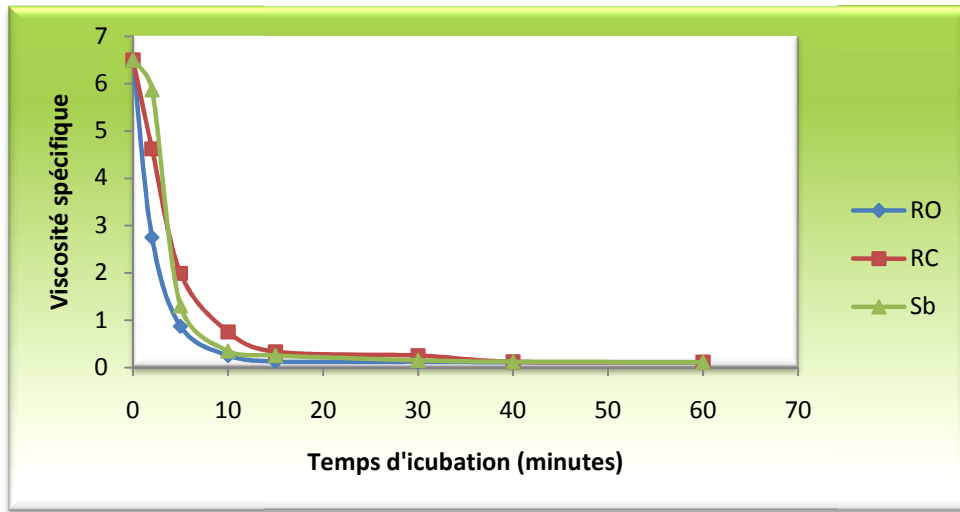


Figure 119. Réduction de la viscosité spécifique du mélange réactionnel en fonction du temps d'incubation

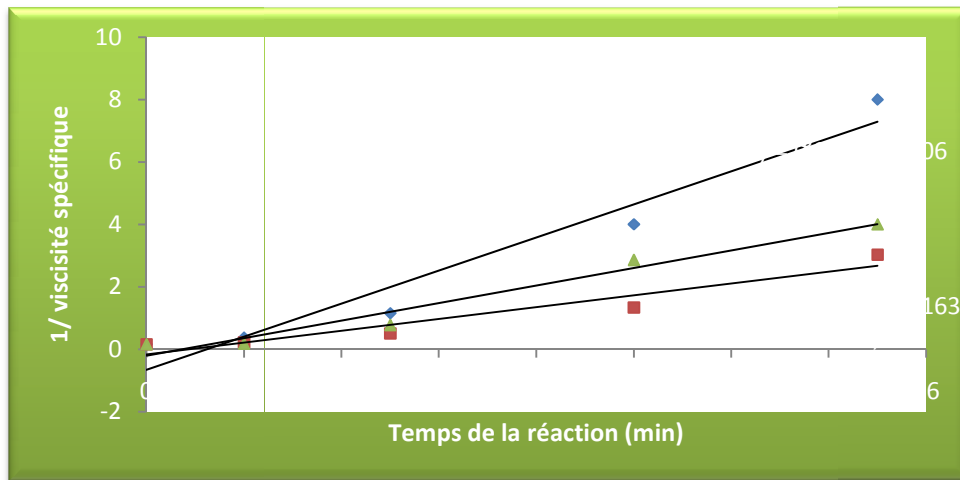


Figure 120. L'inverse de la viscosité en fonction du temps (FMS)

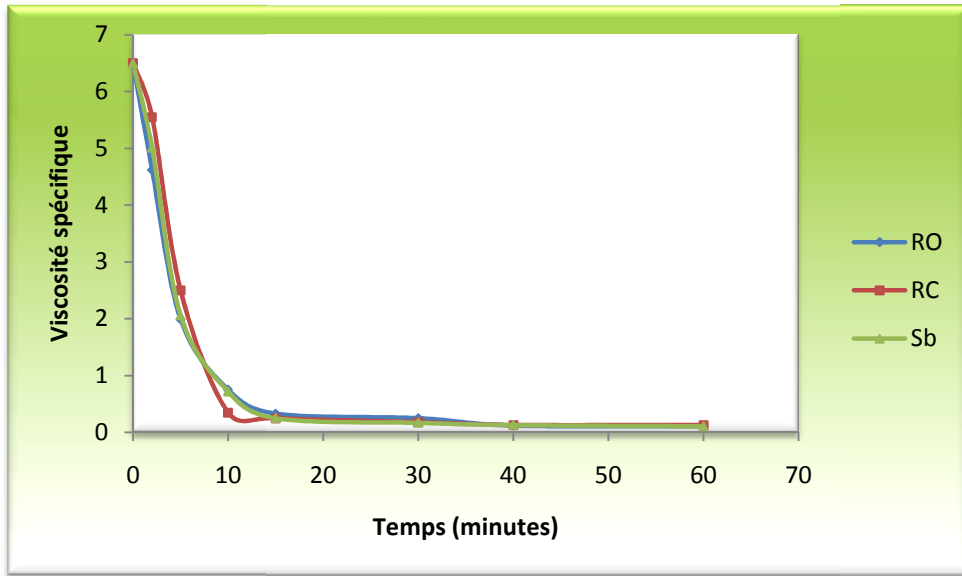


Figure 121. Réduction de la viscosité spécifique dans le milieu réactionnel en fonction du temps (FMSb)

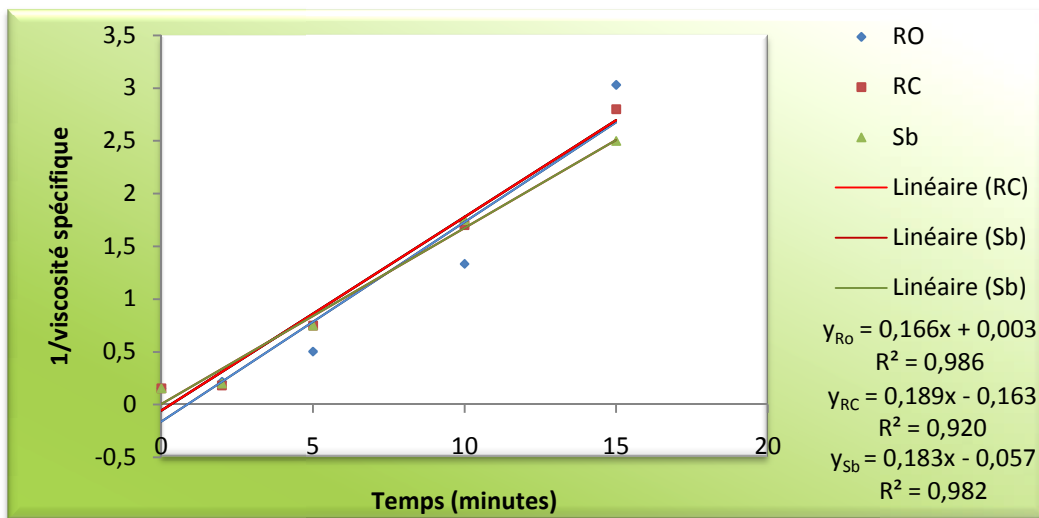


Figure 122. L'inverse de la viscosité en fonction du temps (FMSb)

Annexes

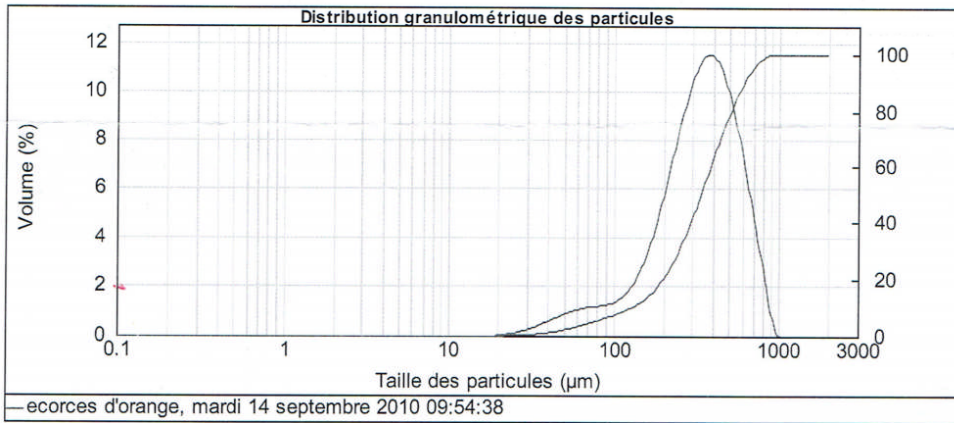
Annexe IV. Analyse granulométrique

Rapport d'analyse

Nom de l'échantillon: ecorces d'orange *0 2* Ref SOP: Mesuré le: mardi 14 septembre 2010 09:54:38
 Origine: Mesuré par: Invite Calculé le: mardi 14 septembre 2010 09:54:38
 Référence de lot: 14/09/10 Source du résultat: Mesure

Particule: Défaut Accessoire: Scirocco 2000 (A) Obscurtion: 1.69 %
 Indice de réfraction particule: 1.520 Absorption: 0.1 Modèle de calcul: Analyse standard
 Dispersant : Dispersion sèche Gamme: 0.020 à 2000.0... µm Résiduel pondéré: 1.720 %
 Indice de réfraction dispersant: 1.000 Result Emulation: Dé...

Concentration: 0.0132 %Vol Moyenne en volume D[4,3]: 360.078 µm Surface spécifique: 0.0258 m²/g
 Span (10% - 90%): 1.428 Moyenne en surface D[3,2]: 232.946 µm Uniformité: 0.434
 Type de distribution: Volume
 d(0.1): 131.025 µm d(0.5): 339.780 µm d(0.9): 616.356 µm



Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %
0.020	0.00	0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.70	355.656	8.68
0.022	0.00	0.159	0.00	1.125	0.00	7.962	0.00	56.368	0.79	399.052	8.51
0.025	0.00	0.178	0.00	1.262	0.00	8.934	0.00	63.246	0.85	447.744	7.92
0.028	0.00	0.200	0.00	1.416	0.00	10.024	0.00	70.963	0.88	502.377	6.95
0.032	0.00	0.224	0.00	1.589	0.00	11.247	0.00	79.621	0.91	563.677	5.71
0.036	0.00	0.252	0.00	1.783	0.00	12.619	0.00	89.337	0.96	632.456	4.32
0.040	0.00	0.283	0.00	2.000	0.00	14.159	0.00	100.237	1.06	709.627	2.87
0.045	0.00	0.317	0.00	2.244	0.00	15.887	0.00	112.468	1.26	796.214	1.47
0.050	0.00	0.356	0.00	2.518	0.00	17.825	0.00	126.191	1.59	893.367	0.17
0.056	0.00	0.399	0.00	2.825	0.00	20.000	0.02	141.589	2.10	1002.374	0.00
0.063	0.00	0.448	0.00	3.170	0.00	22.440	0.06	158.866	2.80	1124.683	0.00
0.071	0.00	0.502	0.00	3.557	0.00	25.179	0.06	178.250	3.70	1261.915	0.00
0.080	0.00	0.564	0.00	3.991	0.00	28.251	0.11	200.000	4.73	1415.892	0.00
0.089	0.00	0.632	0.00	4.477	0.00	31.698	0.19	224.404	5.83	1588.656	0.00
0.100	0.00	0.710	0.00	5.024	0.00	35.566	0.27	251.785	6.89	1782.502	0.00
0.112	0.00	0.796	0.00	5.637	0.00	39.905	0.38	282.508	7.79	2000.000	0.00
0.128	0.00	0.893	0.00	6.325	0.00	44.774	0.49	316.979	8.42		
0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.60	355.656			

Notes de l'opérateur:



MASTERSIZER

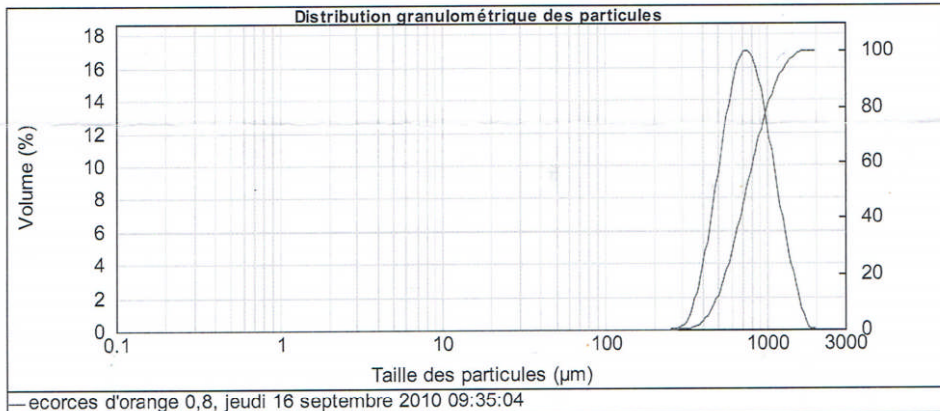


Rapport d'analyse

Nom de l'échantillon: ecorces d'orange 0,8 Ref SOP: Mesuré le: jeudi 16 septembre 2010 09:35:04
 Origine: Mesuré par: Invite Calculé le: jeudi 16 septembre 2010 09:35:04
 Référence de lot: 15/09/10 Source du résultat: Mesure

Particule: Défaut Accessoire: Scirocco 2000 (A) Obscurtion: 0.59 %
 Indice de réfraction particule: 1.520 Absorption: 0.1 Modèle de calcul: Analyse standard
 Dispersant: Dispersion sèche Gamme: 0.020 à 2000.0... µm Résiduel pondéré: 6.347 %
 Indice de réfraction dispersant: 1.000 Result Emulation: Dé...

Concentration: 0.0141 %Vol Moyenne en volume D[4,3]: 792.723 µm Surface spécifique: 0.00847 m²/g
 Span (10% - 90%): 0.920 Moyenne en surface D[3,2]: 708.005 µm Uniformité: 0.281
 Type de distribution: Volume
 d(0.1): 481.952 µm d(0.5): 748.024 µm d(0.9): 1170.143 µm



Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %
0.020	0.00	0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.00	355.656	1.93
0.022	0.00	0.159	0.00	1.125	0.00	7.962	0.00	56.368	0.00	399.052	3.71
0.025	0.00	0.178	0.00	1.262	0.00	8.934	0.00	63.246	0.00	447.744	6.03
0.028	0.00	0.200	0.00	1.416	0.00	10.024	0.00	70.963	0.00	502.377	8.54
0.032	0.00	0.224	0.00	1.589	0.00	11.247	0.00	79.621	0.00	563.677	10.80
0.036	0.00	0.252	0.00	1.783	0.00	12.619	0.00	89.337	0.00	632.456	12.33
0.040	0.00	0.283	0.00	2.000	0.00	14.159	0.00	100.237	0.00	709.627	12.81
0.045	0.00	0.317	0.00	2.244	0.00	15.887	0.00	112.468	0.00	796.214	12.13
0.050	0.00	0.356	0.00	2.518	0.00	17.825	0.00	126.191	0.00	893.367	10.45
0.056	0.00	0.399	0.00	2.825	0.00	20.000	0.00	141.589	0.00	1002.374	8.22
0.063	0.00	0.448	0.00	3.170	0.00	22.440	0.00	158.866	0.00	1124.683	5.63
0.071	0.00	0.502	0.00	3.557	0.00	25.179	0.00	178.250	0.00	1261.915	3.73
0.080	0.00	0.564	0.00	3.991	0.00	28.251	0.00	200.000	0.00	1415.892	2.09
0.089	0.00	0.632	0.00	4.477	0.00	31.698	0.00	224.404	0.00	1588.656	0.60
0.100	0.00	0.710	0.00	5.024	0.00	35.566	0.00	251.785	0.01	1782.502	0.02
0.112	0.00	0.796	0.00	5.637	0.00	39.905	0.00	282.508	0.13	2000.000	
0.126	0.00	0.893	0.00	6.325	0.00	44.774	0.00	316.979	0.65		
0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.00	355.656			

Notes de l'opérateur:

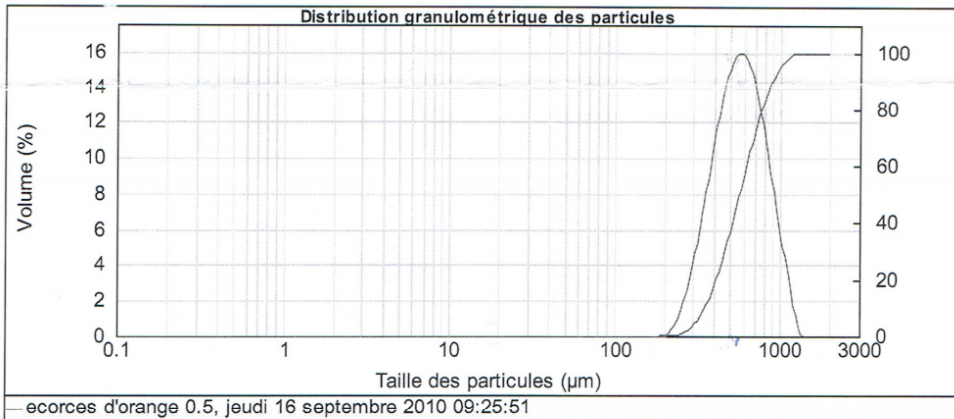


Rapport d'analyse

Nom de l'échantillon: ecorces d'orange 0.5 Ref SOP: Mesuré le: jeudi 16 septembre 2010 09:25:51
 Origine: Mesuré par: Invite Calculé le: jeudi 16 septembre 2010 09:25:51
 Référence de lot: 14/09/10 Source du résultat: Mesure

Particule: Défaut Accessoire: Scirocco 2000 (A) Obscurisation: 1.19 %
 Indice de réfraction particule: 1.520 Absorption: 0.1 Modèle de calcul: Analyse standard
 Dispersant: Dispersion sèche Gamme: 0.020 à 2000.000 µm Résiduel pondéré: 4.085 %
 Indice de réfraction dispersant: 1.000 Result Emulation: Dé...

Concentration: 0.0212 %Vol Moyenne en volume D[4,3]: 602.519 µm Surface spécifique: 0.0113 m²/g
 Span (10% - 90%): 0.959 Moyenne en surface D[3,2]: 532.282 µm Uniformité: 0.296
 Type de distribution: Volume
 d(0.1): 353.858 µm d(0.5): 570.472 µm d(0.9): 900.675 µm



ecorces d'orange 0.5, jeudi 16 septembre 2010 09:25:51

Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %	Taille (µm)	Volume en %
0.020	0.00	0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.00	355.856	6.96
0.022	0.00	0.159	0.00	1.125	0.00	7.962	0.00	56.368	0.00	399.052	9.02
0.025	0.00	0.178	0.00	1.262	0.00	8.934	0.00	63.246	0.00	447.744	10.72
0.028	0.00	0.200	0.00	1.416	0.00	10.024	0.00	70.963	0.00	502.377	11.78
0.032	0.00	0.224	0.00	1.589	0.00	11.247	0.00	79.621	0.00	563.677	11.99
0.036	0.00	0.252	0.00	1.783	0.00	12.619	0.00	89.337	0.00	632.456	11.30
0.040	0.00	0.283	0.00	2.000	0.00	14.159	0.00	100.237	0.00	709.627	9.77
0.045	0.00	0.317	0.00	2.244	0.00	15.887	0.00	112.468	0.00	796.214	7.74
0.050	0.00	0.356	0.00	2.518	0.00	17.825	0.00	126.191	0.00	893.367	5.39
0.056	0.00	0.399	0.00	2.825	0.00	20.000	0.00	141.589	0.00	1002.374	3.44
0.063	0.00	0.448	0.00	3.170	0.00	22.440	0.00	158.866	0.00	1124.683	1.59
0.071	0.00	0.502	0.00	3.557	0.00	25.179	0.00	178.250	0.00	1261.915	0.03
0.080	0.00	0.564	0.00	3.991	0.00	28.251	0.00	200.000	0.00	1415.892	0.00
0.089	0.00	0.632	0.00	4.477	0.00	31.698	0.00	224.404	0.00	1588.866	0.00
0.100	0.00	0.710	0.00	5.024	0.00	35.566	0.00	251.785	0.00	1782.502	0.00
0.112	0.00	0.796	0.00	5.637	0.00	39.905	0.00	282.508	0.00	2000.000	0.00
0.126	0.00	0.893	0.00	6.325	0.00	44.774	0.00	316.979	0.00		
0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.00	50.238	0.00	355.656	4.91		

Notes de l'opérateur:

Annexe V. Purification des extraits enzymatiques et électrophorèse SDS-PAGE

Figure 123. Etapes de purification par chromatographie sur gel de filtration



Extrait enzymatique pré purifié (EEPP)



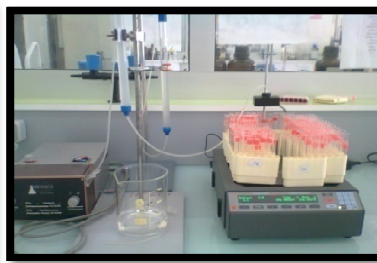
Dépôt de l'EEPP sur le gel



Pénétration de l'EEPP dans le gel



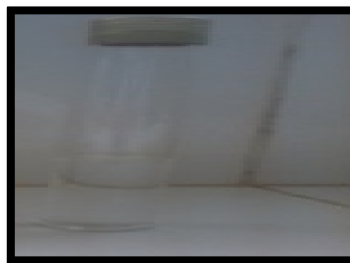
Passage



Collecte



Concentration par lyophilisation



Extrait purifié (EP)

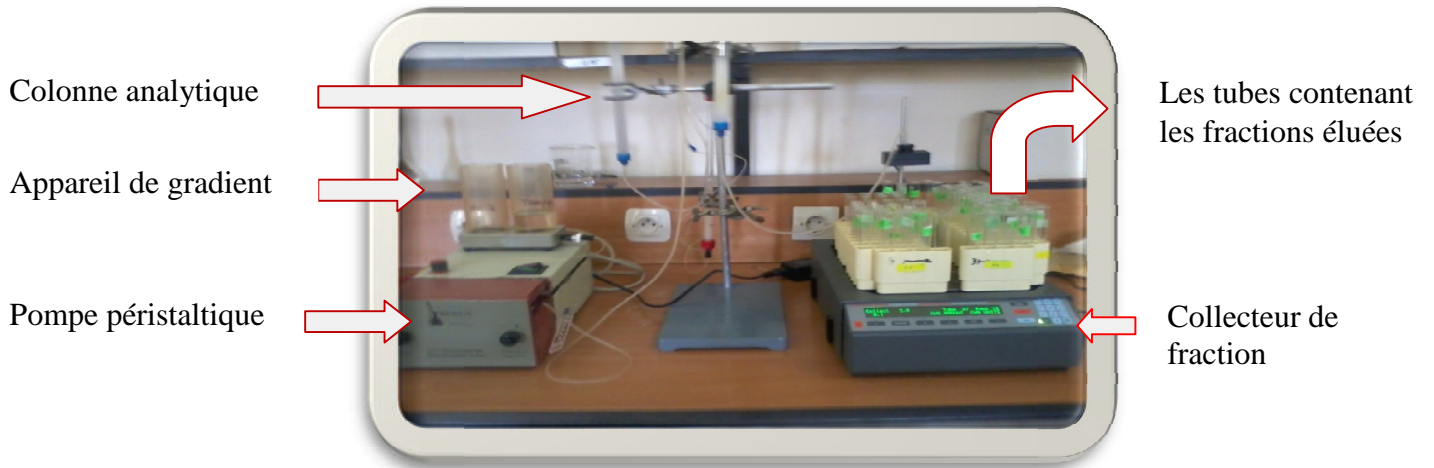


Figure 124. Dispositif employé dans le procédé de purification de l'EEPP par chromatographie sur colonne

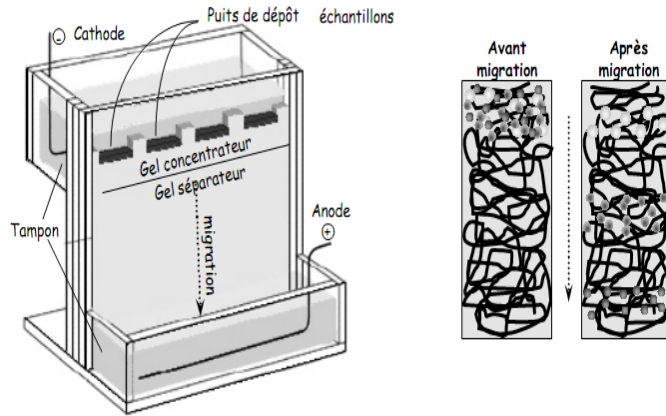


Figure 125. Principe de l'électrophorèse SDS-Page

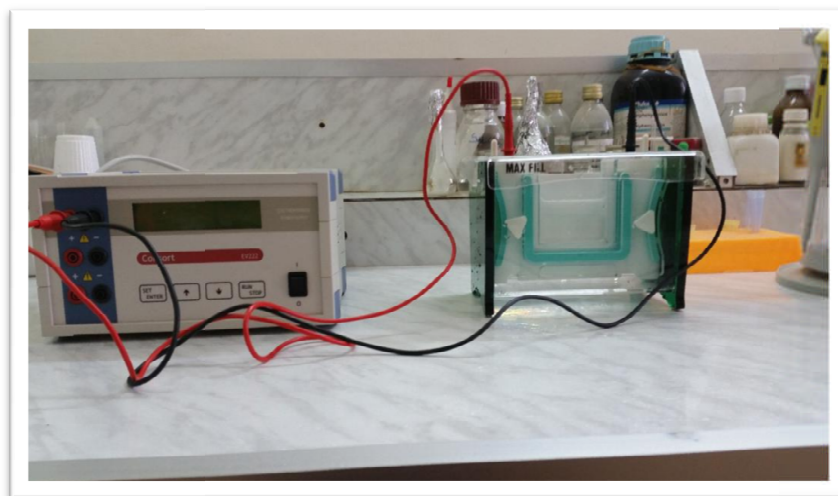


Figure 126. Déroulement de l'électrophorèse SDS-Page

Annexes

Annexe VI. Classification des pectinases

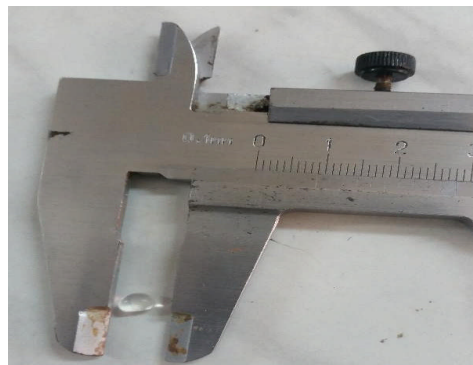
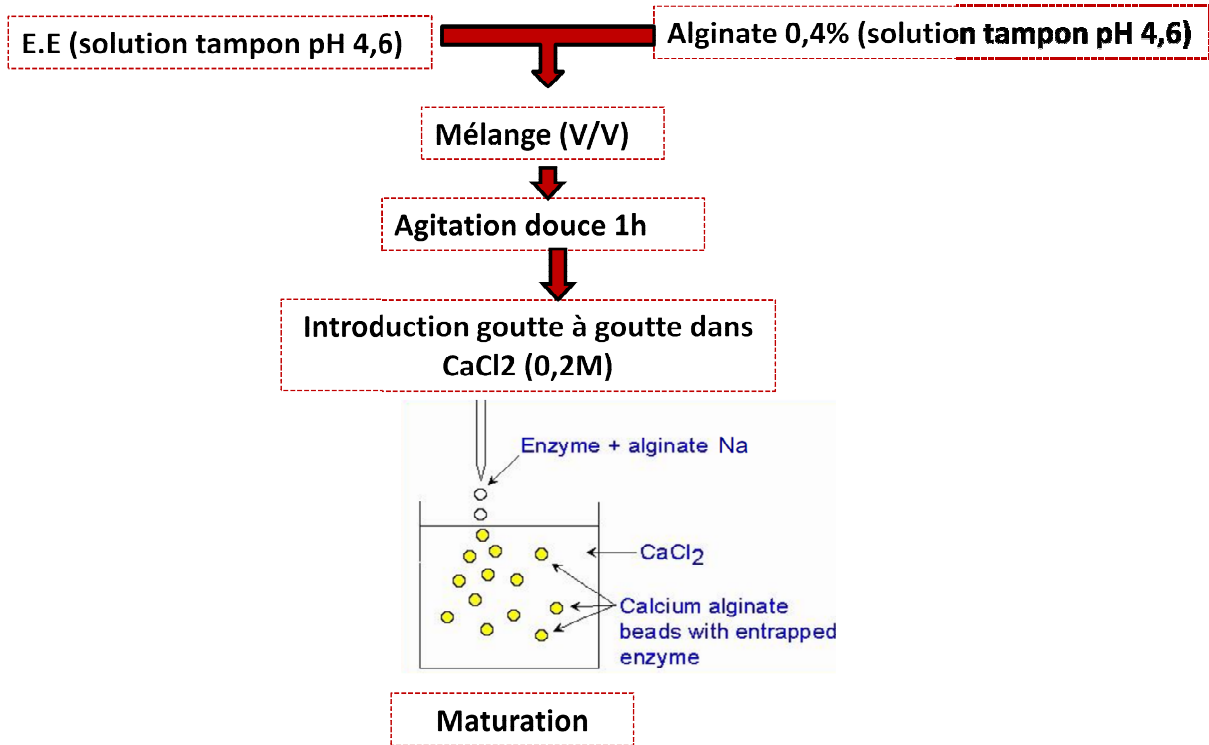
Tableau 38. Classification extensive des pectinases (Jayani et al., 2005)

Enzyme	N° E.C.	Nom systématique	Mécanisme d'action	Mode d'action	Substrat préférentiel.	Produit
Protopectinase			Hydrolyse	Aléatoire	Protopectine	Pectine
Estérase						
1.Pecine méthylestérase	3.1.1.11		Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique + méthanol
Enzymes dépolymérisantes						
a). Hydrolases						
1.Endopolygalacturonase	3.2.1.15	Poly-(1-4)- α -D-galacturonate glycanohydrolase	Hydrolyse	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonate
2.Exopolygalacturonase	3.2.1.67	Poly-(1-4)- α -D- galactosiduronate glycanohydrolase	Hydrolyse	Terminale	Acide pectique	Monogalacturonates
3.Exopolygalacturonan- digalacturohydrolase	3.2.1.82	Poly-(1-4)- α -D- galactosiduronate- digalacturonohydrolase	Hydrolyse	Liaisons pénultième	Acide pectique	Digalacturonate
4.Oligogalacturonate hydrolase			Hydrolyse	Terminale	Trigalacturonate	Monogalacturonate
5. Δ 4:5 Oligogalacturonate insaturés hydrolase			Hydrolyse	Terminale	Δ 4:5(Galacturonate	Monogalacturonate insaturés et saturés (n-1)
6.Endopolyméthylgalacturonase			Hydrolyse	Aléatoire	Pectine hautement estérifiée	Oligométhylgalacturonate
7. Endopolymethylgalacturonase			Hydrolyse	Terminale	Pectine hautement estérifiée	Oligalacturonates
b). Lyases						
1.Endopolygalacturonaselyase	4.2.2.2	Poly-(1-4)- α -D- galactosiduronate lyase	Trans- élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
2. Exopolygalacturonase lyase	4.2.2.9	Poly-(1-4)- α -D- galactosiduronate exolyase	Trans- élimination	Liaison penultième	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
3.Oligo-D-galactosiduronate lyase	4.2.2.6	Oligo-D-galactosiduronate lyase	Trans élimination	Extrémité terminale	Digalacturonates insaturés	Monogalacturonates insaturés
4.Endopolymethyl- galactosiduronate lyase	4.2.2.10	Poly(methyl galactosiduronate) lyase	Trans- élimination	Aléatoire	Poly-(methyl-D- digalacturonates)	Methyloligogalacturonates insaturés.

Annexes

5. Exopolymethyl-D-galactosiduronate lyase	Trans élimination	Poly-(methyl-D-digalacturonate)	Methylmonogalacturonates
--------------------------------------------	-------------------	---------------------------------	--------------------------

Procédé d'immobilisation par inclusion sur les alginate



Perle d'alginate de sodium