



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri – Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications

N° d'ordre : 130 /DS/2017

N° de Série : 03/Bioch/2017

Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité :

Biochimie et Microbiologie Appliquées

Présentée par :

Leila BENNAMOUN

Thème

Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase: Purification et caractérisation enzymatique

Soutenue le 09 Juillet 2017, devant le jury composé de :

Président	Mr. KACEM-CHAOUCHE N.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de Thèse	Mme MERAIHI Z.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinateur	Mr. NECIB Y.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinatrice	Mme BENDJEMANA K.	Professeur, Univ. Laghrour Abbès, Khenchela
Examinateur	Mr. KEBIECHE M.	Professeur, Univ. M.S. Benyahia, Jijel
Examinateur	Mr. YAHIAOUI B.	M.CA., Univ. Ferhat Abbas, Sétif 1

Année universitaire 2016–2017

Ce que signifie le mot recherche ? Vivre pleinement la question.

Edgar Morin (1921-).

Remerciements

*"La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose qu'une pierre
Mais de collaborer, elle s'assemble et devient temple."
Antoine. de Saint-Exupéry.*

Au terme de ce travail, qui a été réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications Université des Frères Mentouri Constantine 1, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse. Une thèse, bien entendu, c'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même. Mais c'est surtout une formidable histoire de relations, de rencontres et d'amitiés.

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers la directrice de cette thèse Madame le Professeur **Zahia Meraihi**. Elle s'y est grandement impliquée par ses remarques et suggestions, mais aussi par ses encouragements dans les moments clés de son élaboration. Je tiens à la remercier aussi pour la confiance qu'elle m'a accordée dès le début, ainsi que pour cette liberté qu'elle a permise, sans laquelle le chercheur ne saurait affirmer sa manière de penser et de procéder.*

Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté de lire et de juger ce travail malgré leur préoccupations et leur tâches d'enseignement et d'encadrement et pris de leur temps si précieux :

- **M. KACEM-CHAOUICHE Noredidine**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury. Je tiens à le remercier également pour ses encouragements et son aide précieuse de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Université de Liège Belgique.
- **M. NECIB Youcef**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail. C'est aussi, mon enseignant, qui a solidement contribué à ma formation, ma reconnaissance lui est grandement acquise.
- **Mme BENDJEMANA Katia**, Professeur à l'Université Laghrour Abbès, Khenchela, d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux,
- **M. KEBIECHE Mohammed**, Professeur à l'Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et mon profond respect.
- **M. YAHIAOUI Bilal**, Maître de Conférence A à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

La partie identification Phénotypique et Moléculaire a été réalisée au Laboratoire de Collection des Levures Industrielles (DBVPG) de l'Université degli Studi di Perugia, Italie. Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères au Professeur Pietro Buzzini et aux Docteurs Benedetta Turchetti et Eva Brenda pour leur accueil chaleureux et leur encadrement lors de mon séjour au sein de leur laboratoire.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Professeur Philippe Thonart de l'Université de Liège de m'avoir accueilli dans son Laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation d'une partie de mon travail. Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Serge Hilgsmann, qui dès mon arrivée, m'a initié à la manipulation du fermenteur. Ce stage m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances. Une pensée très particulière à Wissal avec qui j'ai partagé mes joies, mes déceptions et mes nuits blanches devant le fermenteur.

Je souhaite aussi remercier le Professeur Douadi Khelifi et le Docteur Asma medouri de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir aidé à réaliser « SDS-PAGE et zymogramme ». Merci pour leur gentillesse et leur collaboration.

Je suis également très redevable au Docteur Mohamed El-Hadef El-Okfi de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA) qui n'a jamais été en retrait pour apporter son aide dans la partie statistique et informatique.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Tahar Nouadri Maître de conférence A et adjoint du Département de Biochimie-Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université des Frères Mentouri Constantine 1. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller.

Je suis également reconnaissante à Monsieur Djamel Meraihia Vice doyen de la Pédagogie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir relu et corrigé les fautes d'orthographe de cette thèse.

Les remerciements qui suivent iront à mon amie Scheherazad Dakfimouche pour son soutien et son réconfort sans faille à tout moment et aussi pour les moments agréables.

J'adresse mes très sincères remerciements à tous mes amies (en particulier Amel, Nassira, Malika, KENZA, Hayet, ...) et collègues qui de près ou de loin m'ont soutenu par leurs paroles et leurs encouragements.

Je remercie tous ceux qui ont contribué à faciliter le déroulement de cette thèse, tous ceux qui m'ont permis d'accomplir sereinement mes deux stages. A mon tour, j'espère perpétuer ma servitude pour contribuer au développement de mon pays.

Je clos ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à mes très chers parents, votre amour, votre écoute et votre soutien ont toujours été sans faille qu'Allah vous protège et vous prête bonne santé et longue vie, à mon époux Skander pour sa bienveillance, son écoute au quotidien, son soutien indéfectible sa patience infinie et sa confiance en moi, à mes beaux parents et à mes frères qui ont toujours été là pour moi, à mes belles sœurs, à mes nièces et mes neveux et bien sûr à mes enfants chéris : Rihem-Rym (mon cœur), Ines (ma force) et Mohamed Rochdi Slimane (ma joie) à qui je n'ai pas pu offrir beaucoup de temps au cours de la réalisation et la rédaction de cette thèse.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Levures	4
1.1. Généralités	4
1.2. L'environnement sol : un écosystème microbien complexe	5
1.3. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des levures	5
1.3.1. Méthodes phénotypiques	5
1.3.2. Méthodes génotypiques.....	6
1.4. La levure <i>Aureobasidium pullulans</i>	6
1.4.1. Généralités	6
1.4.2. Caractères cultureux.....	7
1.4.3. Histoire et taxonomie d' <i>Aureobasidium pullulans</i>	7
1.4.4. Morphologie et cycle de vie.....	8
1.5. Conditions de culture des levures	11
1.5.1. Les éléments nutritifs	11
1.5.2. Métabolisme des levures	13
1.5.3. Effet des facteurs environnementaux	14
1.6. Applications biotechnologiques d' <i>Aureobasidium pullulans</i>	16
2. Enzymes glycolytiques : Pectinases	18
2.1. Les substances pectiques	18
2.2. Les enzymes pectinolytiques	21
2.2.1. Classification.....	21
2.2.2. Les enzymes désesterifiantes	24
2.2.3. Les enzymes dépolymérisantes	24
2.3. Origine des polygalacturonases	26
2.4. Structure des polygalacturonases.....	29
2.5. Mode et mécanisme d'action des polygalacturonases	30
2.6. Production et caractérisation des polygalacturonases	32
2.7. Régulation de la synthèse de la polygalacturonase : induction/répression.....	34
2.8. Métabolisme de l'acide galacturonique	34
2.9. Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase.....	36
2.10. Applications industrielles des pectinases	37
2.10.1. Industrie des jus de fruits	37
2.10.2. Industrie du papier	38
2.10.3. Industrie de textile.....	39
2.10.4. Alimentation animale.....	39
2.10.5. Traitement des eaux usées	39
2.10.6. Fermentation du thé et du café.....	39
2.10.7. Préparation des protoplastes.....	39
2.10.8. Purification des virus végétaux	40

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Partie I : Isolement et identification des isolats de levures	41
1. Prélèvement des échantillons	41
2. Caractéristiques de la région de prélèvement	41
3. Isolement, purification et conservation des levures	42
4. Méthodes d'identification des souches levuriennes	43
4.1. Identification phénotypique des isolats de levures	43
4.1.1. Etude des caractères culturaux	43
4.1.2. Etude des caractères morphologiques	43
4.1.3. Etudes des caractères biochimiques et physiologiques.....	44
4.2. Identification moléculaire des isolats de levures	45
4.2.1. Extraction de l'ADN	46
4.2.2. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	47
4.2.3. Séquençage et analyse phylogénétique	48
5. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires des isolats de levures ...	48
5.1. Activité pectinolytique	48
5.2. Activité amylolytique	49
5.3. Activité protéolytique	49
5.4. Activité lipolytique	49
5.5. Activité estérase.....	49
5.6. Activité cellulolytique	49
5.7. Activité uréase	50
Partie II : Optimisation et production de la polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers et en fermenteur	50
6. Milieux de cultures	50
6.1. Substrat de fermentation	50
6.2. Milieu de base.....	50
6.3. Préparation de l'inoculum	50
6.4. Détermination de la composition physico-chimique des déchets de tomates.....	51
7. Effet des différentes sources carbonées sur la production de la PGase d'<i>Aureobasidium pullulans</i>	52
8. Les plans d'expériences	52
8.1. Criblage des facteurs affectant la production de la polygalacturonase (PGase) en utilisant le plan de Plackett-Burman.....	53
8.1.1. Plan de Plackett-Burman (PBD) (Plackett –Burman, 1946).....	53
8.1.2. Analyse statistique du plan de Plackett-Burman.....	55
8.2. Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponse (RSM)	56
8.2.1. Construction du plan CCD.....	56
8.2.2. Analyse statistique et modélisation.....	58
8.2.3. Analyse de la variance (ANOVA)	58
9. Fermentations	58
9.1. Production de la polygalacturonase en Erlen-meyers.....	58
9.2. Fermentation en conditions optimales.....	58
9.3. Cinétique de la production de la polygalacturonase d' <i>Aureobasidium pullulans</i> en fermenteur.....	58
9.3.1. Préparation des pré-cultures.....	59
9.3.2. Culture en fermenteur	59

10. Méthodes analytiques	61
10.1. Détermination de la biomasse sèche et extraction de l'enzyme	61
10.2. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PGase).....	61
10.3. Dosage de l'activité pectine-lyase (PL).....	62
10.4. Dosage de l'activité pectinestérase (PE)	63
10.5. Dosage des protéines	63
10.6. Dosage des glucides par la méthode de Dubois et al., (1956).....	64
Partie III : Purification et caractérisation des PGases	66
11. Purification de la polygalacturonase	66
11.1. Préparation de l'extrait brut	66
11.2. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium	66
11.3. Précipitation des protéines à l'acétone	66
11.4. Ultrafiltration	66
11.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	67
11.6. Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions	67
11.7. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS - PAGE).....	67
11.8. Le zymogramme	68
12. Détermination du taux de glycosylation	68
13. Analyse des produits d'hydrolyse par la chromatographie sur couche mince (CCM)	69
14. Caractérisation des isoenzymes purifiées	69
14.1. Influence du pH	69
14.2. Effet de la température	69
14.3. Etude de la stabilité au pH	69
14.4. Etude de la stabilité thermique	70
14.5. Affinité des polygalacturonases vis-à-vis de différents substrats.....	70
14.6. Détermination des paramètres cinétiques des deux isoenzymes	70
14.7. Action de différents métaux et réactifs chimiques	70
15. Application des exo-polygalacturonases purifiées dans la clarification du jus de citron	70

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Partie I : Isolement et identification des isolats de levures	72
1. Isolement des souches de levures	72
2. diversité des isolats de levures	74
3. Etude morphologique, physiologique et biochimique des souches représentatives	76
3.1. Caractères culturels	76
3.2. Caractères morphologiques	77
3.3. Caractères biochimiques et physiologiques.....	81
3.4. Criblage de souches de levures isolées productrices d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	83
3.5. Caractéristiques et propriétés d' <i>Aureobasidium pullulans</i>	84
3.5.1. Caractères macroscopiques	84
3.5.2. Caractères microscopiques.....	86
3.5.3. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ARNr 26S et de l'ITS	87
3.5.4. Production de pectinase et d'autres enzymes hydrolytiques extracellulaires par la souche (S6) <i>A. pullulans</i>	89

Partie II : Optimisation et production de la Polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers et en fermenteur	90
4. Déchets de tomates substrat de fermentation	90
4.1. Etude de la composition chimique des déchets de tomates	90
4.2. Détermination de la concentration optimale du substrat	92
4.3. Effet de la source carbonée sur la production de la polygalacturonase d' <i>Aureobasidium pullulans</i>	94
5. Optimisation de la production de la polygalacturonase : mise en œuvre d'une approche par plans d'expériences	99
5.1. Criblage des facteurs influençant la production de la PGase	99
5.2. Optimisation par plan composite central (CCD) et méthode de surface de réponse (RSM).....	102
5.3. Analyse graphique des résultats par utilisation des surfaces de réponse.....	106
5.4. Validation du modèle.....	108
6. Etude de la Cinétique de croissance d'<i>Aureobasidium pullulans</i> et de la production de la polygalacturonase	111
6.1. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation	111
6.2. Evolution de la production de la polygalacturonase au cours de la fermentation	111
6.3. Evolution des glucides, des protéines et de la consommation en oxygène (PO ₂)	112
Partie III : Purification et caractérisation des Polygalacturonases	115
7. Essai de purification et caractérisation biochimique des PGases	115
7.1. Essai de purification des PGases de la souche <i>Aureobasidium pullulans</i>	115
7.1.1. Milieu de production.....	115
7.1.2. Précipitation de la PGase	115
7.1.3. Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire	117
7.1.4. Purification par chromatographie échangeuse d'ions	118
7.1.5. Bilan de purification	120
8. contrôle de la pureté des isoenzymes par SDS-PAGE et de l'activité enzymatique par zymogramme	121
9. Mode d'action des isoenzymes purifiées: PG1 et PG2	123
10. Caractérisation des isoenzymes purifiées	124
10.1. Influence du pH sur l'activité des PGases purifiées	124
10.2. Etude de la stabilité vis-à-vis du pH.....	126
10.3. Influence de la température sur l'activité des PGases purifiées	128
10.4. Etude de la thermostabilité des PGases purifiées	130
10.5. Spécificité des PGases purifiées vis-à-vis de quelques substrats	133
10.6. Etude des paramètres cinétiques des PGases purifiées.....	134
10.7. Effet des ions métalliques et des réactifs chimiques sur l'activité des PGases purifiées	136
10.7.1. Effet des ions métalliques	136
10.7.2. Effet des réactifs chimiques	137
11. Essais d'application des PGases purifiées dans la clarification de jus de citron	138
Conclusion générale et perspectives	141
Références bibliographiques	146
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

A. : <i>Aureobasidium</i>	MEA : Malt Extract Agar
ADN : Acide désoxyribonucléique	PCA : Plate Count Agar
ADNr : ADN ribosomique	PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation)
ARN : Acide ribonucléique	PBD : Plackett-Burman Design
ARNr : ARN ribosomique	PDA : Potato Dextrose Agar
5.8S et 26S : Le S correspond au coefficient de Svedberg	PGase : Polygalacturonase
ANOVA : Analyse de la variance	RSM : Response Surface Methodology
aw : Activité de l'eau	rpm : Rotation par minute
BET : Bromure d'Ethidium	SDS : Sodium dodécylsulfate
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	SDS-PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
CCD : Central Composite Design	TAE : Tris Acétate EDTA
CMA : Corn Meal Agar	UI : Unité internationale
C/N : Rapport carbone/azote	YCB : Yeast Carbon Base
DE : Degré d'estérification	YMA : Yeast Malt Agar
DEAE : Diéthylaminoéthanol	YNB : Yeast Nitrogen Base
DNS : 3,5 dinitrosalicylique acide	YNB-glucose : Yeast Nitrogen Base-glucose
DTT : Dithiolthréitol	YP : Yeast Extract Peptone
EDTA : Ethylène diamine tétraacétique acide	YPG : Yeast Peptone Glucose
F : Statistique test Fisher	YPGA : Yeast Peptone Glucose Agar
IAA : Industrie Agro-Alimentaire	

Liste des figures

- Figure 1:** Culture d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 (a) et souche 1113-5 (b) sur milieu PDA. La photo a été prise après 7 jours d'incubation à 25°C (El Hamouchi, 2011). **P.7**
- Figure 2:** Morphologie microscopique d'*Aureobasidium pullulans* var. *namibiae* (Zalar *et al.*, 2008). **P.9**
- Figure 3:** Cycle de vie d'*Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud (Kochova-Kratochvilova *et al.*, 1980). **P.10**
- Figure 4:** Représentation de la molécule de pectine (Albagnac *et al.*, 2002). **P.19**
- Figure 5:** Structure des trois principales unités des pectines (Vincken *et al.*, 2003). **P.20**
- Figure 6:** Site d'action des pectinases impliquées dans la dégradation des pectines (homogalacturonanes). D'après Voragen *et al.*, (2009) et Caffall et Mohnen, (2009). **P.23**
- Figure 7:** Production de fragments pectiques après l'action des polygalacturonases sur les homogalacturonanes (Voragen *et al.*, 2009). **P.26**
- Figure 8:** (A) Polygalacturonase d'*Aspergillus aculeatus* (PDB code : 1IB4). selon Cho *et al.*, (2001). (B) Site actif de la polygalacturonase (Pickersgill et Jenkins, 2003). **P.30**
- Figure 9:** Exemples de topologie du site actif des glycosides hydrolases (Davies et Henrissat, 1995). **P.31**
- Figure 10:** Conversion métabolique de l'acide D- galacturonique chez *Trichoderma Reesei* selon Kuorelahti *et al.*, (2005). **P.35**
- Figure 11:** Géolocalisation de la région d'échantillonnage de sols (Images obtenues de Googlemap, Décembre 2016). **P.42**
- Figure 12:** Organisation génomique de la grande sous unité de l'ADN ribosomique (Morel, 2013). **P.46**
- Figure 13:** Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS. **P.61**
- Figure 14:** Courbe étalon de l'acide galacturonique. **P.62**
- Figure 15:** Courbe étalon pour le dosage des protéines. **P.64**
- Figure 16:** Courbe étalon pour le dosage des glucides. **P.65**
- Figure 17:** Caractères morphologiques de la souche S6 *Aureobasidium pullulans*. **P.85**

- Figure 18:** Morphologie microscopique de la souche (S6) *A. pullulans*. Culture sur milieu YPGA et CMA. **P.86**
- Figure 19A:** Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) basé sur l'alignement de 550 pb des séquences nucléotidique de LSU. **P.88**
- Figure 19B:** Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) basé sur l'alignement de 550 pb des séquences nucléotidiques de l'ITS (espaceurs internes ITS1 et 2 y compris le gène de l'ARNr 5.8S). **P.88**
- Figure 20:** Effet de la concentration du substrat sur la production de la PGase par la souche (S6) *A. pullulans*. **P.93**
- Figure 21:** Comparaison de la production de la PGase par la souche (S6) *Aureobasidium pullulans* sur milieu YPG + 1% pectine de citron (M1) et sur milieu de base (MB) à 4% de déchets de tomates. **P.94**
- Figure 22:** Effet de la source carbonée sur la production de la PGase d'*A. pullulans* (S6). **P.95**
- Figure 23:** Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité de la PGase par rapport à la valeur prédite par le modèle. **P.105**
- Figure 24:** Les courbes de surface de réponse montrant l'effet des facteurs (a) Lactose–CaCl₂, (b) pH–CaCl₂ et (c) pH–Lactose sur l'activité de la PGase d'*A. pullulans*. **P.107**
- Figure 25:** Production de la PGase par *A.pullulans* en Erlen-meyers (a) et en fermenteur de laboratoire (b). **P.110**
- Figure 26:** Evolution cinétique de la croissance, de la production de la PGase et des glucides par la levure isolée d'un sol aride *A. pullulans* cultivé sur milieu optimisé à base de déchets de tomates en fermenteur de 20 l. **P.114**
- Figure 27:** Evolution cinétique des protéines et de la consommation en oxygène par la levure isolée d'un sol aride *A. pullulans* cultivé sur milieu optimisé à base de déchets de tomates en fermenteur de 20 l. **P.114**
- Figure 28:** Effet de différentes concentrations d'acétone sur l'activité de la PGase. **P.117**
- Figure 29:** Profil chromatographique des PGases d'*A. pullulans* sur Séphacryl S-200. **P.118**
- Figure 30:** Purification par chromatographie sur échangeur d'anions, DEAE-Sephrose des fractions (PG1) récoltées après passage sur chromatographie gel filtration (Séphacryl S-200). **P.119**

- Figure 31:** Purification par chromatographie sur échangeur d'anions, DEAE-Sepharose des fractions (PG2) récoltées après passage sur chromatographie gel filtration (Séphacryl S-200). **P.119**
- Figure 32:** Profil électrophorétique SDS –PAGE des PGases pendant la purification. Révélation des protéines par le bleu de Coomassie et parzymogramme (acide polygalacturonique comme substrat). **P.122**
- Figure 33:** Chromatographie en couche mince (CCM) des produits de réaction de l'acide polygalacturonique hydrolysé par différent temps d'hydrolyse des PG1 et PG2 purifiées. **P.123**
- Figure 34:** Influence du pH sur les activités enzymatiques purifiées: PG1 (A) et PG2 (B). **P.125**
- Figure 35:** Etude de la stabilité en fonction du pH de la PG1 (A) et de la PG2 (B) purifiées. **P.127**
- Figure 36:** Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques purifiées: PG1 (A) et PG2 (B). **P.129**
- Figure 37:** Etude de la thermostabilité de la PG1 (A) et de la PG2 (B) purifiées à différentes températures. **P.131**
- Figure 38:** Spécificité du substrat de la PG1 et de la PG2 purifiées. **P.133**
- Figure 39:** Représentation de Lineweaver-Burk de la PG1 et de la PG2 purifiées. **P.135**
- Figure 40:** Effet de différents ions métalliques sur les activités de la PG1 et de la PG2 purifiées. **P.136**
- Figure 41:** Effet de différents réactifs chimiques sur les activités de la PG1 et de la PG2 purifiées. **P.138**
- Figure 42:** Clarification du jus de citron par la PG1 et la PG2 (PGases purifiées) ou par EB (extrait brut) de la souche isolée *A. pullulans* (S6). **P.139**

Liste des tableaux

<u>Taleau 1</u> : Classification de l'espèce <i>Aureobasidium pullulans</i> selon Stenbaek, (2015).	P.8
<u>Taleau 2</u> : Quelques enzymes industrielles produites par la levure <i>Aureobasidium pullulans</i> .	P.17
<u>Taleau 3</u> : Teneur en pectine de différents fruits et légumes (Sakai <i>et al.</i> , 1993 ; Kashyap <i>et al.</i> , 2001).	P.19
<u>Taleau 4</u> : Classification des enzymes dégradant les pectines (homogalacturonanes) d'après Jayani <i>et al.</i> , (2005) et Yadav <i>et al.</i> , (2009).	P.22
<u>Taleau 5</u> : Les différentes origines des polygalacturonases.	P.28
<u>Taleau 6</u> : Caractérisation biochimique de quelques PGases microbiennes.	P.33
<u>Taleau 7</u> : Générateurs des matrices pour N= 4, 8, 12, 16, et 20 essais de PBD (Plackett <i>et Burman</i> , 1946).	P.54
<u>Taleau 8</u> : Matrice du PBD pour l'étude de 7 variables avec 8 expériences.	P.54
<u>Taleau 9</u> : Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du PBD.	P.54
<u>Taleau 10</u> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.	P.57
<u>Taleau 11</u> : Structure du plan composite centré à 3 facteurs.	P.57
<u>Taleau 12</u> : Conditions de fermentation.	P.60
<u>Taleau 13</u> : Isolats de levures obtenus à partir de différents échantillons de sol.	P.73
<u>Taleau 14</u> : Résultats du séquençage des amplicons obtenus après PCR, de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S et de l'ITS pour la souche S6, et comparaison aux séquences de la base de données GenBank.	P.75
<u>Taleau 15</u> : Caractères culturels des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPGA à 25°C.	P.78
<u>Taleau 16</u> : Caractères morphologiques des souches de levures cultivées sur YPG pendant 3 jours à 25°C.	P.79-80
<u>Taleau 17</u> : Résultats des tests d'assimilation des glucides et des sources azotées des souches de levures isolées.	P.81
<u>Taleau 18</u> : Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures.	P.81

<u>Taleau 19</u> : Effet de la température et de la croissance à différentes concentrations de NaCl des levures isolées.	P.82
<u>Taleau 20</u> : Mise en évidence de quelques activités hydrolytiques extracellulaires des souches de levures isolées.	P.83
<u>Taleau 21</u> : Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires chez la souche (S6) <i>A. pullulans</i> .	P.89
<u>Taleau 22</u> : composition de déchets de tomates par rapport à 100% au poids sec.	P.91
<u>Taleau 23</u> : Effet des facteurs testés sur la production de la PGase (Plan de Plackett-Burman).	P.101
<u>Taleau 24</u> : L'analyse statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la PGase.	P.101
<u>Taleau 25</u> : Valeurs expérimentales (observées) et prédites de l'activité de la PGase d' <i>A.pullulans</i> par le CDD.	P.103
<u>Taleau 26</u> : Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité de la PGase.	P.104
<u>Taleau 27</u> : Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité de la PGase.	P.104
<u>Taleau 28</u> : Production de la PGase microbienne rapportée par la littérature.	P.109
<u>Taleau 29</u> : Précipitation par le sulfate d'ammonium ou l'acétone de l'extrait brut de la PGase.	P.115
<u>Taleau 30</u> : Etapes et bilan de purification des deux isoenzymes PG1 et PG2.	P.120
<u>Taleau 31</u> : Caractérisation de quelques PGases d'origine microbienne rapportée par la littérature.	P.132
<u>Taleau 32</u> : Effet des PGases purifiée (PG1 et PG2) et de l'extrait brut sur le taux de clarification du jus de citron. Les sucres réducteurs et le volume sont mesurés dans le surnageant. Le Poids sec dans le culot est pesé après centrifugation du jus traité.	P.139

Introduction

Introduction

« *Le rôle de l'infiniment petit est infiniment grand.* »
Louis Pasteur.

Quotidiennement, l'ensemble de la population consomme des biens et services issus des biotechnologies. Qu'il s'agisse d'un aliment, d'un médicament, d'une pièce de vêtement, d'un détergent, d'une crème hydratante ou parfois même de certaines matières plastiques, de biocarburant ou d'un simple papier. Ces étapes de fabrication de ces produits font appelle à l'action d'enzymes microbiennes (Ruiz *et al.*, 2017).

Parmi les nombreuses enzymes, les industries montrent un intérêt grandissant pour les pectinases qui offrent de nombreuses possibilités d'utilisation dans différents secteurs industriels (IAA, textile, papeterie, ...) et dont les domaines d'application ne cessent de s'accroître. Les enzymes pectinolytiques occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes (Ruiz *et al.*, 2017), marché en pleine croissance, avec un chiffre d'affaires de 4.6 milliards de dollars pour l'année 2016. Une croissance de 5.8% est attendue pour la période de 2017 à 2022 (Industrial Enzyme Market, 2017). Novozymes (Danemark), Novartis (Suisse), Roche (Allemagne) et Biocon (Inde) sont les principaux producteurs commerciaux de pectinases. En Algérie, l'industrie des enzymes est totalement absente.

Les préparations pectinolytiques commerciales sont obtenues à partir des moisissures du genre *Aspergillus*, particulièrement *Aspergillus niger* (Ahmed *et al.*, 2016). Les préparations des pectinases à partir de cette moisissure contiennent les polygalacturonases, les pectinestérases et les pectines lyases. Mais d'autres enzymes parfois indésirables, sont présentes : protéases, glycosidases, oxydoréductases, xylanases, cellulases et hemicellulases (Pilnik et Rombouts, 1981). Certaines d'entre elles ont un effet défavorable sur la qualité du produit traité (Gummadi et Panda, 2003). Toutefois, malgré leur potentiel catalytique, certaines enzymes ne peuvent pas être utilisées efficacement dans les procédés industriels car leur stabilité est altérée par les conditions extrêmes retrouvées dans ces procédés avec des températures dépassant les 70°C. Pour répondre aux besoins de l'industrie, il devient donc

primordial d'identifier de nouvelles enzymes ayant des propriétés de thermostabilité compatibles industriellement.

En l'état actuel, les micro-organismes dominent la terre entière, à peine 1% des levures ont été étudiées (Kurtzman *et al.*, 2011). Par conséquent le potentiel enzymatique de nombreux micro-organismes reste inexploré. En effet, Les levures constituent un groupe important de micro-organismes suscitant un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs bioalimentaire et médical (Buzzini et Margesin, 2014).

Dans cette optique, la présente étude vise à identifier de nouvelles enzymes pectinolytiques répondant aux critères de l'industrie, à savoir la thermostabilité et la capacité à hydrolyser les substances pectiques en conditions alcalines. Pour ce faire, on a procédé à un screening portant sur vingt souches appartenant à une biodiversité de levures des sols de palmeraies et de steppes de la région d'El-M'gheir Wilaya d'EL-Oued (Sud-Est d'Algérie). D'après notre recherche bibliographique, la présente étude est la première à avoir caractérisé des souches de levures pectinolytiques d'un milieu aride Algérien.

Pour diminuer le coût de production de pectinases, on a utilisé les déchets de tomates industrielles comme matière première par fermentation en culture submergée. Les déchets de tomates ont été choisis comme milieu de base en raison de leur abondance en Algérie, leur biodégradabilité et leur richesse en substrats carbonés et en protéines. Peu exploitée en Algérie, où une partie est utilisée dans l'alimentation animale et le reste est mis à la décharge. Les déchets de tomates constituent une source renouvelable utilisable en biotechnologies (Grassino *et al.*, 2016).

Dans le cadre du présent travail, ce document comprend une partie bibliographique relatant l'état des connaissances sur les levures et les enzymes polygalacturonases. L'étude expérimentale et la partie résultat sont entreprises en plusieurs axes de recherches :

- ✚ Le premier axe concerne l'isolement, l'identification et la sélection des souches levuriennes pectinolytiques.
- ✚ Le second volet étudie la composition chimique du substrat, la détermination de la concentration optimale de déchets de tomates pour la production de PGases. Dans le but d'améliorer davantage la production en enzyme d'autres sources carbonées ont été également testées.

- ✚ Le troisième axe vise l'optimisation de la production de la PGase par application de plans statistiques : Plackett-Burman, et surfaces de réponse.
- ✚ Dans le quatrième axe et afin de tester la capacité de la levure isolée *Aureobasidium pullulans* (S6) à se développer et à produire de l'enzyme en conditions industrielles, une production en Scale-up a été réalisée en fermenteur de 20 l.
- ✚ Le cinquième volet a été consacré à la purification et à la caractérisation des PGases.
- ✚ Enfin, en dernière étape, des essais d'application des PGases purifiées ont été effectués sur jus de citron pour sa clarification.

Au terme de cette étude, d'autres perspectives pour ouvrir de nouvelles pistes de recherches sont suggérées.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Levures

1.1. Généralités

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, champignons à thalle unicellulaire immobile, non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes, (Kurtzman *et al.*, 2011). En plus de leur rôle dans le biocyclage des éléments nutritifs, les levures peuvent établir des relations avec d'autres organismes en tant que mutualistes, concurrentes, parasites ou agents pathogènes (Starmer et Lachance, 2011).

Certaines levures ont une reproduction sexuée qui correspond à une phase de leur cycle biologique où on note une alternance des phases haploïde et diploïde. La multiplication asexuée, toujours présente, se fait essentiellement par bourgeonnement aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées. Il peut aussi être multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces*.

Deux autres modes de reproduction végétative peuvent être rencontrés : la fission, caractéristique du genre *Schizosaccharomyces*, qui se manifeste par la formation d'une paroi transversale au grand axe de la levure et le bourgeonnement sur stérigmates, propre aux stérigmatomycètes, où la cellule fille prend naissance sur une protubérance formée sur la cellule mère (Larpent *et al.*, 1997).

Sous sa forme la plus simple, le thalle est une cellule isolée mais les levures se présentent le plus souvent sous la forme de pseudomycélium (*Candida albicans*). Certaines espèces peuvent produire un vrai mycélium caractéristique de champignons filamenteux (*Eremothecium ashbyii*). Les espèces de levures connues appartiennent à deux phylums fongiques distincts : Ascomycota et Basidiomycota (Kurtzman *et al.*, 2011). Ces micro-organismes ubiquitaires sont universellement répandus. On les trouve dans différentes niches écologiques telles que : sol, air, eau, tube digestif de certains animaux et les galeries d'insectes (Starmer et Lachance, 2011). Certaines levures ont été isolées à partir d'environnements extrêmes comme celles isolées à partir de l'antarctique (Turchetti *et al.*, 2011) et lacs salins (Plemenitas *et al.*, 2008). D'autres vivent principalement sur les végétaux riches en sucres comme les baies de raisin (Chavan *et al.*, 2009). Néanmoins, malgré une pléthore d'études, on estime que seulement 1% de toutes les espèces de levures existantes est actuellement connu. De 1820 à 2011, le nombre de levures décrites a augmenté de façon spectaculaire. Actuellement, il y a environ 1500 espèces de levures connues, ce qui signifie

que le nombre prévu d'espèces de levures sur terre serait d'environ 150 000 (Kurtzman *et al.*, 2011 ; Buzzini et Margesin, 2014).

1.2. L'environnement sol : un écosystème microbien complexe

Le sol est probablement le plus intéressant de tous les environnements naturels pour les microbiologistes, en ce qui concerne la taille de la communauté microbienne et la diversité d'espèces présentes. Un gramme de sol de forêt contient environ $4 \cdot 10^7$ bactéries, tandis qu'un gramme de sol cultivé ou de prairie contient environ $2 \cdot 10^9$ bactéries (Paul et Clark, 1989). Les champignons constituent également une fraction très importante de la biomasse microbienne. Dans les forêts tempérées ou boréales dans lesquelles la biomasse des seuls champignons symbiotiques a pu être estimée à 1/3 de la biomasse microbienne totale (Högberg et Högberg, 2002).

En effet, le métabolisme et la survie des micro-organismes du sol et donc la composition de la communauté microbienne est fortement influencée par la disponibilité en eau et en nutriments et par d'autres facteurs exogènes comme le pH, la disponibilité en oxygène ou la température. Le sol est également un important réservoir de carbone organique. Il est le siège de la transformation de la plupart de la matière organique issue des plantes, des animaux et des micro-organismes, en humus par une combinaison de processus microbiologiques et abiotiques.

1.3. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des levures

La diversité des levures peut être évaluée par un ensemble de méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

1.3.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques incluent toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et reposent sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des levures via des techniques standardisées (Kurtzman *et al.*, 2011). Les critères morphologiques fournissent des renseignements concernant les caractéristiques sur la forme de la cellule levurienne et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture (taille, forme, couleur, état de la surface). Les principales méthodes biochimiques sont basées sur la détermination de l'activité de différentes enzymes caractéristiques de certaines espèces de levures. L'étude des caractères physiologiques impliqués dans l'identification des levures repose sur la fermentation de sucres, la capacité

d'utiliser différentes sources de carbone et d'azote, la croissance à différentes variations de températures, la croissance sur cycloheximide à 0,01%, la croissance sur glucose 50%, la sporulation, la résistance aux antifongiques ou l'osmotolérance. Les caractéristiques phénotypiques classiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la description et l'identification des souches d'une même espèce (Marcellino *et al.*, 2001). Il est important de noter que les taxonomistes prescrivent que ces critères phénotypiques soient pris en compte lorsqu'un auteur veut donner un nom à une nouvelle espèce.

1.3.2. Méthodes génotypiques

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments bien définis. Parmi les techniques appliquées le séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S et de la région ITS (voir plus loin dans chapitre Matériel et méthodes).

1.4. La levure *Aureobasidium pullulans*

1.4.1. Généralités

Aureobasidium pullulans, appelée aussi "levure noire", est un champignon levuriforme (yeast-like organisms). C'est un saprophyte cosmopolite qui est communément isolé à partir du sol, des débris des plantes, des fruits, des céréales, des surfaces en bois, des sédiments marins, eaux,.... (Zalar *et al.*, 2008 ; Peterson *et al.*, 2013). Les *A. pullulans* contribuent à une décomposition rapide de la matière organique à travers la production d'enzymes cellulolytiques, pectinolytiques et lignolytique (Domsh *et al.*, 1980). Les examens cliniques ont rarement rapporté qu'il est un agent pathogène des plantes ou des êtres vivants (Kwon-Chung et Bennet, 1992).

Les *A. pullulans* présentent un intérêt industriel et économique très important. Ils sont utilisés pour la production d'une large variété de métabolites, des enzymes, des antibiotiques, des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.) et des polysaccharides biodégradables tel que le pullulane, utilisé pour la conservation des aliments et aussi en industrie pharmaceutique (Chi *et al.*, 2009). De plus, L'espèce *A. pullulans* (de Bary) Arnaud, semble présenter de bonnes potentialités d'utilisation en tant qu'agent de lutte biologique et ceci en raison de sa capacité à coloniser une large gamme d'hôtes, ainsi que sa capacité de survie et d'adaptation à différentes conditions environnementales (Schena *et al.*, 2003).

1.4.2. Caractères cultureux

L'espèce peut être cultivée dans la plupart des milieux de culture de champignons. Elle est caractérisée par des colonies mycoïdes blanchâtres ou roses claires qui noircissent avec le vieillissement du à la production de mélanine (Figure 1), où des conidies de types blastospores, unicellulaires, hyalines, ovoïdes et de différentes formes et tailles et des hyphes hyalins à parois épaisses et contenant des septas transversaux sont observées. Cependant, selon le pH du milieu, la morphologie des cellules produites peut changer. A un pH 4.0, *A. pullulans* peut produire en même temps la forme unicellulaire et la forme hyphale. Alors qu'à un pH 5.0, elle ne produit que la forme unicellulaire (Mounir *et al.*, 2007). La pseudo-levure peut croître entre 10 et 35°C (ne croît pas à 37°C) avec un optimum à 25°C (St-Germain et Summerbell, 1996).



Figure 1: Culture d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 (a) et souche 1113-5 (b) sur milieu PDA.

La photo a été prise après 7 jours d'incubation à 25°C (El Hamouchi, 2011).

1.4.3. Histoire et taxonomie d'*Aureobasidium pullulans*

A. pullulans appartient à la division des Ascomycetes et la classe des Dothideomycetes (Tableau 1) anciennement appelé *Dermatium pullulans* par de Bary en 1866. Le même micro-organisme a été isolé quelques années plus tard par Viala et Boyer, (1891) sur des feuilles de *Vitis vinifera* et ils l'ont appelé *Aureobasidium vitis*. Arnaud (1910) a reconnu que, dans les deux cas, il s'agissait du même micro-organisme et il a suggéré le nom d'*Aureobasidium pullulans*. La taxonomie de ces levures peut être parfois difficile à cause de leur haut

pléomorphisme. En effet, la même souche change de morphologie sous plusieurs conditions environnementales.

A. pullulans est décrite comme une pseudo-levure (yeast-like organisms) qui montre un caractère dimorphique puisqu'il se trouve soit à l'état levuriforme, mycélien ou intermédiaire.

Tableau 1: Classification de l'espèce *Aureobasidium pullulans* selon Stenbaek, (2015).

Règne	Champignon (Fungi)
Division(Phylum)	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Dothideales
Famille	Dothioraceae
Genre	<i>Aureobasidium</i>
Espèce	<i>Aureobasidium pullulans</i>

Synonymes : *Aureobasidium oleae*, *Aureobasidium pullulans*, *Azymocandida malicola*, *Candida malicola*, *Cladosporium pullulans*, *Dematium pullulans*, *Exobasidium vitis*, *Hormonema oleae*, *Hormonema pullulans*, *Pullularia fermentans*, *Pullularia fermentans var. schoenii*, *Pullularia pullulans*, *Torula oleae*, *Torula schoeni*.

1.4.4. Morphologie et cycle de vie

Les hyphes végétatifs de 3 à 12 µm de large sont, septés, hyalins (incolores) au départ et devenant brun noirâtre avec l'âge. Certains filaments présentent une paroi plus épaisse et bien foncée produisant des arthroconidies puis des chlamydospores en vieillissant. Les blastoconidies sont unicellulaires (de 7 à 16 µm x 3,5 µm), de forme ovale, hyalines se développant en grappe de façon synchrone à partir de cellules conidiogènes peu différenciées, intégrées dans les filaments ou disposées en position terminale (Figure 2). Après leur détachement, les blastoconidies bourgeonnent à plusieurs endroits et peuvent donner des chaînettes de spores courtes de 2, 3 ou 4 éléments. Des endoconidies peuvent se former dans une cellule intermédiaire puis ensuite relarguer par une cellule voisine vide (De Hoog *et al.*, 2000).

Le cycle de vie d'*Aureobasidium pullulans* est très complexe (Figure 3). La reproduction asexuée imparfaite est la plus courante, alors que la reproduction sexuelle parfaite est rarement observée, même dans les conditions de laboratoire contrôlées (Stenbaek, 2015).

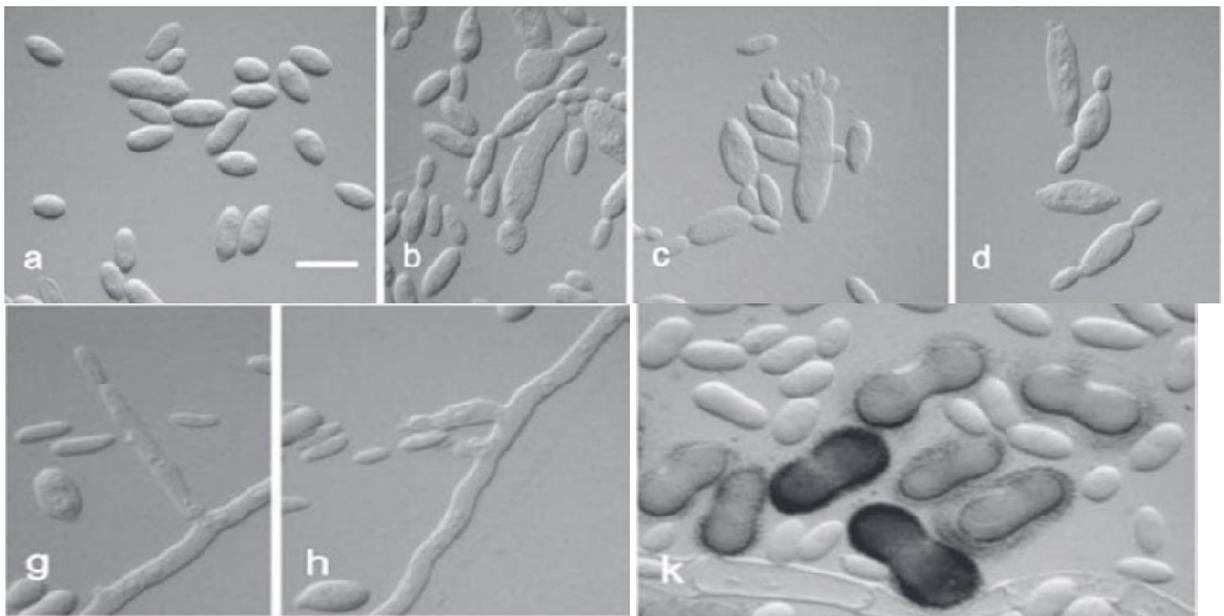


Figure 2: Morphologie microscopique d'*Aureobasidium pullulans* var. *namibiae* (Zalar *et al.*, 2008). **a:** conidie ; **b-d:** conidie (blastoconidies) et bourgeonnement des cellules ; **g-h:** hyphes avec de longues cellules conidiogènes latérales ; **k:** chlamydospores. Barre d'échelle = 10 μ m.



Figure 3: Cycle de vie d'*Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud (Kochova-Kratochvilova *et al.*, 1980).

1. Blastoconidies ovales, en forme de citron, en forme de fuseau, dressées (rarement courbés), la cicatrice basale est située sur une petite dent distinctement formée; bourgeonnement donne lieu à des petites conidies secondaires ;
2. Blastoconidies germent, donnant lieu à un mycélim primaire ;
3. Hyphes avec blastoconidies, les endoconidies se produisent dans les cellules intercalaires ;
4. Hyphes aériens minces sont associés pour former des poils aériens plus épais, ils forment parfois des racines de larges extrémités ;
5. Chlamydospores intercalaires et la mélanine dans les parois cellulaires, ce sont des spores de résistance aux conditions défavorables ;
6. Chlamydospores libres à paroi épaisse avec septa ;
7. Bourgeonnement de chlamydospore noir en blastoconidies hyalines ;
8. Chlamydospores incolores division par septa, leur contenu est granulaire, ils sont également appelés arthroconidies ;
- Bourgeonnement de blastoconidies donnant lieu à des conidies secondaires.

1.5. Conditions de culture des levures

Les levures sont des organismes vivants dont l'activité requiert des apports nutritionnels nécessaires à la synthèse des éléments de base qu'elles dégradent à l'aide d'enzymes exocellulaires appropriées, pour diverses activités métaboliques, y compris la reproduction des cellules (Salmon, 1998). Ces nutriments doivent être présents dans le milieu de culture en concentration optimale pour éviter toute carence susceptible de limiter l'activité cellulaire.

En outre, plusieurs facteurs environnementaux tels que : la température, le pH et l'aération (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992) influencent le développement des levures.

1.5.1. Les éléments nutritifs

a. Sources de carbone

Les levures étant hétérotrophes ont besoin pour leur croissance d'une source de carbone qui est également leur source d'énergie. Le carbone constitue 50% du poids sec de la levure (Leveau et Bouix, 1993). En effet, *A. pullulans* possède une activité glucosidase (α et β -glucosidases) relativement importante qui lui permet de métaboliser un grand nombre de sucres : glucose, fructose, galactose, mannose, saccharose, tréhalose, ainsi que le lactose (Lotrakul *et al.*, 2013) et de nombreux autres oligosaccharides (Baffi *et al.*, 2013). Cependant, Yurlova et De Hoog, (1997) ont trouvé une autre variété, *Aureobasidium pullulans* var. *aubasidani*, différente des autres par sa réponse négative à l'assimilation de méthyle- α -D- glucoside et du lactose.

Par ailleurs, il semble exister une compétition entre le fructose et le glucose pour un même transporteur avec une affinité pour le glucose (Gilis, 1999), expliquant la consommation plus rapide lors d'un mélange de ces deux dimères. Dans le cas d'un mélange de glucose et de saccharose, ce même auteur observe une croissance diauxique chez *Brettanomyces bruxellensis*. La levure commence sa croissance en consommant le glucose et voit cette dernière ralentir lorsque ce substrat disparaît. Une nouvelle phase de croissance plus lente est alors observée en consommant le saccharose. Une telle diauxie a également été décrite sur des mélanges glucose-cellobiose (Parekh *et al.*, 1988). Ces observations montrent que le glucose exerce une répression ou inhibition d'assimilation des autres sucres.

Certaines levures utilisent des polyols, des alcools (glycérol, éthanol, méthanol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide

citrique grâce aux enzymes de leur capital génétique (Kurtzman et Suzuki, 2010). Les travaux de Israilides et al., (1999) montrent que la levure *A. pullulans* peut se développer sur des milieux riches en dextrines, en amidon, en pectine et en inuline.

En fermentation industrielle, le sucre utilisé est majoritairement le glucose même si d'autres sucres peuvent le remplacer comme substrat de croissance : fructose, galactose, maltose... Des résidus de l'industrie sucrière (mélasse par exemple) sont également exploités en tant que substrat pour les levures (Henes et Sonnleitner, 2007).

b. Sources d'azote

L'azote qui représente environ 10% du poids sec, joue un rôle capital car il entre dans la constitution de molécules simples (acides aminés, nucléotides, vitamines et coenzymes) et des macromolécules (protéines et acides nucléiques) essentielles au fonctionnement cellulaire (Leveau et Bouix, 1993). Toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puisqu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés). Certaines levures sont capables d'assimiler les nitrites et les nitrates comme seule source d'azote (Kurtzman *et al.*, 2011). Cette capacité est due à leur potentiel enzymatique qui comporte des nitrites et nitrate-réductases. Ces enzymes sont cependant inhibées par un excès d'ammonium, phénomène qui aura pour conséquence de favoriser l'assimilation préférentielle des sources azotées organiques. Contrairement à *Aureobasidium*, certains genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces* (Bourgeois et Larpent, 1996).

L'apport d'azote est réalisé généralement sous forme de composés organiques azotés : peptone, extrait de levure, corn steep liquor, ... L'extrait de levure apparaît comme l'élément majeur favorisant la croissance microbienne en particulier pour les levures, car il apporte de nombreux acides aminés et d'autres formes d'azote organique (Deak, 2006).

c. Minéraux, oligoéléments et vitamines

Les minéraux sont des éléments indispensables aux levures. Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables on trouve les cations monovalents : K^+ , Na^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ , ainsi que les cations bivalents : Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}

et Mn^{2+} . Les ions Ca^{2+} ont un rôle dans le fonctionnement des microfilaments, dans l'activité des enzymes et dans la maintenance de l'intégrité structurale des membranes (Leveau et Bouix, 1993). D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'inositol) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés ou des groupements prosthétiques d'enzymes essentiels à la croissance des levures (Kurtzman *et al.*, 2011) comme pour *Saccharomyces* et *Brettanomyces* qui ont besoin de biotine et de thiamine pour croître (Conterno *et al.*, 2006).

1.5.2. Métabolisme des levures

Le comportement métabolique de la levure peut être purement oxydatif, fermentaire, ou oxydo-réductif. Il dépend de la nature de la source carbonée et les conditions de culture (Rose, 1980).

1.5.2.1. Métabolisme oxydatif

Ce type de métabolisme nécessite la présence d'oxygène et une concentration en substrat limitée afin d'éviter un changement métabolique vers la production d'éthanol et d'autres co-métabolites. Dans ces conditions, le glucose est oxydé via les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. En effet, la levure *A. pullulans* présente un métabolisme aérobie strict (Belin, 1979).

1.5.2.2. Métabolisme fermentaire

En anaérobiose, les levures sont capables de fermenter le glucose en éthanol, en dioxyde de carbone, avec coproduction de glycérol, de certains acides et esters (Lai, 2010). Il est à noter que le pouvoir fermentaire d'*A. pullulans* est nul (Belin, 1979).

1.5.2.3. Métabolisme oxydo-réductif ou métabolisme respiro-fermentaire

En présence d'oxygène certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ont la particularité de présenter un métabolisme mixte : fermentation (production fermentaire d'éthanol) et respiration (production oxydative de biomasse).

Cependant, en aérobie le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* est purement oxydatif lorsque l'apport en glucose est faible. Dans ces conditions, la biomasse et le CO_2 sont les seuls produits synthétisés par la levure (Van Hoek *et al.*, 2000). Par contre le métabolisme cellulaire devient oxydo-réductif lorsque l'apport de glucose dépasse un certain seuil. Dans ce cas, les produits synthétisés sont la biomasse, le CO_2 , le glycérol, l'acétate et l'éthanol ; le rendement en biomasse est fortement réduit. De plus, le NADH généré à partir de la glycolyse

est réoxydé par la production d'éthanol (fermentation) plutôt que par les voies combinées au métabolisme oxydatif (glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) (Fritsche, 1972). Cette bascule métabolique est appelée transition respiro-fermentaire ou effet Crabtree (Crabtree, 1928 ; Fiechter et Seghezzi, 1992) qui est, du point de vue œnologique très importante car cet effet Crabtree permet de réaliser la fermentation en présence d'une faible concentration d'oxygène.

1.5.3. Effet des facteurs environnementaux

Les levures sont sensibles à plusieurs facteurs environnementaux: la température, le pH et l'apport en oxygène (Wang *et al.*, 2007).

a. Effet de la température

Les levures possèdent des températures de croissance propres à elles : les températures optimales peuvent varier, de -5°C à 20°C pour les psychrophiles, de 20°C à 45°C pour les mésophiles et de 45°C à plus de 100°C pour les thermophiles (Kurtzman *et al.*, 2011).

La pseudo-levure *A. pullulans* peut croître entre 10 et 35°C, elle ne pousse pas à 37°C ; sa croissance optimale est de 25°C (St-Germain et Summerbell, 1996). Cependant, il existe une autre catégorie de levures qui se développent à des températures supérieures à 50°C. Elles sont appelées levures thermophiles ou thermotolérantes. Ces organismes prospèrent dans le compost, les meules de foin, les conduites d'eau chaudes et les sources chaudes. Elles diffèrent des mésophiles par leurs enzymes beaucoup plus stables et leurs systèmes de synthèse protéique, capables de fonctionner à des températures élevées. En outre, leurs lipides membranaires sont plus saturés et ont des points de fusion très élevés ; ainsi les membranes des thermophiles restent intactes à des températures élevées (Hencké, 2000). Par ailleurs, d'autres théories sur la thermophilie proposent que la tolérance des micro-organismes aux températures élevées soit expliquée par les propriétés physico-chimiques spécifiques des polymères cellulaires, des membranes et des organelles, qui leur permettent une stabilité et une survie à des températures élevées (Dix et Webster, 1995).

b. Effet du pH

Le pH a une influence sur le développement des levures qui ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration

et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Les levures sont en général acidophiles et mésophiles. Elles se multiplient à des pH compris entre 3 et 7.5. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4.5 à 7 (Kurtzman *et al.*, 2011) et certaines espèces tolèrent mieux des pH très acides voisins de 1.5 : *Candida gilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula rubra* (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997). L'étude de Conterno *et al.*, (2006) montre que 33 souches de *Brettanomyces* d'origines diverses peuvent se développer à pH 2. Cependant, les levures du genre *Candida* se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 et peuvent survivre à pH 9. En dessous de pH 5.5, les levures entrent facilement en compétition avec les bactéries. Malgré qu'elles supportent la plupart des acides organiques rencontrés dans les aliments, d'autres acides organiques les inhibent : acide acétique et acide lactique (Bourgeois *et al.*, 1996).

c. Effet de l'oxygène

L'oxygène est un élément indispensable pour la croissance aérobie des levures. En manque d'oxygène, la voie métabolique des levures change et la respiration est remplacée par la fermentation. En anaérobie, la croissance est remplacée par une production d'éthanol. Cependant, quelques espèces orientent leur métabolisme vers la fermentation même en présence d'oxygène (*Candida* et *Kluyveromyces*) (Leveau et Bouix, 1993).

Des travaux sur l'effet de l'oxygène montrent que la production d'acide acétique par *Brettanomyces* est favorisée par l'augmentation de l'apport d'oxygène (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003).

d. Influence de la pression osmotique (PO) et de l'activité de l'eau (aw)

L'activité de l'eau (aw) est le rapport de la pression osmotique (PO) de vapeur d'eau du milieu sur la pression d'eau distillée à la même température. Un état d'équilibre doit être établi entre l'atmosphère et le produit.

La plupart des levures nécessitent entre 90 et 95% d'humidité relative, mais certaines peuvent se développer à moins de 65% : ce sont les levures osmophiles, rencontrées dans les moûts de raisin concentrés (Kurtzman *et al.*, 2011). Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0.60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes ou osmotolérantes. La plus xérotolérante est *Saccharomyces rouxii* (Guiraud, 1998).

1.6. Applications biotechnologiques d'*Aureobasidium pullulans*

La plupart des levures sont de type GRAS (Generally Recognised As Safe) pour leur innocuité comme *A. pullulans* qui occupe une place privilégiée dans les activités industrielles. Il est considéré comme le premier producteur de pullulane et de β - glucane utilisés dans diverses applications industrielles et médicales (Singh *et al.*, 2008 ; Muramatsu *et al.*, 2012).

En raison des propriétés spécifiques d'*A. pullulans*, telles que l'utilisation très efficace de plusieurs déchets agro-industriels comme sources de carbone peu coûteuses (extraits de peaux et de pulpes de raisin, déchets d'amidon, déchets d'huile d'olive, effluents et de la mélasse) et sa capacité élevée de sécrétion de métabolites et de protéines, plusieurs projets impliquant cette levure ont rapidement été développés, principalement de procédés de bioconversion pour les industries alimentaires et chimiques (Israilides *et al.*, 1999). La plus ancienne de ces applications est la production de protéines d'organismes unicellulaires (POU ou "single cell protein") pour l'alimentation animale. De plus, *A. pullulans* se distingue par sa capacité à sécréter une gamme d'enzymes importantes (Tableau 2) comme la glucoamylase, la xylanase, les protéases, les amylases, l'uréase, la DNase et l'RNase. La levure peut également produire de l'acide malique, utilisé comme adjuvant en pharmacie et en IAA (Zou *et al.*, 2013), des biotensioactifs, employés en industries alimentaires, en médecine et en cosmétique, (Kim *et al.*, 2015) et des molécules bioactives liamocines (huiles de mannitol) qui montrent des activités anticancéreuses et antimicrobiennes contre *Streptococcus sp.* (Price *et al.*, 2013 ; Manitchotpisit *et al.*, 2014; Bischoff *et al.*, 2015).

Tableau 2: Quelques enzymes industrielles produites par la levure *Aureobasidium pullulans*.

Enzyme	Code	Industrie	Références
Amylase	EC 3.2.1.1	Saccharification de l'amidon, panification, textile, papeterie, pharmacie	Haifeng <i>et al.</i> , 2007
β-galactosidase	EC 3.3.1.23	Applications alimentaires	Lin et Chen, 2004
β-glucosidase	EC 3.2.1.21	Amélioration de l'arôme, biodégradation de la cellulose	Baffi <i>et al.</i> , 2013
Feruloyl esterase	EC 3.1.1.73	Applications alimentaires et pharmaceutiques, papeterie, industrie chimique (composant pour crème solaire), production de carburants	Rich <i>et al.</i> , 2016
Lipase	EC 3.1.1.3	Catalyse une large gamme de réactions, y compris l'hydrolyse, inter-estérification, alcoololyse, acidolyse, estérification et aminolyse, production de biodiesel	Hasan <i>et al.</i> , 2006
Mannanase	EC 3.2.1.78	Papeterie, bioconversion des déchets en sucres fermentescibles, réduction de la viscosité des extraits de café, production de manno-oligosaccharides	Lin et Chen, 2004
Pectinase	EC 3.2.1.15	Extraction et clarification des jus de fruit, traitement des eaux usées, fermentation du thé et du café, extraction des huiles	Kashyap <i>et al.</i> , 2001 ; Jayani <i>et al.</i> , 2005
Protéase alcaline	EC 3.4.17.	Détergent à lessive, traitement du cuir, récupération de l'argent, industrie pharmaceutique et médicale, applications alimentaires, traitement des déchets	Ni <i>et al.</i> , 2008
Pullulanase	EC 3.2.1.41	Brasserie, panification, domaine médical et pharmaceutique, industrie chimique (détergents pour lave-vaisselle)	Moubasher <i>et al.</i> , 2010
Xylanase	EC 3.2.1.8	Applications alimentaires, papeterie, textile, productions de composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine (tensio-actifs)	Chi <i>et al.</i> , 2009

2. Enzymes glycolytiques : Pectinases

2.1. Les substances pectiques

Les substances pectiques ou pectines représentent la troisième source de polysaccharides retrouvés dans les parois cellulaires végétales dans la lamelle moyenne et la paroi primaire.

Ce polysaccharide anionique (chargé grâce à sa forte teneur en acide galacturonique) linéaire est constitué majoritairement d'unités α -D-acide galacturonique joints en α (1-4) par une liaison glycosidique. Des molécules de L- rhamnose (1-4%) sont parfois introduites dans la chaîne en α (1-2) produisant des irrégularités. Plusieurs glucides neutres tels le galactose, le glucose, le rhamnose, l'arabinose et le xylose participent à sa structure par la formation de chaînes latérales (acétylation et méthylation) (Figure 4) (Scheller, 2007 ; Voragen *et al.*, 2009). L'arrangement de ces constituants forme différents domaines pectiques, les domaines acides et les domaines neutres. La pectine contient environ 55-75% d'acide galacturonique méthyl-estérifié. Elle est dite « Hautement Méthylée » lorsqu'elle renferme plus de 50% d'esters sur ses groupements carboxyliques, et « Faiblement Méthylée » quand les esters sont moins de 50%. Le degré d'estérification (DE), défini comme le pourcentage d'acides galacturoniques méthylestérifiés, est une caractéristique importante de la pectine étant donné que c'est ce paramètre qui définit ses propriétés fonctionnelles (Schols *et al.*, 1995). Le DE de l'acide polygalacturonique est inférieur à 5, celui de la pectine faiblement méthoxylées (LM) : $5 < DE < 50$, dans le cas de la pectine hautement méthoxylées (HM) : $DE > 50$ (Bourles, 2010).

Par ailleurs, les pectines représentent environ 0.5 à 4% du poids frais du matériel végétal (Kashyap *et al.*, 2001), avec une masse moléculaire variant de 50 à 150 KDa suivant l'origine botanique (Voragen *et al.*, 1995). Certains sous-produits de l'industrie alimentaire, comme les écorces d'agrumes, le marc de pomme, la pulpe de betterave et de tomate, peuvent être considérés comme d'excellentes sources de pectine et de fibres alimentaires (Tableau 3).

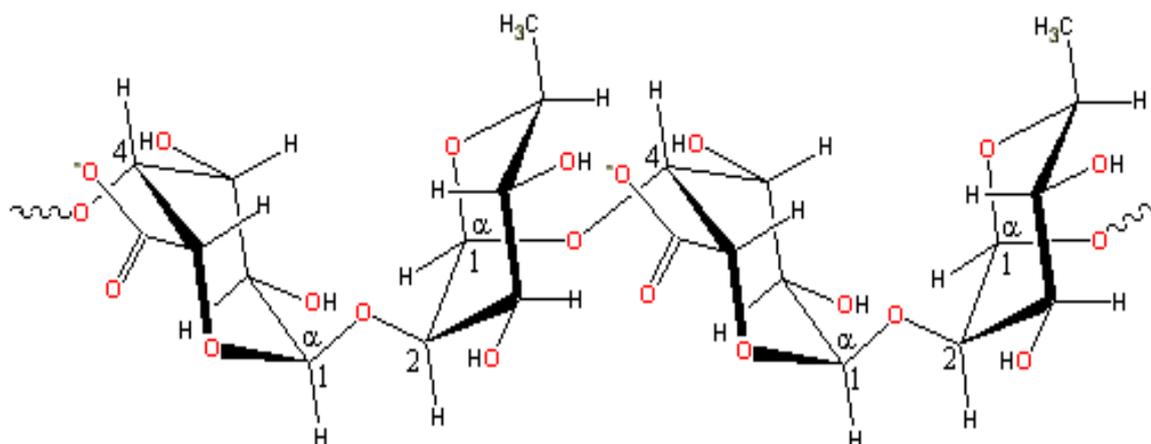


Figure 4: Représentation de la molécule de pectine (Albagnac *et al.*, 2002).

Tableau 3: Teneur en pectine de différents fruits et légumes (Sakai *et al.*, 1993 ; Kashyap *et al.*, 2001).

Fruits/Légumes	Etat de la matière première	Teneur en pectine en %
Pomme	Frais	0.5-1.6
Banane	Frais	0.7-1.2
Pêches	Frais	0.1-0.9
Fraises	Frais	0.6-0.7
Cerises	Frais	0.2-0.5
Carottes	Sec	6.9-18.6
Pulpe d'oranges	Sec	12.4-28.0
Pommes de terre	Sec	1.8-3.3
Pulpe de betteraves à sucre	Sec	10.0-30.0
Tomates	Sec	2.4-4.6

Parmi les caractéristiques et intérêts chimiques, l'aptitude des pectines à la gélification, en solution elles entraînent une augmentation de la viscosité ceci dépend de sa concentration, de son DE, du pH et de la concentration en solides totaux. Une forte proportion de fonction carboxyle dans un pH alcalin favorise la cohésion des molécules de pectine entre elles. Des chaînes peuvent ainsi se lier et les pectines forment alors un gel. De même qu'une augmentation de la méthylation couplée à une forte acidité favorise le relâchement de la pectine. Il existe différentes formes de pectines (Belhamri, 2005) :

- Les protopectines : pectines insolubles dans l'eau,
- Les acides pectiniques : acides polygalacturoniques, partiellement ou entièrement estérifiés,
- Les pectinates : sels d'acide pectinique,
- Les acides pectiques : essentiellement des acides polygalacturoniques non estérifiés,
- Les pectates : sels d'acide pectique.

Les principaux constituants des pectines sont les homogalacturonanes (HGA), les rhamnogalacturonanes (RG) et les xylogalacturonanes (Schols et Voragen, 2002) (Figure 5).

- a) **Les homogalacturonanes** : composés principalement de chaînes d'acides D galacturonique liés en α (1 \rightarrow 4).
- b) **Les rhamnogalacturonanes (RG)**: les RG représentent la liaison entre l'acide galacturonique et le rhamnose ; ce dernier est suivi de chaînes d'arabinane et d'arabinogalactane.
- c) **Les xylogalacturonanes** : résidus de xyloses liés à l'acide galacturonique.

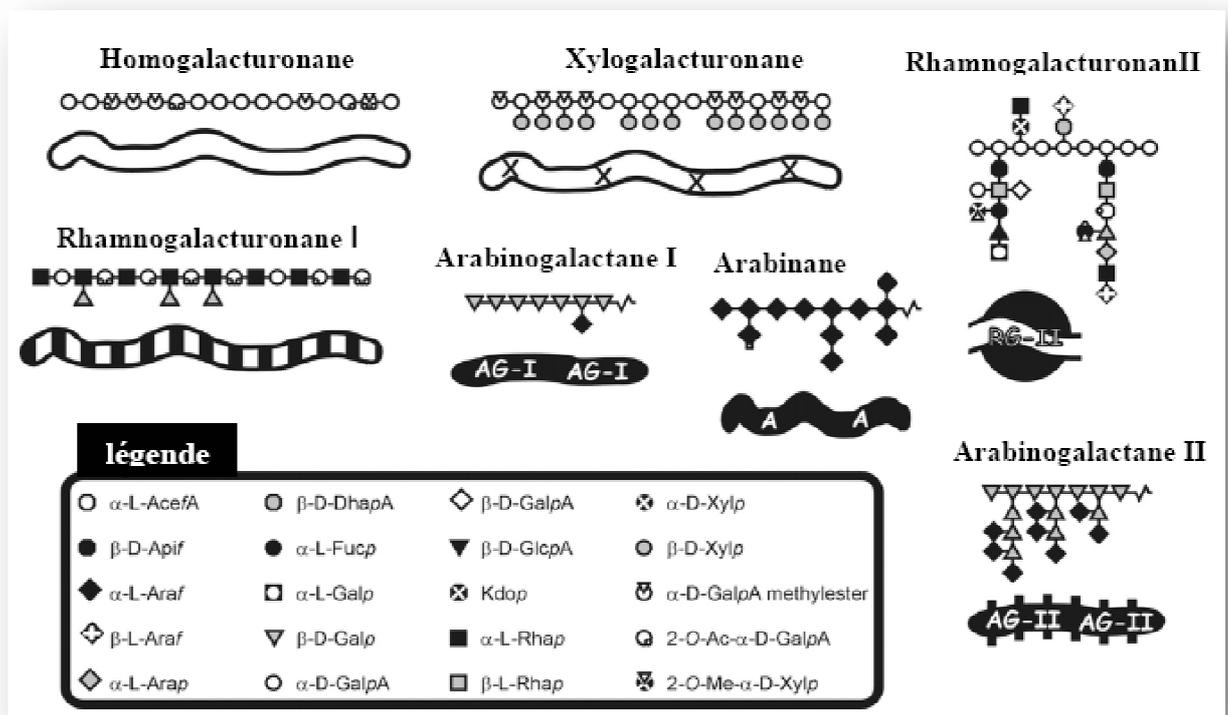


Figure 5: Structure des trois principales unités des pectines (Vincken *et al.*, 2003).

2.2. Les enzymes pectinolytiques

2.2.1. Classification

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures au cours du mûrissement et de la sénescence des fruits et dans une grande variété de micro-organismes entériques, phytopatogènes et saprophytiques. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectolytique » 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 (Combo *et al.*, 2011).

Ces enzymes sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans- élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres *et al.*, 2006). Elles sont classées en deux grands groupes: celles attaquant les liaisons méthyl-ester (estérases) pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et celles qui opèrent sur les liaisons glucidiques (dépolymérase) polygalacturonases et lyases (Tableau 4, Figure 6).

Tableau 4: Classification des enzymes dégradant les pectines (homogalacturonanes) d'après Jayani et al., (2005) et Yadav et al., (2009).

Type	Enzyme	E.C. n°	Mécanisme d'action	Mode d'action	Substrat préférentiel	Produit formé
1. Estérases						
1. PME	Pectine méthylestérase	3.1.1.11	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique + méthanol
2. PAE	Pectine acétylestérase	3.1.1.6	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique + éthanol
2. Dépolymérases						
(a) Hydrolases						
1. Endo PG	Endopolugalacturonase	3.2.1.15	Hydrolyse	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates
2. Exo PG	Exopolygalacturonase	3.2.1.67	Hydrolyse	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonates
(b) Lyases						
1. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.2	Trans-élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
2. Exo PL	Exopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonates insaturés
3. Endo PNL	Endopectine lyase	4.2.2.10	Trans-élimination	Aléatoire	Pectine	Méthyl-oligogalacturonates insaturés

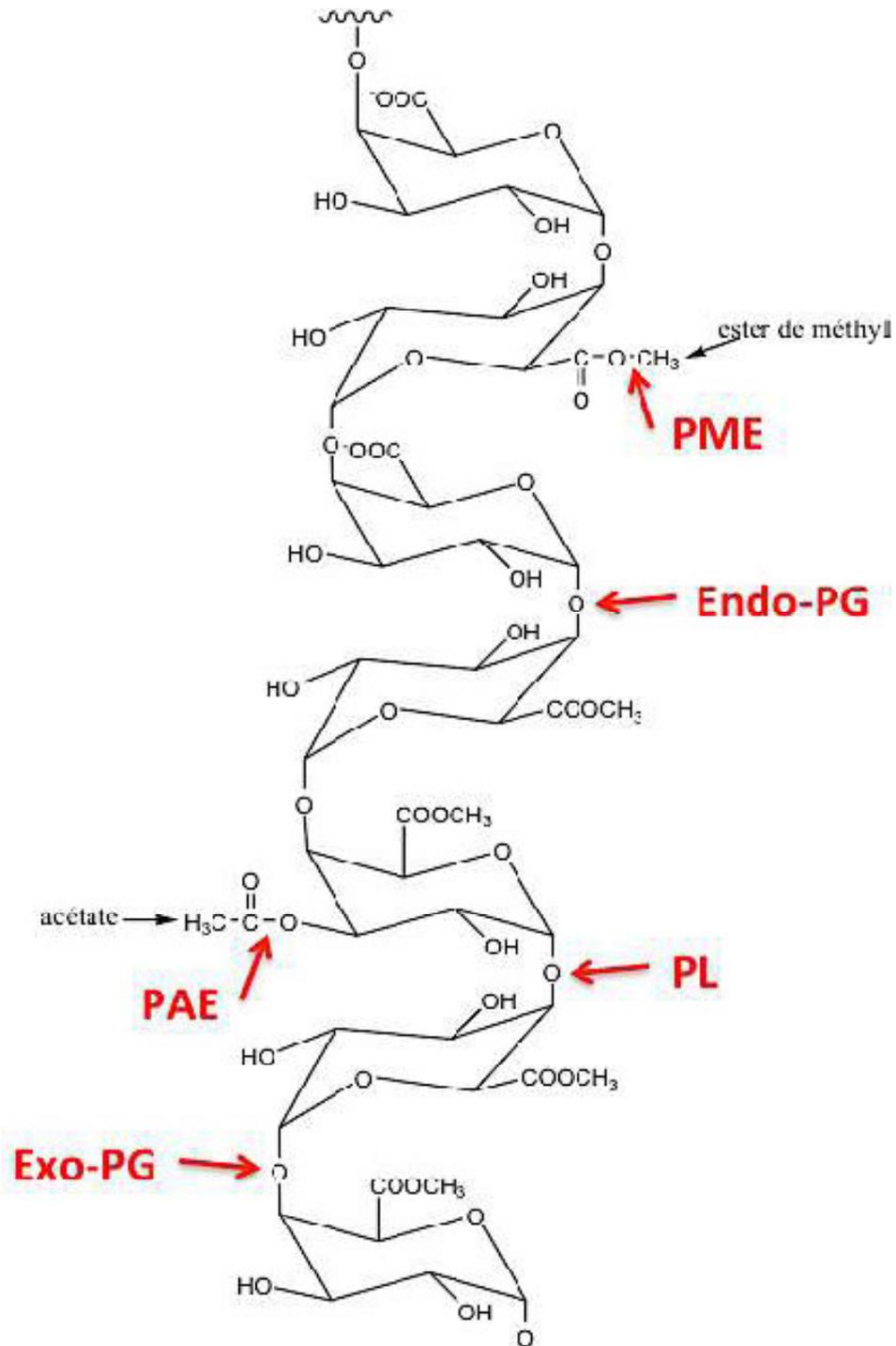


Figure 6: Site d'action des pectinases impliquées dans la dégradation des pectines (homogalacturonanes) (Illustration du Tableau 4). D'après Voragen et al., (2009) et Caffall et Mohnen, (2009).

2.2.2. Les enzymes désesterifiantes

Les pectines-méthylestérases ou pectinestérases (PME ou PE, EC 3.1.1.11). Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines hautement méthylées entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique par hydrolyse des liaisons esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique (Figure 6). Les PE sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et elles sont produites et excrétées par un certain nombre de micro-organismes, essentiellement des moisissures, mais également des bactéries (Combo *et al.*, 2011). Quelle que soit leur origine, elles présentent une haute spécificité vis-à-vis des fonctions ester méthyliques de l'acide polygalacturonique. L'action des pectinestérases ne conduit pas à une désestérification complète de la pectine mais s'arrête à des degrés de méthylation compris entre 10 et 30% (Baron et Thibault, 1985).

2.2.3. Les enzymes dépolymérisantes

Les dépolymérasés sont classés selon : le substrat préférentiel, le mode d'action et la nature de la réaction chimique.

On distingue les pectinases attaquant préférentiellement l'acide pectique de celles qui dégradent de préférence les pectines hautement méthylées. D'après leurs modes d'action deux types de polygalacturonases sont connus, celles qui attaquent au hasard le polymère (endo-enzymes) et celles qui agissent à partir d'une extrémité (réductrice ou non) du substrat (exo-enzymes). De plus, pour chacun de ces deux types, trois mécanismes peuvent être définis : unichaine, multichaine et attaque multiples (Sakai *et al.*, 1993). Enfin la réaction catalysée par les dépolymérasés peut être une hydrolyse (hydrolases) ou une β - élimination (transéliminases) (Figure 6).

2.2.3.1. Pectine-lyases (PL)

Ces enzymes catalysent la dépolymérisation d'un substrat par tans-élimination de la liaison glycosidique α (1-4) entre deux résidus d'acides galacturoniques, qui aboutit à la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité non réductrice du polysaccharide clivé (Tableau 4, Figure 6) (Mayans *et al.*, 1997). En fonction du substrat et du mode d'action, on distingue deux types de lyases : les pectines-lyases (PL) et les pectates-lyases (PAL). Les PL, qui ont pour substrat préférentiel les acides polygalacturoniques hautement méthylestérifiés et forment des méthyl-oligogalacturonates insaturés, ne requièrent pas forcément de calcium, même s'il peut stimuler leur activité. La plupart a un pH optimal généralement proche de 6. A l'inverse, les PAL, qui ont pour substrat préférentiel les acides

polygalacturoniques très faiblement méthylestérifiés et forment des oligogalacturonates insaturés, requièrent absolument du calcium. La plupart des PAL a un pH optimal d'environ 8.5 (Jayani *et al.*, 2005).

2.2.3.2. Polygalacturonases (PG)

Les polygalacturonases clivent par hydrolyse (fixation d'une molécule d'eau) la liaison glycosidique α (1-4) entre deux résidus d'acides galacturoniques, favorisant ainsi le relâchement pariétal (Tableau 4, Figures 6). Les acides pectiques et les pectines faiblement méthylées sont les substrats préférés. Pendant l'hydrolyse, la configuration anomérique change de α à β ce qui fait que cette enzyme fonctionne par inversion (Biely *et al.*, 1996). Elles ont pour substrat préférentiel les polygalacturonates. Selon leurs modes d'actions, on distingue deux types : les endo-polygalacturonases et les exo-polygalacturonases.

- ✓ **Les endo-polygalacturonases** (endo-PG, EC 3.2.1.15) : Elles attaquent aléatoirement les liaisons α (1-4) des résidus d'acides galacturoniques générant des oligosaccharides avec un degré de polymérisation variable (Figure 7). Elles préfèrent généralement un substrat non-estérifié et montrent une activité inversement proportionnelle au degré de méthylestérification (Parenicová *et al.*, 2000).

- ✓ **Les exo-polygalacturonases** (exo-PG, EC 3.2.1.67) : Elles ciblent l'extrémité non réductrice de l'homopolymère pour produire uniquement des monosaccharides d'acides galacturoniques (Figure 7) (Kashyap *et al.*, 2001).

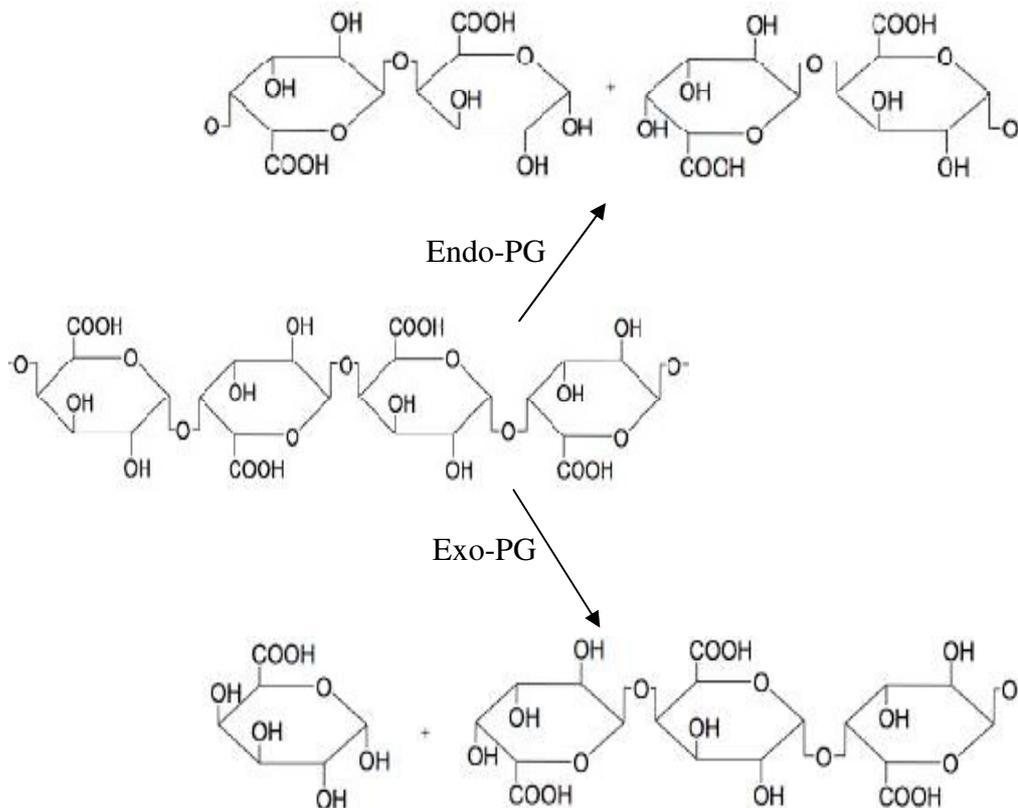


Figure 7: Production de fragments pectiques après l'action des polygalacturonases sur les homogalacturonanes (Voragen *et al.*, 2009).

2.3. Origine des polygalacturonases

Les polygalacturonases sont produites par des bactéries, des moisissures et quelques levures. Elles sont aussi présentes dans les végétaux, principalement dans les fruits où elles sont impliquées dans leur mûrissement. Elles ont été décelées également dans le règne animal puisqu'on les trouve dans les insectes comme la salive gélifiante des pucerons (Guo *et al.*, 2006), les nématodes (Popeijus *et al.*, 2000) ou dans le suc digestif d'escargots (Baron et Thibault, 1985).

- **Origine végétale**

Les polygalacturonases produites par les plantes au niveau intracellulaire fragilisent les membranes cellulaires, ce processus est nécessaire à la croissance de la plante ainsi qu'à la chute des feuilles et des fruits (Hadfield et Bennett, 1998). Le fruit produit aussi des polygalacturonases nécessaires à sa maturation (changement de couleur et de goût) et à son ramollissement (Hadfield *et al.*, 1998 ; Morgutti *et al.*, 2006). De plus, les polygalacturonases sont aussi nécessaires pour la germination et la

croissance du tube pollinique dans le pistil et pour le développement et la maturation du pollen jusqu'à sa sortie pour la pollinisation (Hadfield et Bennett, 1998). Les végétaux tels que la carotte, la pomme possèdent des exo-polygalacturonases mais pas d'endo-polygalacturonases (Baron et Thibault, 1985).

- **Origine microbienne**

La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (Meunier, 1999). De plus, les polygalacturonases végétales sont produites en quantité faible, contrairement aux polygalacturonases microbiennes.

A la suite de ce développement, un grand nombre de polygalacturonases furent produites par des bactéries, des moisissures et des levures.

- ✓ **Origine bactérienne**

Les bactéries produisent principalement des pectate-lyases, cependant la présence de polygalacturonases a été détectée dans quelques unes, comme le genre *Pseudomonas* et *Bacillus* (Tableau 5). Les souches de bactéries *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*, produisent une polygalacturonase qui, lorsqu'elle est sécrétée, entraîne la maladie de la pourriture molle pour de nombreux fruits et légumes comme la maladie appelée "jambe noire" chez la pomme de terre (Basset *et al.*, 2000). En effet, les bactéries produisent plutôt des polygalacturonases alcalines et stables de point de vue thermique pendant que les champignons sont utilisés pour l'obtention des polygalacturonases acides (Favela-Torres *et al.*, 2006).

- ✓ **Origine fongique et levurienne**

Les moisissures sont les micro-organismes les plus importants par la quantité de polygalacturonase produite (Tableau 5). La plupart des produits commerciaux pectinolytiques sur le marché sont obtenus à partir d'*Aspergillus niger*. Cependant, les champignons comme *Aspergillus flavus* (Yan et Liou, 2005), *Botrytis cinerea* (Kars *et al.*, 2005) et *Stereum purpureum*, sont des champignons pathogènes pour les plantes, car ils produisent et sécrètent diverses polygalacturonases. *Stereum purpureum* produit quatre endo-polygalacturonases lui permettant d'infecter plusieurs arbres tels les pommiers causant la maladie des feuilles argentées (Miyairi *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002).

Quelques souches de levures peuvent produire des polygalacturonases comme *Saccharomyces cerevisiae* (Gainvors *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2002; Sieiro *et al.*, 2003 ; Radoi *et al.*, 2005) ; d'autres levures comme *Kluyveromyces marxianus* (Siekstele *et al.*, 1999 ; Jia et Wheals, 2000) *Kluyveromyces fragilis* (Sakai *et al.*, 1984). Ces enzymes sont utilisées dans certains procédés industriels : clarification du jus, industrie du textile pour l'assouplissement des fibres et industrie des pâtes et papiers.

Tableau 5: Les différentes origines des polygalacturonases.

Enzyme d'origine	Références
• Animale	
<i>Meloidogyne incognita</i>	Jaubert <i>et al.</i> , 2002
<i>Sitophilus oryzae</i>	Shen <i>et al.</i> , 2003
• Végétale	
Avocat	Wakabayashi et Huber, 2001
Banane	Pathak et Sanwal, 1998
Fruits rouges	Amid <i>et al.</i> , 2014
Mangue	Singh et Dwivedi, 2008
Tomate	Moshrefi et Luh, 1984
• Bactérienne	
<i>Erwinia carotovora</i>	Basset <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas marginalis</i> CFBP 1287	Membre et Burlot, 1994
<i>Bacillus</i> sp. RK9	Fogarty et Kelly, 1983
<i>Leuconostoc</i> sp. LLn1	Bekhouché <i>et al.</i> , 2006
• Fongique	
<i>Aspergillus niger</i>	Acuna-Arguelles <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Baracat <i>et al.</i> , 1993
<i>Aspergillus sojae</i>	Demir et Tari, 2016
<i>Penicillium italicum</i>	Alana <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Manachini <i>et al.</i> , 1987
• Leuvurienne	
<i>Aureobasidium pullulans</i> LV 10	Manachini <i>et al.</i> , 1988
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blanco <i>et al.</i> , 1997
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	Federici, 1985
<i>Candida sake</i>	Buzzini et Martini, 2002
<i>Pichia guilliermondii</i>	Buzzini et Martini, 2002
<i>Rhodotorula glutinis</i> MP-10	Taskin, 2013

2.4. Structure des polygalacturonases

Les polygalacturonases appartiennent à la famille 28 des hydrolases glycosidiques (GH 28) (Henrissat et Bairoch, 1996). Elles ont une structure monomérique en forme d'hélice main droite composée de feuillets β parallèles (right-handed parallel β -helix) qui peut contenir de 7 à 12 tours complets de 3 à 4 feuillets β formant un baril entrecoupé de boucles (Yoder et Journak, 1995; Van Santen *et al.*, 1999). Le site actif est entouré de deux boucles formant un tunnel dans lequel le substrat va s'insérer. La structure de la polygalacturonase est représentée à la figure 8A. Les PGases sont des protéines sécrétées d'environ 360 acides aminés et contiennent une séquence signal d'environ 20 à 65 acides aminés. Elles sont généralement glycosylées et comportent quelques ponts disulfures stabilisants (Pickersgill *et al.*, 1999).

Pickersgill *et al.*, (1998) ont aligné 36 PGases et ont déterminé qu'il y avait quatre régions conservées soient: Asn²⁰¹-Thr²⁰²-Asp²⁰³, Gl¹²²-Asp²²³-Asp²²⁴, Gly⁵⁰-His²⁵¹- Gly²⁵² et Arg²⁸⁰-Ile²⁸¹-Lys²⁸². Ces séquences sont retrouvées dans le même ordre dans les différentes PGases, seule la position des acides aminés change. Le site actif est constitué de trois acides aspartiques (D) et d'une histidine (H) (Figure 8B) (Blanco *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2002), il est donc conservé au sein des divers organismes qui produisent des PGases puisque ces quatre acides aminés se retrouvent dans les régions conservées.

En effet, il existe des facteurs internes qui peuvent affecter les propriétés de l'enzyme, comme le repliement de la protéine, le nombre de ponts disulfures et le taux de glycosylation. Le repliement de la protéine est très important, car si la structure n'est pas maintenue correctement, l'enzyme ne sera plus active ou elle sera plus sensible aux protéases. Les ponts disulfures permettent de stabiliser l'enzyme en formant des liens covalents qui sont plus solides que les liaisons de Van der Waals. Ces ponts disulfures sont formés entre les soufres des résidus de deux cystéines (Shimizu *et al.*, 2000). La glycosylation est aussi un autre moyen utilisé par les organismes pour stabiliser les enzymes. En plus de l'effet stabilisant, la glycosylation peut aussi avoir un effet sur l'activité enzymatique, la sécrétion et la protection contre les protéases (Yanez *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'étude des déterminants structuraux révèle que les ponts salins jouent un rôle majeur dans la thermostabilité des enzymes (Pezzullo *et al.*, 2013).

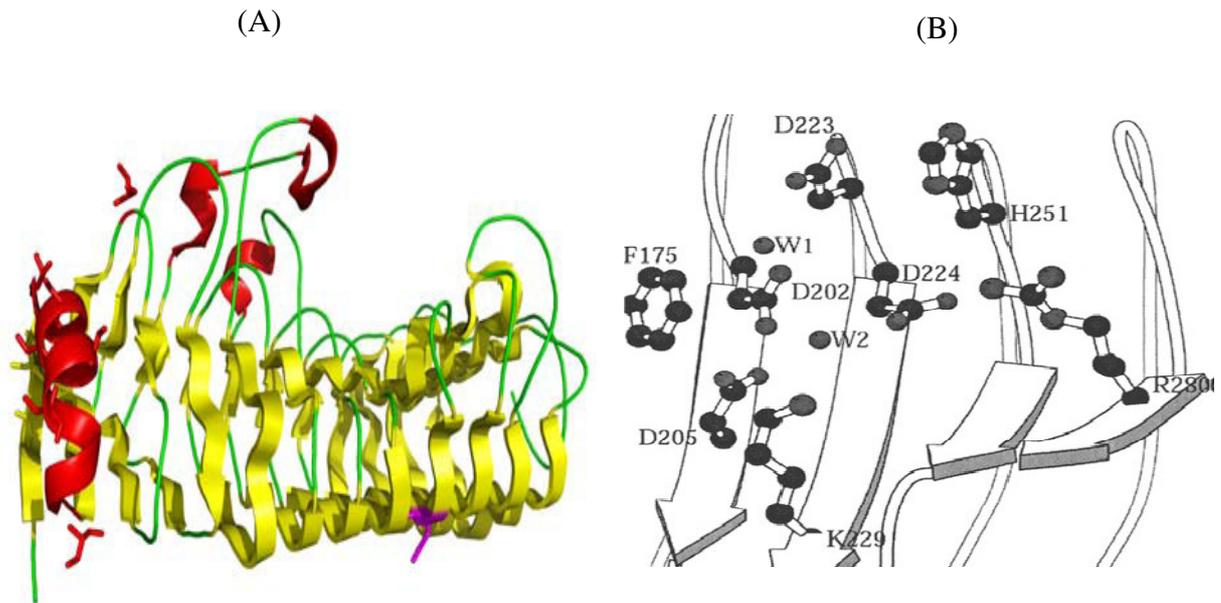


Figure 8: (A) Polygalacturonase d'*Aspergillus aculeatus* (PDB code : 1IB4). Le résidu N-glycosylé Asn²¹⁹ est indiqué en violet dans la région C-terminale (côté droit) alors que, Thr⁵, Thr⁸ et plusieurs résidus serine présentes dans la région N-terminale sont indiqués en rouge qui sont glycosylés par des résidus liés à O- mannose (côté gauche) selon Cho et al., (2001).
(B) Site actif de la polygalacturonase (Pickersgill et Jenkins, 2003).

2.5. Mode et mécanisme d'action des polygalacturonases

Les PGases coupent la liaison glycosidique α (1-4) reliant deux résidus d'acide galacturonique de la chaîne polygalacturonique. Les exo-polygalacturonases dégradent leurs substrats à partir d'une extrémité (réductrice ou non), tandis que les endo-polygalacturonases le font au hasard.

Les analyses viscosimétriques permettent de différencier les « endo » des « exo » enzymes. Une diminution de 50% de la viscosité, équivaut à un pourcentage des liaisons hydrolysées inférieur à 10%, dans le cas des endo-polygalacturonases ; tandis que des valeurs de l'ordre de 40% sont observées pour les exo-polygalacturonases (Palanivelu, 2006).

Pour les endo-polygalacturonases, le pourcentage de liaisons hydrolysées (1 à 10%), correspondant à 50 U de diminution de la viscosité, indique des différences dans leurs mécanismes d'action. Une « endo-enzyme » peut dégrader le substrat par des attaques : « unichaîne », « multichaîne », ou par des attaques multiples. Au cours d'une attaque « unichaîne », il se forme un complexe enzyme-substrat dans lequel le substrat est entièrement dégradé avant la dissociation de ce complexe et la réassociation de l'enzyme avec une

nouvelle molécule de substrat. Une attaque « multichaîne » signifie qu'après une première rupture d'une liaison d'une molécule du substrat, le complexe enzyme substrat s'associe avec une nouvelle molécule pour rompre une autre liaison (Rombouts et Pilnik, 1980). Le phénomène peut être intermédiaire (attaque multiple) (Baron et Thibault, 1985).

Les produits finaux de l'hydrolyse d'un acide pectique sont dans le cas des endo-polygalacturonases les mono- et digalacturonides, et l'acide trigalacturonique pour certaines enzymes. Dans le cas de l'exo-polygalacturonase, l'acide monogalacturonique est le produit final. Les endo-polygalacturonases montrent des différences dans leurs mécanismes de dégradation des oligogalacturonides. Ces différences sont déterminées par la nature du site actif et plus spécifiquement par le nombre de sous-sites et la position du groupe catalytique (Rambouts et Pilnik, 1980).

Le mode d'action d'une enzyme est imposé par la structure du site actif (Davies et Henrissat, 1995) (Figure 9). Ainsi, les endo-enzymes présentent généralement un site actif exposé au solvant formant une crevasse ou un sillon (Figure 9A) qui permet la fixation de plusieurs unités saccharidiques. En revanche, le site actif des exo-enzymes est le plus souvent en forme de "poche" (Figure 9B), permettant la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice ou réductrice d'une chaîne d'oligo- ou de polysaccharide. Enfin, les enzymes processives ont la particularité de posséder de longues boucles qui referment partiellement la crevasse catalytique pour former une structure en tunnel (Figure 9C). Cette topologie en tunnel permet aux GH de fixer la chaîne polysaccharidique et de progresser de façon processive le long de celle-ci, de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, et d'un site de coupure à l'autre. C'est le mode d'action de certaines cellobiohydrolases I (GH48), par exemple (Guimarães *et al.*, 2002).

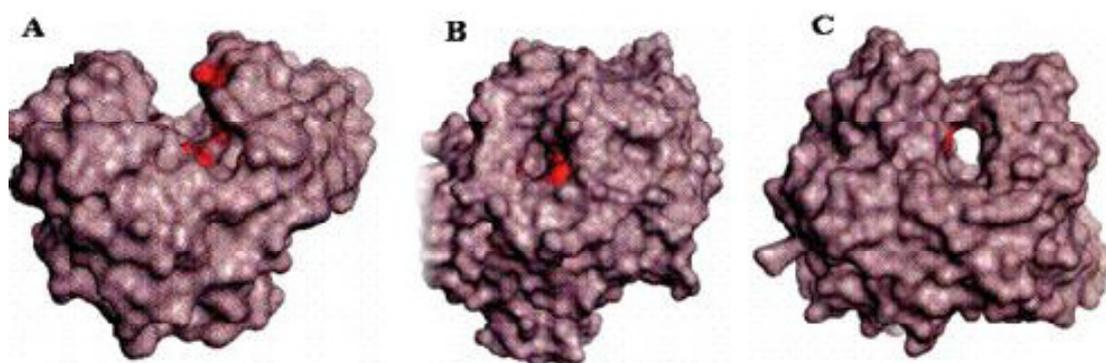


Figure 9: Exemples de topologie du site actif des glycosides hydrolases en forme de sillon (A), en forme de poche (B) et en forme de tunnel (C) (Davies et Henrissat, 1995).

2.6. Production et caractérisation des polygalacturonases

Les systèmes fongiques et bactériens sont largement utilisés pour la production de la PGase en fermentation submergée, encore appelée SMF pour 'Submerged Fermentation' en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres qui peuvent l'influencer : pH, température, aération et humidité (Gangadharan *et al.*, 2008 ; Couto et Sanromán, 2006). Cependant, de plus en plus de travaux ont porté, ces dernières années, sur la production d'enzymes par fermentation sur milieu solide, appelée SSF pour 'Solid State Fermentation' (Handa *et al.*, 2016).

Parmi les substrats utilisés, on trouve les épluchures d'agrumes, sirop de datte, pulpe de bettrave, son de blé ou encore le tournesol (Sharma *et al.*, 2012 ; Qureshi *et al.*, 2012 ; Phutela *et al.*, 2005 ; Patil et Dayanand, 2006). Les pulpes de café et les peaux d'agrumes sont utilisées dans les pays du Sud (Restino, 2012). Les résidus agro-industriels sont considérés comme de très bons substrats puisqu'ils fournissent les nutriments nécessaires aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes.

Les PGases isolées des différentes sources végétales et microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action (Tableau 6). Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés des enzymes pectinolytiques. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité.

La masse moléculaire des exo-PGases varie entre 30 et 50 KDa, elle est beaucoup plus élevée 50 à 80 KDa dans le cas d'endo-PGases glycosylées. Leur pH optimal d'action est situé entre 3.8 et 7.6 (Sharma *et al.*, 2013) et celui des exo-PGases est de 4 à 6. Le tableau ci-dessous rapporte les propriétés physico-chimiques de quelques PGases.

Tableau 6: Caractérisation biochimique de quelques PGases microbiennes.

Source de la PGase	Mode d'action	Substrat	Type de fermentation	PM (KDa)	T _{op} (C°)	pH _{op}	Référence
<i>Bacillus firmus</i>	-	<i>Pectine</i>	<i>SMF</i>	-	50	7	Roosdiana <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus japonicus</i>	Endo Endo	-	-	38 (PG I) 65 (PG II)	30 30	4.0 – 5.5 4.0 – 5.5	Hasunuma <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Endo Endo	-	-	61 (PG I) 38 (PG II)	43 45	3.8 – 4.3 3.0 – 4.6	Singh et Rao, 2002
<i>Aspergillus niger URM 4645</i>	Endo Exo	Peau de fruit de passion jaune	SSF	- -	40 80	7.5 7	Cavalcanti Maciel <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetracosporium sp</i>	-	Acide polygalacturonique	SMF	36	40	4.3	Aminzadeh <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus oryzae</i>	Exo	Peau d'orange, peau de fruit de passion	SSF, SMF	45	35, 70	5.5, 4.5	Johnson <i>et al.</i> , 2012 ; Jaramillo <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus sojae</i>	Exo Exo	Glucose	SMF	36 68	55 55	5 5	Tari <i>et al.</i> , 2008
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Exo	Pectine de citron	SMF	42	50 - 60	4.8	Quiroga <i>et al.</i> , 2009
<i>Thermoascus aurantiacus CBMAI-756</i>	Endo/ Exo	Canne à sucre + bagasse d'orange	SSF	29.3	60 - 65	4.5 – 5.5	Martins <i>et al.</i> , 2013
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Exo Endo	Peectine de citron	SMF	54 31	60 50	5.4 4.6	Stratilová <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodotorula glutinis MP- 10</i>	-	Pectine de citron	SMF	-	30	5.5	Taskin, 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Pectine de citron	SMF	-	30	4.5	Poondla <i>et al.</i> , 2015
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	Glucose	SMF	41.7	55	3 - 5	Serrat <i>et al.</i> , 2002

2.7. Régulation de la synthèse de la polygalacturonase : induction/répression

Il existe dans la cellule des mécanismes de régulation au niveau génétique qui permettent l'induction ou la répression de la synthèse des enzymes selon les besoins. L'effet de l'induction et de la répression par la source carbonée est très important dans la régulation de la synthèse de la PGase par les levures (Ruiz *et al.*, 2017).

L'acide galacturonique, l'acide polygalacturonique et les substances pectiques sont des inducteurs de la PGase (Ruiz *et al.*, 2017). Cependant, Blanco *et al.*, (1994) ont démontré que chez la levure *S. cerevisiae* l'acide polygalacturonique peut avoir un effet stimulateur et répressif à la fois. Le glucose stimule la production de la PGase de *Kluyveromyces marxianus* (Serrât *et al.*, 2002). Néanmoins, le glucose peut inhiber la synthèse de la PGase par répression catabolique (Biely *et al.*, 1996).

La synthèse de la PGase microbienne peut être constitutive ou inductible. La levure *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 sécrète constitutivement la PGase (Merin *et al.*, 2011). Trujillo *et al.*, (2012) rapportent que la souche fongique *Aspergillus flavipes* FP-500 peut produire des exo et des endo PGases inductibles et constitutives. A notre connaissance, la régulation génétique de l'expression de la PGase n'est pas complètement élucidée en raison de la complexité de la structure du substrat. Cependant, il semble que la synthèse de la PGase est sous contrôle de trois mécanismes différents : induction spécifique par la pectine ou l'acide galacturonique, la répression catabolique par l'intermédiaire du facteur de transcription Crec A et la régulation par le pH environnemental qui est contrôlé par le facteur de transcription Pac C (Trujillo *et al.*, 2012). Ainsi, la production de la PGase est induite par différentes sources de carbone et peut être fortement influencée par le pH du milieu de culture.

2.8. Métabolisme de l'acide galacturonique

L'action des enzymes pectinolytiques extracellulaires sur les substances pectiques donne des produits tels que le méthanol par action de la pectinestérase, les mono- et oligogalacturonides par la présence de polygalacturonases et d'oligogalacturonides insaturés par les pectates et les pectine-lyases. Un certain nombre de recherches sur les eucaryotes ont permis de déterminer les voies métaboliques d'utilisation de ces produits (Hilditch *et al.*, 2007) (Figure 10).

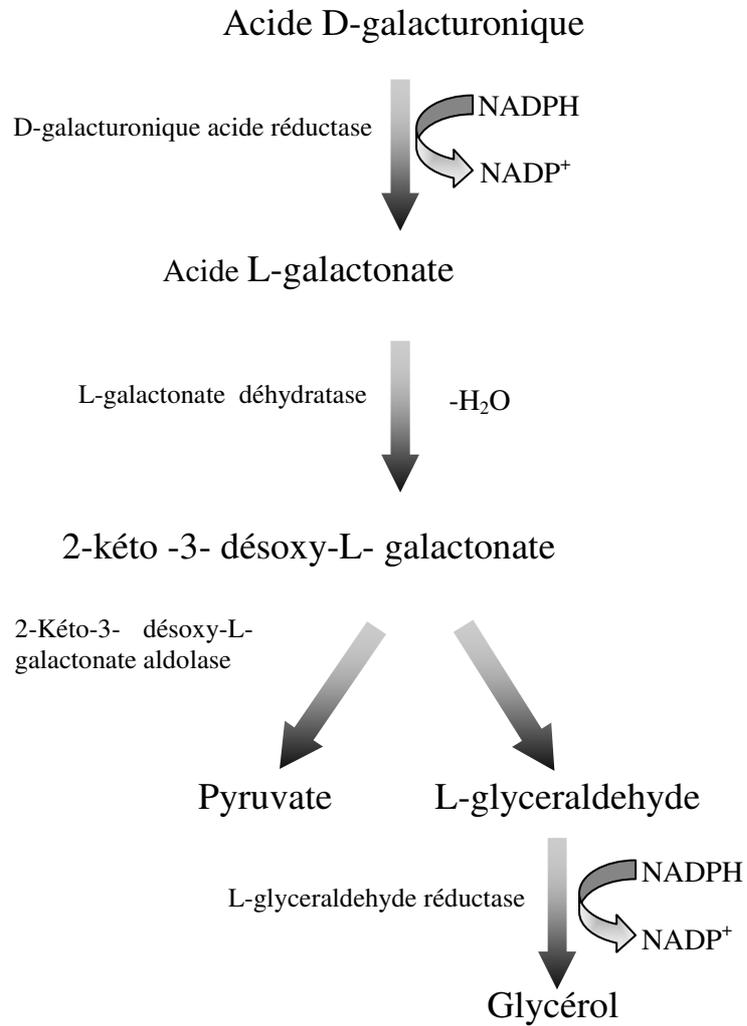


Figure 10: Conversion métabolique de l'acide D- galacturonique chez *Trichoderma Reesei* selon Kuorelahti *et al.*, (2005).

2.9. Effet des facteurs environnementaux sur la production de la polygalacturonase

Les paramètres environnementaux sont déterminants pour la synthèse de la PGase. Les trois paramètres les plus importants sont la température de croissance et de production, le pH du milieu et l'oxygénation.

- **La température**

La température est probablement l'un des paramètres les plus importants parmi les facteurs physiques affectant les fermentations. La température peut avoir une influence sur la croissance du micro-organisme mais également sur la production d'enzyme et de métabolites qui peuvent être très sensibles aux variations de température. Les levures se développent, généralement, de 20 à 55°C mais la température optimale de croissance peut être différente de celle de la production. La température optimale de croissance et de production de la PGase est voisine de 30°C pour un grand nombre de levures et de moisissures utilisés en microbiologie industrielle (Blandino *et al.*, 2002 ; Dey *et al.*, 2014 ; Tounsi *et al.*, 2016). Manachini *et al.*, (1988) ont utilisé une température de 26°C pour la production d'enzymes pectinolytiques (PGase et pectine lyase) par *Aureobasidium pullulans* LV 10 alors que Stratilovã *et al.*, (2005) indiquent que la température optimale de croissance et de production de la PGase par la souche *Aureobasidium pullulans* isolée des eaux de rivières de Danube est de 28°C.

- **pH**

L'influence du pH sur la production d'enzymes est d'une importance capitale. Chaque micro-organisme a une gamme de pH propre à sa croissance et à son activité métabolique (Martinez-Trujillo *et al.*, 2009). La plupart des levures sont capables de se développer à des pH compris entre 3 et 7.5, avec un optimum entre 4 et 6.5, ce qui permet donc de débiter une fermentation à un pH acide. Ceci peut être un atout afin d'éviter la contamination bactérienne. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (Harpreet *et al.*, 2005). Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par un système de régulation (passif) consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels

présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée (Sandy *et al.*, 2005). Le pH initial pour la production de la PGase par *Aureobasidium pullulans* LV 10 et *Aspergillus fumigatus* est de 4.5 et 4 respectivement (Manachini *et al.*, 1988 ; Sandri *et al.*, 2015), alors que le pH optimum de production de la PGase de *Penicillium citrinum* est de 5 (Ramachandran, 2005).

- **L'aération et l'agitation**

L'aération est un facteur important dans la fermentation puisqu'elle va permettre l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les levures), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils) (Duchiron et Copinet, 2011). Il a été constaté que l'apport suffisant d'oxygène dissous ainsi que l'agitation mécanique dans les bioréacteurs jouent un rôle très important dans la production de pectinases. Ainsi, Kant *et al.*, (2013) démontrent dans leurs études, que le taux d'aération optimal pour la synthèse de la PGase d'*Aspergillus niger* MTCC3323 est obtenu lorsque 50 ml du milieu de culture sont utilisés dans des fioles Erlen-meyers de 250 ml avec une agitation de 150 rpm.

En effet, la plupart des études préconisent une vitesse d'agitation de 150 rpm pour la synthèse de la PGase (Kant *et al.*, 2013 ; Demir et Tari, 2014).

2.10. Applications industrielles des pectinases

Commercialisées pour la première fois en 1930 par Kertesz (Sharma *et al.*, 2012), les pectinases sont d'une grande importance aussi bien dans le secteur agroalimentaire que biotechnologique. Leur marché représente environ 25% du marché mondial des enzymes (Ruiz *et al.*, 2017).

2.10.1. Industrie des jus de fruits

Les enzymes pectinolytiques sont utilisées principalement dans l'industrie d'élaboration des jus de fruits :

- **Extraction de jus**

Les pulpes de fruits à haute teneur en pectines (raisin, fraise, framboise) sont traitées par des enzymes pectinolytiques qui dégradent la structure gélifiée de la pectine et

facilitent donc l'extraction du jus. Ces enzymes favorisent l'extraction des pigments et contribuent à améliorer le jus (Junwei *et al.*, 2000). Les enzymes pectinolytiques sont utilisées aussi pour l'extraction des huiles végétales (West, 1996).

- Clarification ou stabilisation du jus de fruits

La dépectinisation du jus de fruits est une nécessité lorsque celui-ci est destiné à la concentration, afin d'obtenir des produits à teneur élevée en solides sans phénomène de gélification ou de turbidité. La dépectinisation est aussi pratiquée couramment pour l'obtention des jus limpides (pomme, poire). L'action simultanée de la pectinestérase, de la polygalacturonase et/ou de la pectine-lyase solubilise une fraction pectique des particules en suspension. Les pectines solubilisées et/ou partiellement hydrolysées flocculent par interaction électrostatique et sédimentent.

- Macération

Les nectars sont des boissons visqueuses obtenues à partir de pulpes de fruits. Les pulpes sont soumises à un réchauffement (30-50°C pendant environ 15 à 90 min) afin d'éviter l'action des pectinestérases endogènes, ensuite une préparation enzymatique contenant des polygalacturonases ou des pectine-lyases est ajoutée. Celle-ci permet une hydrolyse partielle des pectines et donc la désintégration des tissus tout en laissant intactes les cellules (Kashyap *et al.*, 2001).

2.10.2. Industrie du papier

Une étape d'élimination de la pectine de la pâte kraft est primordiale pour avoir une qualité meilleure du papier. Les procédés traditionnels utilisent des agents chlorés et rejettent de grandes quantités de produits toxiques, cancérigènes et non biodégradables. De plus, ces produits peuvent dégrader partiellement la pectine et diminuer la qualité du papier. Les pectinases (essentiellement les polygalacturonases) constituent une alternative au blanchiment chimique et permettraient de diminuer le recours aux agents chlorés. Les pectinases alcalines produites par *Bacillus sp.* et *Erwinia carotovora* pour leur forte activité de macération ont été utilisées pour le rouissage de Mitsumata bast (Polomaki et Saarilahti, 1997). De même, les pectinases fongiques d'*Aspergillus aculeatus* sont utilisés pour l'extraction de fibres d'alfa (Rogge, 2010).

2.10.3. Industrie de textile

Les pectinases sont aussi largement employées en textile comme les amylases, les lipases, les cellulases et les hémicellulases pour éliminer les agents d'encollage des fibres de coton en remplaçant les procédés chimiques. Le bio-récurage (Bio-scouring) est un nouveau procédé consiste à éliminer les impuretés non cellulosiques provenant de la fibre avec des enzymes spécifiques. Les pectinases ont été utilisées à cet effet, sans aucun effet négatif sur la dégradation de la cellulose (Jayani *et al.*, 2005).

2.10.4. Alimentation animale

Les pectinases sont utilisées comme additifs pour améliorer la digestibilité des aliments pour les animaux. Ceci réduit la viscosité de l'aliment, ce qui augmente l'absorption des nutriments, libère les éléments nutritifs, soit par hydrolyse des fibres non biodégradables ou en libérant les éléments nutritifs bloqués par ces fibres et réduit la quantité de matières fécales (Jayani *et al.*, 2005).

2.10.5. Traitement des eaux usées

Les eaux usées provenant de l'industrie de traitement des agrumes contiennent des pectines qui sont à peine décomposés par les micro-organismes pendant le traitement par les boues activées. En effet, l'industrie de préparation de légumes libère la pectine. Le prétraitement des eaux usées avec des enzymes pectinolytiques facilite l'enlèvement des résidus pectiques et les rend plus aptes à la décomposition par boues activées (Jayani *et al.*, 2005). Les pectinases alcalines conviennent parfaitement à l'industrie de traitement des eaux usées.

2.10.6. Fermentation du thé et du café

Les pectinases sont utilisés dans le processus de fermentation du thé en décomposant la pectine présente dans les parois cellulaires des feuilles de thé. Elles sont également introduites dans la poudre de thé instantanée pour empêcher la formation de mousse en hydrolysant les pectines. Les enzymes pectinolytiques sont aussi utilisées pour enlever la couche mucilagineuse de grains de café lors de sa fermentation (Sorensen *et al.*, 2000).

2.10.7. Préparation des protoplastes

La fusion des protoplastes, appelée aussi hybridation somatique, est très utilisée pour l'amélioration des plantes. L'obtention de protoplastes, qui exige la dégradation de la paroi

pectocellulosique, pourrait être améliorée grâce à l'action de pectinases ou chitinases combinée à celle des β -glucanases (Yano *et al.*, 2004).

2.10.8. Purification des virus végétaux

Dans les cas où la particule virale est limitée au phloème, des pectinases et des cellulases alcalines peuvent être utilisé pour libérer le virus des tissus et donner des préparations très pures de virus (Jayani *et al.*, 2005).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Partie I : Isolement et identification des isolats de levures

La présente étude porte sur l'isolement de souches levuriennes à partir des sols des milieux arides (sols sahariens) et la sélection des isolats les plus performants pour la production de pectinases thermostables d'intérêts industriels.

1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons utilisés dans ce travail sont prélevés en Décembre 2010, à partir de différents biotopes :

- Le sol des palmeraies de la région d'El-M'gheir Wilaya d'El-Oued (Sud-Est Algérien) qui se trouve à 140 Km au sud de la wilaya de Biskra Longitude 6°5205900E, Latitude 33°1905900N (Figure 11).
- Le sol des figuiers, des oliviers et des vignes à proximité des palmeraies toujours de la même région.
- Le sol de steppe situé à 5 km des palmeraies de la région d'El-M'gheir.

La caractéristique de ces sols est leur salinité avec une conductivité électrique (CE) entre 2 et 55 millimhos/cm (Meklat *et al.*, 2011). Cinq échantillons de sol bien séparés sont collectés à partir de chaque site à des profondeurs de 10 - 50 cm. Les échantillons sont prélevés selon la technique de Pochon et Tardieux, (1962). 100 à 150 g de sol sont prélevés à l'aide d'une tarière après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol. Ils sont ensuite déposés dans des sacs en papiers stériles, gardés au frais (4°C) puis transférés au laboratoire pour une analyse immédiate.

2. Caractéristiques de la région de prélèvement

La région d'EL-Oued est caractérisée par un climat hyper aride ; l'été est très chaud où les températures atteignent 50°C à l'ombre. La couche superficielle du sable frôle les 60°C, mais la température chute à la nuit tombante d'une vingtaine de degrés. La moyenne annuelle des précipitations est de 250 mm (Boulifa, 2012).

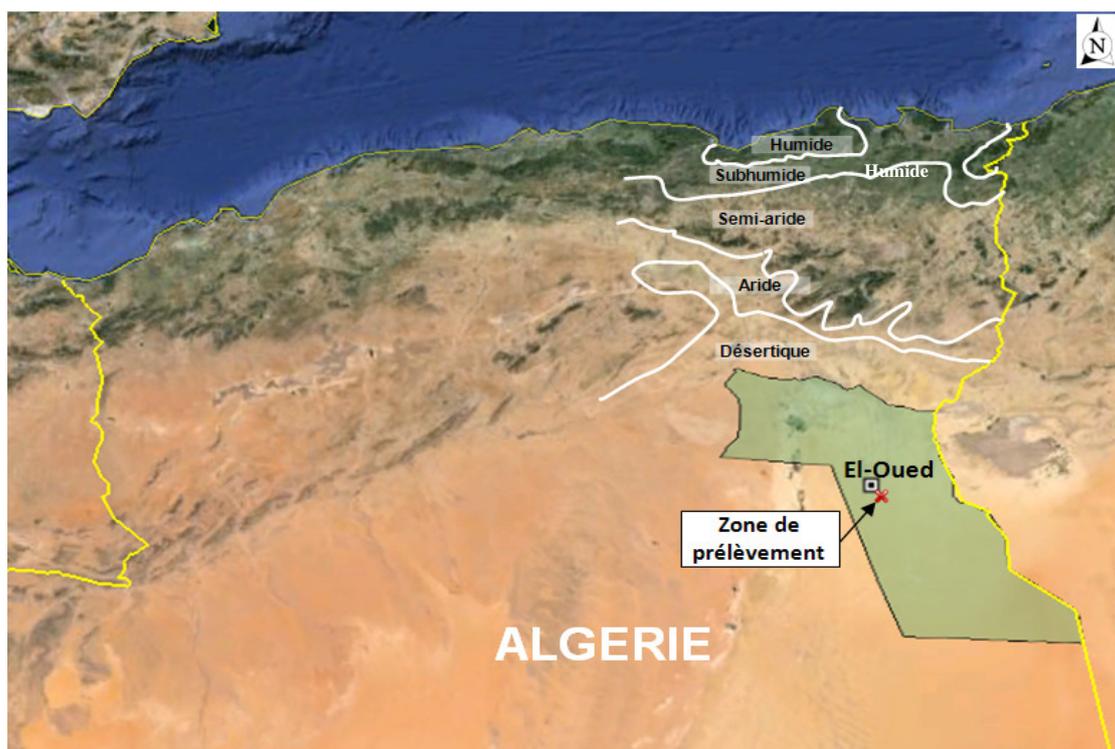


Figure 11: Géolocalisation de la région d'échantillonnage de sols (Image obtenue de Googlemap, Décembre 2016).

3. Isolement, purification et conservation des levures

1g de sol est introduit dans 9 ml d'eau distillée stérile (solution mère). La suspension est agitée pendant 10 min à l'aide d'un agitateur Vortex. Une série de dilutions décimales (10^1 jusqu'à 10^{-5}) est ensuite préparée à partir de la solution mère. Un échantillon de 0.1 ml de chaque dilution, est ensuite étalé sur milieu YMA (Annexe 1), rendu sélectif par un pH acide 3.7 (Kurtzman *et al.*, 2011 ; Hashem *et al.*, 2014). La gentamicine (0.04 mg/ml), un antibiotique, est ajoutée pour inhiber la croissance des bactéries gram positif et négatif (Bouix et Leveau, 1991 ; Tarr, 2004). Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C pendant 7 jours.

A l'aide d'un microscope photonique, les colonies levuriennes sont repérées d'après leur aspect microscopique caractéristique. Elles sont purifiées sur le milieu YPGA (Annexe 1). Les souches purifiées sont conservées à + 4°C en gélose inclinée et d'autre part à – 20°C en suspension en présence de glycérol à 20% (v/v) comme cryoprotecteur. Un autre lot de souches est conservé à – 70°C dans des Cryo-Billes.

4. Méthodes d'identification des souches levuriennes

4.1. Identification phénotypique des isolats de levures

L'identification phénotypique des isolats repose sur la détermination de divers caractères cultureux, morphologiques et physiologiques (Kurtzman *et al.*, 2011).

4.1.1. Etude des caractères cultureux

Les caractères cultureux des souches isolées sont étudiés en milieu liquide et sur milieu solide.

▪ Caractères cultureux en milieu liquide

L'aspect des cultures en milieu liquide est étudié dans des tubes à essai contenant le milieu YPG liquide (Annexe 1). Les cultures sont incubées à 25°C et observées après 3, 7, 14 et 28 jours. L'aspect de la culture de chaque isolat est soigneusement noté : la présence de dépôt au fond du tube (sédimentation des cellules) ainsi que la présence de voile ou de pellicule en surface.

▪ Caractères cultureux sur milieu solide

Cette étude est faite sur milieu YPG gélosé. L'ensemencement se fait en stries. Après incubation à 25°C pendant 1 - 7 jours. L'observation des colonies se fait par une loupe binoculaire. Des observations sur la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies sont notées avec précision.

4.1.2. Etude des caractères morphologiques

▪ Morphologie cellulaire et mode de reproduction végétative

Cette étude a pour but l'examen microscopique de la forme, de la taille, de l'arrangement et du mode de reproduction végétative des cellules. L'examen est réalisé à l'état frais (grossissement x 40) de frottis préparés à partir de cultures fraîches en bouillon YPG.

▪ Test de filamentation

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur milieu CMA (Annexe 1) en boîte de Pétri. La levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale à la surface du milieu gélosé. Une lamelle stérile est ensuite placée sur le centre de la strie. L'observation microscopique (grossissement x 40) se fait sur une période allant de 3 à 7 jours. La bordure de la culture, sa filamentation ainsi que la nature du mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium) sont notées.

4.1.3. Etudes des caractères biochimiques et physiologiques

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques étudiées sont l'assimilation de sources de carbone et d'azote, la fermentation de sucres et la croissance à des températures différentes.

▪ Assimilation de substrats carbonés

L'étude de l'assimilation des sources carbonées est réalisée sur milieu minimum YNB (Annexe 1), additionné de 0.5% de source de carbone. Ce milieu est stérilisé par filtration (diamètre, $\varnothing = 0.22 \mu\text{m}$), puis réparti à raison de 0.5 ml/tube dans des tubes contenant 4.5 ml d'eau distillée stérile. Les substrats carbonés testés: le D-glucose, le D-galactose, le saccharose, le D-maltose, le α, α tréhalose, le lactose et le raffinose. L'assimilation de la source carbonée se traduit par une croissance de la souche dans le milieu après incubation à 25°C pendant 1 à 3 semaines.

▪ Assimilation de substrats azotés

Les sources azotées testées sont le nitrate de potassium (KNO_3) et le nitrite de sodium (NaNO_2). Le milieu utilisé dans cette étude est YCB (Annexe 1) additionné d'une quantité du substrat azoté équivalente à 0.78% de KNO_3 et 0.26% pour le NaNO_2 , puis stérilisé par filtration. L'incubation se fait à 25°C pendant 1 à 3 semaines. L'assimilation de la source azotée se traduit par un trouble dans le milieu de culture. La confirmation des résultats positifs est réalisée par transfert d'un inoculum (0.1 ml) de la culture précédente dans un nouveau tube contenant le même milieu de culture sans la source azotée (même conditions expérimentales).

▪ Fermentation de substrats carbonés

Les sucres testés sont : le D-glucose, le D-galactose, le D- maltose, le saccharose, le α, α tréhalose et le lactose. La solution de base utilisée pour la fermentation de sucres est le milieu YP (Annexe 1), réparti dans des tubes de Durham (contenant une cloche de Durham). Des solutions stériles de sucres sont ajoutées au milieu à raison de 2%. Les tubes sontensemencés avec 0.1 ml d'une suspension de levures, puis incubés à 25°C sous agitation et observés après 3, 7, 14 et 28 jours. La fermentation du sucre est mise en évidence avec la présence du gaz dans la cloche de Durham.

▪ Croissance à différentes températures

Cette étude est réalisée dans un milieu YPG liquide. Les tubes sont ensemencés avec 0.1 ml d'une suspension de levure (absorbance à 580 = 0.5 correspondant à 10^6 cellules /ml). Les cultures sont incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C et 40°C. La croissance des levures est suivie chaque semaine pendant 28 jours.

▪ Tolérance au stress osmotique

Ce test est réalisé sur milieu liquide YNB-glucose (Annexe 1), avec différentes concentrations de NaCl (5%, 10% et 20%). Les cellules de la culture jeune de levure sont inoculées dans les tubes, puis incubées de 3 à 7 jours à 25°C. La présence ou l'absence de croissance est notée.

4.2. Identification moléculaire des isolats de levures

L'ADNr est un fragment d'ADN présent chez tous les organismes vivants (Hillis et Dixon, 1991). Chez les mycètes, il est composé de trois gènes ribosomiques qui sont la sous-unité 18S, la sous-unité 5.8S et la sous-unité 26/28S (26S chez les levures et 28S chez les moisissures) (Figure 12). Ces gènes sont regroupés dans une unité de transcription répétée en tandem une centaine de fois (Eickbush et Eickbush, 2007 ; Poczai et Hyvönen, 2010). Chaque unité de transcription est séparée de la suivante par un espaceur intergénique IGS (Inter Genic Spacer), de longueur variable selon les espèces. Les trois zones codantes sont séparées par deux espaceurs internes ITS (Internal Transcribed Spacers) organisés en ITS1 et ITS2, transcrits puis épissés lors de la maturation de l'ARNr. Les gènes 26/28S codent pour les ARNr participant à la constitution de la grande sous-unité du ribosome (LSU), alors que le gène 18S code pour l'ARNr participant à la formation de la petite sous-unité (SSU). Ces gènes présentent l'avantage d'être constitués d'une alternance de régions variables et de régions conservées (Gutell *et al.*, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002). Les régions conservées permettent d'avoir accès à différents niveaux de taxonomie et l'identification des grands groupes de micro-organismes (eucaryotes, eubactéries, archaebactéries) (Woese *et al.*, 1990) et les régions variables permettent une identification au niveau de l'espèce (Amann *et al.*, 1995). Ainsi, Les espaceurs internes ITS1 et ITS2 et la région D1/D2 de la grande sous-unité sont généralement moins conservés au cours de l'évolution et peuvent être utilisés pour identifier et différencier des espèces phylogénétiquement proches (Eickbush et Eickbush 2007; Poczai et Hyvönen, 2010).

La présente étude repose sur l'amplification de la région D1/D2 du gène de l'ARN ribosomique 26S (ARNr 26S). Les souches présentant des résultats ambigus des séquences D1/D2 subissent le séquençage de la région ITS1 et ITS2. Le séquençage de l'amplicon obtenu est comparé aux bases de données des séquences. Le degré de parenté est alors déterminé en fonction des homologies de séquences.

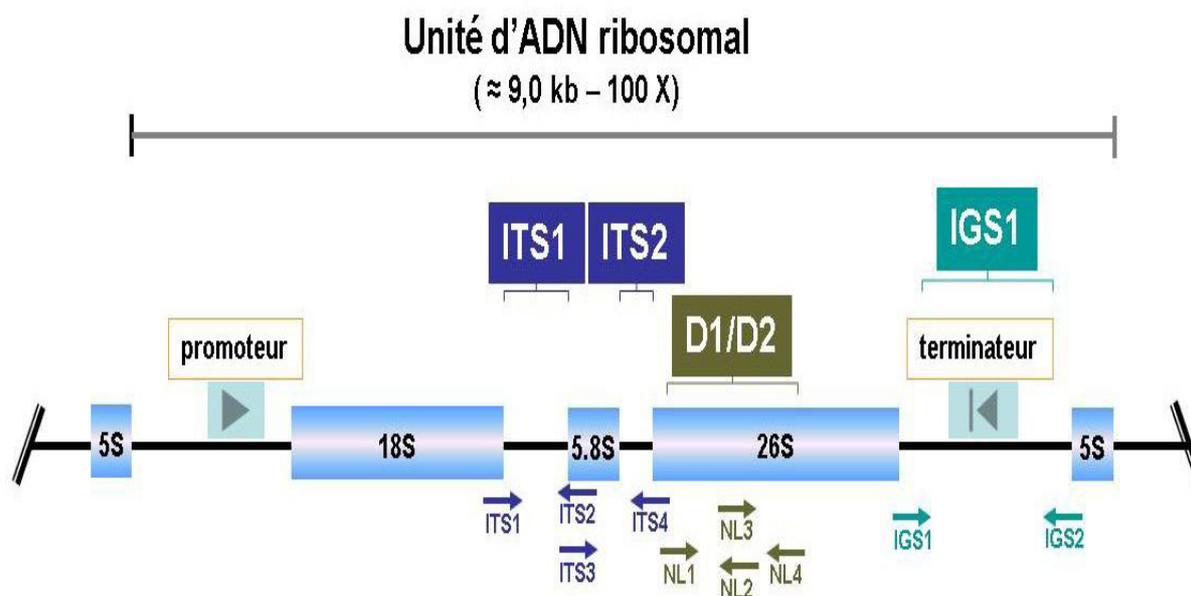


Figure 12: Organisation génomique de la grande sous unité de l'ADN ribosomique (Morel, 2013).

4.2.1. Extraction de l'ADN

La méthode de Bolano *et al.*, (2001) avec quelques modifications (Turchetti *et al.*, 2013) est utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique total des isolats obtenus de cultures fraîches incubées pendant 48-96 h à 25°C sur milieu YPGA. Les cellules sont collectées à la surface des boîtes de Pétri puis mélangées à 500 μ l de tampon de lyse [Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.3% w/v] dans une minicolonne. 150 μ l de billes de verre (de diamètre entre 0.25 à 0.30 mm) sont ajoutés à 500 μ l de solution phénol chloroforme (1:1, v/v, pH 8.0). Le mélange est agité vigoureusement au Vortex pendant 3 min afin de casser les cellules. Une centrifugation (30 min, 12000 rpm à 4°C) permet de séparer 4 phases : les billes de verre (en culot), la phase phénolique (contenant les protéines et les

lipides), les débris cellulaires et la phase aqueuse (en surnageant contenant l'ADN et l'ARN). Cette dernière (environ 400 µl) est transférée dans une nouvelle minicolonne à laquelle est ajouté un volume égal d'éthanol glacé (96%). Le mélange est homogénéisé par inversion du tube, puis maintenu à -20°C pendant 30-60 min ; ce qui permet la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation (15 min, 12000 rpm, à 4°C), le culot d'ADN est dissout dans 100 µl d'eau distillée stérile avec 4 µl de RNase afin d'éliminer les ARNs. Après une incubation à 37°C pendant 30 min, 11 µl d'acétate de sodium (0.3 M) sont ajoutés à 200 µl d'éthanol glacé (96%). Après une centrifugation (15 min, 12000 rpm, à 4°C), le culot d'ADN est mélangé à 500 µl d'éthanol (70%). Le mélange est agité au Vortex pendant 30 secondes au minimum. Une dernière centrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) permet de récupérer le culot d'ADN génomique qui est ensuite parfaitement séché avant d'être dissout dans 100 µl d'eau distillée stérile. L'ADN génomique ainsi extrait est conservé à -20°C.

4.2.2. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase (PCR, Polymerase chain reaction) permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN cible pour faciliter son étude.

La réaction d'amplification (PCR) s'effectue dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl de tampon Taq polymérase (10X) ; 4 µl de MgCl₂ (25 mM) ; 10 µl de dNTPs (1.25 mM) ; 0.2 µl de Taq polymérase (5 U/µl ; Sigma-Aldrich) ; 2.5 µl de chaque amorce [RLR3R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3') et V9G (5'-TGCGTTGATTACGTCCCTGC-3') ; Sigma-Aldrich Co], 5 µl d'ADN génomique et 20.8 µl d'eau distillée. La réaction d'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Biometra® GmbH, Goettingen, Germany). Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 30 cycles PCR (dénaturation 45 secondes à 94°C, hybridation 30 secondes à 52°C, extension 2 min à 72°C) et un cycle final d'extension de 7 min à 72°C.

Afin de vérifier la qualité de la réaction d'amplification, 3 µl de produits PCR additionné de 3 µl de tampon de charge sont séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1.4 % dans lequel a été ajoutée 25 µl de bromure d'éthidium BET (1mg/ml). Ce gel est placé à 95 V pendant 2 h dans une solution de tampon TAE (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1.25 mM, pH 8,3). Le Mass RulerTM DNA ladder, Mix, (Fermentas Inc., Hanover) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. La visualisation est faite sous UV à l'aide d'un imageur. La présence de l'ADN est révélée grâce à la fluorescence du BET piégé entre les molécules.

4.2.3. Séquençage et analyse phylogénétique

Les produits PCR purs sont séquencés auprès de la société MacroGen Inc. (Amsterdam, Pays-Bas). Ainsi, une région de 600 – 650 paires de bases (domaine D1/D2) est séquencée par l'utilisation des amorces NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Sigma-Aldrich Co) (Turchetti *et al.*, 2013).

Le séquençage de la région ITS1 et 2 est effectué pour toutes les souches présentant des résultats ambigus des séquences D1/D2. Une région de 600 à 650 paires de bases (espaceurs internes ITS1 et 2 y compris le gène de l'ARNr 5.8S) est séquencée par l'amorce sens (forward) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et l'amorce anti-sens (reverse) ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Sigma-Aldrich Co) (Turchetti *et al.*, 2013).

Les séquences nucléotidiques obtenues sont vérifiées et corrigées à l'aide du logiciel Chromas Pro (version 1.32, Technelysium Pty. Ltd, Australia), puis comparées avec celles de GenBank en utilisant le programme BLASTN sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Les analyses phylogénétiques sont exécutées sur la plate-forme phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). L'arbre phylogénétique est construit par la méthode Neighbor-joining (Nj) (Saitou et Nei, 1987). Les « gaps » sont retirés de l'alignement. Les comparaisons phylogénétiques des séquences de même taille sont réalisées à partir du logiciel « Molecular Analysis Evolutionary Genetics Analysis » (MEGA) version 5 selon la fonction des plus proches voisins (Tamura *et al.*, 2011).

5. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires des isolats de levures

Toutes les levures isolées sont testées pour leurs capacités à dégrader la pectine, l'amidon, les protéines (caséine), les lipides (tributyryne), l'estérase, la cellulase et l'uréase selon les méthodes décrites par Buzzini et Martini, (2002).

5.1. Activité pectinolytique

La mise en évidence de l'activité pectinolytique est testée sur milieu contenant la pectine. La composition du milieu est la suivante (g/l): YNB 6.7, pectine 10 et agar 20 (pH final 7). Après la croissance des cellules, les boîtes sont couvertes avec la solution de Hexadecyltrimethylammonium (10 g/l). L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine.

5.2. Activité amylolytique

Les cultures sont criblées pour leur aptitude à hydrolyser l'amidon sur un milieu contenant (g/l) : YNB 6.7, amidon soluble 2 et agar 20 à pH 6. Après la croissance des cellules, les boîtes sont couvertes avec la solution d'iode qui donne une zone de lyse transparente par rapport aux zones bleues contenant l'amidon non hydrolysé.

5.3. Activité protéolytique

L'activité protéasique est mise en évidence sur un milieu lait écrémé – agar. La composition du milieu est la suivante : eau distillée – agar 20 g/l et lait écrémé UHT (stérile) 100 g/l. Après incubation, une zone claire autour de la colonie indique une activité protéasique.

5.4. Activité lipolytique

Les souches sont testées sur milieu tributyrine - agar (g/l) : peptone, 5; extrait de levure, 3 ; tributyrine, 10 et agar, 20, pH 6. Le substrat tributyrine est ajouté stérilement. Le milieu est ensuite mélangé pour une période de 30 secondes afin d'émulsifier le substrat de façon homogène dans le milieu de culture. Un halo clair est observé lorsque le substrat est dégradé par les enzymes lipolytiques.

5.5. Activité estérase

La capacité à hydrolyser les esters est testée sur un milieu composé de (g/l) : peptone, 10; NaCl, 5; CaCl₂.2H₂O, 0,1; Tween 80 (polyoxyéthylène-sorbitan-mono-oléate), 10 et agar, 20, pH 6,8. La présence de l'activité estérasique est observée comme un précipité visible (halo opaque) autour de la colonie.

5.6. Activité cellulolytique

Les souches sont testées sur un milieu composé de (g/l) : extrait de levure, 10 ; peptone, 10 ; glucose, 20 ; carboxyméthylcellulose, 5 ; et agar, 20, pH 6.8. Après croissance des cellules, les boîtes sont couvertes avec la solution de Rouge de Congo à 1% pendant 20 min (permettant au colorant de se fixer). Des rinçages successifs par une solution de NaCl 2N pour éliminer l'excès de colorant. Les plages de lyse apparaissent décolorées (jaune-orange).

5.7. Activité uréase

La capacité des souches à produire de l'uréase est testée sur milieu PCA (Annexe 1) additionné de 10 g/l d'urée (stérilisée par filtration), et de 5 ml/l d'une solution de bleu de bromothymol 1%, pH 6. Le milieu doit avoir une couleur jaune-orange (addition de l'HCl 0.1 N si le milieu vire vers le vert). L'activité uréase est détectée par la présence d'un halo bleu sur un fond de milieu de culture jaune orange.

Partie II : Optimisation et production de la polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers et en fermenteur

6. Milieux de cultures

6.1. Substrat de fermentation

Le milieu de base est préparé à partir de déchets de tomates industrielles composés de graines et de pulpe adhérente à la peau. Ils sont obtenus de la conserverie « Maison Latina » de Chelghoum Laid (Wilaya de Mila), compagne de l'été 2012. Le substrat récupéré humide est essoré, séché à l'air libre, puis réduit en poudre à l'aide d'un broyeur et d'un tamis (tamis AFNOR, ouverture 0.5 mm). Le substrat ainsi obtenu est conservé dans des sacs en plastiques à température ambiante.

6.2. Milieu de base

La poudre de déchets de tomates est diluée dans de l'eau distillée à différentes concentrations (1%, 2%, 3%, 4%, 5% et 6%) afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir une meilleure production de pectinase. Le mélange chauffé est mis sous agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène. Il est centrifugé à 6000 rpm pendant 20 min. Le surnageant est ensuite filtré sur papier wathman. Le filtrat constitue ainsi le milieu de base.

6.3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de 40 ml de milieu YPGA coulés en Erlen-meyers de 250 ml. Le milieu ainsi préparé estensemencé avec la levure *Aureobasidium pullulans*. Après une incubation à 30°C de 48 à 72 h, 50 ml d'eau peptonée stérile (Annexe 1) sont ajoutés, les cellules sont alors détachées de la gélose par agitation. Le dénombrement des cellules est estimé par comptage direct sur la cellule de comptage de Burker (0,1 × 0,0025 mm²).

L'ensemencement des milieux de cultures est réalisé avec une suspension de cellules à raison de $2,5 \times 10^7$ cellules/ml (González-Hernández, 2012).

6.4. Détermination de la composition physico-chimique des déchets de tomates

▪ Détermination de la matière sèche

La matière sèche des déchets de tomates est déterminée par séchage d'un échantillon de poids connu (2 g) dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant (Afnor, 1991).

▪ Détermination des cendres

Les cendres totales représentent la partie minérale d'un produit et permettent d'avoir une estimation de l'apport en sels minéraux. Elles sont déterminées par calcination d'un échantillon de poids connu (2 g) dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures (Afnor, 1991).

▪ Dosage de la matière azotée totale

Le dosage de la matière azotée par la méthode de Kjeldhal est réalisé par le Laboratoire EPE Central Labo Spa, Constantine. L'échantillon est minéralisé par l'acide sulfurique concentré à chaud en présence d'un catalyseur (sélénium). L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium puis en ammoniac. Ce dernier, déplacé par la lessive de soude, est récupéré dans une solution d'acide borique ou d'acide sulfurique. Ainsi, le taux de protéines est déterminé par la multiplication du taux d'azote par un coefficient défini expérimentalement, et égale à 6.25.

▪ Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux des déchets de tomates sont déterminés par la méthode au « phenol-sulfuric acid » méthode de Dubois et al., (1956). Les oses sont dégradés à chaud en présence d'acide sulfurique concentré en composés de la famille de dérivés furfuriques. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner des complexes jaune-orange. L'apparition de ces complexes est suivie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 490 nm.

▪ Dosage de la matière grasse libre

Le dosage de la matière grasse libre est réalisé par le Laboratoire EPE Central Labo Spa, Constantine (selon la méthode ISO 7302).

▪ Mesure du pH

Après solubilisation de la poudre de déchets de tomates dans l'eau distillée, et après centrifugation et filtration, le pH de la solution est mesuré.

7. Effet des différentes sources carbonées sur la production de la PGase d'*Aureobasidium pullulans*

L'effet de huit sources de carbone sur la production de l'enzyme est étudié. Il s'agit de la pectine de citron et de la pomme, du lactose, du galactose, de l'acide galacturonique, de l'acide polygalacturonique, du lactosérum en poudre et du glucose. Les différentes sources de carbone sont additionnées à une concentration de 1%. Après stérilisation et ensemencement des milieux de cultures, les Erlen-meyers sont incubés à 30°C pendant 96 heures avec une agitation de 150 rpm. Des prélèvements de 1ml sont effectués chaque jour puis centrifugés à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le dosage de l'activité de la polygalacturonase est déterminée à partir du surnageant. Les expérimentations sont réalisées en trois essais.

8. Les plans d'expériences

La méthodologie des plans d'expériences permet une recherche expérimentale planifiée appelée « plans d'expériences ».

La méthode des plans d'expérience est un modèle statistique permettant à un expérimentateur de limiter le nombre d'essais à réaliser lors d'une expérimentation afin de déterminer une réponse pour un grand nombre de facteurs étudiés.

En effet, un phénomène étudié peut toujours être modélisé sous la forme mathématique :

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_n).$$

Y étant la grandeur ou réponse à laquelle l'expérimentateur s'intéresse, f la fonction mathématique exprimant le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs des facteurs (ou variables appelées x_j).

Cette méthode consiste en une variation raisonnée des niveaux de tous les facteurs en même temps pour chaque essai. Les plans d'expériences vont ainsi permettre d'étudier l'influence simultanée d'un grand nombre de facteurs et de leurs interactions pour conduire à une optimisation des conditions.

8.1. Criblage des facteurs affectant la production de la polygalacturonase (PGase) en utilisant le plan de Plackett-Burman

8.1.1. Plan de Plackett-Burman (PBD) (Plackett –Burman, 1946)

Ce sont des plans factoriels fractionnaires simplifiés qui permettent de réaliser un modèle d'ordre 1 pour k facteurs à deux niveaux. Ils fournissent une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes.

Ces plans sont déjà utilisés par plusieurs auteurs pour la sélection des facteurs influençant la production d'enzymes microbiennes (Bennamoun *et al.*, 2004 ; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006 ; Ait kaki *et al.*, 2012 ; Belmessikh *et al.*, 2013 ; Djekrif *et al.*, 2014 ; Dinarvand *et al.*, 2017). Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet de k facteurs à 2 niveaux sur la production enzymatique étudiée avec un nombre d'expériences N tel que $N=k+1$. Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable. Ce sont donc des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (Tableau 7). Le nombre de facteurs étudiés dans cette étude est 7, ce qui fait que la matrice comprend 8 expériences, *i.e.* $N = 8$ (Tableau 8). D'après Plackett et Burman, (1946), la 1^o ligne du tableau correspond à celle du générateur choisi dans le tableau 7. Pour les lignes 2 à 7, elles sont obtenues par permutation circulaire à partir du générateur. La dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur (-1) (Tableau 8).

Les 5 variables réelles sont : pH (X_1), Lactose (X_2), Glucose (X_4), CaCl_2 (X_6) et Extrait de levure (X_7). Les 2 facteurs restants (X_3 et X_5) sont désignés comme variables erreurs pour évaluer l'erreur expérimentale qui permettra de calculer l'erreur standard. Les niveaux supérieurs (+) et les niveaux inférieurs (-) de l'ensemble des variables testés sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 7: Générateurs des matrices pour N= 4, 8, 12, 16, et 20 essais de PBD (Plackett et Burman, 1946).

Nombre d'essais	Générateur (1 ^e ligne de la matrice)																		
N = 04	+	+	-																
N = 08	+	+	+	-	+	-	-												
N = 12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-								
N = 16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-				
N = 20	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
N = 24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-

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

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

X₁ : pH ; X₂ : lactose ; X₃ : erreur ; X₄ : glucose ; X₅ : erreur ; X₆ : CaCl₂ ; X₇ : extrait de levure (+), niveau supérieur ;(-), niveau inférieur.

Tableau 9: Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du PBD.

Facteurs	Niveau (-)	Niveau (+)	Unité
X ₁ : pH	5	6	-
X ₂ : Lactose	0	1	%
X ₃ : Erreur	-	-	-
X ₄ : Glucose	0	1	%
X ₅ : Erreur	-	-	-
X ₆ : CaCl ₂	0	0,125	g/l
X ₇ : Extrait de levure	0	0.2	%

8.1.2. Analyse statistique du plan de Plackett-Burman

A la fin de l'expérience, les coefficients des facteurs explicatifs de la production de la PGase d'*A. pullulans* sont estimés par la méthode des moindres carrés et assortis du test *t* de Student à un seuil critique $\alpha = 0,1$. Les calculs sont effectués par le logiciel statistique Minitab Software Version 17.1 (Minitab Statistical Software, USA). Des sous-modèles sont alors sélectionnés pour chacun des facteurs à expliquer. La réponse théorique *Y*, pour chaque facteur analysé, s'écrit de la forme suivante :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8$$

Où β_0 : constante
 β_1, \dots, β_8 : coefficients de régression
 X_1, \dots, X_8 : facteurs explicatifs.

Selon Priyadharshini et Bakthavatsalam, (2016), l'effet de chaque variable (*E*) est déterminé par la différence des moyennes des réponses entre le niveau supérieur (+) et le niveau inférieur (-), comme suit:

$$E_{(X_i)} = \frac{\sum Y^{(+)}}{r} - \frac{\sum Y^{(-)}}{r}$$

avec : $Y^{(+)}$ est la valeur de la réponse au niveau supérieur (+)
 $Y^{(-)}$ est la valeur de la réponse au niveau inférieur (-)
r est le nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur.

L'erreur expérimentale (E_E) est définie comme la moyenne des effets des erreurs (*Ed*) :

$$E_E = \frac{\sum(E_d)}{n}$$

E_E est la variance des effets et *n* est le nombre des variables erreurs.

L'erreur standard (*SE*) est déterminée comme la racine carrée de la variance :

$$SE = \sqrt{E_E}$$

La signification de chaque facteur est déterminée par le test de Student :

$$t_{(ddl, \infty)} = \frac{E_{(X_i)}}{SE}$$

$E_{(X_i)}$ est l'effet de chaque variable et **SE** est l'erreur standard.

Si le test *t* est significatif, l'effet est dû au changement du niveau du facteur étudié. Cet effet peut être positif ou négatif.

8.2. Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponse (RSM)

La méthodologie des surfaces de réponse est déjà utilisée dans plusieurs travaux d'optimisation de la production d'enzymes microbiennes (Belmessikh *et al.*, 2013 ; Djekrif *et al.*, 2014 ; Priyadharshini et Bakthavatsalam, 2016). Cette approche mathématique est basée sur l'emploi d'un plan composite centré (CCD, Central Composite Design).

8.2.1. Construction du plan CCD

Pour les trois variables indépendantes, sélectionnées à partir du plan PBD (soit X_1 : pH, X_2 : lactose et X_3 : CaCl_2), le plan étudié comprend cinq niveaux pour chacune d'elles ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$). Aussi, la structure du plan CCD utilisé est représentée dans les tableaux 10 et 11. Il est composé de 3 parties :

1. Un plan factoriel complet à deux niveaux (-1 , $+1$) : ce plan comprend 2^k expériences (k est le nombre de facteurs). Avec $k = 3$ facteurs, ce plan comporte 8 essais (Tableau 11).
2. $2k$ points axiaux : ces points sont représentés sur les axes de chaque facteur ($-\alpha$ et $+\alpha$), et leurs valeurs varient en fonction du nombre de variables utilisées. Pour 3 variables, le nombre d'essais correspond à 6 et la valeur de α est égale à 1.682.
3. Répétitions au centre du domaine expérimental (0) : afin de calculer l'erreur expérimentale ce qui permet d'analyser ce plan (3 répétitions sont effectuées).

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

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

\hat{Y} : réponse ;

β_0 : la constante ;

β_i : les coefficients de régression ;

X_i : les variables explicatives.

Les dérivés par rapport à 0, permettant de déterminer les coordonnées codées des extremums, seront ensuite transformées en valeurs réelles.

d_1 , d_2 et d_3 sont les solutions des dérivés des équations obtenues après le traitement de la matrice du plan composite centré ; ils permettent de déterminer les positions des extremums de ces fonctions.

$$d = \frac{[\text{Concentration ou valeur du facteur étudié}] - y}{z}$$

y est la valeur de la réponse au niveau 0 du facteur étudié,

z est le pas choisi par le manipulateur.

Tableau 10: Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Facteurs	Niveau des facteurs					Unité
	$-\alpha(-1.682)$	-1	0	+1	$+\alpha(+1.682)$	
X ₁ : pH	5.16	5.5	6	6.5	6.84	
X ₂ : Lactose	0.16	0.5	1	1.5	1.84	%
X ₃ : CaCl ₂	0.0205	0.0375	0.0625	0.0875	0.104	g/L

Tableau 11: Structure du plan composite centré à 3 facteurs.

N ° D'essais	Niveaux des facteurs		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1.682	0	0
10	+1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	+1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	+1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

8.2.2. Analyse statistique et modélisation

Pour étudier l'impact des facteurs et modéliser la réponse sous forme d'équation, l'intégration par calcul matriciel est réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 10.0 (Statsoft, Inc. 2012). L'analyse statistique de la réponse Y est déterminée soit en cherchant des optimums/minimums, soit en fixant un des paramètres par exemple. La représentation graphique permet de visualiser rapidement le phénomène en fonction des facteurs étudiés.

8.2.3. Analyse de la variance (ANOVA)

La détermination de l'effet des facteurs (concentration de déchets de tomates, source de carbone) sur la production de la PGase, ainsi que l'effet des paramètres physico-chimiques (température et pH) sur l'activité PGase, sont traités par une analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur à l'aide du logiciel Statistica, version 12.0 (StatSoft Inc., 2014).

9. Fermentations

9.1. Production de la polygalacturonase en Erlen-meyers

La composition du milieu de production varie selon les plans expérimentaux (voir plan de Plackett-Burman et plan composite centré).

Les cultures sont réalisées dans des Erlen-meyers de 250 ml à raison de 50 ml par fiole, puis stérilisées à 121°C pendant 20 minutes. Elles sont ensuite inoculées par une concentration de 2.5×10^7 cellules/ml, incubées à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 72 heures. Les expériences sont réalisées en trois répétitions.

9.2. Fermentation en conditions optimales

Des essais, en condition optimales sont réalisés en batch (Erlen-meyers de 250 ml) afin de vérifier les résultats de l'étude statistique et de valider les plans d'expériences.

9.3. Cinétique de la production de la polygalacturonase d'*Aureobasidium pullulans* en fermenteur

L'évolution de la production de la PGase par la levure *Aureobasidium pullulans* durant les différentes phases de croissance est réalisée en fermenteur de 20 l sur milieu optimisé. La procédure générale comporte trois étapes. Premièrement, la croissance de la levure sur boîte de pétri, suivie d'une croissance en fiole et enfin la culture en fermenteur proprement parlée.

9.3.1. Préparation des pré-cultures

L'utilisation de pré-cultures a deux buts : obtenir une concentration cellulaire assez importante pour inoculer un fermenteur et avoir des levures en phase exponentielle de croissance. L'inoculation des pré-cultures se fait à partir des colonies isolées sur des boîtes de pétri contenant du milieu YPGA. Ces boîtes sont maintenues à 30°C pendant 48 voir 72 heures ; Les colonies qui s'y trouvent sont repiquées dans des fioles Erlen-meyers de milieu YPG préalablement stérilisées. Les pré-cultures sont maintenues sous agitation pendant 24 heures à 30°C. Elles sont ensuite transférées dans un Erlen-meyer de 2 l contenant 980 ml de milieu de fermentation pour assurer un volume de 1l, l'inoculation est réalisée dans les mêmes conditions. Cette dernière pré-culture sert à inoculer le fermenteur. Avant l'inoculation du fermenteur, la culture est vérifiée au microscope pour éviter sa contamination.

9.3.2. Culture en fermenteur

La culture en fermenteur de capacité de 20 l se déroule en batch. Le fermenteur est un Biolaffite (France), la cuve est en acier inoxydable, muni d'un axe d'agitation garni de trois mobiles de type turbine à quatre pâles droites. L'air est injecté dans le milieu via un "sparger" mobile fixé sur l'axe d'agitation en dessous des trois turbines. Le fermenteur est doté d'une garniture interne dans laquelle circulent la vapeur, l'eau chaude ou l'eau froide utilisées pour la stérilisation et la régulation de la température pendant la fermentation. L'entrée d'air est dotée d'un filtre profond pour assurer la stérilité du milieu. Celui-ci est stérilisé à la vapeur avant l'inoculation. Un condenseur fonctionnant à l'eau courante limite la perte de milieu par évaporation. Une vanne de prise d'échantillons permet de réaliser des prélèvements de manière aseptique pendant la fermentation. Cette vanne est stérilisable à tout moment par de la vapeur directe.

Différentes sondes sont connectées au fermenteur. Elles fournissent des informations en continu sur les conditions de travail. Elles doivent supporter la stérilisation (121°C) et être stables dans le temps car elles fonctionnent en continu pendant plusieurs jours sans être recalibrées. Ces trois sondes sont :

- Une sonde de pH autoclavable, connectée à un boîtier de contrôle (Hanna InPro 6000, Yokogama).
- Une sonde polarographique pour la mesure du pourcentage d'oxygène dissous par rapport à la saturation (Escolab).
- Un thermocouple pour la mesure de la température (PT100, Prosensor).

Un logiciel (Digivis) permet de visualiser les données provenant du fermenteur : la température, le pH, la vitesse d'agitation et la concentration en oxygène. Ces mesures sont enregistrées toutes les 30 secondes sur disque dur et sont récupérables via le logiciel DijiBrowse. Le logiciel DigiVis permet également d'imposer la consigne de vitesse d'agitation, la température de fonctionnement et le pH du milieu. La température est régulée par ajout d'eau chaude ou d'eau froide en fonction de la consigne ; le pH est adapté par deux pompes péristaltiques ajoutant de l'acide phosphorique ou l'ammoniac selon les cas.

Un analyseur de gaz connecté à la sortie d'air permet de connaître le pourcentage d'oxygène et de CO₂ dans les gaz sortant du fermenteur. L'air est d'abord séché puis envoyé dans un détecteur infrarouge. Les détecteurs d'oxygène et de CO₂ sont calibrés avec l'air ambiant puis de l'azote 100% (Air liquide).

Le volume de travail est de 15 l. Le lactose est stérilisé séparément puis ajouté aseptiquement au fermenteur avant l'inoculation par une pompe péristaltique. Les conditions de fermentation sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Tableau 12: Conditions de fermentation.

Température	30 °C
pH	5.16
Agitation	200 rpm
Aération	1 vvm
Volume de travail	15 litres
Inoculum	1litre
Solutions pour la régulation du pH	KOH (4 N) et H ₃ PO ₄ (4 N)
Anti-mousse	TEGO 911

Des prélèvements sont effectués périodiquement toutes les 4 heures, puis centrifugés 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Les différents dosages (biomasse, activité de la polygalacturonase, protéines, glucides) sont déterminés à partir du surnageant. Les expérimentations sont réalisées en trois essais.

10. Méthodes analytiques

10.1. Détermination de la biomasse sèche et extraction de l'enzyme

Le poids sec de la biomasse est déterminé, pour la culture en fermenteur, après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant. Le surnageant correspondant à l'extrait enzymatique brut est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique, (des protéines et des glucides dans le cas de l'étude cinétique).

10.2. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PGase)

L'activité de la polygalacturonase est mesurée selon la méthode de Miller, (1959). L'action des polygalacturonases sur l'acide pectique provoque l'apparition en quantité croissante des sucres réducteurs. Le dosage du sucre réducteur est déterminé par une réaction colorimétrique dont le principe est le suivant :

En milieu alcalin et à chaud l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orange (Figure 13). L'activité enzymatique est exprimée par l'unité internationale correspondant à une micromole d'acide galacturonique libéré par minute à 40 °C et à pH 5.

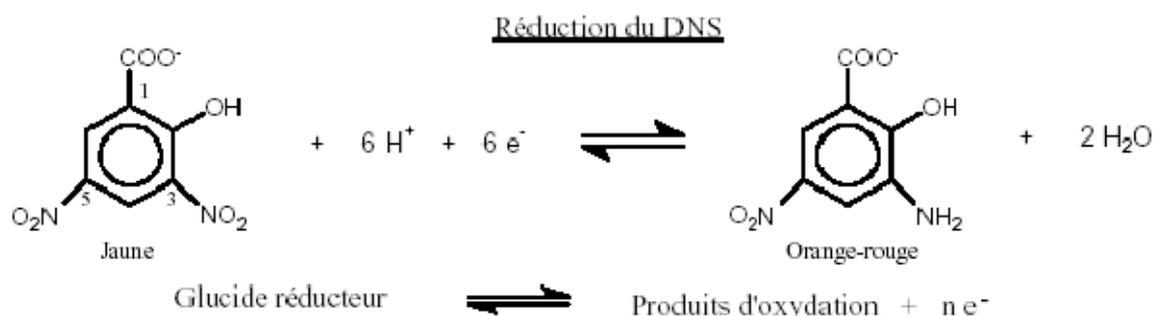


Figure 13: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.

Le dosage de l'activité de la polygalacturonase est déterminé comme suit:

- Le mélange réactionnel est constitué de l'extrait enzymatique brut (100 µl), de 100 µl de substrat acide polygalacturonique (PGA) à 1% (w/v) dans du tampon (acétate de sodium 50 mM, pH 5), incubé à 40°C pendant 20 min.

- La réaction est arrêtée par addition de 400 μ l de DNS (Annexe 2). Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100°C pour le développement de la couleur.
- Après refroidissement dans un bain de glace, 400 μ l d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminée à 540 nm.

La quantité de sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage (Figure 14) avec l'acide D-(+) galacturonique monohydraté (Sigma-Aldrich) à des concentrations de 0-2 mg/ml.

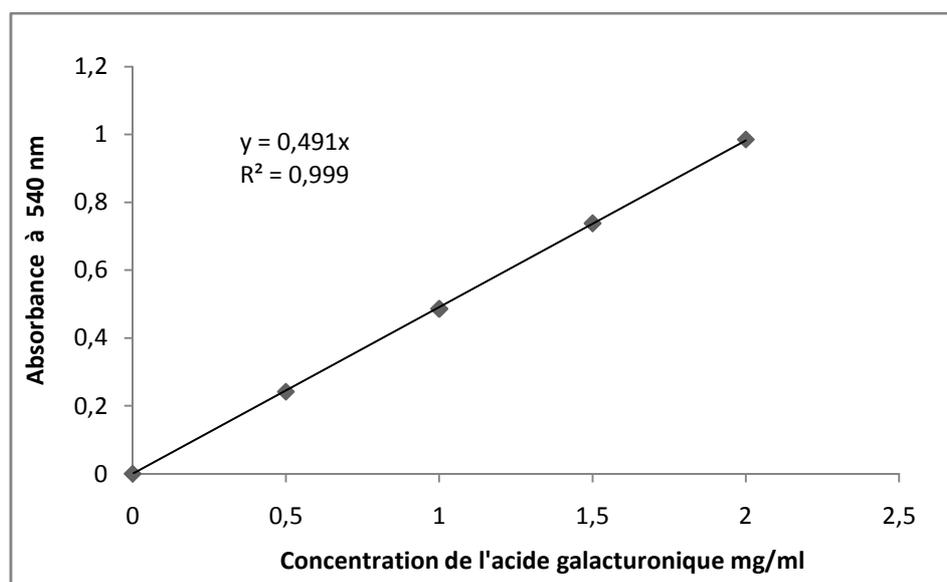


Figure 14: Courbe étalon de l'acide galacturonique.

10.3. Dosage de l'activité pectine-lyase (PL)

La méthode utilisée pour la détermination des activités pectine-lyases est fondée sur la mesure du dérivé galacturonique insaturé en C₄-C₅, par augmentation de l'absorption à 232-235 nm (due à la double liaison) (Collmer *et al.*, 1988).

A 1 ml de pectine à 0.5% dans du tampon citrate-phosphate (0.1/0.2 M), pH 5.5, est ajouté 0.5 ml d'extrait enzymatique. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 20 minutes. 0.5 ml de la réaction sont prélevés et dilués 10 fois avec une solution d'HCl 0.01N. L'augmentation de l'absorbance à 235 nm, est déterminée par rapport au témoin constitué de l'enzyme dénaturée (100°C pendant 5 min).

Une unité d'activité (U) est définie par la quantité nécessaire pour produire une augmentation de l'absorbance de 0.01 unité par min à pH 5.5 et à 30°C.

10.4. Dosage de l'activité pectinestérase (PE)

Les pectinestérases hydrolysent les liaisons esters méthyliques de la pectine. Au cours de la réaction, du méthanol est libéré et de nouvelles fonctions carboxyliques libres apparaissent. Le principe utilisé pour déterminer l'activité PE : la détermination du méthanol libéré.

La libération du méthanol est vérifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Hewlett-Packard Agilent 1100 Series (France).

La séparation est réalisée sur une colonne échangeuse d'ions de type Supelcogel C-610H (Supelco) précédée d'une pré-colonne de type Supelguard H (Supelco, copolymère de styrène et de divinylbenzène). Le méthanol est détecté par un détecteur réfractométrique différentiel ou détecteur à indice de réfraction (Agilent 1100 Series). Le débit d'élution est de 0.5 ml/min d'une solution d'acide phosphorique 0.1% filtrée sous vide et préparée avec de l'acide de qualité analytique et de l'eau milli-Q. Le logiciel HP Chemstation permet l'automatisation de l'analyse et le traitement des résultats. Le méthanol est utilisé comme étalon à une concentration variant de 0.125 à 4 g/l.

10.5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al., (1951) qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques :

La réaction de Biuret dans laquelle Cu^{2+} , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond et la chimie de Folin-Ciocalteu dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleue (le protocole est décrit en Annexe 2). La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine (BSA) à des concentrations de 0 à 500 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 15).

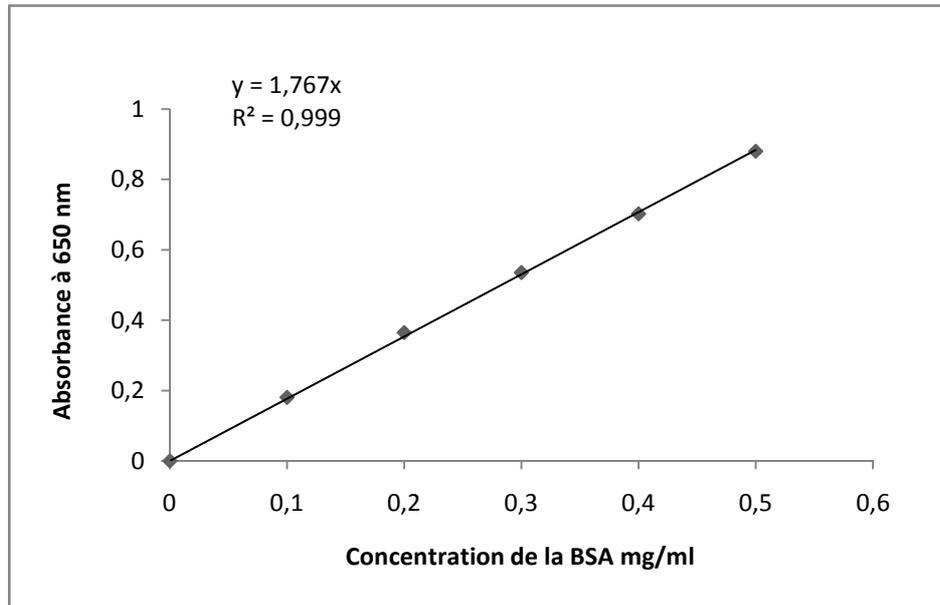


Figure 15: Courbe étalon pour le dosage des protéines.

10.6. Dosage des glucides par la méthode de Dubois et al., (1956)

La méthode est décrite précédemment. Le protocole est détaillé dans l'Annexe 2. La coloration jaune orangé est mesurée à 490 nm par rapport à une gamme d'étalon de 100 μg / ml en glucose (Figure 16A) et en mannose (Figure 16B) (pour le dosage du taux de glycosylation des deux isoenzymes purifiées).

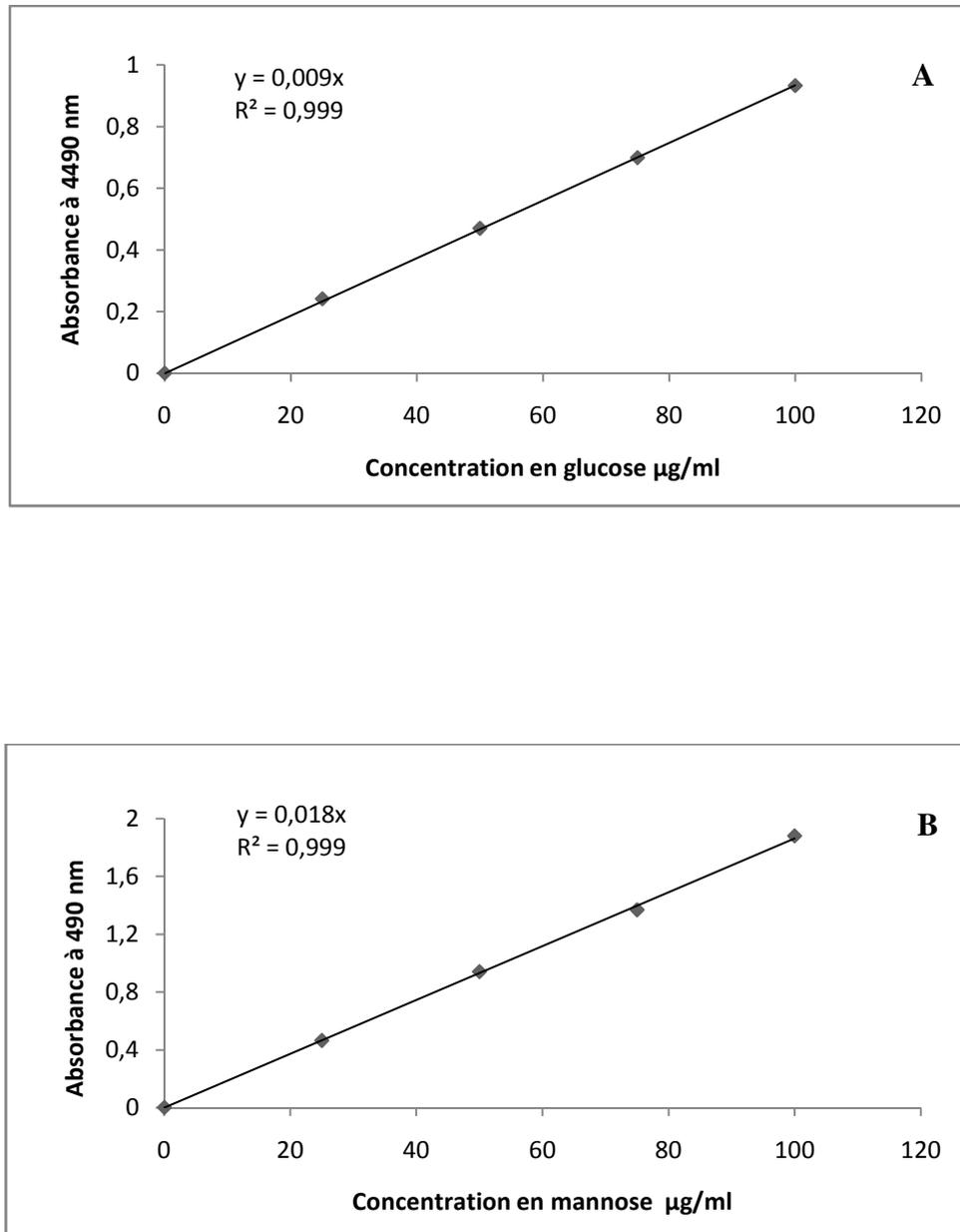


Figure 16: Courbe étalon pour le dosage des glucides.

Partie III : Purification et caractérisation des PGases

11. Purification de la polygalacturonase

La séparation de l'enzyme est réalisée en plusieurs étapes successives :

11.1. Préparation de l'extrait brut

Après une incubation de 52 h à 30°C avec une agitation de 150 rpm de la levure *Aureobasidium pullulans* sur milieu optimisé. Les cellules sont séparées du jus de culture par centrifugation. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

11.2. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium

Le fractionnement des protéines est souvent réalisé par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en première étape de séparation. En effet, ce sel présente plusieurs avantages un pouvoir précipitant élevé, un faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines et une grande solubilité en plus de son faible coût (Kent, 1999).

Le fractionnement des protéines se fait en 2 étapes ; le surnageant est amené à 30% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agité pendant une nuit à 4°C puis centrifugé à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot est éliminé et le surnageant est amené à 80% de saturation, agité pendant une nuit à 4°C et centrifugé à 12000 rpm pendant 30 min, à 4°C. Le culot est alors suspendu dans le minimum de tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5 (Quiroga *et al.*, 2009).

11.3. Précipitation des protéines à l'acétone

Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées à l'acétone glaciale préalablement refroidie à -20°C en utilisant trois taux de concentration de 60 à 80% d'acétone glaciale. Le mélange est gardé toute une nuit à 4°C, puis centrifugé à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C. Les protéines précipitées sont ensuite redissoutes par agitation dans le minimum de tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5 (Thakur *et al.*, 2010).

11.4. Ultrafiltration

Les fractions actives contenant la protéine d'intérêt sont concentrées par ultrafiltration sur des membranes (Amicon-Ultra, 4 ml, 10 KDa). Le concentrat est obtenu après une centrifugation à 7000 rpm pendant 30 min.

11.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire

L'échantillon obtenu par précipitation à l'acétone est réparti en plusieurs fractions de volume égal puis concentré par ultrafiltration. Un échantillon de 1 ml est ensuite déposé au sommet d'une colonne de (1m x 1.6 cm) contenant 30 ml de Séphacryl S-200 préalablement équilibré avec du tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5. Après lavage de la colonne par le tampon acétate, l'enzyme est éluée compétitivement. Le débit d'éluion est réglé à 0.5 ml/min. Des fractions de 2 ml d'éluat sont collectées successivement. Pour chaque fraction collectée, une mesure de l'absorbance à 280 nm est effectuée pour quantifier les protéines. Une détermination de l'activité de la PGase est notamment effectuée sur les fractions correspondant aux pics de protéines. Les fractions correspondant à chaque pic d'activité sont ensuite rassemblées.

11.6. Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur des membranes (Amicon-Ultra, 4 ml, 10 KDa).

La purification est poursuivie sur une colonne (10 x 1 cm) contenant 10 ml de DEAE-Sephrose. Le gel est lavé par trois équivalents volumes de colonne avec le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5 pour éliminer les particules non fixées. L'éluion est réalisée dans le même tampon avec un gradient linéaire de NaCl (0 à 1 M). Le débit est fixé à 0,5 ml/min, le volume des fractions est de 2 ml et l'éluion des protéines est suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions présentant de l'activité PGase sont ensuite rassemblées.

11.7. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS - PAGE)

La pureté de l'enzyme et sa masse moléculaire sont déterminées par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence de SDS) et réductrices (présence de β -mercaptoéthanol) selon la méthode de Laemmli, (1970).

Le gel de séparation contient 10% de polyacrylamide et le gel d'alignement (de concentration 2%).

Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 100°C en bain-marie pendant 1 minute 30 secondes avec un tampon de solubilisation (Tris 0.62 M pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 2.5%, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0.01%).

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 14.4 KDa à 116 KDa (Fisher's EZ-RunTM Protein Marker). Les échantillons sont déposés à raison de 50

μl et de 10 μl pour les marqueurs de taille. La migration électrophorétique est réalisée grâce à un système «Bio-rad Laboratoires». La migration est menée à une intensité constante de 30 mA dans un tampon Tris 25 Mm pH 8.3, contenant 0.192 M de glycine et 0.1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique est achevée, les bandes protéiques sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. Avant la coloration le gel est traité par une solution trichloroacétique acide à 10% pendant 10 min pour fixer les bandes protéiques, puis coloré avec une solution de bleu de Coomassie R-250 à 0.4% pendant une nuit, et enfin décoloré avec de l'eau de robinet jusqu'à visibilité nette des bandes protéiques.

11.8. Le zymogramme

L'activité de la PGase est détectée par la réalisation d'un zymogramme selon la méthode de Ried et Collmer, (1985). Il consiste à faire migrer la solution d'isoenzymes PG1 et PG2 dans un gel de polyacrylamide dénaturant contenant 1% de PGA (acide polygalacturonique). Après coloration du gel avec une solution de bleu de Coomassie R-250, le gel est ensuite lavé avec le Triton X-100 2.5 % pendant 1 h, puis transféré dans une solution de tampon glycine-NaOH 50 mM, pH 10 pour l'isoenzyme PG1 et incubé à 65°C pendant 30 min. Pour l'isoenzyme PG2 le gel est transféré dans une solution de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5 et incubé à 75°C pendant 30 min. Le gel est ensuite coloré avec une solution de rouge de ruthénium à 0.02 % et lavé plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à l'apparition d'une zone incolore sur fond rouge du gel ce qui indique la présence d'une activité de la PGase.

12. Détermination du taux de glycosylation

Le taux de glycosylation ou la quantité de carbohydrates associés aux isoenzymes purifiées PG1 et PG2 est déterminée par la méthode de Dubois et al., (1956). La méthode est décrite précédemment. La coloration jaune orangé est mesurée à 490 nm par rapport à une gamme d'étalon de 100 $\mu\text{g/ml}$ maximum en mannose (Figure 12B). La quantité de carbohydrates est exprimée en quantité équivalente de mannose.

13. Analyse des produits d'hydrolyse par la chromatographie sur couche mince (CCM)

Les produits d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique par PG1 et PG2 purifiées sont analysés par CCM. L'élution est effectuée en utilisant le 1-butanol, l'acide acétique et l'eau dans les proportions 9 :4 :7 comme phase mobile (Contretas et Voget, 2004) et les acides galacturoniques sont détectés en utilisant de l'acide sulfurique à 10% dans l'éthanol absolu. Une solution d'acide monogalacturonique à 10 g/l est utilisée comme étalon.

14. Caractérisation des isoenzymes purifiées

Les deux fractions préalablement purifiées sont utilisées pour déterminer les propriétés suivantes: le pH optimal, la température optimale, la stabilité thermique, la stabilité au pH, l'hydrolyse de différents substrats, l'effet de quelques effecteurs et la cinétique enzymatique.

14.1. Influence du pH

L'étude de la variation de l'activité de la PGase en fonction du pH est menée à la température optimale de chaque fraction active pour une gamme de pH de 3.0 à 12.0. Quatre types de solutions tampons sont utilisés: tampon acétate de sodium 50 mM pour les pH de 3.0 à 5.0, le tampon phosphate 50 mM pour les pH de 6.0 et 7.0, le tampon Tris-HCl 50 mM pour pH 8.0 et le tampon glycine-NaOH 50 mM pour les pH de 9.0 à 12.0. L'optimum est déterminé en traçant l'activité de la PGase en fonction des pH pour chaque fraction active.

14.2. Effet de la température

L'influence de la température entre 10°C et 90°C au pH optimum de chaque fraction active avec un intervalle de 5°C est étudiée. L'optimum est déterminé en traçant la courbe de l'activité de la PGase en fonction de la température pour chaque fraction active.

14.3. Etude de la stabilité au pH

La stabilité au pH est déterminée à 4°C. Les échantillons sont portés à des pH compris entre 3.0 et 12.0 avec des tampons préalablement préparés aux différents pH. Après stockage à 4°C pendant 24 heures, les échantillons sont remis à pH 10 pour PG1 et à pH 5 pour PG2. L'activité résiduelle par rapport à l'activité enzymatique initiale est calculée

14.4. Etude de la stabilité thermique

La thermostabilité des deux fractions est menée au pH optimal de chaque isoenzyme, à différentes températures (60°C-80°C et 90°C) pour un intervalle de temps allant jusqu'à 5 heures, des prélèvements sont effectués chaque heure. L'activité enzymatique résiduelle (par rapport à l'activité de l'échantillon non traité) est déterminée.

14.5. Affinité des polygalacturonases vis-à-vis de différents substrats

Le dosage de l'activité de la PGase sur différents substrats : [pectine de citron (DM : 72%), pectine de pomme (DM : 67%), acide polygalacturonique (PGA), Carboxyméthylcellulose (CMC) et xylane] est réalisé afin de tester la spécificité de chaque isoenzyme. Les différents substrats sont testés à 1% à pH 10 pour PG1 et à 1% à pH 5 pour PG2.

14.6. Détermination des paramètres cinétiques des deux isoenzymes

Les paramètres cinétiques (V_m et K_m) des deux isoenzymes sont déterminés à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk en utilisant des concentrations de substrat de 1 à 20 mg/ml.

14.7. Action de différents métaux et réactifs chimiques

L'effet des réactifs chimiques (l'EDTA à 5 mM, l'urée à 5mM, glycérol à 5 mM, SDS à 0.1%, Tween 80 à 0.02%, Triton X -100 à 0.1%, β -mercaptoéthanol à 0.1% et DTT à 10 mM) et des ions métalliques à 2 mM (CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 , KCl et NaCl) et à 0.2 mM (CoCl_2 , HgCl_2 , FeCl_2 , CuCl_2 , BaCl_2 , CdCl_2 , SnCl_2) sur l'activité des isoenzymes purifiées est évalué. Le mélange enzyme-effecteur est incubé pendant 30 min à 30°C. L'activité de la PGase résiduelle des échantillons est calculée par rapport au contrôle (en absence d'effecteur).

15. Application des exo-polygalacturonases purifiées dans la clarification du jus de citron

Le citron est acheté du marché local de Constantine et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation. Le jus de citron est extrait en utilisant une presse citron. Cinq ml de citron frais sont mélangés avec 50 U (85 μ l) d'enzymes purifiées PG1 et PG2 ou 50 U (50 μ l) d'extrait

brut et incubés à 30°C pendant 4 heures (Tounsi *et al.*, 2016). L'activité de clarification est déterminée en mesurant les sucres réducteurs libérés dans le surnageant obtenu par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959), en pesant les pelletes résiduelles, en estimant l'augmentation du volume de jus clarifié et la couleur (A_{420}).

Chapitre 3

Résultats et discussions

Partie I : Isolement et identification des isolats de levures

La première partie de ces travaux de recherche est consacré à l'isolement de levures pectinolytiques de différents échantillons de sol de la région d'El-M'gheir Wilaya d'El-Oued, ayant des propriétés originales (thermostabilité et quantité) avec un potentiel d'application industrielle dans plusieurs secteurs comme les industries agroalimentaires, les biotechnologies (génie biologique) etc. Les micro-organismes producteurs d'enzymes pectinolytiques pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles sont de plus en plus recherchés.

1. Isolement des souches de levures

Au total, 20 souches de levures sont isolées et purifiées après une incubation de 3 à 7 jours sur le milieu YMA. Les isolats sont désignés selon un code composé de lettres et de numéros (Tableau 13).

Les sols ayant une profondeur de 50 cm de sol de palmeraies (dattier, olivier et vigne) et une profondeur de 20 cm de sol de steppe sont les plus peuplée en levures (Tableau 13) avec une prédominance dans les sols de palmeraies, 75% par rapport au sol de steppe, 25%. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le sol de palmeraie est légèrement riche en matière organique par rapport à l'écosystème steppique (Abdelaziz, 2006). De plus, dans le sol, l'estimation du nombre total de levures suggère qu'elle représente un nombre très faible 10^6 à 10^7 cellules/g de sol, comparé à celui des bactéries et des moisissures de l'ordre de 4×10^6 à 7×10^7 /g de sol (Walker, 2009 ; Starmer et Lachance, 2011).

Le métabolisme et la survie des levures du sol sont fortement influencés par la disponibilité en eau et en nutriments et par d'autres facteurs exogènes comme le pH, la température ou la disponibilité en oxygène (Botha, 2006). L'analyse du pH des échantillons de sol indique un pH neutre (pH 7.14 pour le sol de palmeraies et pH 7.55 pour le sol de steppe) favorisant plutôt une croissance rapide des bactéries aux dépens de celles des levures qui sont plutôt acidophiles (pH optimum entre 4.5 et 5.5) (Deak, 2006). Néanmoins, les levures peuvent tolérer une large gamme de pH et se développent dans une zone large de pH comprise entre 2 et 10 (Conterno *et al.*, 2006 ; Connell *et al.*, 2008).

Tableau 13: Isolats de levures obtenus à partir de différents échantillons de sol.

Origine et caractéristique du sol	Profondeur (cm)	Isolat
Sol de palmeraies, dattier	50	S1
Sol de palmeraies, dattier	50	S2
Sol de steppe	50	S3
Sol de palmeraies, dattier	40	S4
Sol de palmeraies, dattier	50	S5
Sol de palmeraies, olivier et vigne	50	S6
Sol de steppe	20	S7
Sol de steppe	20	S8
Sol de palmeraies, dattier	50	S9
Sol de palmeraies, dattier	20	S10
Sol de palmeraies, dattier	30	S11
Sol de steppe	20	S12
Sol de palmeraies, dattier	50	S13
Sol de palmeraies, dattier	50	S14
Sol de palmeraies, dattier	50	S15
Sol de palmeraies, dattier	50	S16
Sol de palmeraies, dattier	50	S17
Sol de palmeraies, dattier	50	S18
Sol de steppe	20	S19
Sol de palmeraies, dattier	50	S20

De plus, dans les habitats pauvres en matières nutritives, ne peuvent survivre que les levures capsulées (comme le genre *Cryptococcus*) et les formes sporulantes en raison de leur grande thermotolérance (Starmer et Lachance, 2011).

Par ailleurs, la levure *Aureobasidium pullulans* possède la propriété de biocontrôle vis-à-vis du développement de la vigne. La présence de cette espèce limite donc la croissance d'autres espèces de levures (De Felice *et al.*, 2008).

Le choix du biotope du sol n'est pas aléatoire mais basé sur des environnements particuliers (comme les milieux extrêmes du Sahara Algérien) qui peuvent abriter de nouvelles espèces, capables de résister à de telles conditions pour y survivre en produisant certainement de nouvelles molécules bioactives. Ces écosystèmes particuliers ont prouvé leur richesse en actinomycètes rares (Zitouni *et al.*, 2004 ; Boudjelal *et al.*, 2015), peu d'études décrivent des levures pouvant y survivre.

2. diversité des isolats de levures

La PCR et le séquençage des amplicons de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique sont réalisés sur 20 isolats. Dans le cas de la souche S6, l'identification est confirmée par le séquençage de l'ITS.

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences D1/D2 déposées dans la base de données GenBank en utilisant le programme BLASTN à travers le Centre National de l'information pour la Biotechnologie (NCBI). Les similitudes de séquences permettent de classer les 20 isolats de levures en 5 espèces : *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* et *Yarrowia lipolytica* (Tableau 14). L'alignement des séquences est mentionné en Annexe 3. Par ailleurs, une copie des souches isolées est déposée dans la collection des levures industrielles DBVPG (Perugia, Italie) attributaires d'un numéro d'accession (<http://www.dbvpg.unipg.it>).

Tableau 14: Résultats du séquençage des amplicons obtenus après PCR, de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S, et de l'ITS pour la souche S6, et comparaison aux séquences de la base de données GenBank.

Code de la souche	Espèces	Similarité %	Classification des levures
S1	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99%	Ascomycètes
S2	<i>Cryptococcus magnus</i>	100%	Basidiomycètes
S3	<i>Cryptococcus magnus</i>	100%	Basidiomycètes
S4	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99%	Ascomycètes
S5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100%	Yeast like organisms
S7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S9	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S10	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S13	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100%	Ascomycètes
S14	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S15	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S16	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S17	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100%	Ascomycètes
S18	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S19	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	Ascomycètes
S20	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100%	Ascomycètes

L'isolement de *Clavispora lusitaniae* du sol des palmeraies est en accord avec leur fruit puisque cette espèce se trouve couramment sur la peau de dattes (Lachance *et al.*, 2003). En effet, la niche écologique de *Clavispora lusitaniae* est mal définie. Bien que cette espèce a été principalement isolée de végétaux et des aliments (Rao *et al.*, 2008 ; Ceugniz *et al.*, 2015).

La présence de *Cryptococcus magnus* dans le sol n'est pas étonnante car les espèces du genre *Cryptococcus* sont fréquemment isolées à partir des échantillons de sol (Botha, 2006 ; Buzzini et Margesin, 2014). L'espèce *Cryptococcus magnus* se trouve principalement en association avec des plantes (principalement les fleurs mais également les feuilles ou les fruits), dans le monde entier (Fonseca *et al.*, 2011). La même souche est décrite par plusieurs études : dans la rhizosphère en Corée, dans les feuilles d'hibiscus en Taiwan (Yang et Wang, 2003) et dans le sol des forêts alluviales en Autriche (Wuczkowski *et al.*, 2005).

La levure *Meyerozyma guilliermondii* est en adéquation avec sa présence dans les échantillons de sol de steppe et de sol de palmeraies car c'est une espèce ubiquitaire, elle est isolée à partir de fruits, de fleurs et d'autres produits alimentaires (Kurtzman, 2011). Sa présence dans les échantillons de sol de palmeraies peut s'expliquer par le dépôt de dattes dans le sol qui exercent donc un effet sur sa distribution.

Yarrowia lipolytica est une autre espèce de levure omniprésente, se développant dans les sols et les effluents (Barnett *et al.*, 2000). Elle est isolée également à partir de matières riches en lipides et en protéines telles que les fromages et autres produits laitiers (Lopandic *et al.*, 2006), les saucisses (Gardini *et al.*, 2001), la viande et les produits carnés (Sanz *et al.*, 2005), les environnements pétroliers et marins (Chi *et al.*, 2007, Hassanshahian *et al.*, 2012) et également dans les eaux hyper-salines comme la mer Morte et le grand lac salé de l'Utah, USA (Butinar *et al.*, 2005).

La présence de la pseudo-levure *Aureobasidium pullulans* (yeast-like organisms) dans le sol de palmeraies (olivier et vigne) est expliquée par le fait que cette levure est cosmopolite et osmotolérante, isolée dans différentes niches écologiques (sol, débris de plantes, fruits, sédiments marins, eaux polluées) (Raspor et Zupan, 2006 ; Oliveira *et al.*, 2009 ; Selbmann *et al.*, 2014). L'une des caractéristiques de cette levure est la production de mélanine, substance responsable à la survie des cellules face aux stress environnementaux (Sterflinger, 2006) en plus, de sa capacité de biocontrôle vis-à-vis d'autres espèces de levure (De Felice *et al.*, 2008).

3. Etude morphologique, physiologique et biochimique des souches représentatives

Les caractéristiques culturelles, morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats sont déterminées selon les méthodes décrites par Kurtzman *et al.*, (2011).

3.1. Caractères cultureux

Après une croissance de 3 jours à 25°C sur milieu YPGA, toutes les souches possèdent la forme ronde, le contour régulier, la surface lisse est bombée (Tableau 15). Cependant, des différences d'aspects sont notées chez *A. pullulans* qui forme des colonies plates, alors que *Y. lipolytica* qui a des colonies alambiquées mattes (Tableau 15). Ces caractères concordent très bien avec ceux décrits dans la littérature (Kurtzman *et al.*, 2011).

La croissance des isolats de levures en milieu YPG liquide se manifeste de façon différente. Après 14 jours d'incubation à 25°C, on voit apparaître un dépôt qui renseigne sur la masse cellulaire chez l'ensemble des souches isolées (Tableau 15). La formation de l'anneau en surface est observée uniquement chez les espèces *M. guilliermondii* et *A. pullulans*. En revanche, chez la souche *Y. lipolytica* une pellicule nappant la paroi du tube est repérée, correspondant certainement à des cérébrosides (glucosylcéramides) produits par cette souche décrits par Rucic et Maric en 2004.

3.2. Caractères morphologiques

La morphologie des cellules est variable d'une souche à une autre (Tableau 16). Elle est subglobeuse à ovoïde allongée chez *C. lusitaniae*, ovoïde allongée chez *M. guilliermondii*, globuleuse chez *C. magnus*, sphérique à ellipsoïdale allongée chez *Y. lipolytica* et ellipsoïdale chez *A. pullulans*. Le mode de reproduction végétative se fait par bourgeonnement pour la totalité des souches. Il est monopolaire chez *C. magnus*, bipolaire et multilatéral chez *A. pullulans* et multilatéral chez *C. lusitaniae*, *M. guilliermondii* et *Y. lipolytica* (Tableau 16). Le test de filamentation révèle la présence de pseudomycélium chez toutes les souches excepté pour *C. magnus*. Par contre, on observe chez *A. pullulans* des hyphes végétatifs hyalins, transversaux septés transformant en chlamydozoïdes pour former ensuite un mycélium.

Tableau 15: Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPGA à 25°C. (+ : présence ; - : absence).

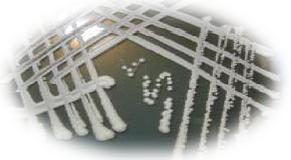
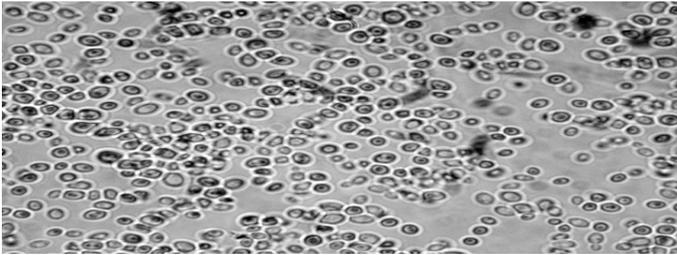
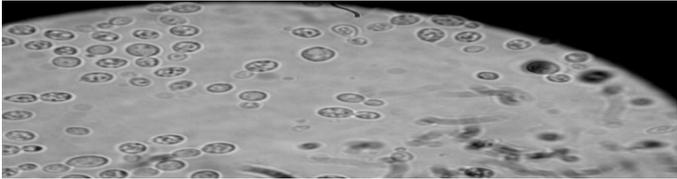
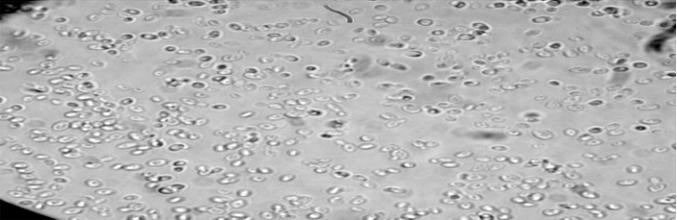
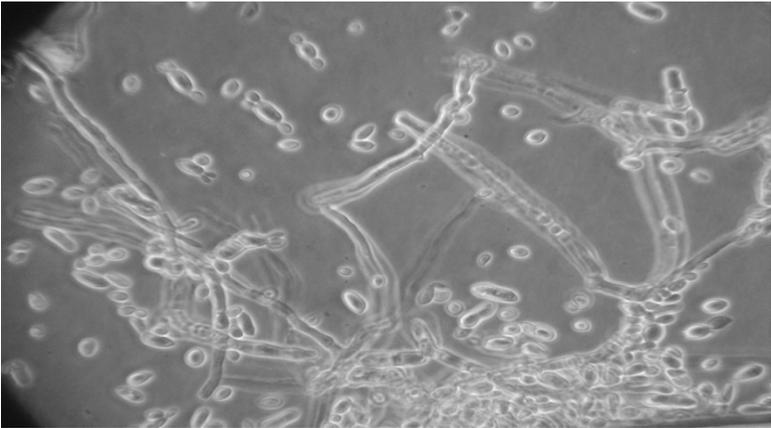
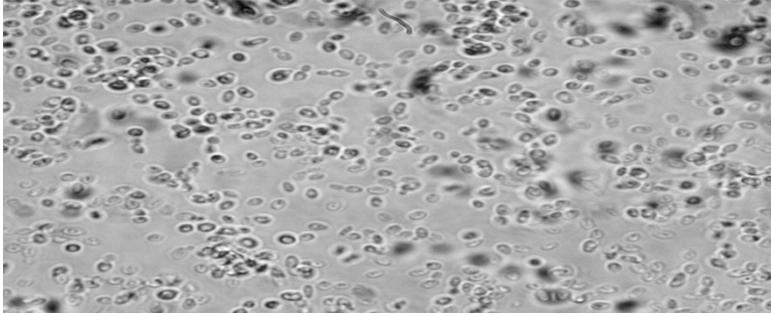
Code des souches	Espèces	Caractères cultureux sur milieu solide	Caractères cultureux sur milieu liquide			Vue d'ensemble de la boîte
			Dépôt	Anneau	Pellicule	
S1 ; S4	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Colonies rondes blanches, crémeuses, lisses, bombées d'aspect brillant.	+	-	-	
S2 ; S3	<i>Cryptococcus magnus</i>	Colonies rondes marron, mucoïdes, lisses, bombées modérément brillantes.	+	-	-	
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12 ; S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Colonies rondes blanches, crémeuses, lisses, bombées à centre élevé d'aspect brillant.	+	+	-	
S6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Colonies plates roses, lisses, mucoïdes, recouvertes d'un excudat visqueux.	+	+	-	
S13; S17; S20	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Colonies rondes blanches, alambiquées, mattes, veloutés avec surface plissées, bombées.	+	-	+	

Tableau 16: Caractères morphologiques des souches de levures cultivées sur YPG pendant 3 jours à 25°C.

Code des souches	Espèces	Caractères morphologiques	Aspect microscopique (grossissement x 40)
S1 ; S4	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Cellules subglobuleuses à ovoïdes allongées. Cellules séparées ou en paires. Bourgeonnement multilatéral. Présence de pseudomycélium.	
S2 ; S3	<i>Cryptococcus magnus</i>	Cellules globuleuses. Bourgeonnement monopolaire. Absence de pseudomycélium.	
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12, S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Cellules ovoïdes allongées. Bourgeonnement multilatéral. Présence de pseudomycélium.	

S6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<p>Conidies hyalines unicellulaires, ellipsoïdales, de forme et de taille variable.</p> <p>Hyphes végétatifs hyalins, transversaux septés transformant en chlamydospores formant un mycélium.</p> <p>Elle se développe comme levure bourgeonnante (bipolaire et multilatéral) et comme un mycélium.</p> <p>Présence de vrai mycélium.</p>	
S13; S20	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<p>Cellules sphériques, ellipsoïdales allongées.</p> <p>Bourgeoisement multilatéral.</p> <p>Présence de pseumycélium.</p>	

3.3. Caractères biochimiques et physiologiques

Pratiquement toutes les souches isolées sont capables d'assimiler les glucides testés à l'exception de la souche *C. lusitaniae* qui n'assimile pas le lactose et le raffinose. L'assimilation de sources azotées est positive pour la plupart des souches à l'exception de la souche *C. magnus* qui n'assimile pas le nitrite (Tableau 17).

Tableau 17: Résultats des tests d'assimilation des glucides et des sources azotées des souches de levures isolées.

Code des souches	Caractères physiologiques								
	Assimilation des glucides							Assimilation des sources azotées	
	D-Glu	D-Gal	D-Sac	D-Mal	α, α Tré	Lac	Raf	Nitrate	Nitrite
S1 ; S4	+	+	+	+	+	-	-	+	+
S2 ; S3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12, S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S13; S17; S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(D-Glu) : D-Glucose ; (D-Gal) : D-Galactose ; (D-Sac) : D-Saccharose ; (D-Mal) : D-Maltose ; (α, α Tré) : α, α Tréhalose ; (Lac) : Lactose ; (Raf) : Raffinose. (+) : assimilation positive ; (-) : pas d'assimilation.

Tableau 18: Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures.

Code des souches	Fermentation de sucres				
	Glu	Gal	Mal	Sac	Lac
S1 ; S4	+	-	-	+/F	+/F
S2 ; S3	-	-	-	-	-
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12, S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	+	-	-	+	-
S6	+/F	-	-	-	-
S13; S17; S20	-	-	-	-	-

(+ : fermentation positive ; - : pas de fermentation ; F : faible fermentation).

L'ensemble des résultats de fermentation des glucides sont regroupés dans le tableau 18. Uniquement les souches *C. lusitaniae* et *M. guilliermondii* sont capables de fermenter le glucose alors que la souche *A. pullulans* le fermente faiblement. En revanche, les souches *C. magnus* et *Y. lipolytica* ne fermentent aucun des glucides testés (Tableau 18).

La température est l'un des facteurs les plus importants qui agit à la fois sur la croissance des levures et sur la capacité à produire des métabolites. Les souches *C. magnus* et *A. pullulans* sont incapables de se développer à 37°C et 40°C (Tableau 19). Par contre, toutes les souches poussent sur un milieu contenant 5%, ou 10% de NaCl et tolèrent même une concentration de 20%. Ces caractéristiques de croissance permettent de classer ces levures parmi les micro-organismes thermophiles halophiles modérés (Buzzini et Margesin, 2014).

Tableau 19: Effet de la température et de la croissance à différentes concentrations de NaCl des levures isolées.

Code des souches	Croissances à différentes températures (°C)								Tolérance au stress osmotique NaCl (%)		
	4	10	20	25	30	35	37	40	5	10	20
S1 ; S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2 ; S3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12, S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
S13; S17; S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : croissance ; (-) : absence de la croissance.

Cette capacité d'adaptation aux différentes températures pourrait être expliquée par les théories énoncées par Dix et Webster, (1995) qui reposent essentiellement sur deux points :

- Le renouvellement rapide des acides gras de la membrane. A des températures élevées, il y aurait une synthèse rapide des acides gras saturés qui remplaceraient les acides gras insaturés membranaires. A basses températures, il y aurait l'effet contraire.
- La thermostabilité des protéines levuriennes reposent sur de nombreuses évidences expérimentales qui prouvent la synthèse des protéines thermostables issus du métabolisme des levures thermophiles et thermotolérantes, et en particulier de leurs enzymes thermostables (Fisher *et al.*, 1995).

Au cours de cette investigation, l'ensemble des caractéristiques observées sont similaires à celles signalées dans la littérature (Kurtzman *et al.*, 2011) et concordent avec l'identification génomique basée sur le séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S des souches de levures isolées.

3.4. Criblage de souches de levures isolées productrices d'activités hydrolytiques extracellulaires

Tableau 20: Mise en évidence de quelques activités hydrolytiques extracellulaires des souches de levures isolées.

Code des souches	Espèces	Activités hydrolytiques extracellulaires						
		Pectinase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase	Cellulase	Uréase
S1 ; S4	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
S2 ; S3	<i>C. magnus</i>	-	-	-	-	-	-	-
S5 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 ; S11 ; S12, S14 ; S15 ; S16 ; S18 ; S19	<i>M. guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-
S6	<i>A. pullulans</i>	+	+	+	+	+	-	-
S13; S17; S20	<i>Y. lipolytica</i>	-	-	-	+	+	-	-

(+) : productrice d'enzyme ; (-) : non productrice d'enzyme.

L'examen du tableau 20 montre que :

- ✓ La production d'activités hydrolytiques (pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique et estérasique) est uniquement observée chez la levure *A. pullulans*.
- ✓ Cependant, aucune activité enzymatique est observée chez les souches *C. lusitaniae* et *C. magnus*.
- ✓ En revanche, *M. guillermondii* et *Y. lipolytica* sont uniquement dotées d'activités lipolytique et estérasique.

La présente étude révèle le potentiel des levures isolées des environnements arides pour produire une large gamme d'enzymes extracellulaires. Les observations ci-dessus décrivent des perspectives intéressantes, démontrant que les levures isolées des milieux arides représentent réellement une source de plusieurs enzymes potentiellement exploitables à des fins biotechnologiques. Par ailleurs et pour la suite de l'étude, on a opté pour la souche (S6) *Aureobasidium pullulans* pour sa capacité à produire des enzymes pectinolytiques.

3.5. Caractéristiques et propriétés d'*Aureobasidium pullulans*

3.5.1. Caractères macroscopiques

Sur milieu MEA, YMA et PDA (Annexe 1), *A. pullulans* a une croissance relativement rapide. Les colonies sont plates, lisses, brillantes, levuriformes, et recouvertes d'un exsudat visqueux. La surface est de couleur rose pâle sur milieu MEA et YMA et jaune sur milieu PDA. Les colonies deviennent noires avec le vieillissement, au-delà de 7 jours (Figure 17).

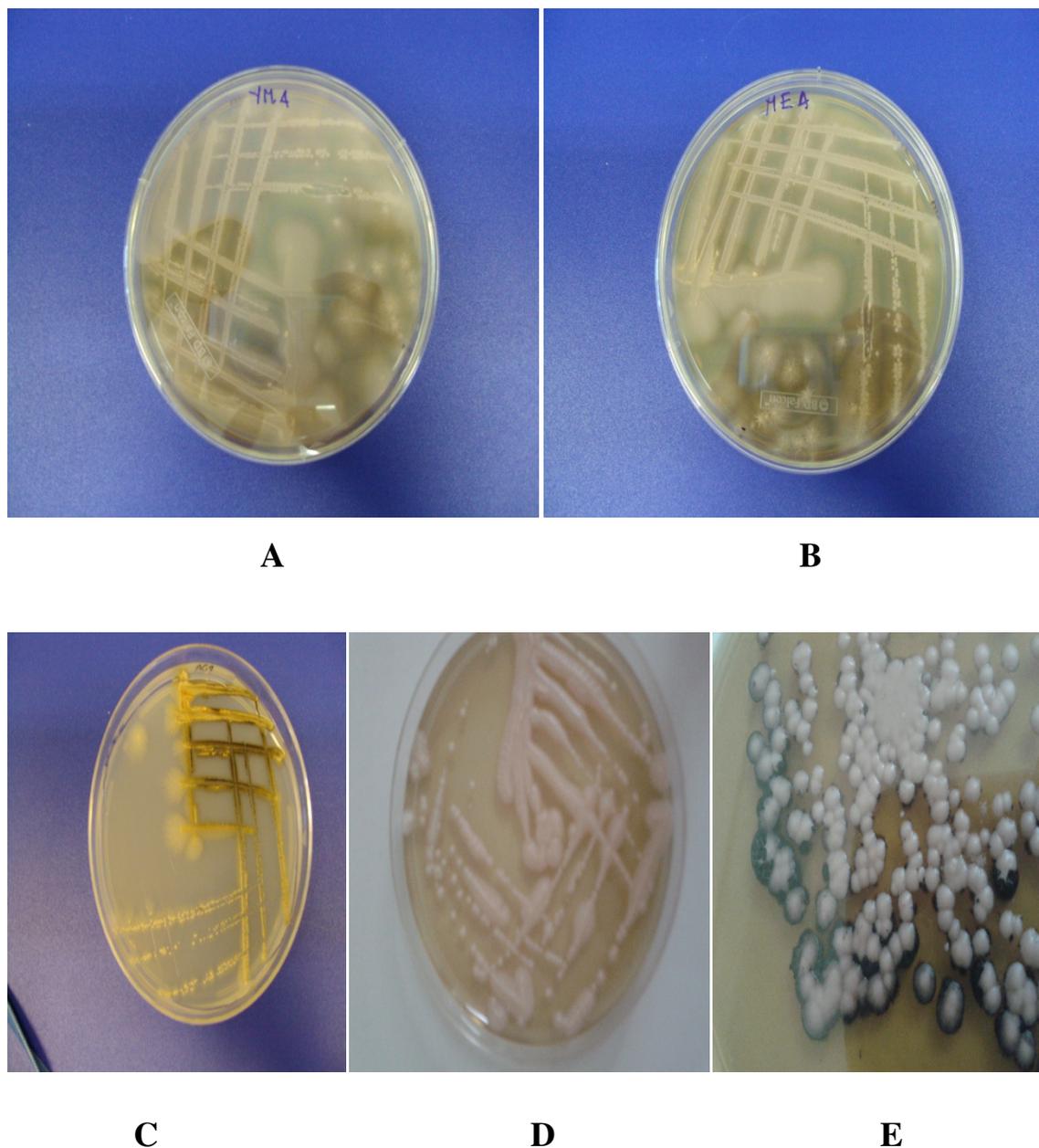


Figure 17: Caractères morphologiques de la souche S6 *Aureobasidium pullulans*. **A** : croissance d'*A. pullulans* sur milieu YMA, **B** : croissance d'*A. pullulans* sur milieu MEA, **C** : croissance d'*A. pullulans* sur milieu PDA, **D** : croissance d'*A. pullulans* sur milieu YPGA, **E** : couleur des colonies après vieillissement sur milieu YPGA.

3.5.2. Caractères microscopiques

Plusieurs types de morphologie peuvent être rencontrés chez la souche (S6) *Aureobasidium pullulans* sur milieu YPGA : des hyphes végétatifs de 3 à 12 μm de large, septés, hyalins (incolores) au départ et devenant brun noirâtre avec l'âge. Certains filaments présentent une paroi plus épaisse et bien foncée produisant des arthroconidies puis des chlamydoconidies en vieillissant. Les blastoconidies, sont unicellulaires (de 7 à 16 μm x 3,5 μm), de forme ovale, ellipsoïdale, hyalines (Figure 18). La souche (S6) *A. pullulans* a une reproduction asexuée par bourgeonnement bipolaire et multilatéral (Figure 18 A). Sur le milieu Corn meal agar CMA (Annexe 1), les pseudomycéliums et les vrais mycéliums sont notamment observés (Figure 18C).

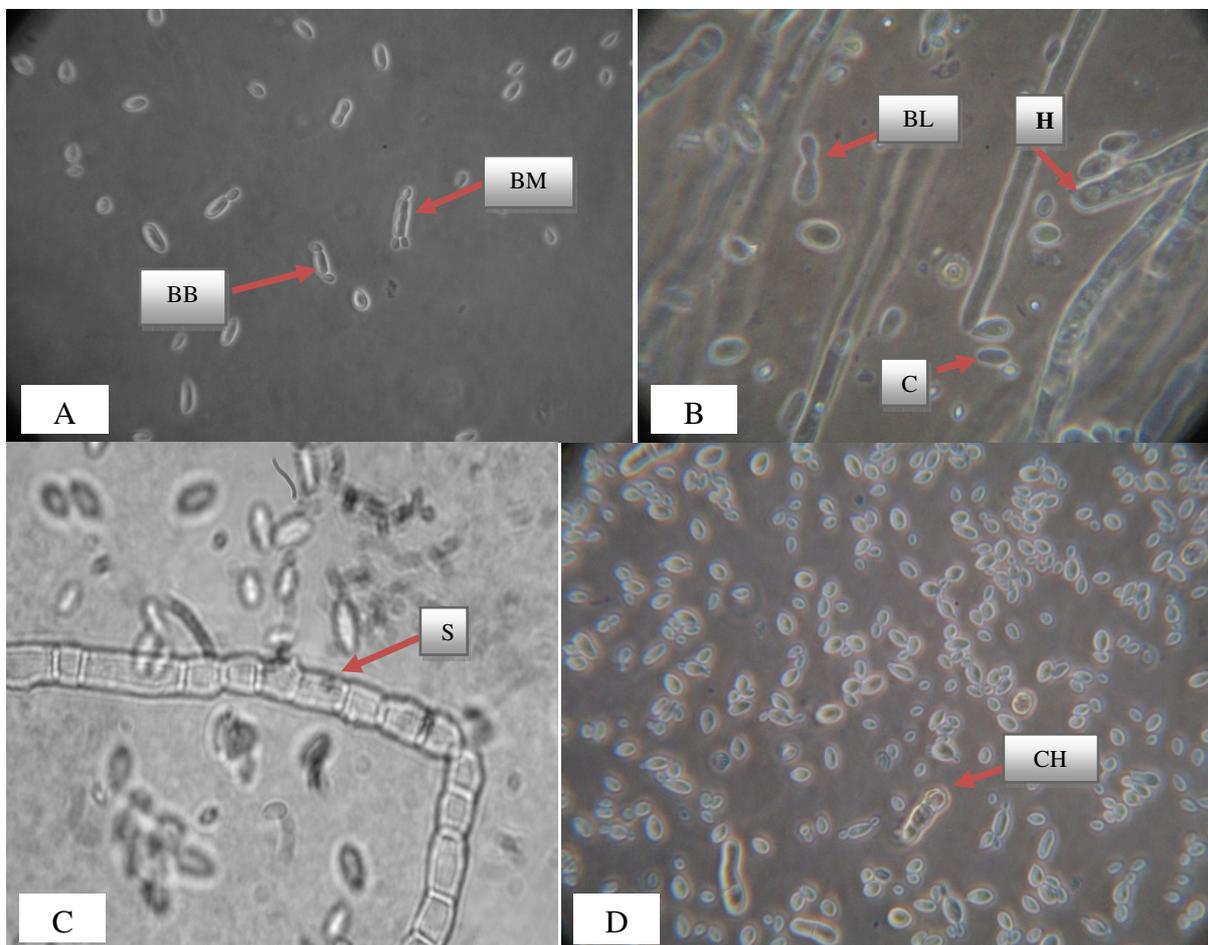


Figure 18: Morphologie microscopique de la souche (S6) *A. pullulans*. Culture sur milieu YPGA et CMA. (A) : **BM** : bourgeonnement multilatéral, **BB** : bourgeonnement bipolaire ; (B) : **C** : conidie, **BL** : blastoconidie, **H** : hyphes avec de longues cellules conidiogènes latérales ; (C) : **S** : hyphe avec des septa (vrai mycélium) ; (D) : **CH** : chlamydoconidies.

3.5.3. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ARNr 26S et de l'ITS

La séquence du gène codant pour l'ARNr 26S de la souche S6 présente 100% d'identité nucléotidique avec les séquences des souches types disponibles dans les bases de données (Figure 19 A). Par ailleurs, le séquençage de l'ITS (espaceurs internes ITS1 et 2 y compris le gène de l'ARNr 5.8S) permet d'augmenter les connaissances sur la phylogénie de l'espèce *A. pullulans* et d'affilier la souche S6 (*A. pullulans* DBVPG5844) isolée de sols de palmeraies (olivier et vigne) à cette espèce. Elle présente 100% d'identité nucléotidique avec la séquence de la souche type *Aureobasidium pulluans* CBS 584.75 (Figure 19 B).

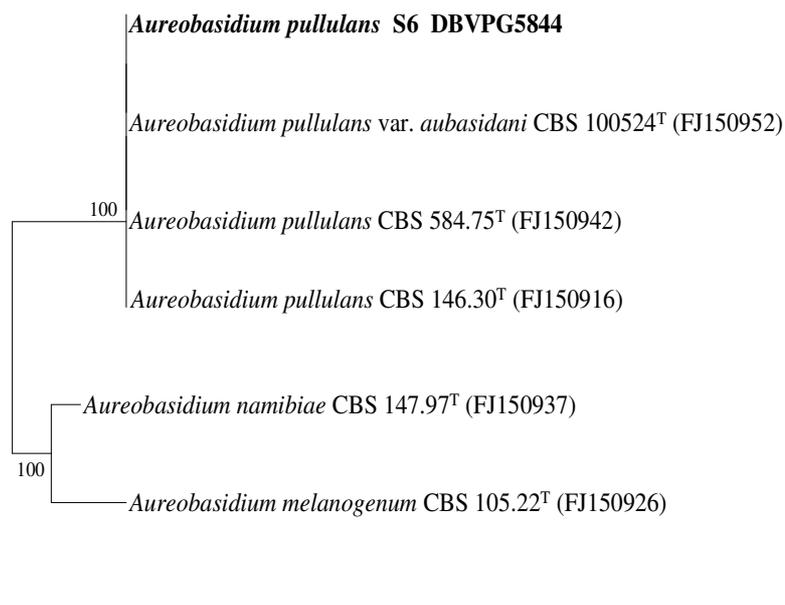


Figure 19 A: Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) basé sur l’alignement de 550 pb des séquences nucléotidique de LSU. Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements. La souche isolée est indiquée en gras. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l’espèce.

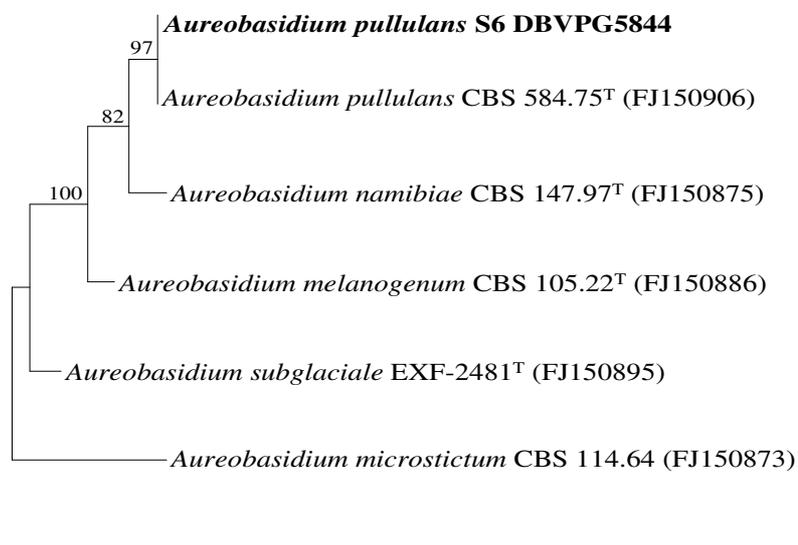
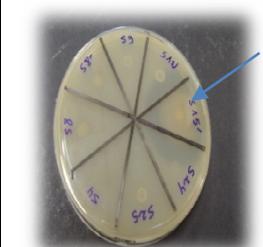
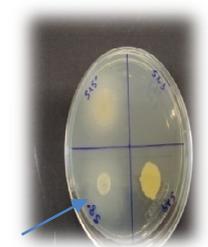
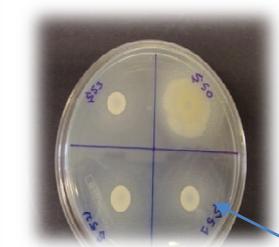


Figure 19 B: Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) basé sur l’alignement de 550 pb des séquences nucléotidiques de l’ITS (espaceurs internes ITS1 et 2 y compris le gène de l’ARNr 5.8S). Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements. La souche isolée est indiquée en gras. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l’espèce.

3.5.4. Production de pectinase et d'autres enzymes hydrolytiques extracellulaires par la souche (S6) *A. pullulans*

Tableau 21: Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires chez la souche (S6) *A. pullulans*.

Activités hydrolytiques extracellulaires				
Pectinase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase
				

La levure S6 soit *A. pullulans* s'est bien développée sur des milieux contenant de la pectine, de l'amidon, du lait écrémé, de la tributyrine et du Tween 80 comme unique source de carbone (Tableau 21). Ce fait signale sa capacité à produire des pectinases, des amylases, des protéases, des lipases et des estérases (Tableau 21). Au vu de l'importance technologique de ces enzymes, les recherches se sont axées sur la production de pectinases.

Conclusion partielle

La souche S6 isolée des sols de palmeraies (olivier et vigne) est affiliée à l'espèce *Aureobasidium pullulans* et produit cinq enzymes : pectinase, amylase, protéase, lipase et estérase. Par sa performance dans la production de pectinase, cette levure sera sélectionnée pour la suite des travaux sur la production d'enzymes pectinolytiques par culture en batch et leurs purifications et caractérisations.

Partie II : Optimisation et production de la Polygalacturonase (PGase) en Erlen-meyers et en fermenteur

4. Déchets de tomates substrat de fermentation

4.1. Etude de la composition chimique des déchets de tomates

La tomate (*Lycopersicum esculentum*) est le deuxième légume produit au monde, soit une production mondiale totale de 170 million de tonnes (Faostat, 2017). Elle occupe une place importante dans l'alimentation mondiale et les pays situés au sud du bassin méditerranéen dont l'Algérie avec une production de 1065609 tonnes en 2014 (Faostat, 2017).

La filière de la tomate industrielle génère un volume important de déchets, évalué entre 10 et 40% selon Strati et Oreopoulou, (2011) et entre 3 et 7% de la matière première selon Van Dyk et al., (2013). D'après ces mêmes auteurs, les déchets de tomates peuvent atteindre plus de 10 millions de tonnes à l'échelle mondiale. Ils se composent de 33% de graines, 27% de peaux et 40% de pulpe en plus de tomates vertes non transformées, parfois mélangés à des feuilles. Les déchets de tomates séchés renferment 44% de graines et 56% de peaux et de pulpe (Sogi et Bawa, 1998). En Algérie, il n'y a pas de statistiques officielles pour évaluer le volume de ces déchets mais, d'après nos estimations ils peuvent dépasser la quantité de 160 000 tonnes par an. La plupart du temps, ils sont mis en décharge et parfois ils sont utilisés en alimentation animale. Les déchets de tomates sont une excellente source de caroténoïdes et de pectines (Grassino *et al.*, 2016). La majorité des travaux réalisés avec ce sous-produit se sont focalisés sur ces pro-vitamines (lycopène et β -carotène), en composés phénoliques (Strati et Oreopoulou, 2014) et en pectine (Grassino *et al.*, 2016).

Les résultats des principaux composants des déchets de tomates de cette étude sont résumés dans le tableau 22 qui va suivre.

Tableau 22: composition de déchets de tomates par rapport à 100% au poids sec.

Paramètres	Pourcentage
Matière sèche	92%
Cendres	5.83%
Protéines	18.31%
Matières grasses libres	1.19%
Sucres totaux	20.25%
pH	4.60

Il ressort du tableau 22 que les déchets de tomates sont relativement riches en matière minérale 5.83%, en protéines 18.31% et en sucres totaux 20.25%. Par contre, ils sont pauvres en matière grasse 1.19%. La valeur de 20.25% en sucres totaux solubles est faible par rapport à celle rapportée par Alvarado et al., en 2001 (59,07%), par Del Valle et al., en 2006 (25.73%) et par Grassino et al., en 2016 (23.8%) et légèrement supérieure à celle obtenue par Belmessikh, en 2011 (13.85%). Cela s'explique par le fait que les glucides présents dans les résidus de tomates sont principalement des fibres dont une proportion élevée (40.54%) est constituée de fibres insolubles (Alvarado *et al.*, 2001).

La teneur en protéines totales de 18.31% corrobore les résultats de Denek et Can, (2006), de Del Valle et al., (2006) qui annoncent une moyenne de 19%. Al-Wandawi et al., (1985) rapportent également une teneur très élevée en protéines (~ 40% dans les graines et environ 11% dans la peau). Cependant, Antunes et al., (2017) rapportent une faible teneur en protéines totales de l'ordre de 4.3% dans les déchets de tomates dépourvus de peaux et de graines. Les échantillons de déchets de tomates (saison 2012), par leurs apports en carbohydrates et en protéines favorisent la croissance et la production d'enzymes. De plus, la présence de pectine dans le substrat induit la production des pectinases (Grassino *et al.*, 2016).

Le taux élevé des cendres 5.83% est proche des valeurs trouvées par Jafari et al., (2006) et Boukhalifa, (2015) de 4,24% et 6,52%, respectivement. Ils citent une prédominance des minéraux suivants : K, P, Mg, Ca, Na et Cl, oligo-éléments nécessaires à toute culture microbienne.

La teneur en matières grasses de 1.19% est relativement faible par rapport à celle trouvée par Labeille, (1997) et par Boukhalifa, (2015) qui indiquent une moyenne de 11.51% ; alors que Del Valle et al., (2006) rapportent une valeur de 5.85%. Cette différence peut être expliquée par le fait que les déchets de tomates sont composés de faible quantité de graines.

Selon Knoblich et al., (2005) les gaines de tomates présentent une forte teneur en matière grasse.

La valeur du pH de 4.6 de l'échantillon représente la gamme de pH typique (3.8 – 4.3) rapporté par plusieurs études (Sobowale *et al.*, 2012 ; Antunes *et al.*, 2017). Cette valeur de pH convient pour la croissance de la plupart des levures et empêche la croissance d'un certain nombre de micro-organismes pathogènes susceptibles de contaminer les déchets de tomates et donc diminuer leur valeur nutritive.

En effet, ces variations dans la composition des déchets de tomates sont liées directement à la variété, aux conditions de cultures, à l'environnement, au mode d'extraction, les conditions climatiques et la technique d'analyse utilisée (Grassino *et al.*, 2016).

4.2. Détermination de la concentration optimale du substrat

Parmi les activités pectinolytiques, uniquement l'activité de la polygalacturonase (PGase) est mise en évidence, les autres activités pectine lyase ou pectinestérase ne sont pas produites par la souche (S6) *A. pullulans*. La PGase a la particularité d'être utilisée dans la clarification des jus de fruits et de légumes et dans l'élaboration du vin sans la libération du méthanol toxique (Taskin, 2013). Elle est également utilisée dans l'extraction de l'huile d'olive et des huiles essentielles et des pigments caroténoïdes à partir des écorces d'agrumes. Les PGases sont aussi appliquées en papeterie et en textile (Kashyap *et al.*, 2001).

Un des paramètres les plus importants dans les systèmes de fermentation est la concentration du substrat utilisé. Dans cette étude, l'activité de la PGase la plus élevée (1.9 UI/ml) est produite par *A. pullulans* dans un milieu contenant 4% de déchets de tomates (Figure 20). Ce résultat corrobore celui de Belmessikh et al., (2013) pour la production de protéase neutre par la moisissure *Aspergillus oryzae*. Par ailleurs, Freixo et al., (2008a) préconisent l'utilisation de 2% de déchets de tomates pour la production d'une laccase et d'une xylanase par la moisissure *Coriolus versicolor*. L'étude de production d'une xylanase par Katapodis et al., (2006) basée sur un plan composite centré a donné des optima de 4,6% des épis du maïs et de 2,1% de farine des graines de tomates.

La comparaison de la production de la PGase dans le milieu de base avec différente concentration est effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA). L'analyse statistique (ANOVA) (Tableau 1 en Annexe 4) montre que la concentration des déchets de tomates a un effet significatif sur la production de la PGase. Le test de Fisher est hautement significatif [$F = 14,2310$; $P=0.000109$] ; ce qui indique que la production de la PGase est influencée par la

concentration de substrat. D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, il ressort que le taux 4 % de déchets de tomates est la concentration optimale pour la production de la PGase.

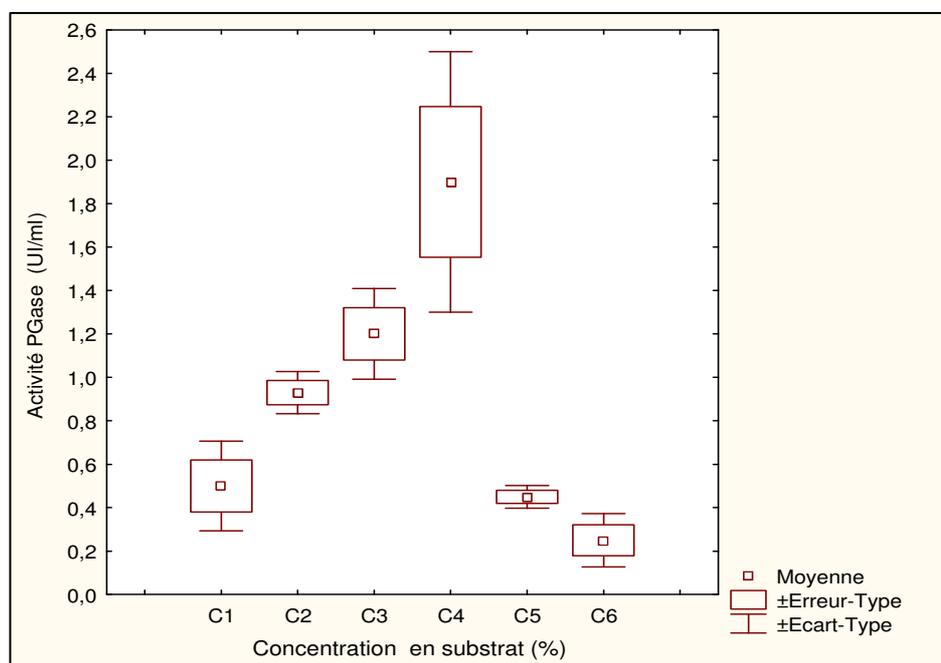


Figure 20: Effet de la concentration du substrat sur la production de la PGase par la souche (S6) *A. pullulans*.

Au vu des résultats obtenus, une étude comparative de la production de la PGase de la levure *Aureobasidium pullulans* est réalisée sur deux milieux différents : milieu M1 (Milieu YPG + 1% de pectine de citron) et sur milieu MB (milieu de base) avec une concentration de 4% en déchets de tomates. La figure 21 indique qu'une production optimale en PGase soit 4.82 UI/ml est obtenue sur le milieu de base (MB) après 72 h de culture. Comparée à d'autres souches de la même espèce, la souche S6 produit une quantité de PGase 3 fois plus importante par rapport à la souche *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311 (CCY 27-1-98) qui croit sur un milieu synthétique après 47h de fermentation: 3.5 UI/ml vs 1.15 UI/ml (Biely *et al.*, 1996). Cependant, la culture de la moisissure *Aspergillus fumigatus* (sur un milieu synthétique contenant 2% de pectine de citron et 2% de glucose), produit une quantité légèrement supérieure : 4.31 UI/ml contre 9 UI/ml après 96 h d'incubation (Sandri *et al.*, 2015).

Il advient donc d'améliorer davantage cette production par une supplémentation du milieu de base (déchets de tomates) en source carbonée (voir plus loin) ce qui permet d'avoir

un ratio C/N favorable à la production d'enzymes. Sharma et Satyanarayana, (2006) préconisent un rapport C/N de 11 pour une production maximale en PGase.

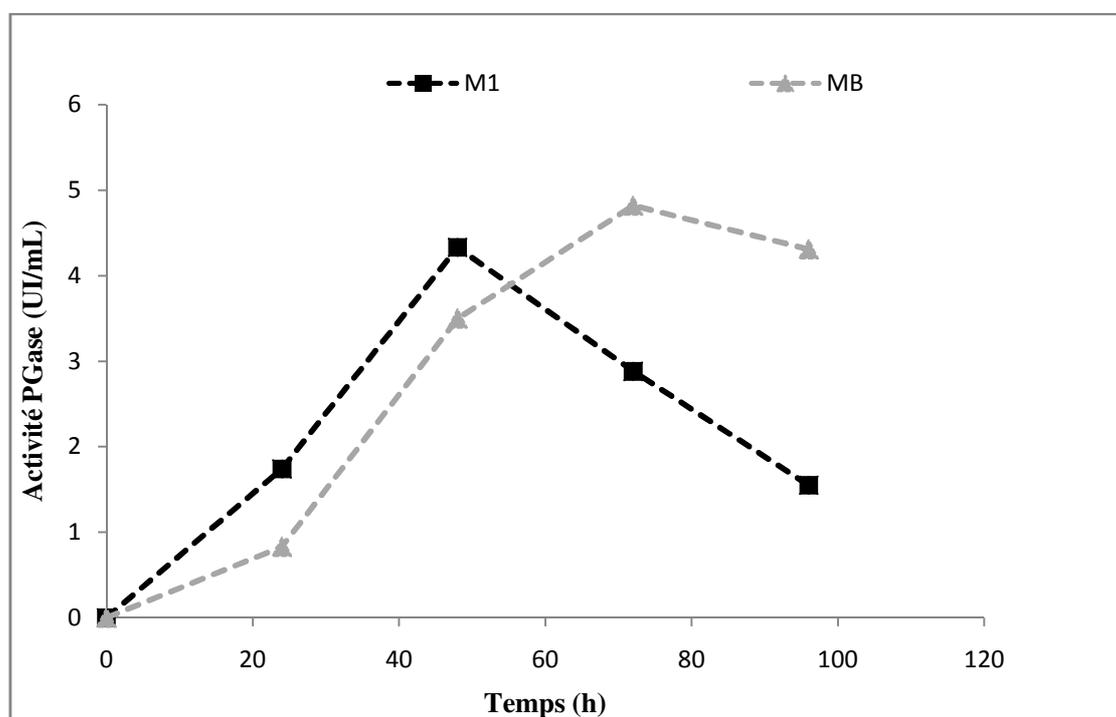


Figure 21: Comparaison de la production de la PGase par la souche (S6) *Aureobasidium pullulans* sur milieu YPG + 1% pectine de citron (M1) et sur milieu de base (MB) à 4% de déchets de tomates.

4.3. Effet de la source carbonée sur la production de la polygalacturonase d'*Aureobasidium pullulans*

Huit sources carbonées à la concentration de 1% (w/v) sont testées pour leur influence sur la production de la PGase par la souche (S6) *A. pullulans*. La production de l'enzyme est affectée par la nature du sucre [F = 9,2703; P=0]. D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, il ressort que le lactose est la meilleure source carbonée (Tableau 2 en Annexe 4). Les activités maximales sont obtenues en présence du lactose (6.81 UI/ml) (provoquant une augmentation de 642%), du galactose (6.16 UI/ml), de l'acide galacturonique (6.11 UI/ml), du lactosérum (5.16 UI/ml), du glucose (4.96 UI/ml), de l'acide polygalacturonique (4.16 UI/ml) et de la pectine de pomme (3.46 UI/ml) après 24 heures de fermentation (Figure 22). Cependant, la pectine de citron induit peu la production de la PGase. La synthèse de la PGase suit l'ordre suivant (Figure 22) :

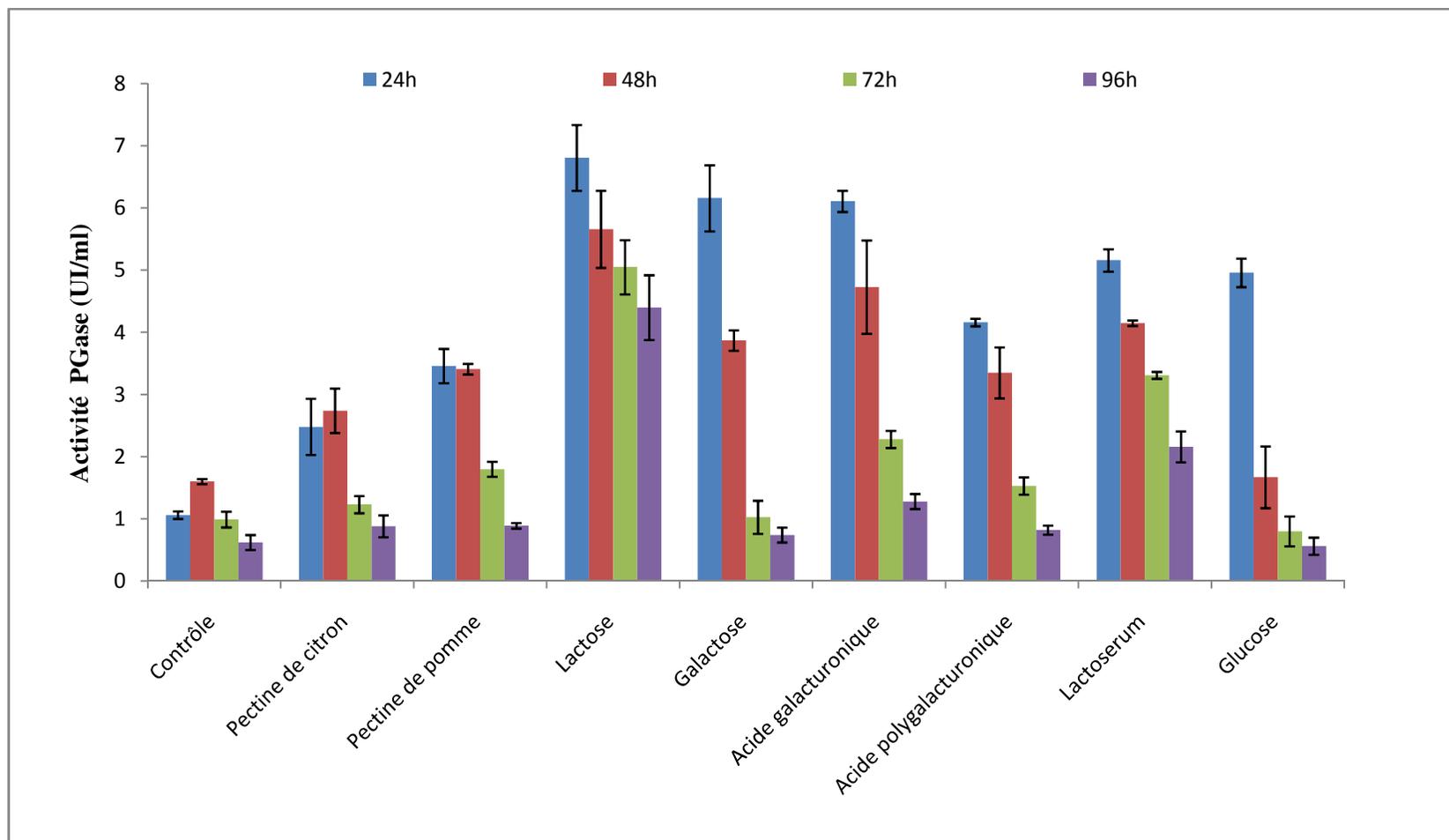


Figure 22: Effet de la source carbonée sur la production de la PGase d'*A. pullulans* (S6).

lactose > galactose = l'acide galacturonique > lactosérum = glucose > l'acide
polygalacturonique > pectine de pomme > pectine de citron

Une légère augmentation de l'activité de la PGase est observée en présence de la pectine de citron après 48 heures de fermentation. Alors qu'en présence de la pectine de pomme la quantité d'enzyme reste presque la même. Les activités PGases en présence des autres glucides, diminuent par rapport au premier jour. L'ordre de stimulation de la PGase à 48 heures de fermentation est le suivant (Figure 22) :

lactose = acide galacturonique = lactosérum > galactose > pectine de pomme = acide
polygalacturonique = pectine de citron > glucose.

Au-delà de 72 heures d'incubation, l'activité de la PGase diminue quelle que soit la nature de la source carbonée ; cette diminution de l'activité enzymatique est faible en présence du lactose et du lactosérum (Figure 22) :

lactose = lactosérum > acide galacturonique > pectine de pomme = acide polygalacturonique =
pectine de citron > galactose = glucose.

Au bout du quatrième jour, une activité de la PGase équivalente à celle obtenue avec le lactosérum et l'acide galacturonique à 48 heures de fermentation, est obtenue en présence du lactose, (4.4 UI/ml). Cependant, elle continue à baisser en présence des autres glucides.

A travers ces résultats, il apparaît que la synthèse de la PGase est sous la dépendance de la nature de la source carbonée, résultats corroborant ceux de Galiotou-Panayotou et al., (1998) de Niture et al., (2008) et de Rehman et al., (2012) qui montrent une variation de la production de la PGase avec la nature des glucides testés.

Il est à noter que les quantités les plus importantes d'enzyme sont obtenues avec le lactose, le lactosérum, l'acide galacturonique et le galactose. Le galactose, élément constitutif des chaînes latérales de la pectine. D'après Call et al., (1985) les sucres neutres formant les chaînes latérales des pectines sont des inducteurs possibles des enzymes pectinolytiques. En ce qui concerne le lactose, l'hydrolyse de ce sucre donne du glucose et du galactose. Le lactose, joue donc le rôle de substrat inductif de l'enzyme PGase (Call *et al.*, 1985). Concernant, l'acide galacturonique, l'un des produits de l'hydrolyse de la pectine par la PGase. Cette source de carbone a été signalée à plusieurs reprises comme un inducteur de

l'enzyme (Blanco *et al.*, 1994; Biely *et al.*, 1996) ; mais dans certains cas, ce substrat a montré un rôle répresseur dans la production des enzymes pectinolytiques (Cavalitto *et al.*, 2000 ; Ouattara *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'activité de la PGase en présence de pectine de citron, de pectine de pomme et d'acide polygalacturonique est moins importante que celle obtenue avec le lactose, le lactosérum, l'acide galacturonique et le galactose (Figure 22). Ceci peut être expliqué par le fait que le milieu de base contient déjà une quantité suffisante de sucres totaux solubles (pectine) qui peuvent avoir un effet de retro-inhibition sur la production de la PGase. On pense plutôt que les faibles concentrations de pectine stimulent la production de la PGase. L'étude de Ouattara *et al.*, (2008) sur la synthèse de la PGase par *Bacillus sp*, estime qu'une concentration de 0.05% de pectine suffit pour augmenter l'activité enzymatique, alors qu'une concentration de 1% l'inhibe. En revanche, Biely *et al.*, (1996) et Niture *et al.*, (2008) préconisent une concentration de 1% de pectine à pH 5 pour la production de la PGase par *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311 (CCY 27-1-98) et par *Fusarium moniforme* NCIM 1276. De plus, il est possible que l'augmentation du pH dans les milieux contenant de la pectine soit la cause de la diminution de la production de la PGase. Par ailleurs, il est possible que les produits de l'hydrolyse (mono-, di- ou trigalacturonides) ou l'un d'entre eux soient la cause de la répression de la PGase dans le milieu contenant de l'acide polygalacturonique comme source de carbone. La littérature rapporte que la synthèse des enzymes et des protéines totales par certains champignons est affectée par les sucres provenant de l'hydrolyse de la pectine (Nighojkar *et al.*, 2006 ; Gattas *et al.*, 2009).

Tous ces résultats montrent que la PGase est induite par les substances pectiques ou substances contenant le galactose, donc il s'agit d'une enzyme inductible (Solis-Pereira *et al.*, 1993 ; Ruiz *et al.*, 2017). Néanmoins, la plupart des travaux s'accordent pour affirmer que la pectine est la meilleure source carbonée pour la production de la PGase d'*Aureobasidium pullulans* (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998) et de *Penicillium* SPC-F 20 (Mathew *et al.*, 2008).

Lorsque le glucose est utilisé comme substrat de fermentation, une quantité importante de PGase est détectée pendant les 24 heures de culture, ensuite la synthèse de l'enzyme diminue suite à l'épuisement du glucose dans le milieu de culture. Le glucose peut avoir un rôle inducteur ou répresseur en fonction de sa concentration dans la culture (Gattas *et al.*, 2009) .

Conclusion partielle

La composition des déchets de tomates révèle une teneur élevée en glucides totaux (20.25%), en matière minérale (5.83%) et en protéines (18.31%). Ces proportions en sources carbonées et azotées sont favorables à l'utilisation de ce déchet comme substrat de fermentation. Ce déchet apporte la quantité en oligoéléments nécessaires aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de PGase par *A. pullulans*.

Une concentration de 4% de déchets de tomates donne une production maximale en enzyme.

Le meilleur substrat inductible est le lactose qui provoque une augmentation de 642% au bout de 24 heures de fermentation.

Néanmoins, pour permettre une bonne croissance levurienne et par conséquent améliorer (optimiser) d'avantage la production en PGase, il serait utile de compléter le milieu à base de déchets de tomates par quelques éléments tels que le lactose (pour son rôle inducteur de la PGase), le glucose (pour son assimilation facile par la levure et aussi pour son effet inducteur) et le calcium nécessaire à la stabilité de l'enzyme etc... . Pour cela, un plan statistique expérimental: Plackett – Burman (1946) et Plan de Box-Wilson (1951) doit être configuré.

5. Optimisation de la production de la polygalacturonase : mise en œuvre d'une approche par plans d'expériences

5.1. Criblage des facteurs influençant la production de la PGase

Les facteurs testés (pH, lactose, glucose, chlorure de calcium, extrait de levure) montrent des effets plus ou moins significatifs sur la réponse mesurée : activité de la PGase (Tableau 23). L'effet de chaque facteur sur la valeur de réponse, ainsi que la statistique t de student et le niveau de signification sont mentionnés dans le tableau 24. Le calcul de p value permet de juger si les facteurs ont une influence statistiquement significative sur la réponse. Si $p < 0.05$ le facteur testé a une influence statistiquement significative sur la réponse.

La réponse expérimentale (activité de la PGase) s'écrit sous forme d'une équation du premier degré :

$$Y = 5.2275 + 0.6245 X_1 + 1.1850 X_2 + 0.1810 X_4 - 0.7080 X_6 - 0.1435 X_7$$

Cependant, le modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif positif ou négatif est le suivant :

$$Y = 5.2275 + 0.6245 X_1 + 1.1850 X_2 - 0.7080 X_6$$

De cette équation, on déduit que la production de la PGase est mieux expliquée par les variables explicatives X_1 , X_2 , et X_6 du fait que leurs coefficients sont les plus importants. Ceci est notamment confirmé par le taux de signification élevé (Tableau 24). Aussi, les variables explicatives (X_1 et X_2) sont corrélées positivement à la production d'enzyme, alors que X_6 est corrélé négativement. Par ailleurs, le coefficient de corrélation linéaire multiple quantifié pour la réponse (activité de la PGase) témoigne de la bonne qualité et de la robustesse du modèle avec un coefficient de corrélation proche de 1 : $R^2 = 0.9908$.

La variation du pH de 5 à 6 exerce un effet positif significatif ($p \leq 0.027$) sur la synthèse de la PGase soit une augmentation de l'activité enzymatique de 30.25% (Tableau 24). Ceci s'explique par le fait que les enzymes sont très sensibles aux variations du pH. Selon Fontana et Silveira, (2012) la production de PGase par la moisissure *A. oryzae* est particulièrement affectée par la composition des milieux de culture (glucose et pectine) et par la variation du pH au cours du procédé de fermentation.

Malvessi et Silveira, (2004), Mathew et al., (2008) signalent que l'optimum de production des enzymes extracellulaires se trouve souvent dans une zone de pH qui est très proche du pH optimum de croissance du micro-organisme. Cependant, dans les cas où

l'optimum de production est éloigné du pH optimum de croissance, les meilleurs rendements sont toujours obtenus dans la zone de pH de stabilité de l'enzyme. En revanche, le pH optimal de croissance de la moisissure *A. oryzae* est voisin de 5 alors que la synthèse des enzymes pectinolytiques est maximale à un pH proche de 3 (Fontana et Silveira, 2012). Sandri et al., (2015) utilisent des pH initiaux situés entre 3 et 4 pour la production de la PGase par la moisissure *Aspergillus fumigatus* LB-01-AP. Biely et al., (1996) rapportent que la levure *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311 (CCY 27-1-98) peut se développer et produire des PGases dans une zone de pH très étendue de 3.3 – 6.1.

L'enrichissement du milieu en lactose à 1% est significatif ($p \leq 0.008$). Il entraîne une augmentation de l'activité pectinolytique de 57.39%. Le lactose est le substrat inducteur de la synthèse de la PGase et constitue également une source importante d'énergie et de carbone (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). En effet, l'effet combiné de pectine dans les déchets de tomates et le lactose additionné au milieu de culture augmente la production de la PGase. Ceci est en accord avec les travaux de Mukesh et al., (2012) qui préconisent l'association des déchets de manioc et du lactose pour favoriser la production de taux élevés de pectinase de *Bacillus sp.* MFW7.

Contrairement aux autres facteurs testés, l'addition de chlorure de calcium à 0.125 g/l au milieu de culture montre un effet négatif significatif ($p \leq 0.021$) et provoque une diminution de l'activité de la PGase de 34.28%. Ce résultat permet d'avancer l'hypothèse qu'à une certaine concentration d'ion calcique peut provoquer une inhibition de la production par blocage de la sécrétion de protéine dans le milieu extracellulaire (Chaudhri et Suneetha, 2012). Le calcium joue un rôle important dans la stabilisation de la PGase et la protège vis-à-vis de diverses protéinases et de la dénaturation thermique (Gomes *et al.*, 2009 ; Murthy et Naidu, 2010). Cet effet est mentionné par Moyo et al., (2003) qui affirment que les ions Ca^{2+} confèrent une stabilité thermique à la PGase produite par la levure *Kluyveromyces wickerhamii*.

La présence de l'extrait de levure à 0.2% et du glucose à 1% dans le milieu de culture est sans effet sur la production de la PGase. Ceci s'explique que les déchets de tomates renferment une quantité suffisante en vitamines et en protéines pour couvrir les besoins de la levure et par conséquent pour produire de l'enzyme (Umsza-Guez *et al.*, 2011). Pour le glucose, bien que ce soit une source de carbone importante dans l'élaboration des cultures de levures, il n'influe pas sur la production de la PGase. Biely et al., (1996) observent des résultats analogues à ceux obtenus dans cette étude : l'addition glucose à 1% n'induit pas la synthèse de la PGase d'*A. pullulans*.

Tableau 23: Effet des facteurs testés sur la production de la PGase (Plan de Plackett-Burman).

N° d'essais	Facteurs							Activité PGase (UI/ml)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	7.67±0.12
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	7.82±0.09
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	3.84±0.15
4	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	4.55±0.11
5	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	4.08±0.1
6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	4.13±0.14
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	5.61±0.12
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.13±0.12

Tableau 24: L'analyse statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de la PGase.

Facteurs	Effect	Coef.	Er-T coef.	t-Value	p-Value	Niveau de signification (%)
Constant		5.2275	0.1044	50.05	0.000	-
pH	1.2490	0.6245	0.1044	5.98	0.027*	97.3
Lactose	2.3700	1.1850	0.1044	11.53	0.008*	99.2
Glucose	0.3620	0.1810	0.1044	1.73	0.225	77.5
CaCl ₂	-1.4160	-0.7080	0.1044	-6.78	0.021*	97.9
Extrait.de levure	-0.2870	-0.1435	0.1044	-1.37	0.303	69.7

Le signe (*) représente le caractère significatif des facteurs avec $P < 0.05$. $Pred-R^2 = 0.8527$; $Adj-R^2 = 0.9908$.

En conclusion : L'utilisation des plans d'expériences de Plackett et Burman, ont permis de sélectionner les facteurs explicatifs à effet significatif sur la production de la PGase d'*A. pullulans* isolée de sol de palmeraies (olivier et vigne).

La production de la PGase est nettement influencée par le pH initial du milieu, le lactose et des faibles concentrations en chlorure de calcium. Les optima de ces facteurs sélectionnés seront déterminés antérieurement par l'emploi d'une autre conception : plan composite centré de Box et Wilson, (1951).

5.2. Optimisation par plan composite central (CCD) et méthode de surface de réponse (RSM)

Le CCD est utilisé pour étudier l'interaction entre les facteurs sélectionnés précédemment, par le plan de Plackett et Burman et aussi pour déterminer leur niveau optimal. Ce plan est basé sur la méthode des surfaces de réponse qui est la plus couramment utilisée dans ce type d'expériences (Jun Li *et al.*, 2015). Elle consiste à modéliser les résultats sous la forme de fonctions polynomiales du second degré soit un modèle quadratique.

Le tableau 25 renseigne sur les valeurs expérimentales données par le CCD et celles prédites pour l'optimisation des facteurs sélectionnés pour la réponse Y (activité PGase). Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle de surface de réponse sont regroupés dans le tableau 26. Le tableau 27 récapitule les coefficients significatifs du polynôme de second degré de l'activité de la PGase déterminés par le test de Student (t) et p-valeur. La relation entre la réponse Y (activité PGase) et les variables expérimentales obtenues par l'application du RSM est représentée mathématiquement par l'équation de régression suivante:

$$Y = 14.31 - 1.40X_1 + 3.94X_2 + 1.69X_3 + 0.05X_1^2 - 0.83X_2^2 - 2.82X_3^2 - 1.78X_1X_2 + 0.86X_1X_3 + 2.78X_2X_3$$

Où Y est l'activité de la PGase et X_1 , X_2 et X_3 représentent les facteurs pH, lactose et CaCl_2 respectivement. Une comparaison des résultats expérimentaux avec ceux prédits est réalisée par le logiciel en utilisant une courbe de régression linéaire. Une corrélation est établie entre les données expérimentales et les valeurs prédites par le modèle. Plus les valeurs expérimentales seront proches de la droite de régression linéaire, plus le modèle sera pertinent (Figure 23).

La valeur du coefficient de détermination R^2 de ce modèle est égale à 0,9421. Cela signifie que 94.21% de la production de la PGase sont expliqués par ce modèle et que 5.79% restent par conséquent inexpliqués. Cette valeur élevée de R^2 témoigne de la bonne qualité et de la robustesse du modèle. Le modèle du deuxième degré est un indicateur adéquat des résultats expérimentaux puisque la valeur de R^2 prédit de 0,8558 indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites. La valeur du coefficient de détermination ajusté R^2_{Adj} représente une correction de la valeur de R^2 qui permet de prendre en compte la taille de l'échantillon et le nombre de variables utilisées dans le modèle (Sampaio *et al.*, 2010). Le coefficient de détermination relativement élevé ajusté ($R^2_{Adj} = 0,8677$) dans la présente étude explique la bonne qualité descriptive du modèle.

Tableau 25: Valeurs expérimentales (observées) et prédites de l'activité de la PGase d'*A. pullulans* par le CDD.

N° d'essais	Niveaux des facteurs			Réponse Y (activité PGase) (UI/ml)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Valeurs expérimentales	Valeurs prédites
1	-1	-1	-1	10.76±0.09	11.18
2	+1	-1	-1	10.42±0.07	10.16
3	-1	+1	-1	14.16±0.03	15.16
4	+1	+1	-1	11.50±0.03	11.62
5	-1	-1	+1	10.42±0.10	10.62
6	+1	-1	+1	11.50±0.07	10.81
7	-1	+1	+1	17.96±0.11	18.53
8	+1	+1	+1	16.31±0.06	16.21
9	-1.682	0	0	17.35±0.06	15.77
10	+1.682	0	0	12.16±0.09	12.96
11	0	-1.682	0	9.20±0.10	9.54
12	0	+1.682	0	18.22±0.11	17.42
13	0	0	-1.682	10.42±0.03	9.80
14	0	0	+1.682	13.03±0.09	13.18
15	0	0	0	14.27±0.06	15.16
16	0	0	0	14.97±0.06	14.31
17	0	0	0	14.16±0.06	14.31

Tableau 26: Analyse de variance (ANOVA) pour les paramètres de la méthode de surface de réponse adaptée au modèle polynomial quadratique pour l'optimisation de l'activité de la PGase.

Source	SS	DF	MS	F-value	p-value
Model	124.887	9	13.8763	12.66	0.001
Residual error	7.674	7	1.0963		
Lack-of-fit	7.346	6	1.2244	3.73	0.377
Pure error	0.328	1	0.3281		
Total	132.561	16			

$R^2 = 94.21\%$; $Adj-R^2 = 86.77\%$; $Pre-R^2 = 85.58\%$; SS, somme des carrés; DF, degré de liberté; MS, moyenne des carrés.

Tableau 27: Résultats de l'analyse de régression du modèle polynomial du second degré pour l'optimisation de l'activité de la PGase.

Facteurs	Coefficient de régression	Coefficient estimé	Valeur-t	Valeur-p
Constant	14.315	0.676	27.17	0.000
X_1	-1.402	0.463	-3.03	0.019
X_2	3.938	0.476	8.27	0.000
X_3	1.691	0.476	3.55	0.009
X_1^2	0.052	0.959	0.05	0.958
X_2^2	-0.834	0.919	-0.91	0.394
X_3^2	-2.819	0.919	-3.07	0.018
X_1X_2	-1.78	1.04	-1.71	0.132
X_1X_3	0.86	1.04	0.82	0.439
X_2X_3	2.78	1.04	2.66	0.033

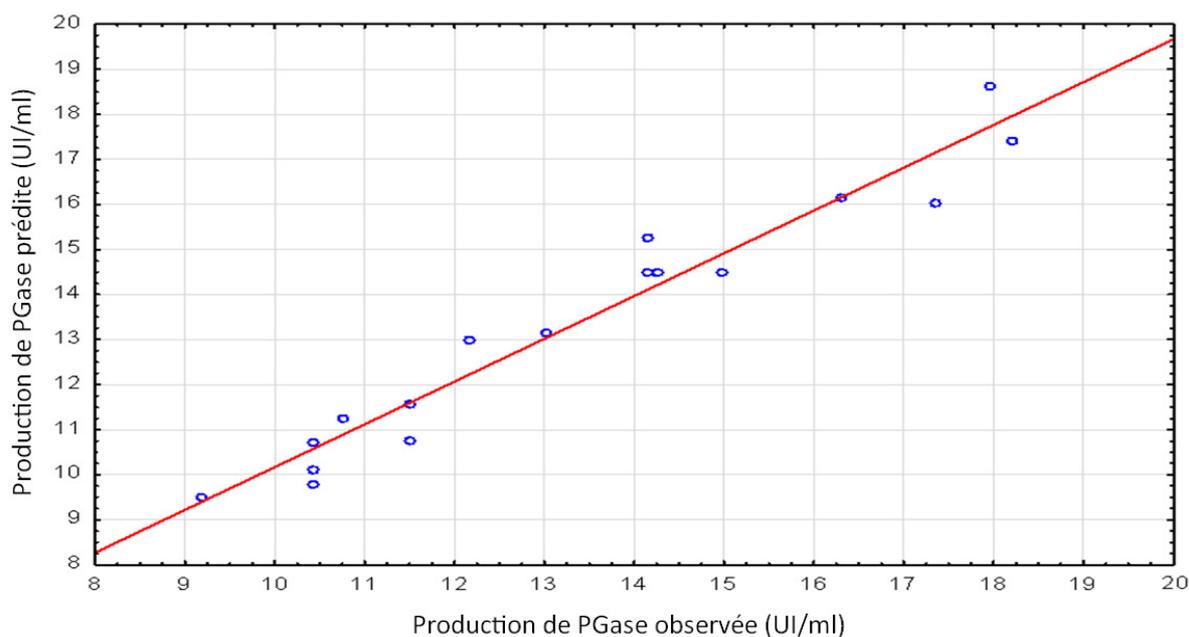


Figure 23: Graphique de parité montrant la distribution des données expérimentales de l'activité de la PGase par rapport à la valeur prédite par le modèle.

L'ANOVA, à travers le modèle de régression quadratique, a révélé que le modèle de surface de réponse du second ordre obtenu est hautement significatif. Cette analyse est également confirmée par la valeur élevée du test de Fisher. Le tableau 26 montre que la valeur de $F = 12.66$ est supérieure à celle tabulée $F(9,6) = 7.97$ au niveau de 1%. Ceci est approuvé aussi par la très faible valeur de la probabilité ($p = 0.001$), ce que signifie que la régression est donc significative à un niveau de confiance d'environ 99 % et que le modèle choisi est adéquat pour la production de la PGase. De plus, la valeur p pour le manque d'ajustement (lack-of-fit = 0,377) n'est pas significatif ce qui permis d'affirmer que les données expérimentales obtenues sont ajustées avec précision par le modèle (Garai et Kumar, 2013).

Par ailleurs, la signification des coefficients du modèle est réalisée par un test d'hypothèse (test-t) à un niveau de signification à 5%. Selon le tableau 27, les résultats montrent que les termes linéaires de pH (X_1), du lactose (X_2) et du CaCl_2 (X_3), le terme quadratique X_3^2 et l'interaction X_2X_3 ont un impact important sur l'activité de la PGase. Les effets positifs de la concentration de lactose (X_2) et de la concentration en CaCl_2 (X_3) indiquent qu'ils ont un effet linéaire pour augmenter l'activité de la PGase, alors que le pH initial (X_1) montre un coefficient négatif indiquant qu'il contribue à diminuer l'activité

enzymatique. Le terme quadratique de concentration de CaCl_2 (X_3^2) a également un coefficient négatif signifie que l'activité de la PGase est plus liée à l'effet linéaire de cette variable. Cependant, l'interaction (X_2X_3) contribue négativement à la réponse.

5.3. Analyse graphique des résultats par utilisation des surfaces de réponse

Les surfaces de réponse sont des graphiques en trois dimensions (Figure 24). Elles sont obtenues par le modèle polynomial de second degré. Le plan horizontal de la figure matérialise le domaine de variation de deux facteurs ; l'axe vertical matérialise la variation de la réponse à partir du modèle. Au-delà de deux facteurs, il est nécessaire de maintenir à un niveau constant les facteurs dont les variations ne sont pas décrites dans le plan horizontal. Ces graphiques permettent d'illustrer les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur chaque variable. En effet, elles sont utilisées pour prédire les valeurs optimales pour différentes variables de test, afin d'obtenir la réponse maximale de la PGase.

La figure 24a représente l'effet de la concentration du lactose et du CaCl_2 sur l'activité de la PGase. Le graphe montre la présence d'effets linéaires et d'effets d'interactions pour les deux facteurs, et l'absence d'effet quadratique. Ceci confirme ce qui a déjà été constaté précédemment dans le tableau 27, soit ($p = 0.033$). Une activité PGase importante est nettement plus prononcée avec une concentration élevée en lactose qu'en faible concentration. L'augmentation de ce facteur a tendance à renforcer l'effet positif du CaCl_2 ce qui peut être dû d'après le tableau 27 à l'effet de l'interaction lactose – CaCl_2 ayant un signe positif. A cet effet, une activité PGase maximale ($> 18 \text{ U / ml}$) est prédite à une concentration de lactose d'environ $1,80 \text{ g/l}$ et à une concentration de CaCl_2 approximativement de $0,09 \text{ g/l}$, confirmant ainsi l'effet de stabilisation du calcium sur la production enzymatique rapporté par Shanmugaprakash *et al.*, (2014).

La figure 24b montre l'effet linéaire du pH et du CaCl_2 à qui s'ajoute l'effet quadratique représenté par la courbure de la surface de réponse. De faibles valeurs de la PGase sont obtenues à pH 6.2 (figure 24b). Ce résultat est cohérent avec les résultats rapportés par Suresh *et al.*, (2009) qui ont étudié la stabilité de la PGase synthétisé par la moisissure *Aspergillus awamori* en fermentation submergée en fonction du pH et ont observé que l'enzyme était rapidement dénaturée lorsque le pH s'élève à des valeurs supérieures à 5,4. Ainsi, le maximum d'activité PGase n'est obtenu qu'aux faibles niveaux de pH soit pH 5,2 et de faibles concentrations de chlorure de calcium (environ $0,09 \text{ g/l}$).

La courbe 24c montre uniquement l'effet linéaire du pH et du CaCl_2 représenté par la forme plane de la surface de réponse. En effet, la forte concentration de lactose et un pH élevé

diminuent l'activité de la PGase alors que, la meilleure combinaison est obtenue par une forte concentration en lactose et de faibles valeurs de pH qui ont montré un effet positif sur l'activité enzymatique (figure 24c).

En conclusion : selon l'analyse de prédiction de surface de réponse, un pH initial de 5,16, une concentration en lactose et en CaCl_2 de 1,84 g/let 0,089 g/l respectivement ont maximisé l'activité de la PGase jusqu'à 21,83 UI/ml.

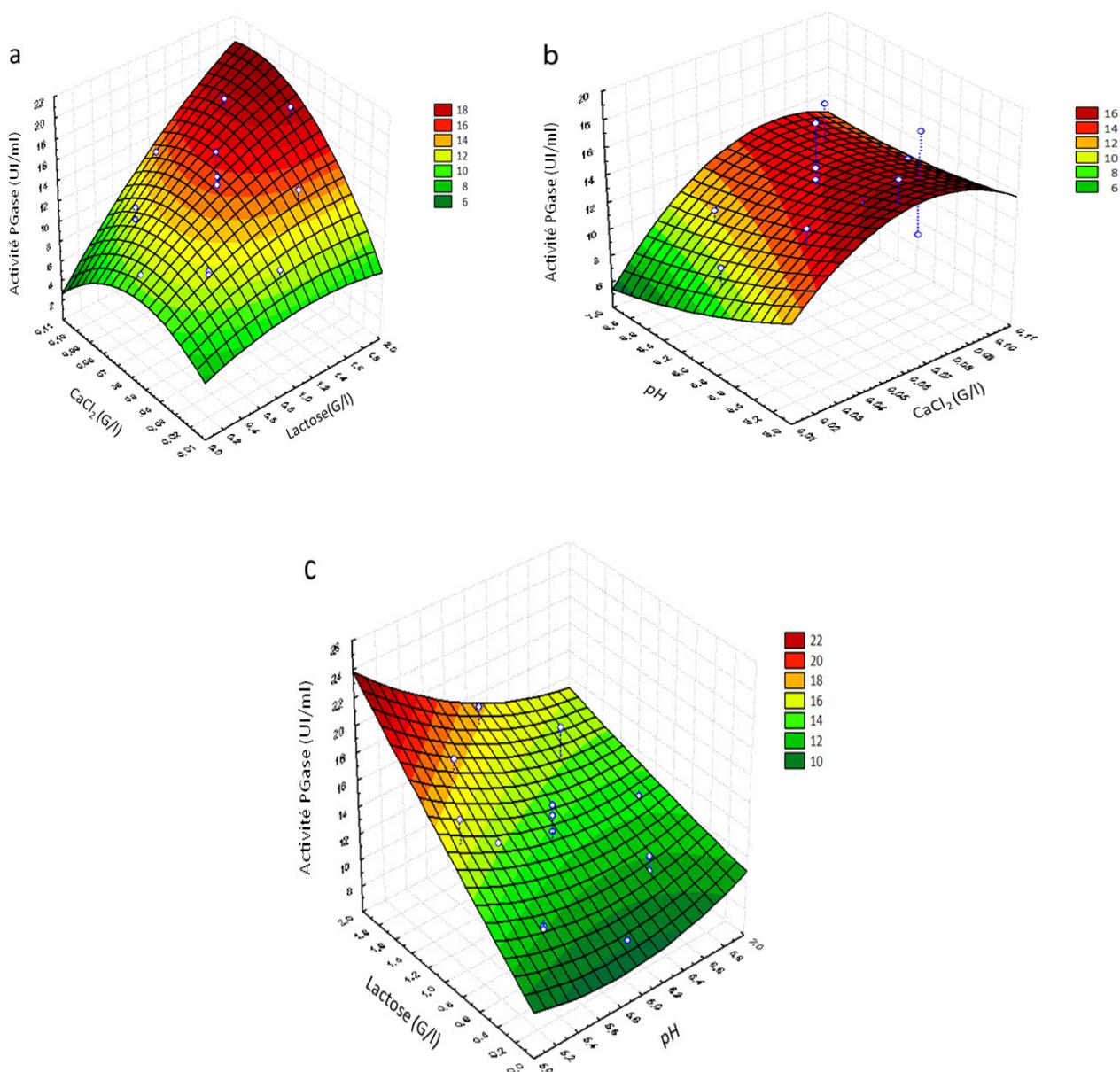


Figure 24: Les courbes de surface de réponse montrant l'effet des facteurs (a) Lactose– CaCl_2 , (b) pH– CaCl_2 et (c) pH–Lactose sur l'activité de la PGase d'*A. pullulans*.

5.4. Validation du modèle

Des essais en conditions optimales sont réalisés en batch (Erlen-meyers de 250 ml). Ces expériences ont permis l'obtention d'une activité de la PGase de 22,05 UI/ml. Cette quantité d'enzyme produite est proche de la valeur prédite par le modèle statistique (CCD), qui évalue une activité de 21,83 UI/ml. L'optimisation a donc permis d'augmenter l'activité de la PGase de la levure *A. pullulans* de 4.13 UI/ml à 22.05 UI/ml, **soit une augmentation de 5 fois**. Ce résultat est relativement supérieur à celui de Tari et al., (2007), de Freixo et al., (2008) et de Uzuner et Cekmecelioglu, (2015) (Tableau 28). Certains exemples de la littérature sont rapportés également dans le tableau 28. Par ailleurs, la quantité d'enzyme obtenue dans cette étude est plus importante par rapport à la PGase recombinante (3U/ml) de la moisissure *A. kawachii* (Rojas et al., 2011).

Pour tester les aptitudes de la souche S6 en conditions industrielles, on a procédé à une culture, sur un milieu optimisé, à l'échelle semi-pilote soit un fermenteur de 20 l. Les résultats révèlent une importante production de la PGase de 25.75 UI/ml dans un temps plus court lorsque la levure est cultivée dans le fermenteur de laboratoire (Figure 25). Le pic de l'activité enzymatique est atteint en 32 h dans le fermenteur comparativement à 52 h dans les Erlen-meyers. Une diminution similaire du temps de fermentation est enregistrée dans la production de la pectinase alcaline par *Bacillus pumilus* dcsrl, où la production optimale a été obtenue en 30 h en fermenteur comparativement à 40 h en fiole Erlen-meyers (Sharma et Satyanarayana, 2006). On peut expliquer cela par la bonne maîtrise des conditions de culture, une distribution uniforme des nutriments et une meilleure aération. Ces résultats confirment que la levure *A. pullulans* a des aptitudes industrielles pour la production de la PGase.

Tableau 28: Production de la PGase microbienne rapportée par la littérature.

Micro-organisme	Substrat	Activité PGase	Référence
• Moisissure			
<i>A. niger</i>	Pectine	0.055UI/ml	Maldonado et Strasser de Saad, 1998
<i>A. awamori</i>	Farine de blé complet	0.05 U/ml	Blandino <i>et al.</i> , 2001
<i>F. moniliforme</i>	Pectine de citron et glucose	0.3 UI/ml	Niture et Pant, 2004
<i>A. sojae</i> ATCC 20235	Maltrin et Corn Steep Liquor	13.5 U/ml	Tari <i>et al.</i> , 2007
<i>C. versicolor</i>	Déchets de tomates	1.427 U/L	Freixo <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> NCIM 548	Amidon de tapioca	22.87 U/ml	Yougandhar <i>et al.</i> , 2008
<i>A. fumigatus</i> MTCC 870	Farine de blé	15.46 UI/ml	Palaniyappan <i>et al.</i> , 2009
<i>T. reesei</i> F418	Paille de riz et pelure de citron	40.1UI/g	Soroor <i>et al.</i> , 2013
<i>A.fumigatus</i> R6	Son de riz	565 U/g	Wong <i>et al.</i> , 2017
• Bactérie			
<i>Leuconostoc</i> sp. LLn1	Pectine de citron	0.16 U/ml	Bekhouche <i>et al.</i> , 2006
<i>B.subtilis</i>	Hydrolysate de coquille de noisette	5.60 U/ml	Uzuner et Cekmecelioglu, 2015
• Levure			
<i>C. utilis</i>	Déchets de pommes	239 UI/ml	Villas-Boas <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodotorula</i> sp. ONRh9	Pectine de citron	0.44U/ml	Bekhouche <i>et al.</i> , 2006
<i>A. pullulans</i> GM-R-22	Glucose	0.751U/ml	Merin <i>et al.</i> , 2011
<i>R. dairenensis</i> GM-15	Glucose	1.260 U/ml	Merin <i>et al.</i> , 2015
<i>A. pullulans</i> (S6)	Déchets de tomates	22.05 UI/ml	La présente étude

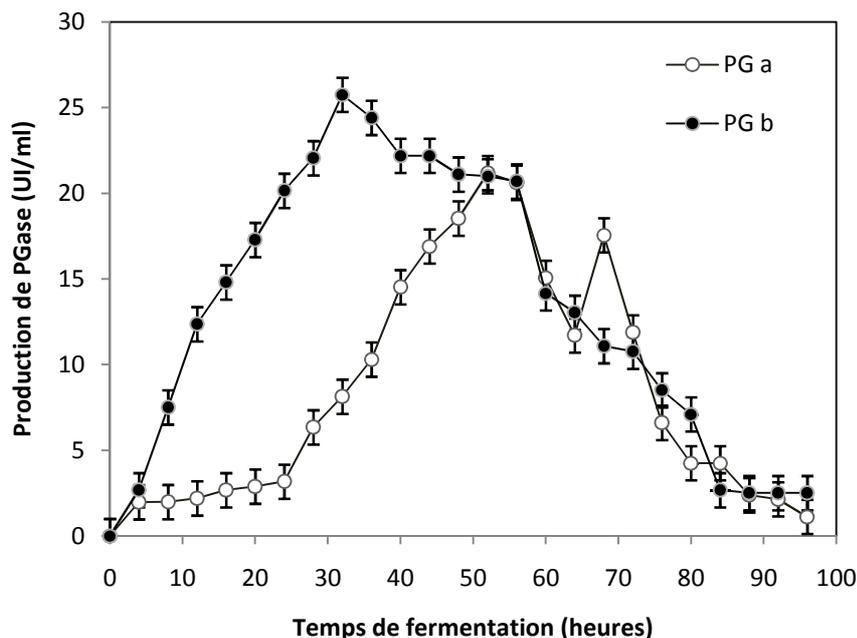


Figure 25: Production de la PGase par *A.pullulans* en Erlen-meyers (a) et en fermenteur de laboratoire (b). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type, $n = 3$.

Conclusion partielle

Le plan composite centré (CCD) semble très efficace pour l'optimisation de la production de la PGase d'*Aureobasidium pullulans*. Par cette méthode statistique les optima des facteurs sélectionnés précédemment sont déterminés (pH initial, lactose et chlorure de calcium). Une production optimale de la PGase par la levure *A. pullulans* (S6) sur milieu à base de déchets de tomate à 4% nécessite un pH initial de 5.16, une concentration en lactose de 1.84 g/l et une concentration en CaCl_2 de 0.089 g/l.

Par ailleurs, le niveau de production de la PGase semble être plus important en fermenteur qu'en fiole d'Erlen-meyers. Les valeurs maximales d'activité obtenues en fermenteur sont de l'ordre de 25.75 UI/ml contre 22.05 UI/ml en fiole ce qui procure à la souche le caractère industriel.

6. Etude de la Cinétique de croissance d'*Aureobasidium pullulans* et de la production de la polygalacturonase.

Une étude cinétique, en fermenteur de 20l, est réalisée pour mieux comprendre l'évolution de différents paramètres au cours de la fermentation et tester la capacité de la levure à s'adapter aux conditions industrielles (Résultats présentés par les figures 26 et 27).

6.1. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation

L'évolution de la biomasse en fonction du temps sur milieu optimisé à base de déchets de tomates sous des conditions de pH contrôlées passe par trois phases majeures :

1. Une courte phase de latence est observée du temps $t = 0$ au temps $t = 4$ h. Ceci est dû probablement au fait que l'ensemencement du milieu provenant d'une préculture de 24 – 36 h. Cet inoculum a permis aux cellules levuriennes de s'adapter facilement aux conditions de culture. Pendant cette période, une consommation accrue des sucres est observée.
2. Une phase de croissance exponentielle dure une vingtaine d'heures et se poursuit jusqu'au temps 32 h, où la biomasse atteint sa valeur maximale de 7.80 g/l.
3. De 32 h à 96 h la levure entre en phase stationnaire. Par ailleurs, la phase de déclin n'est pas atteinte après 96 h de fermentation (Figure 26), résultat similaire à celui de Wang et al., (2014) pour la production de lipide par *A. pullulans* var. *melanogenum* P 10, qui rapportent qu'après 132 h de fermentation la levure est toujours en phase stationnaire.

6.2. Evolution de la production de la polygalacturonase au cours de la fermentation

La figure 26 décrit la cinétique de production de la PGase par la levure *A. pullulans*. L'enzyme apparaît dès le début de la fermentation et sa synthèse se poursuit jusqu'à la fin de la phase exponentielle avec une activité de la PGase maximale de 25.75 UI/ml à 32 h de fermentation. Au début de la phase stationnaire, l'activité de la PGase se poursuit jusqu'à 56 h d'incubation. Passé ce temps, la synthèse de l'enzyme diminue progressivement pour atteindre la valeur de 2.5 UI/ml en fin de culture. Cette diminution de l'activité enzymatique peut être expliquée soit par l'addition continue de l'acide phosphorique (volume de 341.7 ml) pendant la fermentation en raison de l'augmentation continue du pH, soit à l'augmentation de

la concentration en oxygène dissous. Ces deux facteurs influencent négativement sur la production de la PGase ainsi que la stabilité enzymatique (Dogan, 2008 ; Sandri *et al.*, 2015).

La moisissure *Aspergillus oryzae*, cultivé en batch dans un bioréacteur air lift de 4 l sur un milieu liquide contenant du son de blé et de la pectine de citron, produit un maximum de PGase au bout de 96 h d'incubation (Fontana *et al.*, 2009). Cependant, la moisissure *Aspergillus sojae* produit un maximum de PGase après 43 h de fermentation sur un milieu synthétique contenant du glucose (Dogan, 2008).

Par ailleurs, Les profils cinétiques montrent qu'il y a une association entre la croissance et la synthèse de la PGase (Figure 26). Ces résultats corroborent ceux trouvés par Galiotou-Panayotou, (1998) et Sakai et Takaoka, (2014) qui montrent que la synthèse de la PGase d'*A. pullulans* est corrélée à la croissance. De même Bekhouche et al., (2006) indiquent que les cultures en fermenteur de 2 l à pH contrôlé de la levure *Rhodotorula sp.* ONRh9 produisent un maximum de cellule et de PGase après 20 h (DO, 3.96 ; PG, 0.24 U/ml) de cultures. La croissance peut être également de type non associé à la croissance comme pour certaines PGases d'autres souches fongiques (Fontana et Silveira, 2012) et bactériennes (Ur Rehman *et al.*, 2012). D'après Buyukkileci et al., (2015) le modèle de production de la PGase dépend du type de micro-organisme, des conditions de culture et d'autres facteurs.

6.3. Evolution des glucides, des protéines et de la consommation en oxygène (PO₂)

Au cours de la fermentation, la consommation des glucides par la levure est rapide pendant la phase de croissance où leur concentration passe de 5.74 g/l à 1.78 g/l (Figure 27). Cependant, durant la phase stationnaire la concentration des glucides augmente et atteint une valeur de 3.4 g/l. ceci est dû certainement à la production des polysaccharides (pullulane) par *A. pullulans*, résultats sont confirmés par les travaux de Galiotou-Panayotou et al., (1998) qui indiquent que la PGase d'*A. pullulans* ATHUM 2915 est produite pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire alors que les polysaccharides sont produites uniquement pendant la phase stationnaire.

La quantité totale de protéines est variable car il y a à la fois une consommation et une production de protéines (Figure 27). La valeur maximale de 4.46 g/l est obtenue au bout de 92 heures de fermentation. Cette augmentation se traduit par la synthèse des protéines, entre autres les enzymes.

Les conditions d'oxygène dissous jouent également un rôle de première importance dans les cultures submergées en batch pour assurer la croissance adéquate, un entretien cellulaire et une production d'enzymes pectinolytiques. Zetelaki-Horvath et Vas, (1981) et

Meneghel et al., (2014) ont démontré que la modification des conditions de transfert de l'oxygène dissous de la phase gazeuse à la phase liquide a une grande influence sur la production de la PGase en affectant les voies métaboliques du micro-organisme.

En effet, le taux de consommation des glucides et par conséquent la quantité de biomasse produite en fermenteur est très élevée d'environ 4 h à 32 h de fermentation. De 32 h à 52 h la consommation des glucides est ralentie. Il est à noter qu'après la phase de latence, les concentrations en oxygène dissous diminuent rapidement en raison du métabolisme microbien et sont restées à environ 30% de saturation entre 28 et 32 h de fermentation. Les concentrations en oxygène dissous montent ensuite à environ 60% et demeurent constantes jusqu'à la fin de la culture (Figure 27). La PO_2 remonte lorsque la totalité du substrat est consommée par la levure (Meneghel *et al.*, 2014). On observe que, lorsque le taux d'aération augmente dans la dernière phase de culture, une dispersion de la biomasse levurienne s'accumule sur les dispositifs métalliques de la cuve du fermenteur et un ralentissement dans la synthèse de la PGase. Ce phénomène est observé par Rattanachomsri et al., (2009) qui démontrent qu'une concentration excessive en oxygène est toxique aux levures et aux PGases produites. De plus, l'oxygénation suffisante permet d'éviter une orientation du métabolisme vers une fermentation éthanolique (Liang *et al.*, 2014).

Conclusion partielle

Il ressort de cette étude que la levure *Aureobasidium pullulans* (S6) isolée d'un sol aride, est capable de se développer en conditions industrielles sur milieu optimisé à base de déchets de tomates. La synthèse de la PGase atteint sa valeur maximale après 32 heures de culture, en fermenteur de 20 l, correspondant au maximum de croissance. Ce résultat permet de décrire un mécanisme de synthèse de la PGase de type associé à la croissance. De plus, la production de la PGase, dans un temps court (32 heures de fermentation) est un facteur économiquement important pour un industriel.

Pour la poursuite de ces travaux, il serait intéressant d'approfondir l'étude par purifier et caractériser la PGase pour une éventuelle application industrielle.

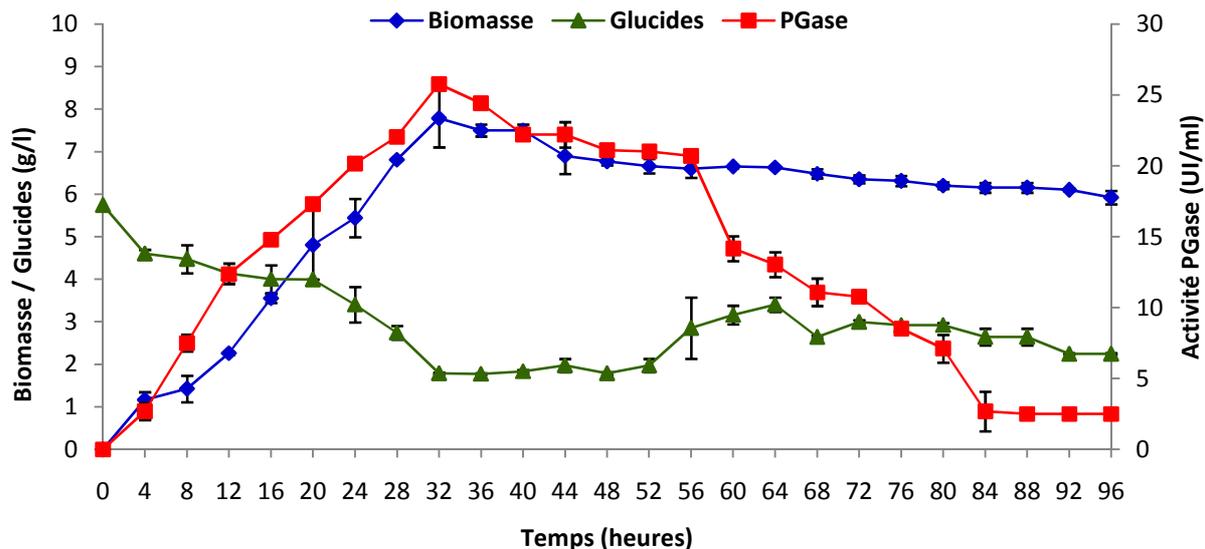


Figure 26: Evolution cinétique de la croissance, de la production de la PGase et des glucides par la levure isolée d'un sol aride *A. pullulans* cultivé sur milieu optimisé à base de déchets de tomates en fermenteur de 20 l.

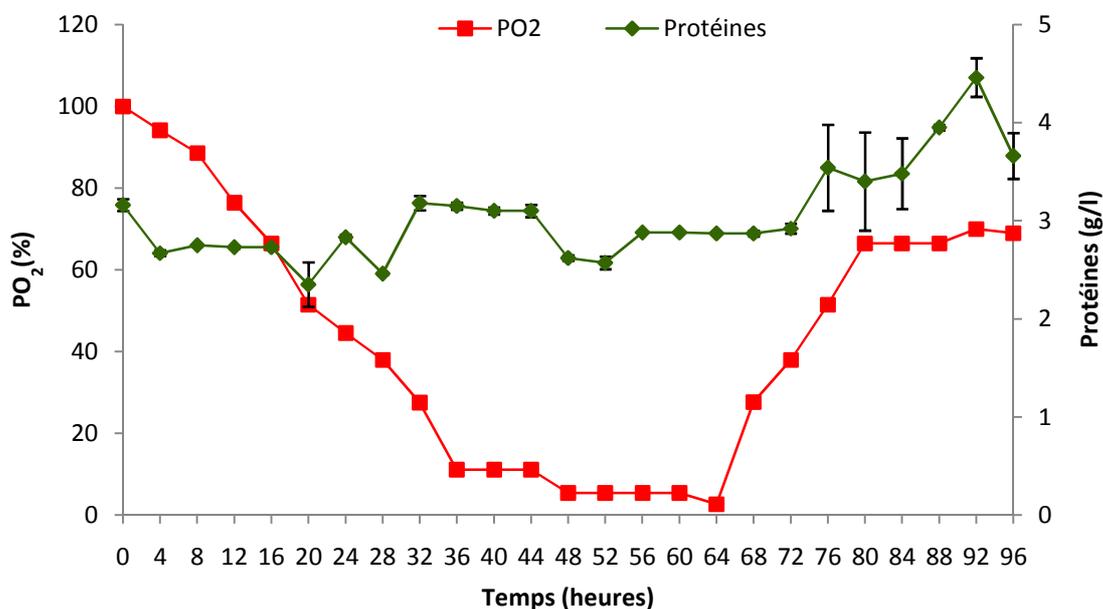


Figure 27: Evolution cinétique des protéines et de la consommation en oxygène par la levure isolée d'un sol aride *A. pullulans* cultivé sur milieu optimisé à base de déchets de tomates en fermenteur de 20 l.

Partie III : Purification et caractérisation des Polygalacturonases

7. Essai de purification et caractérisation biochimique des PGases

7.1. Essai de purification des PGases de la souche *Aureobasidium pullulans*

7.1.1. Milieu de production

La purification est réalisée à partir de l'extrait brut produit en fiole Erlen-meyers de 500 ml obtenu après une culture de 52 h sur milieu optimisé à base de 4% de déchets de tomates.

7.1.2. Précipitation de la PGase

Il existe plusieurs méthodes de concentration des jus de fermentation. Certaines sont adéquates pour des protéines mais d'autres sont inefficaces et même dénaturantes. Pour cela, différentes méthodes sont testées pour concentrer les protéines du jus de fermentation :

- Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium à (30 – 80%).
- Précipitation à l'acétone à froid.

Les protéines obtenues après traitement par une des deux méthodes sont reprises dans un minimum de tampon acétate de sodium 50 mM pH 5. Une détermination de l'activité de la PGase et de la concentration en protéines est mesurée au cours de chaque étape, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 29.

Tableau 29: Précipitation par le sulfate d'ammonium ou l'acétone de l'extrait brut de la PGase.

Méthodes de concentration	Activité PGase totale (UI)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	2665	1150	2.31	1	100
Précipitation au sulfate d'ammonium	50	270	0.185	0.080	1.9
Précipitation à l'acétone à froid	2000	250	8	3.46	75

L'examen du tableau 29 montre que, le procédé de précipitation le plus intéressant vis-à-vis de l'activité de la PGase récupérée et de l'activité spécifique est l'acétone. Par contre, l'utilisation du sulfate d'ammonium, pour une gamme de concentration comprise entre 30 et 80% de saturation, provoque une forte diminution de l'activité spécifique (Tableau 29). Ce

processus de précipitation semble donc être particulièrement néfaste pour la PGase de la levure *A. pullulans*. Généralement, la précipitation au sulfate d'ammonium est utilisée en tant que première étape de purification des PGases : exo-PGase de *Pycnopus sanguineus* (rendement d'activité enzymatique de 65% et un degré de purification de 22.12) avec une saturation de 30 – 80% par le sulfate d'ammonium (Quiroga *et al.*, 2009); PGase d'*Aspergillus niger* (rendement de 15.11 % et taux de purification de 1.36) avec une saturation de 30 – 90% (Ahmed *et al.*, 2016).

La précipitation à l'acétone qui précipite la PGase à 60% est également testée (Figure 28). Il conduit à la concentration de protéines et à une augmentation de l'activité spécifique de 2.32 UI/mg à 8 UI/mg avec un rendement relativement important de 75% (Tableau 29). Cette concentration est donc utilisée pour la précipitation de la PGase en vue de préparer l'extrait enzymatique brut qui servira pour la purification et la caractérisation biochimique de l'enzyme. Cependant, certaines études ont déjà montré l'efficacité de la précipitation à l'acétone par rapport à celle effectuée par le sulfate d'ammonium, résultats en accord avec ceux de cette étude : PGase de *Penicillium chrysogenum* précipitée par l'acétone à 70% avec un rendement en activité de 67.7% (Ramalingam *et al.*, 2013). L'utilisation de l'acétone refroidie pour la précipitation d'enzymes pectinolytiques est plus favorable par rapport au sulfate d'ammonium pour deux raisons:

- a- Un meilleur rendement en activité enzymatique
- b- L'acétone utilisé peut être récupéré par distillation pour une utilisation ultérieure (Ramalingam *et al.*, 2013).

La suite de la purification comporte 2 étapes : une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphacryl S-200 et une chromatographie sur échangeur d'ions DEAE sepharose.

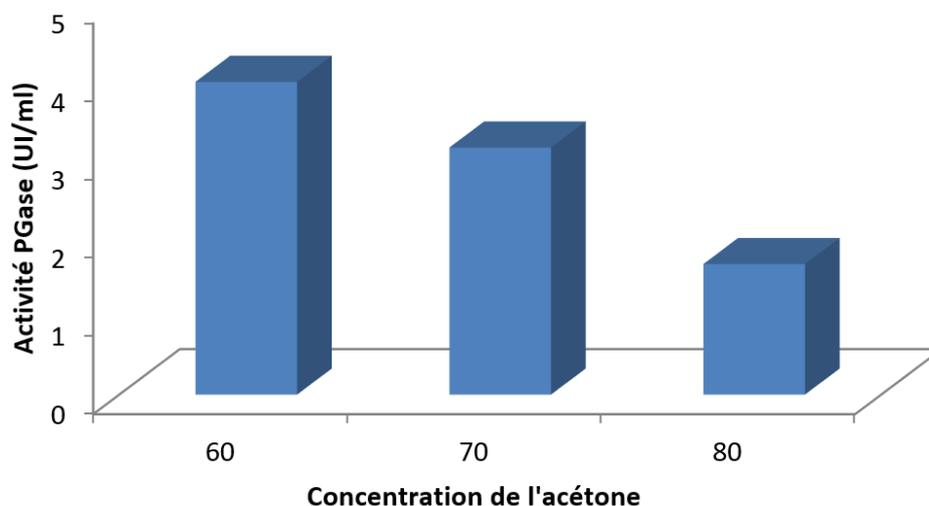


Figure 28: Effet de différentes concentrations d'acétone sur l'activité de la PGase.

7.1.3. Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire

Le précipité à l'acétone 60% est redissous dans une solution dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5, concentré sur des membranes (Amicon-Ultra) puis déposé au sommet d'une colonne de gel filtration Séphacryl S-200 (gamme de fractionnement : 5 à 250 kDa). La figure 29 décrit le profil chromatographique des protéines et le profil de l'activité de la PGase : deux pics de protéines se superposant aux deux pics d'activités de la PGase appelés PG1 et PG2, élués respectivement aux alentours des fractions 10 et 16. Ce résultat suggère la présence de deux isoenzymes de la PGase. Le tableau 30 résume les paramètres de purification des deux fractions pectinolytiques séparément. Le premier pic est séparé avec un rendement en activité de 40%, une activité spécifique de 40.4 UI/mg et un taux d'enrichissement de 17.5 fois ; le deuxième pic est purifié avec un rendement en activité de 35.31%, une activité spécifique de 27 UI/mg et un degré de purification de 11.7. Certains travaux décrivent une seule technique chromatographique pour la purification de la PGase : PGase d'*A. niger* MTCC 3323 élue sur le Séphacryl S-200 (Kant *et al.*, 2013) avec un taux de purification de 6.52 et un rendement final de 5.01%.

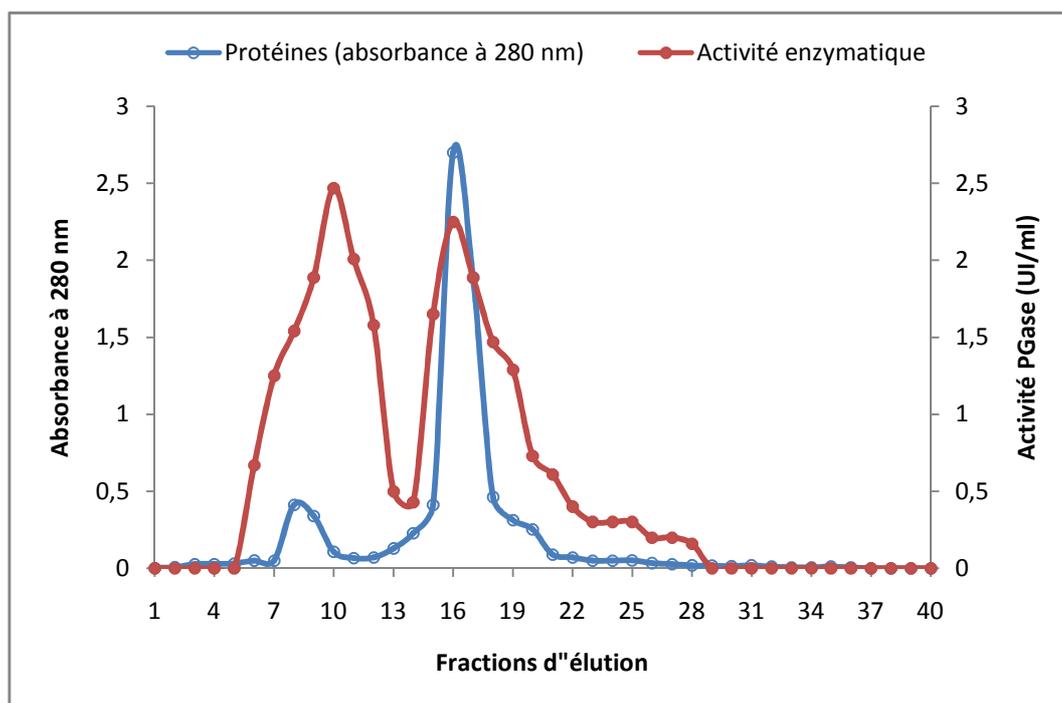


Figure 29: Profil chromatographique des PGases d'*A. pullulans* sur Séphacryl S-200. Elution par le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5 ; volume des fractions: 2 ml.

7.1.4. Purification par chromatographie échangeuse d'ions

Les deux fractions PGasique, correspondants aux pic 1 et pic 2, issus de l'élution sur Séphacryl S-200, sont concentrées par ultrafiltration puis chargées sur une colonne échangeuse d'anions de type DEAE-Sepharose. Les figures 30 et 31 montrent le profil d'élution des protéines ainsi que celui de l'activité des PGase (PG1 et PG2) des deux fractions, par élution avec un gradient croissant de NaCl de 0 à 1 M. Les deux isoenzymes sont éluées avec la même concentration en sel de 0.5 M. Ces isoenzymes ont une charge globale négative identique. Les rendements de la PG1 et de la PG2 sont respectivement de 27.39 % et de 26.45 % et des facteurs de purification respectifs de 162.1 et de 153.4 fois (Tableau 30).

Pedrolli et Carmona, (2010) ont purifié la PGase d'*Aspergillus giganteus* sur DEAE-Sephadex A-50 à pH 8, élue entre 0 et 0.5 M de NaCl avec un taux de purification de 28.1 et un rendement de 86.4%. Sur DEAE-Cellulose, Lu et al., (2016) ont purifié la PGase de *Zygoascus hellenicus* V25 à pH 5.4 avec un taux d'enrichissement de 16.89. La rétention des PGases sur les colonnes échangeuses d'ions peut donc dépendre de plusieurs facteurs tels que la structure de l'enzyme et le type de colonne utilisée.

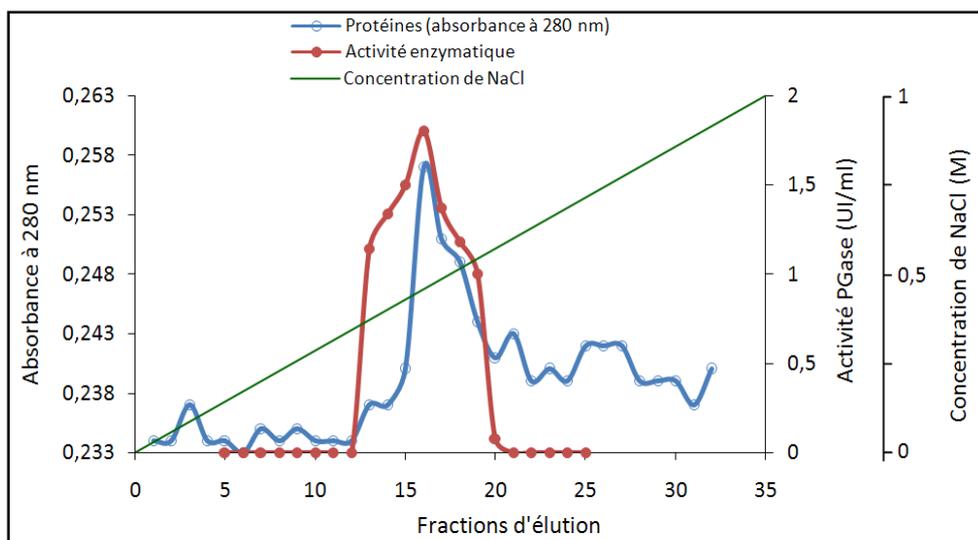


Figure 30: Purification par chromatographie sur échangeur d'anions, DEAE-Sepharose des fractions (PG1) récoltées après passage sur chromatographie gel filtration (Séphacryl S-200). Le tampon d'élution est le tampon acétate de sodium 50 mM pH 5. L'élution est effectuée par un gradient de NaCl (0 - 1 M). Le débit est de 0,5 ml/min. L'absorbance des fractions (2 ml) est mesurée à 280 nm.

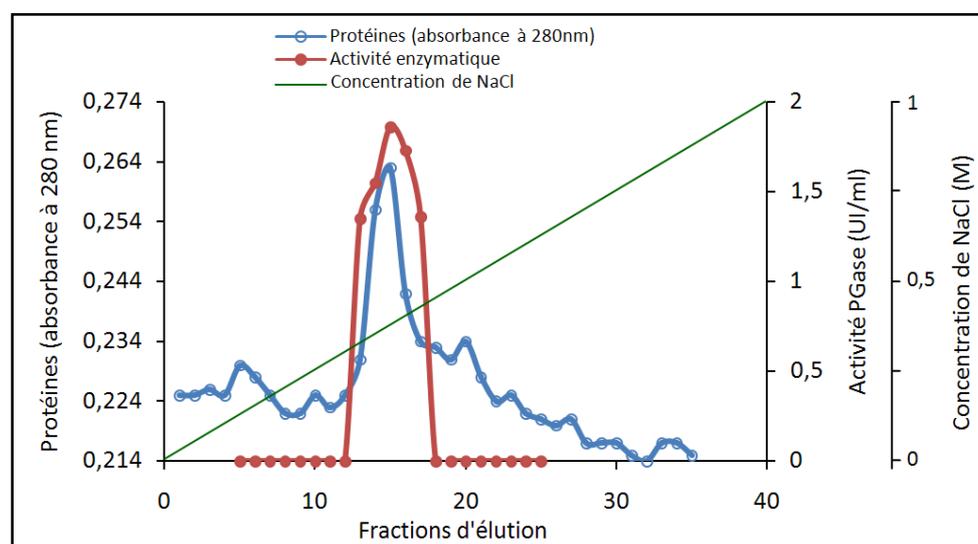


Figure 31: Purification par chromatographie sur échangeur d'anions, DEAE-Sepharose des fractions (PG2) récoltées après passage sur chromatographie gel filtration (Séphacryl S-200). Le tampon d'élution est le tampon acétate de sodium 50 mM pH 5. L'élution est effectuée par un gradient de NaCl (0 - 1 M). Le débit est de 0,5 ml/min. L'absorbance des fractions (2 ml) est mesurée à 280 nm.

7.1.5. Bilan de purification

Le tableau 30 représente les étapes et le bilan de purification des PGases d'*A. pullulans*.

Tableau 30: Etapes et bilan de purification des deux isoenzymes PG1 et PG2.

Etapes de purification	Activité PGase totale (UI)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	2665	1150	2.31	1	100
Précipitation à l'acétone 60%	2000	250	8	3.46	75
Séphacryl S-200					
PG1	1050	26	40.4	17.5	40
PG2	941	35	27	11.7	35.31
DEAE-Sepharose					
PG1	730	1.95	374.36	162.1	27.39
PG2	705	1.98	356.1	153.4	26.45

Au terme de ces étapes de purification, deux isoenzymes (PG1 et PG2) sont purifiées. La quantité de PG1 et de PG2 obtenue est de 1.95 mg avec une activité spécifique de 374.36 UI/mg et 1.98 mg avec une activité spécifique de 356.1 UI/mg respectivement. La PG1 est purifiée 162.1 fois par rapport à l'extrait de départ avec un rendement de 27.39 %. Alors que la PG2 est purifiée 153.4 fois avec un rendement en enzyme de 26.45 %.

8. contrôle de la pureté des isoenzymes par SDS-PAGE et de l'activité enzymatique par zymogramme

La pureté des échantillons, aux différents stades de la purification, est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE (Figure 32). Après trois étapes de purification, une seule bande de protéine dont la masse moléculaire apparente est de 113.79 KDa pour le pic 1 et de 71.44 KDa pour le pic 2. Le zymogramme confirme l'activité enzymatique des deux bandes protéiques ; ce qui laisse supposer que les deux isoenzymes sont monomères (Figure 32). La pectinase d'*A. pullulans* renferme deux isoenzymes avec des masses moléculaires différentes et sous forme monomérique. Les PGases sont déjà identifiées chez les différentes souches d'*A. pullulans*. Ainsi, Stratilovà et al., (2005) rapportent que des masses moléculaires variant de 31 à 54 KDa pour les PGases secrétées par *A. pullulans* CCY 27-1-111. Dans la présente étude, les deux isoenzymes (PG1 et PG2) purifiées et produites par la souche *A. pullulans* (S6) présentent respectivement une masse moléculaire apparente de 113.79 KDa et de 71.44 KDa, masse moléculaire plus élevée que celle signalée dans les travaux précédents, mais équivalente à celles décrites par Pedrolli et Carmona, (2010) et Maller et al., (2013) variant de 70 - 102.6 KDa. Ces mêmes auteurs affirment que les PGases de masse moléculaire élevée sont des enzymes thermostables. Néanmoins, plusieurs études décrivent des PGases de faible masse moléculaire, de 32 KDa (Fahmy *et al.*, 2008)

Pour expliquer la thermostabilité de ces deux isoenzymes, on a déterminé le taux de glycosylation en dosant les sucres (technique de Dubois *et al.*, 1956) dans les isoenzymes PG1 et PG2. Les résultats montrent que la teneur en sucres pour la PG1 et la PG2 sont de 11.6% et 15% de sucres respectivement (exprimé en quantité équivalents de mannose). Ces deux protéines pectinolytiques sont glycosylées, ce qui permet de les classer parmi les glycoprotéines.

La glycosylation, c'est l'ajout d'une chaîne de sucres sur un ou des sites particuliers d'une protéine. Les sucres peuvent se lier de deux façons différentes sur la protéine: une liaison sur une asparagine (soit une N-glycosylation) ou une liaison sur une sérine ou une thréonine (soit une O-glycosylation) (Yanez *et al.*, 1998). Il existe deux types de glycosylation: le type élevé en mannose et le type complexe. En effet, la majorité des bactéries ne font pas de glycosylation. Les bactéries gram-négatives font de la O-glycosylation pour obtenir des glycoprotéines à la surface. Seule la bactérie Gram-négative *Campylobacter jejuni* est connue pour faire de la N-glycosylation (Weerapana et Imperiali, 2006). Par contre, les levures et les cellules des insectes font seulement de la glycosylation de

type mannose. On retrouve de la glycosylation de type complexe chez les parasites, les cellules de mammifères et les cellules de plantes.

La glycosylation peut avoir un impact sur l'activité et la stabilité des enzymes (Li *et al.*, 2015). Bien que le mécanisme moléculaire soit mal compris, les glycanes fixés par covalence peuvent stabiliser une protéine, augmenter sa résistance vis-à-vis de sa dégradation par diverses protéinases et réguler l'activité des enzymes. Cependant, la glycosylation peut avoir aussi un effet positif ou négatif sur la stabilité conformationnelle (repliement de la protéine) (Li *et al.*, 2015) et la position des sites de glycosylation (Houle, 2007).

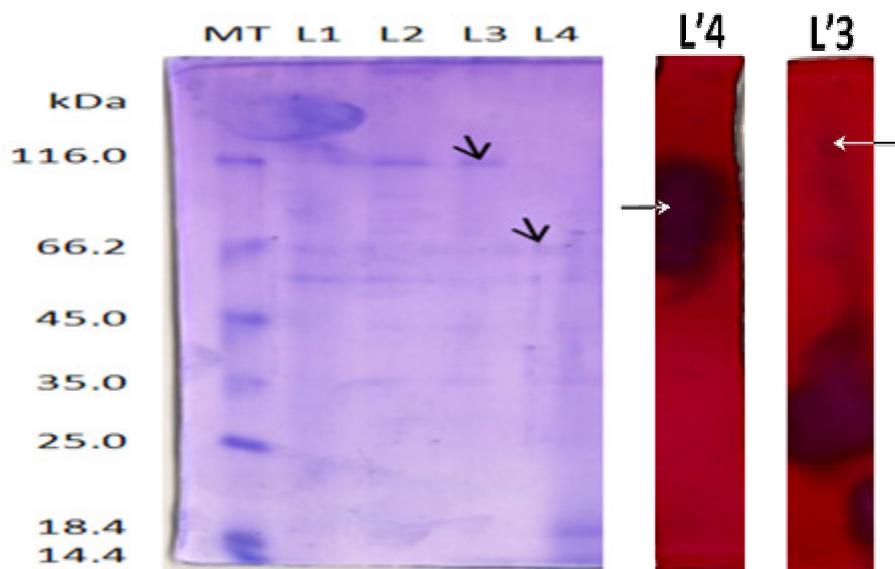


Figure 32: Profil électrophorétique SDS –PAGE des PGases pendant la purification.

Révélation des protéines par le bleu de Coomassie et par zymogramme (acide polygalacturonique comme substrat). MT : marqueurs de taille, L1 : Extrait brut, L2 : Après précipitation à l'acétone, L3 et L4 : Fractions (pic 1 et pic 2) obtenues après filtration sur Séphacryl S-200, L3' : Zymogramme de la PG1, L4' : Zymogramme de la PG2.

9. Mode d'action des isoenzymes purifiées: PG1 et PG2

La chromatographie en couche mince (CCM) permet de déterminer les produits d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique après l'action de la PG1 et de la PG 2 purifiées, après une période d'incubation de 30 min et de 6 h. Une seule tâche visible correspond à l'acide monogalacturonique (Figure 33). Ce résultat permet de se renseigner sur le mode d'action des deux enzymes qui sont de type exo-hydrolase car elles libèrent spécifiquement de l'acide monogalacturonique de l'extrémité terminale de l'acide polygalacturonique : elles sont classées parmi les exo-polygalacturonases (EC 3.2.1.67). Sur la même espèce de levure *A. pullulans* CCY- 27-1-111, Stratilovà *et al.*, (2005) ont purifié une endo-PGase et une exo-PGase.

Ce mode d'attaque est connu chez les PGases fongiques (Dey *et al.*, 2014) et végétales (Gayathri et Nair, 2015). Les PGases bactériennes produisent également un autre type d'exo-PGases (EC 3.2.1.82) qui libèrent un dimère d'acide galacturonique (Quiroga *et al.*, 2009). Les levures synthétisent principalement des endo-PGases qui dégradent les pectines ou l'acide polygalacturonique par hydrolyse aléatoire des liaisons glycosidiques α -1,4. (Blanco *et al.*, 1999).

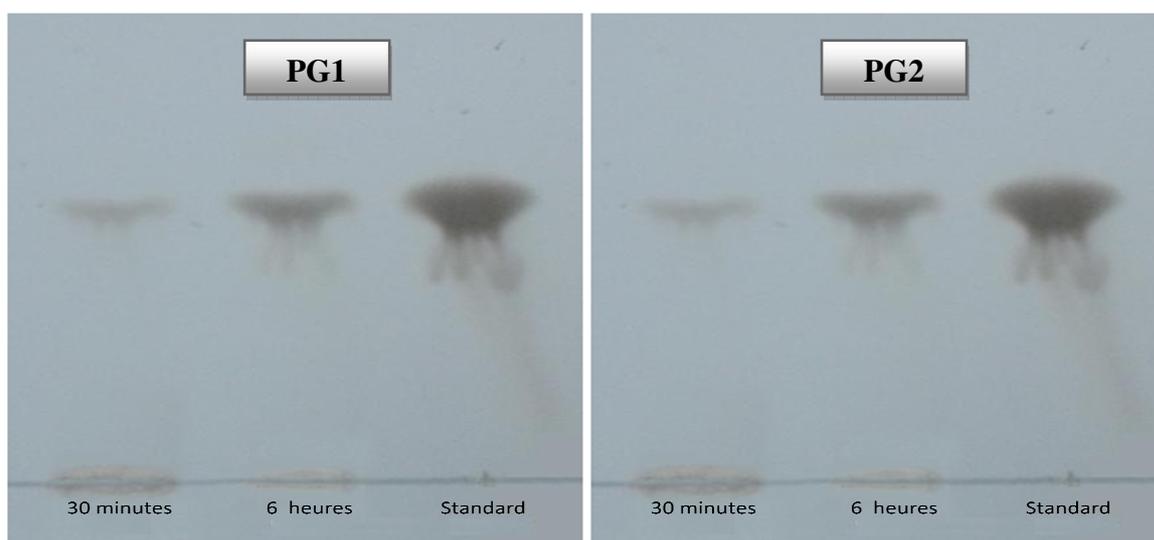


Figure 33: Chromatographie en couche mince (CCM) des produits de réaction de l'acide polygalacturonique hydrolysé par différents temps d'hydrolyse des PG1 et PG2 purifiées. Standard : 10 g/l d'acide mono-galacturonique.

10. Caractérisation des isoenzymes purifiées

L'effet du pH et de la température sur les deux activités PGases, la spécificité de substrat et d'autres paramètres sont étudiés.

10.1. Influence du pH sur l'activité des PGases purifiées

L'activité des deux PGases purifiées est testée sur une gamme de pH comprise entre pH 3.0 et pH 12.0. Les activités relatives obtenues sont présentées dans la figure 34. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats, montre que le pH exerce un effet hautement significatif sur les activités PG1 [$F = 233.0$; $p = 0$] et PG2 [$F = 87.9$; $p = 0$] (Tableau 3 et 4 en annexe 4). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, il ressort que le pH 10 et le pH 5 sont respectivement les pH optimums de la PG1 et de la PG2 (Tableau 3 et 4 en annexe 4).

La PG1 est hautement active dans une large gamme de pH, entre 5 et 12. En effet, les activités relatives dans cette zone de pH sont supérieures à 75%, avec un optimum d'activité à pH 10 où l'enzyme garde 100% de son activité relative, alors qu'elle garde 86% de son activité à pH 7 et à pH 11 (Figure 34A). On peut donc conclure que la PGase purifiée est de nature alcaline et peut être appliquée dans divers procédés industriels où les conditions alcalines sont requises : fabrication du papier, textile, traitement des eaux usées et les industries des jus de légumes. Dans le secteur industriel les PGases alcalines sont principalement d'origine bactérienne et jusqu'à ce jour aucun travail n'a été publié dans ce sens concernant les PGases alcalines d'origine levurienne.

La figure 34B montre que la PG2 présente un pH optimum de 5 où l'enzyme conserve une activité relative considérable, plus de 88% dans un domaine des pH allant de 4.5 à 8. Le champ d'application de cette isoenzyme est aussi très large dont le pH d'action varie de pH 4.5 à 8. Ces dernières données sont en accord avec certaines recherches déjà rapportées dans la littérature : pH 5.4 pour la PGase levurienne d'*A. pullulans* (Statilová *et al.*, 2005), pH 5 pour la PGase de la levure *S. cerevisiae* (Vijayakumar *et al.*, 2015) et pH 5 pour la PGase de la bactérie *C. liquifaciens* N6 (Abe *et al.*, 2006). Certains exemples de la littérature sont rapportés aussi dans le tableau 31. La PG 2 d'*A. pullulans* est encore active à pH 4.5 (acide) et à pH 8 (alcalin), ce qui prédispose cette enzyme à plusieurs applications industrielles: industrie agroalimentaire, procédé de fabrication du papier.

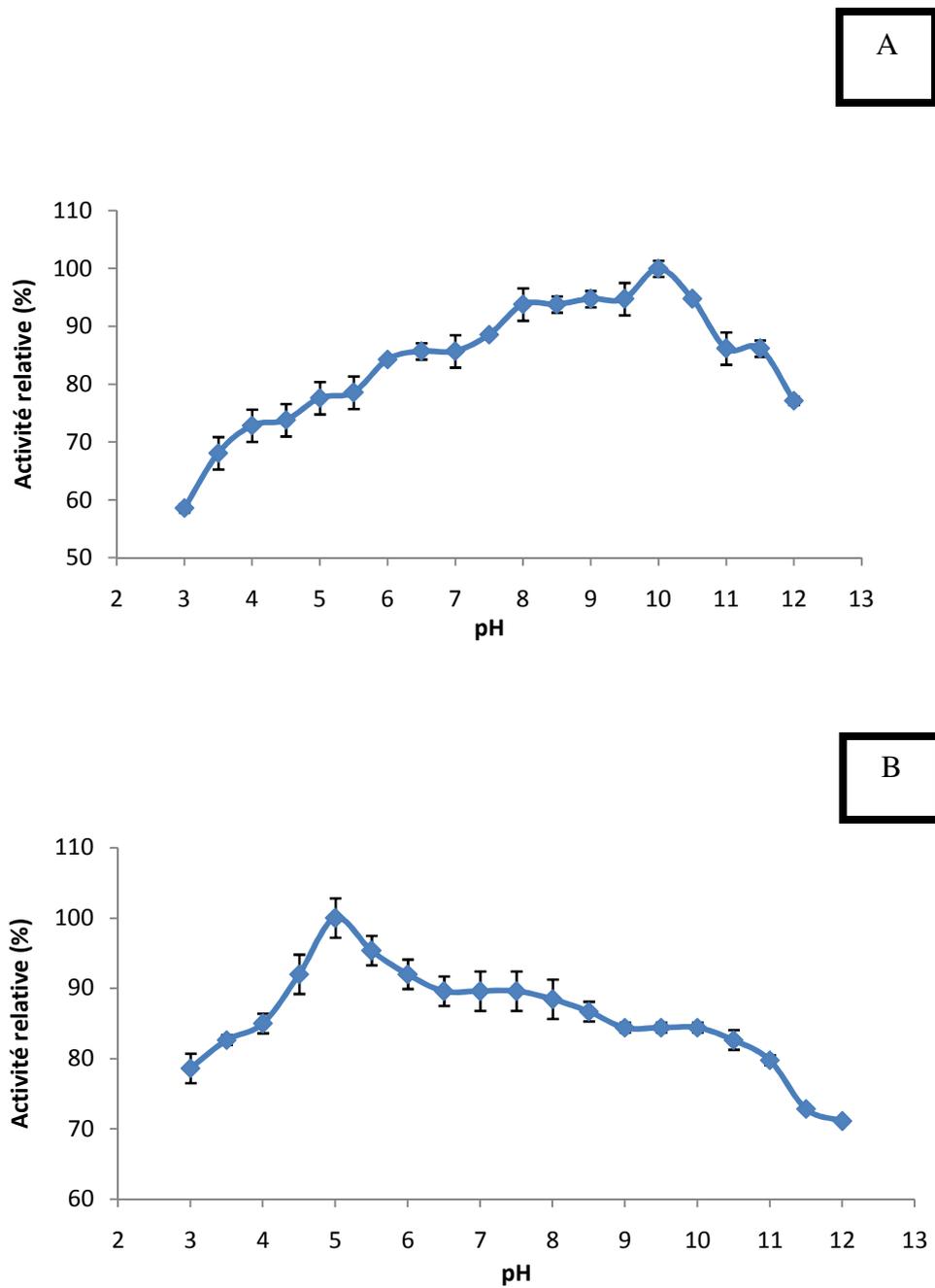


Figure 34: Influence du pH sur les activités enzymatiques purifiées: PG1 (A) et PG2 (B). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

10.2. Etude de la stabilité vis-à-vis du pH

La plupart des exo-PGases sont produites par des champignons. Ces exo-PGases fongiques ont une activité maximale de pH 4 à 5, mais perdent leur stabilité dans des conditions acides et basiques (Niture, 2008). La stabilité de l'enzyme vis-à-vis des pH est une propriété biochimique très recherchée par les industriels. Pour cela, des activités PG1 et PG2 sont testées après incubation de tampons dans une gamme allant de pH 3 à 12 pendant 24 h à 4°C. Le profil de la stabilité du pH montre que les deux isoenzymes purifiées (PG1 et PG2) sont très stables sur un large intervalle de pH. Elles conservent 100% de leur activité à des valeurs de pH comprises entre 7 et 11 pour la PG1 (stable à des pH neutres et alcalins) et entre pH 4 et pH 9 pour la PG2 (stable sur un intervalle plus large) (Figure 35) après 24 h d'incubation à 4°C.

Les deux activités enzymatiques (PG1 et PG2) semblent être supérieures par rapport à celles de la plupart des exo-polygalacturonases, y compris l'exo-PGU B recombinante active à pH 2 -12 mais qui ne retient qu'une activité > 35% à cet intervalle de pH (Yuan *et al.*, 2012). La NfPG I recombinante se stabilise à des pH neutres conservant plus de 75% d'activité à pH 5 - 7. Quand à la NfPG II recombinante, elle est stable aux pH acides et conservent plus de 75% d'activité à un pH de 2 - 6 (Pan *et al.*, 2015).

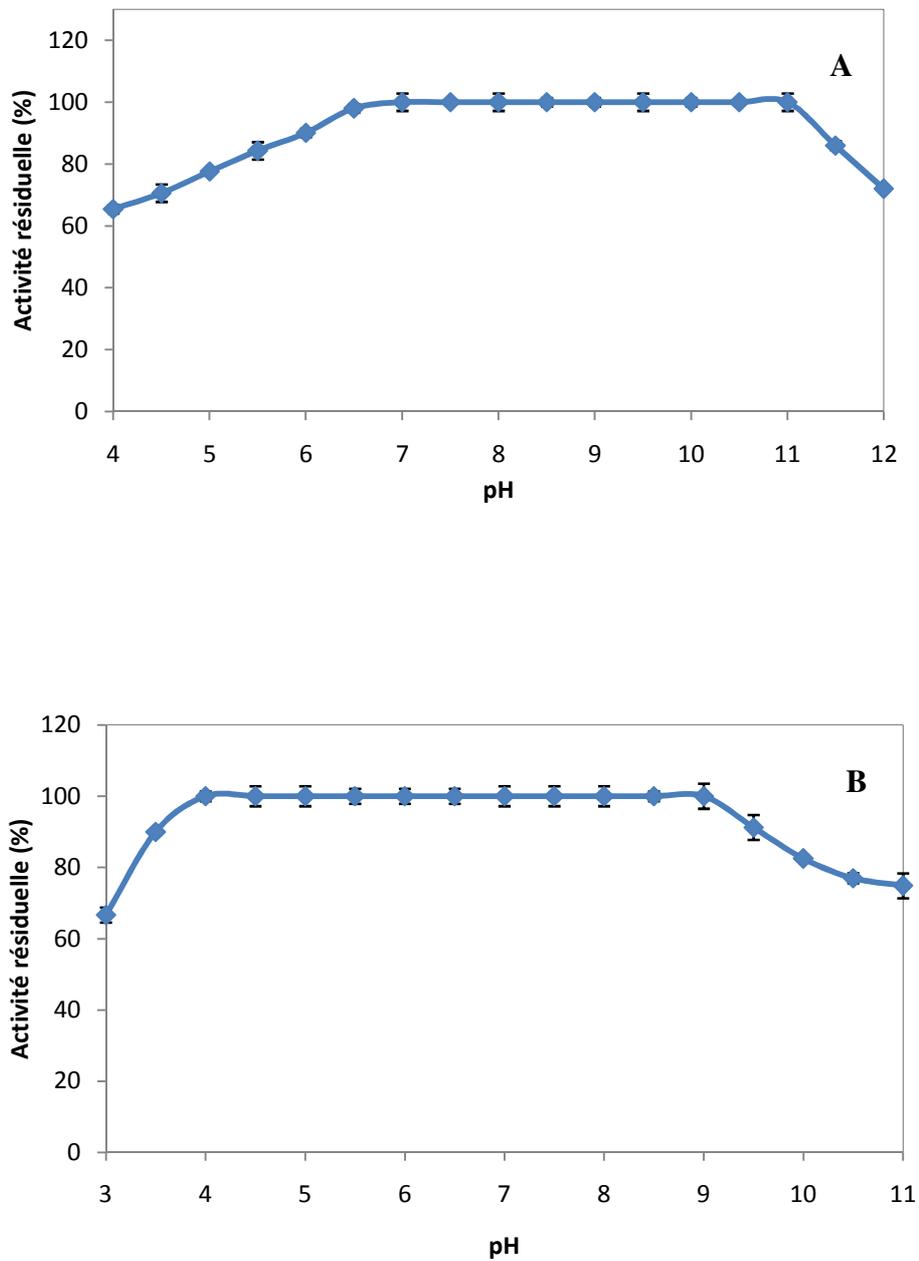


Figure 35: Etude de la stabilité en fonction du pH de la PG1 (A) et de la PG2 (B) purifiées. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

10.3. Influence de la température sur l'activité des PGases purifiées

L'influence de la température sur les activités enzymatiques est déterminée à pH 10 pour la PG1 et à pH 5 pour la PG2, à différentes températures (10°C – 90°C). La figure 32 décrit une importante augmentation de l'activité en fonction de la température. Les activités relatives des deux isoenzymes purifiées (PG1 et PG2) atteignent leur valeur maximale à 65°C et 75°C, respectivement. 80 à 100% de l'activité de la PGase est préservée aux températures situées entre 35 et 70°C pour la PG1 et entre 30 et 90°C pour la PG2 (Figure 36). La PG1 maintient une forte activité sur une large gamme de température (de 35°C à 70°C) où elle atteint des valeurs élevées (plus de 80% de l'activité originale est retenu), avec un pic à 65°C et elle garde 75% de son activité relative à 80°C. Cependant l'activité PG2 (Figure 36) a un pic à 75°C où plus de 85% de l'activité est conservée à 90°C. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats, montre que la température exerce un effet hautement significatif sur les activités PG1 [F = 128.3 ; p = 0] et PG2 [F= 131.7 ; p = 0] (Tableau 5 et 6 en annexe 4). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, il ressort que 65°C et 75°C sont les températures optimales de la PG1 et de la PG2 respectivement (Tableau 5 et 6 en annexe 4).

La température optimale des activités pectinolytiques varie en fonction de l'espèce microbienne et de son biotope. En effet, la température optimale des PGases levuriennes varie entre 9 et 60°C (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011), alors que celle des bactéries varie entre 45 et 75°C (Kashyap *et al.*, 2001). Certains exemples de la littérature sont rapportés aussi dans le tableau 31. La température des PGases de la souche S6 est équivalente à celle de la souche recombinante NfPG4 avec une température optimale de 65°C et celle de NfPG5 recombinante avec un optimum de 70°C (Li *et al.*, 2015).

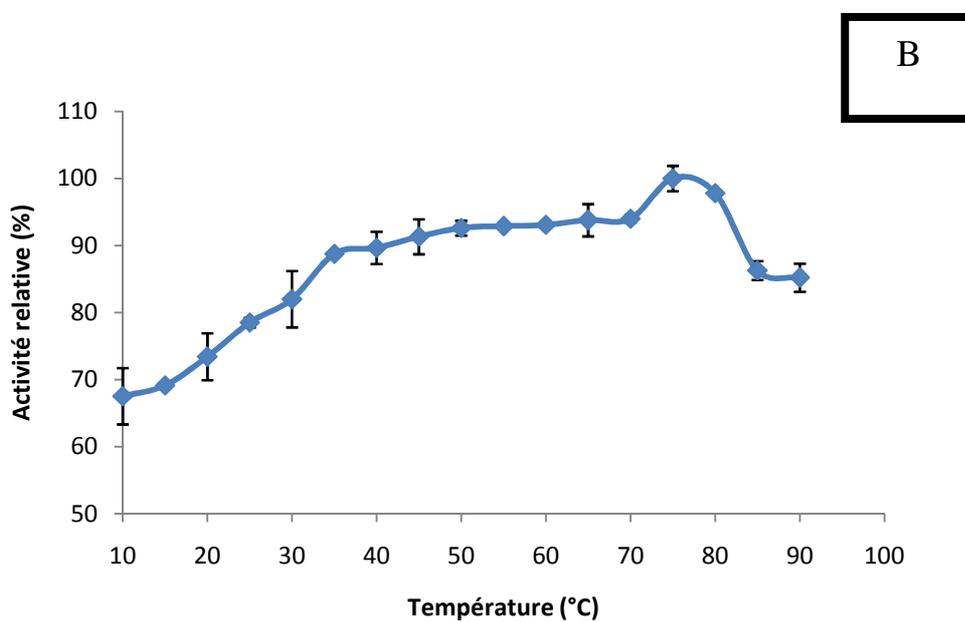
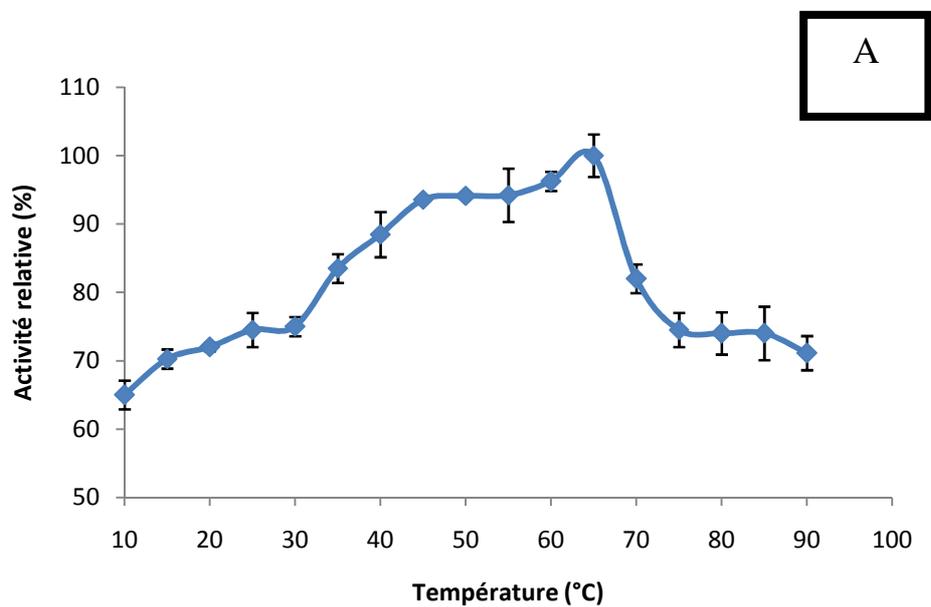


Figure 36: Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques purifiées: PG1 (A) et PG2 (B). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

10.4. Etude de la thermostabilité des PGases purifiées

La thermostabilité des enzymes purifiées (PG1 et PG2) est testée à pH 10 pour la PG1 et à pH 5 pour la PG2 après un traitement thermique d'une durée de 5 heures de l'extrait enzymatique purifié à trois températures différentes : (60, 80 et 90°C).

D'après la figure 37, il ressort que :

- ✓ La PG1 conserve toute son activité après 5 h d'incubation à 60°C. Elle maintient 81,85% de son activité initiale, après 2 h d'incubation à 80°C. A 90°C la PG1 est toujours stable après 5 h d'incubation ; elle perd seulement 30% d'activité initiale.
- ✓ La PG2 est stable à 60, 80 et 90°C et l'activité totale retenue est respectivement de 100%, 88,58% et 70% après 5 h d'incubation à ces trois températures.

Les exo-PGases produites par la souche *A. pullulans* (S6) sont des enzymes thermostables et dépassent largement les valeurs rapportées par la littérature. Contrairement à d'autres PGases de *Bispora sp.* MEY-1 (Yang *et al.*, 2011) et *A. niger* MTCC3323 (Kant *et al.*, 2013) qui sont mésophiles (< 60°C), la protéine recombinante NfPG II possède une température optimale supérieure à 65°C. Cependant, l'enzyme n'est pas stable, elle conserve son activité après seulement 1 h d'incubation à 60°C (Pan *et al.*, 2015). De même, les enzymes recombinantes NfPG4 et NfPG5 possèdent des températures optimales de 65°C et de 70°C respectivement. Cependant, elles perdent rapidement leur activité après 10 min d'incubation à 65°C (Li *et al.*, 2015) (Tableau 31).

Il est à noter que les enzymes pectinolytiques thermostables ont un grand potentiel dans les processus industriels tels que l'industrie alimentaire, l'industrie de textile et la papeterie (Garg *et al.*, 2016). Les enzymes produites par la souche isolée (S6) répondent parfaitement aux exigences industrielles.

L'existence de ponts salins renforce la thermostabilité des enzymes (Pezzullo *et al.*, 2013). Le rôle des cofacteurs n'est pas à exclure et des autres liaisons présentes dans la structure tertiaire, comme les liaisons hydrogènes, les liaisons hydrophobes, les interactions ioniques et les ponts disulfures (Kumar *et al.*, 2000). De plus, une présence accrue de résidus d'arginine et de tyrosine concomitante avec une réduction du nombre de cystéine et de sérine est observée chez les enzymes thermostables (Kumar *et al.*, 2000). La richesse en paires de base CG des mRNA des protéines est également un facteur stabilisant vis-à-vis des traitements thermiques (Trivedi *et al.*, 2006). La glycosylation est aussi un autre moyen utilisé

par les organismes pour stabiliser les enzymes (Li *et al.*, 2015). Ce qui confirme la stabilité des deux isoenzymes purifiées (PG1 et PG2) de la souche S6 vis-à-vis de la température et du pH par la présence de glucides dosés (cité dans le paragraphe 8). Donc la glycosylation a participé certainement au maintien de la structure spatiale des enzymes malgré les traitements thermiques subis.

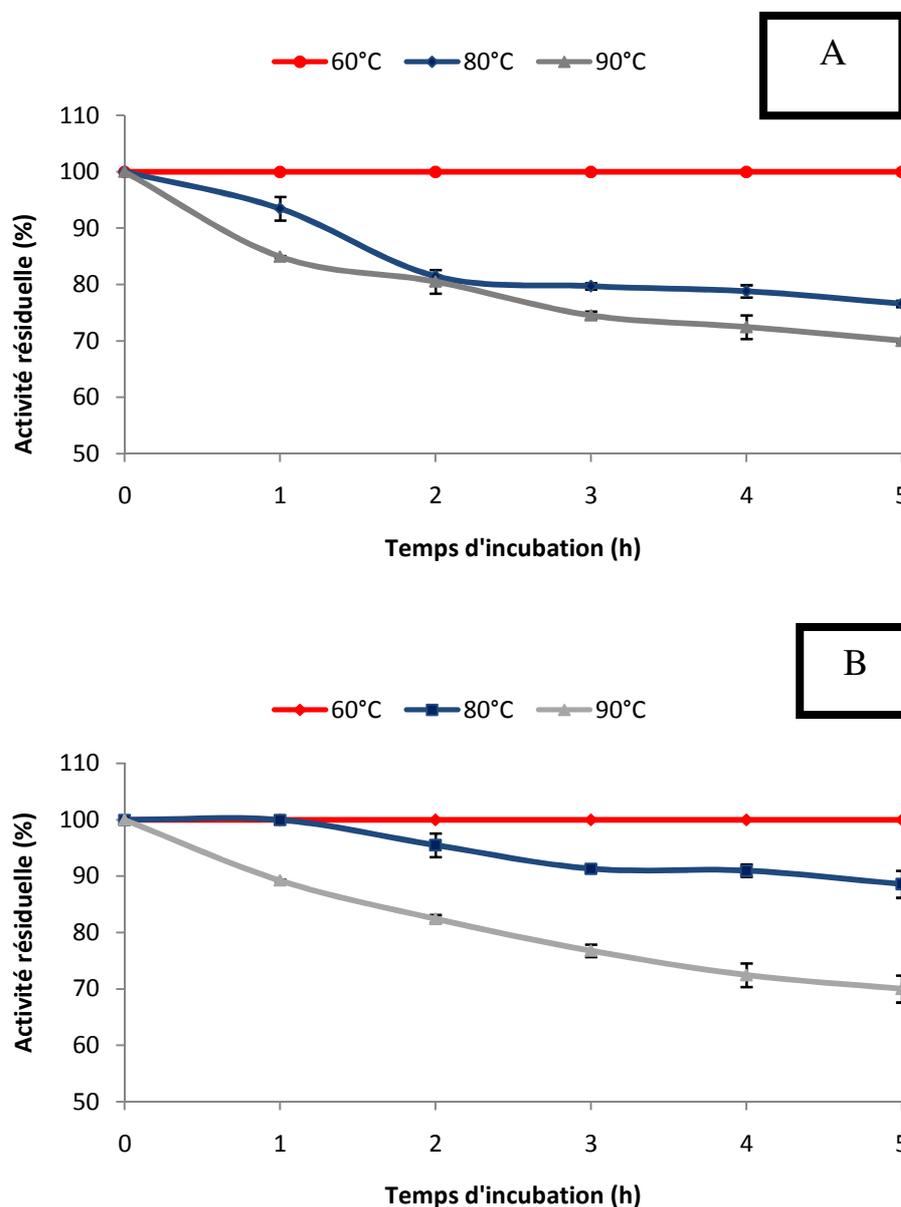


Figure 37: Etude de la thermostabilité de la PG1 (A) et de la PG2 (B) purifiées à différentes températures. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

Tableau 31: Caractérisation de quelques PGases d'origine microbienne rapportée par la littérature.

Micro-organisme	Type de PGase	pH optimum	Température optimale (°C)	Autres propriétés	Référence
<i>Penicillium occitanis</i>	Endo-PG	5	70	PM = 45 KDa Stable à 40-50°C	Tounsi <i>et al.</i> , 2016
<i>Neosartorya fischeri</i> P1	NfPGI	5	< 60	PM = 37.9 KDa, Stable à pH 5-7	Pan <i>et al.</i> , 2015
	NfPGII	4	60	PM = 38.2 KDa Stable à pH 2-6	
	NfPGIII	3.5	< 60	PM = 50.2 KDa Stable à pH 3-8	
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 6652		4.5	50	PM = 30 KDa	Dey <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus niger</i>	Exo-PG1	3.4-3.8	60	PM = 82 kDa	Sakamoto <i>et al.</i> , 2012
	Exo-PG2	3.4-4.2		PM = 56 KDa	
<i>Bispora sp.</i> MEY-1	Endo-PGA1	3.5	50	Stable à pH 2-7	Yang <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sojae</i>	Exo-PG	5	55	80% d'activité initiale retenue après 1 h d'incubation à 65°C.	Tari <i>et al.</i> , 2008
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS1555	Endo-PG	5	50 - 60	-	Sanchez <i>et al.</i> , 1984
<i>Aureobasidium pullulans</i> (S6)	Exo-PG1	10	65	PM = 113.79 KDa Stable à pH 7-11 PM = 71.44 KDa, Stable à pH 4-9 Stables après 5h d'incubation à 60°C	La présente étude
	Exo-PG2	5	75		

10.5. Spécificité des PGases purifiées vis-à-vis de quelques substrats

L'activité des PGases purifiées (PG1 et PG2) est examinée en présence de différents substrats [acide polygalacturonique d'orange (PGA), pectine de citron (DM : 72%), pectine de pomme (DM : 67%), Carboxyméthylcellulose et Xylane]. L'analyse de la figure 38 montre que les meilleures activités sont obtenues avec la PGA pour les enzymes PG1 et PG2. Ces deux enzymes sont très spécifiques aux substances pectiques. Il est à noter que les activités relatives enregistrées sont beaucoup plus élevées que celles rapportées pour les PGases fongiques (Tounsi *et al.*, 2016).

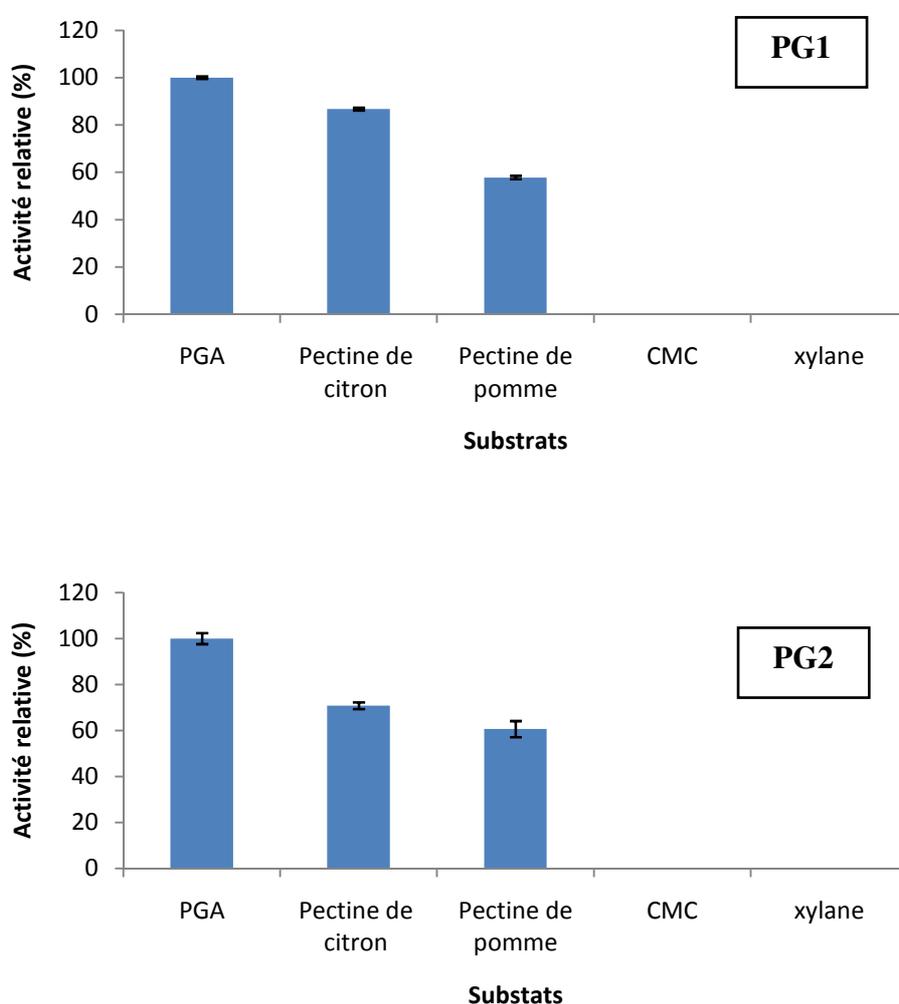


Figure 38: Spécificité du substrat de la PG1 et de la PG2 purifiées.

10.6. Etude des paramètres cinétiques des PGases purifiées

Les deux isoenzymes purifiées PG1 et PG2 présentent une cinétique classique de Michaelis–Menten avec l'acide polygalacturonique (PGA) comme substrat. La représentation graphique de Lineweaver et Burk (Figure 39) permet de déterminer les paramètres cinétiques (K_m , V_{max}) pour les deux enzymes. Les valeurs de K_m et de V_m pour l'hydrolyse de la PGA sont respectivement de 3,70 mg/l et de 2.2 UI pour la PG1 ; de 2.17 mg/ml et de 2.1 UI pour la PG2. La faible valeur de K_m de la PG2 suggère une meilleure affinité pour le substrat.

Les valeurs respectives de K_m 3.70 et 2.17 mg/ml pour la PG1 et la PG2 entrent parfaitement dans la gamme des valeurs annoncées par la littérature variant de 1.017 mg/ml pour l'enzyme de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 (Ur Rehman *et al.*, 2015) à 6.7 mg/ml pour la PGase d'*Aspergillus niveus* (Maller *et al.*, 2013).

En ce qui concerne la vitesse maximale (V_m) indicatrice sur l'état de l'activité catalytique d'une enzyme, il est souhaitable qu'elle soit la plus élevée possible. Les valeurs de 2.2 UI (PG1) et 2.1 UI (PG2) trouvées dans cette étude sont supérieures aux PGases commerciales largement utilisées dans la clarification de jus de pomme Rapidase C8 ($V_m = 1.91$ UI) et Pectinase CCM ($V_m = 1.31$ UI) (Ortega *et al.*, 2007).

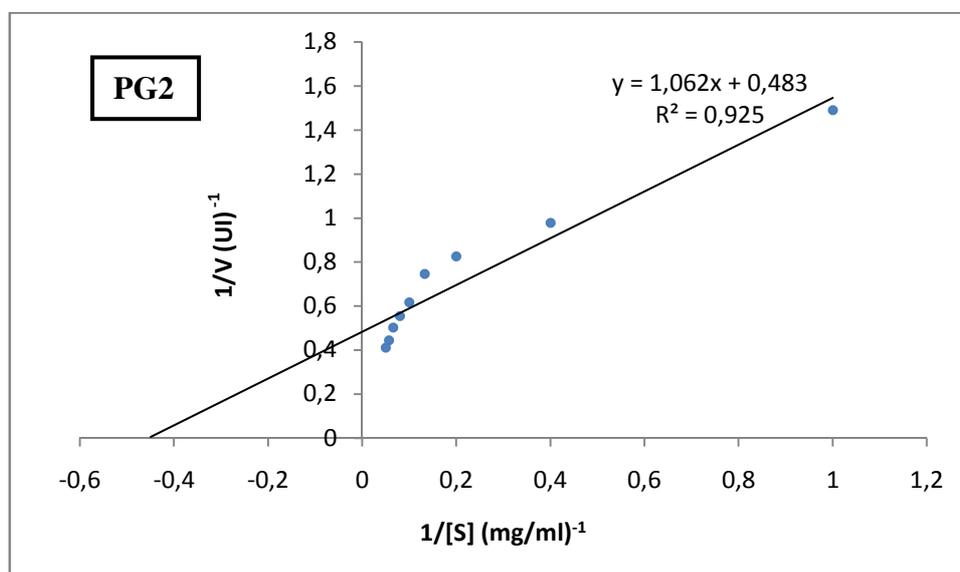
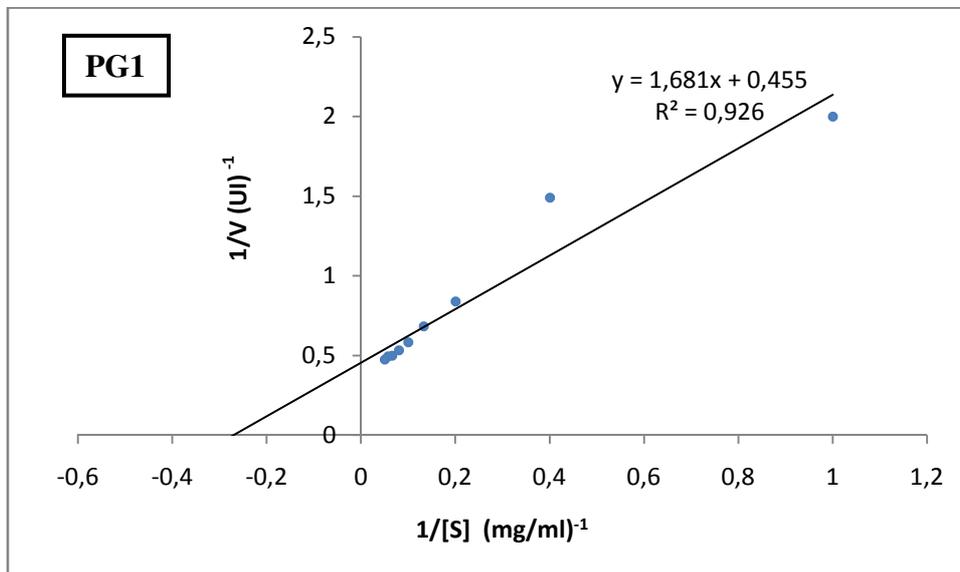


Figure 39: Représentation de Lineweaver-Burk de la PG1 et de la PG2 purifiées.

10.7. Effet des ions métalliques et des réactifs chimiques sur l'activité des PGases purifiées

10.7.1. Effet des ions métalliques

L'effet de différents cations permet entre autre de fournir des indices sur la structure de l'enzyme mais également sur les facteurs essentiels à son activité. Par conséquent, l'étude de l'effet des ions métalliques monovalents et bivalents sur les deux activités pectinolytiques est présentée sur la figure 40. Les deux isoenzymes PG1 et PG2 sont induites en présence de 0.2 mM d'ions Co^{2+} . Selon Yadav *et al.*, (2012) une concentration de 1 mM stimule aussi l'exo-PGase de *Rhizopus oryzae* MTCC 1987. De plus, à une concentration de 2 mM de Mn^{2+} et à une concentration de 0,2 mM de Hg^{2+} l'activité PG2 est augmentée. Cela signifie que les deux enzymes nécessitent ces co-facteurs afin de stabiliser ou activer l'enzyme. La présence des ions Mn^{2+} , en tant que stabilisateur des enzymes pectinolytiques a été déjà rapportée dans plusieurs travaux (Gummadi et Panda, 2003 ; Maller *et al.*, 2013). Cet effet bénéfique peut être expliqué par un changement conformationnel de la protéine qui permet une meilleure accessibilité du substrat au site actif ou une stabilisation de la structure de l'enzyme (Pan *et al.*, 2015). L'effet stimulateur des ions Mn^{2+} est démontré par d'autres études : PGases de *Klebsiella sp.* Y1 (Yuan *et al.*, 2012), *Aspergillus oryzae* (Chen *et al.*, 2014) et *Neosartorya fischeri* P1 (Pan *et al.*, 2015).

Ces deux isoenzymes sont fortement résistantes aux métaux lourds: le Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} et Zn^{2+} . Il a été démontré que la résistance aux métaux lourds caractérise les enzymes thermostables (Li et Zhang, 2005). Les autres ions restent sans effet sur les deux activités pectinolytiques.

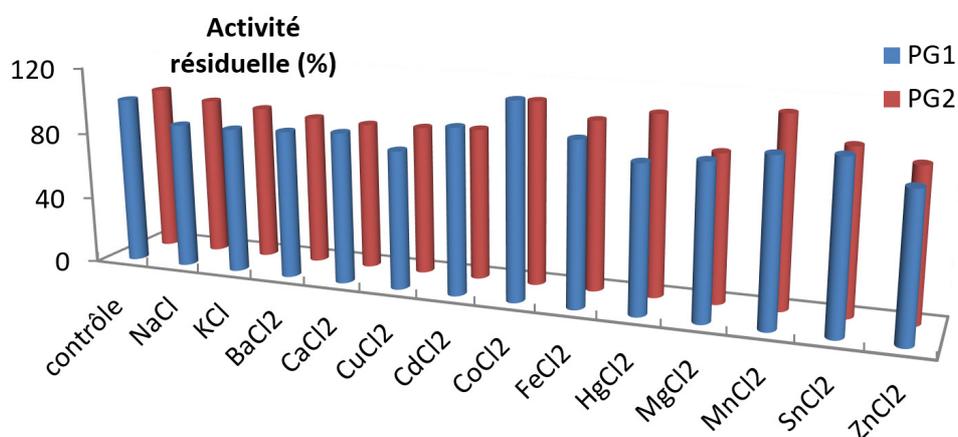


Figure 40: Effet de différents ions métalliques sur les activités de la PG1 et de la PG2 purifiées.

10.7.2. Effet des réactifs chimiques

L'influence de différents réactifs chimiques sur les activités pectinolytiques est également testée et les résultats sont consignés dans la figure 41.

Les enzymes purifiées (PG1 et PG2) conservent pratiquement toute leur activité en présence de l'EDTA, un chélateur de cations ; ce qui indique que les deux isoenzymes ne peuvent pas être des métalloenzymes. L'effet nul de l'EDTA sur les PGases est signalé aussi par Tounsi et al., (2016), chez la moisissure *Penicillium occitanis*.

En présence de l'SDS (agent dénaturant ionique), de l'urée et de détergents non ioniques (Tween 80, Triton X- 100) les deux enzymes restent stables et actives, démontrant encore une fois la grande stabilité et versatilité de la PG1 et de la PG2.

De même, les deux activités pectinolytiques sont conservées en présence du glycérol 0.1% qui est principalement utilisé en tant qu'agent protecteur en conservation. Par conséquent, le glycérol peut être recommandé pour la conservation de l'enzyme polygalacturonase pendant le stockage.

Le β -mercaptoéthanol et le DTT (agents réducteurs) sont de puissants stimulateurs de la PGase, augmentant les activités de la PG1 et de la PG2 de 1.36 fois, 1.95 fois et 1.40 fois, 2.38 fois respectivement. L'augmentation de l'activité engendrée par ces composés suggère une influence de la cystéine (oxydation de la liaison S-S entre les résidus cystéines) dans la catalyse du substrat. Ce qui indique que la cystéine doit être impliquée dans le mécanisme d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique. Une explication à cela serait une implication de la cystéine dans la liaison hydrogène avec le substrat, le repliement de l'enzyme et la formation de l'intermédiaire glycosyle - substrat (Celestino *et al.*, 2006 ; Lu *et al.*, 2016). De plus, ces résultats confirment la structure monomérique des deux isoenzymes purifiées. Tounsi et al., (2016) ; Pan et al., (2015) trouvent des résultats similaires à cette étude.

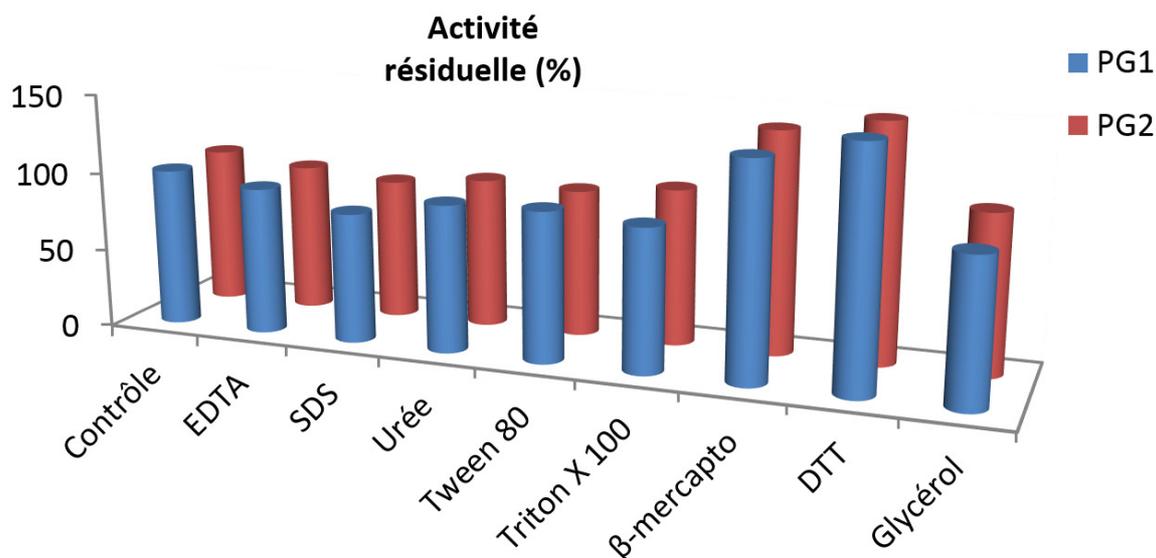


Figure 41: Effet de différents réactifs chimiques sur les activités de la PG1 et de la PG2 purifiées.

11. Essais d'application des PGases purifiées dans la clarification de jus de citron

Du point de vue application, la capacité des exo-PGases purifiées (PG1 et PG2) produites par la levure *A. pullulans* (S6) est testée dans la clarification de jus de citron. Les enzymes purifiées PG1 et PG2 sont comparées avec l'extrait brut (EB) pour voir leur effet sur un jus de citron fraîchement pressé.

Un volume de cinq ml de jus est incubé soit avec l'extrait brut (EB), soit avec PG1 ou PG2 purifiées pendant 4 h à 30°C. Les échantillons traités et non traités sont ensuite laissés à décanter pendant 48 heures à 4°C et photographiés (Figure 42). Une nette différence est observée entre les tubes traités et le contrôle. Les deux exo-PGases (PG1 et PG2) donnent un jus limpide. L'analyse du jus clarifié montre une augmentation du volume du surnageant, à 30% [= (4 ml - 2,5 ml) / 5 ml], 33% [= (4.15 ml - 2.5 ml) / 5 ml] et 33.4% [= (4.17 ml - 2,5 ml) / 5 ml] avec EB, PG1 et PG2 respectivement par rapport à l'échantillon non traité, considéré comme témoin (Tableau 32).

L'analyse du tableau 32 montre aussi une augmentation de la quantité de sucres réducteurs libérés après traitement enzymatique dans le jus de citron, avec une diminution du poids sec et de l' A_{420} .

La clarification du jus de citron est due à la dégradation des molécules de pectine insolubles en molécules d'acide galacturonique solubles grâce aux enzymes extracellulaires,

les PG1 et PG2. En conséquence, la couleur et le goût des produits de jus de citron sont également améliorés.

Tableau 32: Effet des PGases purifiées (PG1 et PG2) et de l'extrait brut sur le taux de clarification du jus de citron. Les sucres réducteurs et le volume sont mesurés dans le surnageant. Le Poids sec dans le culot est pesé après centrifugation du jus traité.

	Contrôle	Extrait brut	PG1 purifiée	PG2 purifiée
Sucres réducteurs (mg/ml)	4.7 ± 0.010	11.22 ± 0.049	10.05 ± 0.098	10.77 ± 0.041
Volume de surnageant (ml)	2.5 ± 0.000	4.000 ± 0.000	4.15 ± 0.000	4.17 ± 0.000
Poids sec (g)	1.25 ± 0.003	0.150 ± 0.045	0.124 ± 0.002	0.126 ± 0.005
A ₄₂₀	1.6 ± 0.002	0.739 ± 0.01	0.339 ± 0.3	0.321 ± 0.2

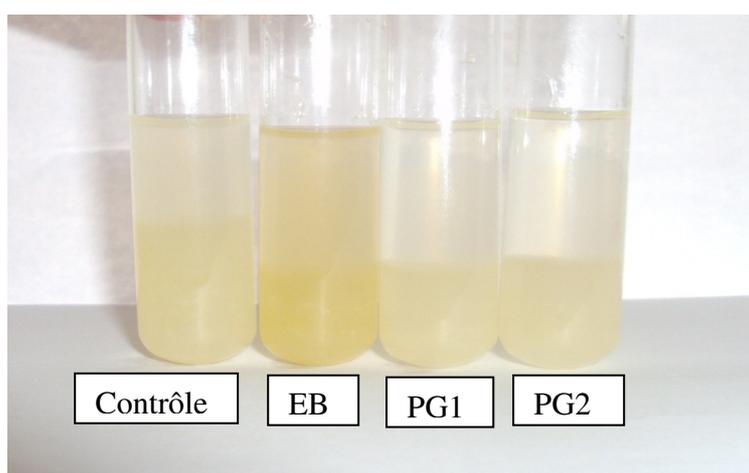


Figure 42: Clarification du jus de citron par la PG1 et la PG2 (PGases purifiées) ou par EB (extrait brut) de la souche isolée *A. pullulans* (S6).

Conclusion partielle

Le profil chromatographique sur Séphacryl S-200 révèle deux activités pectinolytiques confirmées par une élution sur DEAE-Sepharose révélant l'existence de deux isoenzymes : la PG1 et la PG2. Ces deux isoenzymes sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 162.1 et 153.4 et des rendements de 27.39% et 26.45%.

Sur SDS-PAGE des deux isoenzymes purifiées, les masses moléculaires sont estimées à 113.79 KDa pour la PG1 et 71.44 KDa pour la PG2 avec 11.6% et 15% respectivement de carbohydrates, ce qui permet de les classer parmi les glycoprotéines. La glycosylation

explique en partie la thermostabilité des deux isoenzymes et leur résistance aux différents traitements chimiques (pH, ions, détergents et produits chimiques).

La chromatographie sur couche mince (CCM) montre que les deux isoenzymes hydrolysent l'acide polygalacturonique en acide monogalacturonique, prouvant que les deux isoenzymes sont des exo-polygalacturonases (E.C 3.2.1.67).

D'autres propriétés biochimiques sont également élucidées ; la PG1 purifiée à une activité optimale à 65°C et un pH optimum de 10, alors que la PG2 possède une température optimale de 75°C et un pH optimum de 5. Ces deux paramètres sont favorables à l'utilisation de ces exo-PGases dans plusieurs secteurs industriels: industrie agroalimentaire, procédés de fabrication du papier et du textile. L'étude de la stabilité des deux isoenzymes a montré une bonne stabilité entre pH 7-11 pour la PG1 et entre pH 4-9 pour la PG2. Les traitements thermiques, respectivement de 5 h à 60°C, 80°C et 90°C, indiquent que la PG1 conserve 100%, 76.6% et 70% de son activité. Pour la PG2, elle maintient 100%, 88.58% et 70% de son activité initiale après 5 h d'incubation aux mêmes températures.

L'acide polygalacturonique est le meilleur substrat pour les deux exo-PGases, impliquant une grande spécificité pour les substrats pectiques. Les paramètres cinétiques des deux isoenzymes sont déterminés : les Km respectives de la PG1 et de la PG2 sont égaux à 3.70 mg/ml et 2.17 mg/ml. Les Vmax ont pour valeur de 2.2 UI (PG1) et 2.1 UI (PG2).

Les cations Co^{2+} stimulent les deux activités exo-PGases, alors que Mn^{2+} et Hg^{2+} ont un effet activateur uniquement pour la PG2. L'absence d'inhibition des deux isoenzymes par l'EDTA suggère qu'elles ne sont pas des métallo-enzymes. L'activation par les agents réducteurs (DTT et β -mercaptoethanol) indique que les deux isoenzymes contiennent des cystéines et confirment aussi la structure monomérique de la PG1 et de la PG2.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

« *Il est facile de manquer le but et difficile de l'atteindre* »

Aristote.

Le présent travail constitue une contribution à l'étude de la biodiversité des levures isolées à partir de sol aride d'Algérie dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de produire des enzymes pectinolytiques thermostables.

Les sols arides d'Algérie se sont, donc, avérés comme étant un des biotopes particuliers abritant une biodiversité intéressante de levures utiles dont les levures thermophiles. Vingt souches de levures (S1- S20) sont isolées à partir des échantillons de sol de palmeraies et de steppe dans la région d'El-M'gheir Wilaya d'El-Oued (Sud-Est d'Algérie).

L'identification morphologique des différentes espèces isolées, par des clés d'identification appropriées et la caractérisation moléculaire et phylogénique sont réalisées. L'identification moléculaire (séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique et de l'ITS) permet de classer les 20 isolats de levures en 5 espèces différentes: *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* et *Yarrowia lipolytica*. En effet, les souches algériennes sont classées dans les mêmes clusters que les souches provenant du Genbank. Donc l'identification moléculaire a confirmé l'identification morphologique.

La souche S6 isolée de sol de palmeraies (olivier et vigne) est affiliée à l'espèce *Aureobasidium pullulans*, attributaire d'un numéro d'accèsion DBVPG 5844, est productrice de cinq enzymes : pectinase, amylase, protéase, lipase et estérase. Par conséquent, par sa performance dans la production de pectinase, cette levure est sélectionnée pour la suite des travaux sur la production d'enzymes pectinolytiques par culture en batch et leurs purifications et caractérisations. Les études publiées concernant cette souche révèlent son appartenance aux sols et sédiments marins. Cependant, cette étude est la première à l'avoir mis en évidence dans un biotope aride.

Le second objectif visé dans ce travail est la valorisation des sous-produits de la filière tomate transformée par fermentation afin de produire une substance à haute valeur ajoutée

comme la polygalacturonase d'intérêts industriels. Ce procédé permet d'exploiter toute la matière organique de ces déchets agro-industriels disponibles en grande quantité et non utilisés pour cet effet.

Donc les déchets de tomates sont choisis comme matière première de départ en raison des grandes quantités produites annuellement et la nécessité pour les industries de transformation de la tomate de trouver d'autres alternatives pour leur élimination. D'autre part, ces déchets, produits en été, peuvent être séchés à l'air libre sans aucune consommation d'énergie. Ils présentent un substrat riche en matière organique complexe et minérale très économique.

L'étude de la composition des déchets de tomate révèle sa richesse en sucres totaux (20.25%), en matière minérale (5.83%) et une teneur importante en protéines (18.31%). De plus, ils constituent une source importante de pectine (d'après la littérature). De ce fait, ils sont considérés comme milieu favorable pour la croissance de la levure et la production d'enzymes (PGases).

L'utilisation d'une concentration de 4% de déchets de tomates donne la meilleure production en enzyme. Parmi les différentes sources carbonées testées, il apparaît que le lactose est le meilleur inducteur de l'enzyme où il provoque une augmentation de 642% à 24 heures de fermentation. Néanmoins, pour permettre une bonne croissance levurienne et par conséquent améliorer (optimiser) d'avantage la production en PGase, le milieu de base nécessite un enrichissement par le lactose (pour son rôle inducteur de la PGase), le glucose (pour son assimilation facile par la levure et aussi pour son effet inducteur) et le calcium nécessaire à la stabilité de l'enzyme. Pour cela, un plan statistique expérimental: Plackett – Burman (1946) et Plan de Box-Wilson (1951) est adopté.

L'optimisation en fiole Erlen-meyers a permis de déterminer les conditions optimales de culture. Ainsi, une production optimale de la PGase par la levure *A. pullulans* sur milieu à base de déchets de tomate à 4% nécessite un pH initial de 5.16, du lactose à 1.84 g/l et du CaCl₂ à 0.089 g/l. La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la PGase de 22.05 UI/ml, soit 5 fois plus élevé que dans les conditions non optimisées.

Par ailleurs, pour tester la capacité de la levure *A. pullulans* à se développer et à produire l'enzyme en conditions industrielles, des cultures sont réalisées en fermenteur de 20 l. Le niveau de production de la PGase semble être plus important en fermenteur (20 l) qu'en fiole d'Erlen-meyers. En effet, les valeurs maximales d'activité obtenues en fermenteur sont de l'ordre de 25.75 UI/ml après 32 heures de culture contre 22.05 UI/ml en fiole atteinte après 52 heures, ce qui procure à la souche le caractère industriel.

La synthèse de la PGase atteint donc sa valeur maximale après 32 heures de culture, en fermenteur de 20 l, correspondant au maximum de croissance. Ce résultat permet de décrire un mécanisme de synthèse de la PGase de type associé à la croissance. De plus, la production de la PGase dans un temps court est un facteur économiquement important pour un industriel.

Pour une utilisation éventuelle de l'enzyme, il a été procédé à sa séparation par différentes méthodes de purification classique : précipitation au sulfate d'ammonium et à l'acétone, chromatographie gel filtration Séphacryl S-200 et chromatographie échangeuse d'ions DEAE-Sephareose.

Le procédé de précipitation le plus intéressant vis-à-vis de l'activité PGase récupérée et de l'activité spécifique est l'acétone à 60%.

Le profil chromatographique sur Séphacryl S-200 révèle deux activités pectinolytiques. L'élution sur DEAE-Sephareose confirme la présence des deux activités dans deux fractions, ce qui montre qu'il s'agit d'isoenzymes. La PG1 et la PG2 sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 162.1 et 153.4 et des rendements de 27.39% et 26.45%.

Les deux isoenzymes purifiées montrent deux bandes différentes sur le gel de SDS-PAGE avec une masse moléculaire estimée à 113.79 KDa pour la PG1 et 71.44 KDa pour la PG2. De plus la détermination du taux de glycosylation montre que ces deux isoenzymes sont des glycoprotéines ; les valeurs de 11.6% et 15% sont obtenues respectivement pour la PG1 et la PG2. La présence de glucides donne aux enzymes la propriété de thermostabilité et la résistance aux différents traitements chimiques (pH, produits chimiques).

La chromatographie sur couche mince (CCM) montre que les deux isoenzymes hydrolysent l'acide polygalacturonique en acide monogalacturonique. En conséquence, il s'agit d'exo-polygalacturonase (E.C 3.2.1.67) pour les deux isoenzymes.

D'autres propriétés biochimiques sont également élucidées, ainsi la PG1 purifiée a une activité optimale à 65°C et un pH optimum de 10 alors que la PG2 possède une température optimale de 75°C et un pH optimum de 5. Ces deux paramètres sont favorables à l'utilisation de ces exo-PGases dans plusieurs secteurs industriels: industrie agroalimentaire, procédés de fabrication du papier et du textile. L'étude de la stabilité des deux isoenzymes a montré une bonne stabilité entre pH 7-11 pour la PG1 et entre pH 4-9 pour la PG2. Les traitements thermiques respectivement de 5 h à 60°C, 80°C et 90°C indiquent que la PG1 conserve 100%, 76.6% et 70% de son activité. Pour la PG2, elle maintient 100%, 88.58% et 70% de son activité initiale après 5 h d'incubation aux mêmes températures.

L'acide polygalacturonique est le meilleur substrat pour les deux exo-PGases et qui montre une grande spécificité pour les substrats pectiques. Les paramètres cinétiques des deux isoenzymes sont déterminés : les Km respectives de la PG1 et de la PG2 sont égaux à 3.70 mg/ml et 2.17 mg/ml. Les Vmax ont pour valeur de 2.2 UI (PG1) et 2.1 UI (PG2).

Les cations Co^{2+} stimulent les deux activités exo-PGases, alors que Mn^{2+} et Hg^{2+} ont un effet activateur uniquement sur PG2. Ces enzymes sont fortement résistants aux métaux lourds : le Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} et Zn^{2+} . En présence de l'SDS, de l'urée et de détergents non ioniques (Tween 80, Triton X- 100) les deux enzymes restent stables et actives, démontrant encore une fois la grande stabilité et versatilité de la PG1 et de la PG2. L'absence d'inhibition des deux isoenzymes par l'EDTA suggère qu'elles ne sont pas des métallo-enzymes.

De même, les deux activités exo-PGases sont conservées en présence du glycérol 0.1% qui est principalement utilisé en tant qu'agent protecteur en conservation. Par conséquent, le glycérol peut être recommandé pour la conservation de l'enzyme polygalacturonase pendant le stockage.

Par ailleurs, l'activation par les agents réducteurs (DTT et β -mercaptoethanol) renseigne sur la présence de cystéines et confirment aussi la structure monomérique de la PG1 et de la PG2.

Du point de vue application, les deux exo-PGases purifiées PG1 et PG2 se sont montrés capables d'améliorer la clarification du jus de citron.

Au vu de ces propriétés physico-chimiques et de thermostabilité, les deux exo-PGases purifiées PG1 et PG2 peuvent être appliquées industriellement pour la clarification du jus de citron ou autres industries : industries alimentaires, textile, papeterie et le traitement des déchets.

Perspectives

La réponse à une question ouvre toujours la voie à de nouvelles perspectives de recherche. Ce travail peut être amélioré et étendu de différentes manières. Il serait souhaitable de :

- ✚ Réaliser un séquençage des deux isoenzymes par application de la protéomique et comparaison par rapport aux séquences de la banque de données.
- ✚ Immobiliser les deux isoenzymes et les comparer aux enzymes libres.
- ✚ Identifier le gène responsable de la synthèse de ces enzymes, stimuler son expression et le cloner sur *E. coli* à croissance rapide.
- ✚ Exploiter chez la levure *A. pullulans* les autres enzymes telles que : protéase, lipase, estérase, amylase et tester d'autres métabolites comme le pullulane.
- ✚ Faire d'autre isolement à partir de différents biotopes dans le but de créer une mycothèque au laboratoire avec une panoplie d'enzymes à potentiel industriel.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abdelaziz W.** (2006). Isolement des mycètes à partir des sols sahariens producteurs de substances antibactériennes. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Abe F., Minegishi H., Miura T., Nagahama T., Usami R., Horikoshi K.** (2006). Characterization of cold- and high-pressure-active polygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus liquefaciens* strain N6. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 70: 296–9.
- Acuna-Arguelles M.E., Gutierrez-Rajas M., Viniegra-Gonzalez G., Favela-Toress E.** (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A. niger* in submerged and solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43(5): 808-814.
- AFNOR.** (Agence Française de Normalisation). (1991). Contrôle de la Qualité des Produits Alimentaires. Recueil des Normes Françaises, 3^e Ed., Paris, France, pp.360.
- Aguilar Uscanga M.G., Délia M.L., Strehaiano P.** (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 157-162.
- Ahmed I., Anjum Zia M., Azhar Hussain M., Akram Z., Naveed M.T., Nowrouz A.** (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 9: 148–154.
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L., Meraihi Z.** (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. 6(1): 1–17.
- Alana A., Llama M., Serra J.L.** (1991). Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium*. *FEBS Letters*. 280: 335–350.
- Albagnac G., Varoquaux P., Montigaud J.C.** (2002). Technologies de transformation des fruits. Paris, Lavoisier: pp.498.
- Alimardani-Theuil A., Gainvors-Claisse A., Duchiron F.** (2011). Yeasts: An attractive source of pectinases from-gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*. 46: 1525–1537.
- Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Al-Shaikhly K.** (1985). Tomato processing wastes as essential raw materials source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33: 804–807.
- Alvarado A., Pacheco-Delahaye E., Hevia P.** (2001). Value of a tomato byproduct as a source of dietary fiber in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 56: 335–348.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59: 143–169.

- Amid M., Manap Y., Zohdi K.** (2014). Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *European Food Research and Technology*. 239:21–29.
- Aminzadeh S., Naderi-Manesh H., Khajeh K., Naderi-Manesh M.** (2006). Purification, characterization, kinetic properties and thermal behavior of extracellular polygalacturonase produced by filamentous fungus *tetracoccusporium* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 135: 193 – 208.
- Antunes S., Freitas F., Sevrin C., Grandfils C., Reis M.A.M.** (2017). Production of FucoPol by *Enterobacter* A47 using waste tomato paste by-product as sole carbon source. *Bioresource Technology*. 227:66–73.

B

- Baffi M.A., Tobal T.,Lago J.H.G.,Da Silva R.** (2013). Wine aroma improvement using a β -Glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169: 493–501.
- Baracat-Pereira M.C., Vanetti M.C.D., Araujo E.F.D., Silva D.O.** (1993). Partial characterization of *Aspergillus fumigates* polygalacturonases for the degumming of natural fibers. *Journal of Industrial Microbiology*. 11:139–142.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D.** (2000). *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 752-758.
- Baron A., Thibault J.F.** (1985). Les enzymes pectinolytiques. Dans: *Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel*. Mouranche A., Costes C., Gauthier-Villars, pp. 143-164.
- Basset A., Khush R.S., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann J.A., Lemaitre B.** (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:3376-81.
- Bekhouche F., Bonnin E., Boulahrouf A., Levaux J.Y.** (2006). Production d'enzyme polygalacturonase par des souches microbiennes isolées du lait cru et des olives noires et vertes. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 658- 663.
- Belhamri R.** (2005). Extraction des macromolécules parietales des eaux de presse de betteraves sucrières : Etude de leur composition, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur effet sur le process sucrier. Thèse de Doctorat, Université de Reims Champagne – Ardenne, France.
- Belin J.M.** (1979). Les levures d'un chai du Maconnais. *Vitis*. 18: 40–48.
- Belmessikh A.** (2011). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et liquide. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.
- Belmessikh A., Boukhalfa H., Mechakra-Maza A., Gheribi-Aoulmi Z., Amrane A.** (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of Taiwan Institute Chemical Engineering*. 44: 377–385.
- Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S.,** (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus*

- oryzae Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering*. 64: 257-264.
- Biely P., Benen J.A.E., Heinrichova K., Ketser H.C., Visser J.** (1996). Inversion of configuration during hydrolysis of alpha-1,4-galacturonic linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. *FEBS Letters*. 382: 249-255.
- Bischoff K.M., Leathers T.D., Price N.P.J, Manitchotpisit P.** (2015). Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*. *The Journal of Antibiotics*. doi:10.1038/ja.2015.39.
- Blanco P., Sieiro C., Diaz A., Villa T.G.** (1994). Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 40(11): 974- 977.
- Blanco P., Sieiro C., Dtaz A., Villa T.G.** (1997). Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 711-712.
- Blanco P., Sieiro c., Reboredo N.M., Villa T.G.** (1998). Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiology Letters*. 164(2): 249-255.
- Blanco P., Sieiro C., Villa T.G.** (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 175: 1-9.
- Blanco P., Thow G., Simpson C. G., Villa T. G., Williamson B.** (2002). Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*. 210(2): 187-91.
- Blandino A., Dravillas K, Pandiella S.S., Cantero D., Webb C.** (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*. 37: 497–503.
- Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C.** (2002). Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 164 – 169.
- Bolano A., Stinchi S., Preziosi R., Bistoni F., Allegrucci M., Baldelli F., Martini A., Cardinali G.** (2001). Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*. 1: 221–224.
- Botha A.** (2006). Yeasts in soil. In: Rosa C., Peter G. (Eds), *Ecophysiology and biodiversity of yeasts*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 221-223.
- Boudjelal F., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Sproer C., Sabaou N., Klenk H.P.** (2015). *Actinoalloteichus hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 2006–2010.
- Bouix M., Leveau J.Y.** (1991). Les levures. Dans: Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (Eds). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Techniques et Documentation - Lavoisier, Paris*, pp. 210-223.
- Boukhalfa H.** (2015). Etude de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur Fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Thèse de doctorat en Sciences. Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie.

- Boulifa K.** (2012). Synthèse hydrogéologique sur la région d'El –Oued sahara nord oriental – Est Algérien. Thèse de Magistère. Université Constantine 1, Algérie.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J.** (1996). Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. 2^{ème} édition Ed. Tec et Doc, pp. 672.
- Bourgeois C.M., Larpent J.P.** (1996). Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermenté et fermentations alimentaires. Ed. Tec. EtDoc. Lavoisier, Paris, pp. 100– 450.
- Bourles E.** (2010). Aptitude variétale des pommes a la transformation: recherche d'indicateurs biochimiques de l'évolution de la texture et de marqueurs d'intérêt nutritionnel. Thèse de doctorat. Université d'Angers, France.
- Box G.E.P., Wilson K.B.** (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. Journal Royal Statistical Society. XIII(1): 1–49.
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N.** (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiology Letters. 244: 229–234.
- Buyukkileci A.O., Lahore M.F., Tari C.** (2015). Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 38:749–760.
- Buzzini P., Martini A.** (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology. 93: 1020–1025.
- Buzzini P., Margesin R.** (2014). Cold-adapted yeasts. Biodiversity, adaptation strategies and biotechnology significance. Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London, pp. 3–22.

C

- Caffall K.H., Mohnen D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydrate Research. 344: 1879–1900.
- Call H.P., Walter J., Emies C.C.** (1985). Maceration activity of an 23 endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. Journal of Food Biochemistry. 9: 325-348.
- Cavalcanti Maciel M.D.H., Herculano P.N., Fernandes M.J.S., Porto T.S., De Lima J.S., De Magalhães O.M.C., Da Silva L.R.C., Porto A.L.F., Moreira K.A., Motta C.M.D.S.** (2014). Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. African Journal of Biotechnology. 13 (32): 3313 – 3322.
- Cavalitto S.F., Hours R.A., Mignone C.F.** (2000). Growth and protopectinase production of *Giotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 260–265.
- Celestino S.M.C., de Freitas S.M., Medrano F.J., Valle de Sousa M., Ximenes Ferreira Filho E.** (2006). Purification and characterization of novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. Journal of Biotechnology. 123: 33–42.

- Ceugniesz A., Drider D., Jacques P., Coucheney F.** (2015). Yeast diversity in a traditional french cheese "Tomme d'orchies" reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*. 52: 177-184.
- Chaudhri A., Suneetha V.** (2012). Microbially derived pectinases: A review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2: 1–5.
- Chavan P., Mane S., Kulkarni G., Shaikh S., Ghormade V., Nerkar D.P., Shouche Y., Deshpande M.V.** (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*. 26: 801–808.
- Chen J., Yang R., Chen M., Wang S., Li P., Xia Y., Zhou L., Xie J., Wei D.** (2014). Production optimization and expression of pectin releasing enzyme from *Aspergillus oryzae* PO. *Carbohydrate Polymers*. 101: 89–95.
- Chi Z., Wang F., Wang L., Li J., Wang X.** (2007). Selection of *Yarrowia lipolytica* strains with high protein content from yeasts isolated from different marine environments. *Journal Ocean of University of China*. 6(4): 360–364.
- Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T.** (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 793-804.
- Cho S.W., Lee S., Shin W.** (2001). The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *Journal of Molecular Biology*. 311(4): 863-878.
- Collmer A., Ried J.L., Mount M.S.** (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*. 161: 329–335.
- Combo A.M.M., Aguedo M., Paquot M.** (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. 15(1): 153-164.
- Connell L., Redman R., Craig S., Scorzetti G., Iszard M., Rodriguez R.** (2008). Diversity of soil yeasts isolated from south Victoria land, Antarctica. *Microbial Ecology*. 56: 448-459.
- Conterno L., Lucy Joseph CM., Arvik T.J., Henick-Kling T., Bisson L.F.** (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57: 139-147.
- Contreras Esquivel J.C., Voget C.E.** (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*. 110: 21–28.
- Couto S.R., Sanroman M.A.** (2006). Application of solid-state fermentation to food industry. A review. *Food Engineering*. 76: 291-302.
- Crabtree H.G.** (1928). The carbohydrate metabolism of certain pathological over growths. *Biochemistry Journal*. 22 (5): 1289-1298.

D

- Davies G., Henrissat B.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853-859.

- Deak T.** (2006). Chapitre 8: Environmental factors influencing yeasts, in yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds). Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 155- 174.
- De Bary.** (1866). *Dematium pullulans*. Morphology Physiology Pilze. pp. 182.
- De Felice D.V., Solfrizzo M., De Curtis F., Visconti A., Castoria R.** (2008). Decrease of ochratoxin a contamination in wine grapes by strains of *Aureobasidium pullulans*. *Phytopathology*. 98(12): 1261–1270.
- De Hoog G.S., Guarro J., Figueras M.J., Gené J.** (2000). Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, pp. 1–1126.
- Denek N., Can A.** (2006). Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Research*. 65: 260–265.
- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L.** (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*. 73: 190–197.
- Djekrif D.S., Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Ait-kaki A., Labbani K., Nouadri T., Meraihi Z.** (2014). Optimization of thermophilic pullulanase and α -amylase production by amylolytic yeast. *International Journal of Microbiology Research*. 6 (2): 559–569.
- Del Valle M., Cámara M., Torija M.E.** (2006). Chemical characterization of tomato pomace. *Journal of the Science the Food and Agriculture*. 86: 1232–1236.
- Demir H., Tari C.** (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*. 54: 302 – 309.
- Demir H., Tari C.** (2016). Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 96: 3575-3582.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 36: W465–W469.
- Dey T.B., Adak S., Bhattacharya P., Banerjee R.** (2014). Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC6652 and its application in apple juice clarification. *LWT- Food Science and Technology*. 59: 591 – 595.
- Dinarvand M., Rezaee M., Forughi M.** (2017). Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.026>.
- Dix N.J., Webster J.** (1995). Fungi of extreme environments. En 'Fungal Ecology'. Chapman and Hall, London, pp. 322-332.
- Dogan N.** (2008). Production of pectinase enzyme from *Aspergillus sojae* in batch and fed-batch systems. Thèse de Master. Université d'Izmir, Turquie.

Domsh K.H., Gaams W., Anderson T.H. (1980). In: Compendium of Soil Fungi, Academic Press, London. pp. 130–134.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350 – 356.

Duchiron F., Copinet E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur*.

E

Eickbush T. H., Eickbush D.G. (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175: 477-485.

El Hamouchi A. (2011). Développement d'une méthode de traçage mixte pour *Aureobasidium pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5, deux agents antagonistes des maladies fongiques des pommes en conservation. Thèse de doctorat Université Moulay Ismail Meknès, Maroc.

F

Fahmy A.S., El-beih F.M., Mohamed S.A., Abdel-Gany S.S., Abd-Elbaky E.A. (2008). Characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 149: 205–217.

FAOSTAT-Agriculture. (2017). Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Vniegra-Gonzalez G. (2006). Review. Production of hydrolytic depolymerizing pectinases. *Food Technology Biotechnology*. 44 (2): 221-227.

Fedecici F. (1985). Production purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 51: 139-150.

Fiechter A., Seghezzi W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*. 27: 27–45.

Fischer L., Scheckermann C., Wagner F. (1995). Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4): 1497 – 1501.

Fogarty M.V., Kelly C.T. (1983). Pectic enzymes. In: Fogarty M.W. (ed), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science, London, pp. 131–182.

Fonseca A., Boekhout T., Fell J.W. (2011). *Cryptococcus vuillemin* (1901). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds), *The yeasts: A taxonomic study*, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 1661–1745.

Fontana R.C., Polidoro T.A., da Silveira M.M. (2009). Comparison of stirred tank and air lift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*. 100: 4493–4498.

Fontana R. C., Silveira M. M. (2012). Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 29: 683–690.

Freixo M.R., Karmali A., Frazão C., Arteiro J.M. (2008). Production of polygalacturonase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochemistry*. 43: 1265–1274.

Freixo M.R., Karmali A., Frazão C., Arteiro J.M. (2008a). Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 475–484.

Fritsche W. (1972). The Yeasts, Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeasts. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*. 12: 349–349.



Gainvors A., Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M., Belarbi A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 183(1): 131–135.

Galiotou-Panayotou M., Kalantzi O., Aggelis G. (1998). Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 155–162.

Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*. 99: 4597–4602.

Garai D., Kumar V. (2013). A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products*. 44: 352–363.

Gardini F., Suzzi G., Lombardi A., Galgano F., Crudele M.A., Andrighetto C., Schirone M., Tofalo R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research*. 1(2): 161–167.

Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6:47. DOI 10.1007/s13205-016-0371-4.

Gattas E.A.L., Bueno M.R., Ribeiro M.H.L. (2009). Stimulation of polygalacturonase production in an immobilized system by *Aspergillus* sp.: effect of pectin and glucose. *European Food Research and Technology*. 229: 923–928.

Gayathri T., Nair A.S. (2015). Purification and characterization of polygalacturonase from ripened fruits of *Musa acuminata* cultivar from Kerala (*Musa acuminata* cv. Palayankodan). *Food Measure*. 9: 233–239.

Gilis J.F. (1999). Etude de contamination de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse, INP Toulouse, France.

Gomes E., Aguiar A.P., Carvalho C.C., Bonfá M.R.B., Silva R.d., Boscolo M. (2009). Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 31–39.

- González-Hernández J.C., Pérez E., Damián R.M., Chávez-Parga M.C.** (2012). Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.11 (3): 389–400.
- Grassino A.N., Halambek J., Djakovic S., Brncic S.R., Dent M., Grabaric Z.** (2016). Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids*. 52: 265–274.
- Guimarães B.G., Souchon H., Lytle B.L., Wu J.H., Alzari P.M.** (2002). The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase cels, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome, *Journal of Molecular Biology*. 320: 587-96.
- Guiraud J.P.** (1998). *Microbiologie alimentaire* Ed. Dunod, pp. 652.
- Gummadi S.N., Panda T.** (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases. A review. *Process Biochemistry*. 38: 987–996.
- Guo G., Liu Y., Yang J., Ma X.** (2006). Identification, activity and function determination of several salivary enzymes secreted by *Macrosiphum avenae*. *Acta Entomologica Sinica* 49: 768–774.
- Gutell R.R., Larsen N., Woese C.R.** (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews*. 58: 10–26

H

- Hadfield K.A., Bennett A.B.** (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*. 117: 337-43.
- Hadfield K.A., Rose J.K., Yaver D.S., Berka R.M. Bennett A.B.** (1998). Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiology*. 117(2): 363-73.
- Haifeng L., Zhenming C., Xiaohong W., Chunling M.** (2007). Amylase Production by the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* N13d. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*. 6 (1): 60–65.
- Handa S., Sharma N., Pathania S.** (2016). Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus* sp. C4 under solid state fermentation. *Fermentation*. 2, 10; doi:10.3390/fermentation2020010.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A.** (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235–251.
- Hashem M., Hashem A., Alrumman S.A., Alamri S.A., Moustafa M.F.M.** (2014). Indigenous yeasts of the rotten date fruits and their potentiality in bioethanol and single-cell protein production. *International Journal of Agriculture and Biology*. 16: 752-758.
- Hassanshahian M., Tebyanian H., Cappello S.** (2012). Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin Journal*. 64(7): 1386–1391.
- Hasunuma T., Fukusaki E., Kobayashi A.** (2003). Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. *Journal of Biotechnology*. 106 (1): 45-52.
- Hencké S.** (2000). *Utilisation alimentaire des levures*. Thèse de doctorat, Université de Nancy I, France.

- Henes B., Sonnleitner B.** (2007). Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity. *Journal of Biotechnology*. 132: 118–126.
- Henrissat B., Bairoch A.** (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemistry Journal*. 316 (2): 695-696.
- Hilditch S., Berghall S., Kalkkinen N., Penttila M., Richard P.** (2007). The missing link in the fungal D-galacturonate pathway: Identification of the L-Threo-3-Deoxyhexulose aldolase. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 26195-26201.
- Hillis D.M., Dixon M.T.** (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*. 66: 411–453.
- Högberg M., Högberg P.** (2002). Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half of the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*. 154: 791-795.
- Houle V.** (2007). Détermination de l'impact de la glycosylation sur l'activité et la stabilité de l'endopolygalacturonase de *S. cerevisiae* par mutagenèse dirigée. Thèse de doctorat. Université du Québec à Trois-Rivières, Canada.

I

- Industrial Enzymes market.** www.marketandmarkets.com/industrial/enzymes. Visité le 25 février 2017.
- Israilides C., Smith A., Scanlon B., Barnett C.** (1999). Pullulan from Agro-industrial wastes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 16: 309 -324.

J

- Jafari M., Pirmohammadi R., Bampidis V.** (2006). The use of dried tomato pulp in diets of laying hens. *International Journal of Poultry Science*. 5: 618–622.
- Jaubert S., Laffaire J.B., Abad P., Rosso M.N.** (2002). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 522: 109–112.
- Jaramillo P.M.D., Andreus J.R., De souza neto G.P., De souza Castro C.F., Filho E.X.F.** (2016). The characterization of a pectin-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source and the evaluation of its potential for industrial applications. *Biocatalysis and Biotransformation*. DOI: 10.3109/10242422.2016.1168817.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R.** (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 40: 2931–2944.
- Jia J., Wheals A.** (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*. 38(5): 264-70.
- Johnson A.A., Ayodele O.S., Afolake O., Christiana O.M.** (2012). Production of cellulase and pectinase from orange peels by fungi. *Natural Science*. 10: 107–112.
- Jun Li P., Lan Xia J., Shan Y., Yuan Nie Z., Lin Su D., Rui Gao Q., Zhang C., Long Ma Y.** (2015). Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 using response surface methodology. *Waste Biomass Valorization*. 6(1): 13–22.

Junwei C., Weihua S., Yong P., Shuyun C. (2000). High-producers of polygalacturonase selected from mutants resistant to rifampin in alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 545–548.

κ

Kant S., Vohra A., Gupta R. (2013). Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*. 87: 11- 16.

Kars I., Krooshof G. H., Wagemakers L., Joosten R., Benen J. A., van Kan J. A. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant Journal*. 43(2): 213-25.

Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77: 215–27.

Katapodis P., Christakopoulou V., Christakopoulos P. (2006). Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 501–506.

Kent U.M. (1999). Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 115: 11–18.

Kim J.S., Lee I.K., Yun B.S. (2015). A Novel Biosurfactant Produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *lilium lancifolium* thunb. *Plos one*. DOI:10.1371/journal.pone.0122917.

Knoblich M., Anderson B., Latshaw D. (2005). Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *Journal of the Science the Food and Agriculture*. 85: 1166 –1170.

Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*. 13: 179-191.

Kuorelahti S., Kalkkinen N., Penttilä M., Londesborough J., Richard P. (2005) Identification in the mold *Hypocrea jecorina* of the first fungal D-galacturonic acid reductase. *Biochemistry*. 44:11234–11240.

Kurtzman C.P. (2011). *Meyerozyma Kurtzman* and *M. Suzuki* (2010). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds), *The Yeasts, A taxonomic study*. Elsevier, London, pp. 623.

Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. (2011). *The Yeasts, A taxonomic study*, Vol 1. Elsevier, New York, pp. 3–110.

Kurtzman C.P., Suzuki M. (2010). Coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form *Priceomyces* and *Scheeffersomyces*. *Mycoscience*. 51(1): 2-14.

Kockova-Kratochvilova A., Černáková M., Slavikova E. (1980). Morphological changes during the life cycle of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Folia Microbiologica*. 25: 56–67.

Kwon-Chung K.J., Bennett J.E. (1992). *Medical mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia and London.

- Labeille P.** (1997). Production de glucoamylases par *Aspergillus niger* avec un procédé de fermentation du son de blé en milieu solide. Application à l'hydrolyse des farines de blé destinées à la production d'éthanol. Thèse de doctorat. Université de Reims, Champagne-Ardenne, France.
- Lachance M.A., Daniel H.M., Meyer W., Prasad G.S., Gautam S.P., Boundy-Mills K.** (2003). The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Research*. 4: 253–258.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lai Q.P.** (2010). Utilisation des levures non-saccharomyces en œnologie : études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France.
- Larpent-Gourgau M., Sanglier J.J.** (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes*, Editions Doin- Paris, pp. 574 – 581.
- Larpent J.P., Larpent-Gourgau M.** (1997). *Mémento technique de microbiologie - 3ème édition* (Ed), Tec & Doc, pp.1039.
- Leveau J.Y., Bouix M.** (1993). *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel*. Ed. Tec et Doc Lavoisier, pp. 612.
- Li K., Meng K., Pan X., Ma R., Yang P., Huang H., Yao B., Su X.** (2015). Two thermophilic fungal pectinases from *Neosartorya fischeri* P1: Gene cloning, expression, and biochemical characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 118: 70-78.
- Li H., Zhang X.** (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification*. 42(1): 153-159.
- Liang M., Damiani A., He Q.P., Wang J.** (2014). Elucidating xylose metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for lignocellulosic ethanol production. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 2: 38-48.
- Lin T.C., Chen C.** (2004). Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Process Biochemistry* 39: 1103–1109.
- Lopandic K., Zelger S., Banzky L.K., Eliskases-Lechner F., Prillinger H.** (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. 23(4): 341–350.
- Lotrakul P., Unhapattaratitikul P., Seelanan T., Prasongsuk S., Punnapayak H.** (2013). An aubasidan-like β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* in Thailand. *Science Asia*. 39: 363-368.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lu X., Lin J., Wang C., Du X., Cai J.** (2016). Purification and characterization of exopolysaccharide from *Zygoascus hellenicus* V25 and its potential application in fruit juice clarification. *Food Science and Biotechnology*. 25(5): 1379-1385.

M

- Maldonado M.C., Strasser de Saad A.M.** (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 34–38.
- Maller A., Da Silva T.M., De Lima Damásio A.R., Hirata I.Y., Atílio Jorge J., Terenzi H.F., De Lourdes Teixeira De Moraes Polizeli M.** (2013). Functional properties of a manganese-activated exo-polygalacturonase produced by a thermotolerant *Aspergillus niveus*. *Folia Microbiologica*. 58(6): 615–621.
- Malvessi E., Silveira da.M.M.** (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus Oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47: (5): 693–702.
- Manachini P.L., Fortina M.G., Parini C.** (1987). Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. 9: 219-224.
- Manachini P.L., Parini C., Fortina M.G.** (1988). Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 682-685.
- Manitchotpisit P., Watanapokasin R., Price N.P.J., Bischoff K.M., Tayeh M., Teeraworawit S., Kriwong S., Leathers T.D.** (2014). *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 30: 2199–2204.
- Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S., Banerjee U.C.** (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in Solid-State fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1(2):1-9.
- Marcellino N., Beuvier E., Grappin R., Gueguen M., Benson, D.R.** (2001). Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheese making fabrications in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 6: 4752-4759.
- Martins E. D. S., Leite R. S., da Silva R., Gomes E.** (2013). Purification and properties of polygalacturonase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on solid-state fermentation. *Enzyme Research*. doi:10.1155/2013/438645.
- Martínez-Trujillo A., Juan S.A., Gómez-Sánchez C., Trejo-Aguilar B., Aguilar-Osorio G.** (2009). Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* Fp-500 and their modulation by pH and carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 40-47.
- Mathew A., Eldo A.N., Molly A.G.** (2008). Optimization of culture conditions for the production of thermostable polygalacturonase by *Penicillium* SPC-F 20. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 1001–1005.
- Mayans O., Scott M., Connerton I., Gravesen T., Benen J., Visser J., Pickersgill R., Jenkins J.** (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*. 5: 677–689.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A.** (2011). Halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria: isolation, taxonomy and antagonistic properties. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 6710–6714.

- Membre J.M., Burlot P.M.** (1994). Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2017–2022.
- Meneghel L., Reis G.P., Reginatto C., Malvessi E., Silveira M.M.** (2014). Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochemistry*. 49(11): 1800–1807.
- Merín M.G., Mendoza L.M., Farías M.E., Morata de Ambrosini V.I.** (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology*. 147: 144–148.
- Merín M.G., Martín M.C., Rantsiou K., Cocolin L., Morata de Ambrosini V.I.** (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (3): 815–823.
- Meunier N.** (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire Maître ès sciences, Université du Québec, Canada.
- Miller G.L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426–428.
- Minitab Inc.** 2013. Minitab (Statistical Software), version 17.1. State College, PA. www.minitab.com.
- Miyairi K., Senda M., Watanabe M., Hasui Y., Okuno T.** (1997). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*. *Bioscience and Biotechnology and Biochemistry*. 61(4): 655-9.
- Morel G.** (2013). La levure *Geotrichum candidum*: taxonomie, biodiversité et génome. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud XI Orsay, France.
- Morgutti S., Negrini N., Nocito F. F., Ghiani A., Bassi D., Cocucci M.** (2006). Changes in endopolygalacturonase levels and characterization of a putative endo-PG gene during fruit softening in peach genotypes with nonmelting and melting flesh fruit phenotypes. *New Phytologist*. 171(2): 315-28.
- Moshrefi M., Luh B.S.** (1984). Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. *Journal of Food Biochemistry*. 8:39–54.
- Moubasher H., Wahsh S.S., Abo El-Kassem N.** (2010). Purification of pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology*. 79: 759 – 766.
- Mounir R., Durieux A., Bodo E., Allard C., Simon J-P., Achbani E.H., El Jaafari S., Douira A., Jijakli M.H.** (2007). Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*. 29: 553–559.
- Moyo S., Gashe B.A., Collison E.K., Mpuchane S.** (2003). Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*. 85: 87–100.
- Mukesh K.D.J., Saranya G.M., Suresh K., Andal Priyadharshini D., Rajakumar R., Kalaichelvan P.** (2012). Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2: 369–375.
- Muramatsu D., Iwai A., Aoki S., Uchiyama H., Kawata K., Nakayama Y., Nikawa Y., Kusno K., Okabe M., Miyazaki T.** (2012). β -glucan derived from *Aureobasidium*

pullulans is effective for the prevention of influenza in mice. *PLoS One*. 7(7): e41399. doi:10.1371/journal.pone.0041399.

Murthy P.S., Naidu M.M. (2010). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Applied Sciences Journal*. 8: 199–205.

N

Ni X.M., Chi Z.M., Liu Z.Q., Yue L.X. (2008). Screening of protease producing marine yeasts for production of the bioactive peptides. *Acta Oceanologica Sinica*. 27: 1–10.

Nighojkar S., Phanse Y., Sinha D., Nighojkar A., Kumar A. (2006). Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*. 41: 1136–1140.

Niture S.K., Pant A. (2004). Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiological Research*. 159: 305–314.

Niture S.K. (2008). Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*. 63: 1–19.

Niture S.K., Kumarb A.R., Parab P.B., Panta A. (2008). Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. *Microbiological Research*. 163: 51–62.

O

Oliveira R.Q., Rosa C.A., Uetanabaro A.P.T., Azeredo A., Neto A.G., Assis S.A. (2009). Polygalacturonase secreted by yeasts from Brazilian semi-arid environments. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60 (S7): 72-80.

Ortega N., de Diego S., Perez-Mateos M., Busto M.D. (2007). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*. 88: 209-217.

Ouattara H.G., Koffi B.L., Karou G.T., Sangaré A., Niamke S.L., Dioph J.K. (2008). Implication of *Bacillus* sp. In the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 1753–1760.

P

Palanivelu P. (2006). Polygalacturonases : Active site analysis and mechanism of action. *Indian Journal of Biotechnology*. 5: 148-162.

Palaniyappan M., Vijayagopal V., Renuka Viswanathan Viruthagiri T. (2009). Statistical optimization of substrate, carbon and nitrogen source by response surface methodology for pectinase production using *Aspergillus fumigatus* MTCC 870 in submerged fermentation. *African Journal of Biotechnology*. 8(22): 6355-6363.

Palomaki T., Saarilahti H.T. (1997). Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *FEBS Letters*. 400:122–126.

Pan X., Li K., Ma R., Shi P., Huang H., Yang P., Meng K., Yao B. (2015). Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. *Food Chemistry*. 188: 569-575.

- Parekh S.R., Parekh R.S., Wayman M. (1988).** Fermentation of cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 18: 325-338.
- Pathak N., Sanwal G.G. (1998).** Multiple forms of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*. 54: 147–52.
- Patil S.R., Dayanand A. (2006).** Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid state conditions. *Bioresource Technology*. 97: 2054–2058.
- Paul E.A., Clark F.E. (1989).** *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, California.
- Parenticová L., Benen J.A., Kester H.C., Visser J. (2000).** pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *The Biochemical Journal*. 345: 637–644.
- Pedrolli D.B., Carmona E.C. (2010).** Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 567–573.
- Peterson S.W., Manitchotpsit, P., Leathers, T.D. (2013).** *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 790–795.
- Pezzullo M., Del Vecchio P., Mandrich L., Nucci R., Rossi M., Manco G. (2013).** Comprehensive analysis of surface charged residues involved in thermal stability in *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterase 2. *Protein Engineering Design and Selection*. 26(1): 47-58.
- Phutela U., Dhuna V., Sandhu S., Chadha B.S. (2005).** Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36(1): 63–69.
- Pickersgill R., Smith D., Worboys K., Jenkins J. (1998).** Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(38): 24660-24664.
- Pickersgill R.W., Scott M., Smith D., Worboys K., Jenkins J. (1999).** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the endo-polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Acta Crystallographica section D Biological Crystallography*. 55(1): 320-322.
- Pickersgill R.W., Jenkins J.A. (2003).** The structures and active sites of pectinases. In: Voragen F., Schols H., Visser R. (Eds), *Advances in pectin and pectinase research*. Springer-Science, pp. 267–275.
- Pilnik W., Rombouts F.M. (1981).** Dans *Enzymes in food processing*. Sous la direction de G.G. Birch, N. Blakebrough et K.J. Parker. Applied Sciences Publishers Ltd., Londres. pp. 105–128.
- Plackett R.L., Burman J.P. (1946).** The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 33: 305–325.
- Plemenitaš A., Vaupotič T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. (2008).** Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*. 61:67-75.

- Pochon J., Tardieux P.** (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourelle, St Mandé, pp. 110 – 111.
- Poczai P., Hyvönen J.** (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports*, 37: 1897-1912.
- Poondla V., Bandikari R., Subramanyam R., Obulam V.S.R.** (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4: 70-76.
- Popeijus H., Overmars H.A., Jones J., Blok V.C., Goverse A., Helder J., Schots A., Bakker J., Smant G.** (2000). Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature*. 406: 36-37.
- Price N.P.J., Manitchotpisit P., Vermillion K.E., Bowman M.J., Leathers T.D.** (2013). Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *Carbohydrate Research*. 370: 24–32.
- Priyadharshini S.D., Bakthavatsalam A.K.** (2016). Optimization of phenol degradation by the microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett–Burman Design and Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*. 207: 150–156.

Q

- Quiroga E.N., Sgariglia M.A., Molina C.F., Sampietro D.E., Sobero'n J.R., Vattuone M.A.** (2009). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycological Research*. 113: 1404– 1410.
- Qureshi A.S., Bhutto M.A., Chisti Y., Khushk I., Dahot M.U., Bano S.** (2012). Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in adate syrup medium. *African Journal of Biotechnology*. 11(62): 12563–12570.

R

- Radoi F., Kishida M., Kawasaki H.** (2005). Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Research*. 5(6-7): 663-8.
- Ramachandran S.** (2005). Isolation, purification and characterization of pectinase from *Penicillium citrinum*. Thèse de doctorat, Université Mahatma Gandhi, Inde.
- Ramalingam P., Aswini V., Pradeepa P., Sriram S., Swathik H.** (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.
- Rao R.S., Bhadra B., Shivaji S.** (2008). Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (1): 19-24.
- Raspor P., Zupan J.** (2006). Yeasts in extreme environments. In: Rosa C., Peter G. (Eds), *Ecophysiology and biodiversity of yeasts*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 371-417.
- Rattanachomsri U., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L., Champreda V.** (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107 (5): 488–493.

- Rehman H.U., Ul Qader S.A., Aman A.** (2012). Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydrate Polymers*. 90: 387–391.
- Restino C.** (2012). Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergilli* par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- Rich J.O., Manitchotpisit P., Peterson S.W., Liu S., Leathers T.D., Anderson A.M.** (2016). Phylogenetic classification of *Aureobasidium pullulans* strains for production of feruloyl esterase. *Biotechnology Letters*. DOI 10.1007/s10529-016-2054-y.
- Ried J.L., Collmer A.** (1985). Activity strain of rapid characterization of pectin enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 615–622.
- Rogge E.** (2010). Extraction et étude des propriétés physiques et mécaniques des fibres d'Alfa (Esparto grass) en vue d'applications textiles. Projet de fin d'études, Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs Sud-Alsace (UHA), France.
- Rojas N.L., Ortiz G.E., Chesini M., Baroque D.J., Cavalitto S.F.** (2011). Optimization of the production of polygalacturonase from *Aspergillus kawachii* cloned in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 49(3): 316–321.
- Rombouts F.M., Pilnik W.L.** (1980). Pectic enzymes. In: Rose A.H. (Ed), *Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions*, Vol. 5, Academic Press, London, England, pp. 227-282.
- Rose A.H.** (1980). Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F.A. *et al.* *Biology and Activities of Yeast*, Ed. Academic Press, pp. 103.
- Roosdiana A., Prasetyawan S., Mahdi C., Sutrisno S.** (2013). Production and characterization of *Bacillus firmus* pectinase. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*. 2(1): 35–41.
- Ruiz H.A., Rodriguez-Jasso R.M., Hernandez-Almanza A., Contreras-Esquivel J.C., Aguilar C.N.** (2017). Pectinolytic enzymes. In: Pandey A., Negi S., Soccol C.R. (Eds), *Current developments in biotechnology and bioengineering. Production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier, London, pp. 47–71.
- Rupcic J., Georgiu K., Maric V.** (2004). Isolation and characterization of cerebrosides of the hydrocarbon assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Basic Microbiology*. 44: 114–121.

S

- Saitou N, Nei M.** (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406–425.
- Sakai T., Okushima M., Yoshitake S.** (1984). Purification, crystallisation and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48(8): 1951-1961.
- Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E. J.** (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*. 39: 231-294.

- Sakai T., Takaoka A.** (2014). Purification, Crystallization, and Some Properties of Endo-poly-galacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49(2): 449-458.
- Sakamoto T., Bonnin E., Quemssener B., Thibault J.F.** (2012). Purification and characterization of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Malaysian Journal of Microbiology*. 8: 175-183.
- Salmon J.M.** (1998). La levure de fermentation alcoolique. Chap. 1 : Relations levures-milieu. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*, Tech.et Doc. Lavoisier. pp. 1311.
- Sampaio P.N., Calado C.R.C., Sousa L., Bressler D.C., Pais M.S., Fonseca L.P.** (2010). Optimization of the culture medium composition using response surface methodology for new recombinant cyprosin B production in bioreactor for cheese production. *European Food Research Technology*. 231: 339–346.
- Sanchez J., Guiraud J.P., Galzy P.** (1984). A study of the polygalacturonase EC 3.2.1.15 activity of several yeast strains isolated from cocoa. *Applied Biotechnology*. 20: 262-267.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A.** (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* . 40(8): 2689-2694.
- Sandri I.G., Fontana R.C., da Silveira M.M.** (2015). Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *LWT- Food Science and Technology*. 61(2): 430–436.
- Sanz A., Martin R., Mayoral M.B., Hernandez P.E., Gonzalez I., Lacarra T.G.** (2005). Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. *Meat Science*. 71(2): 230–237.
- Scheller H.V., Jensen J.K., Sørensen S.O. Harholt J., Geshi N.** (2007). Mini review Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum* 129: 283–295.
- Schena L., Nigro N., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A.** (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 30: 209–220.
- Selbmann L., de Hoog G.S., Zucconi L., Isola D., Onofri S.** (2014). Black Yeasts From Cold Habitats. In: Buzzini P., Margesin R. (eds), *Yeasts from cold Habitats*. Springer, Berlin, pp. 173–189.
- Serrat M., Bermúdez R.C., Gonzàles Villa T.** (2002). Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing waste water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 97: 193 – 208.
- Shanmugaprakash M., Kirthika J., Ragupathy J., Nilanee K., Manickam A.** (2014). Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344. *International Journal of Biological Macromolecules*. 64: 443–452.
- Sharma D.C., Satyanarayana T.** (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology*. 97: 727–733.

- Sharma N., Rathore M., Sharma M.** (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 12(1): 45-60.
- Sharma S., Mandhan R.P., Sharma J.** (2012). Utilization of agroindustrial residues for pectinase production by the novel strain *Pseudozyma* sp. SPJ under solid state cultivation. *Annals of Microbiology*. 62: 169–176.
- Shimizu T., Miyairi K., Okuno T.** (2000). Determination of glycosylation sites, disulfide bridges, and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry*. 267(8): 2380-2389.
- Shimizu T., Nakatsu, T., Miyairi K., Okuno T., Kato H.** (2002). Active-site architecture of endopolygalacturonase 1 from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution. *Biochemistry*. 41: 6651- 6659.
- Schols H. A., Bakx E. J., Schipper D., Voragen A. G. J.** (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*. 279: 265.
- Schols H.A., Voragen A.G.J.** (2002). The chemical structure of pectins. In: Seymour G.B., Knox J.P. (eds), *Pectins and their manipulation*. Blackwell publishing, Oxford, UK, pp. 1–29.
- Shen Z., Denton M., Mutti N., Pappan K., Kanost M., Reese J., Reeck G.** (2003). Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*.3: 1–9.
- Sieiro C., Poza M., Vilanova M., Villa T. G.** (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1861-1865.
- Siekstele R., Bartkeviciute D., Sasnauskas K.** (1999). Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG 1). *Yeast*. 15(4): 311-22.
- Singh P., Dwivedi U.N.** (2008). Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indicacv. Dashehari*) fruit. *Food Chemistry*. 111: 345–349.
- Singh S.A., Appu Rao A.G.** (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 (2): 115-23.
- Singh R.S., Saini G.K., Kennedy J.F.** (2008). Review. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*. 73: 515–531.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K.M., Soccol C.R., Pandey A.** (2006). α - amylases from microbial sources - an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*. 44: 173–184.
- Sobowale S.S., Olatidoye O.P., Odunmbaku L.A., Raji O.H.** (2012). A comparative study on physicochemical and rheological properties of imported tomato paste in Nigeria. *Sustainable Agriculture Research*. 1: 51-56.
- Sogi D.S., Bawa A.S.** (1998). Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer*. 52(2): 26–29.

- Solis-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Gutiérrez-Rojas M. A.** (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: 36–41.
- Soroor M.A.M., Ghazy A.M., Mahdy E.M.S., El-Badery M.O., Shousha W.G., El-Khonezy M.I.** (2013). Purification and characterization of polygalacturonases produced by *Trichoderma reesei* F418 using lemon peels and rice straw under solid-state fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*. 9(4): 3184-3198.
- Sorensen S.O., Pauly M., Bush M., Skjot M., McCann M.C., Borkhardt B., Ulvoskov P.** (2000). Pectin engineering: modification of potato pectin by in vivo expression of endo-1,4- β -D-galacturonase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:7639–7644.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1043 –1044.
- Starmer W.T., Lachance M.A.** (2011). Yeast ecology. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds), *The yeasts. A taxonomy study*, vol 1. Elsevier, New York, pp 65–83.
- StatSoft Inc.** (2012): Statistica (Data Analysis Software), version 10.0.
- StatSoft Inc.** (2014). Statistica (Data Analysis Software), version 12.0.
- Stenbaek J.** (2015). Bio-sustainable control of the blue strain fungi *Aureobasidium pullulans* on exterior wood coatings. PhD thesis, Université de Copenhagen, Denmark.
- Sterflinger K.** (2006). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: Rosa C., Gabor P. (eds), *Yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, New York, pp. 505–518.
- St-Germain G., Summerbell R.** (1996). *Identifying filamentous fungi – A clinical laboratory handbook*, 1st ed. Star Publishing company, Belmont, California.
- Strati I.F., Oreopoulou V.** (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science and Technology*. 46: 23-29.
- Strati I.F., Oreopoulou V.** (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Research International*. 65: 311-321.
- Stratilová E., Džúrová M., Breierová E., Omelková J.** (2005). Purification and biochemical characterization of polygalacturonases produced by *Aureobasidium pullulans*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 60(1-2): 91–96.
- Suresh B., Viruthagiri T., Sasikumar E.** (2009). Optimization of process variables using response surface methodology (RSM) in the solid-state fermentative production of pectinase by *Aspergillus awamori*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2: 302–314.

T

- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.

- Tari C., Gogus N., Tokatli F.** (2007). Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1108–1116.
- Tari C., Dogan N., Gogus N.** (2008). Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*. 111: 824 - 829.
- Tarr S.** (2004). Yeasts from Lesotho - Their classification and possible applications. PhD thesis, University of the Free State. Afrique du sud.
- Taskin M.** (2013). Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172.
- Thakur A., Pahwa R., Singh S., Gupta R.** (2010). Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Research*. doi:10.4061/2010/170549.
- Tounsi H., Hadj Sassi A., Ben Romdhane Z., Lajnef M., Dupuy J.W., Lapailierie D., Lomnech A.M., Gargouri A., Hadj-Taieb N.** (2016). Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 127: 56 – 66.
- Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R.** (2006). Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics and Molecular Research*. 5(4): 816-827.
- Trujillo M.A.M., Barradas J.S.A., Osorio G.A.** (2012). Polygalacturonases of *Aspergillus flavipes* FP-500: A kinetic analysis of batch culture systems based on unstructured models. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 10: 1 – 19.
- Turchetti B., Thomas Hall S.R., Connell L.B., Branda E., Buzzini P., Theelen B., Müller W.H., Boekhout T.** (2011). Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: description of *Glaciozyma* gen.nov., *Glaciozyma martini* sp. nov. and *Glaciozyma watsonii* sp.nov. *Extremophiles*. 15: 573–586.
- Turchetti B., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D’Agata C., Smiraglia C., Onofri A., Buzzini P.** (2013). Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*. 86: 327–340.

U

- Umsza-Guez M.A., Díaz A.B., Ory I.D., Blandino A., Gomes E., Caro I.** (2011). Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1585–1597.
- Ur Rehman H., Ul Qader S.A., Aman A.** (2012). Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydrate polymers*. 90: 387–391.
- Ur Rehman H., Aman A., Nawaz M.A., Ui Qader S.A.** (2015). Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocolloids*. 43: 819–824.

Uzuner S., Cekmecelioglu D. (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.

V

Van Dyk J.S., Gama R., Morrison D., Swart S., Pletschke B.I. (2013). Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilization of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 26: 521–531.

Van Hoek P., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2000). Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 724–736.

Van Santen Y., Benen J.A.E, Schroter K.H., Kalk K.H., Armand S., Visser J., Dijkstra B.W. (1999) 1.68 Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(43): 30474–30480.

Vijayakumar P., Ramesh B., Rajagopal S., Sarathi Reddy O.V. (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(1): 70–76.

Villas-Boas S.G., Esposito E., de Mendonca M.M. (2002). Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 541–545.

Vincken J. P., Schols H. A., Oomen R. J., McCann M. C., Ulvskov P., Voragen A. G., Visser R.G. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*. 132: 1781–1789.

Voragen A.G.J., Coenen G.J., Verhoef R.P., Schols H.A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*. 20: 263–275.

W

Wakabayashi K., Huber D.J. (2001). Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Physiologia Plantarum*. 113: 210–6.

Walker G.M. (2009). *Yeasts*. University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. Elsevier Inc, pp.1174–1187.

Wang F.Q., Gao C.J., Yang C.Y., Xu P. (2007). Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnology Letters*. 29: 233–236.

Wang C.L., Li Y., Xin F.H., Liu Y.Y., Chi Z.M. (2014). Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production. *Process Biochemistry*. 49: 725–731.

West S. (1996). Olive and other edible oils. In: Godfrey T., West S. (eds), *Industrial enzymology*, 2nd edn. Stockholm Press, New York, pp. 293–300.

Williams H. L., Tang Y., Hintz W. E. (2002). Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genetics and Biology*. 36(1): 71–83.

- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 4576–4579.
- Wong L.Y., Saad W.Z., Mohamad R., Tahir P.M.** (2017). Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*. 97: 175–183.
- Wuczowski M., Metzger E., Sterflinger K., Prillinger H.** (2005). Diversity of yeasts isolated from litter and soil of different natural forest sites in Austria. *Die Bodenkultur*. 56 (4): 201- 208.

γ

- Yadav S., Yadav P., Yadav D., Yadav K.** (2009). Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*. 44: 1–10.
- Yadav S., Anand G., Dubey A.k, Yadav D.** (2012). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase secreted by *Rhizopus oryzae* MTCC 1987 and its role in retting of *Crotalaria juncea* fibre. *Biologia*. 67(6): 1069–1074.
- Yan H.Z., Liou R.F.** (2005). Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*. 42(4): 339-50.
- Yanez E., Carmona T.A., Tiemblo M., Jimenez A., Fernandez Lobato M.** (1998). Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochemistry Journal*. 329(1): 65-71.
- Yang S.H., Wang P.H.** (2003). Three species of yeasts new to Taiwan. *Taiwania*, 48(2): 99-105.
- Yang, J., Luo H., Li J., Wang K., Cheng H., Bai Y., Yuan T., Fan Y., Yao B.** (2011). Cloning, expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase from *Bispora* sp. MEY-1 and its potential application in juice clarification. *Process Biochemistry*. 46: 272–277.
- Yano S., Rattanakit N., Wakayama M., Tachiki T.** (2004). A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 68(6): 1299-1305.
- Yanez E., Carmona T.A., Tiemblo M., Jimenez A., Fernandez Lobato M.** (1998). Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochemistry Journal*. 329 (1): 65-71.
- Yoder M.D., Journak F.** (1995). Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *The FASEB Journal*. 9(5): 335-342.
- Yuan P., Meng K., Wang Y., Luo H., Shi P., Huang H., Bai Y., Yang P., Yao B.** (2012). A protease-resistant exo-polygalacturonase from *Klebsiella* sp. Y1 with good activity and stability over a wide pH range in the digestive tract. *Bioresource Technology*. 123: 171-176.
- Yugandhar N.M., Ravi Kumar D.V.R., Prasanthi V., Kiran Kumar N., Ramy Reddy D.S.** (2008). Optimization of pectinase production from *Manihot utilissima* by

Aspergillus niger NCIM 548 using statistical experimental design. *Research Journal of Microbiology*. 3(1): 9-16.

Yurlova N.A., de Hoog G.S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*. 72: 141–147.

Z

Zalar P., Gostinčar C., De Hoog G.S., Uršič V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 61: 21–38.

Zetelaki-Horvath K., Vas K. (1981). Effect of oxygen transfer rate on the composition of the pectolytic enzyme complex of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*. 23: 2231-2241.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda D.P. (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1377–1381.

Zou X., Zhou Y., Yang S.T. (2013). Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 110: 2105–2113.

Annexes

Annexe 1

Milieux utilisés

- **Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)**

Glucose	20 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 6.5. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Yeast Peptone Glucose (YPG)**

Extrait de levure	10 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 6.5. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Malt Extract Agar (MEA)**

Extrait de malt	30 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 5.0/5.5. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Amidon de pomme de terre	50 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Corn Meal Agar (CMA)**

Farine de maïs	2 g
Agar	20 g

Le pH est ajusté à 6.5. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Yeast Nitrogen Base (YNB) pour les tests d'assimilation de carbone**

YNB	6.7 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

- **Yeast Carbon Base (YCB) pour les tests d'assimilation d'azote**

YCB	11.7 g
KNO ₃	0.78 g (ou équivalent)*
Eau distillée	1000 ml
*NaNO ₂ ,	0.26 g

- **Yeast Extract Peptone (YP)**

Extrait de levure	4.5 g
Peptone	7.5 g
Eau distillée	1000 ml

- **Yeast Nitrogen Base – glucose (YNB-glucose)**

YNB	6.7 g
Glucose	50 g
NaCl	(50, 100, 200)
Eau distillée	1000 ml

- **Plate Count Agar (PCA)**

Tryptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Glucose	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Eau Peptonée**

Peptone de caséine	1 g
NaCl	5 g
Tween 80	1 à 2 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2

Méthode de dosage

1/ Réactif DNS

Dissoudre 1g de DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique) dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30 g de tartrate double Na, K. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Filtrer. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière (Miller, 1959).

2/ Dosage des protéines

Le dosage est effectué selon la méthode de Lowry, (1951).

Les solutions nécessaires sont :

- ✓ Solution A : carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0,1N,
- ✓ Solution B : tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée,
- ✓ Solution C : sulfate de cuivre, 5 H₂O à 1% (w/v) dans l'eau distillée,
- ✓ Solution D : 0,5 ml de C + 0,5 ml de B + 50 ml de A. Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
- ✓ Solution E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 au moment de l'emploi.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit:

- ✓ Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml,
- ✓ Solution D : 5 ml.

Après une agitation et un repos de 10 minutes sur la paillasse, 0,5 ml de la solution E sont rajoutés. Après une deuxième agitation, le développement de la coloration est obtenu après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est réalisée à 650 nm.

3/ Dosage des glucides

La méthode de Dubois et al., (1956) est utilisée pour estimer la teneur en résidus glycosidiques totaux. Elle n'est pas spécifique et réagit indifféremment avec les mono-oses neutres, les aldoses et les cétooses libérés par hydrolyse à l'acide sulfurique. Cette étape déshydrate les oses qui forment des hydroxy-méthylfurfural (HMF) à partir des hexoses ou des furfurals à partir de pentoses. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orange).

Les solutions nécessaires sont :

- ✓ Solution de phénol à 5 % dans l'eau distillée,
- ✓ Acide sulfurique concentré $d = 1.84$.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit:

- ✓ Solution de l'échantillon convenablement dilué : 1 ml,
- ✓ Solution de phénol 1 ml,
- ✓ Acide sulfurique (H₂SO₄) concentré 5 ml

Après une agitation et un repos de 10 minutes à température ambiante. Le mélange est chauffé à 30 °C pendant 20 minutes. L'absorbance peut être lue au spectrophotomètre à 490 nm.

Dans chaque tube à essai, 1 ml de standard ou d'échantillon sont introduits. Puis 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré sont ajoutés, les tubes sont vortexés et maintenus à température ambiante 10 min. Puis incubé au bain-marie à 30°C pendant 20 minutes. L'absorbance peut être lue au spectrophotomètre à 490 nm. L'échantillon est reproduit en triplicat.

Annexe 3

Séquences D1/D2 (gène ARNr 26S)

- **S1- *Clavispora lusitaniae***

CGGCGAGTGAagCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAAGGT
TTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGA
GCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGG
AATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGC
ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGT
CGAAAAGGGGGGAGGAACAAGA ACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTTCGGGCGCGCGTGT
TATAGCTCGTGTGACGCCTCCATCCCTTTTCGAGGCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTA
ATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTGA

- **S2- *Cryptococcus magnus***

ACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGA
AATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTGCTCTTTGGATTCAGCCGGTTCTGCC
GGTGTACTTCCTTTGAGTGGGGTCAACATCAGTTTTGATCGCTGGATAAAGGCTGGAGGA
ACGTAGTACCCTCGGGTAACTTATAGCCTCCTGTCACATACAGTGGTTGGGACTGAGGA
ACGCAGCACGCCTTTATGGCCGGGATTCGTCCACGTACGTGCTTAGGATGTTGACATAAT
GGCTTTAAACGACCCGTCTT

- **S3- *Cryptococcus magnus***

ACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGA
AATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTGCTCTTTGGATTCAGCCGGTTCTGCC
GGTGTACTTCCTTTGAGTGGGGTCAACATCAGTTTTGATCGCTGGATAAAGGCTGGAGGA
ACGTAGTACCCTCGGGTAACTTATAGCCTCCTGTCACATACAGTGGTTGGGACTGAGGA
ACGCAGCACGCCTTTATGGCCGGGATTCGTCCACGTACGTGCTTAGGATGTTGACATAAT
GGCTTTAAACGACCCGTCTT

- **S4- *Clavispora lusitaniae***

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAAGGTTT
CGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAG
CCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGA
ATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCA
CGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGTC
GAAAAGGGGGGAGGAACAAGA ACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTTCGGGCGCGCGTGT
ATAGCTCGTGTGACGCCTCCATCCCTTTTCGAGGCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAA
TGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTG

- **S5- *Meyerozyma guilliermondii***

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAA
TTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGGACGTCACAG
AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAG
AGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGGAGATCAGACTCGATATTTG
TGAGCCTTGCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCG
GTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGAT
GCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
CCGCCCGTCTTGA

• **S6- *Aureobasidium pullulans***

CGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCCTTCGGGTTTCGCATTGTAAT
TTGTAGAGGATGATTTGGGGAAGCCGCCTGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTATGTGACAGGAAATGGCACCCCTATGTAAATCTCCTTCGACGAGTC
GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGG
CGAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAG
AGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAATCAGACTTGTTTAAACT
GTTTCGGCCGGTCTTCTGACCGGTTTACTCAGTTTGGACAGGCCAGCATCAGTTTCGGCGGC
CGGATAAAGGCTCTGGGAATGTGGCCTCCACTTCGGTGGAGGTGTTATAGCCCAGGGTGT
AATACGGCCAGCCGGGACTGAGGTCCGCGCTTCGGCTAGGATGCTGGCGTAATGGTTGTA
AGCGACCCGTCTTGAA

• **S7- *Meyerozyma guilliermondii***

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGT
AATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG
GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATT
TTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGG
GCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTTGA

• **S8- *Meyerozyma guilliermondii***

TGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTC
TATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGC
TTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTC
GGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATC
AAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTGA

• **S9- *Meyerozyma guilliermondii***

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGT
AATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG
GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATT
TTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGG
GCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTT

• **S10- *Meyerozyma guilliermondii***

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGT
AATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG
GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATT
TTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGG
GCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTTGA

• **S11- *Meyerozyma guilliermondii***

CGGCGAGTGAaGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGT
AATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG
GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATT
TTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGG
GCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTTGA

• **S12- *Meyerozyma guilliermondii***

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGT
AATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG
GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATT
TTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGG
GCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTT
GATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTTGA

• **S13- *Yarrowia lipolytica***

AGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCAT
TGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCT
GGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCA
AAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTG
TTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGG
TGTA CTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTC
GGGCGTTCTCCCCTAACCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTACCCGT
CTTGA

• **S14- *Meyerozyma guilliermondii***

CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAAT
TTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGA
GGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGA
GTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCG
AGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGA
GTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGT
GAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGG
TAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATG
CTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAAC
CGCCCGTCTTGA

• **S15- *Meyerozyma guilliermondii***

GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTA
ATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACA
GAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTC
GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGG
CGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGA
GAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTT
GTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGC
GGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGA
TGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
ACCGCCCGTCTTGA

• **S16- *Meyerozyma guilliermondii***

AGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTCGAAGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAG
AGTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTG
TGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCG
GTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGAT
GCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
CCGCCGTCTTA

• **S17- *Yarrowia lipolytica***

AGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCAT
TGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCT
GGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCA
AAGTGGGTGGTAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTG
TTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGG
TGACTGCCGACCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTC
GGCGTTTCTCCCCTAACCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTACCCGT
CTTG

• **S18- *Meyerozyma guilliermondii***

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAA
TTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAG
AGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTCGAAGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAG
AGTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTG
TGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCG
GTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGAT
GCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
CCGCCGTCTTGA

• **S19- *Meyerozyma guilliermondii***

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAA
TTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAG
AGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTCGAAGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAG
AGTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTG
TGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCG
GTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGAT
GCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
CCGCCGTCTTGA

• **S20- *Yarrowia lipolytica***

GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTG
GCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCC
CGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCA
GCTCAAAGTGGGTGGTAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGA
AATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTG
GGCGGTGACTGCCGACCGGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCG
CCTTCGGGCGTTTCTCCCCTAACCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTCA
CCGTCTTGA

Séquences ITS

• S6- *Aureobasidium pullulans*

AAACTACCTTGTTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTTCGTCCCAG
GCGAGCGCCC GCCAGAGTTAAACCAAACCTTGTATTAAACCGGTCGTCTGAGTTAAAA
TTTTGAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTC
AAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCGTCCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAG
GCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTT
GCCGACTGAAACCTTTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCG
AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCCTTCGGGTTTCGCATTG

Matrice des estimations de la divergence évolutive entre les séquences d'*A. pullulans* et les souches types

Title: fasta file

Description

Analysis

Analysis ----- Distance Estimation

Scope ----- Pairs of taxa

Estimate Variance

Variance Estimation Method ---- None

Substitution Model

Substitutions Type ----- Nucleotide

Model/Method ----- No. of differences

Substitutions to Include ----- d: Transitions + Transversions

Rates and Patterns

Rates among Sites ----- Uniform rates

Pattern among Lineages ----- Same (Homogeneous)

Data Subset to Use

Gaps/Missing Data Treatment --- Pairwise deletion

No. of Sites : 550

d : Estimate

[1] #Aureobasidium_pullulans_var._aubasidani_CBS_100524T_(FJ150952)

[2] #Aureobasidium_pullulans_S6_DBVPG5844

[3] #Aureobasidium_pullulans_CBS_584.75T_(FJ150942)

[4] #Aureobasidium_pullulans_CBS_146.30T_(FJ150916)

[5] #Aureobasidium_melanogenum_CBS_105.22T_(FJ150926)

[6] #Aureobasidium_namibiae_CBS_147.97T_(FJ150937)

[1 2 3 4 5 6]

[1]

[2] 0

[3] 0 0

[4] 0 0 0

[5] 15 15 15 15

[6] 12 12 12 12 7

Title: fasta file

Description

Analysis

Analysis ----- Distance Estimation

Scope ----- Pairs of taxa

Estimate Variance

Variance Estimation Method ----- None

Substitution Model

Substitutions Type ----- Nucleotide

Model/Method ----- No. of differences

Substitutions to Include ----- d: Transitions + Transversions

Rates and Patterns

Rates among Sites ----- Uniform rates

Pattern among Lineages ----- Same (Homogeneous)

Data Subset to Use

Gaps/Missing Data Treatment ----- Pairwise deletion

Codons Included ----- 1st+2nd+3rd+Non-Coding

No. of Sites : 434

d : Estimate

[1] #Aureobasidium_pullulans_CBS_584.75T_(FJ150906)

[2] #Aureobasidium_namibiae_CBS_147.97T_(FJ150875)

[3] #Aureobasidium_subglaciale_EXF-2481T_(FJ150895)

[4] #Aureobasidium_microstictum_CBS_114.64_(FJ150873)

[5] #Aureobasidium_melanogenum_CBS_105.22T_(FJ150886)

[6] #Aureobasidium_pullulans_S6_DBVPG5844

[1 2 3 4 5 6]

[1]

[2] 4

[3] 9 11

[4] 17 19 12

[5] 6 6 7 15

[6] 0 4 9 17 6

Annexe 4

Analyses de la variance

Tableau 1 : Analyse de la variance pour la détermination de la concentration optimale des déchets de tomates.

	SC	ddl	MC	F	p
ord. origine	13,67645	1	13,67645	173,3665	0,000000
[C]	5,61325	5	1,12265	14,2310	0,000109
Erreur	0,94665	12	0,07889		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

[C]	Réponse	GH
1%	0,50	a
2%	0,93	ab
3%	1,20	b
4%	1,90	c
5%	0,45	a
6%	0,25	a

GH : Groupes Homogènes

Tableau 2: Analyse de la variance pour l'effet de la source carbonée sur la production de la PGase par *A. pullulans*.

	SC	ddl	MC	F	p
ord. origine	865,4141	1	865,4141	396,2072	0,000000
Milieu	161,9894	8	20,2487	9,2703	0,000000
Erreur	216,2404	99	2,1842		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

Milieu	Reponse	GH
Ct	1,07	a
PectC	1,83	ab
PectP	2,39	abc
Lac	5,48	d
Gal	2,95	bc
AcGt	3,60	c
AcPGt	2,47	abc
Lrum	3,70	c
Glu	2,00	abc

Tableau3: Analyse de la variance pour l'effet du pH sur l'activité de la PG1 purifiée.

	SC	ddl	MC	F	p
ord. origine	118,1316	1	118,1316	270421,7	0,00
pH	1,8320	18	0,1018	233,0	0,00
Erreur	0,0083	19	0,0004		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

pH	Act1	GH
3	1,23	a
3,5	1,43	a
4	1,53	ab
4,5	1,55	ab
5	1,63	b
5,5	1,65	b
6	1,77	c
6,5	1,8	c
7	1,8	c
7,5	1,86	cd
8	1,97	d
8,5	1,97	d
9	1,99	d
9,5	1,99	d
10	2,1	e
10,5	1,99	d
11	1,81	c
11,5	1,81	c
12	1,62	b

Tableau 4: Analyse de la variance pour l'effet du pH sur l'activité de la PG2 purifiée.

	SC	Degr. de	MC	F	p
ord. origine	83,70947	1	83,70947	239169,9	0,000000
pH	0,55373	18	0,03076	87,9	0,000000
Erreur	0,00665	19	0,00035		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

pH	Act2	Groupes
3	1,36	ab
3,5	1,43	B
4	1,47	B
4,5	1,59	Bc
5	1,73	D
5,5	1,65	C
6	1,59	Bc
6,5	1,55	Bc
7	1,55	Bc
7,5	1,55	Bc
8	1,55	Bc
8,5	1,50	Bc
9	1,46	B
9,5	1,46	B
10	1,46	B
10,5	1,43	B
11	1,38	Ab
11,5	1,26	A
12	1,23	A

Tableau 5: Analyse de la variance pour l'effet de la température sur l'activité de la PG1 purifiée.

	SC	Degr. de	MC	F	p
ord. origine	96,97900	1	96,97900	119328,5	0,000000
pH	1,66847	16	0,10428	128,3	0,000000
Erreur	0,01382	17	0,00081		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

T	Act1	Groupes
10	1,35	A
15	1,46	Ab
20	1,50	Ab
25	1,55	Ab
30	1,55	Ab
35	1,74	B
40	1,84	C
45	1,94	D
50	1,96	D
55	1,96	D
60	2,00	D
65	2,08	E
70	1,70	B
75	1,55	Ab
80	1,54	ab
85	1,54	ab
90	1,48	ab

Tableau 6: Analyse de la variance pour l'effet de la température sur l'activité de la PG2 purifiée.

	SC	Degr. de	MC	F	p
ord. origine	88,75072	1	88,75072	188831,3	0,000000
pH	0,99072	16	0,06192	131,7	0,000000
Erreur	0,00799	17	0,00047		

Test Post-Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK)

T	Act1	Groupes
10	1,26	a
15	1,29	a
20	1,37	ab
25	1,47	b
30	1,53	bc
35	1,66	cd
40	1,67	d
45	1,70	d
50	1,73	de
55	1,73	de
60	1,74	de
65	1,75	e
70	1,75	e
75	1,87	f
80	1,75	e
85	1,61	c
90	1,59	c

Résumés

Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El M'gheir) productrices de polygalacturonase : Purification et caractérisation enzymatique.

Résumé: L'objectif principal de cette étude est la recherche de levures performantes dans la production de la polygalacturonase thermostable pour d'éventuelles applications industrielles. Un total de vingt souches appartenant à une biodiversité de levures des sols de palmeraies et de steppes de la région d'El-M'gheir Wilaya d'El-Oued (Sud-Est d'Algérie) ont été isolées. Les méthodes taxonomiques classiques couplées à la biologie moléculaire (séquençage de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S et de l'ITS) des isolats ont permis d'identifier cinq espèces différentes : *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* et *Yarrowia lipolytica*. La méthode de plate-test-agar a permis d'isoler une seule souche pectinolytique *Aureobasidium pullulans* (S6).

Pour diminuer le coût de production de la polygalacturonase, les déchets de tomates ont été utilisés. Ce substrat est ciblé par sa richesse en glucides solubles (20.25%), en matière minérale (5.83%) et en protéines (18.31%). L'étude montre que la levure sélectionnée *Aureobasidium pullulans* donne une meilleure production en enzyme avec une concentration de 4% en déchets de tomates. Le substrat inducteur est le lactose à 1% entraînant une augmentation de l'enzyme de 642%. L'optimisation du milieu de production, par la méthodologie de surface de réponse, est la suivante : pH 5.16, lactose 1.84 g/L et CaCl₂ 0.089 g/L. La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la PGase de 22.05 UI/ml, soit 5 fois plus élevée que dans les conditions non optimisées. En fermenteur de 20 l, la production maximale de la PGase est obtenue au bout de 32 h de culture correspondant à un maximum de croissance levurienne ; le mécanisme de production de l'enzyme est donc de type associé. Le profil chromatographique sur Séphacryl S-200 révèle deux activités pectinolytiques confirmées par l'élution de 2 pics sur DEAE-Sepharose, il s'agit donc de deux isoenzymes : la PG1 et la PG2. Après ces étapes, ces deux formes isoenzymatiques sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 162.1 et 153.4 et des rendements de 27.39% et 26.45%. La PG1 et la PG2 sont des glycoprotéines. La masse moléculaire déterminée par SDS-PAGE est estimée à 113.79 kDa pour la PG1 et 71.44 kDa pour la PG2. La CCM révèle des enzymes hydrolysant l'acide polygalacturonique en acide monogalaacturonique, ce qui montre que les enzymes sont des exo-polygalacturonases (E.C 3.2.1.67). Ces deux isoenzymes ont des charges électriques et de masses moléculaires différentes avec des pH optimum de 10 et de 5 pour la PG1 et la PG2 respectivement. La PG1 a une bonne stabilité dans la zone de pH 7-11 alors que la PG2 est stable dans une autre zone de pH variant de 4-9 avec des thermo-stabilités de 5 h à 60°C. A 80°C et 90°C, la PG1 conserve 76.6% et 70% de son activité respectivement. Quant à la PG2, elle maintient 88.58% de son activité à 80°C, 70% à 90°C après un traitement thermique de 5 h. Du point de vue application, les deux exo-PGases purifiées se sont montrées capables d'améliorer la clarification du jus de citron. Au vu de ces propriétés physico-chimiques et de thermostabilité, les deux exo-PGases purifiées PG1 et PG2 peuvent être appliquées industriellement pour la clarification du jus de citron ou autres industries : industries alimentaires, textile, papeterie ainsi que le traitement des déchets.

Mots Clés:

Exo-polygalacturonase, *Aureobasidium pullulans*, Optimisation, Déchets de tomates, Purification, Caractérisation.

Isolation, selection of yeast strains from Saharan arid soils (El M'gheir) producing polygalacturonase: Purification and enzymatic characterization.

Abstract: The general purpose of this study is to search for performing yeasts in the production of thermostable polygalacturonase for possible industrial applications. A total of 20 strains, belonging to the yeast biodiversity of palm and steppe soils in the region of El-M'gheir (Province of El-Oued in the south-east of Algeria), were isolated. Conventional methods coupled with molecular biology (sequencing of the D1/D2 region of the gene encoding 26S rRNA and ITS) identified five different species: *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* and *Yarrowia lipolytica*. The agar plate testing method allowed the isolation of a single pectinolytic strain: *Aureobasidium pullulans* (S6).

In order to reduce the cost of the polygalacturonase production, tomato pomace was used. This substrate was targeted by its richness in soluble carbohydrates (20.25%), in mineral matter (5.83%) and in proteins (18.31%). The study showed that the selected yeast *Aureobasidium pullulans* gives a better production of enzyme with a concentration of 4% in tomato pomace. The inducing substrate is lactose 1% causing an enzyme increase of 642%. Optimization of the medium components was achieved with the aid of response surface methodology. The composition of the optimized medium was as follows: pH 5.16, lactose 1.84 g/L and CaCl₂ 0.089 g/L. Practical validation of the optimum medium provided polygalacturonase activity of 22.05 U/ml, which was 5-fold higher than in unoptimized conditions. Batch cultivation in a 20 l bioreactor, the maximum production of the PGase was obtained within 32 of culture corresponding to a maximum of the yeast growth. The mechanism of the enzyme production is therefore of associated type. The chromatographic profile on a Sephacryl S-200 revealed two pectinolytic activities confirmed by the elution of two peaks on DEAE-Sephacryl, it is therefore two isoenzymes: the PG1 and the PG2. After these steps, the two forms of isoenzymes were purified respectively with purification rates of 161.1 and 153.4 and yields of 27.39% and 26.45%. The PG1 and PG2 were glycoproteins. The molecular mass determined with SDS-PAGE was estimated as 113.79 KDa for the PG1 and 71.44 KDa for the PG2. The thin layer chromatography revealed enzymes that hydrolyse polygalacturonic acid to monogalacturonic acid, which shows that the enzymes are exo-polygalacturonases (E.C 3.2.1.67). These two isoenzymes have different electrical charges and molecular weights with optimum pH of 10 and 5 for the PG1 and PG2 respectively. The PG1 has a good stability in the pH zone of 7-11 whereas the PG2 is stable in another pH zone varying from 4 to 9 with thermostabilities of 5 h at 60°C. At 80°C and 90°C, the PG1 retains 76.6% and 70% of its activity respectively. As for the PG2, it maintains 88.58% of its activity at 80°C, 70% at 90°C after a 5 h heat treatment. From the point of view of application, the two purified exo-PGases were able to improve the clarification of lemon juice. In view of these physicochemical properties and the thermostability, the two purified exo-PGases PG1 and PG2 could be applied industrially for the clarification of lemon juice or other industries: food industries, textile, paper and waste processing.

Keywords:

Exo-polygalacturonase, *Aureobasidium pullulans*, Optimization, Tomato pomace, Purification, Characterization.

عزل و اختيار سلالات الخميرة من الأراضي الجافة الصحراوية (المغبر) المنتجة لإنزيم Polygalacturonase : التنقية و دراسة الخصائص الإنزيمية

الملخص : تهدف هذه الدراسة إلى البحث عن خمائر ذات كفاءة عالية في إنتاج إنزيم الـ Polygalacturonase ذو ثبات حراري وذلك لتطبيقات صناعية. سمحت الدراسة بعزل 20 سلالة خميرة تنتمي إلى التنوع البيولوجي لتربة بساتين النخيل و السهوب لمنطقة المغبر، ولاية الوادي (جنوب شرق الجزائر). سمحت الدراسة التصنيفية الكلاسيكية المقترنة بالبيولوجيا الجزيئية (دراسة المجال D1/D2 للحامض الريبي 26S و ITS) للسلالات المعزولة بتحديد خمسة أنواع مختلفة : *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans*, *Yarrowia lipolytica*. سمحت طريقة Plate-test-agar بعزل سلالة واحدة محللة للبكتين *Aureobasidium pullulans* (S6).

من أجل خفض تكاليف إنتاج إنزيم الـ Polygalacturonase، تم استخدام نفايات الطماطم، وذلك لغناها بالكاربوهيدرات القابلة للذوبان (20.25%)، بالمواد المعدنية (5.83%)، وبالبروتينات (18.31%). توضح تجربتنا أن الخميرة المختارة تعطي أفضل إنتاج للإنزيم مع تركيز 4% لنفايات الطماطم. اللاكتوز 1% يعتبر محفز، يؤدي إلى ارتفاع إنتاج الإنزيم بـ 642%. إستمثال وسط الإنتاج، باستعمال منهجية استجابة السطح، يكون على النحو التالي : pH 5.16، اللاكتوز 1.84 غ/ل و CaCl₂ 0.089 غ/ل. مصادقة النموذج سمحت بالحصول على نشاط إنزيم PGase بـ 22.05 وحدة دولية/مل، أي 5 مرات أعلى مما تم الحصول عليه في الظروف غير المثلى. عند استعمال جهاز التخمير بسعة 20 لتر، تم الحصول على الإنتاج الأقصى لإنزيم PGase في خلال 32 ساعة من الزراعة، ما يقابل النمو الأقصى للخميرة، إذن آلية إنتاج الإنزيم هي من النوع المرتبط. كشف الفصل الكروماتوغرافي على عمود هلام السيفاكريل S-200 و على هلام DEAE-Sepharese وجود نشاطين محللين للبكتين و منه يتعلق الأمر بمتشابهي إنزيم: إنزيم PG1 و إنزيم PG2. بعد هاتين المرحلتين، نقي متشابهي الإنزيم بالتالي مع معدل تنقية 161.1 و 153.4 و مردود 27.39% و 26.45%. الإنزيمين PG1 و PG2 عبارة عن بروتينات سكرية. تم تحديد الوزن الجزيئي باستعمال SDS-PAGE و قدر بـ 113.79 كدا بالنسبة لإنزيم الـ PG1 و 71.44 كدا بالنسبة لإنزيم الـ PG2. كشفت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن إنزيمات تحلل حمض polygalacturonique إلى حمض monogalacturonique، مما يشير إلى أن هذه الإنزيمات عبارة عن إنزيمات خارجية (E.C.3.2.1.67). يحمل متشابهي الإنزيم شحنات كهربائية و كتل جزيئية مختلفة مع pH مثالي 10 و 5 بالنسبة للإنزيمين PG1 و PG2 على التوالي. يظهر إنزيم PG1 استقرارا جيدا في مجال pH 7-11، أما إنزيم PG2 فهو مستقر في مجال آخر لـ pH يتراوح من 4-9، مع ثبات حراري لمدة 5 ساعات في درجة حرارة 60° م. في درجة حرارة 80° م و 90° م يحتفظ إنزيم PG1 بـ 76.6% و 70% من نشاطه على التوالي. بالنسبة لإنزيم PG2 فهو يحتفظ بـ 88.58% من نشاطه في درجة حرارة 80° م و 70% في 90° م بعد معالجته حراريا مدة 5 ساعات. من وجهة النظر التطبيقية، أثبت الإنزيمين الخارجيين المنقيين قدرتهما على تحسين صفاء عصير الليمون. نظرا لهذه الخصائص الفيزيوكيميائية و الثبات الحراري يمكن للإنزيمين الخارجيين PG1 و PG2 تطبيقهما في المجال الصناعي من أجل تصفية عصير الليمون أو في صناعات أخرى: صناعة المواد الغذائية، المنسوجات، الورق و كذا معالجة النفايات.

الكلمات المفتاحية : *Aureobasidium pullulans*، Exo-Polygalacturonase، إنزيمات الطماطم، تنقية، وصف.

Thème :

Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El M'gheir) productrices de polygacturonase : Purification et caractérisation enzymatique.

Résumé : L'objectif principal de cette étude est la recherche de levures performantes dans la production de la polygalacturonase thermostable pour d'éventuelles applications industrielles. Un total de vingt souches appartenant à une biodiversité de levures des sols de palmeraies et de steppes de la région d'El-M'gheir Wilaya d'El-Oued (Sud-Est d'Algérie) ont été isolées. Les méthodes taxonomiques classiques couplées à la biologie moléculaire (séquençage de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S et de l'ITS) des isolats ont permis d'identifier cinq espèces différentes : *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* et *Yarrowia lipolytica*. La méthode de plate-test-agar a permis d'isoler une seule souche pectinolytique *Aureobasidium pullulans* (S6). Pour diminuer le coût de production de la polygalacturonase, les déchets de tomates ont été utilisés. Ce substrat est ciblé par sa richesse en glucides solubles (20.25%), en matière minérale (5.83%) et en protéines (18.31%). L'étude montre que la levure sélectionnée *Aureobasidium pullulans* donne une meilleure production en enzyme avec une concentration de 4% en déchets de tomates. Le substrat inducteur est le lactose à 1% entraînant une augmentation de l'enzyme de 642%. L'optimisation du milieu de production, par la méthodologie de surface de réponse, est la suivante : pH 5.16, lactose 1.84 g/L et CaCl₂ 0.089 g/L. La validation du modèle a permis d'obtenir une activité de la PGase de 22.05 UI/ml, soit 5 fois plus élevée que dans les conditions non optimisées. En fermenteur de 20 l, la production maximale de la PGase est obtenue au bout de 32 h de culture correspondant à un maximum de croissance levurienne ; le mécanisme de production de l'enzyme est donc de type associé. Le profil chromatographique sur Séphacryl S-200 révèle deux activités pectinolytiques confirmées par l'élution de 2 pics sur DEAE-Sepharose, il s'agit donc de deux isoenzymes : la PG1 et la PG2. Après ces étapes, ces deux formes isoenzymatiques sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 162.1 et 153.4 et des rendements de 27.39% et 26.45%. La PG1 et la PG2 sont des glycoprotéines. La masse moléculaire déterminée par SDS-PAGE est estimée à 113.79 KDa pour la PG1 et 71.44 KDa pour la PG2. La CCM révèle des enzymes hydrolysant l'acide polygalacturonique en acide monogalaacturonique, ce qui montre que les enzymes sont des exo-polygalacturonases (E.C 3.2.1.67). Ces deux isoenzymes ont des charges électriques et de masses moléculaires différentes avec des pH optimum de 10 et de 5 pour la PG1 et la PG2 respectivement. La PG1 a une bonne stabilité dans la zone de pH 7-11 alors que la PG2 est stable dans une autre zone de pH variant de 4-9 avec des thermo stabilités de 5 h à 60°C. A 80°C et 90°C, la PG1 conserve 76.6% et 70% de son activité respectivement. Quant à la PG2, elle maintient 88.58% de son activité à 80°C, 70% à 90°C après un traitement thermique de 5 h. Du point de vue application, les deux exo-PGases purifiées se sont montrées capables d'améliorer la clarification du jus de citron. Au vu de ces propriétés physico-chimiques et de thermostabilité, les deux exo-PGases purifiées PG1 et PG2 peuvent être appliquées industriellement pour la clarification du jus de citron ou autres industries : industries alimentaires, textile, papeterie ainsi que le traitement des déchets.

Mots clés : Exo-polygalacturonase, *Aureobasidium pullulans*, Optimisation, Déchets de tomates, Purification, Caractérisation.

Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université Frères Mentouri Constantine 1

Présenté devant le jury :

Président:	Mr. KACEM-CHAOUCHE N.	Professeur, Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Directrice de thèse:	Mme MERAIHI Z.	Professeur, Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examinateur:	Mr. NECIB Y.	Professeur, Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examinatrice:	Mme BENDJEMANA K.	Professeur, Univ. Laghrour Abbès, Khenchela
Examinateur:	Mr. KEBIECHE M.	Professeur, Univ. M.S. Benyahia, Jijel
Examinateur:	Mr. YAHIAOUI B.	M.C.A., Univ. Ferhat Abbès, Sétif 1