

  
Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA/ IZTAPALAPA

# RAPPORTS DE BIOTECHNOLOGIE

SELECTION DE SOUCHES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX,  
EN VUE DE PRODUIRE DES PECTINASES PAR  
FERMENTATION SOLIDE DE PULPE DE CAFE

REALISE PAR: Franck BOCCAS

**ORSTOM**  
INSTITUT FRANCAIS  
DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

# No. 14

Dans le cadre de la Coopération Scientifique entre l'ORSTOM (France) et le CONACYT (Mexique) ce travail de fin d'études, pour obtenir le grade d'ingénieur ENSBANA-Dijon, a été réalisé aux Laboratoires de Microbiologie du Département de Biotechnologies de la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa (UAM-I). L'auteur de ce rapport remercie Mrs Sébastienne ROUSSES et Wilfrido RODRIGUEZ pour l'attribution de cet ouvrage.

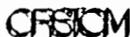


Una de las 54 Universidades  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA DE IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Iztapalapa,

Apartado postal 55-532, México 13, D.F.

Teléfono: 686 03 22, 686-16-11



INSTITUT FRANÇAIS  
DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

MISSION ORSTOM-MEXIQUE

Calle Homero 1001-404  
Colonia Los Morales  
11510 México, D. F.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur S. ROUSSOS, pour la façon dont il m'a accueilli dans son laboratoire, et m'a dirigé dans mes travaux.

Tout en me laissant une grande liberté dans l'organisation et la planification de mon travail, ces conseils et avis sont toujours venus à point pour m'orienter.

Mes remerciements vont aussi à Laure HANNIBAL et à Alexandro MONTERO, pour les conseils et l'aide qu'ils m'ont toujours apportée de si bonne grace.

Encore merci à vous trois pour les amitiés que nous avons pu lier en ses six mois de stage.

Enfin, toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail voudront bien trouver ici le témoignage de ma reconnaissance à leur égard, et plus particulièrement E. FAVELLA, S. SOLIS, A. AQUIAHUATL, et W. RODRIGUEZ.

## SOMMAIRE

	Page
RESUMES	
INTRODUCTION	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I LA PULPE DE CAFE	2
<u>1°) Provenance</u>	2
<u>2°) Composition chimique de la pulpe</u>	2
II LES SUBSTANCES PECTIQUES	3
III LES PECTINASES	3
<u>1°) Classification des enzymes pectinolytiques</u>	3
<u>2°) Pectinestérases</u>	4
a) mode d'action	4
b) description	4
<u>3°) Endopolygalacturonases</u>	4
a) mode d'action	4
b) description	4
<u>4°) Exopolygalacturonases</u>	5
a) mode d'action	5
b) description	5
<u>5°) Endopectate lyases</u>	6
a) mode d'action	6
b) description	6
<u>6°) Exopectates lyases</u>	6
a) mode d'action	6
b) description	6

<u>7°) Endopeptinases</u>	7
a) mode d'action	7
b) description	7
<b>IV : LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX PECTINOLYTIQUES</b>	7
<u>1°) Quelques souches reportées dans la littérature</u>	7
a) Productrices de pectinestérases	7
b) Productrices d'Endopolygalacturonases	8
c) Productrices d'Exopolygalacturonases	8
d) Productrices de lyases	8
<u>2°) Les souches les plus employées pour la production industrielle de pectinases.</u>	8
<u>3°) Conclusions</u>	8
<b>I MATERIEL ET METHODES</b>	9
<u>1- Les microorganismes</u>	9
<u>2- Les milieux de culture</u>	9
2-1 : Milieu PDA	9
2-2 : MI; milieu gélosé à base de pectine	10
2-3 : MII; milieu liquide à base de pectine	10
2-4 : FMS;milieux de FMS de pulpe de café	11
<u>3- Les conditions de culture</u>	11
3-1 : repiquage des souches	11
3-2 : Sélection sur gélose (MI)	11
3-3 : Sélection en milieu liquide (MII)	11
3-4 : Sélection par F.M.S. de pulpe de café	11
<u>4- Méthodes d'analyse et expression des résultats</u>	12
4-1 : Sélection sur gélose (MI)	12
4-2 : Sélection en milieu liquide (MII)	12
4-3 : Sélection par F.M.S. de pulpe de café	13
4-4 : Bilan de matière au cours de l'extraction	13
<u>5-Schéma général de la technique de sélection</u>	15

II	RESULTATS ET DISCUSSION	16
	<u>1- Croissance au repiquage</u>	16
	<u>2- Sélection sur gélose (MI)</u>	16
	2-1 : Mise au point du milieu de culture	16
	2-2 : Résultats de croissance sur MI	17
	2-3 : Tri sur des critères morphologiques et de croissance apicale	18
	<u>3- Sélection en milieu liquide (MII)</u>	20
	3-1 : Mise au point du milieu de culture et de la technique d'analyse	20
	3-2 : Résultats de croissance sur MII	21
	<u>4- Etude en F.M.S. de pulpe de café</u>	22
	4-1 : Sélection par F.M.S. à 25°C	22
	4-2 : Production de pectinases de C28B25 et d'Aspergillus niger CH4, à 25°C	22
	4-3 : Production de pectinases de V22B35 et d'Aspergillus CH4, à 35°C	24
	<u>5- Récapitulation des résultats de sélection</u>	28
	CONCLUSION	29
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30

## TABLEAUX ET FIGURES

	Page
Table I : Liste des souches de collection écartées au cours du repiquage sur PDA.	16
Table II : Résultats des essais de croissance sur milieu MI.	16
Table III : Description du système de choix utilisé pour effectuer un tri parmi les souches ayant démontré une activité pectinolytique supérieure à celle de la référence <u>Aspergillus niger CH4</u> .	19
Table IV : Tableau récapitulatif des 13 souches sélectionnées à la suite de la deuxième étape de sélection.	19
Table V : Classement des souches testées, en fonction de leur activité pectinolytique, par rapport à la souche de référence <u>A.niger CH4</u> .	21
Table VI : Résultats de la sélection par FMS de pulpe de café à 25°C.	23
Table VII : Comparaison du classement de trois souches en fonction de leur activité pectinolytique pour les différentes techniques de sélection utilisées.	24
Table VIII : Comparaison des activités pectinolytiques de <u>C28B25</u> et <u>Aspergillus niger CH4</u> .	25
Table IX : Bilan des pertes de matière (pulpe fermentée et jus) au cours de l'extraction des pectinases produites par <u>C28B25</u> et <u>A. niger CH4</u> .	26
Table X : Comparaison des activités pectinolytiques de <u>V22B35</u> et d' <u>Aspergillus niger CH4</u> .	27
Table XI : Bilan des pertes de matières (pulpe fermentée et jus) au cours de l'extraction des pectinases produites par <u>V22B35</u> et <u>A. niger CH4</u> .	27
Figure 1 : Schéma général de la technique utilisée pour la sélection de champignons filamenteux pectinolytiques, en vue de produire des pectinases par fermentation en milieu solide de pulpe de café.	15
Figure 2 : Récapitulation des différentes étapes de sélection utilisées pour la sélectionner des souches de champignons filamenteux, en vue de produire des pectinases par fermentation solide de pulpe de café.	28

## RESUME

La sélection de deux souches d'*Aspergillus niger* donnant une production de pectinases, supérieure à celle de la référence *Aspergillus niger CH4*, par fermentation solide de pulpe de café, a été réalisée en quatre étapes.

Les souches de champignons filamenteux de la collection UAM-ORSTOM en mauvais état de conservation, ont été éliminées au cours du repiquage sur milieu PDA.

Une sélection en boîte de pétri, sur un milieu gélosé comportant uniquement de la pectine comme source de carbone, a permis d'isoler par mesure du halo de lyse, 22 souches présentant une activité pectinolytique supérieure ou égale à celle de la référence. Sur des critères morphologiques et de croissance apicale, 13 souches parmi les 22 sélectionnées, ont été choisies pour subir la sélection suivante.

Celle-ci, basée sur la mesure de la baisse de viscosité et de pH, après croissance des souches sur un milieu liquide ayant comme seule source de carbone de la pectine, a permis de retenir 5 souches présentant une activité pectinolytique strictement supérieure à celle d'*Aspergillus niger CH4*.

Après fermentation en milieu solide sur pulpe de café, les 2 souches présentant la plus forte activité pectinolytique ont été retenues.

## SUMMARY

Four steps were necessary to select two strains of *Aspergillus niger* producing more pectinases than the reference *Aspergillus niger CH4*, by solid state fermentation of coffee pulp.

Among the filamentous fungi strains from the UAM-ORSTOM's collection, those which were in a bad state of preservation were eliminated during the bedding on PDA medium.

A selection in petri boxes, on a gelyfied medium that only contained pectin as carbon source, enabled us to isolate by lysis blur measures, 22 strains presenting a pectinolytic activity superior or equal to that of the reference. For the following selection step, 13 strains out of the 22 previously selected, were chosen on apical growth and morphological criteriums.

This selection, based on viscosity and pH diminution, due to fungi growing in a liquid medium only containing pectin as carbon source, allowed us to select 5 strains that had a pectinolytic activity strictly superior to *Aspergillus niger CH4*'s one.

After solid state fermentation tests on coffee pulp, the two strains that presented the most important pectinolytic activity were kept.

## INTRODUCTION

Dans l'industrie du café en Amérique Latine, deux méthodes de traitement de la cerise de café sont employées: la voie sèche et la voie humide. La première demandant de lourds investissements en locaux et main d'oeuvre, dans les pays d'Amérique centrale on lui préfère la seconde. Celle-ci comporte quatre étapes principales: le dépulpage qui vise à séparer les cotylédons de la chair du fruit, la fermentation naturelle qui consiste en une digestion du mucilage par la flore pectinolytique naturelle du fruit, le lavage, et le séchage.

La qualité du grain de café en fin de process, ainsi que l'homogénéité de la production dépendent en grande partie de la bonne conduite de la fermentation naturelle. En effet, des irrégularités dans le degré de traitement des grains au niveau des tanks de fermentation, entraînent inévitablement des variations dans la qualité des grains pour la totalité de la production. A fin de mieux contrôler cette étape de démucilage, certaines entreprises ont choisi de la réaliser par voie chimique. Néanmoins, les études préliminaires réalisées par les équipes de la U.A.M.I indiquent que la voie biochimique peut aussi être choisie avec succès.

Ainsi, l'utilisation de solutions d'enzymes pectinolytiques au niveau de la fermentation des grains, permettrait de mieux maîtriser cette étape, et constitue donc une alternative très attrayante pour les industriels du café au Mexique.

Néanmoins, ces enzymes sont chères car importées d'Europe ou des Etats Unis. Par ailleurs, chaque année des quantités considérables de pulpe de café (déchet du dépulpage) sont produites au Mexique et ceci constitue un résidu très encombrant et polluant auquel il serait nécessaire de trouver un débouché.

Une manière de résoudre simultanément ces deux problèmes est de produire des enzymes pectinolytiques, à l'aide de champignons filamenteux, par fermentation en milieu solide de pulpe de café.

Des essais de ce type ont déjà été menés par les équipes de la U.A.M. et actuellement un travail d'optimisation est effectué au niveau pilote à partir d'une souche de la collection internationale Aspergillus niger CH4.

D'autre part, des essais d'isolement de mutants hyperproducteurs de pectinases ont été réalisés, par action d'agents mutagènes sur Aspergillus niger CH4, mais n'ont pas abouti. Ainsi, le but de cette étude était de sélectionner, par des techniques microbiologiques classiques, une souche de champignon filamenteux hyperproducteur de pectinases et destinée à être utilisée dans le cadre de ce programme de recherche.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I LA PULPE DE CAFE

#### 1°) Provenance

Au Mexique, comme dans de nombreux pays d'Amérique Latine, le café est un produit agricole qui contribue énormément à l'économie nationale. Les grains de café y sont obtenus à partir de la cerise, par la technique la plus répandue : la voie humide (fig.1).

La pulpe de café est définie comme étant le déchet obtenu par suite du dépulpage des cerises. Il s'agit donc de l'épicarpe et de l'exocarpe du fruit, alors que le mucilage (mesocarpe) et la coque (endocarpe) sont séparés des grains (endosperme) au cours des étapes ultérieures de traitement (fig.2). Enfin, ce résidu agro-industriel représente une part non négligeable du fruit : environ 40 %.

#### 2°) Composition chimique de la pulpe

Dans le tableau ci-joint on trouve une indication de cette composition chimique, qui varie beaucoup en fonction de la variété, du sol, de la région, des conditions de culture, et de l'état de maturité du fruit traité.

	Pulpe fraîche	Séchée au soleil
Humidité (%)	76.7	12.6
Matière sèche (%)	23.3	87.4
Protéines (n*6.25) (%)	2.1	11.2
Fibres (%)	3.4	21.0
Cendres (%)	1.5	8.3
Graisses (%)	0.48	2.5
Extrait libre d'azote (%)	15.8	44.4

Pour la pulpe sèche: pectines totales 6.5 %  
caféine 1.3 %  
sucres réducteurs 12.4 %

(D'après Aguirre, 1966. Bressani et col, 1972-1974, Bressani et Elias 1976)

## II LES SUBSTANCES PECTIQUES

Les substances pectiques sont des hétéropolysaccharides (PM 30.000 à 300.000) composés d'une chaîne principale d'acide galacturonique partiellement esterifiés par des fonctions méthyl. Un nombre variable de résidus rhamnopyranoses sont accrochés à la chaîne principale par leur carbone 1 ou 2. Suivant la plante d'origine, un nombre plus ou moins grand d'unités galacturoniques peuvent être acétylées en C2 ou en C3. Des chaînes latérales composées en grande partie de galactose, d'arabinose, et de xylose sont liées de manière covalente en C2 ou en C3 des unités galacturoniques, ou en C4 des résidus rhamnosés.

Ainsi, on constate la très grande variabilité potentielle de ce type de composés, pour lesquels le squelette d'unités galacturoniques peut varier entre 50 et 90% du poids de la molécule.

## III LES PECTINASES

### 1°) Classification des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques se répartissent en deux groupes :

- Enzymes de-estérifiantes : Pectinestérases
- Enzymes depolymérisantes :

#### Hydrolases (Hydrolyse)

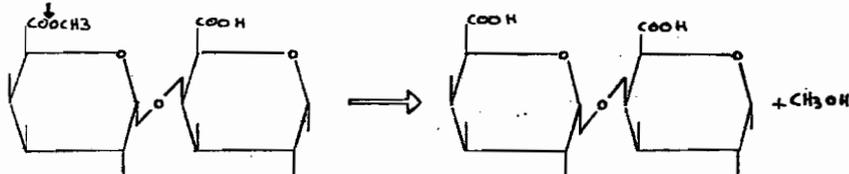
- Endopolygalacturonases
- Exopolygalacturonases

#### Lyases (B-élimination)

- Endopectate lyases
- Exopectate lyases
- Endopectine lyases

### 2°) Pectinestérases

a) mode d'action

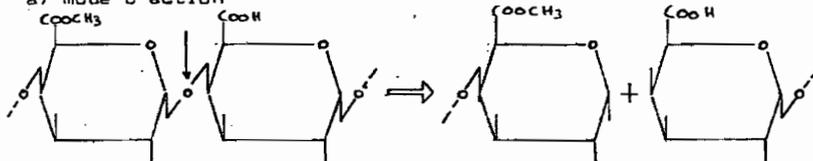


b) description

Les pectinestérases sont synthétisées aussi bien par les plantes supérieures, que par les champignons et les bactéries. Certaines pectinestérases de plantes sont très bien connues, mais par contre celles des bactéries ou des champignons filamenteux très mal. Néanmoins on sait que ces enzymes présentent une grande variabilité suivant leur origine. Par exemple les poids moléculaires peuvent varier de 30.000 à 400.000, les points iso-électriques de 8.4 à 11, les pH optima d'activité de 3.5 à 9, etc... Chez les moisissures, il existe encore une grande variabilité. Ainsi, les pH optima d'activité sont : pour *Acrocylindrium* sp. de 7.5 et pour *Coniothyrium diploidiella* de 4.8 (Kimura et al 1973).

### 3°) Endopolygalacturonases

a) mode d'action



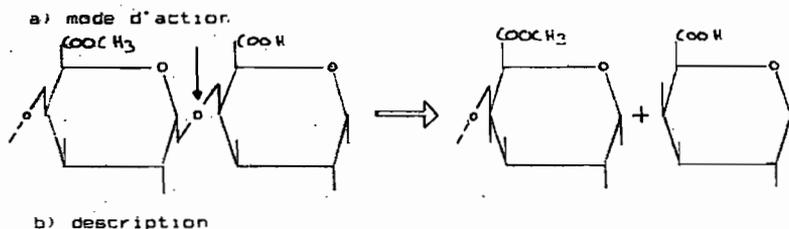
b) description

Récemment, de nombreuses endopolygalacturonases d'origine fongique ont été purifiées. Leurs poids varie entre 30.000 et 85.000 D, leurs points isoélectriques entre 3.8 et 7.0, leurs pH optima entre 3.8 et 6.5 ce qui met en évidence la grande variabilité qui existe ici suivant le champignon producteur (Table 1). Ces enzymes sont spécifiques des polygalacturonates, et donc le degré d'hydrolyse des pectines par cet enzyme décroît lorsqu'augmente le degré d'estérification.

La viscosimétrie est une méthode analytique très sensible pour mesurer l'activité des endogalacturonases. Avec ces enzymes, une chute de 50% de la viscosité spécifique d'une solution de pectates correspond à l'hydrolyse de seulement quelques liaisons glycosidiques. Pour différents enzymes ce pourcentage peut varier, même dans des conditions de test soigneusement standardisées. Cela peut s'expliquer par des différences dans les modes d'action de ces enzymes. En effet, le mode d'action de l'endopectinase de *Kluyveromyces fragilis* est le suivant: attaque au hasard sur la chaîne puis dissociation du complexe enzyme-substrat, libération d'oligogalacturonates qu'elle dégrade ensuite en polymères plus petits, pour enfin obtenir une accumulation de di- et monogalacturonates (Phaff, 1966). Par ailleurs, celle de *Colletotrichum lindemuthianum* libère préférentiellement des tri- et digalacturonates comme premier produit d'hydrolyse, ainsi que comme produits finaux (Engliss et al., 1972).

Enfin, on a aussi démontré des différences entre les compositions des sites actifs, et surtout la taille des sites d'accrochage des enzymes aux substrats (Rexova-Benkova and Markovic, 1976).

#### 4\*) Exopolygalacturonases

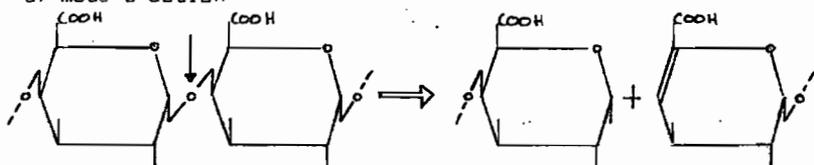


Les exopolygalacturonases se rencontrent aussi bien chez les plantes supérieures que dans le tractus intestinal de nombreux insectes, chez les champignons, et certaines bactéries. Elles ont un pH optimum de l'ordre de 5.0, sont stimulées par les ions calcium et hydrolysent leur substrat par un mécanisme multichaine (Pressey and Avants, 1973, 1975).

Une exopolygalacturonase d'*Aspergillus niger* a été décrite, ainsi qu'une enzyme d'*Acrocyndrium* sp. (Heinrichova and Rexova-Benkova, 1976 et Kimura and Mizushima, 1973), et aucune préférence nette vis à vis de la longueur des chaînes du substrat n'a pu être mise en évidence.

### 5°) Endopectate lyases

a) mode d'action

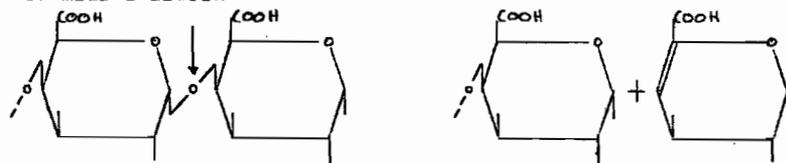


b) description

Ces enzymes sont produites par les bactéries, et par quelques champignons pathogènes des plantes. Elles ont toutes un pH optimum très élevé (6 à 9.9), et un besoin absolu en calcium pour leur activité. L'attaque par B-élimination entraîne la formation de produits possédant une double liaison entre les carbones 4 et 5. La conjugaison de la double liaison avec le groupe carboxyle en C5 engendre un maximum d'absorption à 235 nm. On peut donc facilement mettre en évidence l'activité pectate lyases avec un spectrophotomètre U.V., le coeff. d'extinction molaire étant de 4600 cm<sup>2</sup>.mmol (Macmillan and Phaff, 1966). Leur activité sur les pectates est de nature à faire diminuer la viscosité en fonction du nombre de liaisons glycosidiques rompues. Par ailleurs les différences qui existent entre des enzymes d'origine variable, et celles qui existent pour la même enzyme dans des conditions expérimentales différentes (pH, T°), indiquent un mécanisme d'attaque multiple (Rombouts, 1972).

### 6°) Exopectate lyases

a) mode d'action



b) description

Cette enzyme est l'unique à être produite par quelques microorganismes tels que: *Clostridium multifementans*, *Erwinia* sp., *Erwinia disolvens*, et *Streptomyces nitrosporeus*. Les polyméthyl-galacturonate-méthylglycosides ne sont pas du tout attaqués par ce type d'enzymes, et les pectates sont préférés aux pectines. Les pH optima qui ont été découverts sont assez hauts (6 à 9.5)



## MATERIEL ET METHODES

### 1- Les microorganismes

L'ensemble des champignons filamenteux de la collection ORSTOM-UAM a été isolé soit à partir de parties de la plante du caféier, soit sur des échantillons de sol des zones où les prélèvements ont été réalisés. Il s'agit donc de souches qui sont naturellement présentes dans l'écosystème du caféier, et donc capables de croître sur un substrat à base de café.

Ces souches ont ensuite été purifiées à deux températures différentes (25 et 35°C), sur des milieux gélosés à base de jus de café (Angeles), et ensuite conservées sur les memes milieux au réfrigérateur pendant environ un an. On a ainsi appliqué une pression de sélection qui a permis de conserver l'aptitude physiologique des souches envers un substrat café.

*Aspergillus niger* CH4 a été choisie comme référence, pour ses bonnes aptitudes à la production de pectinases par fermentation en milieu solide sur pulpe de café (Solis Pereira, 1988).

### 2- Les milieux de culture

Au cours de cette étude, nous avons été amenés à utiliser quatre milieux de culture différents:

2-1 : Milieu papa dextrose agar (PDA Sigma)

Ce milieu de culture a été utilisé pour le repiquage et le maintien des souches, les études de croissance apicale et aussi comme milieu de sporulation lors de la préparation d'inoculum.

Formule pour 1000 ml d'eau distillée :

Infusion de pomme de terre	: 200g
Dextrose	: 20g
Agar	: 15g
pH final	: 5.6 + 0.2

Stérilisé 15 minutes à 121°C.

## 2-2 : M1 : Milieu gélosé à base de pectine

Le milieu de culture utilisé contient seulement 2g de pectine par litre, alors que le milieu initial en contenait 20. Il permet de plus de visualiser directement les halos de pectinolyse, en 48 heures, sans avoir à ajouter d'indicateur coloré, et sans avoir à utiliser deux couches de milieu comme cela était fait jusqu'alors (SOLIS PEREIRA 1988).

### Composition du milieu gélosé à base de pectine:

Pectine citrique de marque SIGMA	: 2g
Urée	: 0.05g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: 0.15g
Agar	: 20g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 M pour rectifier le pH	à 5.6
Eau du robinet	: 1000 ml
Rapport C/N = 14.7	
Stérilisé 15 minutes à 121°C.	

## 2-3 : MII : Milieu liquide à base de pectine

Ce milieu de culture ne contient que de la pectine comme source de carbone et uniquement de l'urée comme source d'azote. Il est destiné à mettre en évidence la baisse de viscosité due à l'activité pectinolytique des souches qui seront testées.

### Composition du milieu liquide à base de pectine :

Pectine de marque SIGMA	: 20g
Solution minérale:	
- Urée	: 0.5g
- NaOH N: pour rectifier le pH à 5.8	: 6.25 ml
- Eau du robinet	: 1000 ml

### Stérilisation fractionnée :

- 1) Stérilisation à l'autoclave 20 minutes à 121°C, des solutions eau + urée et NaOH N, et de la seringue de distribution.
- 2) Addition de la pectine en conditions stériles (sous bec bunsen).
- 3) Stérilisation du milieu ainsi préparé, à 70°C pendant 30 minutes, au four micro-ondes.
- 4) Répartition de 30 ml de milieu dans des erlenmeyers de 200 ml, avec la seringue de distribution stérile, et en conditions stériles (sous bec).

#### 2-4 : FMS : milieu de FMS de pulpe de café

Ce milieu était destiné, d'une part à comparer les activités pectinolytiques des souches testées, et d'autre part à nous fournir une information qui nous permette de critiquer les étapes antérieures de sélection (FMS).

##### Composition pour 100 g de pulpe à 70% d'humidité :

Pulpe sèche : 34g

Solution minérale :

- Urée : 0.8g

- Sulfate d'ammonium : 3.3g

- Eau du robinet : 30g

- Acide phosphorique 0.1 M pour ajuster le pH à 4.8

La solution minérale est ajoutée à la pulpe pour constituer un substrat à 50% d'humidité qui est stérilisé à 115°C pendant 30 minutes.

Suspension de spores dans de l'eau du robinet stérile contenant  $2.10^7$  spores /g de pulpe sèche

### 3- Les conditions de culture

#### 3-1 : Repiquage des souches

L'inoculation a été réalisée à l'aide de pipettes sur des milieux répartis en piluliers. Les cultures ont été incubées aux températures d'isolement, c'est à dire soit à 25°C soit à 35°C, pendant au moins 48 heures.

#### 3-2 : Sélection sur gélose (MI)

L'inoculation des milieux à base de pectine (MI) s'est faite en surface à l'aide d'une pipette rectiligne. Comme précédemment, les souches testées ainsi que la souche de référence ont été incubées durant 48 heures à température d'isolement (25 ou 35°C).

#### 3-3 : Sélection en milieu liquide (MII)

Les milieux de culture (MII) ont été inoculés avec une suspension contenant environ  $10^8$  spores/30 ml. Ces milieux ont ensuite été placés sur un agitateur (150 r.p.m.) incubés pendant 40 heures à la température ambiante (25 à 28°C).

#### 3-4 : Sélection par F.M.S. de pulpe de café

Les cultures ont été réalisées en colonnes (ROUSSOS, 1985). A cette fin, on a introduit 20 g de pulpe de café prétraitée et inoculée avec les spores du champignon choisi ( $2.10^7$  sp/g). La densité en colonne était de 0.5 g/cm, les colonnes incubées à 25 ou 35°C, pendant 48 ou 72 heures. L'aération était de 4l/h/colonne.

#### 4- Methodes d'analyse et expression des résultats

##### 4-1 : Sélection sur gélose (M1)

Pour pouvoir comparer les souches testées à la souche de référence, on a choisi de considérer la taille du halo de pectinolyse comme indicateur d'activité.

Néanmoins, les ensemencements et les densités des colonies n'étant pas uniformes d'une souche à l'autre, on a aussi décidé de tenir compte de la taille de la colonie. On a donc mesuré le diamètre du halo (Hi), le diamètre de la colonie (Ci) et ensuite établi le rapport Hi/Ci. Pour la souche de référence *Aspergillus niger CH4* on a pris : Hréf/Créf.

Pour exprimer le caractère pectinolytique des souches testées par rapport à celui de la référence, on a établi le coefficient A' % : pourcentage d'activité supplémentaire par rapport à la référence

$$A' (\%) = (H_i/C_i - H_{réf}/C_{réf}) / (H_{réf}/C_{réf})$$

$$A' (A. niger CH4) = 0$$

##### 4-2 : Sélection en milieu liquide (MII)

Pour effectuer le classement des souches testées, en fonction de leur activité pectinolytique en milieu liquide, nous avons pris deux facteurs en considération.

D'une part la viscosité du milieu de culture après 40 heures d'incubation de la souche considérée, et d'autre part le pH de ce milieu.

Néanmoins, la baisse de viscosité étant le facteur le plus représentatif de l'activité on lui a donné priorité sur le pH pour effectuer un classement qualitatif des souches par rapport à *A. niger CH4* (notre référence). Ainsi, pour classer les souches on calculera la différence de viscosité avec *A. niger* ( $\Delta\mu = \mu_{réf.} - \mu_i$ ), et pour trier deux souches ayant le même  $\Delta\mu$  on tiendra compte de la différence de pH avec *A. niger CH4* ( $\Delta pH = pH_{réf.} - pH_i$ ).

Les deux essais réalisés pour chaque souche ont été filtrés grossièrement (gaze) et mélangés. Le pH des mélangés a été mesuré, puis la viscosité sur deux prises d'essais de 19 ml à l'aide d'un viscosimètre de type *Brookfield R.V.*

Enfin, avec ce système de classement les souches présentant un  $\Delta\mu$  positif seront considérées comme ayant une activité pectinolytique supérieure à celle de la référence et seront retenues. A l'inverse pour les souches présentant un  $\Delta\mu$  négatif, elles seront par la suite écartées.

## 4-3 : Sélection par F.M.S. de pulpe de café

Pour comparer les activités pectinolytiques des souches que l'on a fait croître sur pulpe de café, on a extrait les enzymes par pressage et ensuite déterminé les activités de dépectinisation de ces échantillons.

Pour l'extraction, nous avons additionné à la masse de pulpe fermentée une quantité équivalente d'eau distillée, bien homogénéisé et pressé à 1000 psi. Le jus extrait a ensuite été remélangé au "gateau", et le tout presse une deuxième fois à 1000 psi.

Pour mesurer l'activité pectinolytique des extraits nous avons utilisé une méthode viscosimétrique.

Celle-ci consiste à considérer qu'une U.D. (Unité de Dépectinisation) correspond à une baisse de viscosité de 50 % d'une solution de pectine à 2 %, en 10 minutes. Cette méthode a été utilisée dans les conditions suivantes : Une température de 45 °C, une prise d'essai de 1 ml d'extrait dans 18 ml de solution de pectine M.R.S. de marque Grinstead à 2 % dans un tampon à pH 5.5, la mesure étant réalisée avec un viscosimètre de type *Brookfield R.V.*

Pour chaque échantillon dont on voulait connaître l'activité, on a réalisé les dilutions nécessaires pour qu'un ml fasse diminuer de 50 % la viscosité de la solution de pectine M.R.S., en une période de temps comprise entre 7 et 11 minutes. En effet, il est très difficile d'obtenir la dilution qui permette d'entraîner une baisse de viscosité de 50 % exactement en 10 minutes. Par ailleurs, dans l'intervalle de temps cité et dans les conditions décrites, la diminution de la viscosité en fonction du temps est linéaire (CASANOVA, 89).

Les activités pectinolytiques ont été exprimées de deux manières:

- AI : En UD/ ml de jus filtré, qui correspond à l'activité mesurée.
- AII : En UD/ g de pulpe fermentée, qui est calculée

$$AII = (AI * JF) / P$$

## 4-4 : Bilan de matière au cours de l'extraction

Pour connaître les pertes qui surviennent au cours du pressage et de la filtration nous avons réalisé un bilan de matière sur le substrat pressé (pulpe fermentée et eau ajoutée).

Pour cela, on a pesé (à 0.01 près) pour chaque échantillon:

- la masse de pulpe fermentée (P),
- la masse d'eau ajoutée pour le pressage (E),
- la masse de jus extrait après les deux pressages (J),
- la masse du gateau de presse (G),
- la masse de jus filtré récupéré (JF).

LES RESULTATS SERONT EXPRIMES COMME LA MOYENNE DES QUATRE ECHANTILLONS CORRESPONDANT LA FERMENTATION AVEC LA SUCRE CONSIDERES.

NOUS AVONS ENSUITE CALCULÉ POUR CHAQUE ECHANTILLON, LES PERTES DE MATIERE, POUR LE PRESSAGE ET LA FILTRATION, ET LES AVONS EXPRIMÉES EN POURCENTAGE DE LA MASSE (EAU + PULPE FERMENTÉE) QUE NOUS AVONS PRESSÉE.

Pertes au cours du pressage :

$$P_p = ((P + E) - (G + J)) / (P + E)$$

Pertes totales :

$$P_t = ((P + E) - (G + J)) / (P + E)$$

Pertes à la filtration :

$$P_f = P_t - P_p$$

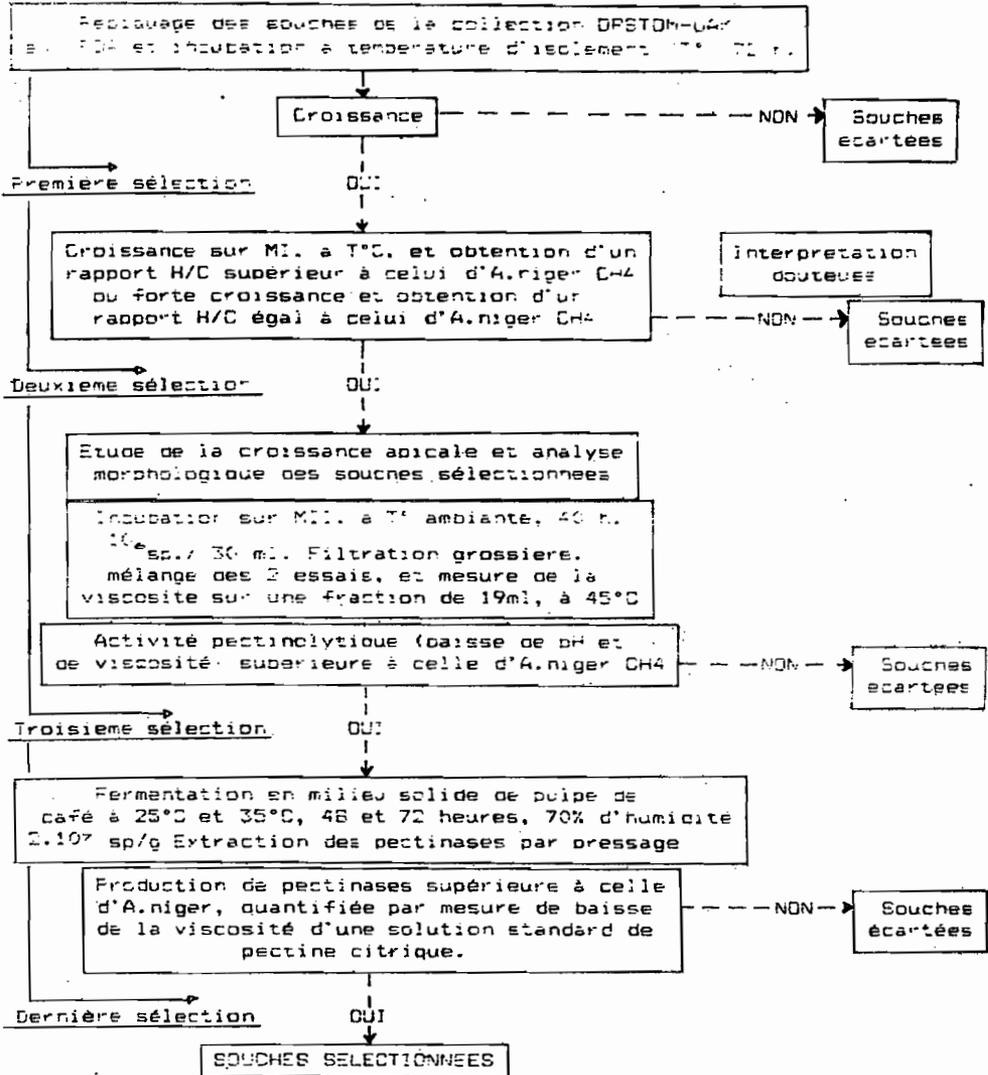


Fig. 1 : Schéma général de la technique utilisée pour la sélection de champignons filamenteux pectinolytiques, en vue de produire des pectinases par fermentation en milieu solide sur pulpe de café.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1- Sélection au repiquage

Sur les 268 souches de la collection qui ont été repiquées, 20 ont été écartées au cours de cette étape. Dans tous les cas, il s'agissait de souches qui se trouvaient dans un mauvais état de conservation, c'est-à-dire que le milieu de culture était fortement desséché et le mycelium pratiquement inexistant.

Table. I : Liste des souches de collection écartées au cours du repiquage sur PDA.

V 30 A 35	C 3 B 25	C 11 C 25
V 31 A 35	C 4 B 25	V 1 B 25
V 32 A 35	C 8 B 25	V 12 B 25
V 1 A 25	C 13 B 25	V 22 B 25
V 3 A 25	C 23 B 25	V 34 B 25
V 5 A 25	C 24 C 35	C 38 B 35
V 12 A 25	C 27 C 35	

### 2- Sélection gélose (MI)

#### 2-1 : Mise au point du milieu de culture

Le milieu de culture mis au point pour la deuxième étape de sélection, devait répondre à deux exigences:

- Etre sélectif pour les souches pectinolytiques.
- Permettre une visualisation facile de l'activité pectinolytique.

Les types de pectinases produites par les microorganismes et surtout les quantités respectives des différents enzymes, étant spécifiques du substrat (SOLIS PEREIRA, 1988), nous avons tout d'abord pensé que le milieu le plus adapté serait un milieu à base de pulpe de café. La mise en évidence de l'activité pectinolytique se faisant par révélation du halo de lyse, à l'aide d'un indicateur coloré (iode) (SOLIS PEREIRA 1988). Néanmoins, en raison de l'opacité des milieux à base de pulpe de café, les essais réalisés dans cette direction se sont avérés infructueux, car la visualisation des halos était impossible.

On a donc décidé de s'orienter vers un milieu synthétique à base de pectine commerciale. Pour cela, nous sommes partis de la composition du milieu utilisé par S.PEREIRA auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

- Suppression des oligo-éléments et remplacement de l'eau distillée par de l'eau du robinet,
- remplacement du  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  par du  $\text{H}_3\text{PO}_4$  comme correcteur de pH,
- correction des quantités de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et d'UREE pour atteindre un rapport C/N de l'ordre de 14, en choisissant de se placer à un rapport  $\text{NH}_4/\text{Urée}$  de 3 pour être certain d'obtenir une acidification du milieu favorable à l'expression des activités pectinolytiques (A.H.ROSE 1980),
- choix d'une pectine plus pure, c'est-à-dire ayant un taux de sucres réducteurs libres inférieur à celui de la pectine employée jusqu'alors,
- et enfin optimisation de la quantité de pectine nécessaire pour une visualisation facile des halos de lyse (essais réalisés avec 20 g/l, 10 g/l, 5 g/l, et 2 g/l).

## 2-2 : Résultats de croissance sur M1

Au cours de cette étape, on a pu classer les souches en 4 groupes présentant les profils de croissance suivants :

- Des souches ne présentant pas de croissance ( $C_i = 0$ ), et qui ne doivent donc pas disposer d'équipement enzymatique leur permettant d'utiliser la pectine ou ses sucres constitutifs (acide galacturonique, galactose, arabinose, xylose, rhamnose...) comme source de carbone.

- Des souches présentant une croissance, mais pour lesquelles nous n'avons pas observé d'halos de lyse sur le milieu utilisé ( $H_i/C_i = 1$ ). On peut bien sûr penser que ces souches ont un caractère pectinolytique mais qu'elles ne sécrètent pas d'enzymes. Néanmoins, compte tenu des conditions de stérilisation du milieu (121°C pendant 15 minutes), le substrat pectique a du subir une hydrolyse partielle, entraînant notamment la libération des unités glycosidiques (galactose, arabinose, rhamnose...) liées de manière covalente en C2 et C3 des acides galacturoniques. Ainsi, ces souches ont probablement utilisé ces sucres libres pour leur croissance.

- Des souches, pour lesquelles on a pu observer un halo de lyse autour des colonies et qui produisent donc fort probablement des exo-enzymes pectinolytiques ( $H_i/C_i > 1$ ). Parmi celles-ci, certaines présentaient une activité supérieure ou égale à celle de la référence ( $A' > 0$ ), et d'autres une activité inférieure ( $A' < 0$ ).

A ce stade nous avons donc pu retenir 22 souches dont l'activité pectinolytique était supérieure ou égale à celle de la référence.

Table II : Résultats des essais de croissance sur milieu M1.

	$C_i = 0$	$H_i/C_i = 1$	$H_i/C_i > 1$		
			$A' < 0$	$A' = 0$	$A' > 0$
Nbr. de souches	12	117	97.	7	15
% du total	5	47	39	9	

2-3 : Tri sur des critères de morphologie et de croissance apicale.

Nous avons ensuite réalisé un tri parmi ces 22 souches de manière à ne conserver que celles qui nous paraissaient les plus intéressantes pour la suite de l'étude.

Pour réaliser ce tri, nous n'avons pris en compte aucune donnée relative à l'activité pectinolytique des souches. Néanmoins, lorsque l'on disposait de deux souches de même nature, il nous est paru préférable de ne conserver que celle qui avait montré la croissance apicale la meilleure. En effet, celle-ci disposait à priori de meilleures chances que l'autre pour coloniser le milieu. Bien sûr, suivant ce raisonnement, on aurait dû éliminer toutes les souches ayant une croissance apicale inférieure à celle de la référence, et ainsi encore restreindre la liste. Mais ne pouvant pas prédire le comportement de ces souches au cours de la fermentation en milieu solide, nous avons décidé de les conserver.

Ainsi, nous n'avons retenu que les souches qui entraient dans les cas suivants :

Cas n° 1 : Souche étant le seul représentant du groupe de souches considéré (Exemple de groupe de souches : V - A 25) même si sa croissance apicale était inférieure à celle de la référence.

Cas n° 2 : Souche présentant une morphologie unique au sein d'un même groupe de souches, même si sa croissance apicale était inférieure à celle de la référence.

Cas n° 3 : Souche ayant la croissance apicale la plus forte lorsque l'on avait à choisir entre plusieurs de même morphologie.

Table III : Description du système de choix utilisé pour effectuer un tri parmi les souches ayant démontré une activité pectinolytique supérieure ou égale à celle de la référence Aspergillus niger CH4.

Groupe	Souche n°	Morphologie	cr. apicale	choix
A	1	X	<CH4	OUI Cas n° 1
B	1	X	<CH4	OUI Cas n° 2
	2	Y	<CH4	NON
	3	Y	>CH4	OUI Cas n° 3

Le tri effectué à partir des résultats de croissance apicale et des études morphologiques nous a permis de restreindre la suite de l'étude à seulement 13 souches sur les 22 déjà sélectionnées.

Table IV : Tableau récapitulatif des 13 souches sélectionnées à la suite de la deuxième étape de sélection.

Souches	Morphologie	Croissance apicale	A %
V 16 A 25	Penicillium sp 1	inférieure à A.niger CH4	21
V 23 A 25	Penicillium sp 2	inférieure à A.niger CH4	4
V 34 A 25	Penicillium sp 3	inférieure à A.niger CH4	16
C 14 A 25	Penicillium sp	inférieure à A.niger CH4	19
C 16 A 25	Aspergillus niger	égale à sup. à A.niger CH4	3
V 12 A 35	Aspergillus niger	égale à A.niger CH4	10
V 22 B 35	Aspergillus niger	égale à A.niger CH4	0
V 32 B 25	Aspergillus niger	égale à A.niger CH4	0
C 15 C 25	Penicillium sp	inférieure à A.niger CH4	0
C 16 C 25	Aspergillus niger	égale à inf. à A.niger CH4	34
C 15 B 25	Penicillium sp	inférieure à A.niger CH4	56
C 17 B 25	Aspergillus niger	égale à A.niger CH4	0
C 28 B 25	Aspergillus niger	égale à sup. à A.niger CH4	0

### 3- Sélection en milieu liquide (Mil)

#### 3-1 : Mise au point du milieu de culture et de la technique d'analyse

Ce milieu de culture, destiné à la troisième étape de sélection, devait présenter les caractéristiques suivantes:

- Ne contenir que de la pectine comme source de carbone pour la croissance des souches testées.
- Présenter une viscosité suffisamment importante pour permettre d'observer une baisse de viscosité significative due à l'activité pectinolytique des souches testées.

Ainsi, pour le mettre au point, nous avons pris comme base le milieu réalisé précédemment en y apportant les modifications suivantes:

- Multiplication par 10 de la quantité de pectine pour obtenir la viscosité requise,
- Multiplication par 10 de la quantité d'Urée, et suppression du sulfate d'ammonium, pour limiter l'acidification du milieu au cours de la croissance des souches,
- Utilisation de NaOH comme correcteur de pH,
- Adoption d'une nouvelle technique de stérilisation pour palier le problème de perte de viscosité due à la dénaturation thermique de la pectine au cours de cette opération (cf. Matériel et méthodes).

Les essais préliminaires ont démontré que la technique choisie permettait de conserver la viscosité initiale en obtenant un milieu de culture qui conservait une parfaite stérilité pendant les 72 heures nécessaires à notre étude.

Pour effectuer le classement de souches en fonction de leur activité pectinolytique nous avons pris en compte deux facteurs :

- La viscosité, car au cours de la croissance de souches pectinolytiques, celles-ci libèrent des enzymes pectinolytiques qui en hydrolysant le substrat lui font perdre sa viscosité initiale. Ainsi, on peut considérer qu'une souche ayant entraîné une baisse de viscosité supérieure à celle enregistrée après croissance de la référence, possède une activité pectinolytique supérieure.
- Le pH, car au cours de la croissance des souches, la dégradation de la source d'azote comme de la pectine entraîne une acidification du milieu de culture. Ainsi, le pH est aussi un indicateur de croissance des souches sur le milieu considéré. Par ailleurs, pour des souches destinées à être utilisées pour des fermentations en milieu solide, l'acido-tolérance est importante. En effet, comme les fermentations en milieu solide se déroulent en conditions non stériles, on est amené à travailler à des pH acides (4 à 5) pour inhiber le développement des bactéries, et favoriser celui de l'inoculum.

## C-2 : Résultats de croissance sur M11

Suite à cette étape de sélection, nous avons pu établir le classement suivant pour les 13 souches sélectionnées précédemment.

Table V : Classement des souches testées en fonction de leur activité pectinolytique par rapport à la souche de référence A.niger CH4.

Souches	uréf - ui (ct.poises)	pHréf - pH	Classement	Caracteristiques
V 22 B 35	+1 + 0.17	0.2	1	Souches ayant une activité pectinolytique supérieure à A.niger CH4
C 28 B 25	+1 + 0.15	0.1	2	
C 16 C 25	0 + 0.17	0.2	3	
C 15 B 25	0 + 0.14	0.1	4	
C 17 B 25	0 + 0.14	0.1	4	
C 15 C 25	-0.5 + 0.14	0	5	Souches ayant une activité pectinolytique inférieure à celle de la référence A.niger CH4
V 32 B 25	-0.5 + 0.17	0	6	
C 16 A 25	-1.0 + 0.15	0	7	
V 34 A 25	-1.0 + 0.14	0	7	
V 23 A 25	-1.5 + 0.15	-0.3	8	
V 18 A 25	-2.0 + 0.15	-0.6	9	
V 12 A 35	-6.0 + 0.13	-1.0	10	
C 14 A 25	-54 + 0.11	-4.0	11	

A ce stade on dispose donc de 5 souches présentant une activité pectinolytique supérieure à celle de la référence. De plus, on dispose ici de données nettement plus précises que celles dont on disposait à la suite de la sélection en boîte de pétri. En effet, bien que l'on ait pu ne faire qu'un classement qualitatif, celui-ci est basé sur une mesure précise de l'activité pectinolytique (Les erreurs absolues sur les mesures de viscosité sont comprises entre 0.11 et 0.17 centipoises).

Parmi ces 5 souches on décidera de retenir C28B25, C16C25, et C15B25 pour l'étape suivante de sélection car l'un des buts de cette étape était de mettre à l'épreuve les deux premières techniques de sélection utilisées. C'est-à-dire de voir si le classement des souches que l'on obtiendra après FMS, est semblable à celui obtenu en milieu liquide, ou à celui défini d'après les résultats obtenus en boîte de pétri.

Il nous fallait donc choisir des souches ayant toutes été isolées à 25°C, car la température d'incubation fixée pour le milieu FMS était de 25°C.

Par ailleurs, il nous fallait choisir un nombre réduit de souches pour faciliter l'étude en FMS, tout en prenant celles qui avaient donné les meilleurs résultats en boîte de pétri, ainsi que celles qui avaient les meilleures activités en milieu liquide.

On a donc choisi C28825 car il s'agit de celle ayant donné les meilleurs résultats en milieu liquide, et C15825 et C16025 car elles avaient montré la plus forte activité en boîte de pétri (les A% étant respectivement de 56 et 34).

#### 4- Sélection par F.M.S. de pulpe de café

##### 4-1 : Sélection par FMS de pulpe de café à 25°C

Pour des quantités équivalentes de matériel presse, on remarque que les volumes de jus filtré varient suivant la souche par laquelle la pulpe a été fermentée. Par exemple, le volume de jus filtré récupéré dans le cas de C28825 est deux fois moins important que pour la pulpe fermentée par Aspergillus niger CH4.

C'est-à-dire que les pertes survenues au cours de l'extraction sont différentes d'une souche à l'autre.

Notre but étant ici, uniquement de comparer les activités pectinolytiques des souches testées, il aurait été très fastidieux de réaliser un bilan de perte de matière pour les 12 échantillons. Nous avons par contre fait l'hypothèse que la matière perdue au cours de l'extraction devait avoir sensiblement la même composition, c'est-à-dire environ le même rapport jus/pulpe. Cela revient à dire que dans un cas ou les pertes de matière seraient égales pour deux souches; que l'on exprime les résultats en UD/ml de jus filtré ou en UD/g de pulpe fermentée, on obtiendrait un rapport égal entre les deux productions.

Nous avons donc comparé les souches en fonction de leur activité pectinolytique, exprimée en UD/ml de jus filtré.

Table VI : Resultats de la selection par FMS de pulpe de cafe, a 25°C.

Echantillon	Activité à 72 h. ( UD / ml de jus filtré )	Activite moyenne à 72 heures
A.niger CH4 0 A.niger CH4 1 A.niger CH4 2	0.0 11.5 + 0.6 12.7 + 0.6	12.1 + 0.3
C 15 B 25 0 C 15 B 25 1 C 15 B 25 2	0.0 15.3 + 0.7 14.5 + 0.7	14.9 + 0.4
C 16 C 25 0 C 16 C 25 1 C 16 C 25 2	0.0 21.3 + 1.1 19.5 + 1.0	20.5 + 0.5
C 28 B 25 0 C 28 B 25 1 C 28 B 25 2	0.0 43.0 + 2.2 43.8 + 2.2	43.7 + 1.1

D'après ces résultats, il apparaît que C28B25 est la souche qui possède la plus forte productivité en enzymes pectinolytiques sur le milieu considéré (FMS). De plus cette souche a une productivité très nettement supérieure (environ 3.5 fois plus) à celle de notre souche de référence Aspergillus niger CH4.

D'autre part, C16C25 possède aussi une activité nettement supérieure à celle de la référence (environ 1.5 fois plus), alors que C15B25 donne une activité proche de celle d'Aspergillus niger CH4.

Par ailleurs, si l'on classe les trois souches testées par ordre de la plus forte productivité on peut placer C28B25 en première position, C16C25 en deuxième, et C15B25 en troisième.

Comparons les classements obtenus pour les trois techniques de sélection employées :

Table VII : Comparaison du classement de trois souches en fonction de leur activité pectinolytique pour les différentes techniques de sélection utilisées.

Souche	En boîte de pétri	En milieu liquide	En F.M.S.
C28825	3	1	1
C16025	2	2	2
C15825	1	3	3

On constate que les classements des souches en fonction de leur activité pectinolytique sont identiques en milieu liquide et en fermentation solide. Ceci démontre que la technique de sélection en milieu liquide est nettement plus performante que la technique de sélection sur milieu gélosé. C'est-à-dire que les deux critères de classement utilisés en milieu liquide semblent avoir été bien choisis. Néanmoins, cela reste à confirmer.

Par ailleurs, il paraît normal d'obtenir une information plus précise à partir des résultats en milieu liquide, plutôt qu'à partir de résultats obtenus en boîte de pétri car, dans le premier cas, le classement est basé sur une mesure de l'activité pectinolytique. Ce qui n'est pas le cas pour les études sur milieu gélosé.

Enfin, il faut noter que si la technique de sélection en milieu liquide est plus efficace que la méthode sur boîte, celle-ci est beaucoup plus économique car requiert dix fois moins de pectine pour le même volume de milieu de culture.

#### 4-2 : Production de pectinases de C28825 et d'*Aspergillus niger* CH4, à 25°C.

Si l'on tient compte des résultats exprimés en UD/ml de jus filtré on peut confirmer que C28825 possède bien une activité pectinolytique supérieure de 3 fois à celle de la souche de référence. Par contre pour les résultats exprimés en UD/g de pulpe fermentée, (c'est-à-dire ceux où l'on tient compte des pertes de matière au cours de l'extraction) la différence est seulement de 2.

Table VIII : Comparaison des activités pectinolytiques de C28B25 et Aspergillus niger CH4.

Souche	UD /ml de jus filtre		UD /g de pulpe fermentée	
	Act. moy. à 48 h.	Act. moy. à 72 h.	Act. moy. à 48 h.	Act. moy. à 72 h.
A. niger CH4	7.7 + 0.2	13.0 + 0.3	6.0 + 0.2	10.5 + 0.3
C 28 B 25	23.2 + 0.6	42.2 + 1.1	11.8 + 0.3	21.6 + 0.5
prod. C28B25	3.1		2.0	
prod. A. n. CH4				

Les pertes au cours de l'extraction pour la pulpe fermentée par C28B25 sont environ le double de celle observées dans le cas d'Aspergillus niger CH4. Il y a trois fois plus de pertes au pressage et elles sont du même ordre à la filtration.

Néanmoins, n'ayant pu déterminer exactement la composition de la matière perdue au cours du pressage (fuites, et rapport jus/pulpe impossibles à évaluer) nous ne pouvons affirmer que celle-ci soit composée pour moitié de jus et pour moitié de pulpe.

On ne peut donc pas dire que lorsque l'on perd deux fois plus de matière, on perd en fait deux fois plus de jus.

Nous nous en tiendrons donc aux résultats exprimés en UD/ g. de pulpe fermentée : C28B25 produit environ deux fois plus de pectinases qu'Aspergillus niger CH4.

Table IX : Bilan des pertes de matière pulpe fermentée et jus: au cours de l'extraction des pectinases produites par V22B35 et A.niger CH4.

	Pertes moyennes au cours du pressage et de la filtration ( en % de la masse de pulpe fermentée et d'eau )	
	A. niger CH4	V 22 B 35
Pp	6.0	18.1
Pf	14.2	18.1
Pt	20.2	36.1

4-3 : Production de pectinases de V22B35 et d'*Aspergillus niger* CH4, à 35°C

Les études en milieu liquide ayant montré que V22B35 possédait une activité pectinolytique supérieure à la référence, nous avons décidé de la mettre à l'épreuve en fermentation solide, mais à sa température d'isolement : 35°C.

Les résultats de cette fermentation démontrent que V22B35 possède bien une activité pectinolytique supérieure à notre référence, en fermentation solide de pulpe de café. Son activité est environ trois fois supérieure à celle d'*Aspergillus niger* CH4.

Table X : Comparaison des activités pectinolytiques de V22B35 et Aspergillus niger CH4.

Souche	UD /ml de jus filtré		UD /g de pulpe fermentée	
	Act. moy. à 48 h.	Act. moy. à 72 h.	Act. moy. à 48 h.	Act. moy. à 72 h.
A.niger CH4	13.9 + 0.3	16.0 + 0.4	5.6 + 0.1	6.9 + 0.2
V 22 B 35	36.8 + 0.9	47.7 + 1.2	16.3 + 0.4	18.9 + 0.5
prod.V22B35 prod.A.n.CH4	2.8		2.8	

Par ailleurs, dans ce cas on remarquera que les pertes de matière à l'extraction (Pt) sont du même ordre de grandeur pour les deux souches.

De plus, que l'on exprime les activités en UD/ml de jus filtré, ou en UD/g de pulpe fermentée, on constate dans les deux cas, que le rapport des productions des deux souches est égal (2.8 fois plus pour V22B35).

Dans ce cas, les pertes ont donc été de même nature pour la pulpe fermentée par V22B35, et pour celle fermentée par Aspergillus niger CH4.

Table XI : Bilan des pertes de matière (pulpe fermentée et jus) au cours de l'extraction des pectinases produites par V22B35 et A.niger CH4.

	Pertes moyennes au cours du pressage et de la filtration ( en % de la masse de pulpe fermentée et d'eau pressée )	
	A. niger CH4	V 22 B 35
Pp	10.5	11.3
Pf	12.8	16.7
Pt	23.3	28.0

## 5- Récapitulation des résultats de sélection

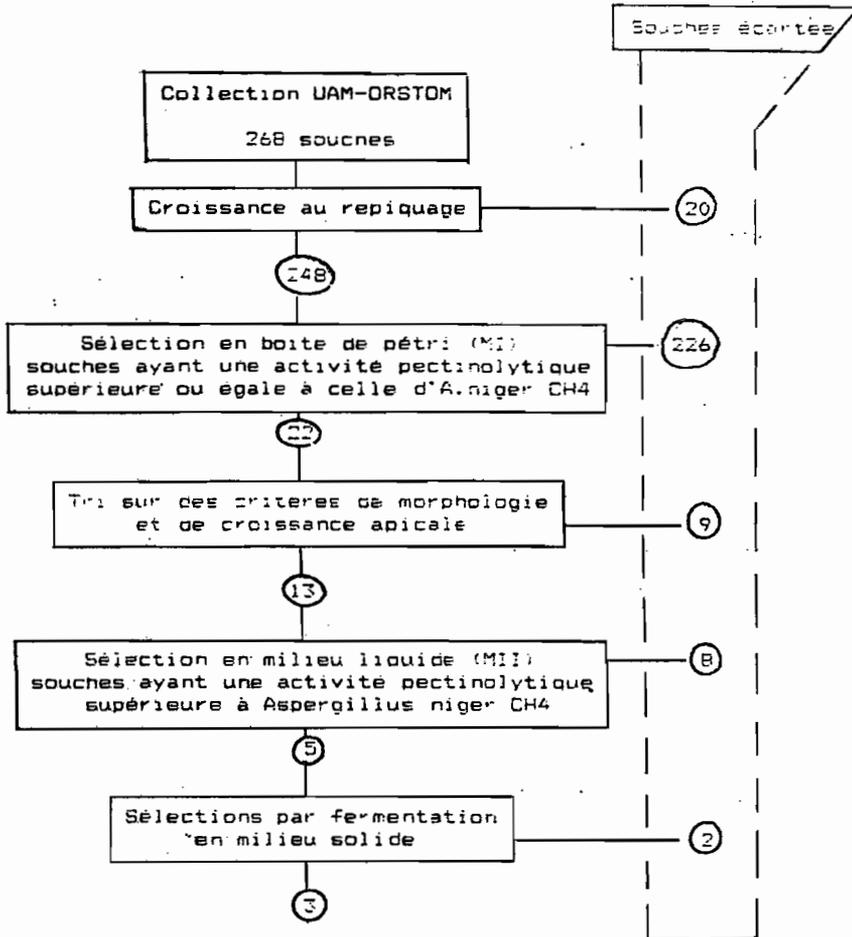


Fig. 2 : Récapitulation des différentes étapes de sélection utilisées pour sélectionner des souches de champignons filamenteux, en vue de produire des pectinases par fermentation solide de pulpe de café.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 : Aquiahuatl M.A., Roussos S. & Salas J.A. 1989. Aislamiento e identificación de cepas de hongos filamentosos con capacidad de degradar la cafeína para detoxificar la pulpa de café. 20° Congreso Nacional de Microbiología del 26 al 29 de abril 1989.
- 2 : Braham J.E. & Bressani 1978. Pulpa de café : Composición, tecnología y utilización. Bogotá CIID. 152 p: ii
- 3 : Casanova A. 1989. Influence du substrat sur la production de pectinases d'*Aspergillus niger* par fermentation en milieu solide. Rapport de stage de fin d'étude UTC-UAMI.
- 4 : Dufour D. 1987. Production de pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse, D.E.A. UTC-UAMI.
- 5 : Fort F. 1988. Purification de pectinases produites par *Aspergillus niger* en fermentation solide. Rapport de stage de fin d'études UTC-UAMI.
- 6 : Panchev J.N., Kirtchev N.A., Kratchanov Chr.G. & Proichev T. On the molecular weight of pectic substances and its relation to their gel strengths. Carbohydrated polymers, 8, 257-269. (1988).
- 7 : Penaloza Izurieta W. 1981. Fermentación sólida de la pulpa de café. Curso de postgrado en ciencias y tecnología de alimentos. CESNA.
- 8 : Raimbault M. Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'état Université Paul Sabatier de Toulouse, France 1980.
- 9 : Rose A.H. Microbial enzymes and bioconversion, Economic Microbiologie, vol. 5, Academic press. 1980.
- 10 : Roussos S. Croissance de trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'état Université de Provence, France. 1985.
- 11 : Solis Pereira S.E. Obtención y usos de mutantes hiperproductivas de *Aspergillus* sp., en la producción de pectinasas extracelulares a partir de desechos agro industriales. Tesis UNAM. 1988.
- 12 : Zuluaga-Vasco J.; Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café; Thèse présentée à la Faculté des sciences de Neuchatel. 1981