

RECHERCHE DE L'ACTIVITE PECTINOLYTIQUE CHEZ 22 SOUCHES DE CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES ISOLEES D'UN SOL DE LA REGION D'EL KALA

H. FENGHOUR, A. LADJAMA, Z. TAIBI

Département de Biochimie, Institut des Sciences de la Nature,
Université Badji-Mokhtar - (23000) Annaba – Algérie –

Abstract

22 microscopic fungi strains pertaining to the following genus : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Nigrospora* and *Trichoderma* have been isolated from soil in the region of El Kala (North-East of Algeria).

These species present a depolymerising pectinolytic activity. They secrete polygalacturonases capable of hydrolysing pectic acid more or less esterified. Besides the strains studied, *Trichoderma* specie seems to be more active and secretes a polygalacturonase activated by chloride sodium (NaCl), acting at pH 5, at 30°C and its preferential substrate is polygalacturonic acid.

Keywords: Fungi, soil, polygalacturonases, polygalacturonic acid, *Trichoderma*

Introduction

Les enzymes pectiques ou pectinases sont un groupe d'enzymes : estérases, polygalacturonases et lyases qui agissent sur les substrats pectiques. Les polygalacturonases et les lyases dépolymérisent les substances pectiques pour donner des oligomères de faible masse moléculaire. Les microorganismes (bactéries, champignons, levures) sont la source essentielle de production de polysaccharidases. Certains de ces enzymes ont déjà un intérêt commercial dans l'industrie agro-alimentaire, c'est le cas des amylases et des pectinases. Ces dernières sont utilisées dans la dégradation des macromolécules pectiques qui restent en suspension à la suite de pressage de fruits [Thibault J. F., 79][Larpent-Gourgand M., 92].

La pectine est un polymère qui représente en effet 22 à 30% du poids sec des écorces d'agrumes et une proportion importante subsiste dans les jus de fruit. Un grand nombre de ces enzymes a été isolé et purifié à partir de filtrat de culture [Sakai T., 93][Durand G., 82][Stratilova E., 93].

Ce travail a permis d'isoler et d'identifier 22 souches de champignons appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Nigrospora* et *Trichoderma* puis, il s'est poursuivi par la recherche de leur activité pectinolytique.

Seule une souche a été sélectionnée afin d'étudier l'équipement enzymatique.

1. Matériel et méthodes

1.1 Isolement des souches de champignons telluriques

Les prélèvements des échantillons de sol pour la recherche de champignons microscopiques à activité pectinolytique, ont été effectués au niveau de la région d'El-Kala (Lac Tonga).

Une série de dilutions du sol au 1/10 a été effectuée selon la méthode Marcelou Kinti et coll. [Marcelou Kinti U., 69]. Seulement deux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} sont retenues pour l'ensemencement du milieu solide choisi pour l'isolement sélectif des champignons. Le milieu choisi est celui de Czapek [Botton B., 85], ajusté à pH 5 et additionné de pectine à 5g/l comme seule source de carbone.

L'ensemencement a été effectué en surface du milieu Czapek par étalement de 0.5 ml de l'inoculum. L'incubation est réalisée dans une étuve thermostatée à 25°C pendant 7 jours.

1.2 Identification des souches de champignons isolées

Après incubation, une mycoflore variée s'est développée. Afin de purifier les souches et les maintenir en culture pure, deux à trois repiquages successifs sur milieu Czapek à base de glucose à 5g/l ont été effectués. Une fois purifiées, les souches sont identifiées en se basant sur leurs caractères cultureux et morphologiques [Botton B., 85][Grames W., 96], permettant ainsi de déterminer le genre de chaque souche.

1.3 Recherche de l'activité pectinolytique chez les souches de champignons isolées

Pour la détection de l'activité pectinolytique, les champignons isolés sont cultivés sur milieu Czapek liquide contenant la pectine comme seule source de carbone. Le milieu liquide est tamponné à pH 5 et la durée d'incubation est de 5 jours à une température de 30°C.

1.4 Extraction des enzymes pectinolytiques

Après 5 jours de culture, le milieu liquide est centrifugé et filtré. On ajoute le sulfate d'ammonium à 80% de saturation pour précipiter toutes les protéines. L'ensemble est dialysé contre l'eau distillée pendant 48 heures à 4°C et le dialysat constitue la préparation enzymatique brute.

1.5 Méthodes analytiques

Le mélange réactionnel enzyme-substrat est composé de 4ml de polygalacturonate à 0.2% dissous dans un tampon acétate de pH 5 à 0.1M. 1ml de solution d'enzyme est ajouté et le tout est mis à incuber pendant 16 heures à 30°C. La recherche de l'activité pectinolytique est effectuée par la méthode à l'acide dinitrosalicylique DNS [G.G. Miller, 59] basée sur la mesure du pouvoir réducteur à la longueur d'onde $\lambda = 540$ nm ou par la méthode de Nelson [Nelson N., 44] et Somogyi [Somogyi M., 45] basée sur la mesure du pouvoir réducteur à $\lambda = 650$ nm.

1.6 Choix d'une souche pour la production d'enzyme

La comparaison entre le temps de culture nécessaire pour le développement des différentes souches isolées ainsi que leur activité pectinolytique a permis de sélectionner la souche *Trichoderma sp.* pour la production de l'enzyme.

1.7 Propriétés de l'enzyme isolé

1.7.1 Recherche du pH optimum de l'enzyme

La variation de l'activité pectinolytique en fonction du pH a été étudiée par incubation de la fraction brute sur l'acide polygalacturonique à 0.2%. La gamme de pH utilisée se situe entre 4,2 et 6 en tampon acétate. L'activité enzymatique est détectée par la méthode Nelson-Somogyi.

1.7.2 Recherche de la température optimale d'action de l'enzyme

La détermination de la température optimale pour l'activité de l'enzyme a été réalisée par incubation de la fraction brute sur l'acide polygalacturonique à 0.2% à pH 5. Des températures de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C ont été testées et l'activité pectinolytique est recherchée par la méthode Nelson-Somogyi.

1.7.3 Substrat préférentiel de l'enzyme :

La variation de l'activité enzymatique a été étudiée sur 4 substrats plus ou moins estérifiés : 0%, 34.1%, 52.4% et 72.8%.

La détermination du substrat préférentiel est réalisée par incubation de la fraction brute sur les 4 substrats à pH 5. L'activité est recherchée par la méthode Nelson-Somogyi.

1.7.4 Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité enzymatique

L'action du NaCl sur l'activité de l'enzyme a été effectuée au pH optimum (pH 5) de celle-ci. Le substrat constitué de polygalacturonate à 0.2% est additionné de chlorure de sodium à des concentrations variant de 0 à 10mM final. L'activité de l'enzyme est mesurée par la méthode de Nelson-Somogyi.

1.7.5 Effet de l'éthylène diamine tétra-acétique (E.D.T.A) sur l'activité enzymatique

La recherche de l'effet de l'E.D.T.A sur l'activité de l'enzyme a été effectuée au pH optimum (pH 5) de celle-ci. Le substrat est constitué d'acide polygalacturonique à 0.2% final. Une concentration 10mM d'E.D.T.A est additionnée au milieu réactionnel. L'activité enzymatique est recherchée par la méthode de Nelson-Somogyi.

2. Résultats et discussions

2.1 Isolement et identification

Parmi les champignons isolés, 22 souches ont été sélectionnées et purifiées en vue de les identifier. Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau I.

L'identification des 22 souches de champignons a permis de mettre en évidence 6 genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Mucor* et *Trichoderma* avec une forte prédominance du genre *Penicillium*.

La forte prédominance des *Penicillium* est due à leur pouvoir élevé de sporulation et à leur capacité de coloniser des milieux très différents même les plus complexes [Bulletin de la société

d'histoire naturelle de l'Afrique du nord, 95]. Les *Aspergillus* ont également marqué leur présence contrairement aux autres genres qui se sont présentés en nombre très réduit. Cela laisse à supposer qu'un bon nombre de micro-organismes spécifiques au substrat ne se développent pas sur des milieux artificiels. [Sengle-Murandi F., 80][Hawksworth D.L., 91].

Tab. I : Colonies isolées sur milieu Czapek

Souche	Genre	Espèce
S ₁	<i>Penicillium</i>	sp ₁
S ₂	<i>Penicillium</i>	sp ₂
S ₃	<i>Penicillium</i>	sp ₃
S ₄	<i>Penicillium</i>	sp ₄
S ₅	<i>Penicillium</i>	sp ₅
S ₆	<i>Penicillium</i>	sp ₆
S ₇	<i>Penicillium</i>	sp ₇
S ₈	<i>Penicillium</i>	sp ₈
S ₉	<i>Penicillium</i>	sp ₉
S ₁₀	<i>Penicillium</i>	sp ₁₀
S ₁₁	<i>Penicillium</i>	sp ₁₁
S ₁₂	<i>Penicillium</i>	sp ₁₂
S ₁₃	<i>Aspergillus</i>	sp ₁
S ₁₄	<i>Aspergillus</i>	sp ₂
S ₁₅	<i>Aspergillus</i>	sp ₃
S ₁₆	<i>Aspergillus</i>	sp ₄
S ₁₇	<i>Aspergillus</i>	sp ₅
S ₁₈	<i>Aspergillus</i>	sp ₆
S ₁₉	<i>Trichoderma</i>	sp
S ₂₀	<i>Mucor</i>	sp
S ₂₁	<i>Alternaria</i>	sp
S ₂₂	<i>Nigrospora</i>	sp

2.2- Détection de l'activité pectinolytique dépolymérisante et choix de la souche

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau II. L'analyse de ces résultats montre que toutes les souches sont actives sur le substrat pectique. Ces souches sécrètent des dépolymérasés capables de scinder le polymère en oligomères de petite taille assimilables par le microorganisme.

Par ailleurs, certaines espèces semblent être plus actives que d'autres. Ainsi, des espèces comme *Aspergillus* sp₅, *Penicillium* sp₇, *Alternaria* sp. *Trichoderma* sp. et *Nigrospora* sp. présentent des activités dépolymérisantes élevées dont les absorbances varient entre 1,4 et 1,9.

Sachant que les dépolymérasés contiennent les lyases et les polygalacturonases, ces dernières agissent à pH acide [Grainvors A, 94] et leur substrat préférentiel est l'acide polygalacturonique. Les polygalacturonases sécrétées seraient donc des polygalacturonases qui agissent par mécanisme d'hydrolyse. En effet, divers souches sont connues dans la

production de ces enzymes [Waksman G., 92][Stotz H.U., 94].

L'étude générale de l'activité pectinolytique des différentes souches isolées montre que la souche *Trichoderma* sp. donne une activité plus ou moins élevée et se cultive le plus facilement en présentant un développement massif au bout d'un temps très réduit (3 jours d'incubation). Cette souche est donc choisie pour une étude plus complète.

2.3 Caractéristiques de l'enzyme isolée de la souche *Trichoderma* sp.

2.3.1 pH optimum d'action de l'enzyme

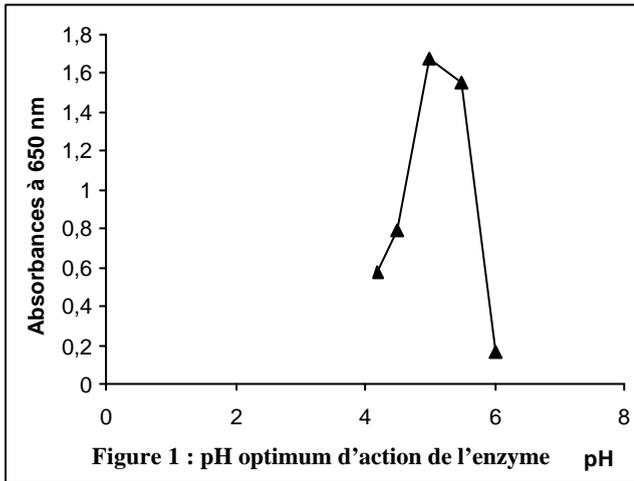
La variation de l'activité enzymatique en fonction du milieu réactionnel a été étudiée pour une gamme de pH allant de 4,2 à 6 en tampon acétate.

L'examen de la figure (1) montre que l'optimum d'activité se situe à pH 5.

En effet, divers microorganismes synthétisent des polygalacturonases actives à pH acide variant de 4 à 6. Ainsi, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus sojae*, et *Penicillium griseofulum* synthétisent des endopolygalacturonases actives à pH 5.5.

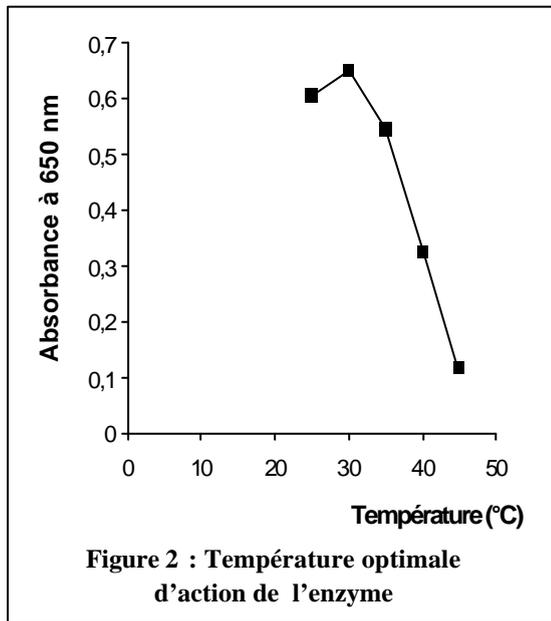
Tab.II : Recherche des pectinases dans le filtrat de culture par la mesure du pouvoir réducteur (méthode au DNS)

Souches isolées	Absorbances mesurées à λ = 540 nm (dilution 1/4)
<i>Penicillium</i> sp ₁	1.097
<i>Penicillium</i> sp ₂	0.583
<i>Penicillium</i> sp ₃	1.298
<i>Penicillium</i> sp ₄	0.751
<i>Penicillium</i> sp ₅	1.302
<i>Penicillium</i> sp ₆	1.528
<i>Penicillium</i> sp ₇	1.99
<i>Penicillium</i> sp ₈	0.273
<i>Penicillium</i> sp ₉	0.657
<i>Penicillium</i> sp ₁₀	0.202
<i>Penicillium</i> sp ₁₁	0.643
<i>Penicillium</i> sp ₁₂	0.651
<i>Aspergillus</i> sp ₁	0.401
<i>Aspergillus</i> sp ₂	0.295
<i>Aspergillus</i> sp ₃	0.598
<i>Aspergillus</i> sp ₄	0.392
<i>Aspergillus</i> sp ₅	1.977
<i>Aspergillus</i> sp ₆	1.302
<i>Mucor</i> sp	1.424
<i>Alternaria</i> sp	1.655
<i>Trichoderma</i> sp	1.453
<i>Nigrospora</i> sp	1.879



2.3.2- Température optimale d'action de l'enzyme

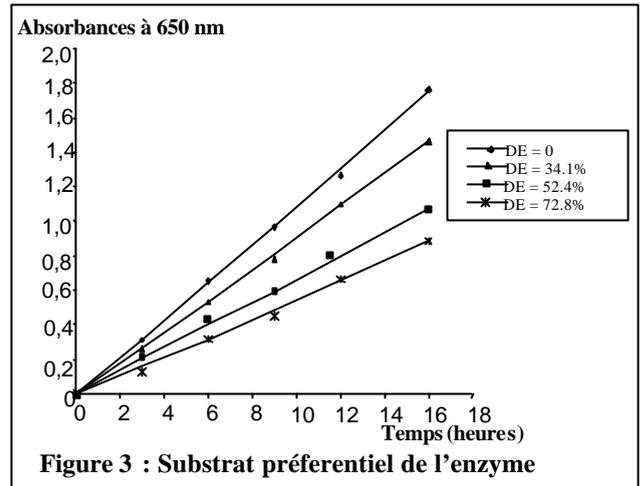
La courbe d'activité pectinolytique en fonction de la température est représentée sur la figure (2). La température optimale d'action de l'enzyme est de 30°C. Cela est observé avec plusieurs



espèces dont les plus connues sont les genres : *Aspergillus* et *Penicillium* [Mouranche A., 85][Rexova-Benkova L., 76].

2.3.3 Substrat préférentiel de l'enzyme

La figure (3) montre que la polygalacturonase isolée est plus active sur un substrat totalement désestérifié (acide polygalacturonique) que sur la pectine de différents degrés d'estérification.



Par ailleurs, l'activité semble diminuer avec l'augmentation du degré d'estérification. Ainsi, avec la pectine hautement estérifiée (72%), l'activité est plus faible qu'avec un polymère estérifié à 34 et 52%. Ces résultats permettent de classer l'enzyme sécrétée par *Trichoderma sp.* parmi les polygalacturonases attaquant de préférence l'acide polygalacturonique, ce qui semble être le cas de quelques polygalacturonases connues chez d'autres espèces du genre *Trichoderma* [Rexova-Benkova L., 76].

2.3.4- Effet du chlorure de sodium sur l'activité enzymatique

Il est connu que la plupart des polygalacturonases isolées de divers microorganismes sont activées par la présence du chlorure de sodium dans le milieu réactionnel [Rexova-Benkova L., 76].

La figure (4) montre qu'en absence de chlorure de sodium, l'activité polygalacturonase reste faible. L'addition du chlorure de sodium augmente l'activité enzymatique jusqu'à une concentration de 4 mM en chlorure de sodium. Par la suite, il y a diminution de l'activité enzymatique.

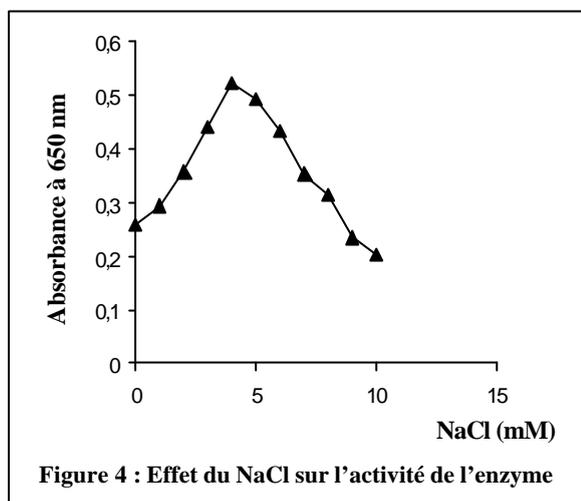
La concentration optimale en chlorure de sodium serait de 4 mM pour une concentration de 0.2% en acide polygalacturonique. En effet les mêmes résultats ont été obtenus pour une polygalacturonase isolée de *Trichoderma reesei* [Thibault J.F., 79][Sakai T., 93].

2.2.5 Effet de l'E.D.T.A sur l'activité de l'enzyme

L'E.D.T.A est un agent chélateur qui ne complexe que les cations bivalents impliqués dans l'activation de plusieurs enzymes. Il les empêche de ce fait, d'agir en tant qu'activateurs.

Toutefois, la plupart des polygalacturonases étudiées ne sont activées que par la présence d'ions monovalents [Durand G., 82].

Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau III.



Tab.III : Effet de l'E.D.T.A sur l'activité polygalacturonase de *Trichoderma sp.*

Mesure de l'activité polygalacturonase	Sans EDTA	Avec EDTA
Absorbance à 650 nm	0.275	0.274

L'examen de ces résultats montre que la présence de l'E.D.T.A dans le milieu réactionnel n'a aucun effet sur l'activité enzymatique. Ce résultat confirme la présence d'une polygalacturonase dans le milieu de culture. En effet, l'E.D.T.A est un inhibiteur des lyases activées par les ions calcium, c'est le cas des pectate-lyases sécrétées par les souches de *Streptomyces SK* et *Streptomyces G* [Ladjama A., 91] ainsi que d'autres lyases sécrétées par *Clostridium felsinum*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Fusarium culmorum* et *Clostridium multifementans* [Rexova-Benkova L., 76].

Conclusion

Le milieu de culture utilisé est à base de pectine hautement estérifiée. Une activité polygalacturonase a été mise en évidence dans le milieu de culture.

Les polygalacturonases attaquent l'acide polygalacturonique comme substrat préférentiel. Les différentes souches sécrètent probablement un mélange d'estérases et de polygalacturonases.

Les estérases déméthylent la pectine et les polygalacturonases dépolymérisent l'acide pectique.

En effet, divers champignons sont connus dans la production d'un mélange de polygalacturonase et d'estérases dont les plus connus sont : *Penicillium funiculosum* qui sécrète une endopolygalacturonase et une pectine méthyl-estérase [Wiseman A., 78] et *Aspergillus niger* qui produit une exopolygalacturonase et une pectine méthyl-estérase [Stratilova E., 93].

REFERENCES

- [1] Botton B., Breton A., Serve M., Guy Ph., Larpent J.B., Veau P. (1985) – Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle – Collection Biotechnologie. Ed. Masson, Paris. pp. 142-145.
- [2] Bulletin de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord (1995) – Les champignons des sols salés de l'est Algérie – pp. 130-140.
- [3] Durand G., Monsan P. (1982) – Les enzymes : production et utilisations industrielles – Ed. Costes C., Gauthier Villars, Paris – . p. 352.
- [4] Grainvors A., Frezier V., Lemaesquier H., Lequart C., Sigle M., Belarbia A. (1994) – Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin- esterase activities – Yeast journal– 10 ; 1311-1319.
- [5] Grams W. (1996) – Identification techniques for soil, Borne fungi – Fungal identification technique office for official publication of the european communities Ed – pp. 92-97.
- [6] Hawksworth D.L. (1991) – The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance and conservation – Mycol. Res. 95; 641-655.
- [7] Jacquiot C. (1978) – Ecologie des champignons forestiers – Ed. Gauthier-Villars, Paris. 94 ; 27-78.

- [8] Ladjama A., Chardron-Loriaux I., Foglietti M.J. (1991) – On the pectolytic activity of two *Streptomyces* strains – FEMS Microbiol. Lett. 79 ; 279-284.
- [9] Larpent-Gourgau M., Sangleer J.J. (1992) – Biotechnologies : principes et méthodes – Collection Biosciences et techniques. Ed. Doin. Paris. 571 ; 61-64.
- [10] Marcelou Kinti U., Paravissilon J., Paniara O.(1969) – On the ecology of yeast, like organisms in Grece – in Journal of Microbiology and Serology. Supp.Yeast- Symposium. D. Yanow. Amsterdam. pp. 124-135.
- [11] Miller G.G. (1959) – A modified starch for use in amylase assays – Anal. Chem. 31 ; 249-254.
- [12] Mouranche A., Costes C. (1985) – Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel – Ed. Gauthier-Villars, Paris, pp. 109-142.
- [13] Nelson N. (1944) – A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose – J. Biol. Chem. 153; 375-380.
- [14] Rexova-Benkova L., Marković O. (1979) – Pectic enzymes – Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 33; 323-385.
- [15] Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J. (1993) – Pectin, Pectinase and protopectine : production, properties and applications – Advances in applied microbiology. 39; 213-294.
- [16] Seigle- Murandi F., Nicot J., Sorin L., Genest L Ch. (1980) – Association hycologique dans la salle de la Verna et le tunnel de l'E.D.F du réseau de la Pierre Saint Martin – Rev. Ecol. Biol. Sol. 17; 149-157.
- [17] Stotz H. U., Contos J.J., Powell A.L., Bennett A.B., Labavitch J.M. (1994) – Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from Tomato – Plant molecular biology, 25, 607-617.
- [18] Stratilova E., Markovic O., Skrovinova D., Rexova-Benkova L., Jornvall H. (1993) – Pectinase *Aspergillus sp.* polygalacturonase : multiplicity, divergence and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases – Journal of protein chemistry. 12; 15-22.
- [19] Thibault J.F., Petit R. (1979) – Les substances pectiques : généralités et domaines d'application dans les industries alimentaires – 12; 233-251.
- [20] Waksman G., Turner G., Walmsley A.R. – Kinetic studies of the polygalacturonase enzyme from *colletotrichum lindemuthianum* – Biochemical Journal. 285; 551-556, 1992.
- [21] Wiseman A. (1978) – Introduction to topics in enzyme and fermentation biotechnology 3 – Ed. Wisman. Ellis Horwood Ltd. pp. 60-66.
- [22] Somogyi M. (1945) – A new reagent for the determination of sugars – J. Biol. Chem. 160; 61-73.