

Université Mohamed KHIDER Biskra
Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Enzymes d'intérêt industriel
(Caractéristiques structurales, sources et propriétés,
modes d'action et intérêt pratique)

Dr. Deghima. A

Année Universitaire 2020/2021

1. Peptidases

Les peptidases sont toutes enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques. Les peptidases sont également connues sous le nom de protéases, protéinases et enzymes protéolytiques. Ces enzymes sont nécessaires à la survie de toutes les créatures vivantes et sont codés par environ 2% des gènes de l'organismes. Il est estimé que 14% des 500 peptidases humaines sont à l'étude en tant que cibles médicamenteuses. Les peptidases sont importantes pour de nombreux processus biologiques, notamment la digestion des protéines alimentaires, le recyclage des protéines intracellulaires, la cascade de la coagulation sanguine, la présentation de l'antigène et l'activation d'une variété de protéines, notamment des enzymes, des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs. En industrie les peptidases sont souvent utilisées en mélanges plutôt que des enzymes individuelles purifiées.

1.1.Types catalytiques

Le type catalytique d'une peptidase concerne les groupes chimiques et les résidus acides aminés responsables des mécanismes de catalyse d'hydrolyse des liaisons peptidiques. Les six types catalytiques spécifiques qui sont reconnus sont : **Sérine, thréonine, cystéine, aspartique, glutamique et métallo-peptidases.**

- Dans les peptidases de type sérine, thréonine et cystéine, le nucléophile catalytique est le groupe réactif d'une chaîne latérale d'acide aminé, soit un groupe hydroxyle (sérine et thréonine peptidases) soit un groupe sulfhydryle (cystéine peptidases) déprotoné par un acide aminé basique voisin.
- Dans les aspartiques et les métallo-peptidases, le nucléophile est couramment une molécule d'eau activée. Dans les peptidases aspartiques, la molécule d'eau est directement liée par les chaînes latérales des résidus aspartiques. Dans les métallopeptidases, un ou deux ions métalliques divalents maintiennent la molécule d'eau en place, et les chaînes latérales d'acides aminés chargés sont des ligands pour les ions métalliques. Le métal est le plus souvent du zinc, mais peut également être du cobalt, du manganèse ou du cuivre.
- Les peptidases glutamiques n'ont été reconnues qu'en 2005, et il reste encore beaucoup à apprendre sur leurs mécanismes catalytiques, mais elles semblent employer une dyade catalytique Glu / Gln.

- Certaines peptidases semblent n'avoir qu'un seul résidu catalytique, qui est le résidu N-terminal. Celles-ci sont connues sous le nom d'hydrolases nucléophiles N-terminales (Ntn). Toutes les thréonine peptidases connues sont des Ntn-hydrolases.

1.2. Peptidases regroupées selon la réaction catalysée

En un sens, toutes les peptidases catalysent la même réaction : l'hydrolyse d'une liaison peptidique. Mais ils sont sélectifs pour la position de la liaison peptidique dans le substrat, pour les résidus d'acides aminés près de la liaison scissile, et pour d'autres caractéristiques du substrat qui ne sont toujours pas comprises. Les termes utilisés pour décrire les différentes spécificités sont expliqués ci-dessous et représentés schématiquement sur la **figure 1**.

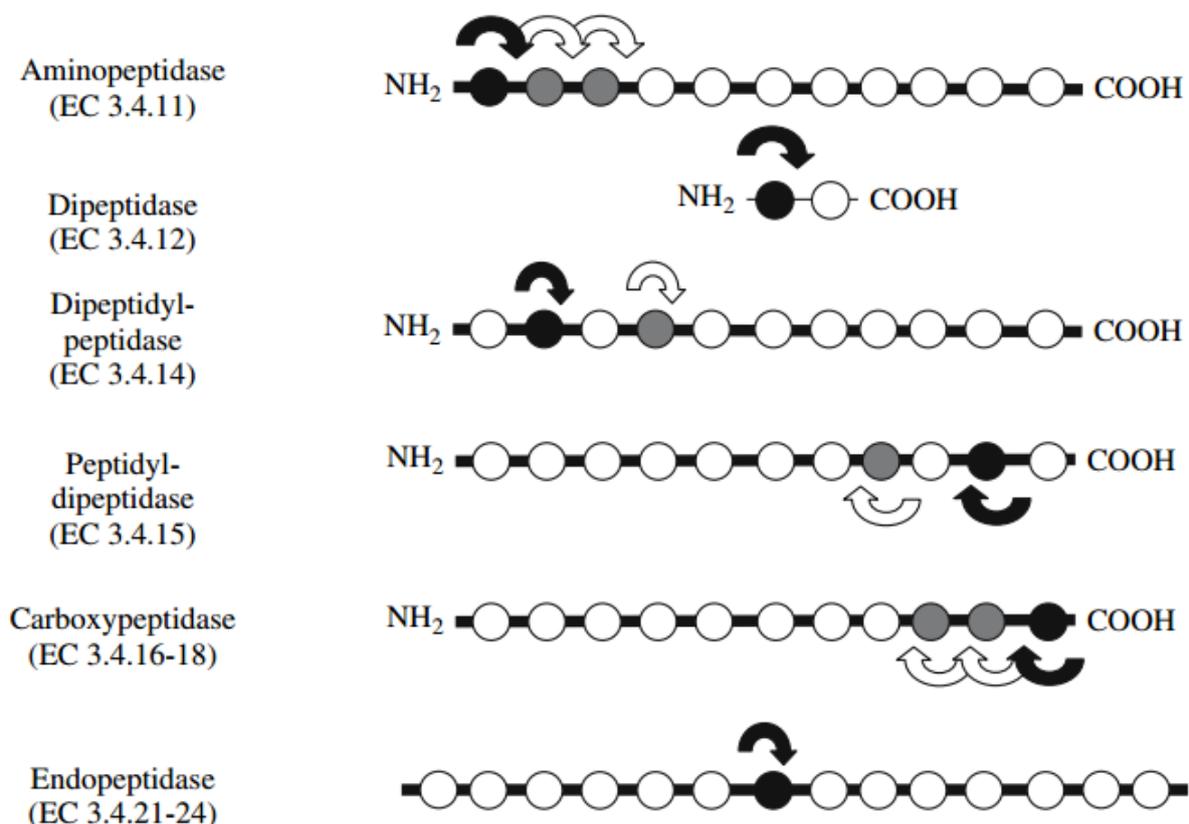


Figure 1 : Classification des peptidases selon la réaction catalysée

1.2.1. Endopeptidases

Une endopeptidase hydrolyse les liaisons alpha-peptidiques internes dans une chaîne polypeptidique, tendant à s'éloigner de l'extrémité N-terminale ou C-terminale. Exemples d'endopeptidases sont la chymotrypsine, la pepsine et la papaïne. Les endopeptidases initient la digestion des protéines alimentaires, générant de nouvelles terminaisons N et C qui sont des substrats pour les exopeptidases qui complètent le processus.

1.2.2. Oméga-peptidases

Les oméga-peptidases forment le deuxième groupe de peptidases qui n'ont pas besoin d'une extrémité N-terminale ou C-terminale libre dans le substrat. Malgré leur manque d'exigence pour un groupe terminal chargé, ils agissent souvent à proximité d'un terminus ou de l'autre, et sont donc totalement distincts des endopeptidases. Certains peptides hydrolysent des liaisons qui ne sont pas des liaisons alpha; c'est-à-dire qu'il s'agit de liaisons isopeptidiques, dans lesquelles un ou les deux groupes amino et carboxyle ne sont pas directement liés à l'alphacarbon de l'acide aminé parent. Les oméga-peptidases sont un assortiment varié de enzymes, y compris les ubiquitinyl hydrolases, les pyroglutamyl peptidases et la gamma-glutamyl hydrolase.

1.2.3. Exopeptidases

Les exopeptidases nécessitent un groupe amino N-terminal libre, un groupe carboxyle C-terminal ou les deux, et hydrolysent une liaison pas plus de trois résidus de l'extrémité. Les exopeptidases sont en outre divisées en aminopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidyl-peptidases, peptidyl-dipeptidases, tripeptidylpeptidases et dipeptidases. Il n'y a pas d'exopeptidases connues qui soient des peptidases aspartiques ou glutamiques.

1.2.4. Aminopeptidases

Une aminopeptidase libère un seul résidu d'acide aminé du N-terminal non bloqué de son substrat: $Xaa + \text{peptide}$ (ou $Xaa + (Xaa)_n$). Exemples sont l'aminopeptidase N et l'aminopeptidase C

1.2.5. Dipeptidases

Une dipeptidase hydrolyse un dipeptide, et nécessite que les deux extrémités soient libre: $Xaa + Xaa$. Des exemples sont la dipeptidase A et la dipeptidase membranaire.

1.2.6. Dipeptidyl-peptidases

Une dipeptidyl-peptidase hydrolyse une liaison dipeptidyle, c'est-à-dire qu'elle libère un dipeptide N-terminal de son substrat: $\text{dipeptide} + \text{peptide}$ (ie $(Xaa)_2 + (Xaa)_n$). Des exemples sont la dipeptidyl-peptidase I et la dipeptidylpeptidase III.

1.2.7. Tripeptidyl-peptidases

Une tripeptidyl-peptidase hydrolyse une liaison tripeptidyle, libérer un tripeptide de l'extrémité N-terminale de son substrat : tripeptide + peptide (c'est-à-dire $(Xaa)_3 + (Xaa)_n$).

1.2.8. Peptidyl-dipeptidases

Une peptidyl-dipeptidase hydrolyse un dipeptide de l'extrémité C-terminale de son substrat : peptide + dipeptide (c'est-à-dire $(Xaa)_n + (Xaa)_2$). Un exemple est la peptidyl-dipeptidase A.

1.2.9. Carboxypeptidases

Une carboxypeptidase hydrolyse un seul résidu du C-terminal non bloqué de son substrat: peptide + Xaa (ou plus précisément: $(Xaa)_n + Xaa$). Des exemples sont la carboxypeptidase A1

1.3. Principales sources des protéases

Des protéases de toutes sources, c'est-à-dire des bactéries, des champignons, des virus, des plantes, des animaux et des humains, ont été identifiées en raison de leurs rôles physiologiques importants. La papaine, la bromélaïne, les kératinases et la ficine sont des protéases bien connues **d'origine végétale**. La papaine, extraite du latex des fruits de *Carica papaya*, est la protéase végétale qui a une longue histoire d'utilisation. La bromélaïne, une cystéine protéase, est extraite et purifiée des fruits d'ananas. D'autres sources potentielles de sérine protéases végétales sont le latex de *Wrightia tinctoria*, *Ipomoea carnea*, *Fistulosa*, *Euphorbia milii*. **L'extraction des protéases des plantes consomme beaucoup de temps.**

La meilleure **source animale** des protéases est le quatrième estomac des veaux non-quittés, où on les trouve avec la pepsine, mais le rapport pepsine / présure est faible. La chymosine est également extraite de l'estomac de veau avec une solution saline. Des approches similaires ont été utilisées pour produire de la pepsine bovine. Les protéases animales, telles que pancréatine, trypsine, pepsine, la chymotrypsine et la rénine sont produites et préparées sous forme pure en grandes quantités mais ces quantités sont insuffisante pour répondre à la demande industrielle mondiale.

Les micro-organismes représentent une source brillante d'enzymes en raison de la facilité des manipulations de leurs génomes et de leurs grandes diversités. La plupart des protéases neutres et alcalines du commerce sont produites par des membres du genre *Bacillus* (**Tableau 1**). Les protéases neutres de bactéries sont actives à un pH étroit (pH 5–8) et présentent une thermo-tolérance relativement faible. **Mais à cause à leur vitesse de réaction intermédiaire, ces**

protéases provoquent moins d'amertume dans les hydrolyses des protéines alimentaires par rapport aux protéinases animales ; par conséquent, ils sont fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire. *Pseudomonas* est une bactérie à Gram négatif qui produit des enzymes protéolytiques alcalines. Une variété de protéases diverses a été isolées à partir de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Les champignons produisent une plus grande variété d'enzymes protéolytiques que les bactéries, par exemple, *Aspergillus oryzae* produit des protéases neutres, acides et alcalines.

Tableau 1 : Quelques protéases et leurs sources microbiennes

Types	pH	Application	Classification	Sources
Alcaline	9-11	Industrie des détergents et du cuir	Sérine protéases, Subtilisine Carlsberg et Subtilisine novo	Principalement produit par des espèces bactériennes, telles que <i>A. salinivibrio</i> sp, <i>Cryptococcus aureus</i> , champignons, <i>Bacillus</i> sp
Acide	3,8 -5,6	Sauce soja, hydrolysats de protéines, aides digestives et en production de matériel d'assaisonnement, défrichage bière et jus de fruits, amélioration de la texture de la pâte de farine et tendre le muscle fibrille	Protéases aspartiques, Pepsine (A1), Rétropepsine (A2)	Principalement produit par des espèces fongiques, telles que <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. fumigatus</i> et <i>A. saitoi</i>
Neutre	5 - 8	Industrie alimentaire, industrie brassicole	Neutrase, Thermolysine	Genre <i>Bacillus</i>

1.4. Applications industrielles

En plus d'être utilisé dans l'industrie du fromage, les peptidases sont également utilisées pour attendrir la viande, clarifier les bières et améliorer les saveurs des fromages et des aliments pour animaux de compagnie. Les peptidases sont utilisées dans l'industrie du cuir pour enlever les poils et rendre le cuir plus souple. Les peptidases sont également largement utilisées dans les matériaux de nettoyage, tels que les poudres de lavage et le liquide de nettoyage des lentilles

de contact. En plus d'être la cible des médicaments, les peptidases sont utilisées en médecine pour éliminer les parasites gastro-intestinaux (anthelminthiques), éliminer les peaux mortes des brûlés (débridement), déterminer les groupes sanguins et pour soulager les maux de dos en digérant le contenu cartilagineux de la hernie intervertébrale (chimonucléolyse).

1.4.1. Industrie laitière (Fabrication du fromage)

L'application la plus importante des protéases dans l'industrie laitière est la fabrication du fromage. Les protéases coagulantes du lait animal et microbien appartiennent à une classe de protéases **aspartates acides**. Les protéases participent à la maturation du fromage, hydrolyse des protéines de lactosérum et développement de la saveur. En outre, l'enzyme utilisée pour le débitage des hydrolysats de protéines (éliminer l'amertume des peptides), la synthèse d'aspartame (un dipeptide composé de deux acides aminés naturels, l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine) et d'accélération des temps d'affinage du fromage. Des protéases ont également été utilisées pour la production de protéines de lait à faible allergène, qui est utilisé comme ingrédient dans les préparations lactées pour bébé

Environ 80% des protéines du lait sont constituées de caséine, qui est par nature hydrophobe. Les caséines bovines peuvent être subdivisées en quatre espèces de phosphoprotéines qui existent, en raison de leur faible solubilité dans l'eau, en agglomérats. Les quatre espèces de caséine α_1 -, α_2 , β - et κ se trouvent à des concentrations molaires relatives d'environ 4: 1: 4: 1 : 6.

Les caséines s'agrègent en forment des submicelles, qui forment ensemble la micelle de caséine. La surface externe de la micelle de caséine est constituée de submicelles contenant une teneur relativement élevée en molécules de κ caséine. **Des parties hydrophiles et chargées négativement des molécules de κ -caséine forment la périphérie de la micelle et garantissent la stabilité des micelles grâce à la répulsion électrostatique et entropique.** Les enzymes coagulantes ciblent spécifiquement une partie distincte des κ -caséine, hydrolysant la liaison Phe-Met (au niveau de l'acide aminé 105-106) et provoquant ainsi la déstabilisation de l'ensemble des micelles, qui s'agrègent les unes aux autres. La partie de la κ -caséine séparée est appelée caséino macro peptide (CMP). Les ions calcium facilitent l'agrégation des micelles de caséine mais n'affectent pas la réaction enzymatique. La réaction enzymatique est très sensible au pH mais moins à la température. Le taux d'agrégation est fortement affecté par la température entre 25 et 35 °C. L'emprésurage est ainsi décrit par la réaction enzymatique et par agrégation de caséine micellaire.

La maturation du fromage est principalement due à la dégradation protéolytique de la protéine caséine. Les endoprotéases telles que la plasmine endogène du lait et les enzymes coagulantes sont responsables de la génération de fragments polypeptidiques de caséine.

La plasmine est une endoprotéase alcaline de type trypsine qui se trouve dans le lait également sous sa forme plasminogène inactive. Elle est principalement associée à la micelle de caséine. La plasmine peut devenir plus ou moins active lorsque les inhibiteurs d'activation de la plasmine et du plasminogène sont séparés par la fraction de lactosérum. Les exoprotéases, provenant des cultures initiales bactériennes, décomposent en outre une partie de ces peptides en d'acides aminés libres. Ces acides aminés fonctionnent comme des précurseurs pour les composés aromatiques (responsable du goût du fromage) qui sont synthétisés par les enzymes cataboliques des cultures de départ. De cette manière, les différents types de cultures de départ sont responsables des caractéristiques typiques des variétés de fromages. Dans cette description simplifiée, il est clair que les coagulants jouent un rôle important dans le mécanisme de maturation.

2. Les enzymes amylolytiques

La cellulose et l'amidon sont les polymères les plus abondants sur Terre. Ils sont tous deux constitués d'unités monomères de glucose qui sont cependant liées différemment pour former des chaînes polymères : l'amidon contient le glucose lié par les liaisons α -glucosidiques, tandis que le glucose de la cellulose est lié par les liaisons β -glucosidiques. Par conséquent, ces deux sources importantes d'énergie pour les animaux, les plantes et les micro-organismes sont hydrolysées biochimiquement par deux groupes différents d'enzymes : l'amidon par α -glycoside hydrolases et la cellulose par β -glycoside hydrolases. L'amidon (amylon en grec) se compose de deux fractions distinctes : amylose - glucanes linéaires α -1,4 liés, et amylopectine - glucanes linéaires α -1,4 liés ramifiés avec des liaisons α -1,6, donc les enzymes responsables de son hydrolyse sont appelées enzymes amylolytiques ou simplement amylases. Les enzymes amylolytiques forment un grand groupe d'enzymes parmi lesquelles les plus courantes et les plus connues sont les β -amylases, α -amylases et glucoamylases.

2.1. Caractéristiques structurelles et mécanisme catalytique

Les Glucosyl Hydrolase contiennent des hydrolases (EC 3) comme α -Amylase, Oligo-1,6-glucosidase, α -glucosidase, Pullulanase, Amylopullulanase, Cyclomaltodextrinase, Maltotetraohydrolase, Isoamylase et également des transférases et des isomérases des classes d'enzymes 2 et 5. Ces enzymes constituent la famille des α -amylases.

Tous Les membres du clan GH-H partagent plusieurs caractéristiques :

- (i) Structure conservée (domaine catalytique) formé par le $(\beta/\alpha)_8$ - pli en tonneau (TIM-baril) (Figure 2)

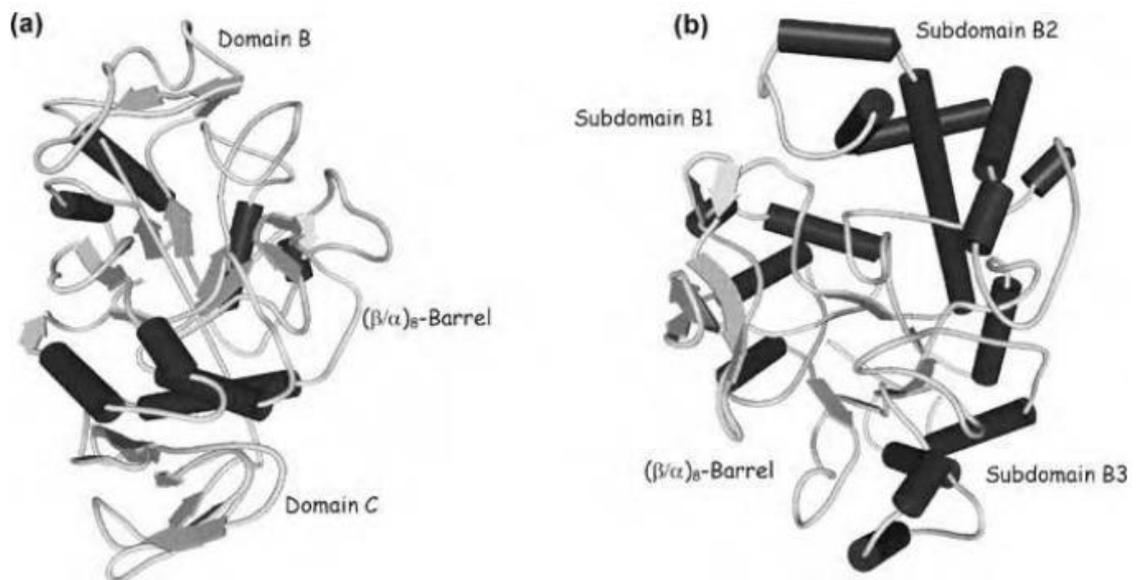


Figure 2 : Structure tri-dimensionnelle de : a) α -amylase de *Aspergillus oryzae* , b) amyloamylase de *Thermus aquaticus*

- (ii) Un mécanisme catalytique commun dans lequel l'aspartate du brin $\beta 4$ (Asp 193) agit comme une base (nucléophile) et le glutamate du brin $\beta 5$ (Glu 219) agit comme un donneur de protons (catalyseur acide / base) à l'aide du troisième résidu, l'aspartate du brins $\beta 7$ (Asp 294), essentiel pour la liaison au substrat (stabilisateur d'état de transition) (**Figure 3**).

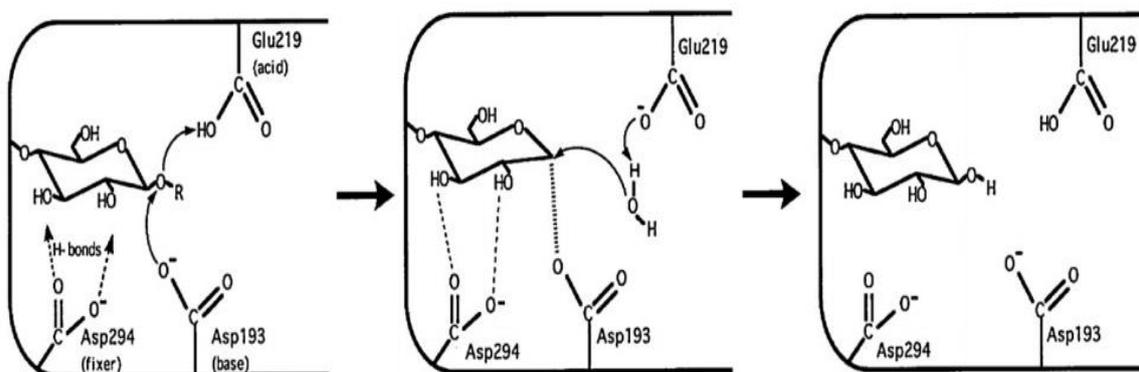


Figure 3 : Mécanisme de catalyse d'une amylase

2.2. Dégradation de l'amidon

La dégradation industrielle de l'amidon est généralement initiée par des α -amylases (α -1,4-glucanohydrolases). Les amylases catalysent le clivage des liaisons α -1,4-glycosidiques dans la région interne de la molécule, provoquant ainsi une diminution rapide du poids moléculaire et de la viscosité du substrat. Ces enzymes **endo-agissant** peuvent être divisées en α -amylases liquéfiantes ou saccharidiques qui dégradent préférentiellement les substrats contenant plus de quinze ou quatre unités de glucose, respectivement. Une hydrolyse prolongée de l'amylose conduit à une conversion des glucides en maltose, maltotriose et oligosaccharides de différentes longueurs de chaîne, parfois suivie d'une deuxième étape dans la réaction libérant le glucose du maltotriose.

Il existe deux groupes principaux d'enzymes de déramification à action endo qui peuvent cliver les liaisons α -1,6-glycosidiques existant aux points de ramification de l'amylose, du glycogène, du pullulane et des oligosaccharides apparentés. Le premier groupe sont les pullulanases qui attaquent spécifiquement les liaisons α -1,6-, libérant des oligosaccharides linéaires de résidus de glucose liés par des liaisons α -1,4. Le deuxième groupe d'enzymes de déramification sont les néopullulanases et les amylopullulanases, qui sont actives à la fois sur les liaisons α -1,6- et α -1,4-.

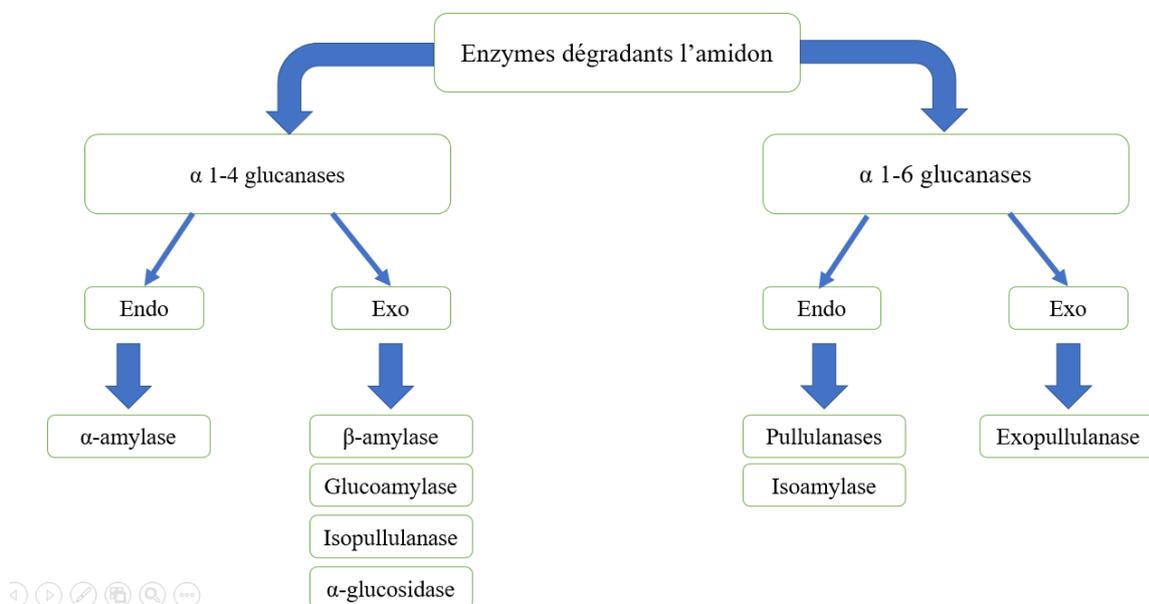


Figure 4 : Enzymes dégradants l'amidon

2.3. Sources d' α -amylase

Bien que les α -amylases soient largement distribuées dans diverses bactéries, champignons, plantes et animaux ainsi que chez les êtres humains, la production commerciale a été limitée à seulement quelques souches sélectionnées de champignons et de bactéries.

Chez les animaux, le pancréas et les glandes salivaires sont les principales sources de α -amylase.

Chez les plantes, elle est généralement présente dans les parties vertes, mais les grains et les parties amylacées ont des concentrations maximales. La β -amylase ne se trouve que dans les plantes et donne du maltose comme produit principal.

Parmi les microorganismes, l' α -amylase est produite par plusieurs champignons et bactéries. L'espèce bactérienne la plus largement utilisée est le *Bacillus* spp. Mésophile, à savoir *B. amyloliquefaciens* et *B. licheniformis*, qui sont largement utilisés pour la production commerciale de l'enzyme. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* et *B. licheniformis* sont également largement étudiés en tant que bons producteurs d' α -amylase thermostable.

Les sources fongiques d' α -amylase sont principalement les espèces *Aspergillus* et quelques espèces de *Penicillium*, telles que *P. brunneum*, *P. fellutanum*.

Les pullulanases sont généralement produites par les plantes, par ex. riz, orge, avoine et haricot, ainsi que par des micro-organismes mésophiles tels que : *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Streptomyces*.

2.4. Applications des α -amylases dans l'industrie alimentaire

De nombreux procédés biotechnologiques industriels, environnementaux et alimentaires utilisent cette enzyme à un stade ou à un autre. En plus d'être utilisé comme une source alimentaire majeure, l'amidon est très largement récolté et transformé en une variété de produits tels que les hydrolysats d'amidon, le sirop de glucose, le fructose, les dérivés de malto-dextrine, etc. Certaines applications industrielles importantes de l' α -amylase sont :

2.4.1. Production de glucose et de fructose à partir d'amidon

L'une des principales utilisations commerciales de l' α -amylase est la production de glucose. Le processus enzymatique de conversion de l'amidon en sirop à haute teneur en glucose commence par la liquéfaction en dextrans à chaîne courte par l'action de l' α -amylase de *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* ou *B. licheniformis*. Ensuite, la saccharification pour

former un sirop de glucose à haute concentration (> 95%) se fait en traitant l'hydrolysate d'amidon avec des exo-glucoamylases fongiques dont *A. niger* est la principale source. Une autre utilisation industrielle importante du traitement de l'amidon est la conversion de sirop à haute teneur en glucose en sirop à haute teneur en fructose. Ce processus est réalisé en utilisant l'enzyme glucose isomérase. Le sirop de fructose est un édulcorant et un additif important largement utilisé dans une grande variété d'aliments et de boissons transformés allant des boissons gazeuses et aux fruits aux yaourts et pains.

2.4.2. Industrie de l'alcool

L'amidon brut est largement converti par hydrolyse et fermentation en éthanol, autres spiritueux distillés et biocarburants. Les amidons tels que les céréales et les pommes de terre sont fréquemment utilisés comme substrat de l'alcool éthylique.

2.4.3. Industries de la boulangerie

Dans l'industrie de la boulangerie, l' α -amylase joue un rôle majeur dans l'amélioration de la quantité, de l'arôme et du goût du produit. Étant le principal constituant du pain, l'amidon provoque de la dureté et le rend désagréable à manger avec l'âge car l'amidon se cristallise. L'ajout d'enzymes amylase et lipase dans la fabrication du pain réduit cette cristallisation et prolonge la durée de conservation.

L'enzyme est fréquemment utilisée lors de la préparation de muffins, de petits pains mous, de petits pains et de pains partout où des caractéristiques supplémentaires sont souhaitées, telles que le conditionnement de la pâte ou une couleur de croûte améliorée.

2.4.4. Industrie d'alimentation du bétail

Une préoccupation majeure de la production industrielle d'aliments pour animaux est qu'elle n'est pas entièrement dégradée et digérée par le bétail, ce qui entraîne une sous-utilisation de l'alimentation animale. Les protéines et les minéraux ne sont pas non plus pleinement utilisés. Les aliments non digérés excrétés par les animaux entraînent également des problèmes environnementaux. Pour améliorer cela, des enzymes sont mélangées dans l'alimentation animale lors de la production à grande échelle. L' α -amylase, la xylanase, la phytase et la protéase sont mélangées à cet effet. **L'enzyme hydrolyse les polymères d'amidon en fructose et glucose, ce qui augmente la digestibilité des glucides.**

Conversion d'amidon	Gélification, liquéfaction, Saccharification de l'amidon	Dégradation complète ou partiel pour produire les sucraants	Glucose et sirops
Boulangerie	Conversion de l'amidon dans les pates en sucres fermentables	Production de sucres qui seront convertis en Ethanol par les levures	Production de carburant
Détergents	Dégradation des résidus des aliments féculents (Pomme de terre) pour donner des dextrines	Clarification des jus par dégradation d'amidon trouble et insoluble	Jus de fruits
Textiles	Elimination d'agents d'encollage textile / produits chimiques tels que l'amidon	Liquéfaction d'amidon pour obtenir la viscosité souhaité des fibres	Papier
Brassage	Conversion de l'amidon des graines en maltose	Contrôler la douceur des bonbons	Bonbons

Figure 5 : Applications industrielles des enzymes amylolytiques

3. Enzymes cellulolytiques

Afin de permettre l'utilisation de la cellulose insoluble en tant que telle, de multiples activités enzymatiques sont nécessaires. Différentes caractéristiques de la cellulose, comme le degré de polymérisation (DP), la cristallinité, la taille des particules et la surface, influencent l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.

La dégradation de la cellulose est accomplie par un ensemble d'enzymes glycosyl hydrolase (**GH**) avec des activités catalytiques complémentaires. Les cellulases ont différentes spécificités pour hydrolyser les Liaisons β -1,4-glycosidiques qui relient les unités de glucose dans la fibre de cellulose. Ils sont divisés en trois classes principales : les endoglucanases (endo-1-4- β -glucanase; EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) et β -glucosidase (CE 3.2.1.21).

- a. **Les endoglucanases (EC 3.2.1.4)** clivent en interne les liaisons β -1,4-glycosidiques dans les régions amorphes de la cellulose, libérant ainsi des extrémités de chaîne réductrices et non réductrices.
- b. **Les exoglucanases (EC 3.2.1.91)** également appelées cellobiohydrolases (**CBH**), éliminent les dimères (cellobiose) de l'extrémité de la chaîne cellulose. Certains CBH ne peuvent travailler que sur extrémités réductrices alors que d'autres clivent les unités de cellobiose uniquement aux extrémités non réductrices. Le produit principal des cellobiohydrolases est le disaccharide cellobiose, qui est clivée en unités de glucose par l'enzyme β -glucosidase.

- c. Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) hydrolysent les dimères de glucose et dans certains cas gluco-oligosaccharides en glucose.
- d. Les oxydases cellulolytiques (LPMO) sont caractérisées par une spécificité du substrat plus large comparé aux cellulases, elles attaquent également la région cristalline de la cellulose. Les LPMO catalysent le clivage oxydant de la cellulose cristalline présentant ainsi une action synergique avec les enzymes hydrolytiques (endoglucanases et cellobiohydrolases). Le LPMO clive les liaisons glycosidiques, conduisant à la formation d'unités de glucose oxydées en position C1 (acide gluconique) et / ou en position C4 (4-cétoglucose). Le site actif du LPMO contenant du cuivre doit être réduit après chaque réaction afin de garantir le renouvellement de l'enzyme et les mécanismes différents de la réduction pouvant aider au recyclage du LPMO ont été identifiés. Les électrons peuvent être restaurés au LPMO par les moyens suivants : (i) oxydation de la cellobiose par la cellobiose déshydrogénase (CDH), (ii) oxydation du monolignol lors de la dégradation de la lignine et (iii) réduction médiée par H_2O_2 (**Figure 6**).

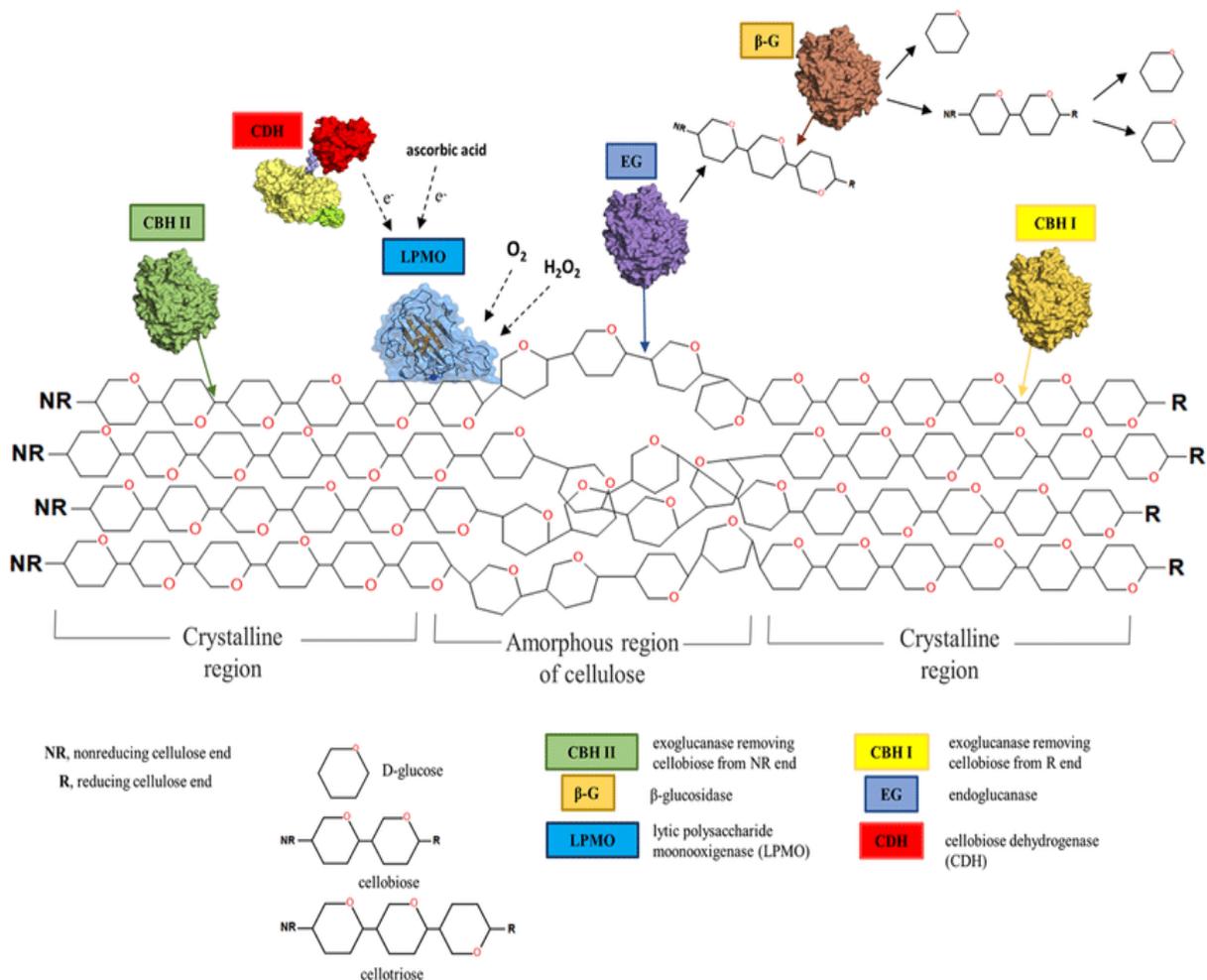


Figure 6 : Dégradation enzymatique de la cellulose

3.1. Sources des cellulases

Les cellulases sont fabriquées par une variété de populations fongiques, telles que *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Phoma*.

Les bactéries aérobies, telles que *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudonoma*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* et *Xanthomonas*; et les bactéries anaérobies, telles que *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Acetovibrio*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Pseudonocardia* et *Thermo anaerobacter*.

Les Champignons filamenteux, *Aspergillus* se démarque comme producteur clé d'enzymes cellulolytiques. *A. niger*, un microorganisme en fermentation, produit des enzymes cellulolytiques, des acides organiques et d'autres produits de grande valeur.

3.2. Applications industrielles

Outre l'utilisation de ces enzymes hydrolytiques dans les industries alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, détergente et textile, elles sont également utilisées dans l'industrie de la pâte de bois et du papier, dans la gestion des déchets et dans les domaines médical et pharmaceutique.

Dans l'industrie alimentaire, les cellulases sont utilisées dans l'extraction de constituants du thé vert, des protéines de soja, des huiles essentielles, des produits aromatiques et de la fécule de patate douce.

Associées aux hémicellulases et aux pectinases, elles sont utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruits. Après le broyage des fruits, les enzymes sont utilisées pour améliorer la liquéfaction par la dégradation de la phase solide.

Ces enzymes sont également utilisées dans la fabrication du vinaigre d'orange et dans l'extraction et la clarification des jus d'agrumes.

Les cellulases complètent les pectinases dans les industries des jus et du vin en tant que services d'extraction, de clarification et de filtration, avec une augmentation du rendement et de la saveur.

Tableau 2 : Applications industrielles des cellulases

Industrie	Application
Biocarburant	Production d'éthanol, solvants et acides organiques, production de nourriture animale à haute énergie et valeur nutritionnelle
Traitements d'aliments	Amélioration d'extraction des jus de fruits et légumes, clarification des jus, amélioration de la macération et extraction des couleurs de fruits
Textiles	Bio polissage, bio finition et bio stoning
Papier et pulpe	Elimination d'encre et blanchiment
Agriculture	Améliore la qualité des sols, et contrôle de pathogènes
Médicale	Anti-biofilms et traitement des phytobézoard
Autres	Réduction des déchets de biomasse, extraction de l'huile d'olive et les caroténoïdes

4. Les enzymes pectolytiques

4.1. Biochimie des parois cellulaires des fruits

La pulpe des fruits et légumes est composée de cellules. Elles sont entourées d'une paroi cellulaire qui résiste à la pression interne et aux chocs externes. Les polysaccharides constituent 90 à 100% des polymères structuraux des parois des cellules végétales en croissance, appelés **parois cellulaires primaires**. Les parois cellulaires secondaires se développent à partir des parois cellulaires primaires pendant la croissance cellulaire.

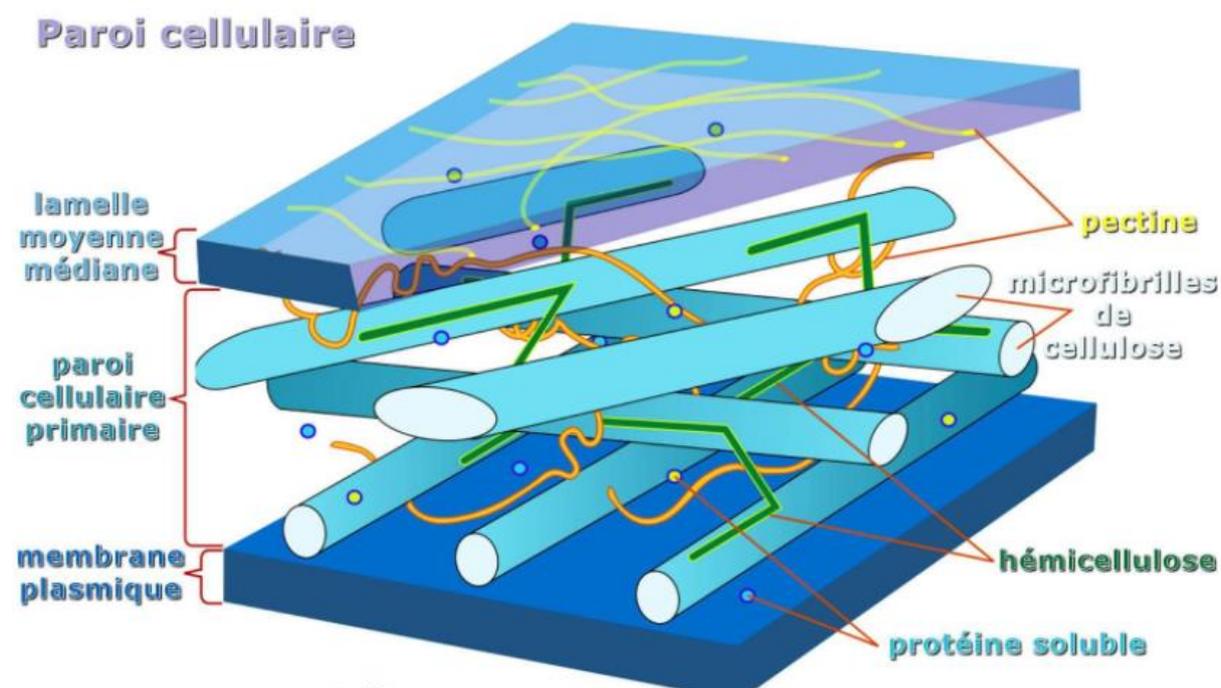


Figure 7 : Structure de la paroi cellulaire végétale

4.1.1. La pectine

La pectine est le principal composant polysaccharidique structural des lamelles de fruits et des parois cellulaires. Trois polysaccharides pectiques sont présents dans toutes les parois cellulaires primaires : l'homogalacturonane (HG) et les rhamnogalacturonanes (RG) I et II (Figure 8).

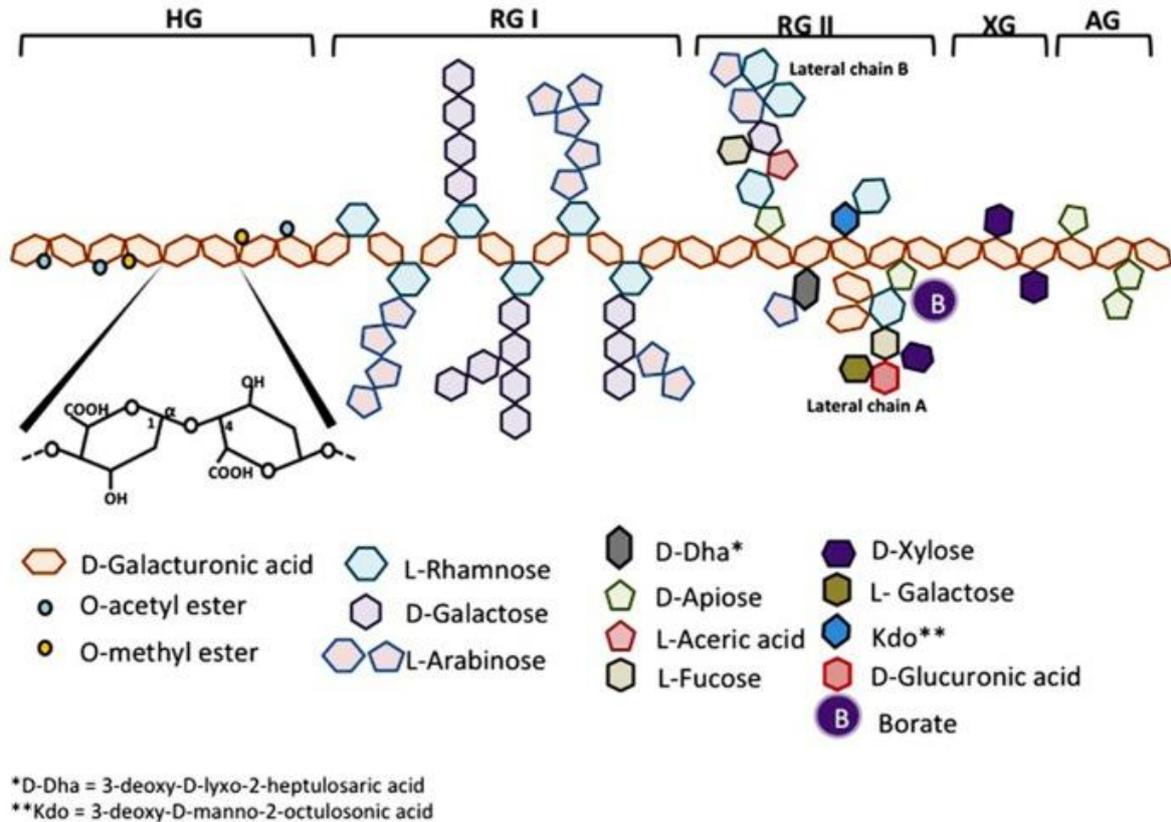


Figure 8 : Structure et composition chimique de la pectine

Des modèles récents divisent la pectine en régions dites lisses d'homogalacturonane non ramifié (HG) (60–90%) et en régions velues de rhamnogalacturonane I hautement ramifié (10–40%).

- a. **L'homogalacturonane** est un homopolymère de résidus d'acide (1-4)- α -D-galactosyluronique, capable de former des gels. Les groupes carboxyle des résidus d'acide galactosyluronique de l'homogalacturonane de la paroi cellulaire primaire peuvent être méthyl-estérifiés en position C-6 et acétylestérifiés en position C-2 ou C-3.
- b. **Le rhamnogalacturonan I (RGI)** a un squelette de jusqu'à 100 répétitions du disaccharide rhamnose-galactose. La chaîne latérale peut varier en taille d'un seul résidu glycosyle à 50 résidus glycosyle ou plus.
- c. **Le rhamnogalacturonan II (RGII)** est un polysaccharide complexe de faible poids moléculaire (environ 4,8 kdalton) avec un squelette de neuf résidus d'acide (1-4) - α -D-galactosyluronique et quatre chaînes latérales attachées à O-2 ou O-3 du squelette.

4.2. Les pectinases

Les pectinases commerciales pour l'industrie des jus de fruits proviennent de souches sélectionnées d'*Aspergillus* sp. Les pectinases sont définies et classées sur la base de leur action vis-à-vis de la pectine (figure X).

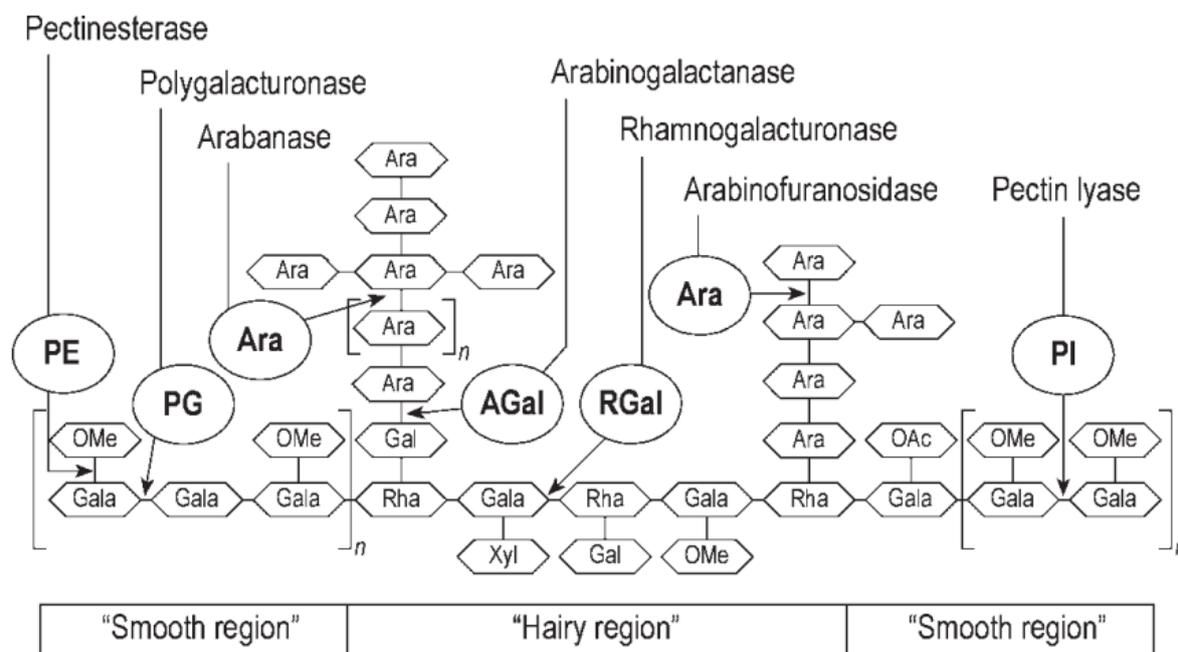


Figure 9 : Enzymes dégradant la pectine, Ara : arabinose, Gal : galactose, GalA : Acide galacturonique, OMe : Méthyl ester, OAc : ethyl ester, Rha: rhamnose, Xyl: xylose.

4.2.1. La pectine lyase (PL)

une pectine dépolymérase de type endo qui a une grande affinité pour les longues chaînes hautement méthylées et agit par β -élimination de l' α -1,4 homogalacturonane méthylé avec formation d'oligo-uronides insaturés en C4-C5.

4.2.2. La pectine méthylestérase (PME)

Élimine les groupes méthoxyle de la pectine et diminue en même temps l'affinité du PL pour ce substrat. Cela entraîne la formation de méthanol et de pectine moins méthylée. La PME d'*Aspergillus* a une forte affinité pour la pectine hautement méthoxylée telle que la pectine de pomme. La déméthylation avec PME génère des groupes d'acide carboxylique libres et la pectine devient chargée négativement.

4.2.3. La polygalacturonase (PG)

Existe sous deux formes : endo-PG et exo-PG. Les deux types n'agissent que sur la pectine avec un degré d'estérification inférieur à 50–60%. L'**Endo-PG** agit de manière aléatoire sur le squelette α -1,4-polygalacturonique et entraîne une diminution prononcée de la viscosité. **Exo-PG** agit à l'extrémité non réductrice de la chaîne, elle libère de petits fragments de la chaîne et ne réduit pas significativement la viscosité. Sept endo-PG, deux exo-PG et sept isoenzymes PL d'*Aspergillus niger* ont été décrits.

4.2.4. Autres enzymes

Différentes enzymes agissant sur le rhamnogalacturonan I ont été identifiées et purifiées à partir d'*Aspergillus sp.* La RGase A a été identifiée comme une hydrolase qui divise la liaison α -D-GalAp-(1-2) – α -L-Rhap de RGI, tandis que la RGase B semble être une lyase qui divise la liaison α -1-Rhap-(1-4)– α -D-GalAp par β -élimination. Deux nouvelles enzymes ont également été identifiées : une rhamnogalacturonan rhamnohydrolase et une rhamnogalacturonan galacturonohydrolase. En tant qu'enzyme accessoire pour les RGases, la rhamnogalacturonane acétyl estérase (RGAE) a également été décrite.

Bien que la structure du substrat RGII ait été décrite, les enzymes capables de l'hydrolyser sont encore inconnues et n'ont pas encore été décrites.

Les arabanases sont des pectinases, car elles éliminent l'arabinose lié de manière covalente au squelette de l'homogalacturonane. Trois enzymes ont été décrites : une endo-arabinanase (α -1-5; ABFA) et deux arabinofuranosidases, à savoir l'exo-arabinofuranosidase A (α -1-2; α -1-3) (ABFA) et exo-arabinofuranosidase B (α -1-3; α -1-5; ABFB). Tous les trois sont produits par *Aspergillus niger*.

Des activités élevées sont nécessaires pour la transformation des pommes et des poires. En général, l'activité de la pectinase et le rapport des différentes pectinases peuvent varier dans différentes préparations commerciales.

4.3. Applications des pectinases

D'un point de vue industriel, les pectinases sont classées en deux types, les pectinases acides et alcalines. **Les pectinases acides** ont de nombreuses applications dans l'extraction et la clarification des jus clairs (pomme, poire, raisins et vin) et trouble (citron, orange, ananas et

mangue) et la macération des tissus végétaux (tableau 2). De plus, les pectinases acides sont utiles dans l'isolement des protoplastes et la saccharification de la biomasse.

Les pectinases alcalines ont applications potentielles dans le décapage du coton, le dégommeage des fibres végétales pour améliorer la qualité des fibres, la fermentation du café et du thé, l'industrie du papier et pour la purification des virus végétaux.

Tableau 3 : Applications industrielles des pectinases

Application	Le but
Stabilisation des troubles	Pour précipiter la matière hydrocolloïde présent dans les jus de fruits
Clarification du jus de fruit	Dégradation des substances formant un nuage pectique, par conséquent, le jus peut être facilement filtré et traité
Extraction de jus et d'huile	Pour surmonter la difficulté de pressage pulpe de fruit pour donner du jus et de l'huile
Macération	Pour décomposer les tissus des légumes et les fruits pour donner des produits pulpeux utilisés comme matériau de base pour les jus, nectar comme dans le cas d'aliments pour bébés, pudding et yogourt
Liquéfaction	Pour décomposer les glucides végétaux fermentescibles en sucres simples par des enzymes
Rouissage des cultures à fibres	Pour libérer les fibres des cultures en fermentant avec des micro-organismes qui dégradent la pectine
Traitement des eaux usées	Pour dégrader les substances pectiques dans les eaux usées des industries de transformation des agrumes
Fermentation du café et du thé	Pour éliminer la couche de mucilage du grain de café. Pour améliorer la fermentation du thé et la propriété de formation de mousse du thé
Préservation du bois	Pour éviter l'infection du bois en augmentant la perméabilité des conservateurs de bois

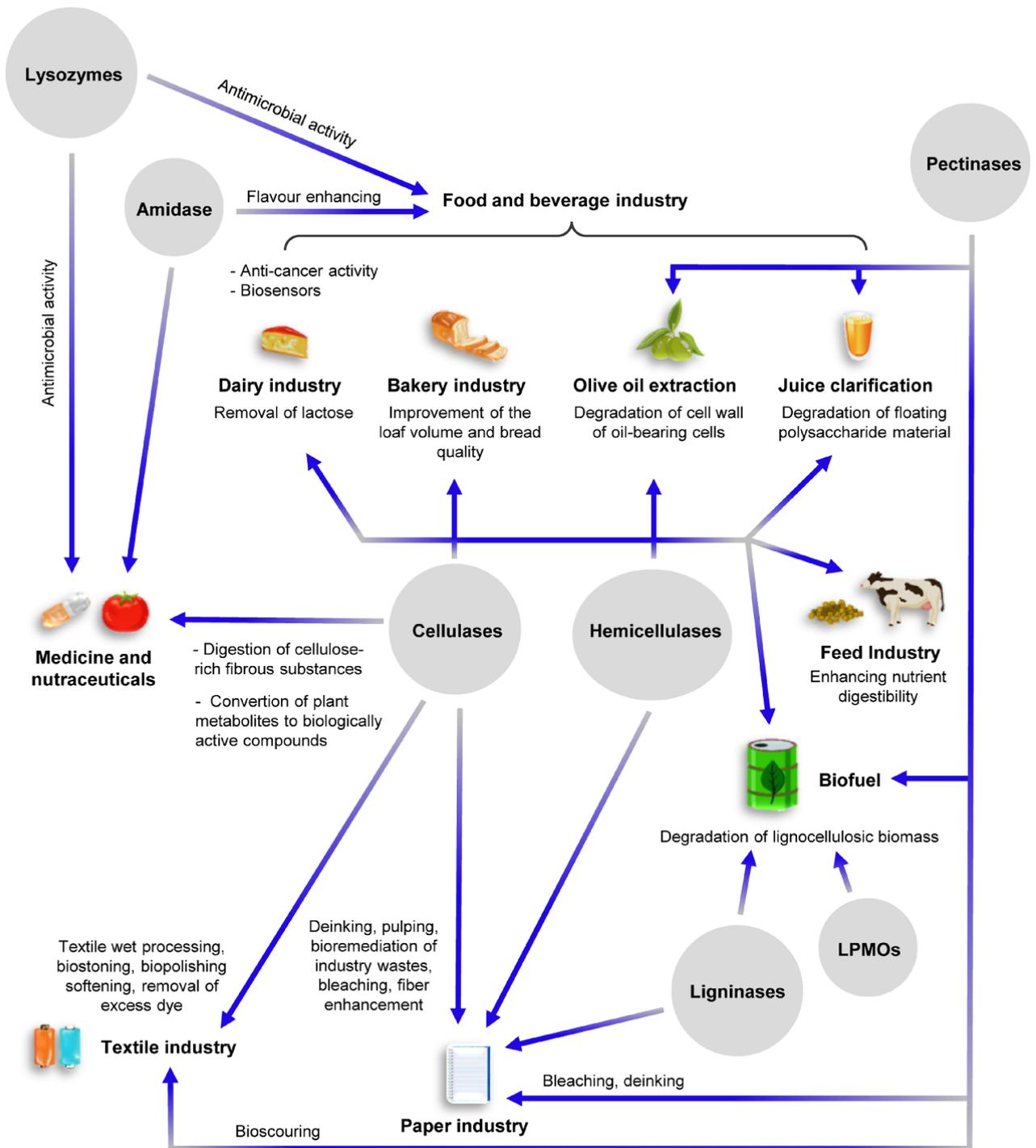


Figure 10 : Résumé des applications industrielles des enzymes dégradant la paroi cellulaire