



République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة مtentouri  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزئية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

Intitulé :

---

***Étude biochimique et thermodynamique d'une  
Pectinase fongique***

---

**Présenté par : LAMOUR Amina  
OGAB Salima**

**Soutenu le : 28/06/2024**

**Jury d'évaluation :**

**Président : Dr. KASSA - LAOUAR M. (M.C.B- Université Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Encadrant : Dr. BENNAMOUN L. (M.C.A- Université Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Examinateur(s) : Pr. DAKHMOUCHE S. (Pr, ENS El Katiba Assia Djebbar Constantine).**

**Année universitaire  
2024 - 2025**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## *Remerciements et Dédicaces*

# **Remerciements**

*Au terme de ce travail de mémoire, il nous tient à cœur d'exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.*

*Nous adressons tout d'abord nos plus sincères remerciements à Madame Bennamoun L., Maître de Conférences A à l'Université Constantine 1 Frères Mentouri, pour avoir accepté de diriger ce travail. Sa disponibilité, son accompagnement constant, ses conseils avisés et son soutien bienveillant ont été d'une aide précieuse tout au long de ce parcours.*

*Nos remerciements s'adressent également à Madame KASSA - LAOUAR M., Maître de Conférences et président du jury, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'évaluer notre travail. Nous remercions aussi Madame Dakhmouche S., professeure à l'ENS El-Katiba Assia Djebbar, pour l'intérêt porté à notre mémoire et pour ses remarques constructives.*

*Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur Boudersa N., Madame Bensari S., et Mademoiselle Zahraoui C., pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur soutien tout au long de notre parcours universitaire*

*Nos vifs remerciements vont également à l'équipe technique du laboratoire, notamment Mounia, Hanane, Fatima, Samia et Hanane, pour leur précieuse assistance durant les manipulations expérimentales*

*Nous tenons à remercier chaleureusement nos camarades de la promotion 2025 et amies Nourhan, Hadil, Aya et Khawla, leur aide, leur gentillesse et leur soutien moral, tout au long de ce travail.*

*Enfin, nous adressons nos pensées reconnaissantes à nos familles et à*

*tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la concrétisation de ce travail.*

## **Dédicaces**

*Je suis reconnaissant envers « Le Dieu » qui m'a mené sur ce chemin inattendu. Je suis reconnaissant pour la force et la fatigue qui n'ont pas été vainues.*

*Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce humble travail :*

*À l'être le plus cher de ma vie, ma mère Mehdi Leïla*

*Peu importe ce que je fais ou dis, je ne saurai vous remercier comme il se doit. Votre amour m'enveloppe, votre vigilance m'oriente et vos prières ont été ma force pour surmonter les obstacles.*

*À qui je porter son nom, mon cher père Samir*

*Je n'oublierai jamais votre soutien et votre patience durant toutes ces années, ainsi que pour tout les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être, j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi.*

*À mes sœurs Malak, Nour, María.*

*Et sans oublier ma grand-mère « yama »*

*À mes amis Yasmine, Soulef, Lina, Sandra*

*À mon chère binôme Salma et mes collègues d'étude*

*À tout l'équipe de recherche scientifique du monde entier.*

*Merci infiniment!*

*Amina*

# Dédicaces

*Avant toute chose, je rends grâce à Allah pour toutes Ses bénédictions tout au long de ces cinq années et de toute ma vie.*

*Alhamdoullah pour le bienfait de l'Islam et celui du savoir.*

*Je dédie humblement mon diplôme au peuple libre et résistant de Gaza.*

*Je dédie cette réussite à chaque enseignant qui a cru en moi et m'a soutenue depuis l'enfance, et tous ceux qui m'ont transmis un savoir utile.*

*À ma famille, qui a semé en moi la volonté de réussir ambition, confiance et bienveillance, et à mon père - qu'Allah lui fasse miséricorde - dont le souvenir m'accompagne toujours.*

*À mes amies sincères, Anfel, Hanan, Nouha, Lina, Hadil, Soundous, Raïhana et Dalel, et à tous ceux qui ont partagé chaque moment de ce parcours, et le chemin de l'université, pour les souvenirs, les efforts et les sourires partagés.*

*À mon enseignant et guide Ahmed Al-Sayed, pour son impact durable sur mon parcours - qu'Allah le bénisse- .*

*À l'équipe de Bunian et ses filles.*

*et à tous ceux qui ont rendu ces années précieuses.*

*Merci à Amira, ma binôme, et à Chafika pour leur présence vivante et constante.*

*Je suis reconnaissante pour tout ce soutien.*

*Enfin, je dédie ce mémoire à tout étudiant persévérant.*

*Allahumma, fais que je sois utile à ma Umma, et que ce mémoire soit*



*une modeste contribution pour elle.*

*Salima*

## Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction .....	1
CHAPITRE 01 : Fermentation	
1. Généralités.....	4
2. Classification.....	5
3. Morphologie .....	5
4. Pathogénicité .....	6
5. Fermentation .....	6
6. Fermentation industrielle .....	8
CHAPITRE 02 : Enzymes pectinolytiques	
1. Généralités.....	10
2. Enzymes pectinolytique .....	10
2.1. Classification des pectinases .....	10
2.2. Sources de pectinase .....	12
2.3. Pectine lyase .....	14
2.3.1. Structure de la PL.....	14
2.3.2. Mode d'action.....	15
2.4. Polygalacturonases .....	15
3. Substrats pectiques .....	19
3.1. Définition.....	19
3.2. Sources des substrats pectiques .....	19
3.3. Structures des substrats pectiques .....	19
3.4. Composition chimique des pectines .....	21
CHAPITRE 03 : Approche thermodynamique des pectinases et leurs applications industrielles	
2.1. Enthalpie .....	24
2.2. Entropie .....	24
2.3. Énergie libre de Gibbs .....	24
Matériels et Méthodes	
1. Réactivation de la souche fongique <i>Aspergillus niger</i> .....	30
2. Production des enzymes pectinolytiques .....	30
2.1. Son de blé substrat de fermentation .....	30
2.2. Préparation de l'inoculum .....	30
2.3. Comptage cellulaire .....	31
3. Fermentation .....	31
4. Extraction .....	31
5. Méthode de dosage .....	31
5.1. Dosage de l'activité de la polygalacturonase (PGs) .....	31
5.2. Dosage des protéines .....	33
6. Purification partielle de l'enzyme pectinolytique PGs .....	34
6.1. Précipitation par l'éthanol .....	34
7. Calcul des paramètres thermodynamiques lors de l'inactivation de PGs .....	34
7.1. Effet de température sur l'activité et stabilité .....	34
7.2. Cinétique de l'inactivation thermique .....	35
7.3. Estimation des paramètres thermodynamiques lors de l'inactivation de PGs .....	35

7.4. Détermination des paramètres cinétiques .....	Erreur ! Signet non défini.
Résultats et discussion	
8. Purification de la PGs .....	38
9. Effet de la température sur l'activité enzymatique de la PGs .....	38
10. Thermostabilité de la PGs .....	39
11. Cinétique d'inactivation thermique et énergie d'inactivation .....	41
12. Calcul des paramètres thermodynamiques d'inactivation .....	43
13. Cinétique enzymatique .....	44
Conclusion .....	47
Annexes	
Références bibliographiques	
Résumé	

<b>Figure 1 :</b> Caractéristiques morphologiques et microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> .....	6
<b>Figure 2 :</b> Structure 3D globale de la pectine lyase .....	14
<b>Figure 3 :</b> Dégradation des composées galacturoniques par l'action de la pectine lyase.....	15
<b>Figure 4 :</b> Structure 3D de l'EndoPGs I d' <i>Aspergillus niger</i> .....	16
<b>Figure 5 :</b> Dégradation des composées galacturoniques par l'action de polygalacturonase .....	17
<b>Figure 6 :</b> Composition de la paroi cellulaire des plantes .....	19
<b>Figure 7 :</b> Structure basique de pectine.....	20
<b>Figure 8 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique .....	32
<b>Figure 9 :</b> Courbe d'étalonnage de la BSA .....	33
<b>Figure 10 :</b> (a) Effet de la température sur la PGs, (b) la stabilité de l'activité résiduelle de la PGs en fonction de temps.....	40
<b>Figure 11 :</b> Courbes de l'activité résiduelle (%) en fonction du temps (min) pour l'inactivation thermique de la PGs d' <i>Aspergillus niger</i> à différentes Températures 70, 75, 80, 85°C .....	41
<b>Figure 12 :</b> Tracé d'Arrhenius de $\ln(kd)$ en fonction de $1/T$ pour l'inactivation thermique de la PGs d' <i>Aspergillus niger</i> . ....	42
<b>Figure 13 :</b> Représentations tridimensionnelles d'entonnoirs de repliement.....	
<b>Figure 14 :</b> Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la PGs par l' <i>Aspergillus niger</i> .....	45

<b>Tableau 1:</b> Classification taxonomique d' <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>5</b>
<b>Tableau 2:</b> Agro-résidus utilisés dans le FMS pour la production d'enzymes.....	<b>8</b>
<b>Tableau 3:</b> Classification des pectinases.....	<b>11</b>
<b>Tableau 4:</b> Different sources de pectine lyase et de polygalacturonases.....	<b>13</b>
<b>Tableau 5:</b> Précipitation d'extrait brut de la PGs .....	<b>38</b>
<b>Tableau 6:</b> Paramètres cinétiques d'activation de la PGs de l' <i>Aspergillus niger</i> . ....	<b>42</b>
<b>Tableau 7:</b> Paramètres thermodynamiques d'inactivation de la PGs de l' <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>44</b>

**AA** : Acide aminé

**DNS**: 3,5-Acide Dénitrosalicilique

**FMS**: Fermentation à l'état solide

**OG**: Oligogalacturonase

**RGI**: Ramnogalacturonan I

**RGII**: Rhamnogalacturonan II

**PDA**: Potato Dextrose Agar

**PE** : pectinestérase

**PEL**: pectate lyase

**PGs**: Polygalacturonase

**PGL**: polygalacturonate lyase

**pH**: potentiel d'hydrogène

**PL**: pectine lyase

**PGA**: acide polygalacturonique

Les substances pectiques sont des polysaccharides complexes largement présents dans la paroi cellulaire des plantes, où elles assurent des fonctions essentielles telles que la cohésion cellulaire, la rigidité des tissus et la régulation des échanges hydriques (*Liu et al., 2023 ; Wang et al., 2024*). Leur hydrolyse enzymatique, notamment par les enzymes pectinolytique, constitue une voie de dégradation naturelle exploitée dans de nombreuses applications biotechnologiques.

Parmi les pectinases, les polygalacturonases (PGs), appartenant à la famille des glycosides hydrolases GH28, sont particulièrement importantes en raison de leur capacité à cliver les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques des chaînes de polygalacturonate, entraînant ainsi une dépolymérisation rapide des pectines (*Liu et al., 2023*). Ces enzymes sont aujourd’hui utilisées dans de nombreux secteurs industriels : extraction et clarification des jus de fruits, traitement des eaux usées, transformation des fibres végétales dans l’industrie d’textile, fermentation du thé et du café, production d’éthanol et d’autres biocarburants (*Kaur et al., 2023 et Ayele., 2022*).

La production industrielle des pectinases repose en grande partie sur les champignons filamentueux, notamment *Aspergillus niger*, connu pour sa capacité à produire des enzymes extracellulaires en grande quantité. La fermentation en milieu solide (SSF, Solid-State Fermentation), utilisant des substrats agricoles tels que le son de blé, s’avère être une méthode économique et efficace pour la production d’enzymes (*Wang et al., 2024 ; Aydin et al., 2024*). Ce procédé permet d’exploiter des résidus agro-industriels tout en améliorant la productivité enzymatique

Par ailleurs, les approches modernes telles que l’immobilisation enzymatique sur des supports biologiques ou nano structurés ont permis d’améliorer la stabilité thermique, la réutilisabilité et l’efficacité catalytique des PGs, ouvrant la voie à leur utilisation dans des systèmes de production en continu (*Kaur et al., 2023*).

En tenant compte des avancées récentes dans le domaine de la biotechnologie enzymatique, le présent travail a pour objectif de caractériser une PGs produite par *Aspergillus niger*, cultivé en fermentation solide sur un substrat à base de son de blé. Cette étude portera sur la détermination des paramètres biochimiques (activité enzymatique selon la température, la concentration en substrat) et des paramètres thermodynamiques (enthalpie, entropie, énergie libre de Gibbs) liés à l’inactivation thermique de l’enzyme. Ces données

permettront d'évaluer le potentiel d'application industrielle de cette enzyme dans des procédés biotechnologiques où la robustesse et la stabilité enzymatique sont des critères déterminants.

# **CHAPITR 01**

## **Fermentation**

## 1. Généralités

Bien que les enzymes pectinolytiques soient ubiquitaires chez les bactéries et les champignons, les préparations commerciales demeurent majoritairement d'origine fongique. *Aspergillus niger* s'impose comme souche de prédilection pour la production industrielle des pectinases (*Oliyad et Dawit, 2018*). Ces champignons filamenteux constituent des outils biotechnologiques de premier ordre, où leur polyvalence métabolique les positionne en bioréacteurs efficaces pour la biosynthèse de composés à haute valeur ajoutée, acides organiques, principes actifs pharmaceutiques et enzymes (*Wakai et al., 2017*).

*Aspergillus niger* se distingue par sa capacité naturelle à sécréter des endopolygalacturonases, clés dans la dégradation de la pectine. Parmi ces enzymes, la PGs représente la seconde activité prédominante dans les préparations enzymatiques commerciales (*Bussink et al., 1991*). Son aptitude à valoriser des substrats agro-industriels peu coûteux (biodéchets, résidus végétaux) réduit drastiquement les coûts de production.

Physiologiquement adapté à de larges gammes thermiques, ce champignon produit des conidies asexuées haploïdes portées par des conidiophores. Après dissémination aérienne, leur germination initie une croissance végétative apicale générant un mycélium ramifié. Ce réseau hyphal optimise l'absorption des nutriments et la sécrétion enzymatique (*Meyer et al., 2004 ; Ward et al., 2006*).

### 1.1. Isolement

L'*Aspergillus niger* présente une large distribution géographique et colonise des habitats variés grâce à sa capacité à se développer sur de nombreux substrats. Ce champignon saprophyte est fréquemment observé sur des matières organiques en décomposition, telles que les feuilles mortes, les grains stockés ou les composts. Ses spores très répandues sont souvent associées aux sols et aux débris végétaux (*Karunakaran et al., 2014*).

## 2. Classification

**Tableau 1 :** Classification taxonomique d'*Aspergillus niger* (**AbdMallick, 2019**).

Règne	Mycetes
Division	<i>Eumycota</i>
Classes	<i>Hymomycetes</i>
Ordre	<i>Moniliials</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Niger</i>

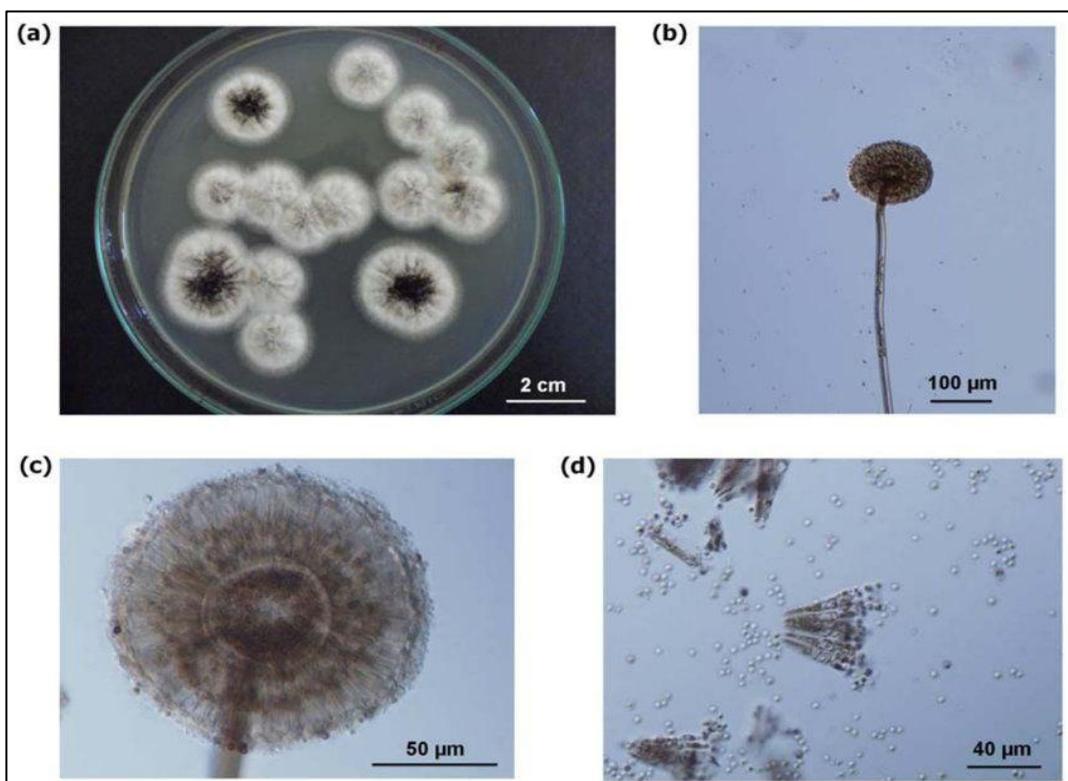
## 3. Morphologie

La caractérisation morphologique de la souche a reposé en premier lieu sur l'observation de la pigmentation de ses colonies. Cultivées sur gélose PDA (Potato Dextrose Agar) à 30°C, ces dernières présentaient une texture cotonneuse, d'abord blanches avant de s'assombrir de manière accélérée, parallèlement à la production de conidiospores noires (**Senawong et al., 2013**).

### 3.1. Observation microscopique

Ce champignon présente des hyphes transparents et cloisonnés. Ses têtes conidiennes, d'abord en forme d'étoile, deviennent des colonnes compactes en mûrissant.

La structure est bisériée de vésicules globuleuses (30-75 µm) à l'apex des conidiophores (longues tiges transparentes de 400-3000 µm) qui portent d'abord des cellules stériles (métules), puis des cellules productrices de spores (phialides). Ces éléments recouvrent entièrement la vésicule, dont l'extrémité s'assombrit. Les spores, sphériques (4-5 µm), sont brun-noir avec une surface très rugueuse (**Van., 1867**).



**Figure 1 :** Caractéristiques morphologiques et microscopique d'*Aspergillus niger* (*Senawong et al., 2014*).

#### 4. Pathogénicité

*L'Aspergillus niger* est un pathogène végétal majeur, responsable de la production de diverses mycotoxines (telles que les ochratoxines et les aflatoxines) contaminant de nombreux produits alimentaires (arachides, maïs, oignons, etc.). De plus, ce champignon provoque la pourriture des légumes et des fruits, entraînant des pertes économiques et agricoles considérables (*Blumenthal et al., 2004 ; Shankar et al., 2013 ; Cortesão et al., 2020*).

#### 5. Fermentation

La fermentation est une processus biologique qui se produit lorsque les micro-organismes comme les levures et les bactéries dégradent le sucre sans la présence d'oxygène. Ce mécanisme génère de l'énergie pour les micro-organismes et engendre des dérivés comme l'alcool, l'acide lactique, le dioxyde de carbone et divers autres composés. La fermentation est utilisée dans de nombreuses industries alimentaires, telles que la production de pain, de vin, de yaourt et de fromage. Elle est aussi employée dans la fabrication de biocarburants et d'autres produits chimiques.

### **5.1. Fermentation sur milieu solide**

La fermentation sur milieu solide est aussi ancienne que celle en milieu liquide (*Francis et al., 2011*). La FMS est un processus qui s'installe aisément est simple à gérer et économique, pouvant être utilisé pour générer des substances bioactives bénéfiques pour la santé humaine tout en améliorant la valeur nutritive des sous-produits (*Yiyan et al., 2021*). Le processus de fermentation utilisant *Aspergillus niger* peut générer une quantité importante d'enzymes qui favorisent la décomposition des substrats macromoléculaires, la conversion des éléments bioactifs, et la création de nouveaux composés. Il en résulte une amélioration des qualités nutritionnelles et fonctionnelles des substrats (*Velázquez et al., 2021*).

### **5.2. Micro-organismes utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes FMS**

La sélection d'un micro-organisme approprié est cruciale pour le succès de la fermentation en état solide (FMS). De nombreux micro-organismes sont utilisés dans une variété de procédés FMS pour atteindre différents objectifs. Les champignons et les bactéries sont capables de se développer sur des substrats solides et d'avoir des applications dans des procédés de fermentation en milieu solide. On utilise couramment les bactéries dans le compostage, l'ensilage et les processus alimentaires, alors que les levures trouvent leur application dans la production d'éthanol et en nutrition. Toutefois, c'est en raison de leur capacité d'adaptation à ce milieu et de leurs caractéristiques physiologiques, enzymatiques et biochimiques que les champignons filamenteux sont les micro-organismes les plus couramment employés dans la fermentation en état solide (FMS) (*Francis et al., 2011*).

### **5.3. Substrats utilisés pour la production d'enzymes dans les systèmes FMS**

La fermentation en état solide utilise principalement des produits agricoles et des déchets agro-industriels comme substrats. Ces matières composées majoritairement de lignocellulose, représentent plus de 60% de la biomasse végétale produite chaque année. (*Nigam et al., 2009*).

**Tableau 2 :** Agro-résidus utilisés dans le FMS pour la production d'enzymes.

Substrats	Microorganismes	Références
Son de blé	<i>Aspergillus sojae</i>	(Demir et al., 2016).
Son de riz	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Oduguwa et al., 2007).
Biomasse algale	<i>Bacillus subtilis</i>	(Goda et al., 2024).
Marc de fraise	<i>Aspergillus flavus</i>	(Hussein et al., 2020).
Tête de tournesol	<i>Aspergillus niger</i>	(Patil et al., 2006).
Marc de raisin	<i>Aspergillus niger</i>	(Gungor et al., 2021).
Bagasse de canne à sucre	<i>Aspergillus terreus</i>	(Ramadan et al., 2023).
Bagasse orange	<i>Aspergillus giganteus</i>	(Pedrolli et al., 2008).

## 6. Fermentation industrielle

Les méthodes de fermentation à l'échelle industrielle débutent avec des micro-organismes spécifiques et dans des conditions précises, comme une modulation rigoureuse de la concentration nutritive. Il existe une multitude de produits : l'alcool, le glycérol et le dioxyde de carbone proviennent de la fermentation de différents sucres par des levures ,l'alcool butylique, l'acétone, l'acide lactique, le glutamate monosodique et l'acide acétique sont dérivés de diverses bactéries ; tandis que l'acide citrique, l'acide glucuronique ainsi que des quantités réduites d'antibiotiques, de vitamine B12 et de riboflavine (vitamine B2) proviennent de la fermentation des moisissures. La production d'alcool éthylique par la fermentation de l'amidon ou du sucre constitue une source majeure de biocarburant liquide (Pasteur et al.,2025).

# **CHAPITRE 02**

## **Enzymes pectinolytiques**

## **1. Généralités**

Les enzymes sont des catalyseurs protéiques intracellulaires, accélèrent les réactions biochimiques sans être altérées lors du processus. Parmi celles-ci, les pectinases forment une classe enzymatique hétérogène spécialisée dans l'hydrolyse des substrats pectiques (***Shet et al., 2018***). L'activité catalytique de ces enzymes pectinolytiques sécrétées par divers micro-organismes (levures, bactéries et champignons) est caractérisée via des approches *in vivo* et des analyses biochimiques (***Gainvors et al., 1994***).

## **2. Enzymes pectinolytique**

### **2.1. Classification des pectinases**

Les pectinases aussi appelées enzymes pectinolytiques, sont des enzymes qui dégradent les pectines, des polysaccharides présents dans la paroi cellulaire des plantes. Leur classification repose sur leur mode d'action et leurs substrats spécifiques, (***Haile., 2022 ; Satapathy et al., 2020***). Elles se divisent en trois catégories (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** Classification des pectinases.

<i>Catégories</i>	<i>Sous-type</i>	<i>Mode d'action</i>	<i>Références</i>
Protopectinases	Protopectinases A	Interagit spécifiquement avec la région constituée d'acide polygalacturonique, localisée dans la partie interne de la protopectine insoluble.	(Satapathy et al., 2020)
	Protopectinases B	Agit au niveau des chaînes polysaccharidiques situées à la périphérie ou à l'extérieur de la protopectine insoluble.	(Satapathy et al., 2020)
Estérases (EC 3.1.1.11)	Pectine méthylestérases (EC 3.1.1.11)	Hydrolyse les groupes méthoxyles de la pectine.	(Nighojkar et al., 2015)
	Pectine acétylestérases (EC 3.1.1.6)	Hydrolyse les groupes acétyles sur la région HG de la pectine.	(Nighojkar et al., 2015)
Dépolymérases	Endopolygalacturonases (EC 3.2.1.15)	Coupent les liaisons $\alpha(1 \rightarrow 4)$ du polygalacturonate.	(Nighojkar et al., 2015)
	Exopolygalacturonases (EC 3.2.1.67)	Hydrolyse aléatoirement la chaîne de polygalacturonate.	(Nighojkar et al., 2015)
	pectate lyases (EC 4.2.2.-)	Clivage des liaisons par $\beta$ -élimination	(Satapathy et al., 2020)
	Pectine lyases (EC 4.2.2.10)	Agit sur la pectine méthylée via trans-élimination.	(Satapathy et al., 2020)

La classification des enzymes pectinolytiques souligne la diversité des mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation de la pectine, permettant d'adapter leur utilisation aux exigences industrielles et biotechnologiques (*Satapathy et al., 2020*).

## **2.2. Sources de pectinase**

Comme toutes les pectinases la PL est aussi une enzyme hautement inductible, bien que certaines études signalent une production significative en l'absence de son inducteur naturel. Jusqu'à présent, la majorité des lyases de pectine étudiées ont identifiées chez les micro-organismes. Cependant, il y a peu d'information sur leur occurrence chez les plantes et les animaux (*Yadav et al., 2009*).

Les polygalacturonases (PGs) sont des enzymes largement répandues chez les micro-organismes, notamment les bactéries et les champignons. Plusieurs PGs fongiques, isolées de genres tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium* et d'autres espèces apparentées, ont été caractérisées et exploitées pour diverses applications industrielles en raison de leur efficacité dans la dégradation des pectines. (*Nakamura et Iwai, 2019*).

**Tableau 4:** Différentes sources de pectine lyase et de polygalacturonases.

<i>Enzyme</i>	<i>Sources</i>	<i>Référence</i>
<b>Pectine lyase</b>	<b>Fongiques</b> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium griseoroseum</i> <i>Trichodermaharzianum</i> <i>Aspergillus niger</i>	(Yadav et al., 2008). (Lima et al., 2017). Mehmoud et al., 2019) (liu et al., 2024)
	<b>Bactériennes</b> <i>Pectobacteriumcarotovora</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacillus clausii</i> <i>Bacillusvelezensis</i>	(Masuria et al., 2012). (Tasgin et al., 2020). (Li et al., 2022). (Li et al., 2024).
	<b>Levuriennes</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichiapastoris GS115</i> <i>Kluyveromyces</i>	(Gainvors et al., 1994). (Qiang et al., 2009). (Colombo et al., 2014).
<b>polygalacturonases</b>	<b>Fongiques</b> <i>Neurospora crassa</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium janczewskii</i> <i>Aspergillus niger</i>	(Crotti et al., 1996). (Caxias et al., 2004). (Faiza et al., 2020). (Nour et al., 2024).
	<b>Bactériennes</b> <i>Bacillus sp. MG-cp-2</i> <i>Erwiniacarotovora MTCC</i> 1428 <i>Chryseobacteriumindologenes</i> <i>Bacillus pumilus</i>	(Mukesh et al., 2000). (Mangesh et al., 2013). (Roy et al., 2018). (Tehseen., 2024).
	<b>Levuriennes</b> <i>Wickerhanomycesanomalu</i> <i>Rhodotorulaglutinis MP-10</i>	(Martos et al., 2013). (Taskin., 2013).

## 2.3. Pectine lyase

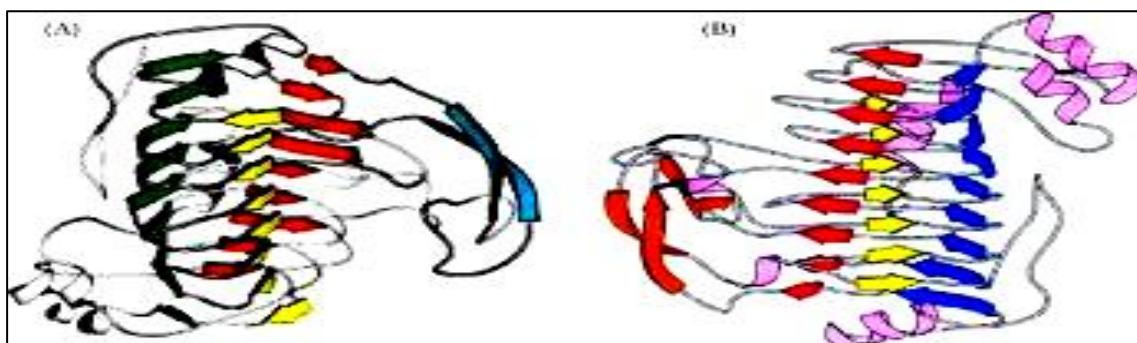
La lyase de la pectine (**EC 4.2.2.10**) intervient sur les composés pectiques, qui se présentent en tant que polysaccharides structurels dans la lamelle moyenne et les parois cellulaires primaires des plantes supérieures.

### 2.3.1. Structure de la PL

Les structures de la lyase de la pectine issue des souches N400 et 4M-147 englobent les 359 résidus de la protéine mature ainsi que les molécules solubles, de masse moléculaire de la pectine lyase varié de 30 à 40 kDa (**Soriano et al., 2005**). La structure universelle commune comprend un domaine en spirale parallèle et une zone en boucle.

Les brins parallèles se courbent en une vaste hélice dextrogyre, visible lorsqu'elle est sectionnée transversalement. Trois couches parallèles, nommées PB1, PB2 et PB3, se constituent lorsque les brins de tours consécutifs s'alignent. PB1 et PB2 constituent un sandwich antiparallèle, alors que PB3 est à peu près perpendiculaire à PB2. PB1 comprend huit brins, tandis que PB2 et PB3 sont composés de neuf brins. Les segments sont généralement de courte longueur, on les retrouve typiquement avec trois acides aminés pour PB1, quatre ou cinq pour PB2 et trois à cinq pour PB3 (**Mayans et al., 1997**).

La famille PL1 comprend la lyase de pectine, compose de trois structures cristallines (PDB: 1IDJ, 1IDK et 1QCX) de cette enzyme ont été déterminées, révélant une structure en hélice- $\beta$  (**Kanchan et al., 2023**).

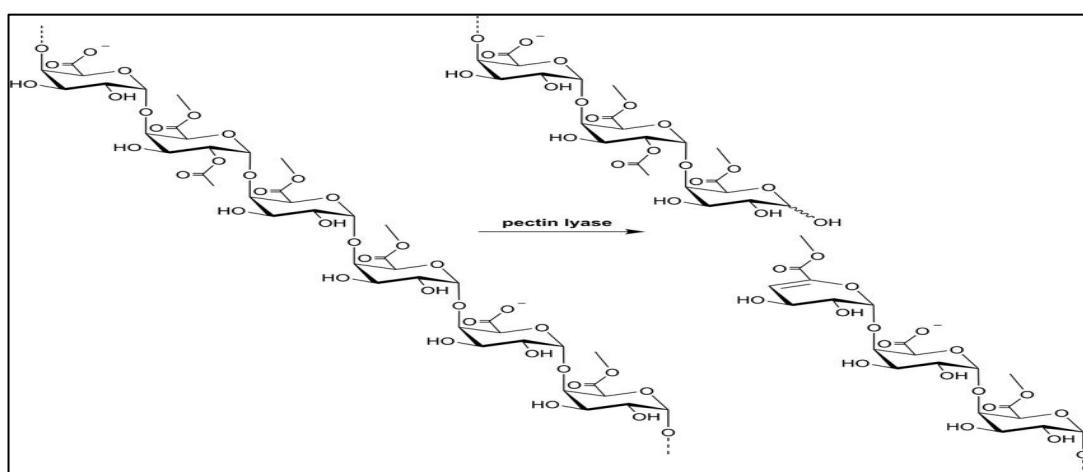


**Figure 2 :** Structure 3D globale de la pectine lyase (**Yadav et al., 2009**).

### 2.3.2. Mode d'action

Les lyases de la pectine sont les seules enzymes pectinolytiques identifiées capables de catalyser directement la dépolymérisation d'une pectine fortement méthylée par le biais d'un processus de  $\beta$ -élimination menant à la production d'oligogalacturonates 4,5 insaturés. Il est généralement admis que toutes les PL sont de type endo-agissant et que leur activité tend à diminuer avec la baisse du niveau de méthylation des pectines (*Hadj et al., 2016*).

L'activité des pectine lyases n'est pas influencée par les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , mais peut être augmentée par d'autres cations divalents. Le processus de  $\beta$ -élimination s'effectue en trois étapes : (1) la neutralisation du groupe carboxyle C-5 réduit le pKa du proton H-5 tout en augmentant sa propension à être extrait ; (2) abstraction du proton entraîne un intermédiaire émulé, et (3) l'élimination de la liaison glycosidique se produit avec un transfert d'électrons simultané du groupe carboxylate qui engendre une double liaison entre C- 4 et C-5. D'après la théorie acido-basique des protons, le proton  $\alpha$  de l'atome C-5 du substrat acidifié est ôté par la base catalytique, tandis que l'acide catalytique fournit le proton au groupe carbonyle (*Ling et al., 2021*).



**Figure 3 :** Dégradation des composées galacturoniques par l'action de la pectine lyase (*Birgitte et al., 2020*).

### 2.4. Polygalacturonases

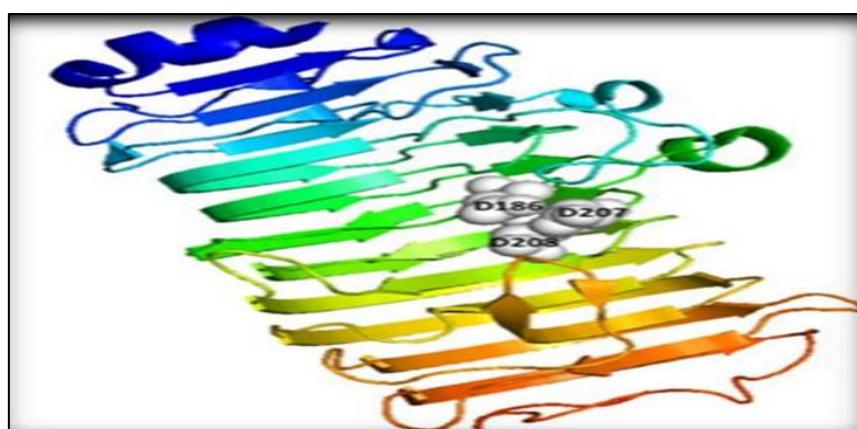
Les polygalacturonases sont des enzymes pectiques qui dégradent les substances pectiques adhésives présentes dans la lamelle moyenne et la paroi cellulaire. Elles font partie de la famille glycosyl hydrolase 28 et sont responsables de la coupure de la liaison  $\alpha$ -1,4 entre deux résidus d'acide galacturonique. On les retrouve abondamment chez les microorganismes ainsi que chez les plantes supérieures (*Nakamura et Iwai., 2019*).

Il a été observé que les polygalacturonases sont divisées en deux catégories en fonction de leur mécanisme d'action:

- **Endo-PGs:** (**EC 3.2.1.15**) décompose les PGA pour libérer des oligomères de galacturoniques (*Haile et Ayele., 2022*), interviennent sur les liaisons glycosidiques internes de chaîne principale de polysaccharides (*Liu et al., 2023*).
- **Exo-PGs:** (**EC 3.2.1.67**) dégrade les acides pectiques en libérant du mono-galacturonate (*Haile et Ayele., 2022*), interviennent sur les liaisons glycosidique situées aux extrémités terminales du polymère (*Liu et al., 2023*).

#### 2.4.1. Structure de la PGs

La majorité des PGs se caractérisent comme étant des mésophiles acides et possèdent des poids moléculaires variant entre 30 et 50 kDa. Ces PGs possèdent des structures en hélice  $\beta$  parallèles à droite, ainsi que des résidus clés conservés qui sont essentiels pour le mécanisme de catalyse inverse et l'attachement au substrat (*Liu et al., 2023*). Alors toutes dérivant de micro-organismes, se plient en une hélice bêta parallèle dextrogyre et montrent quatre séquences d'acides aminés (AA) préservées dans leur site actif : NTD, DD, GHG et RIK. Le site actif est organisé en une fente de liaison en forme de tunnel, permettant à l'enzyme de se lier au polysaccharide et de produire des fragments pectiques appelés oligogalacturonides (OG) de différents DP et avec différentes substitutions méthyles et acétyles (*Josip et al., 2023*).



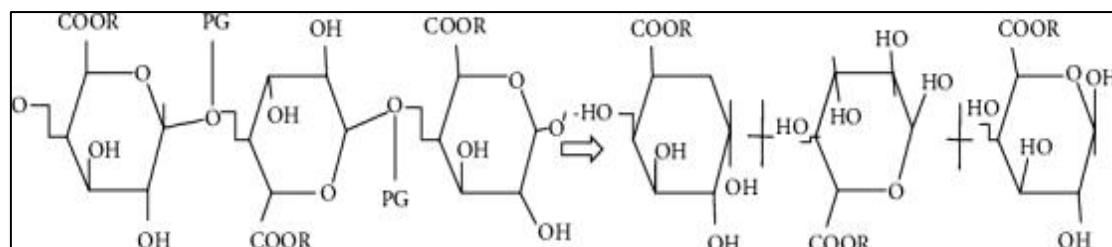
**Figure 4 :** Structure 3D de l'Endo-PGs d'*Aspergillus niger* (*Nakamura et Iwai., 2019*).

### 2.4.2. Mode d'action

Les polygalacturonase jouent un rôle crucial dans la décomposition des pectines. On peut classer leur mécanisme d'action en deux grandes catégories: les exo-polygalacturonases et les endo-polygalacturonases.

Les exo-polygalacturonases dégradent les liaisons terminales  $\alpha$ -(1-4) de la chaîne d'acide polygalacturonique et sont réparties en deux catégories en fonction du produit libéré: la classe I (EC 3.2.1.67; galacturan 1,4- $\alpha$ -galacturonosidase), qui libère des monomères d'acide galacturonique, et la classe II (EC 3.2.1.82 ; exo-poly- $\alpha$ -galacturonosidase), qui libère de l'acide digalacturonique (*Carla et al., 2021*). Pour déterminer le mécanisme d'action des endoPGs, l'approche expérimentale la plus fréquemment adoptée est de repérer les éléments libérés lors de l'hydrolyse d'une chaîne de substrat. En fonction du profil de progression du produit d'hydrolyse, les endoPGs ont été catégorisées en enzymes à attaque unique ou à attaque multiple. Par conséquent, pour les enzymes à coupure unique, les molécules de substrat sont seulement dégradées une fois suite à la création du complexe ES (enzyme-substrat), ce qui provoque la libération d'oligomères de diverses longueurs. Les enzymes à attaques multiples fragmentent plutôt la même molécule de substrat à plusieurs reprises, libérant des oligomères de petite taille ou même des monomères durant la phase initiale du processus réactionnel (*Claudia et al., 2007*).

On peut distinguer l'activité exo-PGs et endo-PGs en évaluant simultanément l'accroissement des groupes réducteurs et la diminution de la viscosité. Une endo-enzyme se distingue par une réduction importante de la viscosité (par exemple 50 %), sans toutefois provoquer une libération notable de groupes réducteurs (24 %). Pour atteindre une diminution de viscosité de 50 %, il est nécessaire qu'une exo-enzyme hydrolyse 20 % des liaisons glycosidiques (*Sakai et al., 1993*).



**Figure 5 :** Dégradation des composées galacturoniques par l'action de polygalacturonase (*Haile et al., 2022*)

### **2.4.3. Effet des facteurs environnementaux sur l'activité et la stabilité de PGs**

#### ➤ **Effet de température**

La température est un facteur important pour déterminer l'activité et la stabilité des enzymes. L'étude a révélé que la PGs a une activité optimale à 40 °C, ce qui signifie que l'enzyme fonctionne le mieux à cette température. L'enzyme conserve une activité importante même à 50 °C, affichant 99% de son activité optimale. Cela suggère que l'enzyme est assez stable dans cette plage de température. Les températures élevées dénaturent les enzymes, diminuant leur activité et à des températures plus basses, l'activité enzymatique est augmentée car la chaleur fournit de l'énergie pour la réaction (**Hande et Canan., 2016**). Habituellement, la température idéale pour produire du PG est alignée sur la température de croissance du micro-organisme concerné (**Sharma et al., 2002**). Concernant les enzymes extracellulaires, la température peut affecter leur libération, potentiellement en altérant les caractéristiques physiques de la membrane cellulaire (**Rahman et al., 2005**).

#### ➤ **Effet de pH**

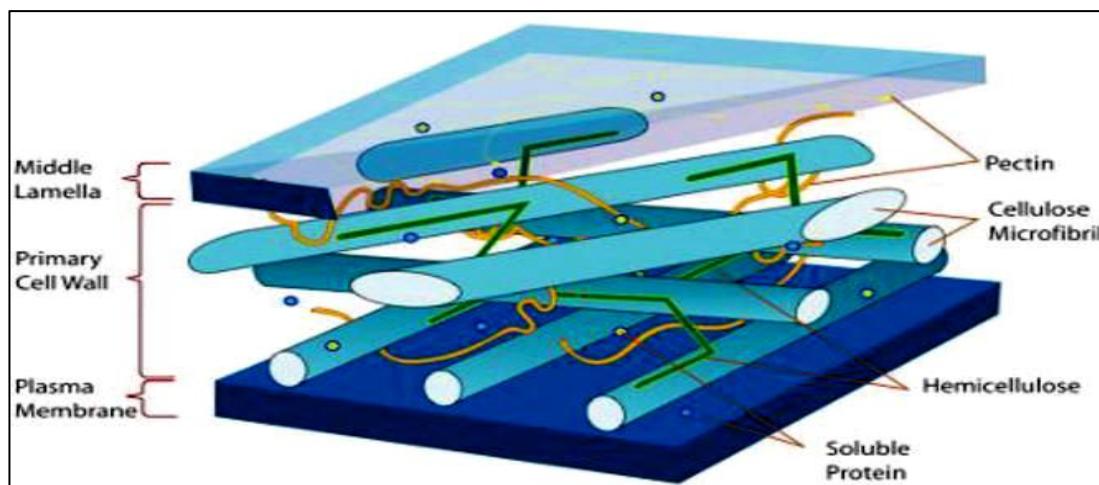
Le pH est un facteur essentiel pour l'activité et la stabilité de diverses enzymes. Les fluctuations du pH en particulier les changements dans les charges des acides aminés, influencent manifestement la charge nette globale des enzymes ainsi que la répartition des charges sur leur surface. Par conséquent le changement du pH a un impact direct sur la stabilité des enzymes.

L'enzyme PGs a une activité optimale dans la zone acide (pH 4,0-5,0). L'activité de l'enzyme est affectée par le pH, ce qui suggère que l'ionisation des résidus d'acides aminés essentiels du site actif est influencée. Ces derniers jouent un rôle dans la fixation du substrat et le processus catalytique, c'est-à-dire la transformation du substrat en produits (**Hande et Canan., 2016**). Ce résultat reste très similaire à celui noté par (**Shashi et al., 2013**), qui signalent un pH optimal de 4 pour la souche d'*Aspergillus niger* selon la littérature.

### 3. Substrats pectiques

#### 3.1. Définition

Les substrats pectiques constituent une famille de polysaccharides complexes qui jouent un rôle structural essentiel dans la paroi cellulaire des plantes (*Kohli et Gupta., 2015; Wu et al., 2020*). Ils sont la cible des enzymes pectinolytiques, notamment les pectinases qui catalysent leur dégradation en molécules plus petites utilisables dans diverses applications biotechnologiques et industrielles (*Zheng et al., 2021*).



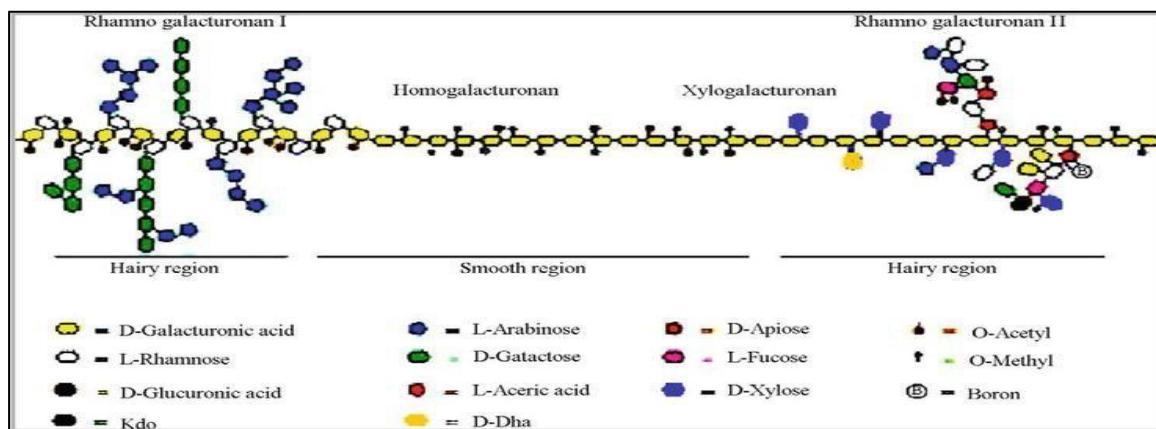
**Figure 6 :** La composition de la paroi cellulaire des plantes (*Haneef, 2023*).

#### 3.2. Sources des substrats pectiques

Les pectines sont abondantes dans la nature et se retrouvent principalement dans les parois cellulaires des fruits et légumes. La pectine présente sur le marché est essentiellement obtenue à partir de sous-produits agroalimentaires: la pulpe de betterave sucrière, les écorces d'agrumes et le marc de pomme (*Berlowska et al., 2018*).

#### 3.3. Structures des substrats pectiques

Les substances pectiques sont des polysaccharides riches en acide galacturonique, un sucre acide qui constitue l'élément de base des pectines. Ces polymères sont reliés par des liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glycosidiques, formant des chaînes linéaires ou ramifiées selon leur structure (*Shrestha et al., 2021*).



**Figure 7 :** Structure basique de pectine (Haneef., 2023).

Selon la classification de l'American Chemical Society (ACS), les substances pectiques sont divisées en quatre catégories principales (*Jayani.*, 2005):

- **Protopectine:** une forme insoluble de pectine présente dans les parois cellulaires des fruits et légumes avant maturation. Elle est convertie en pectine soluble par les protopectinases (*Nawaz et al.*, 2018).
- **Pectine:** polymère solubilisée avec différents degrés de méthylation, influençant ses propriétés gélifiantes (*Nighojkar et al.*, 2015).
- **Acide pectinique:** produit de déméthylation de la pectine. Ces acides forment des gels en présence de calcium et jouent un rôle clé dans la cohésion des parois végétales (*Nighojkar et al.*, 2015).
- **Acide pectique:** forme totalement démethylée (*Nighojkar et al.*, 2015).

### **3.4. Composition chimique des pectines**

Les pectines se composent principalement de trois domaines structuraux majeurs:

#### **3.4.1. Homogalacturonanes (HG)**

Les homogalacturonanes constituent la partie lisse de la pectine et sont formés d'une chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique liés par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidiques. Ces résidus peuvent être méthylés ou acétylés, modifiant ainsi leurs propriétés physicochimiques et leur susceptibilité aux pectinases (*Lara-Espinoza et al., 2018; Ropartz et Ralet, 2020*).

#### **3.4.2. Rhamnogalacturonanes (RG-I et RG-II)**

- **Rhamnogalacturonane I (RG-I)** : contient des unités répétées de rhamnose et d'acide galacturonique, avec des chaînes latérales de sucres neutres. Elle présente des zones structurées différemment selon la densité en rhamnose (*Polizeli et al., 2005*).

-**Rhamnogalacturonane II (RG-II)** : repose sur un squelette D-galacturonane et possède des chaînes latérales complexes fixées directement aux résidus de l'acide galacturonique. Alors que la structure de RGI est hétérogène, celle de RGII est très conservée (*Vincken et al., 2007*) Ce type de pectine joue un rôle clé dans la stabilité de la paroi cellulaire.

#### **3.4.3. Xylogalacturonanes (XGA) :**

les xylogalacturonanes sont des résidus xylose attachés aux unités d'acide galacturonique (*Bennamoun, 2017*).

## **CHAPITRE 03**

# **Approche thermodynamique des pectinases et leurs applications industrielles**

## **1. Introduction aux thermodynamiques**

La thermodynamique est une branche fondamentale de la physique qui étudie les relations entre la température et d'autres formes d'énergie. Elle repose sur des principes établis qui gouvernent les transferts d'énergie et les transformations de la matière. L'importance de la thermodynamique dépasse largement le cadre académique, trouvant des applications cruciales dans de nombreux secteurs industriels.

La thermodynamique est régie par quatre lois qui décrivent le comportement de l'énergie et des systèmes. La première loi, également connue sous le nom de principe de conservation de l'énergie, affirme que l'énergie ne peut être ni créée ni détruite, mais seulement transformée d'une forme à une autre. La deuxième loi introduit le concept d'entropie, qui mesure le désordre d'un système et indique la direction naturelle des processus. La troisième loi établit que l'entropie d'un cristal parfait tend vers zéro lorsque la température approche le zéro absolu. Enfin, la loi zéro définit l'équilibre thermique, c'est-à-dire l'état où deux systèmes ont la même température et n'échangent plus d'énergie. Ces lois fournissent un cadre essentiel pour comprendre et prédire le comportement des systèmes thermodynamiques.

La compréhension des propriétés thermodynamiques de la PGs est essentielle pour optimiser son utilisation dans diverses applications industrielles. L'étude de la thermodynamique des enzymes permet de caractériser leur stabilité, leur activité et leur affinité pour le substrat en fonction de la température, du pH et d'autres facteurs environnementaux. Cette étude vise à analyser les paramètres thermodynamiques de la PGs, tels que l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre de Gibbs, afin de mieux comprendre son mécanisme catalytique et d'évaluer son potentiel d'application dans des conditions industrielles spécifiques.

La PGs est déjà utilisée dans plusieurs secteurs industriels, notamment dans la production de jus de fruits, la clarification des vins et la fabrication de textiles. Sa capacité à hydrolyser la pectine facilite l'extraction des jus, améliore la filtration et réduit la viscosité des produits. De plus, la PGs peut être employée dans la production de biocarburants et la valorisation des déchets agricoles. L'étude approfondie des propriétés thermodynamiques de la PGs permettra d'optimiser son utilisation, d'améliorer les procédés industriels et de développer de nouvelles applications.

## **2. Paramètres thermodynamiques**

### **2.1. Enthalpie**

Elle représente la chaleur absorbée ou dégagée lors de la réaction enzymatique. On examine comment les changements d'enthalpie influencent la stabilité et l'activité de l'enzyme (*Moran, M. J et al., 2018*).

### **2.2. Entropie**

Elle mesure le degré de désordre dans le système. L'analyse de l'entropie aide à comprendre les changements structurels et conformationnels de l'enzyme lors de la liaison du substrat et de la catalyse.

### **2.3. Énergie libre de Gibbs**

Ce paramètre combine l'enthalpie et l'entropie pour déterminer la spontanéité d'une réaction. L'étude de l'énergie libre de Gibbs permet d'évaluer la faisabilité thermodynamique de la réaction enzymatique et de prédire les conditions optimales pour l'activité enzymatique (*Sandler., 2017*).

## **3. Le rapport entre énergie libre de Gibbs et les paramètre thermodynamique et cinétique**

Le  $\Delta G^*$  qui correspond à la variation de l'énergie libre de Gibbs est essentiel pour saisir la réaction. Un  $\Delta G^*$  négatif indique qu'une réaction se produit spontanément à l'instar de la décomposition du polygalacturonate par les polygalacturonases. Le  $\Delta G^*$  est associé à la constante d'équilibre (K) qui définit l'état d'équilibre de la réaction. Par ailleurs, des éléments tels que la température, le pH et la concentration des réactifs ont un impact sur le  $\Delta G^*$ , influençant ainsi l'activité enzymatique (*Copeland., 2000*).

Le  $\Delta G^*$  a un impact indirect sur la vitesse de réaction en influençant l'énergie d'activation Ea qui définit la rapidité de la réaction. Une réaction plus rapide peut être favorisée par un  $\Delta G$  plus négatif. En autre, le  $\Delta G^*$  peut servir à examiner la stabilité du complexe formé entre l'enzyme et le substrat. Un  $\Delta G^*$  plus défavorable pour créer ce complexe suggère une affinité plus forte entre l'enzyme et le substrat, ce qui pourrait amplifier la rapidité de la réaction (*Bonnin et al., 2014*).

L'étude du  $\Delta G^*$  combinée à d'autres paramètres thermodynamiques et cinétiques offre une compréhension complète du mécanisme de la réaction enzymatique. Les valeurs de  $\Delta G^*$  sont utilisées dans les modèles et simulations pour prédire le comportement des polygalacturonases et comprendre l'impact des modifications structurelles sur leur activité.

## **4. Thermostabilité**

La thermostabilité des enzymes pectinolytiques est un facteur crucial pour leur application industrielle.

L'étude a examiné l'impact des mutations de cystéine sur les propriétés biochimiques de la PGs PecJKR01. Les données indiquent que les modifications aux positions 42 et 283 influencent de manière significative la thermostabilité et l'activité enzymatique. Le variant A42C a démontré une stabilité à la chaleur supérieure et une activité enzymatique améliorée, alors que le variant M283C a révélé une stabilité thermique augmentée mais une activité enzymatique diminuée. La mutation M283C a conduit à l'établissement d'un lien disulfure supplémentaire, ce qui a favorisé une augmentation de la thermostabilité tout en diminuant la taille de la cavité, influençant ainsi l'activité de l'enzyme (*Singh et al., 2018*).

## **5. Dénaturation des enzymes**

La dénaturation des enzymes constitue un processus thermodynamique impliquant la transition de l'état natif replié, conformation de moindre énergie libre et biologiquement active, vers un ou plusieurs états dépliés, caractérisés par un désordre conformationnel accru et une énergie libre supérieure. À l'issue d'une dénaturation complète, le polypeptide adopte une conformation de pelote statistique, où tous les résidus d'acides aminés sont entièrement accessibles au solvant. Ce processus peut impliquer des états intermédiaires partiellement repliés qui peuvent exister ou apparaître transitoirement. Toutes les formes peuvent être en équilibre rapide ou lent.

Cependant, la dénaturation devient irréversible lorsque des modifications covalentes ou des réarrangements structuraux irréversibles surviennent, conduisant à un état dénaturé inactif. Ces altérations comprennent : Des modifications chimiques des chaînes latérales (ex : desamination, oxydation), la formation de liaisons croisées aberrantes. L'hydrolyse peptidique ou le clivage de liaisons covalentes.

Le dépliement peut être induit par des changements dans les conditions physico-chimiques, telles que la température, la pression, le pH, etc. Cela peut également conduire à une stabilité accrue des états natif, par exemple, en remplaçant l'eau par de l'eau lourde ou en ajoutant des co-solvants stabilisants. Cependant, la présence d'un co-solvant déstabilisant rend les protéines plus sensibles à la pression (*Masson et Lushchekina ., 2022*).

### **5.1. Forme native**

L'état natif d'une enzyme est sa conformation tridimensionnelle biologiquement active, capable de catalyser efficacement une réaction chimique spécifique.

### **5.2. Forme active**

L'état dénaturé d'une enzyme correspond à la perte de sa structure tridimensionnelle native, conduisant à une perte de sa fonction biologique. L'inactivation thermique des enzymes se déroule en deux étapes, c'est-à-dire :  $N \leftrightarrow U \rightarrow I^*$ , où N est l'enzyme native,  $U^*$  représente l'enzyme dépliée et inactive, qui peut être repliée de manière réversible lors du refroidissement, et I est l'enzyme inactivée formée après une exposition prolongée à la chaleur et qui ne peut donc pas être récupérée lors du refroidissement (*Amin et al., 2020*).

## **6. Applications industrielles des pectinases**

Les recherches sur les applications des pectinases sont en plein essor au niveau mondial pour optimiser leur activité enzymatique. La demande croissante pour ces enzymes explique leur large utilisation dans divers secteurs industriels. L'application des pectinases varie en fonction des conditions physiques disponibles (*Haile et Ayele, 2022*).

### **6.1. Extraction d'huile**

Les pectinases en combinaison avec d'autres enzymes dégradantes des parois cellulaires (CWDE), sont largement utilisées pour extraire l'huile de diverses sources, telles que les graines de lin, les olives et les dattes. Dans le cas des huiles d'agrumes, comme l'huile de citron, les pectinases permettent de perturber les propriétés émulsifiantes de la pectine, facilitant ainsi l'extraction de l'huile des pelures d'agrumes (*Haile et Ayele, 2022*).

Lors du broyage l'ajout d'enzymes dégradant la pectine des lamelles médianes des cellules végétales améliore l'extraction de l'huile en augmentant sa libération à partir des graines et des couches germinales. Par ailleurs, des études ont montré que les pectinases

bactériennes favorisent l'extraction d'huile des graines de sésame en augmentant le rendement et la clarté de l'huile, tout en réduisant sa viscosité (*Shrestha et al., 2021*).

## **6.2. Industries pharmaceutiques**

Les pectinases sont utilisées dans la fermentation de substances pectiques issues des peaux de fruits et légumes pour produire divers composés pharmaceutiques. Ces produits servent notamment comme compléments de fibres pour traiter le diabète et l'obésité (*Satapathy et al., 2020*).

## **6.3. Traitement des fruits et des légumes**

Les pectinases jouent un rôle clé dans l'industrie des jus de fruits en réduisant la viscosité, en améliorant la clarté et en facilitant la macération des fruits et des légumes. Elles permettent également de diminuer le temps de fermentation, ce qui optimise la production de jus troubles, de jus clairs pétillants et de produits unicellulaires (*Shrestha et al., 2021*).

En dégradant la pectine, ces enzymes améliorent l'extraction du jus et la capacité de pressage de la pulpe, évitant ainsi la flocculation pectine-protéine. Elles sont aussi utilisées dans le raffinage des fibres végétales pour la fabrication de l'amidon, le séchage du café, du cacao et du tabac, ainsi que la mise en conserve des segments d'orange (*Shrestha et al., 2021*).

## **6.4. Formulation cosmétique**

L'industrie cosmétique intègre les pectinases dans ses formulations pour répondre aux besoins croissants des consommateurs, notamment face aux effets des polluants environnementaux et des modes de vie modernes sur la peau. Grâce à leurs propriétés émulsifiantes, gélifiantes, antioxydantes et anti-âge, ces enzymes sont utilisées dans les produits de soins de la peau (*Satapathy et al., 2020*).

## **6.5. Traitement du textile**

Dans l'industrie du textile la pectinase est combinée à d'autres enzymes (amylase, lipase, cellulase, hémicellulase) pour éliminer les agents de la dernière étape du coton. Son utilisation remplace des produits chimiques agressifs, réduisant ainsi les déchets toxiques et améliorant la qualité des tissus tout en créant de meilleures conditions de travail pour les ouvriers du secteur (*Haile et Ayele., 2022*).

## **6.6. Fermentation du café et du thé**

Les pectinases interviennent dans la fermentation du café et du thé pour améliorer la qualité des boissons. Dans le thé, elles permettent de réduire la formation de mousse causée par la présence de pectines, améliorant ainsi la couleur et la clarté du produit final. Pour le café, elles facilitent le retrait du mucilage visqueux entourant les grains, ce qui optimise la fermentation et la qualité du café (*Haile et Ayele., 2022*).

## **6.7. Production de bioéthanol**

Les pectinases jouent un rôle clé dans la production de bioéthanol en dégradant la pectine des parois cellulaires végétales pour libérer la cellulose et l'hémicellulose. Ces composants sont ensuite transformés en sucres fermentescibles, utilisés par des levures pour produire de l'éthanol. Les déchets agricoles, comme les épluchures d'agrumes et le marc de pomme, sont ainsi prétraités avant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation (*Danúbia et al., 2023*).

## **Matériel et Méthodes**

Ce travail mené au sein du Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (UFMC1) vise à caractériser une pectinase produite par *Aspergillus niger*, en conditions de fermentation solide. L'étude porte sur la caractérisation des propriétés catalytiques et thermodynamiques de l'enzyme, dans le but de déterminer son aptitude à être utilisée comme biocatalyseur dans des procédés industriels nécessitant une stabilité thermique.

## **1. Réactivation de la souche fongique *Aspergillus niger***

La souche fongique est réactivée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**Annexe 1**). À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, un fragment de la souche est transféré aseptiquement au centre de boîtes de Pétri contenant le milieu. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 4 jours afin de permettre le développement du mycélium.

## **2. Production des enzymes pectinolytiques**

### **2.1. Son de blé substrat de fermentation**

Le son de blé est un déchet agricole riche en pectine, réduisant ainsi le besoin des composants chimiques coûteux dans la composition du milieu (**Begum et Munjam., 2021**). Dans cette étude est le son de blé, fourni par le Groupe des Moulins Sidi Rachad (Unité n°312, Hamma Bouziane). Afin de préserver ses propriétés physico-chimiques le substrat est conservé dans des boîtes en métal hermétiquement fermé à température ambiante.

### **2.2. Préparation de l'inoculum**

La souche fongique est réactivée sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) et incubée à 30 °C pendant 5 à 7 jours, jusqu'à obtention d'une sporulation abondante recouvrant l'ensemble de la surface de l'rlenmeyer. Les spores ont récoltées en ajoutant 40 mL d'eau distillée stérile sur la surface du milieu, suivie d'un léger grattage à l'aide d'une anse en platine stérile. La suspension obtenue est homogénéisée par agitation douce. La concentration sporale est déterminée par comptage au microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma, et ajustée à la concentration souhaitée pour l'inoculation, généralement exprimée en spores/ml.

### **2.3. Comptage cellulaire**

Le dénombrement des spores est effectué par microscopie optique à un grossissement de 40 $\times$ , à l'aide d'une cellule de numération de type Thoma. Une aliquote homogène de la suspension sporale est prélevée et introduite dans la chambre de comptage, puis les spores ont quantifiées dans les carrés délimités. La concentration sporale (spores/mL) est calculée en appliquant la formule standard tenant compte du facteur de dilution et du volume défini par la grille de la cellule.

## **3. Fermentation**

Les fermentations en milieu solide (FMS) ont conduites dans des erlenmeyer de 500 ml. Chaque erlenmeyer contenait 10 g de son de blé humidifié à une teneur en eau de 60 % (m/m) avec de l'eau distillée. Après inoculation avec l'inoculum fongique, le substrat est homogénéisé par agitation manuelle à l'aide d'une baguette de verre stérile. Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé enveloppé avec du papier d'aluminium, assurant une protection contre les contaminations tout en permettant les échanges gazeux nécessaires à la croissance. Et stérilisés à 120 °C pendant 20 minutes, les cultures sont ensuite incubées à 45 °C pendant 4 jours.

## **4. Extraction enzymatique**

À l'issue de la fermentation, 10 g de substrat fermenté sont homogénéisés dans 100 mL d'une solution aqueuse de Tween 80 à 0,02 %. Le mélange est soumis à une agitation mécanique durant 3 minutes, puis centrifugé à 5000 tr/min pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu, correspondant à l'extrait enzymatique brut, est collecté et conservé à -20 °C en vue de l'évaluation des activités pectinolytique.

## **5. Méthodes de dosage**

### **5.1. Dosage de l'activité de la PGs**

La détermination de l'activité de la polygalacturonase s'effectue de la manière suivante :  
Extrait enzymatique brut.....100ul

Pectine à 0.1%, tampon acétate de sodium 50 mM pH 5.....100ul

Incubé au bain marie à 40 °C pendant 20 min.

On stoppe la réaction en ajoutant 400 µl de DNS (**Annexe 2**). Le mélange est par la suite chauffé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100 °C afin de favoriser le développement de la couleur et puis, au refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 4,4 ml d'eau distillée.

L'absorbance est mesurée à 540 nm en utilisant le blanc dans les mêmes conditions, mais l'extrait brut est remplacé par un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5 à l'aide d'un spectrophotomètre. Chaque dosage est réalisé en triple.

- L'activité enzymatique est calculée en UI/g(Substrat) :

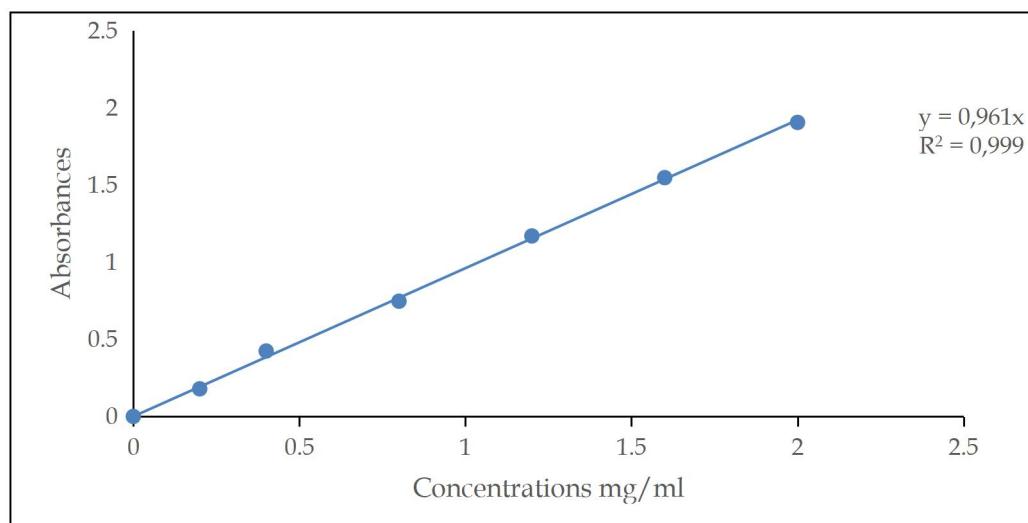
$$\text{Activité enzymatique UI/substrat} = \frac{\text{Activité } UI/mg * \text{Volume d'extraction}}{\text{Matière sèche}}$$

- L'activité spécifique est calculée en UI/mg :

$$\text{Activité spécifique UI/mg} = \frac{\text{Activité total } UI/g (\text{substrat})}{\text{Masse de protéine mg/ml}}$$

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{Activité enzymatique de l'extrait purifié (UI)}}{\text{Activité enzymatique de l'extrait brut (UI)}} * 100$$

$$P^o = \frac{\text{Activité spécifique de l'extrait purifié (UI/mg)}}{\text{Activité spécifique de l'extrait brut (UI/mg)}}$$



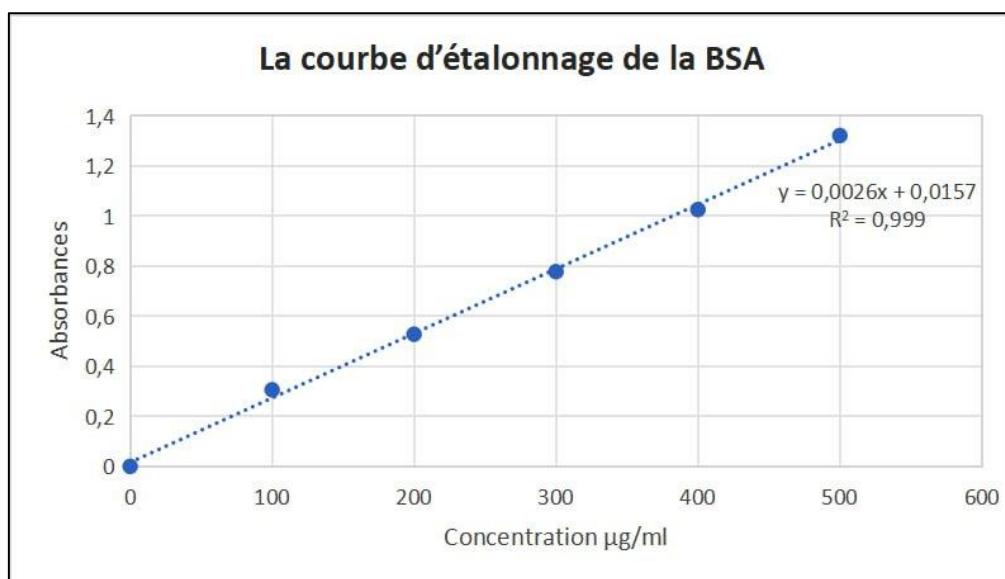
**Figure 8:** Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique

## 5.2. Dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de (*Lowry et al., 1951*). Le principe de la détermination des protéines repose sur les résultats de deux réactions :

La première est la réponse au test du Biuret pour améliorer la sensibilité de détection, où la présence de sulfate de cuivre dans un milieu alcalin entraîne la création d'un complexe entre les ions cuivre et la liaison peptidique dans la protéine. La seconde méthode implique une réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu, qui interagit avec les acides aminés aromatiques, tyrosine et tryptophane, présents dans les protéines. Ce réactif se réduit en un complexe bleu-violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration d'acides aminés dans le milieu et qui peut être mesuré entre 650 et 750 nm.

Suite au dosage, le taux de protéine se calcule en se basant sur une courbe d'étalonnage créée à partir d'une solution standard d'Albumine Sérique Bovine (BSA) à 500 µg/ml. Chaque test est réalisé en triple.



**Figure 9 :** Courbe d'étalonnage de la BSA

## **6. Purification partielle de l'enzyme pectinolytique PGs**

La purification partielle des enzymes est une étape essentielle en biochimie. Elle consiste à isoler et concentrer une enzyme spécifique à partir d'un mélange complexe.

- **Préparation de l'extrait brut**

Après une incubation de 96 h à 30 °C, la séparation des cellules se fait par centrifugation. Le surnageant représente l'extrait enzymatique non purifié.

### **6.1. Précipitation par l'éthanol**

Une purification partielle de l'extrait brut est réalisée par précipitation à l'éthanol (97 %), conservé à -20 °C afin de préserver ses propriétés dénaturantes et d'assurer une précipitation efficace des protéines. Trois volumes d'éthanol froid sont ajoutés lentement à 10 mL de l'extrait brut sous agitation douce afin d'éviter la formation de grumeaux et d'assurer une homogénéisation optimale. Le mélange a ensuite été incubé à 4 °C pendant 16 à 18 heures (une nuit complète) pour permettre une précipitation selective des enzymes tout en minimisant la dénaturation excessive des protéines d'intérêt. Cette étape permet de concentrer l'activité enzymatique en éliminant une partie des protéines solubles non précipitées et autres contaminants. La suspension est ensuite centrifugée à 5000 tours par minute (environ  $3000 \times g$ ) pendant 15 minutes à 4 °C pour séparer le culot protéique du surnageant. Le culot recueilli, contenant les enzymes précipitées, est délicatement resuspendu dans 5 ml de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5, choisi pour ses propriétés tamponnantes compatibles avec la stabilité et l'activité optimale des enzymes ciblées. Cette solution a ensuite été homogénéisée par agitation douce pour assurer une dissolution complète, avant d'être conservée à 4 °C en attendant les analyses enzymatiques ultérieures.

## **7. Calcul des paramètres thermodynamiques lors de l'inactivation de PGs**

### **7.1. Effet de température sur l'activité et stabilité**

L'effet de la température sur l'activité de la PGs est évalué en incubant le mélange réactionnel contenant l'extrait enzymatique brut et purifié à différentes températures comprises entre 50 et 90 °C, pendant une durée de 20 minutes. Chaque expérience est réalisée

en triple afin d'assurer la fiabilité des données. L'activité enzymatique a ensuite été déterminée selon la méthode de *Miller G.L. (1959)* décrite par *Hande et Canan. (2016)*.

La thermostabilité de la polygalacturonase purifiée est évaluée en déterminant l'activité enzymatique résiduelle après incubation à 55 °C et 85 °C pendant des durées de 30, 60, 90, 120 et 150 minutes.

## 7.2. Cinétique de l'inactivation thermique

La cinétique d'inactivation thermique de la polygalacturonase purifiée est étudiée en incubant les échantillons enzymatiques à 70, 75, 80 et 85 °C pendant 10, 15, 30, 60 et 90 minutes. Les constantes de vitesse d'inactivation thermique ( $k_d$ ) sont obtenues à partir des pentes des courbes semi-logarithmiques représentant l'activité résiduelle en fonction du temps. Les demi-vies apparentes ( $t_{1/2}$ ), correspondant au temps nécessaire pour que l'activité enzymatique diminue de moitié, sont calculées selon la relation :  $t_{1/2} = (\ln 2) / k_d$ .

## 7.3. Estimation des paramètres thermodynamiques lors de l'inactivation de PGs

L'étude des paramètres thermodynamiques de l'inactivation des PGs est réalisée en utilisant les équations suivantes :

L'enthalpie d'inactivation  $\Delta H^*$ , représentant la variation d'enthalpie du système, est calculée selon l'équation : 
$$\Delta H^* = Ed - RT$$

où  $Ed$  est l'énergie d'activation,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température absolue.

L'énergie libre de Gibbs d'inactivation  $\Delta G^*$ , indicateur de la spontanéité de la réaction, est déterminée à partir de la constante de vitesse du processus d'inactivation, en utilisant l'équation : 
$$\Delta G^* = -RT \ln(kdh/kT)$$

où  $k_d$  est la constante de vitesse, la constante de Planck et  $kappa$  la constante de Boltzmann.

Enfin, l'entropie d'inactivation  $\Delta S^*$ , mesurant le désordre du système, est calculée à partir de la relation : 
$$\Delta S^* = (\Delta H^* - \Delta G^*) / T$$
.

Ces calculs ont permis d'évaluer les propriétés thermodynamiques de l'inactivation des PGs en fonction de la température.

### **7.1. Détermination des paramètres cinétiques**

L'activité enzymatique de la PGs est mesurée en utilisant différentes concentrations (0,05 %, 1 %, 1,5 %, 2 % et 2,5 %) et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité maximale.

---

## Résultats et Discussion

L'ensemble de l'étude est conduit en suivant un protocole intégré de production, d'optimisation et de purification partielle de l'extrait enzymatique, élaboré sur la base des travaux antérieurs réalisés par **Benkadia et Benyouunes (2023)** dans le cadre de leur mémoire de master (encadré par **Dr. Bennamoun**).

## **8. Purification de la PGs**

La purification des enzymes constitue une étape essentielle pour l'étude de leurs propriétés biochimiques et pour leur éventuelle application industrielle. Parmi les méthodes classiques de purification, la précipitation par l'éthanol est une technique simple, économique et efficace, largement utilisée pour concentrer et partiellement purifier les protéines à partir d'extraits bruts.

**Tableau 5:** Précipitation d'extrait brut de la PGs

Extrait	A. PGs totale (UI/ml)	Protéines totales (mg)	A. Spécifique (UI/mg)	R° (%)	P°
Brut	1,8	101	0,0178	100	1
Précipitation par l'éthanol	0,86	2,068	0,415	47,77	23,31

L'éthanol (1v/3v), est utilisé comme solvant de précipitation en raison de sa capacité à induire une agrégation différentielle des protéines par réduction de la solubilité hydrophile, favorisant ainsi la concentration des formes actives de la PGs. Ce choix repose sur les résultats antérieurs.

## **9. Effet de la température sur l'activité enzymatique de la PGs**

L'effet de la température sur l'activité catalytique de la polygalacturonase (PGs) est étudié dans un intervalle allant de 50 °C à 90 °C. Les résultats obtenus (**Figure 10a**) indiquent que l'activité maximale est atteinte à 65 °C, ce qui suggère une bonne adaptation thermique de l'enzyme à des conditions modérément élevées, compatibles avec les exigences de nombreux procédés biotechnologiques.

La température optimale d'activité des pectinases fongiques est étroitement liée à l'origine taxonomique de la souche productrice ainsi qu'à son environnement écologique. Ainsi, la PGs produite par la souche mésophile *Penicillium janczewskii* présente un optimum catalytique à 45 °C (**Amin et al., 2020**), tandis que deux isoformes purifiées d'*Aureobasidium pullulans*, PGs1 et PGs2, présentent des températures optimales respectives de 65 °C et 75 °C (**Bennamoun, 2017**). Par ailleurs, la PGs extraite de *Aspergillus sojae* affiche une activité maximale à 55 °C (**Tari et al., 2008**).

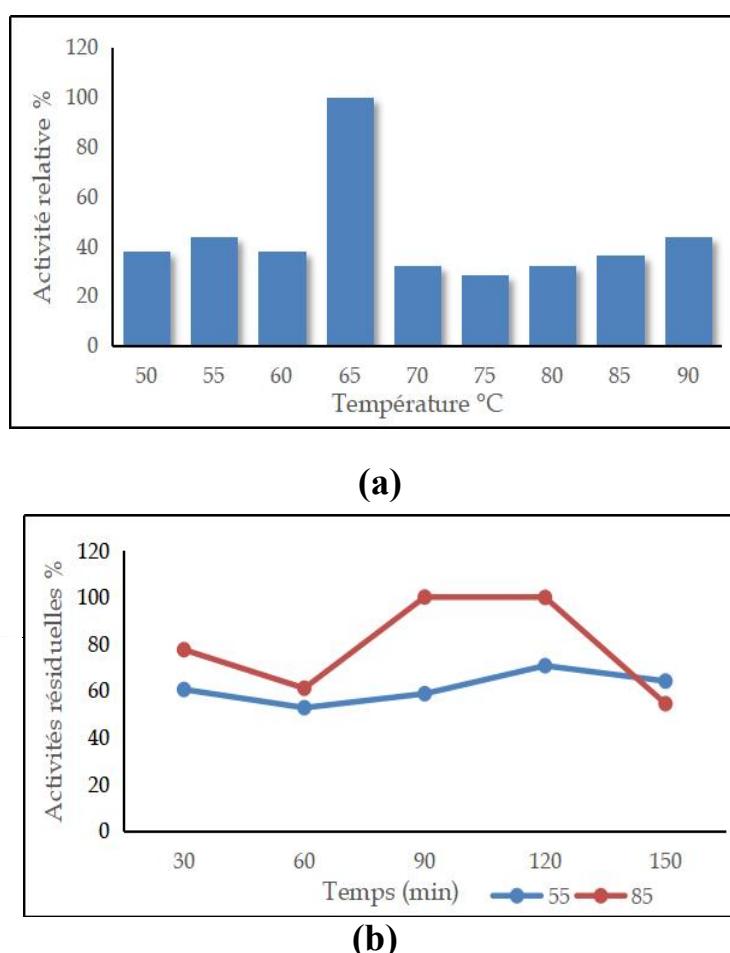
Ces différences reflètent l'adaptation thermique des souches productrices. Cette variabilité confère aux PGs un fort potentiel biotechnologique. Elle permet de choisir des enzymes adaptées à des conditions spécifiques. Cela est essentiel pour les bioprocédés agro-industriels, où la stabilité à certaines températures est un critère clé.

## **10. Thermostabilité de la PGs**

La thermostabilité de la polygalacturonase (PGs) purifiée a été évaluée en suivant l'activité résiduelle après incubation à 55 °C et 85 °C sur des périodes de 30, 60, 90, 120 et 150 minutes (**Figure 10b**).

- À 55 °C, l'enzyme conserve plus de 80 % de son activité après 60 minutes d'incubation. Cette résistance thermique prolongée témoigne d'un entonnoir de repliement énergétique profond, dans lequel les interactions ioniques et les forces hydrophobes forment une barrière élevée contre la dénaturation. Au-delà de 120 min, la protéine subit une dénaturation irréversible, les domaines globulaires s'effondrent, les chaînes latérales se réorganisent de manière désordonnée, et des agrégats insolubles se forment, empêchant toute restauration de la conformation native (**Yon-Kahn et al., 2019**). Cette stabilité thermique dépasse largement celle observée pour la PGs de *Penicillium janczewskii*, qui perd plus de 40 % de son activité en seulement 30 minutes à 60 °C (**Amin et al., 2020**).
- À 85 °C, l'enzyme subit une perte rapide d'activité durant les 30 premières minutes, vraisemblablement due à la rupture partielle des liaisons hydrogène et à la désorganisation du cœur hydrophobe, qui est crucial pour la stabilité du site catalytique. Au-delà de ce stade, une réactivation partielle est observée, suggérant que certaines molécules partiellement dépliées peuvent temporairement reformer leurs structures secondaires, permettant ainsi une restauration partielle du site actif (**Yon-Kahn et al., 2019**).

Ce phénomène de réactivation partielle peut s'expliquer par la présence, dans l'extrait enzymatique, de petites quantités de protéines appelées chaperonnes. Ces protéines aident naturellement les enzymes à se replier correctement après un stress thermique. Elles empêchent les enzymes de s'agglutiner entre elles et favorisent le retour à leur forme active en séparant les structures mal formées. Ainsi, même après purification, ces chaperonnes peuvent contribuer à stabiliser la PGs et à maintenir son activité pendant les tests thermiques (**Yon-Kahn et al., 2019**). Au-delà de 120 min, une diminution de l'activité observé suggère une dénaturation irréversible.

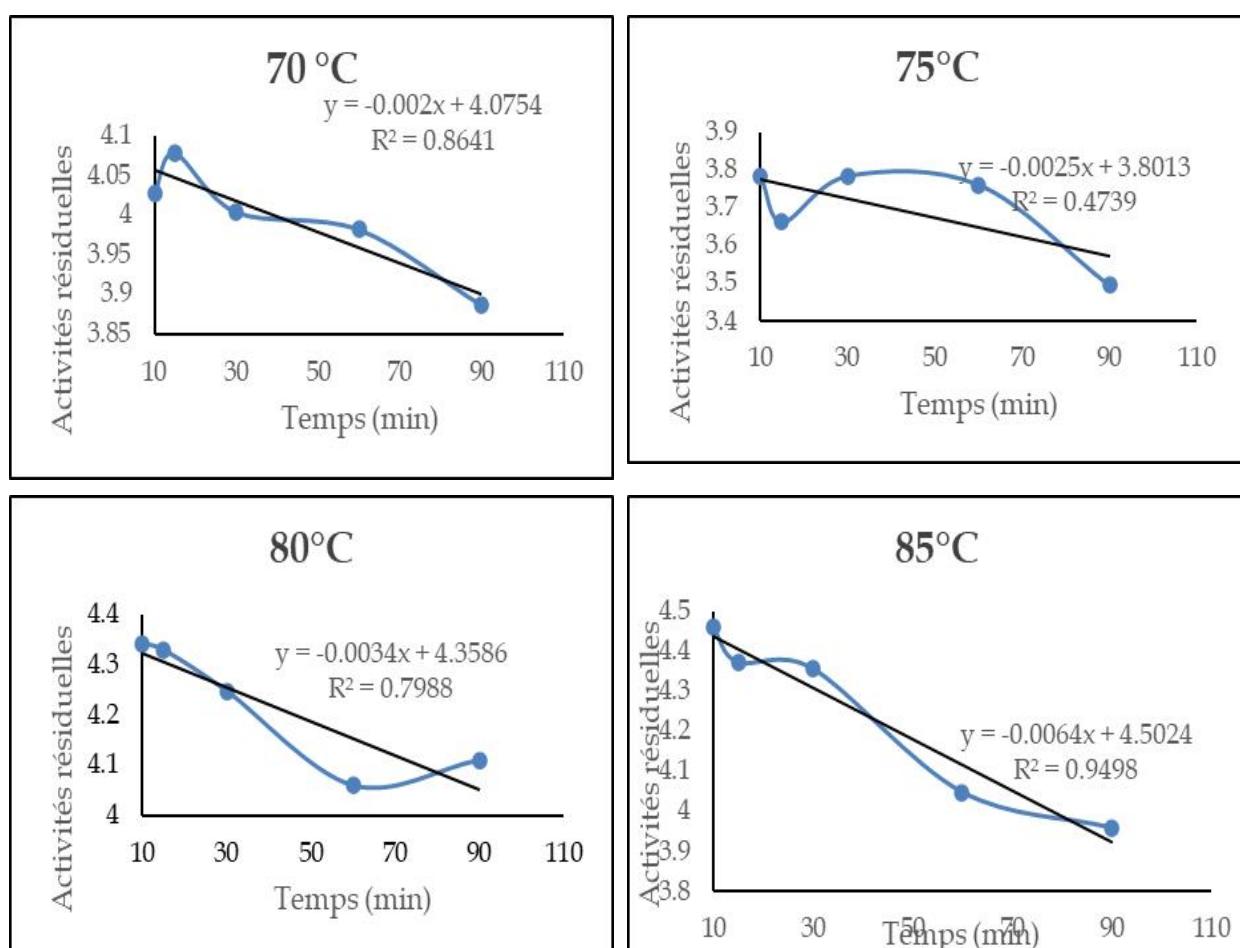


**Figure 10 :** (a) Effet de la température sur la PGs, (b) la stabilité de l'activité résiduelle de la PGs en fonction de temps.

## 11. Cinétique d'inactivation thermique et énergie d'inactivation

L'inactivation enzymatique résulte de modifications des structures secondaire, tertiaire ou quaternaire sans rupture des liaisons covalentes. Ce phénomène est principalement lié à la dénaturation thermique, qui perturbe les interactions non covalentes telles que les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, essentielles à la stabilité de la conformation native de l'enzyme (*Naidu et Panda, 2003*).

Dans cette étude , la thermostabilité de la PGs purifiée d'*Aspergillus niger* thermophile a été caractérisée par le calcul des constantes cinétiques d'inactivation  $k_d$  à des températures comprises entre 70 et 85 °C. Ces constantes, extraites des pentes des courbes de décroissance enzymatique (Figure 11).



**Figure 11 :** Courbes de l'activité résiduelle (%) en fonction du temps (min) pour l'inactivation thermique de la PGs d'*Aspergillus niger* à différentes Températures 70, 75, 80, 85°C.

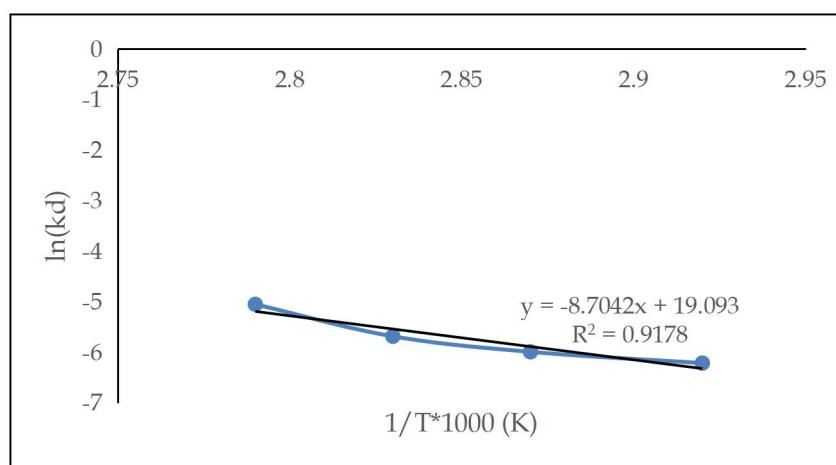
## Résultats et Discussion

Ils augmentent significativement avec la température, passant de 0,002 à 0,0064 min<sup>-1</sup>, tandis que les demi-vies enzymatiques diminuent de 346,57 à 108,30 minutes (**Tableau 6**). Ces données traduisent une perte progressive d'activité liée à une dénaturation irréversible.

**Tableau 6 :** Les paramètres cinétiques d'activation de la PGs de l'*Aspergillus niger*.

T (°C)	kd (min <sup>-1</sup> )	t½ (min)
70	0,002	346,57
75	0,0025	277,26
80	0,0034	203,87
85	0,0064	108,30

L'énergie d'activation Ea de cette dénaturation thermique, estimée à 72,331 kJ·mol<sup>-1</sup> (**Figure 12**), est inférieure à celle rapportée pour la PGs d'*Aspergillus sojae* (152 kJ·mol<sup>-1</sup>) (*Tari et al., 2008*). Cette valeur relativement modérée reflète la présence d'interactions intramoléculaires solides, notamment des réseaux étendus de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, conférant à l'enzyme une robustesse structurale notable, indispensable pour son usage dans des bioprocédés soumis à des contraintes thermiques élevées.



**Figure 12 :** Tracé d'Arrhenius de ln(kd) en fonction de 1/T pour l'inactivation thermique de la PGs d'*Aspergillus niger*.

## 12. Calcul des paramètres thermodynamiques d'inactivation

Les paramètres thermodynamiques d'activation de la PG d'*Aspergillus niger* sont détaillés dans le (**Tableau 07**), offrent une vue approfondie sur la stabilité de l'enzyme.

- L'enthalpie d'activation  $\Delta H^*$  reste constante à  $69 \text{ kJ mol}^{-1}$  sur la plage de températures étudiée (343–358 K), indiquant que l'énergie nécessaire pour briser les interactions non covalentes est stable. En comparaison, l'étude de **Tari et al. (2008)** rapporte également une constance de  $\Delta H^*$  dans cette plage de température, mais avec une valeur nettement plus élevée, atteignant  $148 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Cette différence notable pourrait refléter une structure enzymatique différente.
- L'énergie libre de Gibbs  $\Delta G^*$  augmente légèrement de  $102,12 \text{ kJ mol}^{-1}$  à  $103,28 \text{ kJ mol}^{-1}$  avec l'élévation de la température (de  $70^\circ\text{C}$  à  $85^\circ\text{C}$ ). Les résultats rapportés par **Tari et al. (2008)** montrent une diminution de  $\Delta G^*$  dans les mêmes conditions. Nos résultats suggèrent qu'une activation thermodynamiquement défavorable. Cette augmentation modeste indique que l'énergie requise pour atteindre l'état de transition de l'inactivation croît avec la température, ce qui soutient la capacité de l'enzyme à maintenir une activité prolongée, notamment au-delà de  $80^\circ\text{C}$  où elle conserve plus de 50 % d'activité après 150 minutes. Cette propriété est cohérente avec les caractéristiques des enzymes thermophiles, où une  $\Delta G^*$  élevée contribue à une stabilité structurale (**Vieille et Zeikus, 2001**).
- L'entropie d'activation  $\Delta S^*$  varie de  $-96,57 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  à  $-95,75 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , restant négative. Cela signifie que le passage à l'état de transition vers la forme inactive se fait avec une perte d'entropie, donc vers un état plus ordonné. À l'inverse, une  $\Delta S^*$  positive, comme celle observée pour la PGs d'*Aspergillus sojae*, suggère une augmentation du désordre (**Tari et al., 2008**). Cette situation est cohérente avec le modèle de l'entonnoir énergétique du repliement des protéines (**Yon-Kahn et al., 2019**).

Selon ce modèle, la protéine atteint progressivement son état natif en suivant un chemin énergétique descendant, tout en évitant les pièges de mauvais repliement. Ainsi, à  $85^\circ\text{C}$ , l'enzyme peut subir des réarrangements partiels sans basculer immédiatement vers une dénaturation irréversible. Cela explique la résistance temporaire observée et la conservation partielle de l'activité catalytique à cette température.

**Tableau 7 :** Les paramètres thermodynamiques d'inactivation de la PGs de l'*Aspergillus niger*

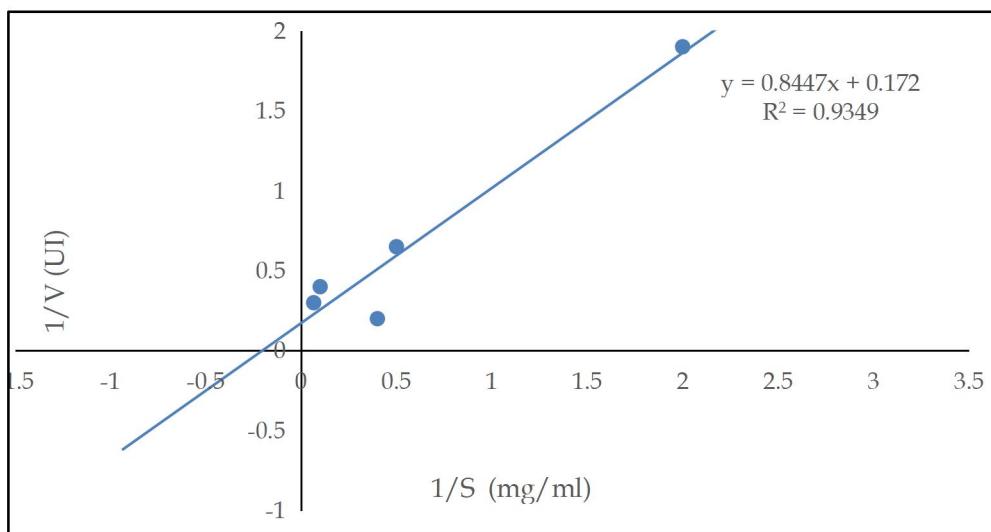
T (K)	$\Delta H^*$ (kJ mol $^{-1}$ )	$\Delta G^*$ (kJ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^*$ (J mol $^{-1}$ K $^{-1}$ )
343	69	102,12	-96,57
348	69	103,049	-97,84
353	69	103,98	-99,09
358	69	103,28	-95,75

### 13. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique de l'enzyme purifiée (PGs) est étudiée en incubant l'enzyme à 40 °C pendant 20 minutes avec différentes concentrations de pectine (0,05 %, 1 %, 1,5 %, 2 % et 2,5 %). La vitesse de réaction mesurée a montré une augmentation progressive avec la concentration en substrat, jusqu'à atteindre un plateau, conforme au modèle classique de Michaelis-Menten.

L'analyse des données par la représentation de Lineweaver-Burk (**Figure 14**) a permis de déterminer les paramètres cinétiques suivants : une constante de Michaelis Km de 4,9 mg/ml, traduisant une affinité modérée de l'enzyme pour la pectine, et une vitesse maximale Vmax de 5,81 UI.

Ces résultats indiquent que la PGs étudiée possède une activité catalytique élevée et une affinité suffisante pour son substrat, ce qui en fait un candidat prometteur pour des applications biotechnologiques impliquant la dégradation de la pectine.



**Figure 14 :** Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la PGs par l'*Aspergillus niger*.

La température constitue un paramètre fondamental influençant le comportement des systèmes biologiques et physico-chimiques, en particulier dans les processus impliquant des réactions enzymatiques. Elle affecte directement la cinétique des réactions, en modifiant la vitesse et l'efficacité des transformations biochimiques. Chaque application industrielle nécessite des conditions thermiques spécifiques afin d'optimiser l'activité enzymatique, notamment pour les PGs, couramment utilisées dans divers secteurs.

Dans l'industrie agroalimentaire, les PGs sont utilisées pour la clarification des jus, avec une activité optimale observée entre 50 et 60°C. Le traitement du jus de pomme, en particulier, est généralement réalisé à une température de 55°C (**Soares., 2005**).

Dans l'industrie du café, une activité enzymatique optimale est rapportée entre 40 et 45 °C (**Murthy et Naidu., 2012**). En ce qui concerne l'industrie textile, les PGs doivent présenter une stabilité thermique accrue, avec une activité maintenue à des températures comprises entre 60 et 70 °C. À l'inverse, l'industrie cosmétique exploite des enzymes actives à des températures plus modérées, typiquement entre 35 et 40 °C (**Sharma et al., 2020**).

Dans le cadre du traitement des déchets végétaux, les PGs doivent être thermostables à des températures supérieures à 60 °C pour garantir une dégradation efficace de la matière organique (**Kumar et al., 2017**).

---

## *Résultats et Discussion*

Ainsi, quelle que soit l'application considérée, la température ne peut être réduite à un simple paramètre environnemental, elle représente un facteur déterminant, influençant de manière significative l'activité, la stabilité et les performances des enzymes impliquées.

# Conclusion

Cette étude porte sur la production et la caractérisation partielle d'une polygalacturonase (PGs) produite par la souche fongique *Aspergillus niger*, cultivée par fermentation en milieu solide (FMS) en utilisant le son de blé comme substrat. Les conditions optimales de production correspondent à un inoculum de  $1 \times 10^7$  spores/mL, une humidité de 60 %, une température de 45 °C et une durée d'incubation de 96 heures. Dans ces conditions, l'enzyme présente une activité pectinolytique de 1,961 UI/mL et une concentration protéique de 1,118 µg/mL.

L'enzyme a fait l'objet d'une purification partielle par précipitation éthanolique, suivie d'une caractérisation biochimique et thermodynamique. La PGs a une température optimale de 65 °C, conserve 90 % de son activité initiale après une incubation d'une heure à 70 °C. L'énergie d'inactivation thermique  $E_d$  est calculée à  $72,331 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , et les demi-vies de l'enzyme s'échelonnent de 346,57 min à 70 °C à 108,30 min à 85 °C, ce qui témoigne d'une bonne thermostabilité.

L'étude cinétique, avec la pectine comme substrat, révèle une constante de Michaelis-Menten  $K_m$  de 4,9 mM et une vitesse maximale  $V_{max}$  de  $5,81 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , traduisant une affinité modérée pour le substrat et une activité catalytique satisfaisante. Les paramètres thermodynamiques de dénaturation, à savoir l'enthalpie, l'énergie libre et l'entropie d'activation, confirment la robustesse de l'enzyme en conditions thermiques élevées.

L'ensemble de ces résultats positionne la polygalacturonase produite par *Aspergillus niger* comme un biocatalyseur potentiellement exploitable dans des procédés industriels exigeants, notamment dans les secteurs de l'agroalimentaire, du traitement des effluents, ainsi que dans les industries papetières et textiles.

Dans le prolongement de cette étude, plusieurs axes de recherche méritent d'être envisagés afin d'approfondir les connaissances acquises et d'optimiser l'exploitation de cette enzyme à l'échelle industrielle:

- Elaboration d'un protocole de purification intégrale en vue d'analyses structurales avancées (exp: spectroscopie, cristallographie).
- Evaluation comparative de l'activité enzymatique sur une gamme élargie de substrats pectiques, en vue d'identifier de nouvelles potentialités applicatives.

---

## **Annexes**

## Annexe 1 : Biomasse

Nous avons segmenté l'rlenmeyer réservé pour le calcul de la biomasse sur trois boîtes de Pétri et avons pesé la masse. Ensuite, après un séchage de 4 jours, nous avons procédé à une nouvelle pesée.

**Tableau 8:** Résultats de la biomasse

La boîte de petri	Boîte 1	Boîte 2	Boîte 3
La masse avant séchage	2.0266g	2.446g	4.112g
La masse après séchage	1.552g	2.029g	3.695g

## Annexe 2: Courbe étalon de l'acide galacturonique

### Préparation de solution mère :

On a pesé 0.1 g de l'acide galacturonique, dans un bécher ensuite ajouté une quantité de l'eau distillée. On a laissé la solution sous l'agitateur magnétique jusqu'à soit dissous. Puis transférer la solution dans un fiole et compléter le volume final à 50 ml avec de l'eau distillée.

**Tableau 9:** Protocole de Courbe étalon de l'acide galacturonique

	Blanc	1	2	3	4	5	6
<b>Concentration</b>	0 mg/ml	0.2mg/ml	0.4mg/ml	0.8mg/ml	1.2mg/ml	1.6mg/ml	2mg/ml
<b>E.D (ml)</b>	1000	900	800	600	400	200	0
<b>S.M (ul)</b>	0	100	200	400	600	800	1000
<b>DNS (ul)</b>	400	400	400	400	400	400	400
Incubation à 100 °C pendant 10 min							
Refroidissement avec bain glaçon							
<b>E.D (ml)</b>	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Lecture de l'absorbance à 540 nm							

### Annexe 3: Courbe étalon des protéines

#### Préparation des réactifs

**Réactif A :** carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0.1 N.

**Réactif B :** tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée.

**Réactif C:** sulfate de cuivre , $5\text{H}_2\text{O}$  à 1% (w/v) dans l'eau distillée.

**Réactif D :** 0.5ml de C + 0.5ml de B + 50ml de A. ce mélange doit être préparé juste avant l'utilisation.

**Réactif E :** réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 au moment de l'emploi.

Concentration des dilutions (mg/ml)	0	100	200	300	400	500
Solution mère de BSA (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Solution M (ml)	5	5	5	5	5	5
Agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante						
Réactif dilué au 1/3 <sup>ème</sup> (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

-Agiter immédiatement chaque tube.

-Laisser la coloration se développer 30 min à l'obscurité.

-Lire l'absorbance contre le blanc de la gamme à 650 nm.

#### **Annexe 4 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**

Extrait de pomme de terre.....	1000ml
Glucose.....	20g
Agar.....	20g

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

❖ Préparation de l'extrait pomme de terre

On lave et découpe en petites morceau 200 g de pommes de terre qui ne sont pas épluchées, dés ensuite mis dans 700 ml d'eau distillée puis portés à l'ébullition pendant 20 minutes.

❖ Préparation de milieu de culture

Dans l'extrait, le glucose et l'agar sont dissous à chaud, puis on complète avec de l'eau distillée pour atteindre un litre.

## Annexe 5 : Préparation des solutions tampon

### ❖ Solution tampon acétate de sodium 50 mM, pH=5

Acétate de sodium.....	2,05g	3.2
Acide acétique.....	1,45ml	4.2
Eau distillée.....	1 L	

#### ➤ Préparation de solution Acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )

Nous avons pesé 2,05 g d'acétate de sodium, que nous avons ensuite ajouté à un bêcher contenant approximativement 300 ml d'eau distillée.

Nous avons laissé la solution sous l'agitateur magnétique jusqu'à ce que l'acétate de sodium soit entièrement dissous.

Une fois l'acétate de sodium dissous, transférer la solution dans un fiole volumétrique de 500 ml et compléter le volume final à 500 ml avec de l'eau distillée.

#### ➤ Préparation de solution Acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

On a prendre 1.45 ml d'**Acide** acétique dans un bêcher ensuite ajouté une quantité de l'eau distillée. Nous avons laissé la solution sous l'agitateur magnétique jusqu'à ce qu'**Acide** acétique soit complètement mélangé.

Une fois l'acide acétique bien mélangé, transférer la solution dans un fiole volumétrique de 500 ml et compléter le volume final à 500 ml avec de l'eau distillée.

Vérifiez le pH des solutions. Si nécessaire, ajustez légèrement le pH avec de l'acide acétique ou de l'acétate de sodium, mais cela ne devrait pas être nécessaire si vous suivez correctement les volumes.

### ❖ Préparation de NaOH (2N)

NaOH.....	8g
-----------	----

Eau distillée.....	100m
--------------------	------

Nous avons pesé 8 g de Na OH, dans un bêcher ensuite ajouté une quantité de l'eau distillée. On a laissé la solution sous l'agitateur magnétique jusqu'à ce que Na OH soit dissous.

Une fois Na OH dissous, transférer la solution dans un fiole volumétrique de 500 ml et compléter le volume final à 500 ml avec de l'eau distillée.

### ❖ Préparation de Réactif de DNS

NaOH.....	20ml
Tartrate double Na, K.....	30g
Eau distillée.....	100ml

Dans un bécher on ajoute 1g DNS ,20 ml de NaOH (2N) et 50 ml de l'eau distillée sous l'agitateur magnétique avec chaleur jusqu'à soit dissous.

Une fois le mélange dissous on a ajouté 30g de tartrate double Na, K lentement.

Après ce la transférer la solution dans un fiole volumétrique de 100 ml et compléter le volume final à 100 ml avec de l'eau distillée et à la fin on a filtré dans un flacon.

#### ❖ Préparation de Tween 80 (0,02%)

Tween.....0.13g

Eau distillée.....650ml

Nous avons pesé 0.13 g de Tween, dans un bécher ensuite ajouté une quantité de l'eau distillée. On a laissé la solution sous l'agitateur magnétique jusqu'à soit dissous.

Puis transférer la solution dans un fiole et compléter le volume final à 650 ml avec de l'eau distillée.

# Références Bibliographiques

- **Amin, F., Mohsin, A., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2020).** Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1886(5), 140379. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140379>
- **Begum, G., Munjam, S.(2021).** *Carbon and Nitrogen Sources Effect on Pectinase Synthesis by Aspergillus niger Under Submerged Fermentation*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(1), <https://dx.doi.org/10.13005/bbra/2906>
- **Bennamoun, L. (2017).** Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens productrices de polygalacturonase: Purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat , Université Frères Mentouri Constantine.
- **Bonnin e (2014).** Kinetics and thermodynamics of pectin hydrolysis by polygalacturonase. *Carbohydr. Res.*, 386, 1-6.
- **Colombo LT, Rosa JC, Bragança CR, Ignacchiti RP, Alvim MC, Silveira WB, de Queiroz MV, Bazzolli DM, Passos FM.(2014).** Construction of a *Kluyveromyces lactis* ku80<sup>-</sup> host strain for recombinant protein production: extracellular secretion of pectin lyase and a streptavidin-pectin lyase chimera. *Mol Biotechnol.* 56(4):319-28.<https://doi.org/10.1007/s12033-013-9711-3>.
- **Cortesão, M., de Haas, A., Unterbusch, R., & Alves, E. (2020).** *Aspergillus niger* spores are highly resistant to space radiation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00873>
- **Gainvors, A., Frézier, V., Lemaresquier, H., Lequart, C., Aigle, M., & Belarbi, A. (1994).** Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 10(10), 1311–1319. <https://doi.org/10.1002/yea.320101008>
- **Goda DA ,Shalaby NH ,Soliman NA.(2024).**immprovement of *bacillus subtilis* PI agarase production ,hydrolysate scavenging capability assessment ,and saccharification of algal biomass for green ethanol generation. *Sci Rep*,14(1) :16417.<https://doi.org/10.1038/s41598-024-65736-4>.

- **Kanchan Y, Shruti D, Supriya G, Aiman T, Sangeeta Y, PramodK. Y, Gautam A, Dinesh Y.(2023).** Recent insights into microbial pectin lyases: A review. *process Biochemistry.* 134 :199-217.<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.10.008>
- **Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001).** Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *\*Bioresource Technology\*, \*77\*(3), 215–227.* [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
- **Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Balandrán-Quintana, R., López-Franco, Y., & Rascón-Chu, A. (2018).** Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules*, 23(4), 942. <https://doi.org/10.3390/molecules23040942>
- **Ling, Z., Yinxiao, X., Qian, L., & Benwei, Z. (2021).** Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. *Bioresources and Bioprocessing*, 8, 79. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00432-z>
- **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.*193: 265-275
- **Masson P, Lushchekina S (2022).** Conformational Stability and Denaturation Processes of Proteins Investigated by Electrophoresis under Extreme Conditions. *Molecules.* 13;27(20):6861.<https://doi.org/10.3390/molecules27206861>
- **Miller G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.
- **Moran, M. J., Howard N. S., Daisie D. B., Margaret B. B. (2018).** Fundamentals of Engineering Thermodynamics. Wiley.
- **Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012).** Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *\*Resources, Conservation and Recycling\*, \*66\*, 45–58.* <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- **Nour.E, Abdeslam. A, Sondes. M, Ismail .H, Sara. M, Meryem .I.Y, Fatima .B, Mohamed. T, Reda .B, Abdelkarim. A, Loubna. F, Ennouamane .S, Bassem .J. (2024).** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* strain HO32 and its suitability for clarification of orange juice. *Process Biochemistry*,145 : 63-735. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.06.013>.

- **Oduguwa OO, Edema MO, Ayeni AO.(2007).** Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. Bioresour Technol, (6):1816-20.<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.036>
- **Pedrolli DB, Gomes E, Monti R, Carmona EC.(2008).** Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. Appl Biochem Biotechnol. 144(2):191-200.<https://doi.org/10.1007/s12010-007-8059-1..>
- **Ropartz, D., & Ralet, M.-C. (2020).** Pectin structure. In J.-L. Doublier, K. Nishinari, & F. van de Velde (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (3rd ed., pp. 557–584). Elsevier.
- **Shet, A. R., Desai, S. V., & Achappa, S.(2018).** *PECTINOLYTIC ENZYMES: CLASSIFICATION, PRODUCTION, PURIFICATION AND APPLICATIONS*. Life Science Informatics Publications,<https://doi.org/10.26479/2018.0403.30>.
- **Singh R , Kumar A , Chopra N , Mahajan R, Kaur J.(2018).** Conserved cysteine variants of metagenomic derived polygalacturonase concurrently shift its optima at acidic pH and enhanced thermostability: structural and functional analysis. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics,37(1), 265-273. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1426045>.
- **Soares, M. M. C. N., da Silva, R., Gomes, E., & Carmona, E. C. (1999).** Production of pectinase by solid-state fermentation with \**Penicillium viridicatum*\* RFC3. \*Process Biochemistry\*, \*35\*(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00046-6)
- **Tari, C., Dogan, N., & Gogus, N. (2008).** Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. Food Chemistry, 111(4), 824-829.
- **YON-KAHN, J., HERVÉ, G., & POPOT, J.-L. (2019).** LA STRUCTURE DES PROTÉINES. EDP SCIENCES.118. Analytical Chemistry. 31: 426–428. Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. Biotechnology for Agro Biomass Valorization.
- **Birgitte Z, Thore B ach T , Mary Ann S , kristian B.R.M.K , Anne S . M ,Jesper H. (2020).** Comparative Characterization of *Aspergillus* Pectine lyases by discriminative substrate degradation profiling.frontiers inbioengineering andbiotechnology,8(8),3.<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00873>

- Carla , C.V.D ; Robson, C.A, Vanessa, E. P ;Mariana ,C : Carla, B.M, André, D, Marlei J. A ; Wellington ,P ; Roberto Nascimento ,S, :Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli.(2021).** Structural model and functional properties of an exo-polygalacturonase from *Neosartorya glabra*. International Journal of Biological Macromolecules.(186), 909-918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.065>.
- Caxias D.S ,R.S,Brazil .(2004).** Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*, Braz. arch. biol. Technol. 47 (5). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500004>.
- Claudia ,M ; Mads, H .C ; Jure, S ;Doriano ,L ;Cristiana ,C.(2007).** Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia*.Biochem J, 25;407(Pt 2):207–217.<https://doi.org/10.1042/BJ20061833>.
- Copeland (2000).** Enzymes:A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Wiley.
- Crott L . B, Jorge J.A, Terenzi H.F, M. Polizeli M.L.T.M. .(1996).** Purification and characterization of galactose-induced pectinases from the exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa*.progress in Biotechnologie,14 : 787-792. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80317-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80317-0).
- Demir H, Tari C.(2016).** Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. . J Sci Food Agric, 96(10):3575-82.<https://doi.org/10.1002/jsfa.7543>
- design using citrus waste and its immobilization for industrial exploitation. Waste and
- Faiza A, Arooj M, Haq .N.B , Muhammad B.(2020).** Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,1886 : 5. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140379>.
- Francis D, Estelle C.(2011).** Fermentation en milieu solide (FMS).
- Gainvors A, Frézier V, Lemaresquier H, Lequart C, Aigle M, Belarbi A. (1994).** Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast. ;10(10):1311-9.<https://doi.org/10.1002/yea.320101008>

- Gungor E, Altop A, Erener G.(2021).** Effect of Raw and Fermented Grape Pomace on the Growth Performance, Antioxidant Status, Intestinal Morphology, and Selected Bacterial Species in Broiler Chicks. *Animals (Basel)*. 11(2):364. <https://doi.org/10.3390/ani11020364>.
- Hadj Sassi A, Trigui-Lahiani H, Abdeljalil S, Gargouri A.(2016).** Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol*, 95:256-262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.036>.
- Haile S, Ayele A.(2022) .** Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *ScientificWorldJournal* , 2022:1881305.<https://doi.org/10.1155/2022/1881305>
- Hande, D ; Canan ,T.(2016).** Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation.sci,(96),3575-3582.<https://doi.org/10.1002/jsfa.7543>.
- Hussein MA ,el- aid AHM , Yassin AS .(2020).** Mycobiota associated with strawberry fruits,their mycology .11(2) :158-166.<https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1759719>.
- Industrial Residues Utilisation.
- Josip S, Wafae T, Vanessa U, Adrien L, Olivier H, Julie B, Maxime R, Aline V, Paula P, Solène B, Roland M, Jean-X. F, Serge P, Corinne Pau-R, Estelle B, Danaé S. L, Mélanie Morel-R, Jean-M.G, Valérie L, Fabien S, Davide M, Jérôme P.(2023).** Plant polygalacturonase structures specify enzyme dynamics and processivities to fine-tune cell wall pectins.*Plant cell*,35(8) : 3073–3091. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad134>.
- Kumar, V., Yadav, A. N., Verma, P., Sangwan, P., Saxena, A., & Dhaliwal, H. S. (2017).** Thermostable microbial pectinases: Sources, production and applications. \*World Journal of Microbiology and Biotechnology\*, \*33\*(11), 210. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2368-5> L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:165–172.
- Li P.W, Ma J, Wei XF, Zhang ZY, Wang RM, Xiao J, Wang JQ.(2022).** *Modification and application of highly active alkaline pectin lyase. AMB Express* , 12(1):130 .<https://doi.org/10.1186/s13568-022-01472-0>.
- Li Z, Tian SY.(2024).** A new alkaline pectin lyase with novel thermal and pH stability from *Bacillus velezensis*. *Protein Expr Purif*, 224:106564. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2024>.

- Lima JO, Pereira JF, Araújo EF, Queiroz MV. (2017). Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. *Braz J Microbiol*, 48(3):602-606 . <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.009>.
- Ling Z, Yinxiao X , Qian L ,Benwei Z. (2021). Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. *Bioresources and bioprocessing*, 8:79. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00432-z>
- Liu C, Qin X, Liu B, Xu X, Deng A, Zhang Y, Zhang Z, Zhang W. (2022). High-yield production of acidic pectin lyase PNLZJ5B for juice processing. *Lett Appl Microbiol*, 75(4):1055-1062. <https://doi.org/10.1111/lam.13781>.
- Liu S, Tian L, Cong Y, Shi Q, Wang L, Lu Y, Wang L, Yang G.(2023). Recent advances in polygalacturonase: Industrial applications and challenges. *Carbohydr Res*, 528:108816.<https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108816>.
- Mangesh N. Kothari , Mirza M. Vaseem B.(2013). PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR POLYGALACTURONASE BY *Erwinia carotovora* MTCC 1428. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* ,4(1) : 118-122.
- Martos, M.A., Zubreski,E.R., Combina,M.,Garro,O.A.andHours, R.A.(2013).Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci Technol*. 33:332–8. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000047>.
- Masuria .V. B., Nerurkar .A. S.(2012).Biochemical properties and thermal behavior of
- Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J.(1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Current Biology Ltd ISSN*, 0969-2126.
- Mehmood .T., Saman. T., Irfan. M., Anwar .F., Ikram M. S., Tabassam .Q.(2019).Pectinase production from *Schizophyllum commune* through central composite
- Mukesh K, Qasim K.B, Bharat B, K.S. Dadhich, G.S. Hoondal.(2000). Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*,36(5) : 467-473. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00238-7).

- Nakamura, M., Iwai,H. (2019).** Functions and mechanisms: polygalacturonases from plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors. Journal of General Plant Pathology, <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00856-8>.
- Nigam, P. S., P. Singh nee ,Pandey, A. (2009).** Solid-State Fermentation Technology for
- Pasteur L, von H, Chelpin E , Harden S A, Buchner E.(2025).** Fermentation. chemical reaction.
- Patil SR, Dayanand A.(2006).** Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. Bioresour Technol. 97(18):2340-4.<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.025>
- pectate lyase produced by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* BR1 with industrial potentials. Biochemical Engineering Journal ; 63:22–30.
- Pectinase from a Novel Bacterium *Chryseobacteriumindologenes* Strain SD and Its Application in Fruit Juice Clarification. Enzyme Research, 2018, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/3859752>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005).** Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-z> protopectinase: production, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol. 39:213-279.
- Qiang H, Yang X, Tian B, Ke C, Lin W, Lü R, Huang W, Wang C, Huang J.(2009).** [Expression of a pectin lyase A gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. ;25(12):1962-8. Chinese.
- Rahman, R.N.Z.A., P.G. Lee, M. Basri and A.B. Salleh.(2005).** Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. Bioresource Technol.,( 96,) 429- 436 .
- Ramadan AMAA, Shehata RM, El-Sheikh HH, Ameen F, Stephenson SL, Zidan SAH, Al-Bedak OAM.(2023).** Exploitation of Sugarcane Bagasse and Environmentally Sustainable Production, Purification, Characterization, and Application of Lovastatin by *Aspergillus terreus* AUMC 15760 under Solid-State Conditions. Molecules. 28(10):4048.<https://doi.org/10.3390/molecules28104048>.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M. K., Barua, R., andHossain, M. T. (2018).** Extracellular
- Sakai ,T., Sakamoto, T., Hallaert,J. andVandamme, E.J.(1993).** Pectin, pectinase and

- Sandler, S. I. (2017).** Chemical, Biochemical, and Engineering Thermodynamics. Wiley.
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sugandha. (2020).** Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds for cosmetic applications. \*Industrial Crops and Products\*, \*158\*, 112985. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112985>
- Sharma, R, S.K. Soni, R.M .Vohra, R.S. Jolly, L.K. Gupta and J.K. Gupta.(2002).** Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. Ind. J. Microbiol.,( 42), 49-54 .
- Shashi K ; Anuja v ; Reena G.(2013).** Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. Protein Expression and Purification, (87)11-16. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.014>.
- Shrestha, S., Rahman, M. S., & Qin, W. (2021).** New insights in pectinase production development and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology.
- Soriano, M., Diaz, P. et Pastor, F.I.J., (2005):** Pectinolytic system of two aerolicksperogenous bacterial strains with high activité on pectin.Cun.Microbio.50, 114-
- Tasgin E, Nadaroglu H, Babagil A, Demir N.(2020).** Immobilization of Purified Pectin Lyase from *Pseudomonas putida* onto Magnetic Lily Flowers (*Lilium candidum* L.) Nanoparticles and Applicability in Industrial Processes. Molecules, 25(11):2671.<https://doi.org/10.3390/molecules25112671>.
- Tehseen. Z, Saqib H. H, Muhammad I, Muhammad J. A<sup>c</sup>, Saba <sup>a</sup>, Isra. A, Raja T. M.(2024).** Production, purification and characterization of endo-polygalacturonase using novel strain of *Bacillus pumilus* through RSM. Process Biochemistry, 146 : 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.07.029> the yeast *Rhodotorulaglutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki*)
- Velázquez JE, Sadañoski MA, Zapata PD, Comelli NA, Villalba LL. (2021).** Bioproduction of α-terpineol and R-(+)-limonene derivatives by terpene-tolerant ascomycete fungus as a potential contribution to the citrus value chain. Journal of Applied Microbiology, 130(1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/jam.14645>
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., & Visser, R. G. F. (2007).** If homogalacturonan were a side chain of

rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. Plant Physiology, 144(1), 188–199. [<https://doi.org/10.1104/pp.107.096594>](<https://doi.org/10.1104/pp.107.096594>)

-**Yadav .S, Yadav .PK, Yadav.D, Yadav .KD.(2008).** Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. Process Biochemistry,43 : 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.015>.

-**Yadav .S, Yadav .PK, Yadav.D, Yadav .KD.(2009).** Pectin lyase: A review. Process Biochemistry,44 :1-10.<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>.

-**Yiyan C ,Jiazhou L,Dun D, Huijie L, Zhimei T, Zhichang L, Xianyong M. (2021).** Solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* improves the quality of tea dregs for use as feed additives. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PONE.0260045](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260045).

# Résumé

## Résumé

Les polygalacturonases (EC 3.2.1.67) sont des enzymes pectinolytiques d'un intérêt majeur dans l'industrie agroalimentaire, en particulier pour la dégradation des polymères de pectine. Dans cette optique, la présente étude se concentre sur la production et la caractérisation biochimique d'une polygalacturonase extracellulaire synthétisée par *Aspergillus niger*, cultivé en fermentation à l'état solide (FMS) sur un substrat agro-industriel, dans des conditions préalablement optimisées. L'enzyme présente une température optimale d'activité à 65 °C, et conserve 90 % de son activité initiale après une incubation d'une heure à 70 °C, révélant une bonne thermostabilité. L'étude de la stabilité thermique a permis de déterminer une énergie d'inactivation ( $E_d$ ) de 72,331 kJ·mol<sup>-1</sup>. Les demi-vies enzymatiques à 70, 75, 80 et 85 °C sont respectivement estimées à 346,57 ; 277,26 ; 203,87 et 108,30 minutes. Les paramètres thermodynamiques de dénaturation ( $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta S^*$ ) sont calculés afin d'évaluer la stabilité conformationnelle de l'enzyme à température élevée. Par ailleurs, l'étude cinétique est réalisée avec la pectine comme substrat, montre que l'enzyme suit une cinétique de type Michaelis-Menten, avec une constante de Michaelis (Km) de 4,9 mM et une vitesse maximale (Vmax) de 5,81 U·mg<sup>-1</sup>, indiquant une affinité modérée pour le substrat et une bonne catalyse enzymatique. Aux vues de ces propriétés catalytique et de thermostabilité, cette enzyme représente un candidat prometteur pour des applications industrielles variées, notamment dans le traitement des déchets pectiques, ainsi que dans les secteurs agroalimentaire, papeterie et textile.

**Mots-clés :** *Aspergillus niger*, polygalacturonase, pectinase, thermodynamique.

## Abstract

Polygalacturonases (EC 3.2.1.67) are pectinolytic enzymes of major interest in the food industry, in particular for the degradation of pectin polymers. With this in mind, the present study focuses on the production and biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase synthesized by *Aspergillus niger*, grown in solid-state fermentation (FMS) on an agro-industrial substrate, under previously optimized conditions. The enzyme has an optimal activity temperature of 65 °C, and retains 90% of its initial activity after a one-hour incubation at 70 °C, revealing good thermostability. The thermal stability study determined an inactivation energy (Ed) of 72.331 kJ·mol<sup>-1</sup>. The enzymatic half-lives at 70, 75, 80 and 85 °C are estimated to be 346.57 °C, respectively; 277.26; 203.87 and 108.30 minutes. The thermodynamic denaturation parameters ( $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta S^*$ ) are calculated in order to evaluate the conformational stability of the enzyme at elevated temperatures. In addition, the kinetic study is carried out with pectin as the substrate, shows that the enzyme follows a kinetics of the Michaelis-Menten type, with a Michaelis constant (Km) of 4.9 mM and a maximum velocity (Vmax) of 5.81 U·mg<sup>-1</sup>, indicating a moderate affinity for the substrate and a good enzymatic catalysis. In view of these catalytic and thermostable properties, this enzyme represents a promising candidate for various industrial applications, particularly in the treatment of pectic waste, as well as in the agri-food, paper and textile sectors.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, polygalacturonase, pectinase, thermodynamic.

## ملخص:

(3.2.1.67Polygalacturonases (EC 3.2.1.67) هي إنزيمات محللة للبكتينات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأغذية، ولا سيما لتحلل بوليمرات البكتين. مع وضع ذلك في الاعتبار، تركز الدراسة الحالية على الإنتاج والتوصيف الكيميائي الحيوي لبولي الجالاكتوروناس خارج الخلية الذي تم تصنيعه بواسطة *Aspergillus niger*، المزروع في تخمير الحالة الصلبة (FMS) على ركيزة صناعية زراعية، في ظل ظروف محسنة سابقاً. يتمتع الإنزيم بدرجة حرارة نشاط مثالية تبلغ 65 درجة مئوية، ويحتفظ بنسبة 90% من نشاطه الأولي بعد حضانة لمدة ساعة واحدة عند 70 درجة مئوية، مما يكشف عن ثبات حراري جيد. حددت دراسة الاستقرار الحراري طاقة تعطيل (Ed) تبلغ 72.331 كيلو جول · مول <sup>-1</sup>. تقدر فترات النصف الأنزيمية عند 70 و 75 و 80 و 85 درجة مئوية بـ 346.57 درجة مئوية، على التوالي. (ΔH \* = 277,26 ; ΔS \* = 203.87 و 108.30 دقيقة). يتم حساب معلمات التفكك الديناميكي الحراري  $K_m$  ،  $V_{max}$  ،  $K_m$  مع ثابت Michaelis مع ثابت  $K_m$  (Michaelis-Menten) يبلغ 4.9 ملي مولار وسرعة قصوى  $V_{max}$  تبلغ 5.81  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  ، مما يشير إلى تقارب معندي للركيزة وتحفيز إنزيمي جيد. بالنظر إلى هذه الخصائص التحفيزية والمقاومة للحرارة، يمثل هذا الإنزيم مرشحاً واعداً لمختلف التطبيقات الصناعية، لا سيما في معالجة النفايات البكتيرية، وكذلك في قطاعات الأغذية الزراعية والورق والمنسوجات.

## الكلمات المفتاحية

<b>Année universitaire : 2024-2025</b>	<b>Présenté par : LAMOUR Amina OGAB Salima</b>
<b>Étude biochimique et thermodynamique d'une pectinase fongique</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée</b>	
<p><b>Resumé</b></p> <p>Les polygalacturonases (EC 3.2.1.67) sont des enzymes pectinolytiques d'un intérêt majeur dans l'industrie agroalimentaire, en particulier pour la dégradation des polymères de pectine. Dans cette optique, La présente étude se concentre sur la production et la caractérisation biochimique d'une polygalacturonase extracellulaire synthétisée par <i>Aspergillus niger</i>, cultivé en fermentation à l'état solide (FMS) sur un substrat agro-industriel, dans des conditions préalablement optimisées. L'enzyme présente une température optimale d'activité à 65 °C, et conserve 90 % de son activité initiale après une incubation d'une heure à 70 °C, révélant une bonne thermostabilité. L'étude de la stabilité thermique a permis de déterminer une énergie d'inactivation (Ed) de 72,331 kJ·mol<sup>-1</sup>. Les demi-vies enzymatiques à 70, 75, 80 et 85 °C sont respectivement estimées à 346,57 ; 277,26 ; 203,87 et 108,30 minutes. Les paramètres thermodynamiques de dénaturation (<math>\Delta H^*</math>, <math>\Delta G^*</math>, <math>\Delta S^*</math>) sont calculés afin d'évaluer la stabilité conformationnelle de l'enzyme à température élevée. Par ailleurs, l'étude cinétique est réalisée avec la pectine comme substrat, montre que l'enzyme suit une cinétique de type Michaelis-Menten, avec une constante de Michaelis (Km) de 4,9 mM et une vitesse maximale (Vmax) de 5,81 U·mg<sup>-1</sup>, indiquant une affinité modérée pour le substrat et une bonne catalyse enzymatique. Au vue de ces propriétés catalytique et de thermostabilité, cette enzyme représente un candidat prometteur pour des applications industrielles variées, notamment dans le traitement des déchets pectiques, ainsi que dans les secteurs agroalimentaire, papeterie et textile.</p>	
<b>Mots-clés :</b> <i>Aspergillus niger</i> , polygalacturonase, pectinase, thermodynamique	
<b>Laboratoires de recherche :</b> Laboratoire Génie Microbiologique et Applications de UFM1	
<b>Président du jury :</b> Dr. KASSA – LAOUAR M. (M.C.B- Université Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Encadrant :</b> Dr. BENNAMOUN L. (M.C.A- Université Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Examinateur(s) :</b> Pr. DAKHMOUCHE S. (Pr- ENS El Katiba Assia Djebbar Constantine).	