

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri – Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



N° d'ordre :

N° de Série :

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

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

Intitulé :

**Séparation et purification des enzymes
pectinolytiques d'origine microbienne :
Comparaison entre les méthodes conventionnelles et
le système TPP**

Présenté par : CHAFI Ines et DRIAS Rihana Le : 22/09/2021

Jury d'évaluation :

Président : Mme DAKHMOUCHE S. M.C.A, (ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).

Rapporteur : Mme BENNAMOUN L. M.C.B, (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Mme SEMRA I. M.A.A, (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire 2020- 2021

Résumé :

Ce travail s'intéresse à la séparation, et à la purification des enzymes pectinolytiques d'origine microbienne. La comparaison de la technique de partitionnement en trois phases (TPP) avec les techniques chromatographiques conventionnelles a montré que, le TPP est une technique d'extraction et de récupération des enzymes en une seule étape à partir des macromolécules. Contrairement aux techniques conventionnelles, le rendement de la purification par le système TPP est influencé par plusieurs facteurs à savoir : la température, le pH, la concentration en sulfate d'ammonium et en t-butanol.

Les enzymes pectinolytiques sont un système complexe de protéines, qui comprennent des hydrolases, des lyases et qui jouent un rôle important dans la dégradation des substances pectiques. Ces enzymes occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation dans différents secteurs industriels (IAA, textile, papeterie,...).

En effet, la purification des pectinases est une étape essentielle afin d'obtenir des enzymes pures qui peuvent être utilisées dans divers procédés industriels. Une sélection rigoureuse de la méthode de purification doit être réalisée pour obtenir des enzymes de plus haute pureté avec un rendement élevé.

Finalement, les techniques chromatographiques conventionnelles se sont révélées des méthodes coûteuses et lentes, contrairement au système TPP qui est facile, rapide, et moins coûteux.

Mot clés :

Enzymes pectinolytiques, Système TPP, Techniques chromatographiques, Purification.

Abstract:

This work is interested in the separation and purification of pectinolytic enzymes of microbial origin. The Comparison of the three-phase partitioning technique (TPP) with conventional chromatographic techniques showed that, TPP is a technique for extracting and recovering enzymes in one step from macromolecules. Unlike conventional techniques, the performance of the purification by the TPP system is influenced by several factors, namely: temperature, pH, concentration of ammonium sulfate and t-butanol.

Pectinolytic enzymes are a complex system of proteins, which include hydrolases, lyases and which play an important role in the degradation of pectic substances. These enzymes occupy a central position with 25% of the overall enzyme market and offer many possibilities of use in different industrial sectors (IAA, textiles, stationery, etc.).

Indeed, the purification of pectinases is an essential step in order to obtain pure enzymes which can be used in various industrial processes. Careful selection of the purification method must be carried out to obtain enzymes of higher purities with high yield.

Finally, the conventional chromatographic techniques have proved to be expensive and slow methods, unlike the TPP system which is easy, fast, and less expensive.

Keywords:

Pectinolytic enzymes, TPP system, Chromatographic techniques, Purification.

ملخص:

يهتم هذا العمل بفصل وتنقية الإنزيمات المحللة للبكتين من أصل جرثومي. مقارنة تقنية التقسيم ثلاثي الطور (TPP) بتقنيات كروماتوغرافيا تقليدية اظهرت أن TPP هي تقنية لاستخراج واستعادة الإنزيمات في خطوة واحدة من الجزيئات الكبيرة. على عكس التقنيات التقليدية ، يتأثر أداء التنقية بواسطة نظام TPP بعدة عوامل ، وهي: درجة الحرارة ، ودرجة الحموضة ، وتركيز كبريتات الأمونيوم و t- بيوتانول.

الإنزيمات المحللة للبكتين هي نظام معقد من البروتينات ، والتي تشمل هيدروليز ، لياز والتي تلعب دورًا مهمًا في تحلل المواد البكتيرية. تحتل هذه الإنزيمات موقعًا مركزيًا بنسبة 25 ٪ من سوق الإنزيمات الكلي وتوفر العديد من إمكانيات الاستخدام في القطاعات الصناعية المختلف IAA ، المنسوجات ، القرطاسية ، إلخ في الواقع ، تعد تنقية البكتينات خطوة أساسية للحصول على إنزيمات نقية يمكن استخدامها في عمليات صناعية مختلفة. يجب إجراء اختيار دقيق لطريقة التنقية للحصول على إنزيمات ذات نقاوة أعلى و ذات إنتاجية عالية. أخيرًا ، أثبتت تقنيات الكروماتوغرافيا التقليدية أنها طرق باهظة الثمن وبطيئة ، على عكس نظام TPP الذي يتميز بالسهولة والسرعة والأقل تكلفة.

الكلمات المفتاحية :

الانزيمات المحللة للبكتين ، نظام TPP ، تقنيات الكروماتوغرافيا ، التنقية.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :

Mme DAKHMOUCHE Scheherazad de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme SEMRA Ilham de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur Madame BENNAMOUN LEILA pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement.

Elle n'a pas cessé de nous guider et nous donner des conseils tout au long de notre parcours. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de nos profondes gratitudes et de l'estime que nous portons pour vous.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous nos enseignants qui nous ont aidés de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère : Rachida

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point de te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différentes obstacles.

A mon très cher père : Yacine

Mon archétype signe de noblesse qui m'a soutenu tout au long ma vie, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection et tout mon respect

A ma chère sœur : Sara et ton mari : Baha

Merci de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études, que dieu les protéger et leurs offre la chance et le bonheur.

A ma chère binôme : Rihana

Pour sa patience et sa compréhension tout au long de travail

A tous mes amies

INES

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Je dédie ce travail

A mes très chers parents **Drias chiboub** et **Sahli Amina**

A ma très chère sœur **Asma**.

A ma très chère binôme **Inès**

Je sais très bien à quel point vous avez dû patienter pour me faire arriver à ce jour. Je n'oublierai jamais vos sacrifices et vos prières.

Vos bénédictions, votre soutien moral, votre gentillesse sans égal, votre profond attachement m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Que Dieu tout puissant vous protégé du mal, vous procure longue vie, santé et bonheur

Afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois.

Que Dieu vous garde...

DRIAS RIHANA

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1 .Enzymes glycolytiques : pectinases	3
1.1. Généralités sur les enzymes.....	3
1.2. Substrats pectiques.....	3
1.3. Enzymes pectinolytiques.....	3
1.4. Classification des enzymes pectinolytiques.....	4
1.4.1. Enzymes désestrifiantes	5
1.4.1.1. Pectines méthylestérases EC (3.1.1.11)	5
1.4.1.2. Pectines acétylestérases EC (3.1.1.6).....	6
1.4.2. Enzymes dépolymérisantes.....	6
1.4.2.1. Pectine lyases	6
1.4.2.1.1. Origine de la pectine lyase	7
1.4.2.1.2. Structure de la pectine lyase.....	8
1.4.2.1.3. Mode d'action de la pectine lyase.....	8
1.4.2.1.4. Caractérisation des lyases.....	10
1.4.2.2. Polygalacturonases	10
1.4.2.2.1. Origine des polygalacturonases.....	10
1.4.2.2.2. Classification des polygalacturonases.....	11
1.4.2.2.3. Structure des polygalacturonases.....	12
1.4.2.2.4. Mode d'action et mécanisme des polygalacturonases.....	13
1.4.2.2.5. Production et caractérisation des polygalacturonases.....	14
1.5. Applications des enzymes pectinolytiques.....	16
1.6. Production des enzymes industrielles.....	16
1.7. Applications industrielles des pectinases	17

Chapitre II : Matériels et méthodes

1-Système de répartition en trois phases TPP	18
1.1. Définition.....	18
1.2. Processus de TPP	19
1.3. Mécanisme de TPP	20
1.4. Facteurs affectant TPP.....	22
1.4.1. Effet du sulfate d'ammonium.....	22
1.4.2. Effet du butanol.....	22
1.4.3. Effet du pH.....	23
1.4.4. Effet de la température.....	24
1.5. Avantages et les inconvénients du TPP.....	25
1.6. Optimisation des paramètres influençant le système TPP.....	25
2. Techniques chromatographiques de séparation des biomolécules	26
2.1. Types de chromatographie.....	26
2.1.1. Chromatographie sur colonne.....	28
2.1.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	28
2.1.3. Chromatographie d'affinité.....	30
2.1.4. Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	31
2.1.5. Chromatographie sur couche mince CCM.....	34
2.1.6. Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	35
2.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	37
2.3. Méthodes analytiques	38
2.3.1. Dosage de l'activité des polygalacturonases.....	38
2.3.2. Dosage de l'activité de pectine lyase.....	39
2.3.3. Dosage des protéines.....	40
2.3.3.1. Méthode de Lowry 1951.....	40
2.4. Bilan de purification	40

Chapitre III : Résultats et discussions

1-Comparaison entre les techniques conventionnelles et le système de répartition en trois phases TPP.....	44
2. Différentes études utilisant le système de répartition en trois phases	44
2.1. Exemple 1 : Purification des pectinases	44

2.2. Exemple 2 : Comparaison entre la chromatographie échangeuse d'ions et le système de répartition en trois phases TPP pour purifier l'enzyme alpha galactosidase.....	45
2.3. Exemple 3 : Purification de la pectine lyase	47
2.4. Exemple 4 : Caractérisation de l'exo- polygalacturonase.....	48
2.5. Exemple 5 : Extraction de l'époxyde hydrolase.....	50
Conclusion	52
Références bibliographiques	53

Liste des abréviations

AG : Acide galacturonique	PAL : Pectate lyase
APG : Acide polygalacturonique	PE : Pectine estérase
CCM : Chromatographie sur couche mince	PEG : Polyéthylène glycol
CPC : Chromatographie de partage centrifuge	PGs : Polygalacturonases
CPG : Chromatographie en phase gazeuse	PI : Point isoélectrique
CPL : Chromatographie en phase liquide	pH : Potentiel d'hydrogène
Da : Dalton	RGI : Rhamanogalacturonane typeI
DM : Degré de méthylation	RGII : Rhamanogalacturonane typeII
DNC : Dinitrosalicylique	SDS-PAGE : Eléctrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
Endo PG : Endo polygalacturonase	BuOH : Butanol tertiaire
Endo PL : Endo pectine lyase	TPP : Trois phases partitionnement
EDTA : Ethylène diamine tétraacétique acide	µg : Microgramme
FMS : Fermentation en milieu solide	µl : Microlitre
FML : Fermentation en milieu liquide	µmole : Micromole
GalA : Acide galacturonique	HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
HM : Pectine hautement méthyles	v/v : Volume sur volume
KDa : Kilo Daltons	v/max : Volume maximale
p/v : Poids sur volume	
PAE : Pectine acétylestérase	

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Mode d'action des pectinases.....	4
<u>Figure 2</u> : Action des pectines – méthylestérases.....	6
<u>Figure 3</u> : Action des pectines – acétylestérases.....	6
<u>Figure 4</u> : Structure de pectine lyase (PLB).....	8
<u>Figure 5</u> : Action de pectine lyase.....	9
<u>Figure 6</u> : Structure tridimensionnelle de endo PG II <i>d'A-niger</i>	13
<u>Figure 7</u> : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique.....	14
<u>Figure 8</u> : Système de récupération par partitionnement triphasé (TPP).....	20
<u>Figure 9</u> : Comportement interfaciale des protéines dans le partitionnement à trois phases en utilisant des systèmes eau/t-butanol BuOH).....	21
<u>Figure 10</u> : Base de la répartition des macromolécules (protéines) dans le système de Répartition à trois phases.....	24
<u>Figure 11</u> : Base de la chromatographie par échange d'ions.....	29
<u>Figure 12</u> : Principes de la chromatographie d'affinité bio sélective.....	30
<u>Figure 13</u> : Diagramme d'un système de chromatographie en phases gazeuse.....	32
<u>Figure 14</u> : Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG.....	33
<u>Figure 15</u> : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.....	36
<u>Figure 16</u> : Organes d'une chaîne HPLC.....	37
<u>Figure 17</u> : Principe du dosage des sucres réducteurs par méthodes DNS.....	38
<u>Figure 18</u> : Courbe étalon de l'acide galacturoniques.....	39
<u>Figure 19</u> : Principaux mécanismes réactionnels de la méthode de LOWRY 1951.....	40
<u>Figure 20</u> : Etapes de purification de l'enzyme pectine lyase par la méthode de partition en trois phases (TPP).....	48

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Classification des enzymes dégradant les pectines.....	5
<u>Tableau 2</u> : Classification des lyases	9
<u>Tableau 3</u> : Différentes origines des polygalactoronases.....	11
<u>Tableau 4</u> : Propriétés biochimiques et physicochimiques de quelque polygalacturonases...	15
<u>Tableau 5</u> : Différentes domaines d'applications des enzymes pectinolytiques.....	16
<u>Tableau 6</u> : Exemple de partitionnement en trois phases (TPP) et de ses variantes pour la récupération et purification de macromolécules.....	18
<u>Tableau 7</u> : Choix du type de chromatographie et du support.....	27
<u>Tableau 8</u> : Différentes méthodes de purification utilisées pendant le processus de production de pectinase dans l'industrie.....	43
<u>Tableau 9</u> : Comparaison entre une chromatographie conventionnelle avec la technique de partitionnement en trois phases (TPP).....	47
<u>Tableau 10</u> : Diverses conditions utilisées pour le partitionnement en trois phases (TPP) de l'enzyme exo polygalacturonase.....	49

Introduction

Introduction

L'existence des êtres vivants dépend de certains catalyseurs appelés enzymes, notamment la croissance des microorganismes qui sont capable de réaliser des taches biochimiques très spécifiques. Certaines enzymes sont utilisées pour les réactions de synthèse et la fabrication de certains composés chimiques. Tandis que d'autres enzymes sont utilisées dans les réactions de dégradation par rupture des liaisons chimiques, ce qui permet par conséquence la décomposition de certains composés biochimiques. Les enzymes accélèrent de millions de fois ces réactions d'où leurs noms de catalyseurs. **(Simon et Barry, 2005)**, Parmi les enzymes actuellement connues, une vingtaine est disponible à l'échelle industrielle. Dans l'industrie alimentaire se sont les branches sucrières et laitières qui sont les plus grands consommateurs d'enzymes.

Les enzymes principalement utilisées sont les enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères naturels tels que les amidons, les pectines, les celluloses et les protéines **(Werner et al., 2010)**. Parmi lesquelles les enzymes pectinolytiques qui sont un groupe d'enzymes constitué d'estérases, de polygalacturonases et de lyases qui agissent sur les substrats pectiques.

Les pectinases occupent 25 % de vente d'enzymes alimentaires dans le monde; ces enzymes sont appliquées dans divers industries comme l'industrie du textile, du papier, la fermentation du café, du thé, l'extraction des huiles et le traitement des eaux usées. **(Mehrnouche et al., 2014)**.

La purification est une série de processus divers destinés à isoler une ou plusieurs enzymes à partir d'un mélange complexe (cellules, autres particules ou matrices). C'est une étape importante en recherche fondamentale pour la caractérisation de la fonction (études des propriétés), de la structure, mais aussi en recherche appliquée et industrie pour préparer des matières et réactifs.

la purification des enzymes restent liées aux techniques de séparation utilisées, parmi ces techniques, nous les citons les chromatographies conventionnelles et le système de répartition en trois phases (TPP), qui est une technique simple et rapide utilisée avec succès pour la séparation et la purification des enzymes et des protéines au cours des dernières années **(Bayraktar et Onal, 2013 ; Gagaoua et al., 2015, et Gagaoua et Hafid, 2016)**. Elle est facilement appliquée et peut être employée directement sur la suspension brute d'un extrait enzymatique ou protéique **(Sharma et Gupta, 2001)**.

Les différentes étapes réalisées au cours de ce travail sont :

- Etude des enzymes pectinolytiques : séparation, purification et caractérisations
- Etude du système de répartition en trois phases comme une nouvelle technique de séparation et purification des protéines.
- Influence des facteurs (sulfate d'ammonium, butanol, pH, température) sur le processus de séparation TPP
- Comparaison entre le système de répartition en trois phases (TPP) et les techniques chromatographiques conventionnelles.
- Le couplage de la technique de TPP avec d'autres méthodes.

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

Dans le domaine de séparation et purification des enzymes pectinolytiques

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Enzymes glycolytiques : pectinases.

1.1- Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10⁶ fois, par rapport à la réaction en leur absence (**Granner, 2008**). En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Drouin, 2005**). En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al., 2005**), la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al., 2001**).

1.2. Substrats pectiques

La pectine est un polysaccharide important de la paroi cellulaire des plantes supérieures. Elle existe particulièrement dans les lamelles moyennes et primaires parois cellulaires des plantes, elle joue un rôle fondamental dans la croissance cellulaire, mécanique force de défense. Structuralement complexe avec au moins 17 monosaccharides différents interconnecté à travers plus de 20 différents liens. Le polymère de pectine comprend différents domaines structurels qui sont liés de manière covalente à un autre (**Merve et al., 2014**) d'un poids moléculaire situé entre 50000 et 150000 Da (**Voragen et al., 1995**). Ces substances consistent de protopectines, d'acides pectiniques, de pectines et d'acides pectiques (**Tapre et al., 2014**). Par conséquent, la pectine est un polysaccharide anionique qui a des régions linéaires formées par les monomères de l'acide D - galacturonique (GalA), liés par des liaisons α - (1,4) glycosidiques, et ramifiées régions principalement constituées de divers types de monosaccharides neutres (principalement le rhamnose, le xylose, mannose, glucose, galactose et arabinose) liés entre eux. Les unités GalA ont un groupe carboxyle. (**Thakur et Yapo, 2011**).

1.3. Enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques (**Lamrini, 2012**) et leur production est élaborée par différents genres d'actinomycètes tel que : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (**Massaoudi, 2015**).

Les substances pectiques sont des macromolécules contenant des acides galacturoniques polymérisés, de haut poids moléculaire, chargées négativement, largement répandues dans le règne végétal ou elles constituent avec l'hémicellulose et la cellulose, l'un des composants majeurs de la paroi des cellules végétales (**Haberra, 2014**).

Par définition, les pectinases forment une catégorie d'enzymes (polygalacturonases (E.C 3.2.1.15 et E.C 3.2.1.67), pectine lyases (E.C 4.2.2.10) et pectate lyases (E.C 4.2.2.2)) qui coupent les liaisons glycosidiques des résidus d'acide galacturonique dans les matériaux pectiques (**Kheder, 2007**). Il est important de mentionner que les pectinases sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Lamrini, 2012**). Comme le montre la (Figure1)

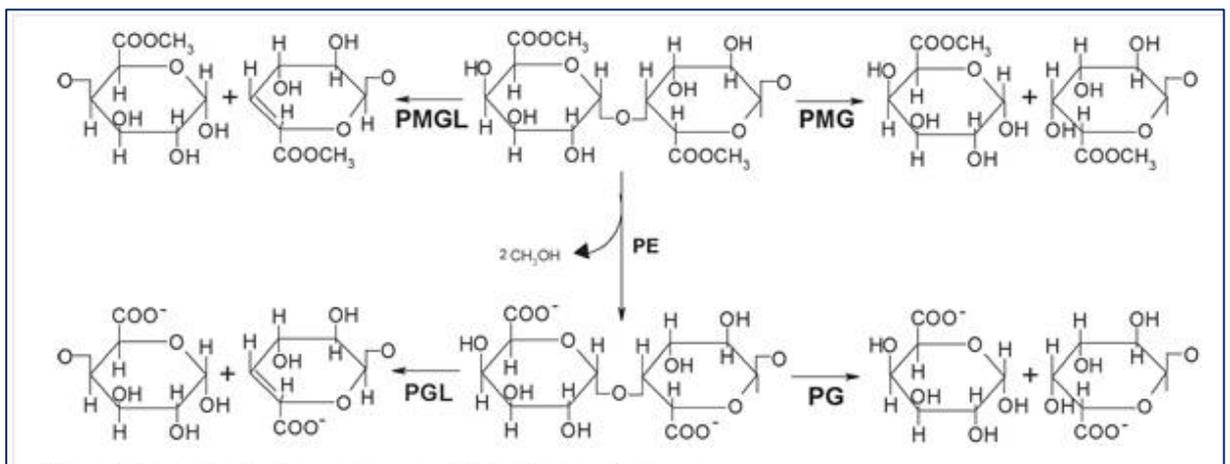


Figure 1 : Mode d'action des pectinases (**Combo et al., 2011**).

1.4. Classification des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-Torres et al., 2006**). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérases (polygalacturonases et lyases). Comme le montre le (Tableau 1) ci-dessous.

Tableau 1 : Classification des enzymes dégradant les pectines (homogalacturonanes) d'après (Jayani *et al.*, 2005 ; Yadav *et al.*, 2009).

Type	Enzyme	EC.n°	Mécanisme d'action	Mode d'action	Substrat préférentielle	Produit formé
1. Esterase						
1. PME	pectine méthylestérases	3.1.1.11	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique +méthanol
2. PAE	Pectine acetyle esterase	3.1.1.6	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique+ Ethanol
2. Dépolymérase (a) hydrolases						
1. Endo PG	Endo polygalacturonase	3.2.1.15	Hydrolyse	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonase
2. Exo PG	Exopolygalacturonase	3.2.1.67	Hydrolyse	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonase
(b) lyases						
1. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonateinsaturés
2. Exo PL	Exopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonate Insaturés
3. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.10	Trans-élimination	Aléatoire	Pectine	Méthyle oligogalacturonate Insaturés

1.4.1. Enzymes désesterifiantes

1.4.1.1-Pectines-méthylestérases

(PME ou PE, E.C. 3.1.1.11), Elles catalysent l'élimination des groupements méthoxyles fixés sur la pectine pour former de l'acide pectique et du méthanol par hydrolyse des liaisons esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique. Ce mode d'action conduit à une distribution en bloc des groupements carboxyliques libérés et à une grande sensibilité des acides pectiques produits au Ca²⁺ (Khan *et al.*, 1990). Comme le montre la (figure 2).

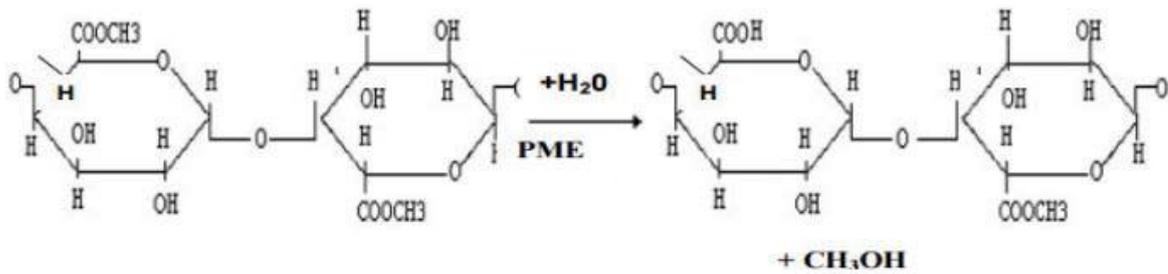


Figure 2: Action des pectines-méthylestérases (Khan *et al.*, 1990).

1.4.1.2. Pectines-acétylestérases (PAE, E.C. 3.1.1.6)

Elles éliminent les acides estérifiés en C-2 ou C-3 des résidus AG (Figure 3).

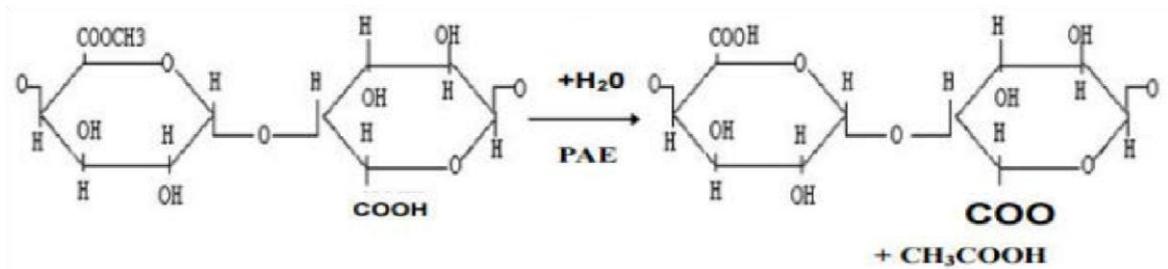


Figure 3: Action des pectines-acétylestérases (Khan *et al.*, 1990).

1.4.2. Enzymes dépolymérisantes

1.4.2.1. Pectine lyases

La pectine lyase catalyse le clivage aléatoire de la pectine, préférentiellement haute pectine estérifiée, produisant des insaturés méthyloligogalacturonates par transélimination de glycosidiques liens. (Jayani *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, toutes les pectines lyases décrites sont des endo-PL (EC 4.2.2.10) (Sinitsyna *et al.*, 2007) et ses collaborateurs (Van Alebeek *et al.*, 2002) ont mené une étude détaillée du mode d'action de la pectine lyase *d'Aspergillus niger* qui produit des mono-, di-, tri- et tétragalacturonates. Outre les di-, tri- et tétragalacturonates insaturés à partir des méthyloligogalacturonates insaturés les monogalacturonates n'ont pas été identifiés dans les produits de la réaction dans n'importe quel essai.

1.4.2.1.1-Origine de la pectine lyase

Les lyases sont produites par des bactéries et des champignons (**Prade et al., 1999**). Elles sont aussi présentes dans les végétaux, principalement dans les fruits et les légumes où elles sont impliquées dans leur mûrissement.

- **Origine végétale**

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

- **Origine microbienne**

La synthèse d'enzyme à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (**Meunier, 1999**). De plus, les lyases végétales sont produites en quantité faible, contrairement aux lyases microbiennes. A la suite de ce développement, un grand nombre de lyases furent produites par des bactéries, des moisissures et des champignons.

- **Origine bactérienne**

Les bactéries produisent principalement des lyases telles que *Bacillus spp.* (**Kashyap et al., 2000**), *Pseudomonas marginalis* (**Hayashi et al., 1997**), *Geobacillus pallidus* p26 (**Safinur et al., 2014**), *Bacillus macerans* (**Morozova et al., 2006**).

En effet, les bactéries produisent plutôt des lyases alcalines et stables de point de vue thermique pendant que les champignons sont utilisés pour l'obtention des lyases acides (**Torres et al., 2006**).

- **Origine fongique**

Les moisissures sont les micro-organismes les plus producteurs des lyases tels que : *Aspergillus niger* (**Sidra et al., 2013**), *Aspergillus giganteus* (**Pedrolli et al., 2008**), *Penicillium citrinum* (**Yadav et al., 2009**). La plupart des produits commerciaux pectinolytiques sur le marché sont obtenus à partir de *l'Aspergillus niger*

1.4.2.1.2-Structure de la pectine lyase

Dans la figure 4B la couleur représente le facteur de température et varie progressivement du bleu au rouge lorsque le facteur de température augmente. B, Schéma en ruban schématique du squelette PLB, illustrant la structure secondaire. Les hélices sont représentées par des spirales roses et la structure β par des flèches. La feuille β parallèle, PB1, est jaune; PB2 est bleu; et PB3 est rouge. La structure antiparallèle β dans le premier tour T3 et un brin β dans la troisième boucle T3 sont indiqués en orange. Les liaisons disulfures sont désignées par des lignes épaisses et noires.



Figure 4 : Structure de la pectine lyase (PLB) (Kraulis, 1991).

1.4.2.1.3. Mode d'action de la pectine lyase

Elles ont pour substrat préférentiel la pectine et agissent selon deux modes :

- Les Endopectines-lyases (EC 4.2.2.10) agissent par β -élimination et ont une préférence pour les pectines HM. Leur affinité pour les pectines diminue avec le DM du substrat et sont inactives sur l'acide polygalacturonique (APG). Elles coupent la liaison soit entre deux AG méthoxylés, ou entre un résidu AG libre et un résidu AG méthoxylé. Le plus petit substrat est un AG4 totalement méthoxylé (Lemberg *et al.*, 2000).
- Les Exopectines-lyases agissent sur les pectines fortement estérifiées, ont récemment été isolées d'*Aspergillus niger* (Suherland, 1995). Comme le montre la (Figure5) ci-dessous

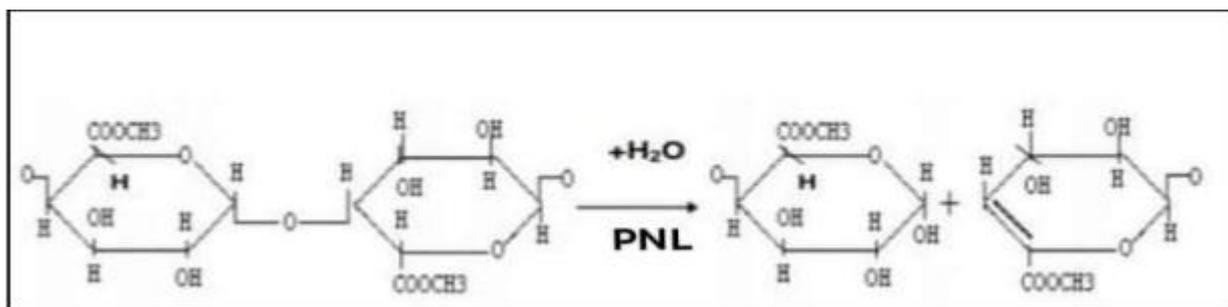


Figure 5: Action de pectine lyase (Sutherland 1995).

Les deux groupes lyases sont classés dans la famille de polysaccharides lyases. Comme le montre le tableau 2, les lyases de champignons présentent une activité optimale en milieu acide et neutre, alors que celles de bactéries sont plus actives en milieu alcalin. La dégradation complète du substrat de la pectine nécessite toujours des enzymes qui coupent la chaîne du rhamnogalacturonane.

Tableau 2 : Classification des lyases (Jayani *et al.*, 2005).

Enzyme	Numéro EC	Mécanisme D'action	Model d'action	Première Substrat	Produit
Endopolygalacturonase Lyase	4.2.2.2	Trans-elimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonase
Exopolygalacturonase Lyase	4.2.2.9	Trans-elimination	Avant dernière Liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyle 1-D	4.2.2.10	Trans-elimination	Aléatoire	Polyméthyle-D-digalcturonates Insaturés	Méthyloligogalacturonates insaturés
Exopolyméthyle-D-galctosiduronate lyase		Trans-elimination	Dernière Liaison	Polyméthyle-D-digalcturonates Insaturés	Méthylmonogalacturonates insaturés

1.4.2.2.4. Caractérisation des lyases

Les enzymes lyases sont caractérisées par : le pH optimal, la température optimale, la stabilité thermique, la stabilité au pH, cette caractérisation est réalisée de l'extrait brut obtenu après ensemencement de la souche sur milieux optimisés.

1.4.2.2. Polygalacturonases

Les PGs sont des enzymes pectinolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectinolytiques. Les PGs impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PGs (EC 3.2.1.15) et des exo-PGs (EC 3.2.1.67) (**Jayani *et al.*, 2005**).

1.4.2.2.1. Origine des polygalacturonases

Polygalacturonases (PGs) sont produits par divers organismes, tels que les plantes, les bactéries et les champignons (**Gautam *et al.*, 2017**), sont représentées dans le tableau 3 suivant :

Tableau 3 : Différentes origines des polygalacturonases (**Gautam et al., 2017**)

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

1.4.2.2.2- Classification des polygalacturonases

Ce sont des enzymes qui catalysent la coupure des liaisons reliant les molécules d'acide galacturonique, Il en existe différentes modes d'action (endo et exo).

- **Exo-polygalacturonases** (exo-PGs, EC 3.2.1.67)

Elles ciblent l'extrémité non réductrice de l'homopolymère pour produire uniquement des monosaccharides d'acides galacturoniques (**Kashyap et al., 2001**).

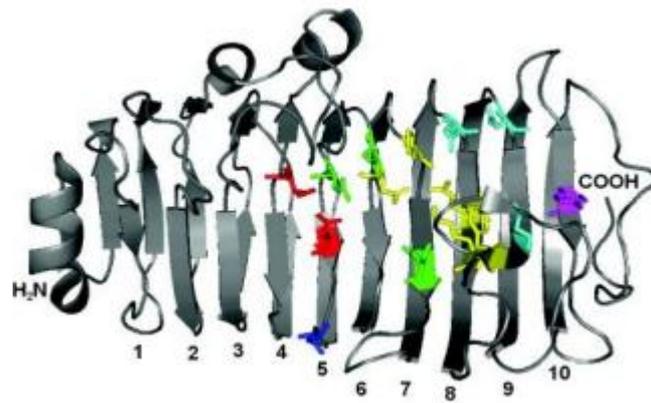
- **Endo-polygalacturonases** (endo-PGs, EC 3.2.1.15)

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

1.4.2.2.3- Structure des polygalacturonases

L'hélice β englobe dix échelons complets (numérotés de 1 à 10). Les résidus d'acides aminés associés aux sous-sites -3 à +3 sont rapportés dans le schéma. Asp180, Asp201 et Asp202 sont impliqués dans la catalyse. Les résidus sur les sous-sites -1 et +1 sont strictement conservés parmi les endoPGs fongiques.

Les PGs sont des protéines sécrétées d'environ 360 acides aminés et contiennent une séquence signal d'environ 20 à 65 acides aminés. Elles sont, généralement, glycosylées et comportent quelques ponts disulfures stabilisants (**Pickersgill et al., 1998; Pickersgill et al., 1999; Van Santen et al., 1999**). Plus de 115 séquences ont été trouvées et étudiées jusqu'à maintenant (**Markovic et Janecek, 2001**). Les PGs ont une structure monomérique en forme d'hélice main droite composée de feuillets parallèles qui peut contenir de 7 à 12 tours complets formant de 3 à 4 feuillets (**Yoder et Journak, 1995; Jenkins et al., 1998; Van Santen et al., 1999**). La structure des PGs est représentée à la figure 6. Les PGs et les exoPGs procaryotes et eucaryotes partagent quelques similitudes dans leurs séquences. Le mécanisme catalytique implique six acides aminés conservés soit Asp-180, Asp-201, Asp-202, His-223, Arg-256 et Lys-258 (numérotation basée sur la séquence primaire de la PGII d'*Aspergillus niger*). L'aspartate 180 avec l'aide de l'aspartate 202 agirait comme une base pour activer la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse et l'aspartate 201 serait le donneur de proton au substrat. L'histidine 223 aurait pour fonction de maintenir le bon état d'ionisation d'un carboxylate impliqué dans la catalyse (probablement celui de l'aspartate 201) en partageant un proton. L'arginine et la lysine seraient quant à elles impliquées dans la liaison du substrat (**Armand et al., 2000**). La séquence consensus du site actif est montrée (**Huang et Schell, 1990; Rutkowski et al., 1990; Bussink et al., 1991; Henrissat, 1991**). Parmi les autres acides aminés conservés dans les PGs, on retrouve aussi la tyrosine 291, elle aussi un rôle dans la catalyse et dans la liaison du substrat (**Armand et al., 2000; Stratilova et al., 1993 et 1996; Rao et al., 1996; Pages et al., 2000**).



Subsite	- 3	- 2	- 1	+ 1	+ 2	+ 3
Residues	N186	M150 D183	D180, D202, G228 G229, K258	D201, H223, R256 K258, Y291	E252, D282 Q288	Y326
Rung Number	5	4, 5	5, 6, 7	6, 7, 8	8, 9	10
Colour code	Blue	Red	Green	Yellow	Cyan	Purple

Figure 6: Structure tridimensionnelle de endo PG II *d'A .niger* (Claudia *et al.*, 2007).

1.4.2.2.4. Mode d'action des polygalacturonases :

La fonction des pectinases est d'hydrolyser les liens glucosidiques α et β à 1-4 liant deux GA non méthylés. Étant donné que la chaîne de RG-I est composée d'un GA suivi d'un rhamnose, il n'y a pas deux GA liés par un lien C 1-4, ainsi, les pectinases ne peuvent pas dégrader ce type de pectine. Ainsi, seuls les homogalacturonans et le RG-II sont hydrolysés par les PGs. Les endo PGs hydrolysent le substrat de façon aléatoire à l'intérieur du polymère, tandis que les exo PGs font l'hydrolyse à partir des extrémités du polymère (Gainvors *et al.* 2000). Montre l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique (PGA, substrat qui sera utilisé pour les expérimentations) par une endo PG, et pour chacune des hydrolyses, la longueur du polymère diminue et il y a formation d'un groupe réducteur à une des extrémités. (Figure7)

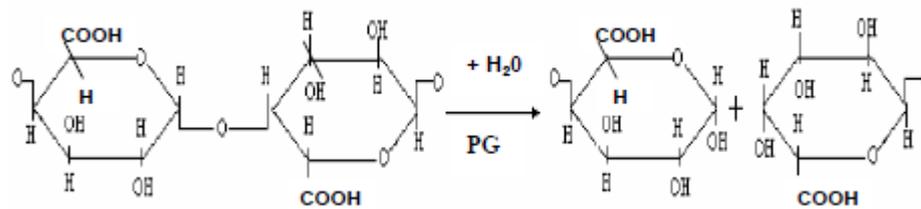


Figure 7 : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique (**Korner *et al.*, 1999**).

1.4.2.2.5. Production et caractérisation des polygalacturonases

Les microorganismes sont largement utilisés pour la production de la PGs en fermentation submergée, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres qui peuvent l'influencer : pH, température, aération et humidité (**Gangadharan *et al.*, 2008 ; Couto et Sanromán, 2006**).

Cependant, de plus en plus de travaux ont porté, ces dernières années, sur la production d'enzymes par fermentation sur milieu solide (FMS) (**Handa *et al.*, 2016**).

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

Les PGs isolées des différentes sources végétales et microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action (tableau 4). Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés des enzymes pectinolytiques. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité. La masse moléculaire des exo-PGs varie entre 30 et 50 KDa, elle est beaucoup plus élevée 50 à 80 KDa dans le cas d'endo-PGs glycosylées. Leur pH optimal d'action est situé entre 3.8 et 7.6 (**Sharma *et al.*, 2013**) et celui des exo-PGs est de 4 à 6.

Tableau 4 : Propriétés biochimiques et physico-chimiques de quelques polygalacturonases (PG) (De Vries *et al.*, 2001 ; Jayani *et al.*, 2005).

Sources PG	Natures	Masse moléculaires	Pi	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	T(C°)	pH
<i>Aspergillus japonicus</i>	Endo PG1	38	5.6	-	30	4.0-5.5
	Endo PG2	65	3.3	-	30	4.0-5.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo PGA	41	-	-	45	5.0
<i>Thermococcus Aurantiacus</i>	Endo	35	5.9	5890	55	5.0
<i>Aspergillus niger</i>	Endo PG1	61	-	982	43	3.8-4.3
	Endo PG2	38	-	3750	45	3.0-4.6
<i>Bacillus sp KSM-P410</i>	Exo	45	5.8	54	60	7.0
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo	63	-	2571	50	5.0
<i>Aspergillus awamori</i>	Endo	41	6.1	487	40	5.0
<i>Aspergillus Alliaceus</i>	Exo PG1	40	5.7	-	45-50	3.5
<i>Bacillus licheniformis</i>	EXO	38	-	209	69	11.0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Endo PG	40	5.9	-	35	5.5
<i>Salerotinia borealis</i>	Endo	40	7.5	2088	40-50	5.0
<i>Aspergillus niger</i>	Exo PG1	66	5.6	-	60	3.8
	Exo PG2	63	5.8	209	60	4.5
<i>Saccaromyces ceverisiae</i>	Endo	39	-	2870	45	5.5

1.5. Applications des enzymes pectinolytiques

L'utilisation des pectinases en association avec les amylases dans les industries agroalimentaires à le pouvoir de clarifier les jus et ainsi réduire le temps de filtration de 50% (**Saxena et al., 2008**). Elles sont utilisées également dans la clarification du vin, ou bien comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (**Rodriguez-Fernández et al., 2011**). Les pectinases trouvent des applications dans divers domaines tel que : le textile, industries du papier, fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et légumes, ainsi que le traitement des eaux usées (**Zenil et al., 2015**). Les applications des pectinases dans les divers domaines sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Différent domaines d'applications des enzymes pectinolytiques.
(**Kumar et Suneetha, 2014**).

Domaine	Processus
Production de jus et fruits	Classification des jus
Cornichons	Favorise le ramollissement durant le processus de fermentation et de stockage
Production de café et thé	-Accélération du processus de fermentation et l'élimination de la mousse -Elimination des souches mucilagineuses dans les grains de café
Textiles	-Dégraissage des fibres végétales Utiliser dans l'élimination des impuretés non cellulosiques dès les fibres de coton
Traitement des eaux usées	Elimination des pectines contenues dans les eaux usées des industries agroalimentaire
Papier et pulpe	Dépolymérisations des pectines retrouvées dans le papier et réduit la demande cationique des solutions de pectine

1.6. Production des enzymes industrielles

Si les enzymes sont présentes dans tous les organismes vivants, ce sont des bactéries et des champignons microscopiques qui sont les sources exploitables d'enzymes pour les industriels. Ces microorganismes sont prélevés dans des milieux naturels. Chaque producteur d'enzymes détient ses souches. Les enzymes pectinolytiques sont issues principalement de

microorganismes appartenant aux espèces *Aspergillus*. *Aspergillus niger*, l'unique microorganisme utilisé pour la production d'enzymes pectinolytiques, est capable de sécréter une vaste gamme d'activités avec différentes fonctions oenologiques du fait de la sélection de la source d'*A. niger* et du mode de production en milieu solide ou liquide (**Moutounet, 2014**).

- **Fermentation**

Les enzymes sont produites par le microorganisme lorsqu'il est mis en conditions de fermentation. Les microorganismes sont mis en culture, dans un substrat liquide (fermentation immergée) ou sur un substrat solide (fermentation en milieu solide ou en surface). Les conditions de température, d'hygrométrie, de pH et de nutrition (facteurs de croissance) sont primordiales pour conduire la fermentation vers la formation des enzymes désirées.

- **Séparation**

Les enzymes produites sont séparées du microorganisme de production, en général par floculation et filtration. Le liquide obtenu contenant les enzymes est ensuite soumis à des étapes de filtration.

- **Concentration et la purification**

Le liquide clarifié contenant les enzymes doit être concentré pour proposer un produit suffisamment actif. Cette concentration se fait à l'aide de technologies membranaires et/ou par évaporation. A ce stade, si nécessaire, le producteur procède à une étape de purification

1.7. Applications industrielles des pectinases

Les pectinases industrielles peuvent être classées en deux types; pectinases acides et alcalines (**Gummadi et al., 2007**). Les pectinases acides jouent un rôle important dans l'industrie des jus de fruits. Les pectinases du commerce sont couramment utilisées dans les processus d'extraction et de clarification des jus clairs mousseux (jus de pomme, de poire et de raisin), jus jusques nuages (jus d'agrumes, jus de pruneaux, jus de tomates et nectars) et dans les produits unicellulaires dans le but de préserver l'intégrité des cellules végétales en hydrolysant sélectivement les polysaccharides de la lamelle moyenne (**Kashyap et al., 2001**). Par contre, les pectinases alcalines principalement produites à partir de *Bacillus spp.* sont principalement utilisés pour le dégommeage et le rouissage des cultures de fibres et le prétraitement des eaux usées pectiques des industries des jus de fruits (**Kashyap et al., 2001**)

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Système de répartition en trois phases (TPP)

1.1. Définition

Le système de répartition en trois phases ou en anglais (TPP : Three phases partitioning), est une technique décrite pour la première fois par le groupe de Lovrien, a été intensivement utilisée pour purifier plusieurs macromolécules cibles et elle est maintenant devenue un outil d'exploration précoce polyvalent et un outil de bioséparation commun avec de larges applications (**Mondal *et al.*, 2006 ; Dennison, 2011 ; Gagaoua et Hafid, 2016 ; Nadar *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017, Chew *et al.*, 2018**).

Cette technique implique l'emploi du butanol tertiaire (*t*-BuOH) et de sulfate d'ammonium pour former un système à deux phases dans lequel les macromolécules protéiques précipitent à l'interface, formant ainsi la troisième phase (**Gagaoua et Hafid, 2016**).

Le TPP a été utilisé avec succès pour la récupération d'une grande variété de macromolécules à partir de diverses sources naturelles (fluides, tissus et cellules) tels que les plantes, les animaux et les microorganismes. (y compris les extrémophiles), ainsi que les culture microbienne de fermentation. Comme le montre le (Tableau 6).

Tableau 6: Partitionnement en trois phases (TPP) et de ses caractères pour la récupération et la purification de macromolécules et de petites molécules à partir de différentes sources, y compris les milieux de culture et les microorganismes provenant d'environnements atypiques. (Szamos et Kiss, 1995 ; kiss *et al.*, 1998 ; Paule et coll, 2004 ; Alvarez-Guerra et Irabien, 2014; Chew et coll, 2018) y compris les enzymes / protéases (Akardere *et al.*, 2010 ;Dennison, 2011 ;Gagaoua *et al.*, 2014 ;Gagaoua *et al.*, 2015 ;Gagaoua et Ziane et Nait 2015 ;Gagaoua et Hafid, 2016 ; Ait Kaki *et al.*, 2017; Gagaoua *et al.*, 2017).

Biomolécules ciblé	sources	systeme tpp appliqué	rendemnt de récupération	degré de purif	references
α -Galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	TPP	50%	15	Dhananjay and Mulimani (2008)
Alcaline protease	<i>Bacillus pumilus</i> MP27		186%	16.65	Baweja et al. (2017)
Inulinase	<i>Aspergillus niger</i>		88%	10.2	Kumar et al. (2011)
α -Galactosidase			97.2% ^b	6.27	Gu et al. (2012)
exo-Inulinase			88%	10.2	Kumar, Premkumar, et al. (2011)
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		363%	15	Akardere, Ozer, Celem, and Onal (2010)
Xylanase	<i>Trichoderma citrinoviride</i>		99.8%	5.7	Periyasamy et al. (2017)
Carboxymethyl cellulase	AUKAR04		96.5%	5.5	
β -1,3-Glucanase			98.4%	5.6	
β -Galactosidase	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		78%	7.5	Choonia and Lele (2013)
α -Amylase	<i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4		168.8%	14.94	Ait Kaki El-Hadef El-Okki, Gagaoua, Bourekoua, et al. (2017)
Xylanase	<i>Bacillus oceanisediminis</i> SJ3		107%	3.48	Boucherba et al. (2017)
Lipase	<i>Chromobacterium viscosum</i>		320%	3.24	Roy and Gupta (2005)
Nattokinase	<i>Bacillus natto</i> NRRL-3666		129.5%	5.6	Garg and Thorat (2014)
Laccase	<i>Coriopsis trogii</i>		75%	20	Liu, Yan, and Huang (2015)
Naringinase	<i>Aspergillus brasiliensis</i> MTCC 1344		21.41%	4.2	Shanmugaprasanth, Vinothkumar, Ragupathy, and Reddy (2015)
Superoxide dismutase	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		80%	9.8	Simental-Martinez, Rito-Palomares, and Benavides (2014)
β -Lactamase	<i>Bacillus cereus</i> EMB20		15% ^c	30	Sadaf et al. (2018)
exo-Polygalacturonase	<i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235		25%	6.7	Dogan and Tari (2008)
Asparaginase	<i>Escherichia coli</i> k12		36.21%	11	Biswas, Kumari, Singh, and Jha (2014)
Aryl alcohol oxidase	<i>Pleurotus ostreatus</i>		10.95%	10.19	Kumar and Rapheal (2011)
Mannitol dehydrogenase	<i>Aspergillus parasiticus</i>		77%	4.8	Niehaus and Diits (1982)

1.2- Processus de TPP

La technique de séparation TPP est une méthode de récupération en trois étapes, qui est un hybride de «relargage» et de précipitations alcooliques pour l'extraction, asséchant, purifiant et concentrant les macromolécules, en particulier les protéines pour utilisation dans des opérations de fabrication petites ou grandes chaînes. (Dennison, 2011 ; Gagaoua et Hafid, 2016 ; Yan *et al.*, 2017 ; Chew *et al.*, 2018).

Le principe de cet outil en plein essor consiste à mélanger l'extrait brut ou la suspension de cellules avec un sel solide (sulfate d'ammonium [(NH₄)₂SO₄] phosphate de potassium et citrate de sodium) et un solvant organique (t-BuOH, 2-butanol, 1-propanol et 2 propanol), mais généralement le t-BuOH afin d'obtenir trois phases (fig 8A).

La plupart des procédures, générales, suivies pour le TPP comprennent une étape d'incubation et une étape d'extraction, La première consiste à mélanger l'extrait brut avec une solution saline pendant une courte période déterminée, et la seconde comprend l'ajout lent de t-BuOH pour initier la séparation. Ainsi, le procédé est basé sur la capacité du sel à séparer un mélange de t-BuOH et d'eau, une solution autrement miscible, en deux phases, une phase organique supérieure et une phase aqueuse inférieure (Gagaoua et Hafid, 2016).

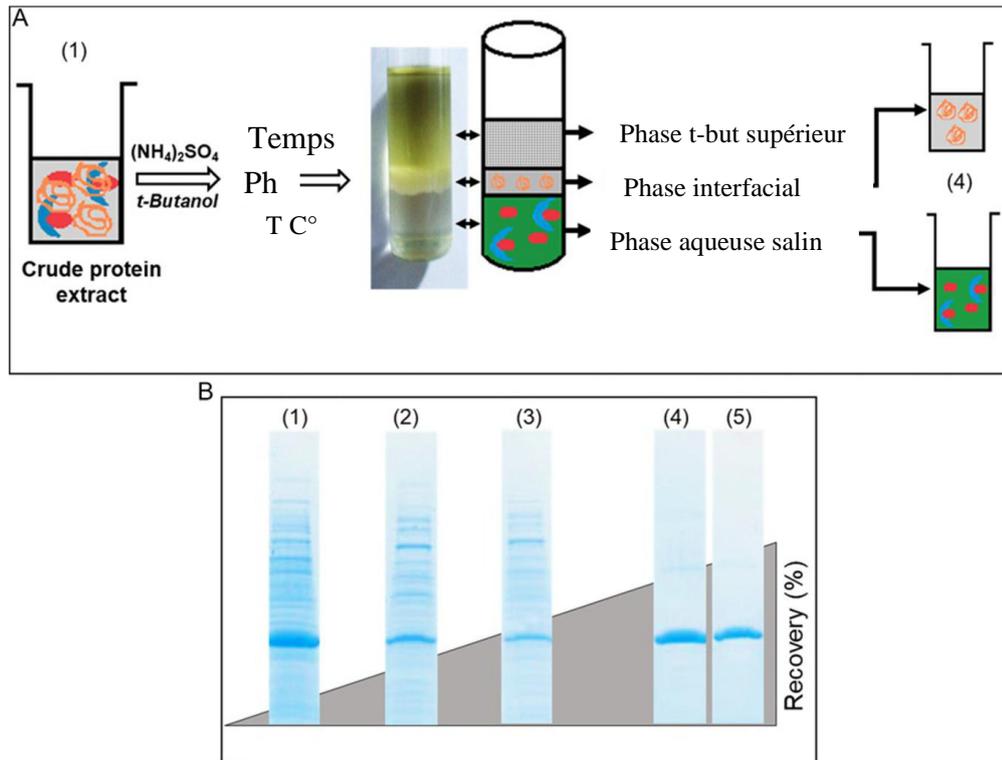


Figure 8 : Système de récupération par partitionnement triphasé (TPP) (Dennison, 2011 ; Gagaoua *et al.*, 2014 ; Gagaoua et Hafid, 2016 ; Gagaoua, Hafid, et Hoggas, 2016).

(A) Exemple de représentation schématique des trois phases après la séparation de TPP, mettant en évidence les principales étapes de l'extrait de protéines brutes à la récupération des macromolécules.

(B) phase de précipité interfaciale évaluée par SDS-PAGE pour mettre en évidence la pureté de la protéine cible après chaque étape d'optimisation de la TPP ainsi que le pourcentage de récupération correspondant, (triangle gris)

1.3-Mécanisme de TPP

Malgré le nombre élevé d'études sur le système de répartition en trois phases, le mécanisme exact de ce système non chromatographique n'est pas bien rapporté. Cependant, il est généralement reconnu que le processus de séparation implique l'opération collective de nombreuses techniques comme :

- 1- Le salage,
- 2- La précipitation isoionique.
- 3- La précipitation par co-solvant.

4- La précipitation osmolytique.

5- La précipitation anti-chaotrope des protéines.

6- Les changements d'hydratation des protéines et le resserrement de la conformation, qui peuvent tous contribuer positivement à la meilleure récupération de la protéine des macromolécules cibles (**Dennison, 2011 ; Gagaoua et Hafid, 2016 ; Gagaoua et al., 2017; Yan et al., 2017**).

Dans le procédé TPP, le *t*-BuOH peut être d'abord ajouté à la solution aqueuse de protéine dans un rapport d'environ 1-2. Cela permet à la protéine de s'équilibrer avec le solvant (eau) et le co-solvant. La protéine devient ainsi partiellement hydratée et partiellement *t*-butanolisée, en proportion de l'abondance relative des solvants dans le mélange. Lors de l'ajout de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (initialement à une quantité de 20%-30% avant optimisation), l'eau est absorbée par les ions de sel (en particulier SO_4^{2-}), Au fur et à mesure que ceux-ci s'hydratent. Le sel a apparemment une plus grande affinité pour l'eau que pour le *t*-BuOH, et donc séquestre préférentiellement l'eau (figure 9).

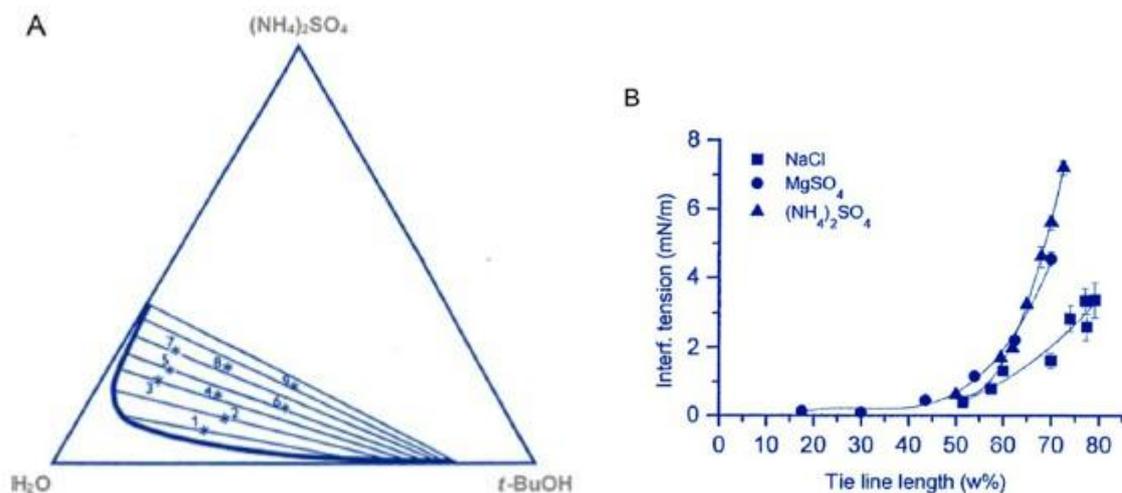


Figure 9 : Comportement interfaciale des protéines dans le partitionnement à trois phases en utilisant des systèmes eau/*t*-butanol (*t*-BuOH).

(A) Diagramme de phase (en rapport pondéral) du système à trois composants eau/sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /*t*-butanol. à 25°C selon (**Kiss et al., 1998**).

(B) Tension interfaciale entre les phases supérieures et inférieures des systèmes à trois composants en fonction de la longueur du fil d'attache sous trois sels différents (**Szamos et al., 1998**).

1.4-Factures Affectant le processus TPP

1.4.1-Effet du sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, est le sel le plus utilisé pour le salage des protéines car il est bon marché, facilement disponible, doux pour les protéines, stabilise certaines protéines et il est très soluble, De plus NH_4^+ et SO_4^{2-} sont aux extrémités de leurs séries respectives de Hofmeister et il a été démontré qu'ils stabilisent les interactions intermoléculaires dans les macromolécules telles que les protéines.

La saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est d'une importance cruciale et joue un rôle majeur dans le développement de la structure des protéines. Importance critique et joue un rôle majeur dans le TPP car elle est responsable de l'interaction protéine-protéine et de la précipitation, Elle provoque la précipitation des protéines par un mécanisme de relargage.

L'efficacité du saltingout dépend d'abord de la quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et ensuite de la force ionique de la solution. Par exemple, à une précipitation de sel plus élevée, les molécules d'eau sont attirées par les ions de sel, ce qui entraîne des interactions protéine-protéines et les molécules de protéines précipitent par le biais d'interactions hydrophobes (**Gagaoua, 2014**)

1.5.2- Effet du t-butanol

Presque tout le développement du système TPP jusqu'ici a dépendu du *t*-butanol, un alcool C4 qui est un solvant sélectif. Il a été constaté que d'autres solvants comme le méthanol ou l'éthanol n'étaient pas en mesure de former une troisième phase, il est donc recommandé d'utiliser le *t*-butanol.

Ainsi, le *t*-butanol est utilisé comme solvant car il est capable de former les trois phases du système TPP (**Kulkarni et Rathod, 2014 ; Gagaoua et al., 2014, 2015 ; Gagaoua et Hafid, 2016**).

Le *t*-butanol dans l'eau est également un promoteur puissant de la structure. Bien que le sulfate soit un anion et *t*-butanol est une molécule neutre, il est maintenant clair que ces paires de composés utilisés à concentrations assez importante se renforcent les uns les autres le comportement physico-chimique lorsque le solvant principal est l'eau (**Dennison et Lovrien, 1997**).

Dennison et Lovrien (1997) ont expliqué le mécanisme de TPP qui est basé sur l'effet anti-chaotropique des deux produits. Selon eux, ni le grand ion de sulfate hydraté, ni la molécule

de *t*-butanol ne sont pas capables de pénétrer à l'intérieur des protéines, et donc cela favorise la stabilité de la structure des protéines.

1.4.3-Effet du pH

Le pH du milieu est un autre paramètre important affectant le système TPP, car il provoque l'ionisation des acides aminés acides ou basiques présents dans les protéines et influence d'autres aspects des macromolécules (**Dennison, 2011 ; Guerra et Irabien, 2014 ; Gagaoua et Hafid, 2016**). Il a été signalé que les systèmes TPP changent brusque autour du point isoélectrique (pI) des macromolécules, principalement avec protéines, et l'efficacité du système dépend de ce paramètre notamment dans la présence d'un électrolyte comme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Il a été postulé que la distribution et la partition des macromolécules dans les systèmes TPP changent avec le pH en raison de l'électrostatique interaction entre phases et macromolécules chargées.

En TPP, et dans le cas de la récupération des protéines, si le pH du système est supérieur au point isoélectrique (pI) de la protéine, les résidus d'acides aminés hydrophiles sont chargés négativement et la protéine acquerra une charge négative nette la déplaçant vers le bas de la phase aqueuse. Dans ces conditions, les protéines restent dans la partie aqueuse inférieure phase. Cependant, si le pH du système est inférieur au pI de la protéine cible, il y a une précipitation ou une accumulation maximale de protéines dans le précipité interfaciale phase (**Gagaoua et al.,2014 ;Gagaoua et Hafid, 2015 ; Gagaoua et Hafid, 2016**) Cela peut être dû au développement d'une charge positive sur le surface de la protéine à un pH bas qui facilite la liaison de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ au cationique sites, améliorant ainsi considérablement l'effet du criblage électrostatique et minimisant la répulsion électrostatique entre des molécules de protéines de même charge ou des protéines stabilisées gouttes d'émulsion. Il a été examiné que les changements de pH facilitent le changement dans la charge nette des molécules cibles et influence le partitionnement des protéines (figure 10).

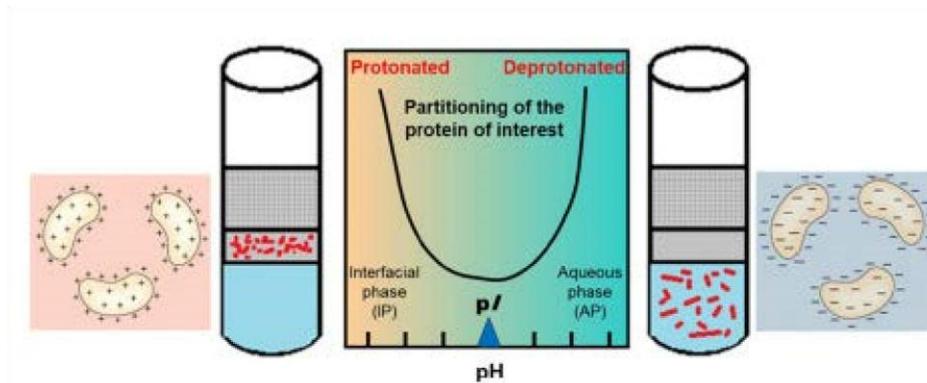


Figure10 : Base de la répartition des macromolécules (protéines) dans le système de répartition à trois phases (Dennison, 2011).

Cette base de partitionnement des macromolécules (protéines) dans le cadre du système TPP représenté sur la figure10. En conséquence, il a été rapporté que la solubilité des protéines a été maximisée lorsque le TPP a été réalisé au pI de la protéine (Pike et Dennison, 1989). Par conséquent, à la lumière des raisons précédentes, il est important d'étudier avec prudence les effets du pH sur le procédé TPP et de définir les conditions optimales de pH pour le partage qui améliorerait à la fois le pli de purification et le récupération des macromolécules cibles, à savoir des protéines et des enzymes.

1.4.4- Effet de la température

La température est un autre paramètre physique important qui n'a pas un grand effet sur la quantité de macromolécules récupérées, mais a un impact sur la configuration et la stabilité globale des enzymes et des protéases (Dennison et Lovrien, 1997 ;Gagaoua et Hafid, 2016 ; Chew *et al.*, 2018). On suppose que les niveaux les plus élevés du processus de séparation fonctionne à basse température, une condition qui est considérée comme favorable car la chaleur générée par le solvant ou la précipitation du sel peut être dissipé rapidement, assurant ainsi une dénaturation minimale des protéines (Gagaoua *et al.*,2016 ; Yan *et al.*, 2017 ; Nadar *et al.* 2017 ; Chew *et al.*, 2018) ,à la plus basse température (4°C) le rendement de récupération ou l'activité peut être similaire à celle obtenu à température ambiante qui est postulée pour être due au faible mouvement du solvant particulière (Gagaoua *et al.*, 2015 ; Gagaoua *et al.*, 2016) D'autres études ont montré qu'une plage de température de 20 à 40 °C peut être optimal

Cependant, cela est difficile à confirmer compte tenu de la complexité de les paramètres de processus impliqués (Sharma et Gupta, 2001 ; Garg et Thorat, 2014). En effet, à très haute température, et en dehors de la dénaturation des protéines, la volatilité du t-BuOH conduit

à sa faible disponibilité lors de la séparation, résultant dans un effet synergique réduit avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, produisant ainsi un rendement inférieur.

Pour ces raisons, l'effet de la température à différents intervalles doit être optimisé après avoir validé les paramètres décrits précédemment.

1.5-Avantages et inconvénients de TPP

Comme indiqué ci-dessus, le système TPP est une technique de purification simple et rapide et s'est avérée très efficace pour concentrer une large gamme de protéines, à savoir les protéases. Par ce procédé, certains enzymes sont stabilisés et d'autres sont inhibés par le t-butanol, ce qui permet des fractionnements préliminaires de l'extrait enzymatique

Le système de répartition en trois phases augmente l'activité enzymatique de plusieurs protéines. Autrement, il a été rapporté qu'il dénature les protéines avec une structure quaternaire, par exemple l'hémoglobine, ce qui constitue un avantage lors de l'isolement des protéines sanguines. En revanche, de petites quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doivent être éliminées par dialyse. Certaines enzymes peuvent perdre leur activité en présence d'une grande quantité de t-butanol. Peu d'études ont rapporté que la structure des protéines peut être altérée par le t-butanol. Le TPP ne convient pas pour l'isolement des anticorps IgG ou des protéines moins présentes dans la solution ($<5 \mu\text{g}$). Autrement, un problème avec l'homogénéisation des tissus est la génération possible d'autre facteur soit par protéolyse, soit par d'autres interactions protéine/protéine. (**Gagaoua et al., 2017**).

1.6-Optimisation des paramètres influençant le système TPP

L'optimisation est un processus, par le biais duquel, on cherche à déterminer des conditions opératoires variables qui tendent à améliorer une performance en se rapprochant d'une solution optimale. Le mot Optimum, vient du latin Optimus, qui veut dire «Meilleur » (**Foulds, 1981**)

De ce fait, l'optimisation implique le changement de certaines conditions appelées variables de décision ou variables du problème (le degré de liberté du procédé), afin de maximiser ou de minimiser un critère bien défini (la productivité ou le rendement...), appelé fonction objectif. Parmi les solutions possibles, sont acceptables celles qui répondent à certaines exigences, appelées contraintes (**Fonseca et Fleming, 1993 ; Beveridge et Schechter, 1970 ; Himmelblau, 1972**)

L'étude menée par le Dr Ait kaki en 2017, dans le cas l'alpha amylase, a déterminé les conditions appropriées du système pour une meilleure purification de l' α -amylase, l'optimisation des paramètres du processus doit être étudiée.

Il s'agit de la concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, du rapport extrait brut : *t*-butanol et du pH et de leurs effets sur le rendement et le degré de purification de l' α - amylase de *R. oryzae* FSIS4. L'influence de ces paramètres sur le système est déterminée selon les recommandations de **(Dennison et Lovrien, 1997 et Gagaoua *et al.*, 2015)**.

- L'effet de la concentration en sel (30, 40, 50, 60, 70 et 80 %) (p/v) sur l'extrait brut de l'enzyme est étudié en fixant le rapport du *t*-butanol : extrait brut à 1:1 et le pH à 5
- Différents ratios de *t*-butanol (extrait brut: *t*-butanol; 1:0,5 ; 1:0,75 ; 1:1 ; 1:1,25 ; 1:1,5 ; 1:1,75 et 1:2) sont testés avec une saturation constante en sulfate d'ammonium à 50 % (concentration optimal) et à température ambiante.
- Après optimisation du *t*-butanol et du sulfate d'ammonium, l'effet de différentes valeurs du pH est étudié : L'extrait brut est saturé à 50 % de sulfate d'ammonium et le pH est ajusté à 3, 4, 5, 6, 7 et 8, Le *t*-butanol est ensuite ajouté à un rapport extrait brut : *t*-butanol de 1,0 : 1,50.
- Le dosage des protéines est réalisé par la méthode Bradford (1976)
- Le dosage de l'activité amylasique est réalisé par la Méthode Bernfeld (1955)

2. Techniques chromatographiques de séparation biomoléculaire

2.2. Types de chromatographies

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie en phase liquide (CPL):
- Chromatographie sur couche mince (CCM).
- Chromatographie de partage centrifuge (CPC).

- Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), à séparer ou à purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC). Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé (tableau 7) (<http://staff.univ-batna.2.dz>).

Tableau 7: Choix du type de chromatographie et du support (web1)

Types de chromatographie	Natures de l'adsorbant	Natures des composés à séparer
Adsorption	Gel de silice	Molécule organique simple, molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substance a haute poids moléculaire,
	Oxyde d'aluminium	Vitamine, alcaloïdes, colorants, substances à caractère nucléophile
Partage	Gel de silice	Substances très polaires
	Oxyde d'aluminium	Substance très polaires
	Kieselguhr	Sucre et composées amphotères, acide aminées
Partage en phase inverse	Film E.C.S.511V	Composées hydrophiles de série homologues
	Film E.C.S.541V	
	Polyamide	Phénols et dérivés nitrés aromatiques
	Cellulose	Acide gras et leur ester méthyliques
Electrophorèse	Gel de silices	Amines, acides aminés et peptide, colorant
	Oxyde d'aluminium	Hétérocycle azotés polynucléaire
	Kieselguhr	Acides nucléique
Echange d'ion	DEAE	Composées dont la charge électriques Dépond de Ph
	Esteola	
	Sephadex	Nucléotides et acides carboxyliques
	Dowex	

2.2.1. Chromatographie sur colonne

En chromatographie solide-liquide la séparation des extraits lipidiques est basée sur la séparation et / ou l'adsorption des composants lipidiques entre la phase stationnaire (solide) et la phase mobile (liquide). Les colonnes les plus utilisées pour l'analyse des lipides sont l'acide silicique ainsi que le silicate de magnésium (**Purdon, 1991**).

1-Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Effectuer l'élution.
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel

2.2.2. Chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie d'échange d'ion est la plus communément utilisée comme technique de séparation des protéines. Une matrice chargé positivement est appelée **un échangeur d'anions**, car elle se lie ions ou molécules chargés négativement en solution. Une matrice chargée négativement est appelé **un échangeur de cations** parce qu'il lie des ions ou des molécules chargés positivement (**Bonner, 2007 ; Doultani, 2004**) (figure 11).

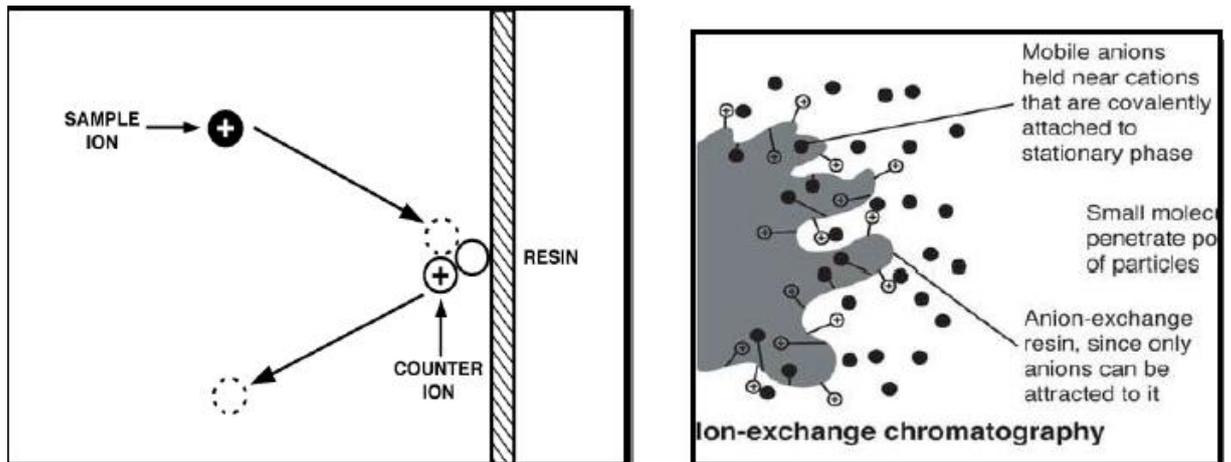


Figure 11 : Base de la chromatographie par échange d'ions (Harris, 1999).

1-Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir le gel.
- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne (fixation des contre ions).
- Injecter l'échantillon. Effectuer l'élution (étape de désorption par la Fi ou pH).
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une élution soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu.

Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

- Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.
- Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de

concentration plus élevée (exp. Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...).on (l'étape de fixation ou adsorption des protéines) (Louahab, 2018).

2.2.3. Chromatographie d'affinité

La protéine est séparée dans une matrice chromatographique contenant un ligand lié par covalence à un support solide. Un ligand est défini comme une molécule avec affinité de liaison réversible, spécifique et unique pour une protéine (figure12) (Bonner, 2007 ; Pfeiffer *et al.*,1997).

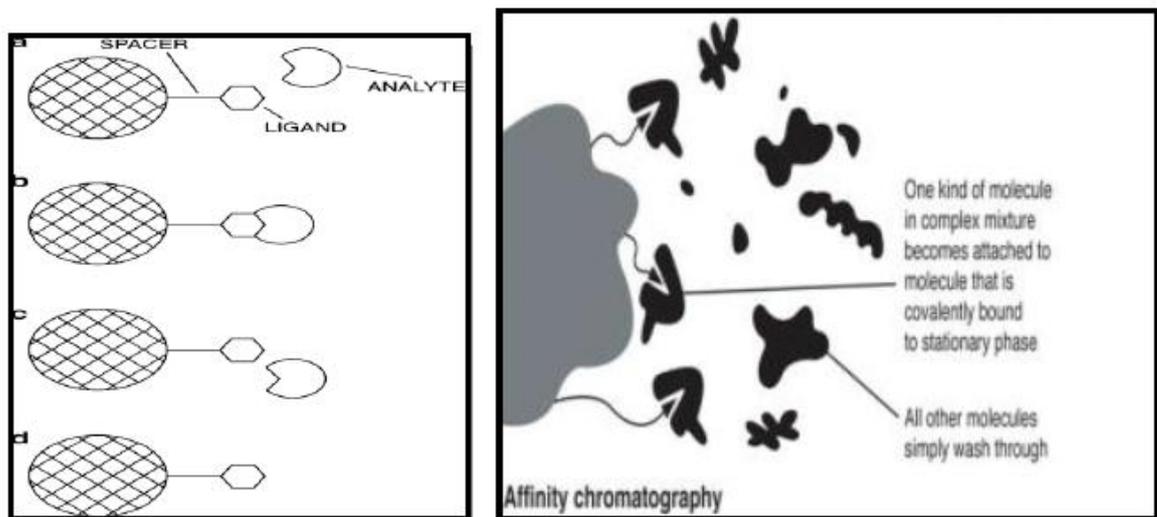


Figure12: Principes de la chromatographie d'affinité bio sélective (Heftmann ,2004).

- (a) Le support présente le ligand immobilisé à l'analyte à isoler.
- (b) L'analyte entre en contact avec le ligand et se fixe.
- (c) L'analyte est récupéré par l'introduction d'un éluant, qui dissocie le complexe contenant l'analyte au ligand,
- (d) Le support est régénéré

1-Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Laver la colonne pour éliminer les substances non adsorbées.
- Eluer les substances adsorbée ou fixée.
- Récupérer les fractions.

- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur le support. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité. On y fait passer la solution aqueuse contenant la substance à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. Des lavages successifs permettent d'éliminer toute trace de produits indésirables. Enfin, on élue la substance retenue en décomposant le complexe (**Louahab, 2018**)

2.2.4-Chromatographie en phase gazeuse CPG

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile est gazeuse et la phase stationnaire soit un liquide immobilisé, soit un solide contenu dans un tube fermé. Elle est utilisée pour séparer les composants volatils thermiquement stables d'un mélange. Elle consiste à vaporiser un échantillon et à l'injecter sur la tête de la colonne. Sous un gradient de température contrôlé, l'échantillon est transporté à travers la colonne par le passage d'une phase mobile gazeuse inerte. Les substances volatiles sont ensuite séparées en fonction de plusieurs propriétés, notamment le point d'ébullition, la taille moléculaire et la polarité (**Sloneker ,1972**).

Il existe deux types de chromatographie en phase gazeuse :

- Chromatographie gazeuse d'adsorption** : phase stationnaire est un solide (gel de silice, charbon actif, tamis moléculaire...). La séparation est déterminée par les propriétés adsorbantes du solide vis-à-vis de la substance à analyser.
- Chromatographie gazeuse d'absorption** : phase stationnaire est un liquide (PSL) fixé sous forme d'une couche mince ininterrompue sur la surface d'un porteur solide (support) inerte. La séparation est déterminée par les propriétés du liquide. Cette technique est la plus utilisée. Dans les deux cas, le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés ; la phase mobile est constituée du gaz vecteur et des solutés gazeux (figure 13) (**Takia, 2003**).

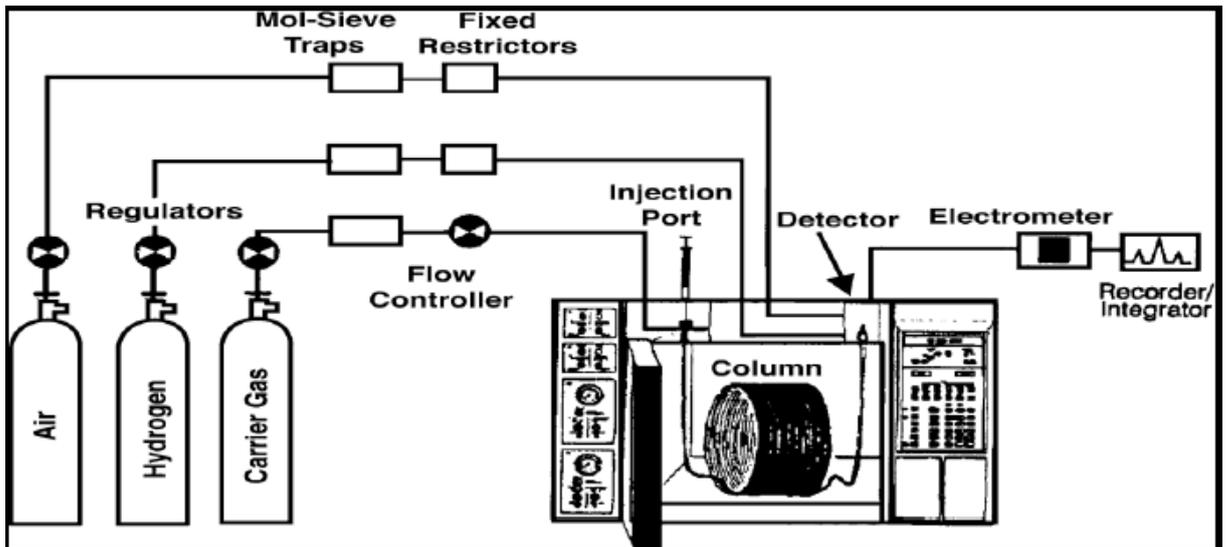


Figure 13 : Diagramme d'un système de chromatographie en phase gazeuse. (Gracieuseté de Hewlett Packard Co., Formation à la clientèle analytique, Atlanta, GA.) (Gordon ,1990).

1-Principe d'une installation de CPG

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée. L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Comme le montre la (figure 14) (Rouessac, 2014).

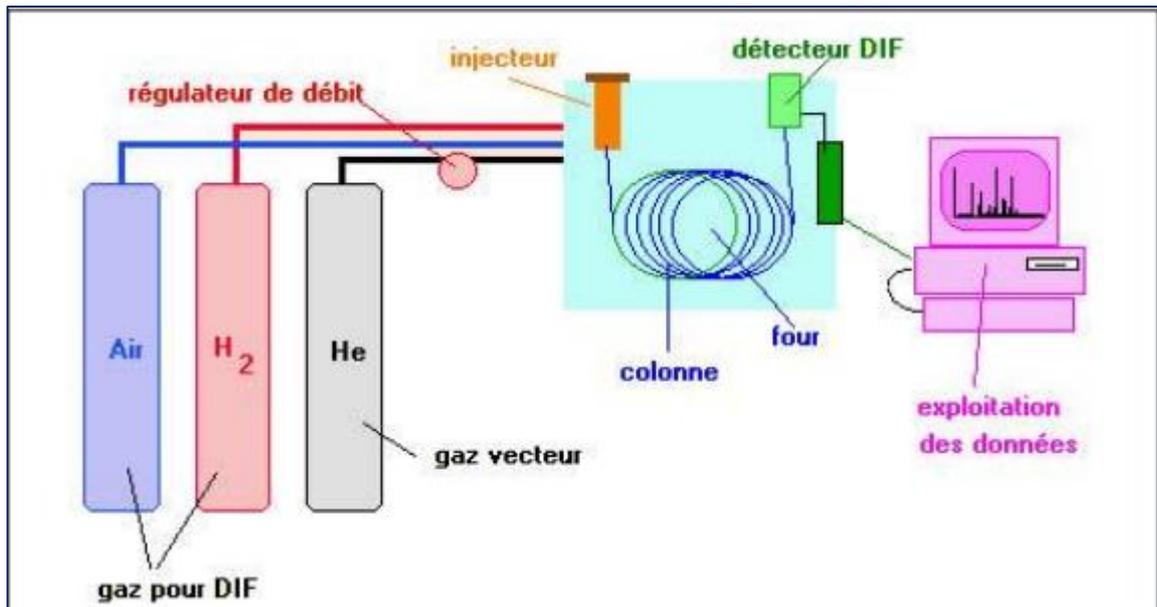
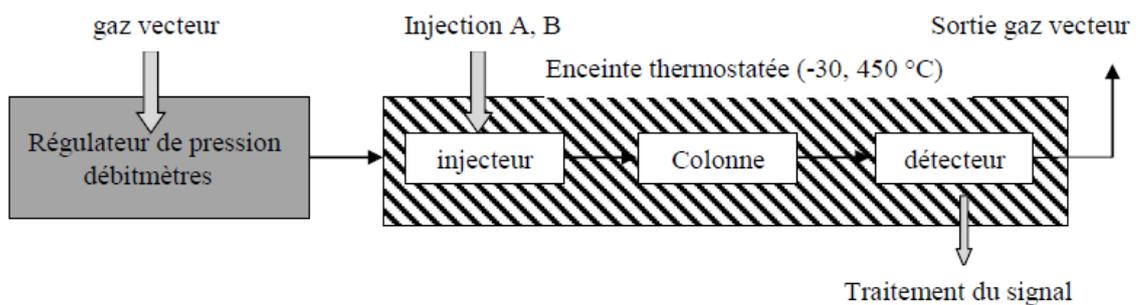


Figure 14 : Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG (Rouessac,2014).

On considère le principe d'analyse à l'aide d'un schéma :



On injecte les substances à doser A et B à la tête de la colonne, après évaporation des substances A, B elles arrivent sur la phase stationnaire. Il se passe immédiatement l'adsorption et l'absorption des corps A, B.

Soit $K_A \gg K_B$:

Un gaz vecteur arrive dans la colonne, entraîne les particules des corps A et B qui se trouve dans la phase gazeuse, le long de la colonne. Les particules entraînées sont adsorbées sur la deuxième partie de la colonne (Rouessac, 2014).

2.2.5-Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

La CCM est l'un des principaux outils analytiques utilisés pour l'analyse des lipides. L'adsorbant généralement utilisé en CCM pour l'analyse des lipides est le gel de silice de très haute qualité. Des échantillons d'extraits lipidiques sont appliqués sous forme de points discrets ou de stries étroites, 1,5 - 2 cm du bas de la plaque. La plaque est ensuite développée dans une chambre contenant le solvant de développement ou un mélange de solvants. Le solvant remonte la plaque par action capillaire, en prenant les différents composants avec elle à des vitesses différentes, en fonction de leur polarité et à quel point ils pourraient être retenus par l'adsorbant. La plaque est retirée de la chambre de développement lorsque le solvant s'approche de la en haut, puis séché dans l'air ou sous un courant d'azote. La détection des taches peut être faite en utilisant un réactif directement sur la plaque. Il existe des réactifs chimiques non destructeurs, qui permettent la récupération des lipides après la détection (**Louhab, 2018**)

1. Principe

La chromatographie sur couches minces (CCM) est une méthode d'analyse couramment utilisée pour l'identification de composés organiques, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté des produits analysés (**Autran, 1991**). De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange, semble employer pour suivre la progression d'une réaction comme dans le cas de l'hydrolyse de polysaccharides (**Delattre, 2005**). Selon deux phases :

- la phase stationnaire solide, le support est le gel de silice qui joue le rôle d'adsorbant. Il adsorbe des molécules de soluté contenues dans la phase mobile, grâce à des forces de rétention par adsorption entre le support et les solutés, ce qui favorise des interactions plus importantes, donc une meilleure séparation des composés.
- la phase mobile liquide : le solvant va permettre le déplacement et la migration des molécules.

2. Protocole

La fraction est déposée sous forme de bande fine sur la plaque, qui sera placée par la suite dans une cuve muni d'un support, contenant la phase mobile. Le système de solvants utilisé est choisi après plusieurs essais. Après le développement et le séchage du chromatogramme, les bandes séparées et homogènes sont marquées et délimitées dans une chambre noire sous la

lumière UV, suivie d'une révélation chimique en utilisant les vapeurs de NH₃ et par la suite un autre examen du chromatogramme sous la lumière UV à 254 et 366 nm pour noter les changements de couleurs avant et après.

Les bandes grattées constituées de produits et de la phase stationnaire sont lavés par différents solvants en gradient de polarité : CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH et puis l'acétone pour solubiliser le produit séparé, qui est destiné à d'autres analyses (**Louhab, 2018**).

2.2.6. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Elle a été utilisée depuis 1975 et elle a réduit en moyenne de dix fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés).

La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- Des composés thermosensibles.
- Des composés très polaires.
- Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Cette technique est indiquée pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse (**Bruneton, 1999**). La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (**Audigie et al., 1995**).

1-Principe de la HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme (Cuq, 2001).

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par la figure 15 suivant :

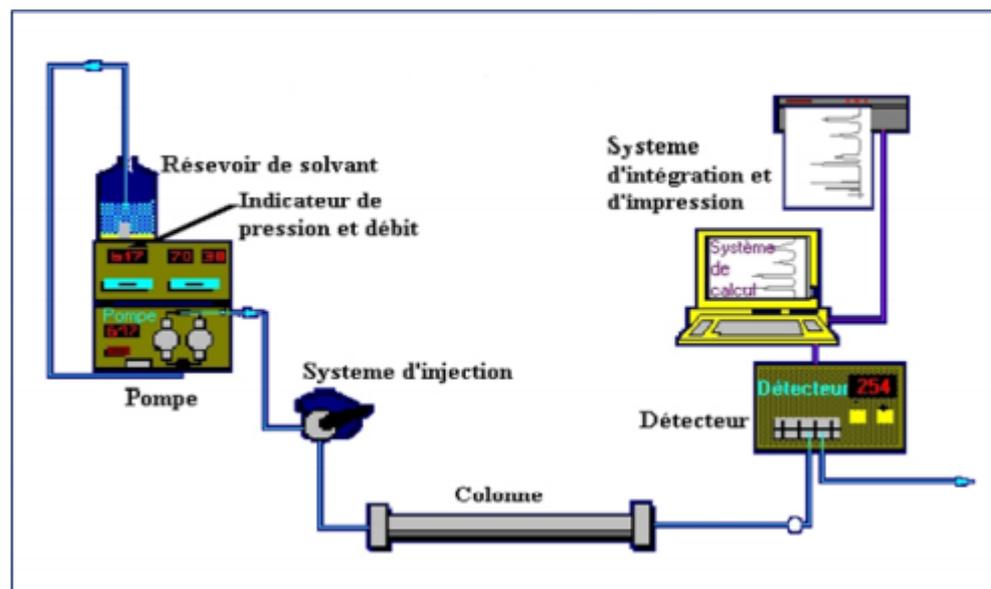


Figure15: Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC (Ben Saad, 2013).

2-Appareillage :

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulsent l'éluant dans une colonne analytique.

L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques μL) dans l'éluant sous pression.

Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données (figure16) (**Ben saad, 2013**)

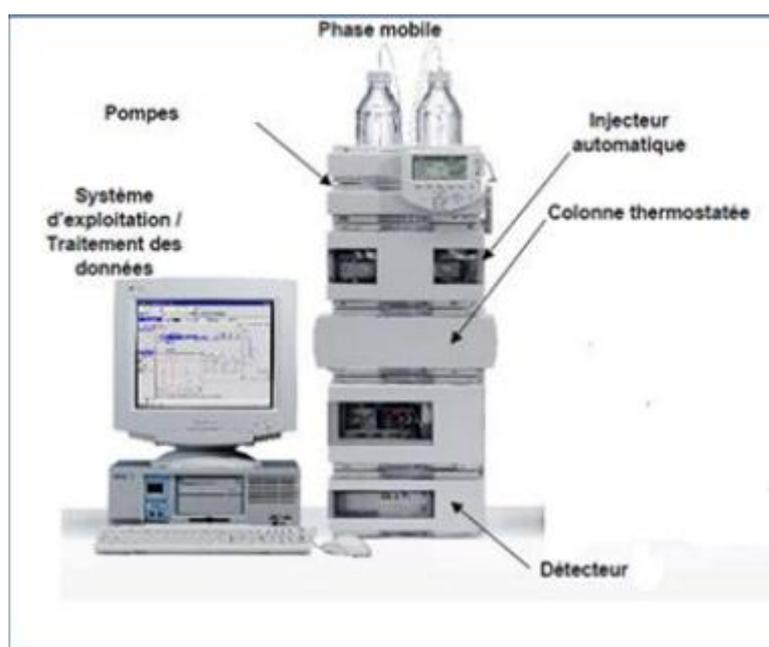


Figure 16 : Organes d'une chaîne HPLC (**Ben Saad, 2013**).

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).

2.3- Mise en évidence de l'activité pectinolytique :

L'activité pectinolytique est mise en évidence selon la méthode décrite par (**Reddy et Sreeramulu, 2012**). Elle est testée sur milieu contenant la pectine comme seule source de carbone. Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les boîtes sont couvertes avec la solution de

lugol pendant 15 minutes. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine.

2.4. Méthode analytique

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

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

En milieu alcalin et à chaud l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orange (Figure 17).

L'activité enzymatique est exprimée par l'unité internationale correspondant à une micromole d'acide galacturonique libéré par minute à 40 °C et à pH 5.

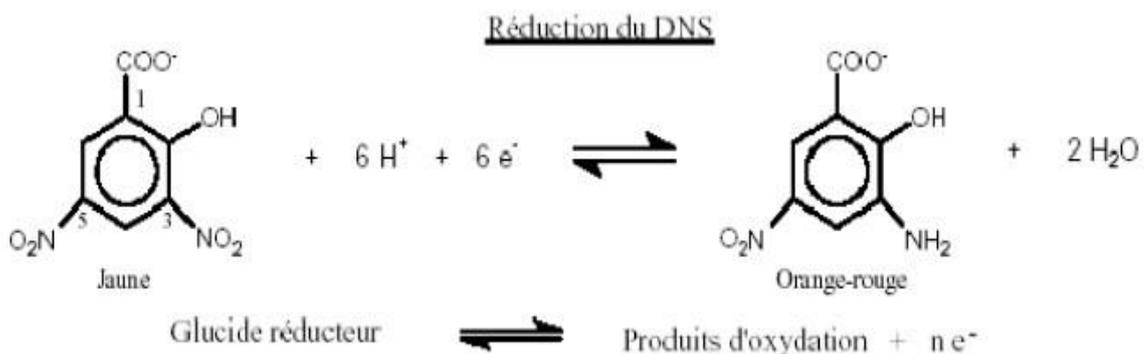


Figure 17: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (Bennamoun, 2017).

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

- Le mélange réactionnel est constitué de l'extrait enzymatique brut (100 µl), de 100 µl de substrat acide polygalacturonique (PGA) à 1% (w/v) dans du tampon (acétate de sodium 50 mM, pH 5), incubé à 40°C pendant 20 min.
- La réaction est arrêtée par addition de 400 µl de DNS. Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100°C pour le développement de la couleur.

- Après refroidissement dans un bain de glace, 400 µl d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminée à 540 nm.

La quantité de sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage (Figure 18) avec l'acide D-(+) galacturonique monohydraté (Sigma-Aldrich) à des concentrations de 0-2 mg/ml.

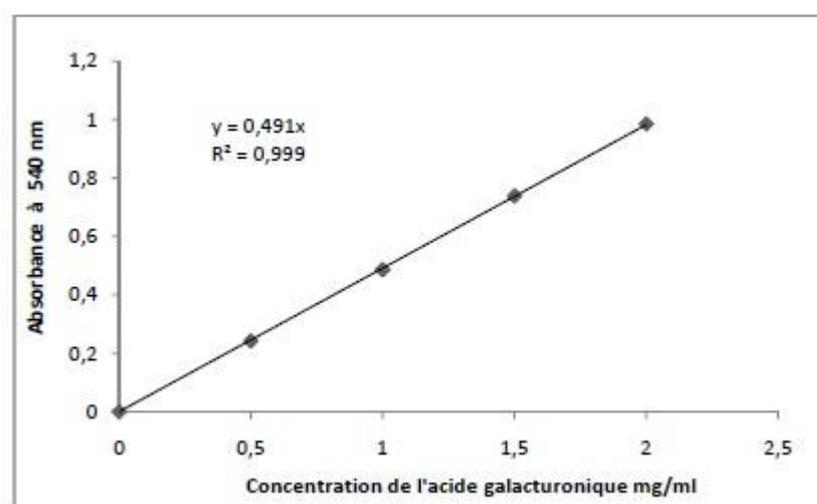


Figure 18: Courbe étalon de l'acide galacturonique (Bennamoun, 2017)

2.4.2-Dosage de l'activité de la pectine lyase

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

A 1 ml de pectine à 0.5% dans du tampon citrate-phosphate (0.1/0.2 M), pH 5.5, est ajouté 0.5 ml d'extrait enzymatique. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 20 minutes. 0.5 ml de la réaction sont prélevés et dilués 10 fois avec une solution d'HCl 0.01N.

L'augmentation de l'absorbance à 235 nm, est déterminée par rapport au témoin constitué de L'enzyme dénaturée (100°C pendant 5 min).

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

2.4.3-Dosage des protéines

- **Méthode de Lowry 1951**

Cette méthode est basé sur l'obtention d'un composé chromogène par la réaction d'oxydoréduction, cette dernière a lieu d'une part des groupements de protéines notamment les groupements phényles du tryptophane, de la tyrosine et dans une moindre mesure ceux de la cystéine et histidines (la liaison peptidique et aussi impliquée) et d'autre part, le réactif de Folin-Ciocalteu dont l'acide phosphomolybdotungstique est le constituant actif en milieu alcalin (**Lowry et al., 1951**). Cette réaction donne naissance à une coloration en bleu de molybdène (couleur bleu foncée) dont l'intensité est mesurée à 750 nm elle permet de doser du réactif de Folin-Ciocalteu par le complexe dans la figure 20 qui est dans le format original proposé par Lowry.

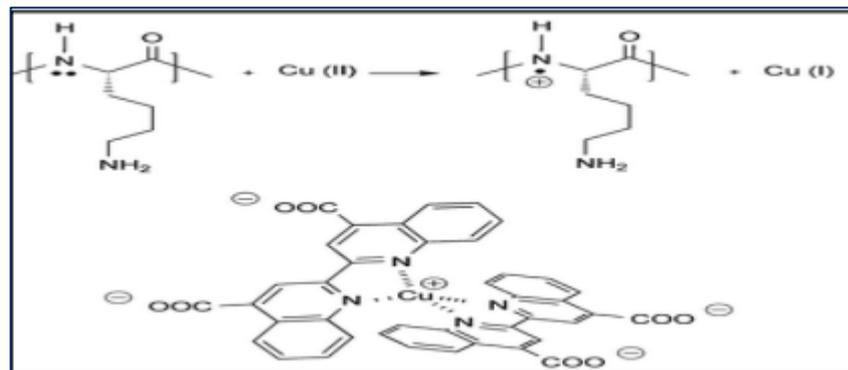


Figure19 : Principaux mécanismes réactionnels de la méthode de (**Lowry 1951**)

2.5-Bilan de purification

-L'activité spécifique

C'est le nombre d'unités enzymatiques rapporté au poids total de protéines (en mg) dans la solution enzymatique.

$$A_{sp.} = \frac{\text{Activité enzymatique (U)}}{\text{Quantité de protéines (mg)}}$$

C'est un paramètre essentiel, elle permet de suivre le degré de pureté des enzymes pendant leur purification. Elle augmente pendant les étapes de purification des enzymes. Elle est donc liée à la pureté de l'enzyme (**Bennamoun, 2020**)

-Rendement de purification (%)= Activité enzymatique de l'extrait purifié /Activité enzymatique de l'extrait brut×100

La purification des pectinases s'effectue par étapes séquentielles afin d'obtenir des enzymes pures qui peuvent être utilisées pour diverses applications industrielles. Une telle purification et la caractérisation des enzymes aideront à comprendre leurs propriétés et complètement les caractéristiques.

Choix de la stratégie de purification est basé sur l'application de l'enzyme à des fins diagnostiques et thérapeutiques ou en applications industrielle. Les enzymes de qualité en faible quantité (échantillon pur) sont utilisées en applications diagnostic et en thérapeutique alors qu'une quantité élevée à faible qualité (échantillon brut) est requise pour d'autres applications industrielles. Au cours de ces processus de purification, de nombreuses autres enzymes ou interférences les composés produits par le même organisme peuvent interférer avec le processus de séparation et donc une sélection rigoureuse de la stratégie de purification doit être suivie pour obtenir des enzymes de plus haute puretés et rendement. Quelques exemples de méthodes de purification utilisées dans les industries incluent la précipitation au sulfate d'ammonium Dialyse, ultrafiltration et précipitation à l'éthanol. En ammonium méthode de précipitation au sulfate, des sels de concentrations plus élevées sont utilisés pour modifier la solubilité et par conséquent, un fractionnement et une séparation faciles des enzymes pectinases peuvent être obtenus (**Ahmed *et al.*, 2016**).

Dialyse est une autre méthode de purification importante qui est couramment utilisée de nos jours pour séparer les pectinases et dans cette méthode, basée sur les taux de diffusion à travers le semi membranes perméables, les pectinases sont séparées (**Schuster *et al.*, 2018**). En cas d'ultrafiltration, les surnageant qui doivent être séparés sont autorisés à passer à travers des membranes UF de moindre porosité (0,1-0.01um) et une fois le processus de filtration effectué, les pectinases séparées restent concentrés dans les membranes UF tandis que les autres composés mineurs tels que les sucres et les acides aminés traversent la membrane et la séparation a lieu éthanol (**Fahmy *et al.*, 2015**). La méthode de précipitation est effectuée lorsque les impuretés solubles dans l'alcool doivent être éliminée et ainsi une forme purifiée de pectinase peut être obtenue (**Takci et Turkmen, 2016**). Ces méthodes peuvent fournissent des enzymes de rendements plus élevés mais avec moins de pureté alors que les méthodes chromatographiques telles que la filtration sur gel et l'échange d'ions peuvent être utilisés pour obtenir des enzymes de très haute purification et peut être utilisé pour diverses applications (**Zhou *et al.*, 2017**). En chromatographie par filtration sur gel, les enzymes sont généralement

fractionnés en fonction de leurs tailles alors que lors de la chromatographie d'échange d'ions, les biomolécules chargées telles que les enzymes sont séparées en fonction de leur affinité envers l'échangeur d'ions respectifs (**Yu et Xu, 2011**). Comme les techniques chromatographiques sont coûteuses lorsqu'elles sont appliquées pour des applications à grande échelle, développement de nanomembranes polymères perforées d'une résistance mécanique élevée et un faible coût de production peuvent être utiles lors de la purification de processus (**Peng Yuan et al., 2018**). Autres formes de nanomatériaux tels que les nanotubes de carbone, la fibre électrofilée, les membranes et les nanoparticules magnétiques peuvent également être utilisées pour la séparation biologique de ces pectinases à l'avenir (**Polizeli et al., 1991**).

L'efficacité de la purification est étudiée par des méthodes de dosage enzymatique appropriées développées pour mesurer l'activité des pectines lyases, polygalacturonases et pectine méthylestérases produites au cours des processus de fermentation. Le tableau 4 montre différentes méthodes de purification qui sont utilisées dans les procédés de production de pectinase.

Activité enzymatique par réduction de l'estimation du sucre :

Il existe de nombreux colorimétriques ainsi que la méthode de criblage rapide disponibles pour déterminer les activités de la polygalacturonase. Di-nitro la méthode salicylique (DNS), la méthode Nelson-Somogyi et les méthodes Miller sont les plus couramment utilisées pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs qui sont produits au cours des activités pectinases. Une unité d'activité pectinase a été définie comme 1 μmol de sucre réducteur libéré par minute en utilisant l'acide galacturonique comme standard. Les activités de dépolymérisation peuvent être détectées à l'aide de certaines méthodes viscosimétriques dans lesquelles la viscosité du mélange réactionnel en présence d'enzymes est détectée à l'aide d'un viscosimètre (**Mehmood et al., 2019**). Détermination des protéines et du poids moléculaire : La teneur totale en protéines de l'échantillon peut être principalement estimée par la méthode de Lowry et la méthode de Bradford en utilisant le sérum bovin Albumine (BSA) comme standard. Le poids moléculaire et l'homogénéité du produit purifié l'enzyme pectinase a pu être étudiée par Zymogram, SDS PAGE. De nombreuses études ont rapporté que le poids moléculaire moyen de la polygalacturonase se situe entre 35 et 80 kDa (Tableau 8).

Tableau 8 : Différentes méthodes de purification utilisées pendant le processus de production de pectinase dans l'industrie (John *et al.*, 2020)

Organisme et type d'enzyme	Méthode de purification	Degré de purification	Activité spécifique (μ /mg)	Rendement %
<i>Aspergillus niger</i> et pectinase	Précipitation au Sulfate d'ammonium	1,36	23,6	15,11
	Dialyse	2,87	46,9	16,33
	Chromatographie par filtration sur gel	5,59	97,2	12,96
<i>Neurospora crassa</i> et polygalacturonase	Précipitation à l'éthanol	1,35	7,17	42,72
	Chromatographie par filtration sur gel	56,14	298,65	28
<i>Bacillus sp</i> ZJ 407 et pectinase acide	Précipitation au sulfate d'ammonium	5,29	4,87	67,2
	DEAE-cellulose	83,32	76,66	8,17
	Sephadex G-100	120,07	110,47	5,00
<i>Aspergillus fumigatus</i> et pectinase	Précipitation au sulfate d'ammonium	1,22	10,66	68,09
	Chromatographie échangeuse d'ions	1,74	15,19	27,36
	Sephadex 200 gel filtration	4,45	38,88	26,16
<i>Schizophyllum commune</i> et pectinase	Précipitation au sulfate d'ammonium	1,22	141	11,93
	Dialyse	1,4	162	8,81
	Sephadex G-100 column	3,08	355	4,16
<i>Paenibacillus sp</i> et pectinase	Précipitation acétone	6,25	12,42	2,42
	Sephadex G-75	97,65	187,66	3,73
<i>Aspergillus niger</i> et pectinase	Précipitation acétone	1,2	8,33	19
	Sephadex G-75	8,5	60	10

Chapitre III

Résultats et discussion

1-Comparaison entre le système de répartition en trois phases et les Techniques chromatographiques classiques

Le système de partitionnement triphasé (TPP) en tant qu'outil non chromatographique efficace, est capable non seulement de purifier les protéines, mais aussi de les concentrer dans l'une des phases et d'améliorer leur activité enzymatique. L'application du TPP pour l'extraction et la purification des enzymes de coagulation du lait végétal et des attendrisseurs de viande des agents donnés. Le TPP est une méthode simple, économique et rapide de récupération des enzymes à partir de mélange enzyme. Cette technique peut être utilisée dans un processus de purification, dans les industries alimentaires, à savoir pour fournir des enzymes pour la fabrication du fromage et l'attendrissement de la viande. **(Gagaoua et Hafid, 2016)**

Par contre, il existe de nombreuses méthodes de purification conventionnelles utilisé pour récupérer et purifier les enzymes. La précipitation au sulfate d'ammonium suivie de chromatographie d'exclusion de taille et d'échange d'ions, chromatographie d'interaction hydrophobe, chromatographie d'affinité, ou une combinaison de ceux-ci méthodes. Tout cela prend du temps, lourd et coûteux. De plus, à chaque étape de ces protocoles conventionnels, une certaine quantité de l'enzyme cible est perdue et donne ainsi un faible rendement

2. Différentes études qui utilisant le système de répartition en trois phases

2.1. Exemple 1 : Purification des pectinases

Sharma et Gupta (2001) ont utilisé un partitionnement triphasé pour purifier en une seul étape les pectinases , à partir *Aspergillus niger* dans un milieu extrait de tomate.

La séparation en trois phases a été utilisée pour purifier les pectinases *Aspergillus niger* et de tomate par addition de t-butanol en présence de sulfate d'ammonium.

Le sulfate d'ammonium a été ajouté à la quantité désirée niveau aux extraits bruts de pectinases *Aspergillus niger* et extrait de tomate à 25 C, mélangé doucement pour dissoudre le sel suivi par l'ajout de t-butanol. Après 1 h, les mélanges ont été centrifugés (2000 g pendant 10 min) pour faciliter la séparation des phases

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que le rendement de *l'Aspergillus niger* 76% et le pour tomate 183% et des purifications de 10 fois de *l'Aspergillus niger* et 9 fois de tomate, et la préparation enzymatique purifiée finale a montré une seule bande sur SDS-PAGE après

coloration avec Coomassie Brilliant Blue R-250, avec un poids de 46 kDa ce qui est en accord avec la valeur rapporté plus tôt

2.2. Exemple 2 : Etude comparative entre la chromatographie échangeuse d'ions et le système de répartition en trois phases TPP pour purifier l'enzyme α -galactosidase :

Dhananjay et Mulimani (2009) Ont utilisé le système de répartition en trois phases (TPP) pour purifier α -galactosidase à partir d'un milieu fermenté *Aspergillus oryzae* dans diverses conditions requises pour atteindre une purification efficace des fractions α -galactosidase qui ont été optimisées.

L'addition de n-butanol, de t-butanol et d'isopropanol dans la présence de sulfate d'ammonium pousse la protéine hors de la solution pour former une couche de précipité interfaciale entre les couches aqueuses inférieures et organiques supérieures.

Les résultats obtenus montrent que l'étape unique de séparation triphasique, en saturant la concentration finale de sulfate d'ammonium (60%) avec 1:1 de t-butanol, a donné récupération d'activité de 92% avec une purification 12 fois à la seconde phase du TPP, et l'enzyme final purifier après TPP a montré une purification considérable sur SDS-PAGE avec un poids de 64 kDa. L'enzyme, après TPP, a montré une amélioration d'activité dans les solvants organiques.

Ces résultats sont comparés aux procédés conventionnels établis pour la purification de l' α -galactosidase produite par *Aspergillus oryzae* et globalement la technique TPP proposée a entraîné une réduction de 70 % de coût de purification par rapport à la chromatographie conventionnelle protocoles,

- **Comparaison du TPP avec d'autres techniques de purifications conventionnelles :**

Il est intéressant de comparer cette séparation basée sur le TPP stratégie avec celle basée sur les techniques de purification conventionnelles.

Lorsque, l'extrait brut de galactosidase a été appliqué à la purification conventionnelle (extrait brut-Wltration-précipitation sur gel Wltration suivie d'une chromatographie d'échange d'ions) a donné au total 6 opérations unitaires (**Ramalingam et Mulimani, 2004**) . En revanche, le processus TPP qui comprend l'ajout de sulfate d'ammonium et de t-butanol, une opération en

une étape produit une α -galactosidase globale et récupération de 92% avec purification 12facteurs avec beaucoup de concentration plus faible en sel.

Cependant, le TPP produit une augmentation favorable de la purification de (12 fois) α -galactosidase, par rapport à celui produit après les techniques de purification conventionnelles (4,1 fois). Une autre comparaison entre les processus mettent en évidence la supériorité du TPP approche (Tableau 9). Mise en œuvre de l'extraction TPP après, a entraîné une réduction du nombre d'unités opération impliquée dans les protocoles de chromatographie. Par conséquent, il y avait un avantage économique important dans la réduction du coût des opérations unitaires. Une telle analyse soutient le fait que le procédé TPP pour la récupération de la α -galactosidase est supérieur aux méthodes chromatographiques conventionnelles. De plus, un avantage notable par rapport à la précipitation de co-solvant glacial C2 est que, TPP via le t-butanol peut être pratiquement utilisé soit à température ambiante, soit même à température plus élevée. Par rapport à d'autres extractions liquides, comme la séparation en deux phases par la dextrine et le polyéthylène glycol (PEG) (**Tanuja et al., 2000**). Le TPP est beaucoup moins cher, sur en poids, que la dextrine et le PEG. Le TPP fonctionne du microlitre au millilitre, soit à partir de 0,5 l (rendement 89 % avec purification décuplé) dans un tube eppendroph à 2 ml (rendement 85 % avec purification octuple) en tube à essai et 50 ml (83% rendement avec purification octuple) dans une éprouvette graduée. Le volume en microlitres a mieux fonctionné, car il est facile à transporter hors certification et séparation du précipité interfaciale. Ce nécessite moins de butanol et son coût est proche de celui du réactif éthanol de qualité. Le TPP nécessite un peu moins de sulfate d'ammonium que la précipitation conventionnelle au sel. Un avantage dans l'ensemble séparation est que, la protéine précipitée par le TPP est nettement plus concentré que les autres purifications conventionnels techniques en une seule étape.

Tableau 9: Comparaison entre une chromatographie conventionnelle avec la technique TPP

Paramètres	Chromatographie échangeuse d'ions	Système de réparation en trois phases (TPP)
Facteur de séparation	Interaction ionique	Précipitation isoionique précipitation co-solvant relargage
Mode d'opération	Semi-continu	Grouper
Volume de travail requis	25–50 ml	0.2–10 ml
Temps	40 h	3 h
Température requis	Température base (0-4°C)	Température de chambre
Rendement globale du processus	11.5%	92%
Facteur de purification	4.1	12
Cout de l'agent de séparation	1,270.80 USA\$/500gm (DEAE-Sephehex)	19.80 USA\$/500 ml t-butanol 56.80 USA\$/500 gm a.sumplate
Cout global de processus	8.48 USA\$/column	2.5 USA\$/system

2.3. Exemple 3 : purification de l'enzyme pectine lyase

Babagil et Nadaroglu (2021) Ont purifié l'enzyme pectine lyase à partir de *Bacillus pumilus*, et la pectine lyase hybride de nanofleur (hNF-PL) a été synthétisée, pour la première fois dans ce travail. à cette fin, l'enzyme PL a été produite dans un milieu de culture solide en utilisant la bactérie *Bacillus pumilus*, et purifiée, en 191,8 fois avec un rendement de 78,2 % en utilisant la technique (TPP).

Les résultats obtenus montrent que l'enzyme PL a été déterminé comme ayant une seule sous-unité, et le poids moléculaire a été défini comme étant de 32,88 kDa avec une technique de Chromatographie sur gel. Il s'agit de la toute première étude à immobiliser facilement l'enzyme PL purifié sur des nanoparticules hybrides chitosane /pyrophosphate de calcium. La structure synthétisée de la nanofleur hNF-PL a été caractérisée par des méthodes chromatographiques SEM, FT-IR, XRD et TEM.

Dans la phase finale de l'étude, les effets des enzymes pures PL et hNF-PL sur la clarification et le taux de clivage des jus de fruits obtenus à partir de raisin noir, de grenade, de pêche, de pomme rouge et de prune qui ont été étudiés. À la lumière de cette étude, il a été déterminé que l'enzyme hNF-PL clarifiait les jus de fruits plus efficacement que l'enzyme PL pure

- **Purification d'enzyme pectine lyase**

L'enzyme PL a été purifié et caractérisé par la technique de partitionnement en trois phases (TPP). Pour cela, une optimisation du n-butanol puis une optimisation du sulfate d'ammonium ont été réalisées. Brièvement ; Du n-butanol et 8 g de sulfate d'ammonium ont été ajoutés au milieu réactionnel dans un rapport de 1 : 0,5, 1,0 : 1,0, 1,0 : 1,5, 1,0 : 2,0. Le mélange a été agité pendant 30 min dans un agitateur magnétique. Les solutions résultantes ont ensuite été centrifugées à 6000 x g pendant 10 min. Une formation triphasique dans le milieu réactionnel a été observée, telle que l'alcool surnageant comme phase supérieure, la phase intermédiaire de précipité et la phase inférieure d'eau. La phase intermédiaire précipitée a été dissoute dans un tampon phosphate 0,05 M (pH 8,0) avec 1 ml et dialysée contre le même tampon pendant 3 heures. Comme le montre la (figure 20) ci-dessous

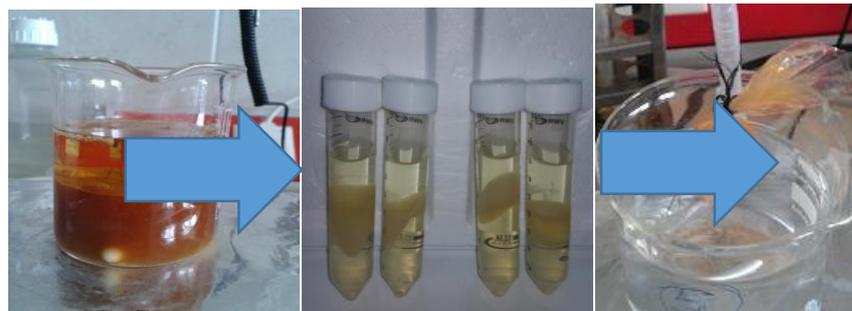


Figure 20 :Étapes de purification de l'enzyme pectine lyase par la méthode de partition en trois phases TPP (Babagil et Nadaroglu, 2021)

2.4. Exemple 4 : Caractérisation de l'exo-polygalacturonase

Dogana et Tari (2007) ont purifié d'enzyme exo-polygalacturonase produit par *Aspergillus sojae* ATCC 20235 en utilisant la partition en trois phases (TPP), une nouvelle technique de bio-séparation en une seule étape par rapport à la purification classique en plusieurs étapes, l'enzyme brute solution (pH 6,6) saturée à 30 % (p/v) avec du sulfate d'ammonium et avec un rapport extrait brut sur tert-butanol de 1:1 (v/v) à 25°C dans une

récupération de 25,5 % de l'exo-polygalacturonase avec une purification de 6,7 fois. L'activité et la stabilité de l'enzyme purifiée ont été étudiées à diverses plages de pH et de température (tableau 10)

les résultats obtenus d'après les expériences que le pH et la température optimaux pour une activité maximale ont été déterminés comme pH 4 et 55 °C. L'enzyme était stable à pH acide et alcalin pendant 2 h à 30 C. L'étude de stabilité thermique a montré que l'enzyme purifié présentait une inactivation une énergie de 68,41 kcal/mol et une valeur de demi-vie ($t_{1/2}$) de 3,6 h à 75 C présentant une grande stabilité thermique.

Les constantes cinétiques K_m et V_{max} utilisant l'acide polygalacturonique comme substrat étaient de 0,75 g l⁻¹ et 1,14 mol min⁻¹, respectivement. Le profilage a révélé que l'exopolygalacturonase purifié avait deux bandes avec des poids moléculaires de 36 et 53 kDa. L'enzyme a été complètement inhibée en présence de Mn²⁺ et SDS et induit de manière significative par l'EDTA, le glycérol et le -mercaptoéthanol

Tableau 10 : Diverses conditions utilisées pour le partitionnement en trois phases (TPP) de l'enzyme exo-polygalacturonase (**Dogana et Tari, 2007**).

Conditions	Température °C	Pourcentage de saturation avec sulfate d'ammonium (p/v)	Enzyme : tert-butanol rapport (v/v)	Degré de purification	Reprise d'activité (%)
1	25	25	1 :1	1.1	12.7 ± 2.4
2	25	25	1 :2	0.5	7.4 ± 5.9
3	25	30	1 :1	6.7	25.5 ± 1.8
4	25	30	1 :2	1.5	7.8 ± 3.2
5	25	40	1 :1	1.7	10.3 ± 3.3
6	25	40	1 :2	3.4	17.2 ± 1.3
7	37	25	1 :1	0.1	1.0 ± 0.3
8	37	25	1 :2	0.4	3.4 ± 0.8
9	37	30	1 :1	0.7	8.8 ± 1.4
10	37	30	1 :2	1.2	9.8 ± 1.4
11	37	40	1 :1	1.8	21.6 ± 4.7
12	37	40	1 :1	1.5	9.8 ± 1.5

2.5. Exemple 5 : Extraction de l'époxyde hydrolase

Harshada *et al* (2020) ont purifié l'enzyme époxyde hydrolase de Glycine max et récupéré en une seule étape en utilisant une partition en trois phases (TPP). Il s'est avéré qu'il était exclusivement partagé dans la phase de précipité interfaciale.

Le TPP a été exploré pour l'extraction de l'époxyde hydrolase en utilisant du carbonate de diméthyle comme phase organique et du sulfate d'ammonium comme phase saline. Il a ensuite été combiné avec une irradiation par micro-ondes pour l'intensification du processus, et l'effet de l'irradiation par micro-ondes sur l'étendue de la récupération d'extraction a été étudié.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de récupération et le facteur de purification obtenus dans le TPP étaient respectivement de $121,2 \pm 1,6$ % et $2,14 \pm 0,03$, dans les conditions optimisées de précipitation au sulfate d'ammonium à 40 %, rapport extrait brut/solvant de 1:1,5 (v/v) à 45 °C.

Ces conditions optimisées ont ensuite été exploitées sous irradiation par micro-ondes réduisant le temps de contact de 1 h à 8 min avec une puissance micro-ondes de 20 W et un cycle d'utilisation de 50 %, atteignant une récupération de $142,6 \pm 1,9$ % et un facteur de purification de $2,38 \pm 0,02$.

Le pourcentage de récupération a été amélioré jusqu'à 1,17 fois avec l'utilisation du TPP assisté par micro-ondes (MTPP). Le TPP assisté par micro-ondes combiné s'est avéré être une technique verte et efficace pour la récupération et la purification partielle de l'époxyde hydrolase à partir de Glycine max.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de cette étude est la comparaison entre la technique de partitionnement en trois phases avec les techniques chromatographiques conventionnelles sur l'extraction et la purification des macromolécules (protéine et enzymes).

Les principaux avantages des enzymes industrielles par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnière et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmenté de façon importante par l'amélioration des souches microbienne et l'optimisation des conditions de production.

Le TPP est une technique de purification en trois étapes a été utilisé avec succès pour la récupération d'une grande variété de macromolécules de divers sources naturelles. En effet, la température, le pH, le sulfate d'ammonium et le t-butanol affectent le rendement et le degré de purification pour cela une optimisation des paramètres est nécessaire, puis les techniques classiques (chromatographiques) classé selon la phase mobile et stationnaire sont très coûteux, difficile à manipuler et prend du temps.

Finalement, on conclue que, les étapes de le TPP sont moindres, le temps de traitement est une opération plus courte et à plus grande échelle est plus facile. Parce que parmi ces améliorations, il peut également y avoir une récupération avec une pureté acceptable que les résultats obtenus à partir de techniques de purification conventionnelle.

Au cour de ces dernières années, le TPP est concéderer comme le centre d'intérêt des chercheurs dans l'industrie agroalimentaire essayant de développer cette technique pour toucher un maximum des molécules afin de remplacer les techniques conventionnelle, vu l'absence de matériel adéquat pour cette étude la réalisation d'une séparation et purification dans un laboratoire spécialisé été irréalisable.

.

Références bibliographiques

Ait Kaki Amel, L' α -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides : Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification, 2017.

Aparna Sharma., M.N. Gupta. (2001). Purification of pectinases by three-phase partitioning. 23:1625–1627.

Armand, S., Wagemaker, M.J., Sanchez-Torres, P., Kester, H.C.M, van Santen, Y., Dijkstra, B.W., Visser, J., Benen, J.A.E. (2000) The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site directed mutagenesis. J Biol Chem 275(1):691-696.

Autran J. C. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 3ème Ed. Technique et Document, Paris, 115-137.

Aynur Babagil ., Hayrunnisa Nadaroglu.(2021). Purification of Pectin Lyase Enzyme from *Bacillus pumilus* Bacteria by Three-Phase Partitioning Method (TPP), Nanoflower Preparation and Investigation of Fruit Juice Clarification. 3938 – 3955.

Bayraktar H., Önal S. (2013). Concentration and purification of α -galactosidase from water melon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. Sep. Purif. Technol., 118, 835–841.

Bennamoun Leila. (2017) « Mémoire de doctorat en sciences : Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase : Purification et caractérisation enzymatique ». spécialité Biochimie et Microbiologie Appliquées, Université Constantine1 .170 page.

Bennamoun Leila. (2020) cours enzymologie « chapitre 1 : Généralités sur les enzymes » université des frères Mentouri, Constantine1.

Ben saad Latifa, Mémoire Pour l'obtention du Mastère en chimie analytique « étude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma ». Université Tunis El Manar Faculté des Sciences de Tunis.2013 ; 63page.

Bonner PLR. (2007). Protein purification. Taylor and Francis Group, New York

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2ème édition. Masson. Paris. 16, 41,110,183,364

Bussink, H.J., Brouwer, K.B., de Graaff L.H.,Kester, H.C.M.,Visser, J. (1991). Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. Curr Genet 20(4): 301-307.

- Collmer A., Ried J.L., Mount M.S.** (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*. 161: 329–335
- Combo M., Aguedo M., et Paquot M.** (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications Possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15, 153-164.
- Delattre C.** (2005). Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, Valois Santerre, 5-10.
- Dennison C., Lovrien R.** (1997). Three phase partitioning: concentration and Purification of proteins. *Protein Expr Purif* 11: 149-161.
- Dennison C.** (2011). Three-phase partitioning, in *Methods in protein biochemistry*. Walter de Gruyter: Berlin, Germany 1-5.
- Dennison, C.** (2011). Three-phase partitioning. In H. Tschesche (Ed.), *Methods in protein biochemistry* (pp. 1–5). Berlin, Germany: Walter de Gruyter.
- Dhananjay S. K. ., Mulimani V. H** (2009). Three-phase partitioning of α -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. 36:123–128.
- Doultani S., Turhan KN., Etzel MR.** (2004). Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. *Process Biochem* 39:1737–1743
- Drouin M.** (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître ès sciences (M.Sc.). Canada.
- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Vniegra-Gonzalez G.** (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 221-227.
- Gagaoua Mohamed, kahina Hafid.** (2016). Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification.. Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000, Constantine, Algeria. , *Biosensors Journal*.5 :1
- Gagaoua Mohamed.** (2018). Aqueous Methods for Extraction/Recovery of Macromolecules from Microorganisms of Atypical Environments: A Focus on Three Phase Partitioning. Volume Université Clermont Auvergne, INRA, Saint-Gene`s-Champanelle, France.45, ISSN 0580-9517,
- Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A.** (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase

Production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioresource Technology. 99: 4597-4602

Gautam A., Sangeeta Y., Dinesh Y.(2017).Production, purification and Biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. 7(2): 122.

Gainvors, A., N. Nedjaoum, S. Gognies, M., Muzart, M. Nedjma., A. Belarbi. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 183:131-5.

Gordon MH. (1990) .Principles and applications of gas chromatography in food analysis. E. Horwood, New York.

Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008).Biochimie de HARPER. 3ème édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.

Gummadi, S.N., Manoj, N., Kumar, D.S. (2007). Structural and Biochemical Properties of Pectinases. In Industrial Enzymes; Polaina, J., MacCabe, A.P., Eds.; Springer: Heidelberg, pp. 99-115.

Haberra S.(2014).Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse de Doctorat. Faculté Des Science Département De Biochimie.17p.

Hadfield K.A., Bennett A.B. (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function.Plant Physiology. 117: 337-43

Handa S., Sharma N., Pathania S. (2016). Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus sp.* C4 under solid state fermentation. Fermentation. 2, 10; doi: 10.3390/fermentation2020010.

Harshada M., Salv i., Ganapati D., Yadav., (2020).Extraction of epoxide hydrolase from Glycine max using microwave-assisted three phase partitioning with dimethyl carbonate as green solvent. Food and Bioproducts Processing .159–167.

Hayashi, K., Inoue, Y., Shiga, M., et al. (1997).Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03±01173. Phytochemistry 45, 1359±1363.

Heftmann E (end). (2004) .Chromatography, 6th edition. Fundamentals and applications of Chromatography and related differential migration methods. Part A: fundamentals and techniques. Part B: applications. J Chromatography Library Servols 69A and 69B. Elsevier, Amsterdam.

Henrissat, B. (1991).A classification of glycosyl hydrolases based on amine acid sequence similarities. Biochem J 280 (pt 2) : 309-316

- Huang, J.H., Schell, M.A.** (1990). DNA sequence analysis of *pglA* and *so/anacearum*. *J Bacteriol* 172(7): 3879-3887..
- Jayani r.s., saxena s., gupta r.** (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review *Process Biochem.*, 40, 2931-2944
- Jenkins, J., Mayans, O., Pickersgill, R.** (1998).Structure and evolution of parallel betahelix proteins. *J Struct Biol* 122(1-2) : 236-246.
- Juliana John., K.K. Surendranathan Kaimal., Matthew L. Smith, Pattanathu K.S.M. Rahman., Padmanaban Velayudhaperumal Chellam.**(2020).Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review S0141-8130(20)33676-X
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A. and Tewari, R.** (2000).Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 277±282.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R.** (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology.* 77: 215–27.
- Khan, N.Q., Albrecht, H., Ruttkowski, E., Loffler, F., Gottschalk, M., Jany, K. D.** (1990). Nucleotide and derived amino acid sequence of a pectinesterase Cdna isolated from *Aspergillus niger* strain RH5344. *Nucleic Acids Research.* 18, 4262 p.
- Kheder F.**(2007).Production et Purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique De Lorraine.4-39p.
- Kiss E., Szamos, J., Tamas, B., & Borbas, R.** (1998).Interfacial behavior of proteins in threephase partitioning using salt-containing water tert-butanol systems. *Colloids and Surfaces A—Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(2–3), 295–302.
- Kumar, P., & Suneetha, V.** (2014).Natural, culinary fruit peels as a potential substrate for pectinolytic enzyme *int. J. Drug Dev. Res*, 6, 109-118
- K.W. Chew., T.C. Ling., P.L. Show.**(2018) Recent developments and applications of three phase partitioning for the recovery of proteins, *Sep. Purif. Rev.* 1–13.
- Lamrini S.** (2012).Etudes préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Mémoire de magéster. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.14-28p.
- Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O.** (2001).Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, end Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds

- Li, Y., Xiang, H., Liu, J., Zhou, M., & Tan, H.** (2003). Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from Halobacterium strain AS7092. *Extremophiles*, 7(5), 401–407. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0335-6>.
- Louhab Hassina ;** « mémoire en vue de l'obtention du diplôme master : Métabolites primaires de fenouil » Spécialité : Biochimie appliquée; Université Akli mohand oulhadj–Bouira, 2018. 50 page.
- 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.
- Markovic, O., Janecek, S.** (2001). "Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution." *Protein Eng* 14(9) : 615-631.
- Massaoudi Y.** (2015). Contribution à la recherche et l'isolement de *Dickeya sp.* (*Erwinia chrysanthemi*) et à la caractérisation des bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques et à effet antagoniste de *Dickeya sp.* Mémoire de Magister. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 13p
- Mehrnouche A., Yazid M., Khanani Z.** (2014). Purification and characterization of thermal alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *Eur. Food Res. Technol.* 239: 21-29
- Merve K., Antonio G., Sousa., Marie J.C., Susanne O. Sørensen., Marie .C.R.** (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different condition influence of acid type and pH of extraction. 114: 1319–1326.
- Mondal, K., Gupta, M. N.** (2006). The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomolecular Engineering*, 23(2–3), 59–76. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.01.004>.
- Morozova VV., Semenova MV., Salanovich TN.** (2006). Application of neutral-alkaline pectate lyase to cotton fabric boil off. *Appl Biochem Microbiol*; 42: 603-8.
- Nergiz Dogana., Canan Tari.,** (2007). Characterization of three-phase partitioned exopolygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. 43–50.
- Pagès, S., Heijne, W.H.M, Kester, H.C.M, Visser, J., Benen, J.A.E.** (2000). "Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 275(38) : 29348-29353.
- Patel R., Dodia M., Singh S.P.** (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40; 3569– 3575.

- Parenicová L., Benen J.A., Kester H.C., Visser J.** (2000). *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. The Biochemical Journal. 345: 637–644
- Paule, B. J., Meyer, R., Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F. .** (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Protein Expression and Purification, 34(2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.12.003>.
- Patil S.R., Dayanand A.** (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid state conditions. Bioresource Technology. 97:2054–2058.
- Pedrolli DB.** (2008). Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus*. M.Sc. Thesis, São Paulo State University, Rio Claro, São Paulo, Brazil.
- Pfeiffer C, Rogers LM, Gregory JF.,** (1997). Determination of folate in cereal-grain food products using tri-enzyme extraction and combined affinity and reverse-phase liquid Chromatography. J Agric Food Chem 45:407–413.
- Phutela U., Dhuna V., Sandhu S., Chadha B.S.** (2005). Pectinase and polygalacturonase Production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orangepeels. Brazilian Journal of Microbiology. 36(1): 63–69.
- Pike, R. N., Dennison, C.**(1989). Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. Biotechnology and Bioengineering, 33(2), 221–228. <https://doi.org/10.1002/bit.260330213>
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K., Jenkins, J.**(1998).Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora ssp. carotovora*. J Biol Chem 273(38) :24660-24664.
- Pickersgill R.W., Scott M., Smith D., Worboys K., Jenkins J.** (1999).Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the endo-polygalacturonase from *Erwinia carotovora ssp.*. Acta Crystallographica section D Biological Crystallography. 55(1): 320-322.
- Prade, R.A., Zhan, D., Ayoubi, P., Mort, A.J.** (1999).Pectins, pectinases and plant±microbe interactions. Biotechnology and General Engineering Review 16, 361±391.
- Professeur Jean-Louis Cuq.** (2001). Cours chromatographie liquide, Université Montpellier ,p4
- Purdon M. P.,** (1991).Application of HPLC to lipid separation and analysis: Sample Preparation. In: Analysis of Fats, Oils, and Lipoproteins (E. G. Perkins, ed.). AOCS Press,

Champaign, IL, pp. 166–192.

Qureshi A.S., Bhutto M.A., Chisti Y., Khushk I., Dahot M.U., Bano S. (2012). Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in adate syrup medium. *African Journal of Biotechnology*. 11(62): 12563–12570.

Rao, M.N., Kembhavi, A.A., Pant, A. (1996). "Implication of tryptophan and histidine in the active site of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus*. elucidation of the reaction mechanism." *Biochim Biophys Acta* 1296(2) : 167-173.

Restino C. (2012). Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergillus* par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne- Ardenne, France

Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Sturm, W., Soccol, C. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(22), 10657-10662.

Rouessac, F. ; Rouessac, A.; Cruché, D., (2004). *Analyse chimique Méthodes et Techniques instrumentales modernes : Méthodes et techniques instrumentales modernes.* Dunod - 6ème édition

Ridley B. L., O'Neill M. A. and Mohnen D. (2001). Pectins structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6): p. 929– 967.

Rutkowski, E., Labitzke, R., Khanh, N.Q., Loffler, F., Gottschalk, M., Jany, K.D. (1990) "Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *Aspergillus niger* RH5344." *Biochim Biophys Acta* 1087(1) : 104-106.

Safinur Yildirim Çelika., Nazan Demirb., Yaşar Demirb., Ahmet Adiguzelc., Medine Gulluced. (2014). Production of pectin lyase from *Geobacillus pallidus* p26, purification, characterization and fruit juice application. *Acta Chimica Slovaca*, Vol. 7, No. 1, 2014, pp. 57—63

Saxena, S., Shukla, S., Thakur, A., & Gupta, R. (2008). Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*,;55 (1) :33-51.

Sharma N., Rathore M., Sharma M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization And applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 12(1): 45-60.

Sharma S., Mandhan R.P., Sharma J. (2012). Utilization of agroindustrial residues for pectinase production by the novel strain *Pseudozyma sp.* SPJ under solid state cultivation. *Annals of Microbiology*. 62: 169–176.

- Sharma A., Gupta M.N.** (2001). Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease / amylase inhibitor. *Process Biochem.*, 37, 193–196.
- Sidra Batool¹, M. Javaid Asad¹, S. M. Saqlan Naqvi¹, Raja Tahir Mahmood¹, A. Guffar², M. Gulfraza¹, Saqib H. Hadri¹.** (2013). Production and partial purification of pectin lyase by *Aspergillus niger* grown on orange peels. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(13), pp. 1144-1149.
- Sinitsyna OA, Fedorova EA, Semenova MV.** (2007). Isolation and Characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochem (Moscow)* 2007; 72(5): 565-71.
- Simon j.charnock ., Barry Mc Cleary .**(2005). les enzymes: application industrielles et analytique (extrait de la revue oenologie) .
- Sloneker JH.,** (1972). Gas–liquid chromatography of alditol acetates. *Methods Carbohydr Chem* 6:20
- Stratilova, E., Markovic, O., Skrovinova, O., Rexova-Benkova, L., Jornvall, H.** (1993) "Pectinase *Aspergillus sp.* polygalacturonase: multiplicity, divergence, and structural patterns linking fungal, bacterial, and plant polygalacturonases." *J Protein Chem* 12(1) :15-22.
- Sutherland, J.W.** (1995). Polysaccharides lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, pp: 223-347.
- Szamos, J., Janosi, A., Tamas, B., & Kiss, E.** (1998). A novel partitioning method as a possible tool for investigating meat. I. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und- Forschung A— Food Research and Technology*, 206(3), 208–212. [https://doi.org/ 10.1007/s002170050244](https://doi.org/10.1007/s002170050244)
- Tapre, A. R., Jain, R. K.** (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. 21(2): 447-453.
- Tan KH, Lovrien R .**(1972). Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures. *J Biol Chem* 247: 3278-3285.
- Takia Atika.** (2003) «Mémoire de fin d'études : Amélioration CO₂ et He avec la CPG »
- Thakur B. R., Singh R. K. and Handa A. K.**(1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 37(1): p.47-73
- Van Alebeek GJWM, Christensen TMIE, Schols HE, Mikkelsen JD, Voragen AGJ.**(2002). Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem*; 277(29): 25929-36.
- Van Santen Y., Benen J.A.E, Schroter K.H., Kalk K.H., Armand S., Visser J., Dijkstra B.W.** (1999) 1.68 Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and

identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(43): 30474-30480.

Voragen, A.G.J.; Pilnik, W.; Thibault, J.-F.; Axelos, M.A.V.; Renard, C.M.G.C.(1995). Pectins. In *Food Polysaccharides and their Applications*, Marcel Dekker Inc.: New York, , pp 287-339

-Ward, W. W. (2008). USA patent no.

-Ward, W. W. (2009). Three-phase partitioning for protein purification. *Innovations in Pharmacy and Pharmaceutical Technology*, 2009, 28–34.

Yadav S., Yadav P., Yadav D., Yadav K. (2009). Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*. 44: 1–10.

Yoder, M.D., Jurnak, F. (1995). "Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds." *Faseb J* 9(5) : 335-342.

Yapo B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, .86(2): p. 373–385

-**Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., & Wu, J. Y.** (2017). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1327418>

Zeni, J., Pili, J., Cence, K., Toniazzi, G., Treichel, H., & Valduga, E. (2015) Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 38(12), 2497-2502.

Site web:

Web1: http://staff.univbatna2.dz/sites/default/files/ghedadba_nabil/files/cours_2_chromatographie.pdf

Web 2: <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/RENDEMENT.html>

Présenté par : CHAFI Ines et DRIAS Rihana

Date de soutenance : 22 septembre 2021

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biochimie**

Thème :

Séparation et purification des enzymes pectinolytiques d'origine microbienne : Comparaison entre les méthodes conventionnelles et le système TPP.

Résumé :

Ce travail s'intéresse à la séparation, et à la purification des enzymes pectinolytiques d'origine microbienne. La comparaison de la technique de partitionnement en trois phases (TPP) avec les techniques chromatographiques conventionnelles a montré que, le TPP est une technique d'extraction et de récupération des enzymes en une seule étape à partir des macromolécules. Contrairement aux techniques conventionnelles, le rendement de la purification par le système TPP est influencé par plusieurs facteurs à savoir : la température, le pH, la concentration en sulfate d'ammonium et en t-butanol.

Les enzymes pectinolytiques sont un système complexe de protéines, qui comprennent des hydrolases, des lyases et qui jouent un rôle important dans la dégradation des substances pectiques. Ces enzymes occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation dans différents secteurs industriels (IAA, textile, papeterie,...).

En effet, la purification des pectinases est une étape essentielle afin d'obtenir des enzymes pures qui peuvent être utilisées dans divers procédés industriels. Une sélection rigoureuse de la méthode de purification doit être réalisée pour obtenir des enzymes de plus haute pureté avec un rendement élevé.

Finalement, les techniques chromatographiques conventionnelles se sont révélées des méthodes coûteuses et lentes, contrairement au système TPP qui est facile, rapide, et moins coûteux.

Mot clés : Enzymes pectinolytiques, Système TPP, Techniques chromatographiques, Purification.

Jury d'évaluations :

Président	: Mme DAKHMOUCHE S.	M.C.A, (ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine).
Rapporteur	: Mme BENNAMOUN L.	M.C.B, (Université Frères Mentouri, Constantine1).
Examineur	: Mme SEMRA I.	M.A.A, (Université Frères Mentouri, Constantine1).

