

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Polytechnique



Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement

Thèse de Doctorat d'Etat

En Génie de l'Environnement

Présentée par : **DJABALI DJAAFAR**

Ingénieur Magister ENP

Thème :

**IMMOBILISATION de L' α -AMYLASE (de source : *Aspergillus Oryzae*)
SUR UN POLYSACCHARIDE BIODEGRADABLE
APPLICATION : HYDROLYSE DES AMIDONS DE POMME DE
TERRE LOCALE**

Mr	R.KERBACHI	Professeur,	ENSP,ALGER	Président
Mme.	A.HASSANI	Professeur,	ENS Kouba-Alger,	Examinatrice
Mr	A.SELATNIA	Professeur	ENSP,ALGER	Examineur
Mr	H.LOUNICI	Professeur,	Université.Mouloud .Maameri,Tizi ousou	Examineur
MR.	B. NADJEMI	Professeur,	ENS Kouba-Alger,	Directeur de thèse
Mme.	N.BELHANECHÉ	Professeur,	ENSP,ALGER	Codirectrice de thèse

Année Universitaire 2007/2008

ملخص

إن العمل المنجز يتلخص في تجريب ودراسة عملية تثبيت أنزيم α -أميلاز على متعدد سكريات طحلي بطريقة فيزيائية (الإمتزاز) و طريقة كيميائية بتشكيل رابطة أميدية بين الوظيفة الكربوكسيلية لمتعدد السكريات و الوظيفة الأمينية للأنزيم في وجود منشط من نوع كربونثائي إמיד (EDCI). حُضرت كريات من ناتج التثبيت بالطريقتين وعينت بعض خصائصها الفيزيائية والكيميائية. كما تم استخلاص النشا من بطاطا محلية و تعيين بعض خصائصه و تحليله المائي بالإنزيم الحر و بكريات الألجينات الحاملة للإنزيم المثبت.

قبل القيام بعملية تثبيت الأنزيم ، أجرينا تجارب لفحص استقرار مادتين من متعددات السكريات و هما كربوكسي مثيل سليولوز (CMC) و ألجينات الصوديوم بغرض استعمالهما كحاملين للأنزيم. تم الفحص بقياس توزيع كتلتيهما الجزيئيتين لوحدهما و بعد مزجهما مع الأنزيم، باستعمال كروماتوغرافيا الفصل الفراغية و تبديد ضوء الليزر (SEC/MALLS). بين التحليل أن كربوكسي مثيل السليولوز يتحلل بوجود الأنزيم. تم اختيار ثلاثة عينات من ألجينات الصوديوم (A) , (B) , (C) لحمل الأنزيم بعد أن بيّنت نتائج التحليل استقرارها بوجود الأنزيم و تم التثبيت بطريقتين: الطريقة الأولى طريقة فيزيائية تعتمد على امتزاز الأنزيم على ألجينات الصوديوم ثم تشكيل كريات من الناتج و الطريقة الثانية هي طريقة كيميائية تعتمد على تحفيز الألجينات بواسطة 1-إيثيل-3-(3-ثنائي ميثيل-أمينو) - بروبييل [كربو ثنائي إמיד، (EDCI) و ربط الأنزيم كيميائيا على ألجينات الصوديوم ، ثم شكلت منها كريات .

تأكدنا من نجاعة التثبيت بقياس توزيع الكتل الجزيئية للألجينات بعد عملية التثبيت و بقياس نسبة الكربون و الأزوت في كل من الأنزيم المتبقى و الألجينات في مختلف مراحل التثبيت. كما تم اقتراح نماذج رياضية، مكنتنا من تقدير درجة تنشيط مادة ألجينات الصوديوم بواسطة مادة EDCI و تقدير مردود التثبيت بالطريقتين الفيزيائية و الكيميائية .

بيّنت دراسة بعض العوامل المؤثرة على مردود التثبيت الفيزيائي أنه كان أعظما من أجل تركيز الإنزيم مساو 3 غ/ل و تركيز الألجينات 10 غ/ل و عند قيمة رقم هيدروجين مساوية $pH=4,7$ و عندما تكون قيمة النسبة بين كمية حمض الميليرونيك (M) و كمية حمض الغليرونيك (G) للألجينات مساوية $(M/G)=0.5$. بينما تحصلنا على المردود الأعظمي للتثبيت الكيميائي من أجل القيم التالية : تركيز الإنزيم 2 غ/ل و قيمة رقم الهيدروجين السابقة و قيمة النسبة بين المنشط و عدد مولات وحدات متعدد السكريات هي $R=0,5$ و القيمة $(M/G)=1.2$ ويكون تركيز ألجينات الصوديوم مساو 18 غ/ل .

بعد إجراء عدة تجارب لاستخلاص النشا من البطاطا اخترنا تطبيق طريقتين تعتمدان على نفع البطاطا في محلول مائي من أكسيد ثنائي الكبريت و من هيدروكسيد الصوديوم . أعطت الطريقة الأولى مردودا أحسن (56%) مقارنة بمردود الطريقة الثانية (38.9%) ، بينما أعطت طريقة هيدروكسيد الصوديوم نشا أكثر نقاوة ، قدرت بنسبة 99.31% أمام 97.39% .

و بيّنت الدراسة الحركية لتحليل النشا المستخلص بالإنزيم الحر و المثبت بطريقة كيميائية أن التفاعل يتم حسب نموذج ميخائيلس و منتن و أنّ الثوابت الحركية V_m و K_m تتعلق قيمها و كيفية تغييرها بطريقة استخلاص الإنزيم و حالة الإنزيم .

الكلمات المفتاحية: ألفا أميلاز ، تثبيت الإنزيم ، ربط بيني ، متعدد السكريات ، النشا ، التحلل المائي، الثوابت الحركية .

Résumé

Le présent travail se résume en l'immobilisation de l' α -amylase sur un polysaccharide algaire, l'alginate de sodium, par adsorption et greffage chimique et la préparation d'une matrice de biocatalyseur sous forme de billes par gélification, en l'isolation et la caractérisation partielle du substrat (amidon) à partir d'une matière première locale (pomme de terre du sud de l'Algérie) et enfin en l'étude cinétique d'hydrolyse de l'enzyme immobilisée chimiquement sur des amidons extraits dans différentes conditions.

Avant d'effectuer l'immobilisation, des tests de stabilité de deux supports polysaccharidiques (la carboxyméthyl cellulose ou CMC, et l'alginate de sodium) en présence de l' α -amylase ont été réalisés, par la mesure de la distribution des masses moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffraction de la lumière laser (SEC/MALLS) de ces polymères seuls et après contact de l'enzyme. L'analyse a montré une dégradabilité de la CMC. Trois alginates (A), (B) et (C), ayant montré une stabilité vis-à-vis de l' α -amylase, ont été choisis pour l'immobilisation. Deux méthodes d'immobilisation ont été effectuées : La première est une méthode physique se basant sur l'adsorption de l'enzyme sur l'alginate suivie par gélification et formation des billes, la deuxième méthode se base sur l'activation de l'alginate par l'EDCI (1-éthyl-3-[3-(diméthyl amino)-propyl] carbodiimide hydrochlorique) dans un milieu aqueux suivie par un attachement chimique. L'alginate greffé chimiquement a été réticulé sous forme de billes. L'efficacité de l'immobilisation a été démontrée par la mesure de la distribution des masses moléculaires par SEC/MALLS et les taux d'azote et de carbone des alginates dans les différentes étapes d'immobilisation.

Les modèles mathématiques de calcul proposés ont permis d'estimer le degré d'activation des alginates par l'EDCI et les taux d'immobilisation par les deux méthodes. L'influence de certains facteurs sur le taux d'immobilisation physique a montré que les concentrations en enzyme et en alginate de 3g/l et 10g/l respectivement donnent les meilleurs taux de fixation de l'amylase à un pH de 4,7 avec une valeur plus élevée pour l'alginate C (M/G=0,5). Le rendement maximal pour l'immobilisation chimique est observé pour une concentration en enzyme 2g/l, un pH=4,7, un rapport $R(n_{EDCI}/n_{an,alg})=0,5$, M/G=1,2 et une concentration en alginate de 18g/l.

Deux méthodes d'extraction humides de l'amidon, à partir de la pomme de terre locale, ont été testées : la méthode bisulfite et la méthode alcaline. La méthode bisulfite donne un rendement élevé comparé à la méthode alcaline (56,1% devant 38,9% par matière première sèche). Cependant, l'extrait d'amidon obtenu par la méthode alcaline est plus pur (99,31% d'amidon total contre 97,39%).

L'étude cinétique de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par les deux méthodes, par l'enzyme libre ou immobilisée par voie chimique, montre que cette cinétique obéit au modèle de Michaelis-Menten. Les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} dépendent des méthodes d'extraction et de l'état de l'enzyme.

Mots clés : α -amylase, immobilisation, réticulation, polysaccharide, amidon, Hydrolyse, paramètres cinétique.

Summary

The present work is summarized in the immobilization of the α -amylase on a polysaccharide, the sodium alginate, by adsorption and chemical grafting and the preparation of a biocatalyst matrix in the form of beads by gelation. The isolation and partial characterization of the substrate (starch) from a local raw material (potato of the south of Algeria). And finally, the kinetic study of hydrolysis of the enzyme immobilized chemically on starches extracted under various conditions.

Before carrying out the immobilization, tests of stability of two polysaccharidic supports (the carboxymethyl cellulose CMC, and the sodium alginate) in the presence of the α -amylase were realized, by the measurement of the distribution of the molecular masses by Size Exclusion Chromatography/Multi Angle Laser Scattering (SEC/MALLS) of these polymers alone and after contact of the enzyme. The analysis showed a degradability of the CMC. Three alginates (A), (B) and (C), have shown stability within the presence of the α -amylase, they were selected for the immobilization. Two methods of immobilization were carried out: The first is a physical method based on adsorption of the enzyme on alginate followed by gelation and formation of the beads, the second method focused on the activation of alginate by the EDCI (1-ethyl-3-(3 (dimethyl amino) - propyl) carbodiimide hydrochloric) in an aqueous medium followed by a chemical attachment. The chemically grafted alginate was entrapped in the form of beads. The effectiveness of the immobilization was shown by the measurement of the distribution of the molecular masses by SEC/MALLS and the rates of nitrogen and carbon of alginates in the various stages of immobilization

Mathematical models of calculation proposed. enabled us to estimate the degree of activation of alginates by the EDCI and the rates of immobilization by the two methods. The influence of some factors on the physical rate of immobilization showed that the enzyme and alginate concentrations of 3g/l and 10g/l respectively give the best rates of amylase fixation to a pH of 4,7 with a higher value for the alginate (C) $M/G=0,5$. The maximum output for the chemical immobilization is observed for a concentration of enzyme 2g/l, a pH=4, 7, a report/ratio $R (n_{EDCI}/ n_{an,alg})=0.5$, $M/G=1.2$ and an alginate concentration of 18g/l.

The starch isolation from local potato was carried out using two wet methods of extraction: the bisulfite and the alkaline method. The bisulfite method gives a high output compared with the alkaline method (56.1% in front of 38.9% per raw material dries). However, the extracted starch obtained by the alkaline method is purer (99.31% of total starch against 97.39%). The kinetic study of the hydrolysis of the potato starches extract by the two methods, by free or immobilized enzyme (by chemical way), shows that this kinetic obeys the model of Michaelis-Menten. The values of kinetic parameters k_m and V_{max} depend on the methods of extraction and the state of the enzyme.

Key words: α -amylase, immobilization, reticulation, polysaccharide, starch, hydrolysis, kinetic parameters

Dédicaces

A ma mère

A la mémoire de mon défunt père et à

Nadjemi Boubekeur

A ma femme et mes filles

A mes sœurs et frères

A mes amis

Je dédie ce modeste travail

Remerciements

Si cette thèse a connu le jour, c'est grâce à Monsieur Boubakeur NADJEMI, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Alger, et Madame BELHANECHÉ Naima, Professeur à l'école nationale polytechnique Supérieure d'Alger, mon directeur et ma co-directrice de thèse. A cet effet, j'aimerais vivement les remercier pour m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir patiemment dirigé tout au long de ces années tout en me laissant entière liberté à mes propres initiatives. Grâce à leur appui et leur rigueur, j'ai pu pratiquer plusieurs techniques d'analyse qui m'ont permis de disposer de données importantes.

J'ai largement profité de mon séjour au laboratoire Polymères, Biopolymères, Membranes, CNRS UMR 6522, Université de Rouen, grâce aux Professeurs Luc PICTON, Didier Le CERF et Guy-Alain JUNTER et à l'ingénieur de recherche Virginie DULONG. Je me dois de les remercier pour m'avoir facilité l'accès au matériel disponible et de m'avoir permis de profiter de leur riche et longue expérience, comme je remercie vivement tous les membres du Laboratoire de m'avoir aimablement accueilli parmi eux pendant mon séjour et particulièrement Anne Sophie pépin et Elie Abou JAUDET maître de conférence.

Mes vifs remerciements vont à l'adresse de monsieur Rabah KERBACHI qui a accepté de présider le jury de cette soutenance et à tous les membres du jury pour avoir accepté de lire et de critiquer le présent travail.

Mes remerciements vont aussi à mes intimes, Abdelmalek CHERGUI, Youcef MAHDI, Réda YEDDOU, Farid HALET, tous mes amis et tous les membres de notre laboratoires qui m'ont continuellement soutenu dans ma vocation et m'ont aidé surtout dans les moments les plus difficiles.

J'aimerai enfin exprimer mon éternelle reconnaissance à ma mère et à mon défunt père, à ma femme et mes filles et à mes soeurs et frères, tout en leurs exprimant mon affection particulière, pour m'avoir constamment soutenu durant mes études et notamment dans les moments difficiles.

Abréviations

- M : l'acide D-mannuronique.
G : l'acide L-guluronique.
Ca-alginate : L'alginate de calcium.
Na-alginate : L'alginate de sodium.
EDCI : 1-éthyle-3-[3-(diméthylamino)-propyle]carbodiimide hydrochlorique.
SEC : La chromatographie d'exclusion stérique.
MALLS : Multi Angle Laser Light Scattering (la diffraction de la lumière Laser à angle multiple).
DRI : Le détecteur à indice de réfraction.
CT : Le carbone total.
NT : L'azote total.
IC : Le carbone inorganique.
T_C : La teneur en carbone organique total en mg/L.
T_N : La teneur en azote organique total en mg/L.
Analyseur COT : analyseur du carbone organique total.
Analyseur NOT : analyseur de l' azote organique total.
x : Le taux de substitution par l'EDCI de l'alginate (en mole d'EDCI par mole du monomère anhydre).
y : Le taux d'immobilisation de l' α -amylase (en mole d'enzyme par mole du monomère anhydre).
R_{EX} % : Le rendement d'extraction de l'amidon par matière première sèche.
U : L'unité d'activité enzymatique définie par la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole de maltose par minute à pH=6 et à 25°C.
M_{enz} : La masse molaire de l'enzyme en g/mole.
M_{EDCI} : La masse molaire de l'EDCI en g/mole.
M_{an,alg} : La masse molaire du monomère anhydre d'alginate en g/mole
TS : Le pourcentage d'amidon total dans l'extrait d'amidon.
H% : Le taux d'humidité de la pomme de terre.
D.O : densité optique ou absorbance.
R = n_{EDCI}/ n_{an,alg} : Le rapport du nombre de mole de l'EDCI sur le nombre de mole du monomères anhydre d'alginate.
S : Le substrat.
K_m : La constante de Michaelis en g/L.
V_{max} : La vitesse maximale en g/L.min.
V₀ : La vitesse initiale en g/l.min.
C : La concentration des sucres réducteurs en g/L.
t : Le temps.
V_h : Le volume hydrodynamique.
H : La viscosité intrinsèque.
 $\langle L^2 \rangle$: La distance quadratique moyenne des extrémités de chaîne.
 Φ : Le paramètre de viscosité de Flory.
DDL : La diffusion de la lumière.
A₂ : Le second coefficient de viriel .
 $\Delta R\theta$: Le rapport de Rayleigh.
M_w: la masse moléculaire moyenne en poids du polymère.
M_n: la masse moléculaire moyenne en nombre du polymère.

R_g : Le rayon de giration moyen du polymère.
 n_0 : L'indice de réfraction du solvant.
 λ_0 : La longueur d'onde du faisceau incident.
 N_a : Le nombre d'Avogadro.
 dn/dc : L'incrément d'indice de réfraction du couple polymère/solvant.
 θ : L'angle d'observation par rapport à la lumière incidente.
CMC : La carboxyméthylcellulose .

Liste des figures

- Figure I.1** Hydrolyse d'amidon par l' α -amylase immobilisée dans des capsules préparées à partir de différentes concentrations en alginate de sodium. 6
- Figure I.2** Effet de la concentration en CaCl_2 utilisé pour la préparation de capsules, sur le taux d'hydrolyse d'amidon. 6
- Figure I.3** Courbes d'hydrolyse d'amidon par l' α -amylase immobilisée dans des capsules préparées à partir d'alginate de sodium 2% imprégné de différentes concentrations en gel de silice. 6
- Figure I.4** Quantité totale de sucres réducteurs libérés par l'amidon après dix cycles successifs par action de l' α -amylase immobilisée dans des capsules avec différentes concentrations d'alginate de sodium, gel de silice ou CaCl_2 . 7
- Figure I.5** Efficacité des capsules d'alginate et d'alginate/silice contenant différentes quantités d' α -amylase : 1, 6 ou 9 U/ml lors de leurs réutilisations 7
- Figure I.6** Production de sucres réducteurs à 50°C et 70°C de différents amidons : pomme de terre, soluble, riz, maïs. 8
- Figure I.7.** Immobilisation par liaisons covalentes de biomolécules sur la membrane poly(HEMA/GMA) 9
- Figure I.8** Profil de pH de l' α -amylase libre et immobilisée. 10
- Figure I.9** Effet du temps de contact sur le taux d'hydrolyse de l'amidon 10
- Figure I.10** Effet du pH de la solution sur l'activité relative de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase libre et immobilisée. 11
- Figure I.11** Effet de la température sur l'activité relative de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase libre et immobilisée. 12
- Figure I.12** Variations de l'activité de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase immobilisée après réutilisations. 13
- Figure I.13.** Formation du poly(EGMA-VIM) par copolymérisation. 13
- Figure I.14** Effet du pH sur l'adsorption de l' α -amylase sur les supports poly(EGDMAVIM)- Cu^{2+} . (concentration en α -amylase : 1.0 mg/ml, $t=3\text{h}$, $T=20^\circ\text{C}$). 13
- Figure I.15** Réaction de carboxymethylation du pullulane en présence de chloroacétate sodium et d'hydroxyde de sodium à 70 °C dans l'eau (1/3 (V/V))/isopropanol. 15
- Figure I.16** (I) Réaction du carboxyméthylpullulane avec l' EDCI, (II) réaction de couplage du carboxyméthylpullulane avec l'ADH en présence d' EDCI dans l'eau à pH 4.6. 16

Figure II.1 structure de la CMC	17
Figure II.2 Résidu d'acide mannuronique	18
Figure II.3 Résidu d'acide guluronique.	18
Figure II.4 Structure de l'Alginate	18
Figure II.5 Modèle de la « boîte à œufs »	20
Figure II.6 Modèle de chaîne d'alginate de calcium : formation de gel	21
Figure II.7 principe de la chromatographie d'exclusion stérique	23
Figure II.8 Diagramme de Zimm	25
Figure II.9 Représentation schématique du couplage SEC/MALLS/DRI	27
Figure II.10 Schéma de la cellule de diffusion multi-angles (Dawn-F, Wyatt)	28
Figure III.1 variation de l'activité relative de l'enzyme en fonction du pH	33
Figure III.2 Variation de l'activité relative de l' α -amylase en fonction de la température	35
Figure III.3 Chromatogrammes de Distribution de la masse en fonction du volume d'élution de la CMC seule et après mélange avec l' α -amylase.CMC à 2 g/L, filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15, Zimm 1, angles à17	36
Figure III.4 Courbe représentant les valeurs du rayon de giration en fonction de la masse molaire de la CMC testé à la dégradabilité par l' α -amylase.	36
Figure III.5 Chromatogramme de Distribution de la masse molaire en fonction du volume d'élution de l' α -amylase seule à 10 g/L, filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,2, Zimm 1, angles 7 à17	37
Figure III.6 Comparaison des Chromatogramme des distributions de masse de la CMC et de l' α -amylase en fonction du volume d'élution.	38
Figure III.7 Chromatogrammes de distributions de masse en fonction du volume d'élution de la CMC seule et après mélange avec l' α -amylase.	38
Figure III.8 Chromatogrammes de distributions des masses en fonction du volume d'élution de l' α -amylase et de l'alginate B avant et après mélange avec l' α -amylase. Alginate B1,2 à 1,8 g/L, α -amylase à 0,3 g/L, pH 4,7, 51h, filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15, Zimm 1, angles 7 à 17.	39
Figure III.9 Chromatogrammes de distribution des masses molaires de l'alginate seul et de l'alginate mélangé avec l' α -amylase.	40
Figure III.10 comparaison des Chromatogrammes des distributions des masses de l'alginate B	

seul et de l'alginate mélangé à l' α -amylase.	40
Figure III.11 Courbes d'hydrolyse des amidons de pomme de terre, de maïs et de blé 0,5%(m/v) à 25°C par l' α -amylase d' <i>Aspergillus Oryzae</i> fixée physiquement sur l'alginate $m_{\text{billes}}=0,35\text{g}$.	48
Figure IV.1 Chromatogrammes des distributions des masses molaires de l'alginate B : (1) avant et (2) après le test de greffage chimique. filtration 0,45 μm , débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15 mL.g ⁻¹ , Zimm 1, angles 7 à 17.	
(1) alg : alginate (M/G= 1,2) seul à 1,8 g/L,	
(2) alg-am- gr : α -amylase greffée chimiquement sur l'alginate (M/G=1,2), 0,135 g/L	51
Figure IV.2 Schéma de l'immobilisation chimique de l' α -amylase sur l'alginate de sodium	59
Figure IV.3 Dosage conductimétrique des COO ⁻ de l'alginate A seul	62
Figure IV.4 Dosage conductimétrique des COO ⁻ de l'alginate A activé par l'EDCI (R=1)	63
Figure IV.5 hydrolyse des amidons de pomme de terre, de maïs et de blé par l' α -amylase greffée chimiquement	67
Figure V.1 structure chimique de l'amylose	73
Figure V.2 Structure chimique de l'amylopectine	74
Figure V.3 Chaînes ramifiées de l'amylopectine	75
Figure V.4 Définition des types de chaînes dans la structure branchée de l'amylopectine	76
Figure V.5 Microscopie des grains d'amidon de pois : normale (A), en biréfringence (B) et transformé thermiquement (C).	80
Figure V.6 Différents niveaux d'organisation au sein d'un grain d'amidon.	81
Figure V.7 Microscopie électronique d'amidon de différentes sources : riz (a), blé (b), pomme de terre (c) et maïs (d).	81
Figure V.8 Modélisation de la structure du grain d'amidon montrant les positionnements possibles et les interactions entre les différents composants : (1) : microcristaux, (2) : fraction plus ou moins complexée avec les lipides, (3) : fraction interfaciale rigide.	82
Figure VI.1 différentes enzymes dégradant l'amidon. Le cycle ouvert symbolise l'extrémité réductrice de la molécule polyglucose .	87
Figure VI.2 la structure $(\beta/\alpha)_8$ (A) ou TIM barrel (B) contenant le site catalytique .	88
Figure VI.3 représentation des sites actif et des sous-sites de l' α -amylase	88
Figure VI.4 les mécanismes catalytiques possibles de l' α -amylase (a) réaction S _N 1 via un ion carbonium intermédiaire. (b) réaction S _N 2 via formation un complexe glycosyl-enzyme par liaison covalente	89

Figure VII.1 Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en glucose	93
Figure VII.2 Photo microscopique des grains d'amidon de pomme de terre Spunta 2005 extrait par la méthode Bisulfite	96
Figure VII.3 Photo microscopique des grains d'amidon de pomme de terre Spunta 2005 extrait par la méthode NaOH.	97
Figure VII.4 Courbes cinétiques d'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> libre- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.	98
Figure VII.5 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'el Oued (sud d'Algerie) extrait par SO_2 à pH 3 et t=2h par l' α -amylase d' <i>Aspergillus Oryzae</i> 160U à 50°C	98
Figure VII.6 Courbes de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> libre pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.	99
Figure VII.7 Courbes cinétiques d'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> libre- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.	99
Figure VII.8 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'el Oued (sud d'Algerie) extrait par NaOH C=0,30% et t=24h par l' α -amylase d' <i>Aspergillus Oryzae</i>	100
Figure VII.9 Courbes de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> libre pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.	100
Figure VII.10 Courbes cinétiques d'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> immobilisée- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 and 50°C	101
Figure VII.11 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'el Oued (sud d'Algerie) extrait par SO_2 à pH 3 et t=2h par l' α -amylase from <i>Aspergillus Oryzae</i> immobilisée 160U à 50°C	101
Figure VII.12 Courbes de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> immobilisée pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C	102

Figure VII.13 Courbes cinétiques d'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* immobilisée- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C 102

Figure VII.14 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'el Oued (sud d'Algerie) extrait par NaOH C=0,30% et t=24h par l' α amylase from *Aspergillus Oryzae* immobilisée 160U à 50°C 103

Figure VII.15 Courbes de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* immobilisée pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C 103

Liste des Tableaux

Tableau I.1 Composition de la membrane poly(HEMA-GMA) et activités de l' α -amylase immobilisée obtenue avec ces compositions de membrane.	9
Tableau II.1 Sources d' α -amylases	22
Tableau III.1 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction du pH .	33
Tableau III.2 Variation de l'activité relative de l'enzyme libre en fonction du pH.	33
Tableau III.3 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction de la température	34
Tableau III.4 Activité relative de l'enzyme libre en fonction de la température.	34
Tableau III.5 Conditions opératoires de l'immobilisation physique de l'amylase sur les alginates	41
Tableau III.6 résultats de l'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux de l' α -amylase dialysée et lyophilisée et des alginates seuls.	43
Tableau III.7 Résultats de l'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux des alginates adsorbant l' α -amylase d' <i>Aspergillus Oryzae</i> .	43
Tableau III.8 Les valeurs du taux d'immobilisation physique dans les 11 expériences (voir les conditions opératoires des expériences dans le tableau II.5)	46
Tableau IV.1 Conductivité des eaux de filtration de la solution après le test d'immobilisation chimique	51
Tableau IV.2 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate (B) avant et après le test de greffage chimique par l' α -amylase et de l' α -amylase dialysée	52
Tableau IV.3. Conductivités des eaux de lavage des produits des réactions de greffage	54
Tableau IV.4 Carbone et azote organiques totaux de l'alginateA avant et après réaction de greffage chimique.1	55
Tableau IV.5. Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction.2	55
Tableau IV.6 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate C avant et après réaction.3	56
Tableau IV.7 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate C avant et après réaction4	56
Tableau IV.8 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction.5	56
Tableau IV.9 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction.6	57
Tableau IV.10 Les valeurs des masses moléculaires des alginates activés et des produits purifiés	

des expériences d'immobilisation chimique	58
Tableau IV.11 Résultats d'analyse du carbone et de l'azote organiques des alginates seuls et activés et les valeurs du degré de substitution (x) des alginates A et C activés par l'EDCI	60
Tableau IV.12 Variation des masses moléculaires et du taux d'immobilisation en fonction des conditions opératoires dans les expériences d'immobilisation	65
Tableau V.1 Composition non glucidique de différents amidons en fonction de leurs origines botaniques (en % d'amidon sec).	77
Tableau V.2 Teneur en amidon et forme selon l'origine botanique.	79
Tableau VI.1 Les quatre régions des acides aminées qui forment le site catalytique	88
Tableau VI.2 Valeurs de K_m et V_{max} des cinétiques d'hydrolyse des amidons par l' α -amylases libre et immobilisées	90
Tableau VII.1 Masse humide d'extrait m, Amidon total (TS) et rendement d'extraction d'amidon par matière sèche en fonction des méthodes d'extraction (pour 50g de pomme de terre sèche)	96
Tableau VII.2 Paramètres cinétiques (K_m and V_{max})de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par les méthodes alcaline et bisulfite par l'enzyme libre et immobilisée	104

SOMMAIRE

Résumés	i
Dédicaces	iv
Remerciements	v
Abréviations	vi
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	xiii
PREMIERE PARTIE : IMMOBILISATION DE L'α-AMYLASE	
Sommaire	1
Introduction	6
CHAPITRE I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'IMMOBILISATION D'ENZYMES	
I.1 Historique et généralités sur l'immobilisation des enzymes	8
I.2 Techniques d'immobilisation de l'α-amylase	10
I.2.1 Séquestration physique	10
I.2.2 Immobilisation par liaison covalente	13
I.2.3 Immobilisation par adsorption	13
I.3 Fonctionnalisation des polysaccharides et immobilisation chimique	21
CHAPITRE II- MATERIELS ET METHODES	
II.1 Produits	22
II.1.1 Les supports polysaccharidiques	22
II.1.1.1 <i>La carboxymethylcellulose (CMC)</i>	22
II.1.1.2 <i>L'alginate</i>	22
II.1.2 l'α-amylase	26
II.1.3 Les autres produits chimiques	27
II.2 Méthodes d'analyse et techniques	27
II.2.1 Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière	27
II.2.1.1 <i>Théorie de la chromatographie d'exclusion stérique</i>	27
II.2.1.2 <i>Diffusion de la lumière et détermination de la masse moléculaire d'un polymère</i>	28

<i>II.2.1.3 Dispositif et principe de la méthode de la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière : couplage SEC/MALLS/DRI</i>	30
II.2.2 Analyse du Carbone organique total et de l'azote organique total (T _c , T _N)	33
<i>II.2.2.1 Instrument de mesure (analyseur du COT/NOT)</i>	33
<i>II.2.2.2 Principe de l'analyse du carbone total (CT)</i>	34
<i>II.2.2.3 Principe de l'analyse du carbone inorganique (IC)</i>	34
<i>II.2.2.4 Principe de la mesure de l'azote total (NT)</i>	34
II.2.3 Analyse des sucres réducteurs (Méthode Somogyi Nelson)	34
II.2.4 L' ultrafiltration	35
II.2.5 La lyophilisation	35
II.2.6 Les autres techniques	36

CHAPITRE III. IMMOBILISATION PHYSIQUE DE L'α-AMYLASE SUR L'ALGINATE

III.1 Test de l'activité de l'α-amylase d' Aspergillus oryzae	37
III.1.1 Définition de l'activité en (U/mg.min)	37
III.1.2 Variation de l'activité de l'enzyme en fonction du pH (T=25°C)	37
III.1.3 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction de la température	39
III.2 Tests de dégradation des polysaccharides de greffage	40
III.2.1 Test de dégradation de la CMC	40
III.2.2 Test de dégradation de l'alginate	44
III.3 L'immobilisation physique de l'α-amylase sur les alginates	46
III.3.1 Procédures d'immobilisation physique et influence de certains paramètres sur l'immobilisation physique	46
III.3.2 Préparation des billes d'hydrogel (enzyme adsorbée sur les alginates)	47
III.3.3 Détermination du taux d'immobilisation physique de l'enzyme	47
<i>III.3.3.1 Analyse du carbone organique total et de l'azote organique total</i>	47
III.3.3.2 Calcul du taux d'immobilisation physique de l'enzyme	49
III.3.4 Essais d'hydrolyse des amidons purs par l'α-amylase immobilisée par méthode physique sur l'alginate	52

CHAPITRE IV. IMMOBILISATION CHIMIQUE DE

I' α -AMYLASE SUR LES ALGINATES

IV.1 Test d'immobilisation chimique	55
IV.2 Etude de l'influence de certains paramètres sur l'immobilisation chimique de l' α -amylase sur les alginates	57
IV.2.1 Expériences d'immobilisation chimique	57
IV.2.2 Purification des produits de l'immobilisation	58
IV.2.3 Analyse des taux de carbone et d'azote totaux dans les produits d'immobilisation chimique	59
IV.2.4 Mesure des masses molaires	62
IV.3 Etude et calcul du taux d'activation et d'immobilisation chimique de l'enzyme sur l'alginate	63
IV.3.1 Calcul du degré de substitution de l'alginate par l'EDCI	64
<i>IV.3.1.1 Calcul du degré de substitution à partir des résultats d'analyse du T_C et T_N</i>	64
<i>IV.3.1.2 Calcul du degré de substitution par dosage conductimétrique</i>	66
IV.3.2 Calcul du taux d'immobilisation chimique de l'enzyme sur l'alginate	68
IV.4 Essais d'hydrolyse des amidons purs de pomme de terre, maïs et blé par l'amylase immobilisée par voie chimique et réticulée	71
Références de la première partie	73

DEUXIEME PARTIE : EXTRACTION ET HYDROLYSE DES AMIDONS

EXTRAITS PAR L' α -AMYLASE LIBRE ET IMMOBILISEE

CHAPITRE V. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES AMIDONS

V.1 Structure chimique de l'amidon natif	77
V.1.1 Fraction glucidique	77
V.1.2 Fraction non glucidique	81
<i>V.1.2.1 Lipides</i>	81
<i>V.1.2.2 Fraction azotée et protéines</i>	83
<i>V.1.2.3 Fraction minérale</i>	83
V.2 Structure granulaire	83
V.2.1 Observation morphologique	84

V.2.2 Organisation moléculaire	87
V.2.3 Complexation de l'amylose	88

CHAPITRE VI. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'EXTRACTION ET L'HYDROLYSE DES AMIDONS

VI.1 Etude bibliographique sur l'extraction des amidons	89
VI.2 Etude bibliographique sur l'hydrolyse des amidons	90
VI.2.1 Les enzymes dégradant l'amidon	90
<i>VI.2.1.1 Les endoamylases</i>	90
<i>VI.2.1.2 Les exoamylases</i>	90
<i>VI.2.1.3 Les enzymes débranchantes</i>	91
<i>VI.2.1.3 Les enzymes du quatrième groupe</i>	91
VI.2.2 .Caractéristiques et mécanisme réactionnel des α -amylases	91
VI.2.3 La cinétique enzymatique	94
VI.2.4 Modèles cinétiques de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase	94

CHAPITRE VII. EXTRACTION ET HYDROLYSE DES AMIDONS DE POMME DE TERRE LOCALE PAR L' α -AMYLASE LIBRE ET IMMOBILISEE

VII.1 Isolation de l'amidon de pomme de terre	96
VII.1.2 La méthode bisulfite	96
VII.1.2 La méthode alcaline	96
VII.2 Caractérisation partielle des amidons extraits	97
VII.2.1 L'Humidité	97
VII.2.2 L'amidon total (TS) dans l'extrait d'amidon	97
VII.2.3 Le rendement d'extraction ($R_{EX}\%$)	99
VII.2.4 Photos microscopiques des grains d'amidon	99
VII.3 Hydrolyse des amidons, de pomme de terre locale, extraits, par l'amylase libre et immobilisée	99
VII.4 Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme libre et immobilisée sur l'alginate	100

VII.5 Résultats	100
VII.5.1 L'Isolation et la caractérisation partielle de l'amidon	100
VII.5.2 La morphologie des grains d'amidon	101
VII.5.3 L'hydrolyse des amidons et mesure des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme libre et immobilisée sur l'alginate	102
VII.6 Conclusions	109
Références de la deuxième partie	110
Résultats généraux, conclusions et perspectives	116
Annexe I	
Annexe II	
Annexe III	

Introduction

La production de sirop de glucose et de dextrine ou encore d'oligosaccharides à partir de la dégradation de l'amidon est utilisée depuis très longtemps. L'hydrolyse peut être chimique ou thermique mais la méthode la plus économique et efficace reste sans aucun doute la dégradation enzymatique mettant en jeu l' α -amylase (endo-enzyme peu coûteuse) ou la β -amylase (exo-enzyme plus onéreuse). Les produits d'hydrolyse de l'amidon trouvent de vastes applications dans l'industrie alimentaire (confiserie, boissons, ...) dans l'industrie pharmaceutique et dans des produits diététiques variés. Une nouvelle application à fort potentiel de développement concerne la production de bioéthanol par bio fermentation comme source de carburant renouvelable à partir de sucres issus de la dégradation de l'amidon. Pour cette dernière application [1], une solution consiste à contrôler le procédé par l'action conjointe et simultanée de l' α -amylase (dégradation de l'amidon) et de *Candida Tropicalis* (fermentation alcoolique).

L'utilisation de l' α -amylase libre (free α -amylase) dans une solution d'amidon présente un certain nombre d'inconvénients comme la purification du glucose produit, la vulnérabilité de l'enzyme vis-à-vis de conditions plus dures d'utilisation (pH, T...) et bien sûr la grande difficulté de réutilisation de l'enzyme limitant le transfert industriel. Une solution consiste à immobiliser l'enzyme sur un support solide [2] ou au sein d'une matrice polymère pouvant être d'origine synthétique [3] ou naturelle [4, 5]. En milieu aqueux, la matrice forme alors un hydrogel dont les liens de réticulation sont de nature chimique ou physique et l'enzyme y est le plus souvent séquestrée par interaction physique, beaucoup plus rarement fixée de façon covalente. Les études montrent ainsi une meilleure résistance de l'enzyme vis-à-vis de facteurs externes (pH, T...), mais surtout un potentiel d'utilisations successives très important (jusqu'à 80% d'efficacité conservée après 50 utilisations dans certains cas).

Notre travail a donc consisté à

- ❖ immobiliser l' α -amylase sur un polysaccharide alguaire ; l'alginate de sodium par adsorption et greffage chimique (via la formation d'une liaison amide entre les fonctions acide carboxyliques de l'alginate et les fonctions amines de l' α -amylase en présence d'un activateur de type carbodiimide),
- ❖ la préparation de la matrice de biocatalyseur par gélification physique entre le support alginate et les cations divalents (en l'occurrence ici le Ca^{+2}),

- ❖ La détermination de l'activité enzymatique sur des amidons purs solubles (traités thermiquement) de pommes de terre, de maïs et de blé par dosage des sucres réducteurs.
- ❖ L'isolation de l'amidon de pomme de terre locale et sa caractérisation partielle,
- ❖ l'hydrolyse et l'étude cinétique des amidons de pomme de terre locale par l'amylase immobilisée chimiquement

Le sujet de cette thèse de doctorat a offert une occasion d'initier une thématique nouvelle sur la fonctionnalisation des polysaccharides biodégradables comme support pour l'immobilisation des enzymes d'hydrolases et la valorisation des céréales et tubercules amylicés du sud de l'Algérie. La réalisation des travaux de cette nouvelle thématique a fait l'objet d'une collaboration scientifique entre le laboratoire des sciences et techniques de l'environnement à l'ENSP , le laboratoire polymères, biopolymères et membranes du CNRS ,UMR 6522 de Rouen (France) et le laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et valorisation de la biomasse (LPBVB), rattaché à l'école normale supérieure de Kouba.

CHAPITRE.I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'IMMOBILISATION D'ENZYMES

I.1 Historique et généralités sur l'immobilisation des enzymes

Depuis la deuxième moitié du dernier siècle, de nombreux efforts ont été consacrés au développement des enzymes immobilisées insolubles (à la place des enzymes solubles), pour une variété d'applications [6] comme biocatalyseurs hétérogènes et réutilisables afin de réduire les coûts de production et une meilleure maîtrise des processus [7,8], en tant que dispositifs stables pour les applications analytiques et médicales [9,10] et en tant qu'adsorbants sélectifs pour la purification des protéines et des enzymes [11].

Les premières immobilisations furent réalisées au début du vingtième siècle, quand en 1916 Nelson et Griffon découvrirent que l'invertase portée par l'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$ et le charbon du bois était toujours active [12]. Cette découverte fortuite et simple, a été largement identifiée comme pierre angulaire des diverses techniques d'immobilisation, et depuis, plusieurs travaux pour la préparation des adsorbants pour l'isolement des protéines sur porteurs inorganiques simples tels que le verre [13], l'alumine [14] ou autres ont été réalisés. Cependant peu d'immobilisations covalentes d'enzymes ont été rapportées dans la littérature dans cette période jusqu'au années cinquante [15], quand l'immobilisation d'enzymes ou anticorps sur le polyaminostyrene [16,17,18], sur la cellulose diazotée [19] et l'acide acrylique [20,21] ont eu lieu, mais malheureusement ces porteurs se sont avérés moins appropriés à l'immobilisation covalente en raison de la conservation faible de l'activité [22]. Dans cette même période Dickey montrait que certaines enzymes comme l'AMP deaminase immobilisées par inclusion dans une matrice inorganique sol-gel formé par un dérivé d'acide silicique de verre retenait son activité biologique [23], mais l'importance de cette découverte n'a été reconnue que 40 ans après.

Dans les années soixante différentes méthodes d'immobilisation covalente d'enzymes ont été le centre principal de la bio-immobilisation parallèlement à l'immobilisation non covalente, comme l'adsorption et l'inclusion qui ont été encore développées et ainsi que l'encapsulation des enzymes dans des membranes sphériques semi-perméables (appelées cellules artificielles) qui a été proposée pour la première fois par Chang [24]. Les techniques d'inclusion avaient aussi connu un grand progrès par l'utilisation des gels de polymères synthétiques comme le PVA (Alcool Polyvinylique) [25] ou des dérivés des polymères naturels

comme la nitrocellulose ou l'amidon[25] ou le gel de polyacrylamide [26] ou des élastomères de silicium pour des processus sol-gel. D'autres techniques ont été développées durant cette période, comme l'adsorption suivie par la réticulation des enzymes en films ou membranes [27] ou perles pour former des enzymes enveloppées, comme il a été montré qu'on pouvait préparer des porteurs d'enzymes libres insolubles par réticulation des enzymes libres insolubles à l'état solide [28] ou solubilisées [29] en utilisant un réticulant bi fonctionnel comme le glutaraldehyde, mais l'étude s'est axée sur les enzymes solubilisées par l'immobilisation de plus de 80 différentes enzymes de différentes classes qui étaient adsorbées sur des supports inertes puis réticulées [30] et l'utilisation de plusieurs porteurs hydrophiles insolubles étaient à la une, comme l'aragose et la cellulose en raison de l'utilisation de nouveaux activateurs comme le bromure de cyanogène [31], l'isothiocyanate pour lier les groupements amines[32], les réactifs de Woodward [33] pour l'activation des groupements carboxyliques, et la triazine pour les polysaccharides [34]. En outre la préparation de porteurs synthétiques contenant des fonctions actives comme le polyanhydride [35] ou le polyisothiocyanate [32] qui peuvent se lier facilement aux enzymes a permis la préparation, relativement simple, d'enzymes immobilisées.

Dans les années soixante dix l'immobilisation d'enzymes a continué à s'épanouir dans une phase de maturation avec l'immobilisation des enzymes sur un porteur solide dans un solvant organique [36,37] et a été prolongée à plusieurs enzymes à grand potentiel industriel comme l' α -amylase, l'acylase, la pénicilline G, etc. Dans cette période plusieurs nouveaux polymères synthétiques et naturels fonctionnalisés avec des propriétés désignées et particulières ainsi que des polymères naturels contenant des groupements fonctionnels comme des aldéhydes, anhydrides, et carbonates [38] ont été utilisés pour l'immobilisation covalente et plusieurs réactions chimiques ont été réalisées :

- Acylation avec l'imidoester [39]
- Immobilisation sur carbohydrates [40]
- L'utilisation de l'ester N-hydroxysuccinimide pour l'activation des groupements carboxyles [41]
- Immobilisation sur oxirane [42]

Dans les années quatre vingt et quatre vingt dix, la préparation des enzymes immobilisées robustes, qui ne sont pas seulement en activité, mais également stables et sélectifs dans les

solvants organiques [43,44] a fait objet de plusieurs études. Ainsi, beaucoup d'efforts ont été consacrés au développement des cristaux d'enzymes réticulées [45,46] appropriées aux biotransformations dans les milieux non aqueux ou dans les mélanges organique-eau, en raison de leur grande stabilité dans les conditions hostiles. Remarquablement, il a été noté que la performance des cristaux d'enzymes réticulées obtenues était étroitement dépendante des conformations prédéterminées des molécules d'enzymes dans le cristal et le choix d'une conformation fortement active en changeant les conditions de cristallisation devient crucial pour l'élaboration de cristaux d'enzymes réticulées fortement actifs, stables et sélectifs. Dans cette même période, on a découvert que les agrégats physiques d'enzymes pouvaient aussi être réticulés pour former des enzymes immobilisées insolubles et actives [47, 48].

Actuellement, les règlements environnementaux de plus en plus strict vis-à-vis les procédés biocatalytiques et la rude concurrence qui exige la réduction des coûts d'énergie, d'une part, et le fait que les enzymes immobilisées peuvent satisfaire la demande des fabricants des secteurs pharmaceutiques et agrochimiques, d'autre part, encouragent les chercheurs à trouver des porteurs biodégradables tout en sauvegardant les critères de stabilité, activité et sélectivité.

I.2 Techniques d'immobilisation de l' α -amylase

Différentes techniques d'immobilisation de l' α -amylase peuvent être utilisées comme l'attachement à une surface par adsorption ou par liaison covalente, ou encore la séquestration.

I.2.1 Séquestration physique

On trouve dans la littérature des travaux réalisés sur l'immobilisation d' α -amylase de *Bacillus subtilis* partiellement purifiée par emprisonnement dans des matrices d'alginate de calcium [5]. Les facteurs qui affectent les propriétés caractéristiques d'hydrolyse de l'enzyme ont également été étudiés. La séquestration a été réalisée de la manière suivante : un mélange d'alginate de sodium aqueux à 2% et d' α -amylase brute (20 unités) a été introduit au goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur dans une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) sous faible agitation. Des matrices d'alginate imprégnées de gel de silice ont également servi à l'immobilisation de l'enzyme. Dans ce cas, le gel de silice a été ajouté au mélange alginate de sodium et enzyme brute avant la gélatinisation. Il a été trouvé que l'enzyme était d'autant mieux retenue dans la matrice que celle-ci était poreuse, ce qui est fortement lié à la

concentration en alginate de sodium (Fig I.1) et en CaCl_2 (Fig I.2). En outre le taux de gel de silice joue un rôle important dans la séquestration ainsi que sur la stabilité et l'efficacité de celles-ci (Fig I.3) et (Fig I.4).

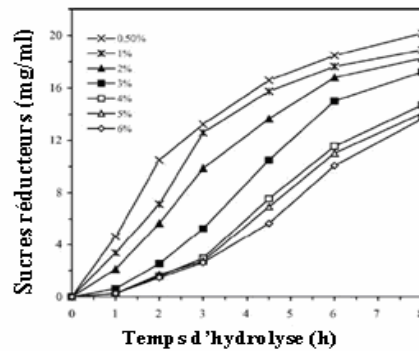


Figure I.1 Hydrolyse d'amidon par l' α -amylase immobilisée dans des capsules préparées à partir de différentes concentrations en alginate de sodium [5].

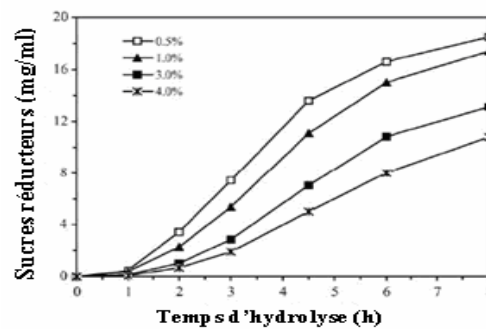


Figure I.2 Effet de la concentration en CaCl_2 , utilisé pour la préparation de capsules, sur le taux d'hydrolyse d'amidon [5].

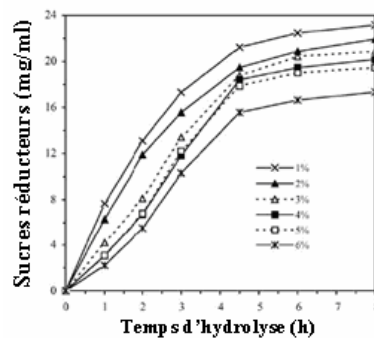


Figure I.3 Courbes d'hydrolyse d'amidon par l' α -amylase immobilisée dans des capsules préparées à partir d'alginate de sodium 2% imprégné de différentes concentrations en gel de silice [5].

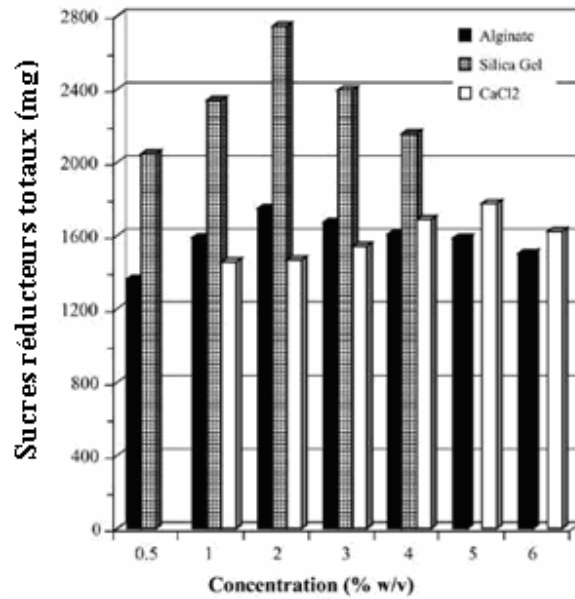


Figure I.4 Quantité totale de sucres réducteurs libérés par l'amidon après dix cycles successifs par action de l' α -amylase immobilisée dans des capsules avec différentes concentrations d'alginate de sodium, gel de silice ou CaCl₂ [5].

Les conditions optimales retenues pour la séquestration efficace de l' α -amylase sont : alginate de sodium à 2%, CaCl₂ à 5% et 9U/ml d'enzyme par volume de réaction d'hydrolyse. Dans ces conditions les capsules conservent plus de 70% de leur efficacité initiale d'hydrolyse après 20 processus d'hydrolyses en réacteur agité (Fig.I.5).

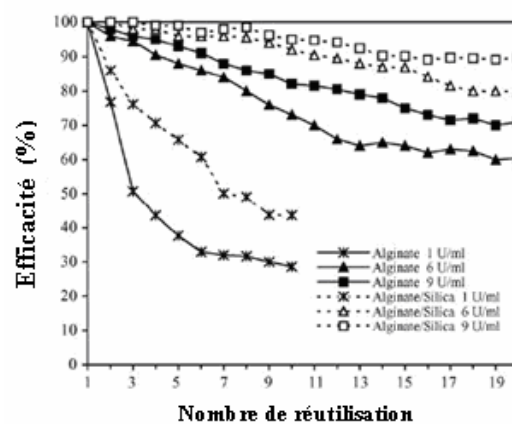


Figure I.5 Efficacité des capsules d'alginate et d'alginate/silice contenant différentes quantités d' α -amylase : 1, 6 ou 9 U/ml lors de leurs réutilisations [5].

La séquestration réalisée dans cette étude semble être une technique plus simple et économique en comparaison à l'utilisation de supports tels que le poly (éthylèneimine), protamine ou le chitosan recouvert d'alginate de calcium cités dans la littérature [49,50].

L' α -amylase immobilisée a également été utilisée pour l'hydrolyse de nombreux substrats amidonnés. C'est avec l'amidon de pomme de terre que les résultats d'hydrolyse à 50 °C ont été les meilleurs (Fig.I.6).

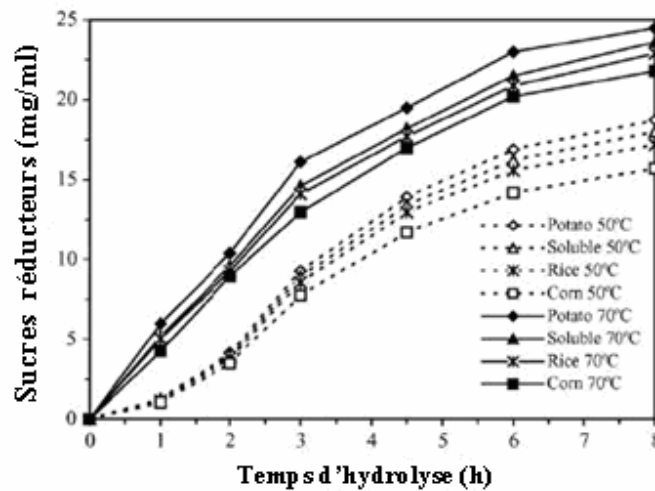


Figure I.6 Production de sucres réducteurs à 50°C et 70°C de différents amidons : pomme de terre, soluble, riz, maïs [5].

Il a été prouvé que la dégradation de tous les amidons testés dépend de la température d'hydrolyse alors qu'au contraire la stabilité des hydrogels dans les conditions de travail ne semble pas affectée. Cela étant probablement dû à la capacité de l'alginate à former des gels stables sur une gamme de température allant de 0 à 100°C. A 70°C la concentration en sucres issus de l'hydrolyse est supérieure à celle trouvée à 50°C, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité de l'enzyme à des températures élevées avec une plus grande diffusion des substrats. Ainsi il a été montré que l' α -amylase utilisée possède une grande stabilité et que son immobilisation dans des capsules de gel d'alginate de sodium sous certaines conditions est sûre, simple de mise en oeuvre et bon marché.

I.2.2 Immobilisation par liaison covalente

On trouve dans la bibliographie des travaux sur l'immobilisation d' α -amylase sur des membranes poly(HEMA-GMA-1-3) par la création de liaisons amides entre la fonction

amine de l'amylyase et la fonction époxy du support [51]. Le poly (HEMA-GMA-1-3) a été préparé à partir d'hydroxyéthylmétacrylate (HEMA) et metacrylateglucidique (GMA) (Fig. I.7).

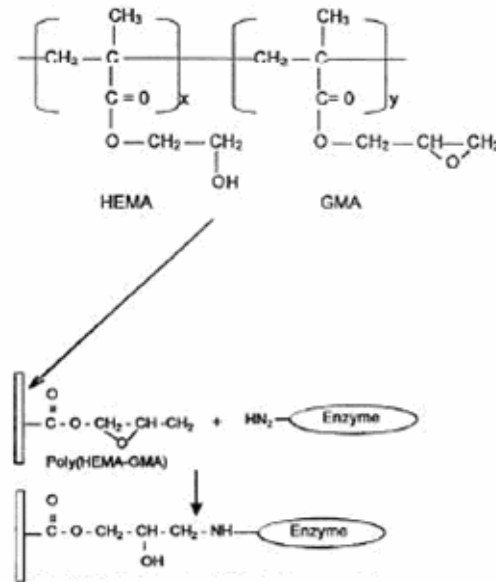


Figure I.7. Immobilisation par liaisons covalentes de biomolécules sur la membrane poly (HEMA/GMA) [51].

La capacité d'immobilisation des membranes augmente avec le taux de GMA présent dans la membrane. Il a été montré que l'activité de l' α -amylyase immobilisée est de 76% avec la membrane poly(HEMA-GMA-2) (Tableau.I.1).

Tableau I.1 Composition de la membrane poly(HEMA-GMA) et activités de l' α -amylyase immobilisée obtenue avec ces compositions de membrane [51].

Type de membrane	HEMA/GMA (Rapport molaire)	Densité de GMA (mmol/g membrane)	Eau (%)	Enzyme immobilisée ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Activité de l'enzyme (Ucm^{-1})	Activité retenue (%)
Poly (HEMA-GMA-1)	7.65	0.58	54	51	61.5	76
Poly (HEMA-GMA-2)	3.41	1.16	49	89	77.9	73
Poly (HEMA-GMA-3)	1.98	1.75	45	96	77.2	67

Le profil de température et pH optimal de l'enzyme immobilisée n'a pas été radicalement modifié par l'immobilisation (Fig.I.8).

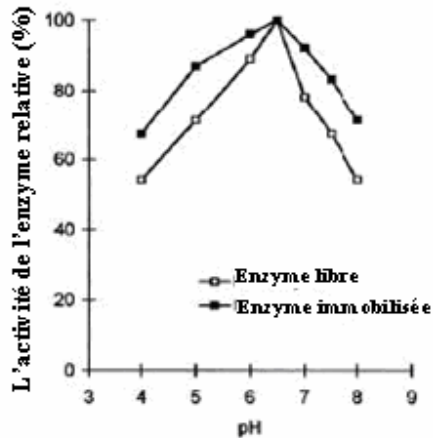


Figure I.8 Profil de pH de l'α-amylase libre et immobilisée [51].

Une étude de la cinétique de dégradation a été menée (Fig.I.9)

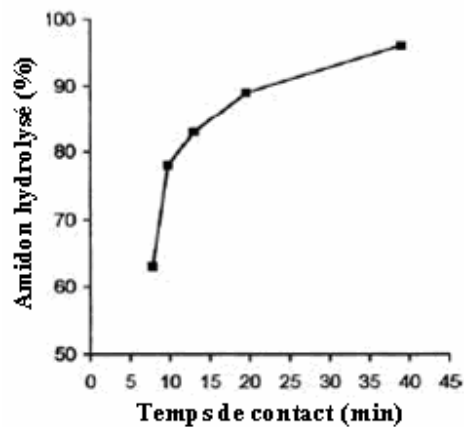


Figure I.9 Effet du temps de contact sur le taux d'hydrolyse de l'amidon [51].

Plus important, l'enzyme immobilisée a montré une plus grande stabilité thermique que l'enzyme libre. L'enzyme-membrane a été utilisée en continu pour l'hydrolyse d'amidon et il a été observé une perte de 4% d'activité initiale durant une opération continue dans le réacteur de 120h. La grande stabilité de l'enzyme immobilisée montre que celle-ci peut être engagée dans des systèmes continus pour la production de maltose et dextrine issus de l'amidon.

Une autre immobilisation s'est effectuée sur des copolymères de l'acrylate de butyl-triacrylate (BA) et le pentaerhitrite ou le dimetacrylate glycolethylene en activant leurs trois

groupements -OH, - COOH et -NH₂ par le divinyl sulfone , le carbodiimide et la glutaraldehyde respectivement [52]. Parmi sept copolymères étudiées, et ayant les trois fonctions le copolymère acrylate butylique-diméthacrylate ethylene glycol a été le meilleur pour l'immobilisation amylolytique pour l' α -amylase [52].

Une autre immobilisation d'enzymes a été effectuée par greffage chimique sur un composite chitosane-argile [4]. Les stabilités des enzymes α -amylase, β -amylase et glucoamylase immobilisées et libres vis à vis du pH (Fig.I.10) et de la température (Fig. I.11) ont été comparées. Le support a été préparé à partir d'un mélange chitosane et argile activée en masse égale qui a ensuite été réticulé avec le glutaraldéhyde. Le chitosane possède des fonctions hydroxyles (-OH) et amines (-NH₂) ce qui permet facilement de créer des liaisons avec des enzymes.

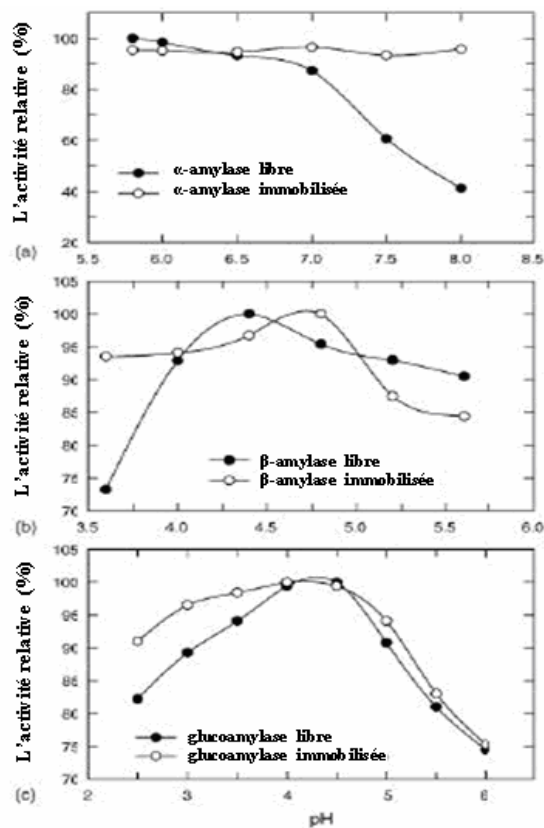


Figure I.10 Effet du pH de la solution sur l'activité relative de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase libre et immobilisée.[4]

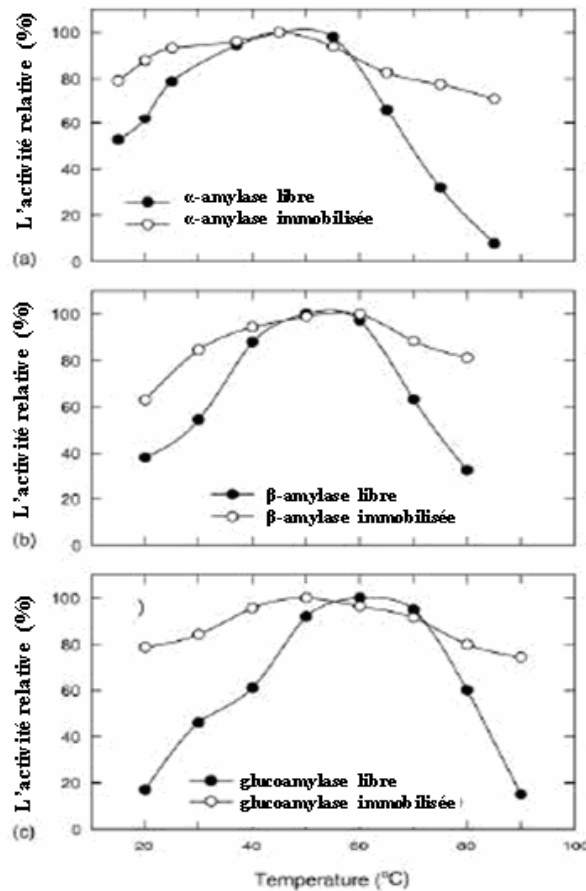


Figure I.11 Effet de la température sur l'activité relative de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase libre et immobilisée.[4]

Il a été montré que les activités relatives des enzymes immobilisées sont plus élevées que celles des enzymes libres sur une plus large gamme de température et pH [4]. Par exemple, l' α -amylase immobilisée ne subit quasiment pas de variation de son activité (activité relative > 93%) alors que l' α -amylase libre est détériorée lorsque le pH augmente dans la gamme de pH 5.8-8.0. Dans la gamme de température 15-85°C, les activités relatives des α -amylase, β -amylase et glucoamylase immobilisées sont supérieures à 71, 63, et 74% respectivement, alors qu'elles sont de 8, 22, et 18% pour les enzymes libres correspondantes. De plus, les enzymes immobilisées montrent une stabilité d'utilisation supérieure. L' α -amylase immobilisée sur le support composite conserve 81% de son activité initiale après 50 réutilisations (Fig.I.12)

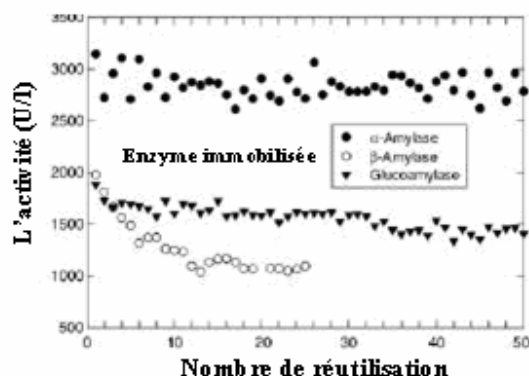


Figure I.12 Variations de l'activité de l' α -amylase, β -amylase et glucoamylase immobilisée après réutilisations [4].

I.2.3 Immobilisation par adsorption

Des travaux visant à immobiliser l' α -amylase provenant de *Aspergillus Oryzae* par adsorption sur une matrice de poly(éthylène glycol diméthacrylate-*n*-vinyl imidazole) (Fig.I.13). chélaté par Cu^{2+} ont également été réalisés [53].

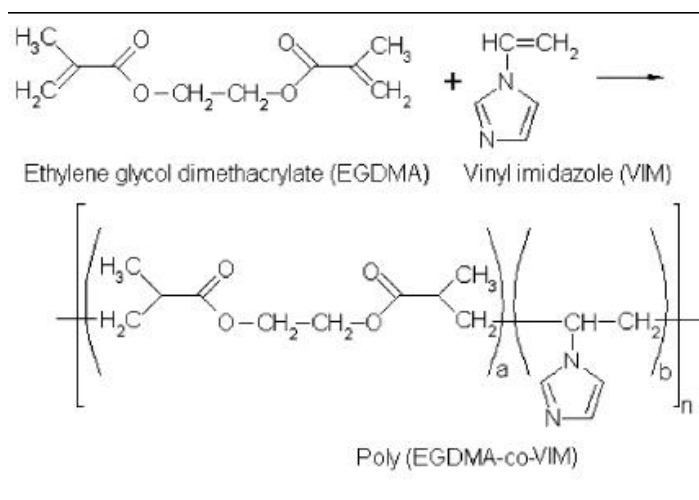


Figure I.13. Formation du poly(EGMA-VIM) par copolymérisation [53].

Le maximum de capacité d'adsorption d' α -amylase par le support poly (EGDMAVIM)- Cu^{+2} a été observé pour une concentration de 38.9mg/g et à un pH de 4.0 (Fig.I.14).

La stabilité du système est augmentée par l'immobilisation. Il a été constaté que l'enzyme pouvait être adsorbée et désorbée de manière répétée sans perte significative de sa capacité d'adsorption ou de son activité.

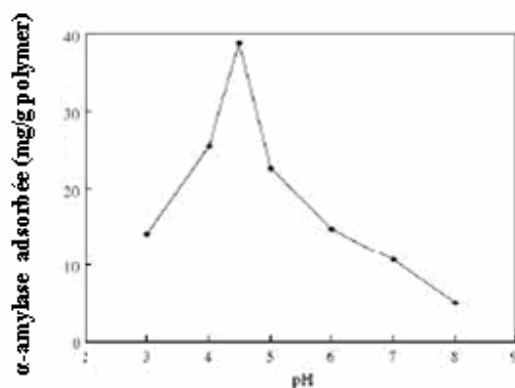


Figure I.14 Effet du pH sur l'adsorption de l'α-amylase sur les supports poly(EGDMAVIM)-Cu²⁺. (concentration en α-amylase : 1.0 mg/ml, t=3h, T=20°C) [53].

I.3 Fonctionnalisation des polysaccharides et immobilisation chimique

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le cadre d'études sur la fonctionnalisation des polysaccharides. Il s'agit de l'élaboration de systèmes matriciels et d'hydrogels avec comme finalité leur capacité à séquestrer et à libérer un composé actif en contrôlant les paramètres externes comme la température, la force ionique, le pH...

En fonction du couple matrice/composé actif, ce contrôle peut être assuré par un effet stérique (gonflement) pour un composé macromoléculaire et/ou par des effets d'affinités (électrostatique ou hydrophobe).

Les hydrogels, solubles dans l'eau, sont définis comme un ensemble de chaînes polymères en trois dimensions capables de gonfler mais ne se dissolvant pas en milieu aqueux.

L'utilisation de polymères naturels dans les domaines du biomédical et de l'industrie est devenue très attractive en raison de leur caractère biocompatible. Les hydrogels, en particulier, représentent un important groupe de biomatériaux pour la diffusion contrôlée de médicaments.

L'une des études réalisées concerne l'élaboration d'hydrogels présentant des clusters hydrophobes capables de séquestrer des composés actifs hydrophobes ou amphiphiles [54].

Il s'agit d'étudier les propriétés de gonflement et d'emprisonnement des hydrogels de carboxyméthyl pullulane hydrophobiquement modifié.

La première étape de ce travail est la fonctionnalisation du pullulane. Le pullulane a d'abord été carboxyméthylé afin d'y greffer des chaînes alkyle ou perfluoroalkyle (Fig.I.15).

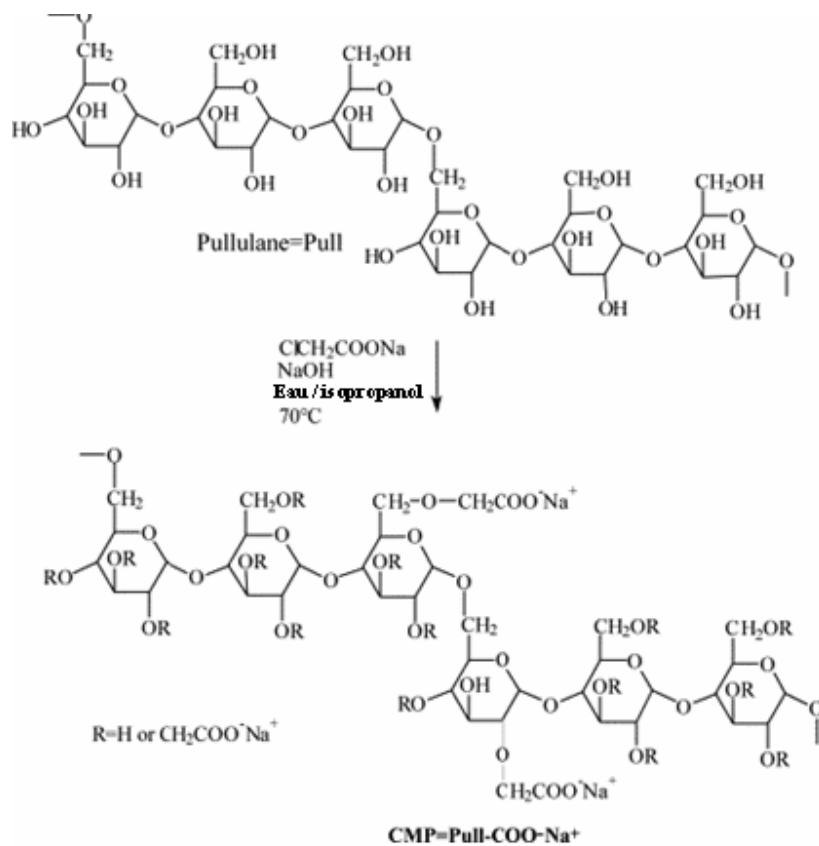


Figure I.15 Réaction de carboxyméthylation du pullulane en présence de chloroacétate sodium et d'hydroxyde de sodium à 70 °C dans l'eau (1/3 (V/V))/isopropanol [54].

Les hydrogels ont ensuite été obtenus en milieu aqueux avec l'acide adipique dihydrazide (ADH) comme réticulant et en présence du 1-éthyl-3-[3-(diméthyl amino)- propyl] carbodiimide hydrochlorique(EDCI) (Fig.I.16).

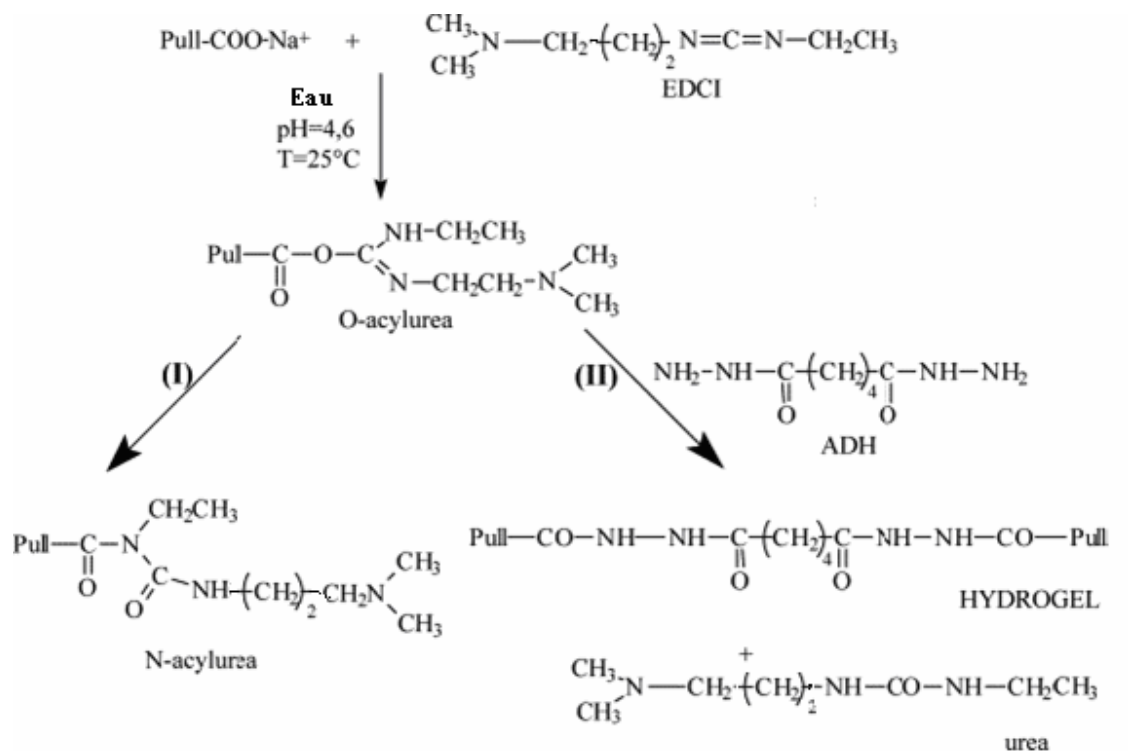


Figure I.16 (I) Réaction du carboxyméthyl pullulane avec l' EDCI, (II) réaction de couplage du carboxyméthyl pullulane avec l'ADH en présence d' EDCI dans l'eau à pH 4.6 [54].

Au vu de ces résultats, il semble donc possible de réaliser un greffage chimique entre une matrice carboxylée, soit un polysaccharide fonctionnalisé, et une molécule porteuse de fonctions amines en présence d'EDCI et en milieu aqueux.

On a ainsi décidé d'entreprendre le greffage chimique d'une enzyme, l' α -amylase, sur un support polysaccharide par la technique décrite ci-dessus.

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Produits

II.1.1 LES SUPPORTS POLYSACCHARIDIQUES

II.1.1.1 La carboxymethylcellulose (CMC)

La CMC (Fig.II.1) a le squelette de la cellulose constituée d'un enchaînement linéaire de glucoses. La présence sur chaque monomère glucose de trois groupements hydroxyyles, liés aux carbonnes C2, C3 et C6, permet la formation de ponts hydrogènes entre les structures cellulosiques.

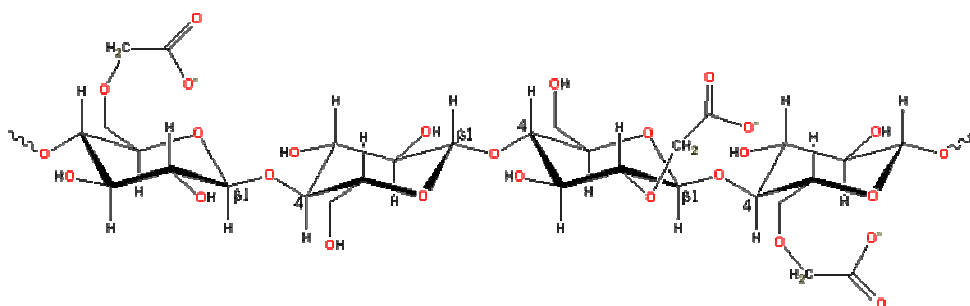


Figure II.1 structure de la CMC

II.1.1.2 L'alginate

L'alginate est relativement abondant dans la nature, il est présent sous deux formes : en tant que composant structurel de l'algue marine brune ou *Phaeophyceae* et comme polysaccharide présent dans les bactéries du sol.

Les applications industrielles de l'alginate sont liées à sa capacité à retenir l'eau ainsi qu'à ses propriétés gélifiantes, viscosifiantes et stabilisantes. Ses nouvelles applications biotechnologiques sont soit basées sur les effets biologiques spécifiques de la molécule d'alginate soit sur sa transition sol-gel unique et quasiment indépendante de la température en présence de cations multivalents. Ceci fait de l'alginate une matrice de choix pour l'immobilisation de cellules vivantes.

- **Structure Primaire**

L'acide alginique est un polymère naturel constitué de deux unités monosaccharidiques : l'acide D-mannuronique (M) (Fig.II.2) et l'acide L-gulonique (G) (Fig.II.3); il s'agit donc d'un polyuronide. Ces acides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques du type β -(1 \rightarrow 4). La proportion en acide mannuronique (ManA) et en acide gulonique (GulA) varie d'une espèce à l'autre [55].

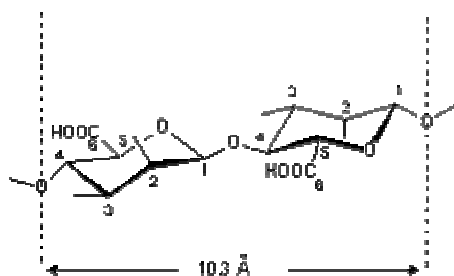


Figure II.2 Résidu d'acide mannuronique.

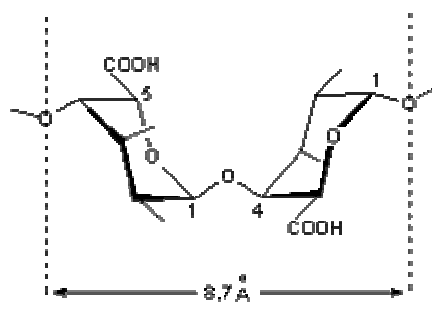


Figure II.3 Résidu d'acide guluronique.

L'acide alginique comporte une fraction riche en ManA appelée bloc M, une fraction riche en GulA appelée bloc G, et une fraction où les deux unités d'acides uroniques sont liées alternativement entre elles, appelée bloc MG ou GM (Fig.II.4).

Les séquences polymannuroniques et polyguluroniques se présentent sous forme de double hélice. La période de translation est de 10,35Å pour la première et de 8,72Å pour la seconde dans l'acide alginique pur. Le bloc M se dilate dans les alginate ou en solution. Sa période de translation devient dans ce cas 15Å. Elle est de 8,7Å pour le bloc G. En effet, les liaisons glycosidiques (1 → 4)- β-D-ManA sont diéquatoriales tandis que celles (1 → 4)- α-L-GulA sont diaxiales.

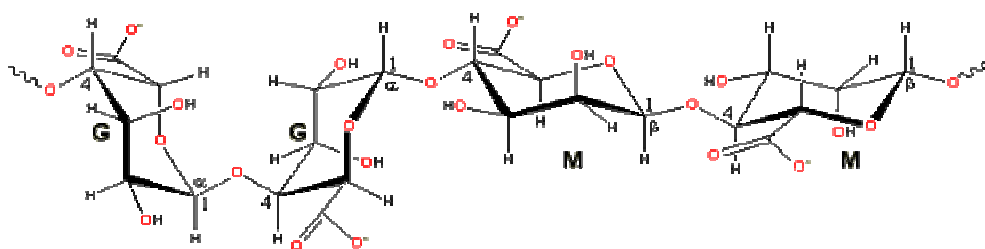


Figure II.4 Structure de l'alginate

- **Propriétés physiques**

En comparaison avec d'autres polysaccharides gélifiants, les particularités les plus frappantes de l'alginate sont les interactions sélectives avec des cations multivalents, qui est la base de la formation de gel et le fait que la transition sol/gel ne soit pas particulièrement affectée par la température.

La qualité de l'alginate est appréciée par le rapport des deux monomères (M/G). Ce rapport est fonction de l'espèce, de la variation saisonnière, de la partie et de la portion de l'algue brune en étude.

Les algues brunes du genre *Sargassum* ont donné un taux élevé du bloc G et un faible pourcentage du bloc M tandis que les Laminaires ont une quantité énorme en bloc M, et faible en bloc G. Le rapport M/G des monomères se situe entre 0,25 et 2,25 selon l'espèce, l'organe, ou le tissu considéré. La structure primaire des alginates dépend donc du rapport M/G et des proportions relatives des 3 types de blocs dans la chaîne [55].

- **Solubilité et viscosité**

L'acide alginique pur est insoluble dans l'eau. Sa solubilité ou non dans l'eau dépend du type de sels métalliques qui lui sont associés. Les sels de sodium, d'ammonium, de potassium et d'autres métaux alcalins se dissolvent parfaitement en solution aqueuse, en donnant des solutions à haute viscosité. Exemple: pour une dilution de 1% d'alginate à 20°C, la viscosité est de 1.500 à 3.000 centipoises, alors que la gomme arabique à la même dilution donne moins de 30 centipoises. Les sels de cations polyvalents, tel le Ca^{+2} sont insolubles en solution aqueuse, à l'exception de celui de Mg^{+2} [55].

- **Applications**

Les applications de l'alginate sont nombreuses, ce qui en fait l'un des polysaccharides les plus utilisés pour des domaines variés.

Les utilisations techniques de l'alginate sont multiples et variées. Il est utilisé dans les teintures textiles pour ses propriétés viscosifiantes, dans les enduits papiers et comme agent complexant pour la production de tiges de soudure.

En médecine l'alginate est utilisé depuis des décennies dans des applications traditionnelles comme pansement, moulage dentaire et dans des formulations contre le reflux gastrique. Mais l'alginate est aussi utilisé dans un domaine de techniques plus avancées : en tant que matrice d'immobilisation. La perspective la plus intéressante des cellules immobilisées sur gel d'alginate est sans doute leur utilisation potentielle dans la transplantation de cellules. Enfin l'alginate est utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif pour améliorer, modifier et stabiliser la texture des aliments [55].

- **Réticulation de l'alginate**

Les gels de polysaccharides peuvent être façonnés sous forme de billes, la géométrie sphérique permettant alors d'augmenter les transferts de masse par rapport aux films. Deux méthodes peuvent être utilisées pour produire les billes de gel : l'extrusion ou l'émulsion. Dans la méthode d'extrusion, un mélange liquide, contenant les polymères et les microorganismes, est extrudé par une seringue pour former des billes qui sont ensuite placées dans une solution de durcissement. La technique d'émulsion met en jeu une solution aqueuse contenant le polymère liquide et les cellules. Cette solution est dispersée dans une phase organique agitée pour former une émulsion eau dans huile. L'abaissement de la température induit la gélification du polymère et les billes de gel sont ensuite placées dans une solution ionique de durcissement. La technique d'émulsion permet de produire des billes de gel de différents diamètres (5 μm à 5 mm) selon les conditions.

Le principe de la réticulation est le suivant : lorsque l'alginate de sodium est introduit goutte à goutte dans une solution contenant des ions calcium, chacun de ces ions Ca^{2+} prend la place de deux ions Na^+ . La molécule d'alginate contient des fonctions hydroxyles qui peuvent être coordonnées aux ions Ca^{2+} (Fig.II.5). Seuls les blocs G retiennent par coordination les ions calcium. L'agrégation des chaînes parallèles conduit à un assemblage géométrique tridimensionnel régulier appelé "boîte à oeufs" (Figure.II.5) [55].

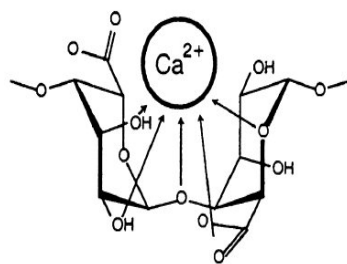


Figure II.5 Modèle de la « boîte à oeufs »

En conséquence, la rigidité du gel est fonction de la proportion et de la longueur du bloc G. Dans la pratique, la texture et la qualité recherchées du gel sont obtenues en jouant sur la concentration en ions du milieu. Lorsque l'alginate est coordonné au sodium, il forme une chaîne flexible. Lorsque les ions sodium sont remplacés par les ions calcium, chaque ion

calcium (Fig.II.6) (représenté ici par un point noir) coordonné pour deux chaînes d'alginate, les liant ainsi ensemble. Les chaînes deviennent alors moins flexibles et forment un réseau tridimensionnel : un gel.



Figure II.6 Modèle de chaîne d'alginate de calcium : formation de gel

II.1.2 l' α -amylase

L' α -amylase est une des plus anciennes et plus importantes enzymes utilisée dans l'industrie. Les amylases sont des hydrolases, qui hydrolysent les molécules d'amidon et forment ainsi des dextrans ou des oligosaccharides de longueurs de chaîne variables.

Les amylases peuvent être divisées en deux catégories : endoamylases et exoamylases.

- ❖ Les endoamylases, aussi connues sous le nom d'enzymes « liquéfiantes » ou α -amylases, catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,4 situées à l'intérieur de la molécule d'amidon.
- ❖ Les exoamylases, aussi appelées enzymes « saccharifiantes », hydrolysent les liaisons glucosidiques α -1,4 des extrémités non réductrices de la molécule d'amidon.

L'utilisation combinée des deux catégories d'enzymes est requise afin d'hydrolyser totalement la molécule d'amidon.

L' α -amylase est la plus demandée. Elle détient la plus grosse part du marché des enzymes vendues grâce à son application principale dans l'industrie de l'amidon puisqu'elle est bien connue pour son utilisation dans la boulangerie. Son champ d'application s'étend également aussi bien à la médecine qu'aux détergents, aux textiles et à l'industrie du papier.

L'hydrolyse acide et la décomposition thermique de l'amidon sont employées dans la production du sirop de glucose. Leurs produits sont plutôt compliqués, avec un coût élevé du fait de la nécessité de purifier, et ne sont pas appropriés à la production en série industrielle. L'emploi d'enzymes pour la décomposition de l'amidon a un coût plus faible et le

procédé est beaucoup plus simple. C'est devenu la méthode principale pour l'hydrolyse de l'amidon.

Le tableau II.1 résume les sources d' α -amylases

Tableau II.1 Sources d' α -amylases

α -amylase végétale	α -amylase bactérienne	α -amylase fongique	α -amylase animale
Blé et blé malté Eleusine (espèce de millet) Millet perle et sorgho	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Pseudomonas stutzen</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus candidus</i>	Salive Pancréas

Bacillus subtilis, *Bacillus amyloliquefaciens*, et *Aspergillus oryzae* sont les sources d' α -amylase les plus courantes du fait de leur grande thermostabilité.

Les valeurs de pH optimales de l'enzyme sont comprises entre 4,5 et 6,0. La stabilité de l'enzyme vis à vis du pH est un critère important pour l'étude des enzymes.

La température est un des paramètres les plus importants qui affecte le taux d'hydrolyse enzymatique. La température optimale d'utilisation se situe entre 40 et 55°C.

Pour des raisons économiques, on a décidé d'utiliser l' α -amylase comme enzyme pour notre étude.

II.1.3 Autres produits chimiques

L'acide acétique (ACROS), l'acétate de sodium (Prolabo), le 1-éthyl-3-[3-(diméthyl amino)-propyl]carbodiimide hydrochlorique (EDCI) (SIGMA), glucose 99% (sigma), le $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ACROS) sont des produits commerciaux utilisés tels quels.

II.2 Méthodes d'analyse et techniques

II.2.1 Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière

II.2.1.1 Théorie de la chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), aussi appelée chromatographie par perméation de gel (GPC), est une technique basée sur la séparation des macromolécule en fonction de leurs tailles. La phase stationnaire est constituée d'un gel de polymère réticulé et gonflé présentant des pores de tailles variables. Les molécules qui migrent dans ce gel avec l'éluant vont être plus ou moins retenues en fonction de leurs dimensions ou volumes

hydrodynamiques (V_h). Ainsi, les plus volumineuses, n'ayant pas accès aux pores les plus petits, seront éluées rapidement alors que les molécules de tailles plus petites seront retardées par le plus grand volume offert dans les pores (Fig.II.7).

Une détection appropriée (UV, réfractométrie..) permet alors de visualiser et/ou de quantifier le fractionnement. Il est possible de récupérer les différentes fractions (SEC préparative). Dans le cas d'un polymère polydispersé, on peut ainsi obtenir le profil de distribution des volumes hydrodynamiques (V_h), proportionnel au produit $[\eta].M$ défini par Fox-Flory par :

$$[\eta]=\Phi.\langle L^2 \rangle^{3/2}/M \quad (II.1)$$

Avec $[\eta]$ la viscosité intrinsèque, M la masse moléculaire moyenne et $\langle L^2 \rangle$ la distance quadratique moyenne des extrémités de chaîne, Φ le paramètre de viscosité de Flory.

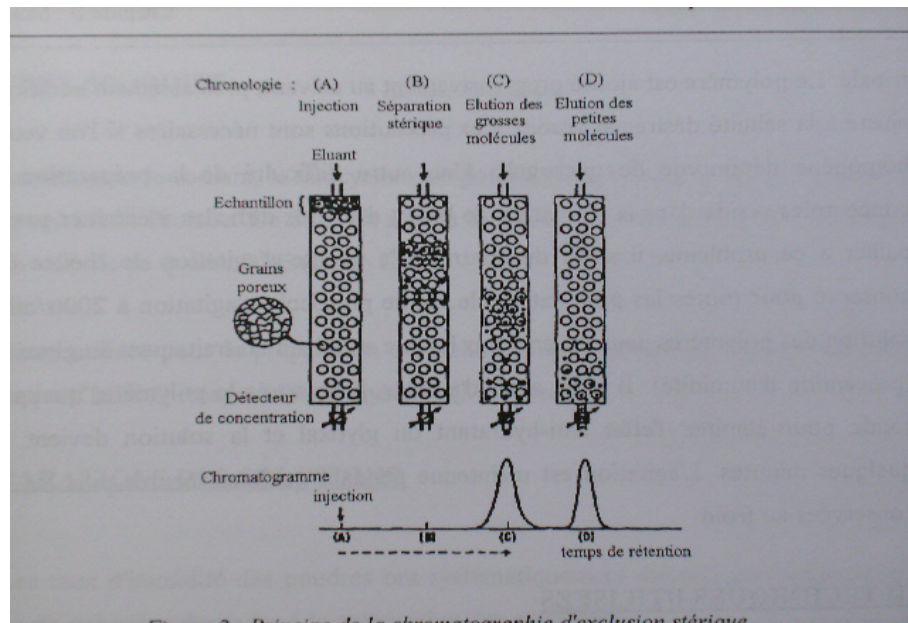


Figure II.7 principe de la chromatographie d'exclusion stérique [56].

Cette technique est donc basée sur les seuls effets stériques et le polymère doit être inerte vis-à-vis de la phase stationnaire, car toute interaction de nature chimique ou physique fausse la mesure du volume d'éluion par rapport à l'étalonnage.

II.2.1.2 Diffusion de la lumière et détermination de la masse moléculaire d'un polymère

La diffusion de la lumière (DDL) représente une technique de choix dans la caractérisation physico-chimique des polymères. Développée il y'a une quarantaine d'années grâce aux progrès dans le domaine des sources lumineuses au laser notamment, la DDL

permet d'obtenir des informations sur les dimensions des molécules diffusantes ainsi que sur la thermodynamique de solubilité du soluté dans le solvant considéré.

La simple analyse de la dépendance spatiale de l'intensité diffusée par une particule (diffusion statique) permet d'accéder à la masse moléculaire moyenne en poids (M_w), au rayon de giration moyen (R_g) et au second coefficient de viriel (A_2).

- **Diffusion statique de la lumière**

- ❖ **Rappels théoriques (Annexe I)**

Les rappels théorique de la diffusion de la lumière sont exposés dans l'annexe I. La relation générale de la diffusion de la lumière est alors donnée par :

$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \left(\frac{16\pi^2 n_0^2 R_g^2}{3\lambda_0^2 M_w} \right) \sin^2(\theta/2) + 2A_2C + 3A_3C^2 + \dots \quad (\text{II.2})$$

$$\text{Avec : } K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_a} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (\text{II.3})$$

ΔR_θ , le rapport de Rayleigh

C, la concentration en polymère

M_w , la masse moléculaire moyenne en poids du polymère

R_g , le rayon de giration moyen du polymère

n_0 , l'indice de réfraction du solvant

λ_0 , la longueur d'onde du faisceau incident

N_a , le nombre d'Avogadro

dn/dc , l'incrément d'indice de réfraction du couple polymère/solvant

θ , l'angle d'observation par rapport à la lumière incidente

En traçant

$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = f(\sin^2(\theta/2) + KC) \quad (\text{II.4})$$

Avec K, une constante arbitraire, on réalise un diagramme de Zimm (Fig.II.8).

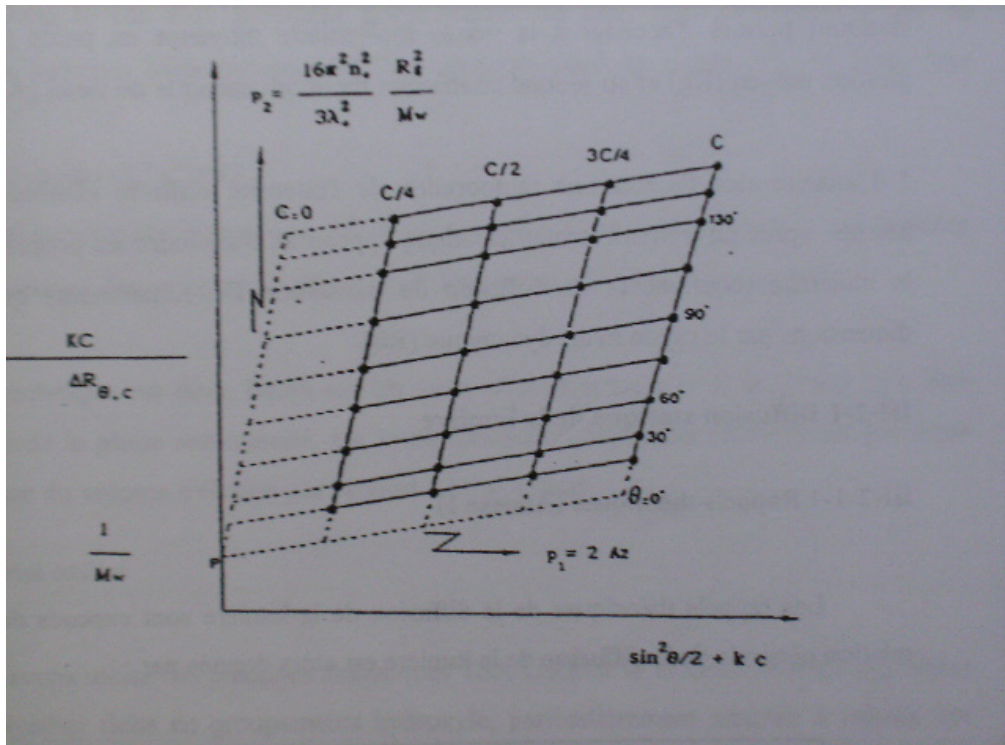


Figure II.8 Diagramme de Zimm [56].

Une double extrapolation à concentration nulle et à angle nul permet d'accéder respectivement à M_w et A_2 puis M_w et R_g .

II.2.1.3 Dispositif et principe de la méthode de la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière : couplage SEC/MALLS/DRI

(Size Exclusion Chromatography/Multi Angle Laser Scattering/Differential Refractometry Index)

Le dispositif de la SEC et de la MALLS (Fig.II.9) avec un réfractomètre différentiel permet l'analyse simultanée des fractions isomoléculaires issues de la séparation par taille. L'éluant est constitué de nitrate de lithium (LiNO_3) 0,1M et d'azide à 2%(antibactérien), le tout filtré sur membrane 0,1 μm (GSWP 047 Millipore). Le dispositif de couplage alimenté par l'éluant, est constitué en ligne des éléments suivants :

- Un dégazeur (Gastoor 154,Flow, Japon)
- Une pompe HPLC (Flow intelligent pump, Japon)à 0,6 ml/min
- Une vanne d'injection (Rhéodyne) munie d'une boucle d'injection de 100 μl
- Un pré filtre inox (0,45 μM)

- Deux colonnes Shodex en série (OHpack SB806HQ et SB804HQ)
- Un détecteur de diffusion de lumière multiangles (fig II.10) : MALLS (Dawn EOS, Wyatt Technology Corp, Santa Barbara, Ca), équipé d'une cellule K5 de 50 μ l, d'un laser lumière rouge (He-Ne, 690nm) de 5mW, et de 18 diodes de mesure (angles répartis autour de la cellule)
- Un détecteur réfractométrique différentiel (DRI) : ERC 7515 A, Erman Cr. Inc., Japon

La double détection permet de déterminer en continu la masse molaire et la concentration grâce aux détecteurs MALLS et DRI pour chaque fraction isomoléculaire éluée. L'ensemble des acquisitions est collecté et exploité par le logiciel Astra 4.90 sous Windows. Après une extrapolation à angle nul à chaque fraction analysée et une intégration sur l'ensemble du pic, on accède aux masses moyennes et au rayon de giration moyen. La concentration est corrigée par la prise en compte du coefficient de Viriel A_2 .

Le grand intérêt de ce couplage réside dans le fait que la seule connaissance de l'incrément d'indice de réfraction dn/dc permet d'obtenir une distribution de masses molaires absolues par détection simultanée DRI et diffusion de la lumière. L'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) a été fixé à : $dn/dc \approx 0,15L/g$. La masse molaire moyenne en poids M_w est donc obtenue à tout moment par la droite d'extrapolation à angle nul de la courbe de Zimm grâce aux photodiodes détectant l'intensité diffusée à 15 angles différents compris entre 14° et 160° simultanément qui constituent le domaine accessible en milieu aqueux. La pente de cette droite permet alors d'accéder au rayon de giration R_g .

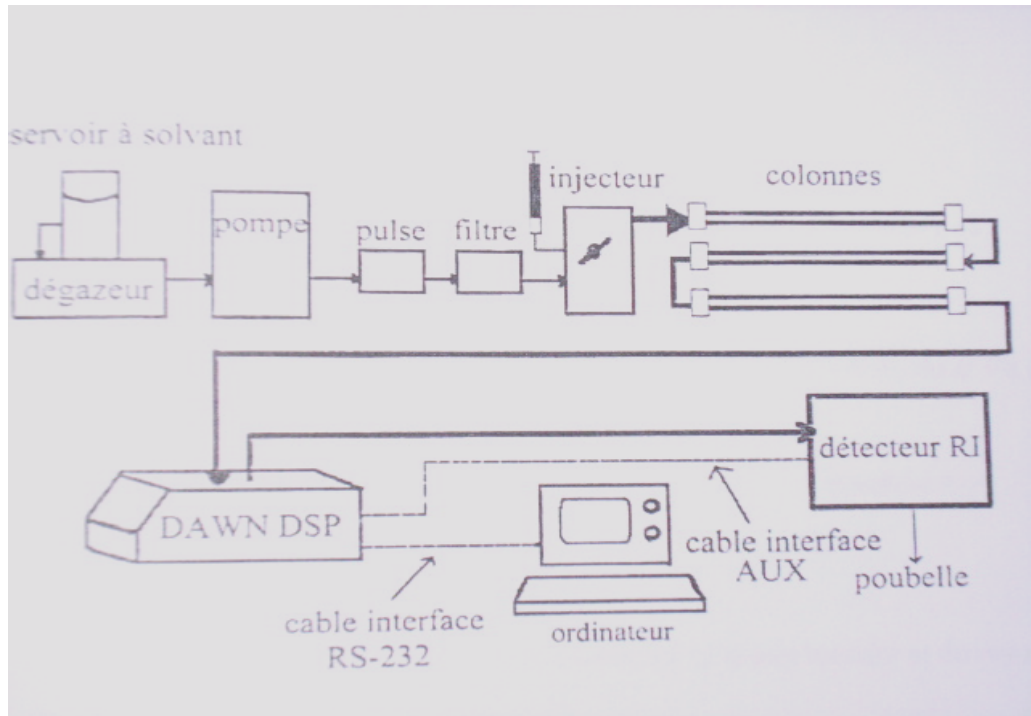


Figure II.9 Représentation schématique du couplage SEC/MALLS/DRI

La double extrapolation à angle et concentration nuls pour accéder à M_w , A_2 et R_g par la méthode Zimm se fait par le logiciel Astra 4.90 qui propose deux équations pour la détermination de la masse molaire et du rayon de giration

$$\text{L'équation de Zimm : } \frac{KC}{\Delta R(\theta, C)} = f\left(\sin^2 \frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{II.5})$$

Avec l'extrapolation, $1/M_w$ (ordonnée à l'origine) et R_g (pente à une concentration nulle)

$$\text{L'équation de Debye : } \frac{\Delta R(\theta, C)}{KC} = f\left(\sin^2 \frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{II.6})$$

La méthode de calcul pour nos échantillons est « Zimm ordre 1 ».

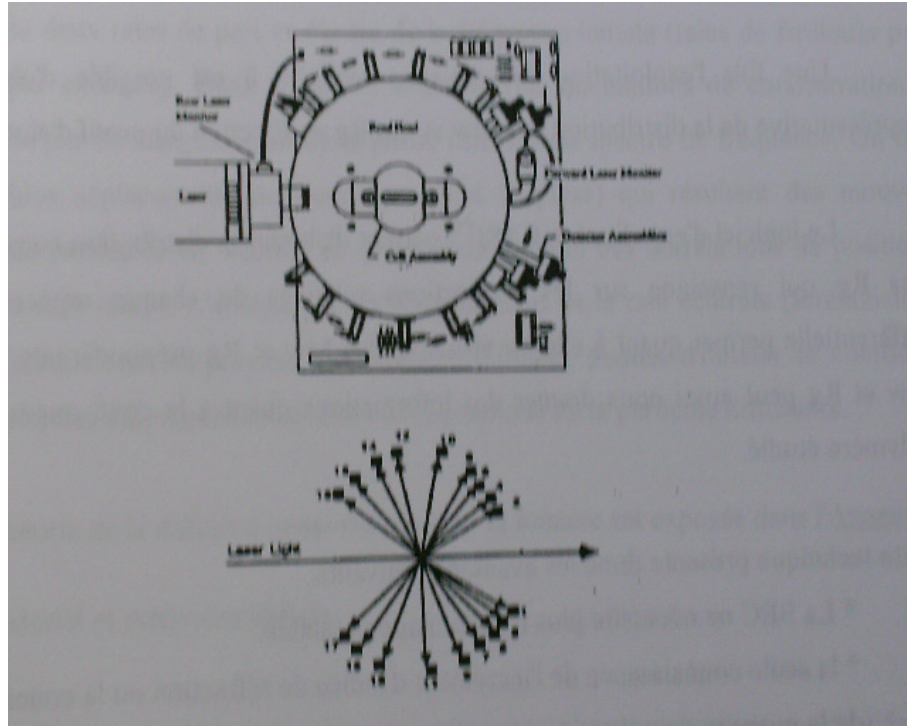


Figure II.10 Schéma de la cellule de diffusion multi-angles (de marque Dawn-F, Wyatt) [56].

II.2.2 L'analyse du carbone organique total et de l'azote organique total (T_C, T_N)

II.2.2.1 L'instrument de mesure (analyseur du COT/NOT)

Le carbone organique total et l'azote organique total ont été mesurés à l'aide d'un appareil modèle Total Organic Carbon Analyser de marque Shimadzu TOC-VCSH/CSN

Le TOC- VCSH/CSN est un instrument qui mesure la quantité de carbone total (CT), du carbone inorganique (IC) et du carbone organique total (T_C) dans l'eau. Avec l'installation optionnelle de l'unité NT, il est aussi possible de mesurer l'azote total contenu dans l'eau, en utilisant le principe de la chimiluminescence.

Il y a deux types de carbone présents dans l'eau : le carbone organique et le carbone inorganique. Le carbone organique se lie avec l'hydrogène ou l'oxygène pour former des composés organiques et le carbone inorganique (IC) est la structure de base des composés inorganiques. La somme des deux donne le carbone total (CT) et la quantité du carbone organique total est déduite de la relation suivante :

$$T_C = CT - IC \quad (II.7)$$

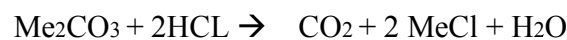
L'azote dans l'eau est également de deux types : organique et inorganique, et la somme est désignée par l'azote total (NT).

II.2.2.2 Principe de l'analyse du carbone total (CT)

Dans le TOC-V, le gaz vecteur est contrôlé grâce à un régulateur de pression et un contrôleur d'écoulement. Le gaz vecteur a un débit de 150 mL/min dans le tube de combustion chauffé à 680 °C et contenant un catalyseur agissant comme oxydant. Le TC d'un échantillon est brûlé dans le tube de combustion pour former du dioxyde de carbone. Le gaz vecteur, contenant le CO₂ et d'autres produits de la combustion, coule du tube de combustion jusqu'à un déshumidificateur, où il est refroidi et déshydraté. Ensuite il passe à travers un laveur de gaz, afin de l'épurer de ses halogènes, avant d'atteindre la cellule de spectroscopie infrarouge non-dispersive où le CO₂ est détecté. Cette détection forme un pic et l'aire de ce pic est mesurée par ordinateur.

II.2.2.3 Principe de l'analyse du carbone inorganique (IC)

Le carbone inorganique dans l'analyse, se réfère au carbone contenu dans le dioxyde de carbone dissout dans l'eau et se trouvant dans les carbonates. En acidifiant l'échantillon avec une petite quantité d'acide chlorhydrique pour obtenir un pH inférieur à 3, puis en le faisant barboter, les carbonates produisent du CO₂ grâce à la réaction suivante :



Puis le CO₂ est détecté par spectroscopie infrarouge. Le T_C est enfin obtenu par la différence entre CT et IC.

II.2.2.4 Principe de la mesure de l'azote total (NT)

Lorsqu'un échantillon est introduit dans le tube de combustion, porté à 720°C, le NT contenu dans celui-ci se décompose en monoxyde d'azote. Le gaz vecteur, qui contient le monoxyde d'azote, est refroidi et déshydraté dans le déshumidificateur. L'azote est ensuite détecté grâce à une réaction de chimiluminescence du monoxyde d'azote avec l'ozone. La quantification est convertie en concentration par interpolation à partir d'une courbe de calibration obtenue avec du nitrate de potassium.

II.2.3 Analyse des sucres réducteurs (Méthode Somogyi Nelson)

- **Principe de la méthode de SOMOGYI NELSON [57]**

En milieu alcalin et à ébullition, les sucres réducteurs réduisent les ions cuivriques Cu^{2+} du réactif D (voir la préparation des solutions ci-dessous) en ions Cu^+ qui précipitent. L'addition de la solution arséniomolybdique, le réactif C(voir la préparation des solutions ci-dessous) , à température ambiante, permet d'engager les ions cuivreux dans un complexe bleu, dont la densité optique est proportionnelle à la concentration en sucres réducteurs.

Il faut donc préalablement tracer une droite d'étalonnage. Celle-ci est faite à partir de différentes solutions de concentrations en glucose connues.

- **Réalisation de la droite d'étalonnage voir annexe (III)**

II.2.4 L' Ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique de filtration qui permet de séparer les composants d'un liquide grâce aux différences de taille qu'ils présentent. Essentiellement, il s'agit de filtrer sous pression d'air un liquide à travers une membrane avec des pores tellement petits que les macromolécules seront retenues sur la membrane. Ces macromolécules pourront alors être récupérées, débarrassées des petites molécules de la solution originale, des impuretés.

Le montage typique d'une cellule à ultrafiltration est relativement simple. Il s'agit d'un contenant transparent qu'on peut ouvrir pour déposer le mélange à ultrafiltrer. La membrane est mise en place sur un support poreux solide qui constitue la base du dispositif et qui se fixe sur le contenant transparent. Après avoir refermé la cellule, on applique une pression sur le mélange. L'eau et les petites molécules sont forcées à travers la membrane et sont évacuées par un tuyau sous la base. Le dispositif comprend aussi une tige rotative qui permet de mélanger continuellement. La filtration se fait lentement à cause du débit très lent de ces membranes microporeuses.

II.2.5 La lyophilisation

La lyophilisation, appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer, par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit.

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur, ou piège.

Les échantillons sont donc tout d'abord congelés pour que l'eau qu'ils contiennent soit sous forme de glace, puis, sous l'effet du vide, la glace se transforme en vapeur, et va se retrouver sur les parois du condensateur. Une fois toute la glace sublimée, les échantillons sont séchés à froid. Cette opération peut durer plusieurs jours.

En raison de ses particularités, la lyophilisation occupe une place originale au regard des techniques de séchage. Elle permet d'obtenir des produits finaux de haute qualité. La forme et l'aspect des produits sont bien conservés, leur qualité est bien supérieure à celle des produits séchés par les techniques classiques. La transition du produit de l'état congelé à l'état déshydraté, en l'absence d'une forte proportion d'eau liquide, réduit les possibilités de développement des réactions d'altération. Un autre avantage technologique majeur de la lyophilisation repose sur la capacité du produit lyophilisé à se réhydrater instantanément.

II.2.6 Autres techniques

Pour la réalisation de cette partie des travaux de la thèse, d'autres techniques ont été utilisées dont on cite : La spectrophotométrie UV Visible, la conductimétrie, et la pH métrie.

CHAPITRE III. IMMOBILISATION PHYSIQUE DE L' α -AMYLASE

SUR L'ALGINATE

III.1 Test de l'activité de l' α -amylase d' *Aspergillus oryzae*

III.1.1 Définition de l'activité en (U/mg.min) :

On définit l'activité par le nombre n de μ moles de sucres réducteurs libérés par mg d'enzyme et par minute.

III.1.2 Variation de l'activité de l'enzyme en fonction du pH (T=25°C)

➤ Mode opératoire :

- On prépare 0,25 ml de solutions tampon d'acétate (pH=2, 3, 4 et 5) et d'acide citrique/phosphate (pH= 6 et 7) .
- On ajoute 0,25 ml d'une solution d'amylase (0,1mg/ml).
- 0,5 ml d'amidon de pomme de terre (1%) solubilisé à 120°C (à reflux pendant 30 minutes) sont ajoutés à la solution d'enzyme.
- On laisse réagir pendant 3min .
- On prend 20 μ l .
- On dilue à 3ml (+2980 μ l) (facteur de dilution f=150)
- On prend 1ml de la solution diluée.
- On la verse dans 1ml de la solution cuivrique (D).
- On laisse réagir pendant 20 mn à ébullition.
- On ajoute 1ml de la solution arséniate (C).
- On laisse refroidir et on dilue à 5 ml.
- On mesure l'absorbance à 600nm (le blanc étant 0,5 ml d'amidon de pomme de terre (1%)+ 0,5tampon) et on détermine le nombre de moles de sucres réducteurs selon la méthode d'analyse présentée dans la partie II-2-3 et annexe III.

➤ Résultats

Les résultats expérimentaux de la variation de l'activité de l'enzyme en fonction du pH sont donnés dans les tableaux III.1 et III.2 et la figure.III.1. On remarque que l'activité atteint une valeur maximale à un pH =6. Le tableau III.2 donne les valeurs de la variation de l'activité relative à la valeur maximale.

Tableau III.1 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction du pH .

pH	D.O	Cglucose ($\mu\text{mol/ml}$)= $\text{D.O} \cdot f / 0,00$ $33/1000$	Activité (U/mg.min) = $n(\mu\text{moles}$ sucreslibérés)/ $m_{\text{enz}}(\text{mg})/3 \text{ min}$ [$m(\text{enzyme})=0,025\text{mg}$]
2	0,038	1,727	23,02
3	0,039	1,772	23,62
4	0,038	1,727	23,02
5	0,048	2,181	29,08
6	0,060	2,727	36,36
7	0,028	1,272	16,96

Tableau III.2 Variation de l'activité relative de l'enzyme libre en fonction du pH.

pH	Activité relative (l'activité maximale étant prise égale à 100%)
2	63,31
3	64,96
4	63,31
5	81,96
6	100
7	46,64

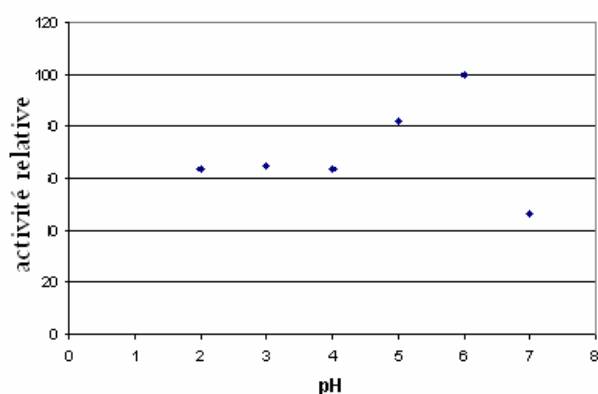


Figure III.1 Variation de l'activité relative de l'enzyme en fonction du pH

III.1.3 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction de la température

➤ Mode opératoire :

Pour l'étude de l'effet de la température sur l'activité de l'enzyme libre, on a adopté le même mode opératoire précédent (II-1-2), en faisant varier la température de 20 à 60°C à la valeur du pH=6 (pH de l'activité maximale).

➤ Résultats

Les tableaux III.3 et III.4 et la figure III.2 donnent les résultats de l'influence de la température sur l'activité de l'enzyme libre utilisée au pH de la valeur d'activité maximale. Ces résultats montrent que la valeur de la température qui donne une valeur maximale de l'activité dans les conditions expérimentales choisies est égale à 50°C.

Tableau III.3 Variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction de la température.

T(°C)	D.O	Cglucose($\mu\text{mol/ml}$)= $\text{D.O} \times f \times 0,0033/1000$	Activité (U/mg.min)
20	0,052	2,363	31,50
30	0,089	4,045	53,93
40	0,113	5,136	68,48
50	0,133	6,045	80,6
60	0,054	2,454	32,72

Tableau III.4 Activité relative de l'enzyme libre en fonction de la température.

T(°C)	Activité relative% (l'activité maximale étant prise égale à 100%)
20	39,08
30	66,91
40	84,96
50	100
60	40,59

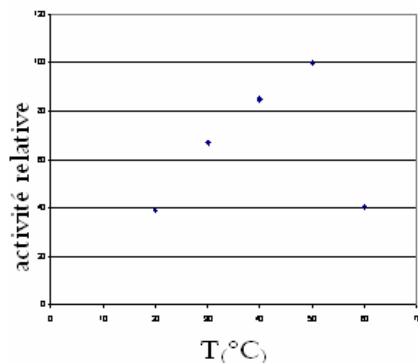


Figure III.2 Variation de l'activité relative de l' α -amylase en fonction de la température

Les résultats de l'étude de la variation de l'activité de l'enzyme libre en fonction du pH et de la température montrent bien qu'elle est active et les conditions optimales de pH et de température (pH=6, T=50°C) sont identiques à celles données par le fournisseur.

III.2 Tests de dégradation des polysaccharides de greffage

III.2.1 Test de dégradation de la CMC

La première étape de notre étude consiste à vérifier la non dégradation de la carboxyméthylcellulose (CMC) par l' α -amylase afin de pouvoir l'utiliser par la suite pour le greffage chimique.

Nous avons donc tout d'abord analysé la CMC et l' α -amylase seules en chromatographie d'exclusion stérique (SEC). La CMC est ensuite mise en présence d' α -amylase dans une solution tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium à pH 4,7 qui est le pH de la réaction. Celles-ci sont placées dans un bain thermostaté à 25°C pendant quelques jours. Des prélèvements sont effectués à t = 0, 24h, 48h et 72h, neutralisés à la soude puis placés au réfrigérateur en vue de leur analyse en chromatographie.

- **Résultats**

Les résultats nous donnent pour la CMC seule (Fig III.3) des masses molaires moyennes en masse et en nombre de 135 000 et 58 000 g.mol⁻¹, pour un indice de polymolécularité de 2,3. La CMC est donc très dispersée et la valeur de la pente de la droite du rayon en fonction de la masse molaire qui est de 0,6 (Fig III.4) nous indique une conformation en pelote statistique.

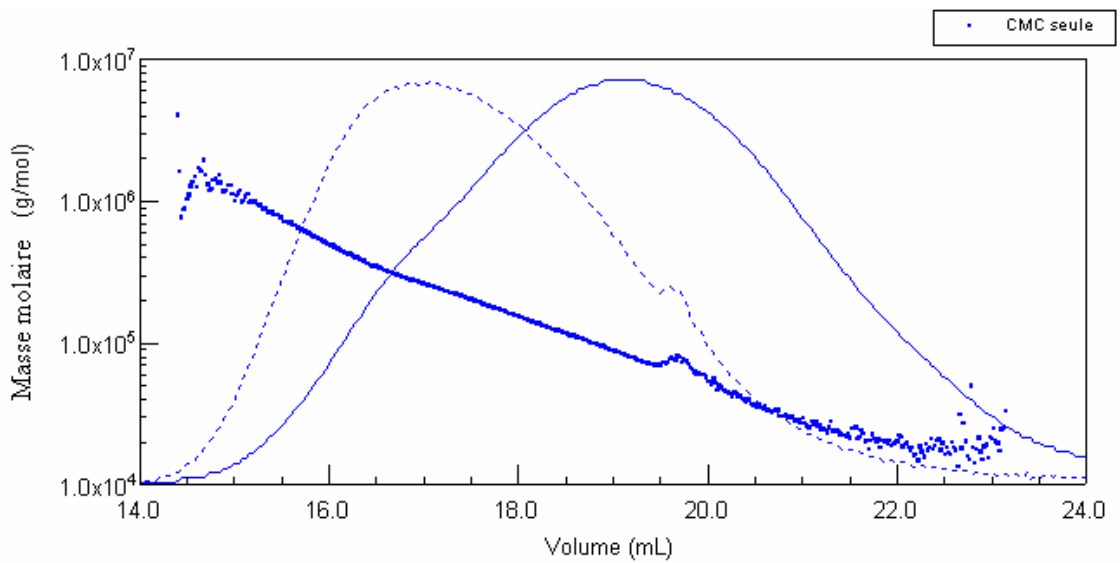


Figure III.3 Chromatogrammes de distribution de la masse en fonction du volume d'éluion de la CMC seule .CMC à 2 g/L, filtration 0,45 μm , débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15, Zimm 1, angles à 17

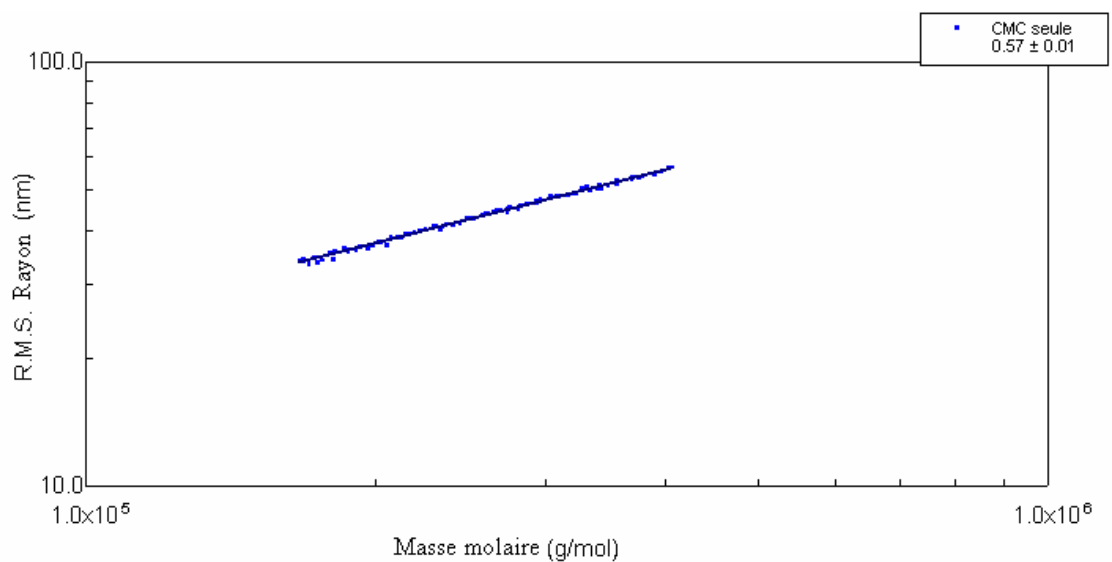


Figure III.4 Courbe représentant les valeurs du rayon de giration en fonction de la masse molaire de la CMC testé à la dégradabilité par l' α -amylase.

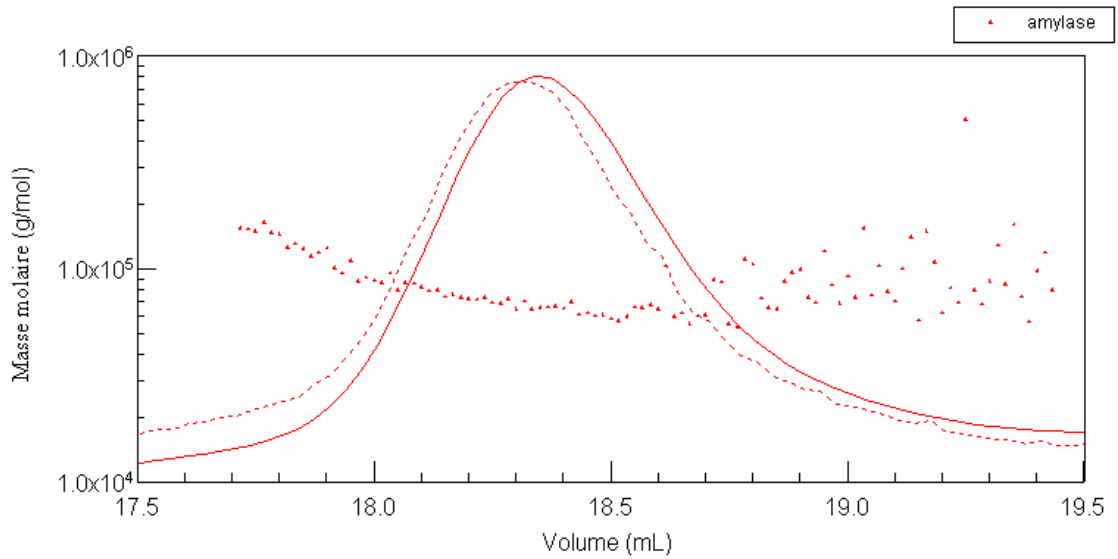


Figure III.5 Chromatogramme de distribution de la masse molaire en fonction du volume d'élution de l' α -amylase seule à 10 g/L, filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,2, Zimm 1, angles 7 à 17

L' α -amylase brute quant à elle possède des masses molaires moyennes en masse et en nombre de 77 500 et 73 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Fig.III.5) pour une polydispersité de 1,07. Elle a donc une faible polymolécularité mais la distribution décroissante des masses ne correspond pas à une enzyme pure car une protéine a généralement une masse constante.

En comparant la CMC et l' α -amylase seules (Fig.III.6) , nous pouvons bien voir que l'amylase est plus petite que la CMC puisque son volume d'élution est plus grand. L'analyse de l' α -amylase montre également la présence d'agrégats. En effet, aux alentours de 13 et 16,5 mL d'élution, la diffusion de lumière détecte de grosses particules mais il n'y a pas de signal réfractométrique, donc une concentration très faibles.

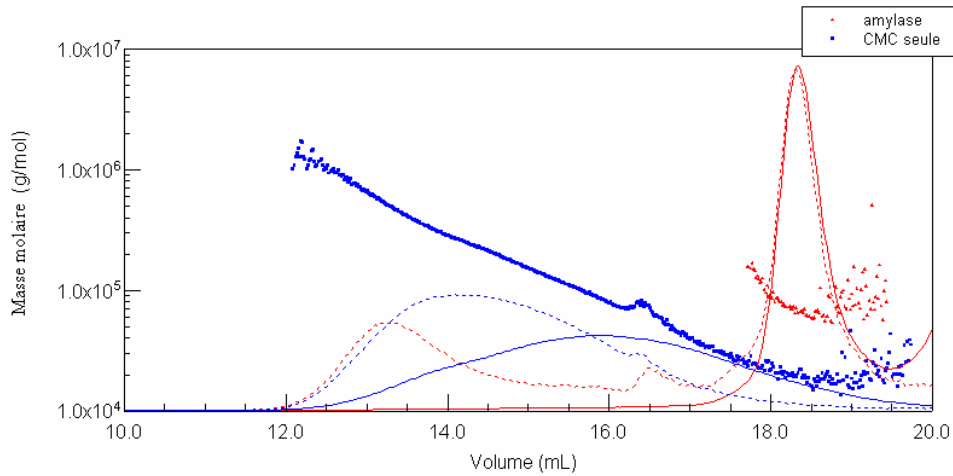


Figure III.6 Comparaison des Chromatogrammes des distributions de masse de la CMC et de l' α -amylase en fonction du volume d'élution.

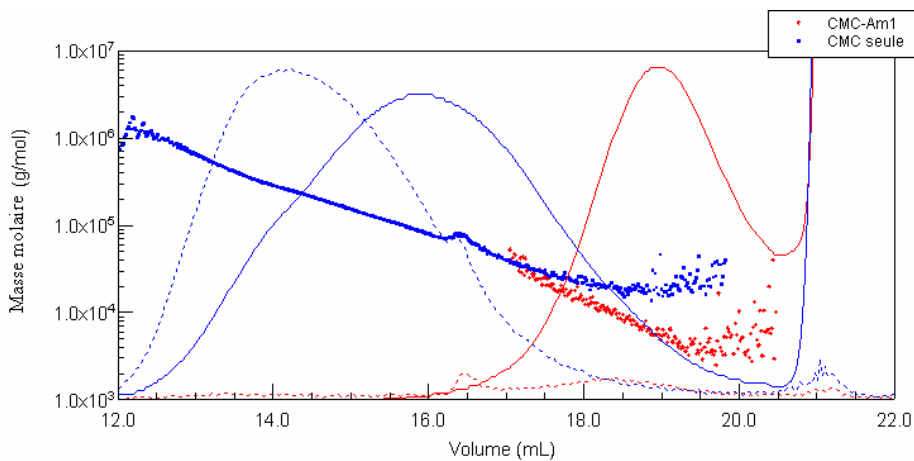


Figure III.7 Chromatogrammes des distributions de masse en fonction du volume d'élution de la CMC seule et après mélange avec l' α -amylase.

Les analyses par SEC/MALLS (Fig.III.7) montrent qu'au contact de l' α -amylase, une diminution significative des masses molaires de la CMC, passant de 135 000 à 8 400 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ est observée: il y a dégradation. Or, l' α -amylase ne dégrade théoriquement pas la CMC. Ceci provient donc probablement des impuretés d'hydrolases présentes. En effet, l' α -amylase que nous utilisons n'est pas pure et elle est extraite d'un champignon : *Aspergillus Oryzae* qui peut produire de la cellulase, responsable de la dégradation de la cellulose.

Pour résoudre ce problème de dégradabilité de la CMC, deux solutions sont alors possibles : utiliser une enzyme plus pure ou utiliser un autre support polymère. L' α -amylase purifiée étant assez chère, nous choisissons alors de remplacer la CMC par un autre polysaccharide, l'alginate de sodium.

III.2.2 Test de dégradation de l'alginate

Nous effectuons le même test de dégradation sur l'alginate par l' α -amylase .

- **Résultats**

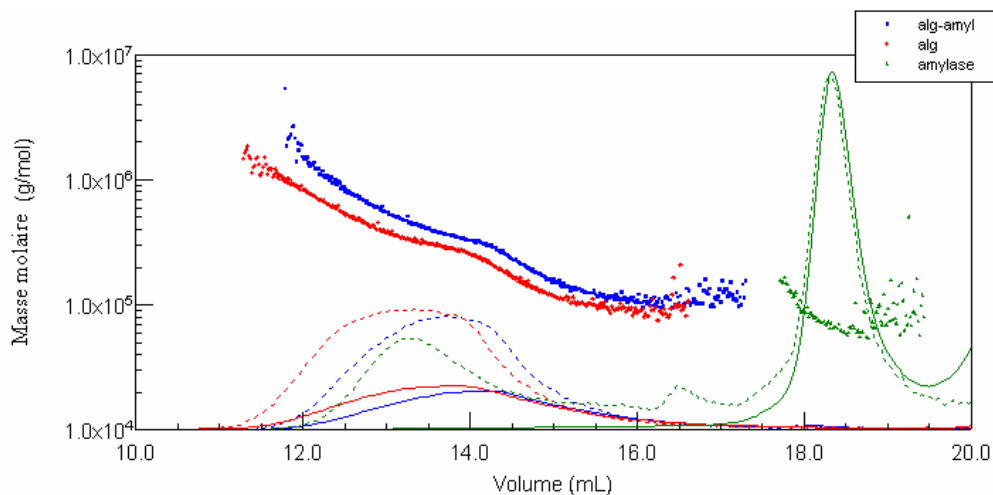


Figure III.8 Chromatogrammes des distributions des masses en fonction du volume d'élution de l'amylase et de l'alginate B avant et après mélange avec l' α -amylase. Alginate B1,2 à 1,8 g/L, α -amylase à 0,3 g/L, pH 4,7, 51h, filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15, Zimm 1, angles 7 à 17

Nous constatons (Fig III.8) que, lorsque l'alginate est mis en présence de l' α -amylase, l' α -amylase n'est plus détectée aux mêmes volumes d'élution quand elle est analysée seule. L' α -amylase est certainement fixée sur l'alginate. Cette fixation est probablement due aux interactions entre l'enzyme et le polymère.

De plus, la distribution des masses molaires de l'association alginate- α -amylase est supérieure à celle du polysaccharide seul (Fig III.9). Les résultats obtenus sont $M_w = 310\,000$

$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $M_n = 215\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'alginate seul et $M_w = 335\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $M_n = 230\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l' α -amylase adsorbée.

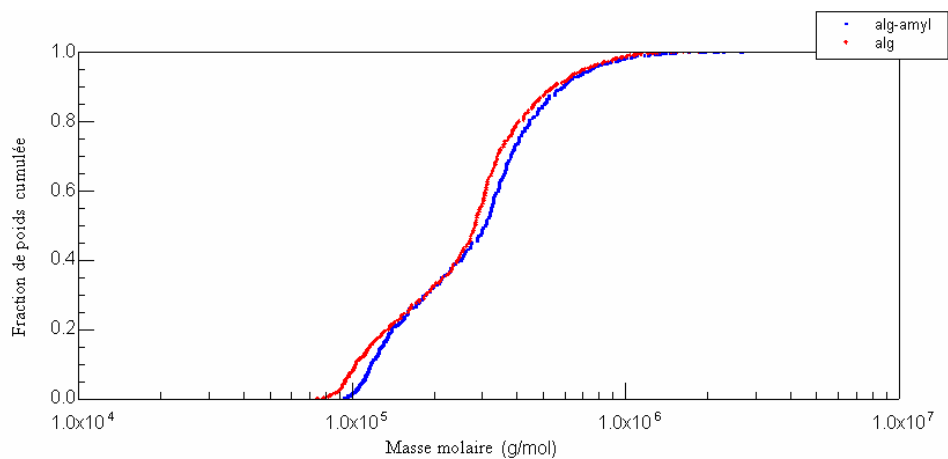


Figure III.9 Chromatogrammes de distribution des masses molaires de l'alginate seul et de l'alginate mélangé avec l' α -amylase.

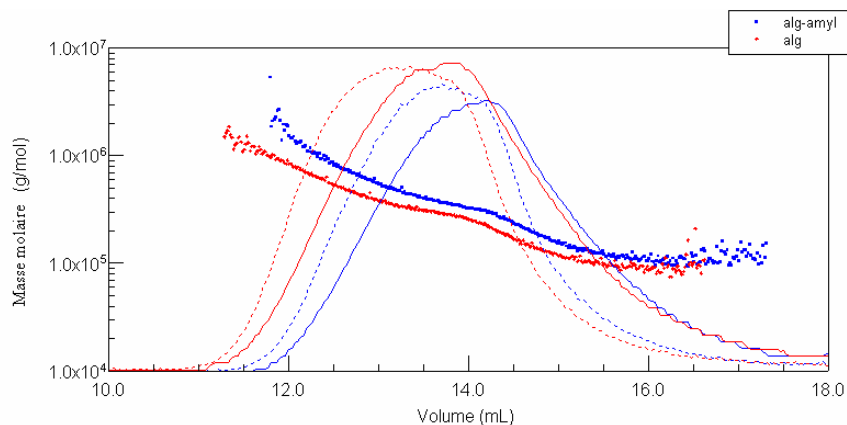


Figure III.10 Comparaison des Chromatogrammes des distributions des masses de l'alginate B seul et de l'alginate mélangé à l' α -amylase.

Pour un même volume d'élution, par exemple 14 mL (Fig III.10), l'association alginate- α -amylase a une masse molaire plus élevée que l'alginate seul, ce qui signifie donc que cette association est plus compacte. Les interactions sont donc d'origine intramoléculaire. Nous décidons alors d'étudier ce phénomène plus en détail.

III.3 L'immobilisation physique de l' α -amylase sur les alginates

III.3.1 Procédures d'immobilisation physique et influence de certains paramètres sur l'immobilisation physique

On réalise une série d'expériences dans lesquelles on met en contact l' α -amylase dialysée et lyophilisée avec deux échantillons d'alginate (C(M/G=0,5) et B(M/G=1,2)) selon les conditions opératoires indiquées dans le tableau.III.5.

Tableau III.5 Conditions opératoires de l'immobilisation physique de l'amylase sur les alginates

N°Expérience	Alginate	M/G	Concentration d'alginate /(g/l)	Concentration d'enzyme/(g/l)	pH	t/h
1	B	1,2	18	3	4,7	24
2	B	1,2	10	3	4,7	24
3	B	1,2	10	3	4,7	48
4	C	0,5	10	3	4,7	24
5	C	0,5	10	3	4,7	48
6	C	0,5	10	1,5	4,7	24
7	C	0,5	10	0,75	4,7	24
8	C	0,5	10	1,5	7	24
9	C	0,5	10	0,75	7	24
10	C	0,5	20	3	7	24
11	C	0,5	20	6	7	24

Les différentes conditions opératoires ont été choisies afin d'étudier l'influence de certains paramètres sur le taux d'immobilisation, en l'occurrence, le pH, le temps d'incubation, la nature et la concentration de l'alginate et la concentration initiale de l'enzyme.

III.3.2 Préparation des billes d'hydrogel (enzyme adsorbée sur les alginates)

Nous avons préparé des billes d'enzyme adsorbées sur les alginates par séquestration du produit de l'immobilisation dans une solution de CaCl_2 en introduisant goutte à goutte à l'aide d'une pipette Pasteur une solution d'alginate et d'enzyme dialysée dans une solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,1 M sous agitation. Les billes d'hydrogels d'alginate séquestré ainsi obtenues sont filtrées sur Büchner avec précaution et rincées trois fois à l'eau distillée. Elles sont alors conservées au réfrigérateur dans un pot en présence d'un papier filtre humidifié.

III.3.3 Détermination du taux d'immobilisation physique de l'enzyme

III.3.3.1 Analyse du carbone organique total et de l'azote organique total

Afin d'estimer le taux d'adsorption de l'amylase sur les alginates on mesure le carbone organique total et l'azote organique total dans les trois produits suivants :

- **L' α -amylase dialysée**

On prépare une solution d' α -amylase à environ 1g/L en introduisant 9,9 mg d'amylase dans 10 mL d'eau distillée. Cette solution est purifiée par dialyse, on la place dans une membrane dont les caractéristiques sont les suivantes :

Diamètre=25,5 mm, vol/long.=5,1mL/cm, laisse passer les masses inférieures à 6000/8000g/mol.

On analyse la solution à l'aide de l'analyseur COT/NOT (après 5 jours de dialyse suivie d'une lyophilisation pendant 4 jours) à une concentration de 0,12g/L.

- **Les alginates**

On réalise une analyse par l'analyseur du COT/NOT des solutions des deux échantillons d'alginate (B) à 0,28 g/l et l'alginate (C) à 0,24 g/L

- **Les alginates séquestrées après immobilisation**

Les solutions d'alginates après immobilisation, dans différentes conditions, destinées à l'analyse sont préparées par dissolution thermique des billes d'hydrogel dans l'eau milli-Q suivi d'un refroidissement avant d'être passées dans l'analyseur du COT/NOT .

les résultats d'analyse sont donnés dans les tableaux (III.6 et III.7)

- **Résultat**

Tableau III.6 Résultats de l'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux de l' α -amylase dialysée et lyophilisée et des alginates (B) et (C) seuls.

	Amylase dialysée et lyophilisée	Alginate B(M/G=1,2)	Alginate C(M/G=0,5)
C_0 (g/l)	0,12	0,28	0,24
T_C (mg/l)	36,73	130,40	68,48
T_N (mg/l)	8,917	0,55	0,77
T_C/T_N	4,09	-	-

Tableau III.7 Résultats de l'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux des alginates adsorbant l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*

N°Experience	$C_{0 \text{ enzyme}}$ (g/l)	T_C (mg/l)	T_N (mg/l)	T_C/T_N
1	0,153	79,08	2,401	32,94
2	0,144	75,29	3,566	21,11
3	0,149	78,13	2,030	38,49
4	0,159	57,74	3,345	17,26
5	0,150	59,44	2,377	25,00
6	0,141	54,22	1,799	30,13
7	0,144	54,48	1,706	31,93
8	0,140	54,13	0,981	55,17
9	0,150	54,21	0,894	60,63
10	0,142	53,73	1,027	52,31
11	0,140	53,99	0,990	54,53

Le tableau III.6 présente les résultats d'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux de l' α -amylase dialysée et des deux échantillons d'alginate (B) et (C). On remarque que le taux d'azote dans les deux échantillons d'alginate est négligeable par rapport aux taux d'azote de l'enzyme. Ce résultat peut nous permettre d'évaluer le taux d'enzyme immobilisée en fonction du taux d'azote analysée. Le tableau III.7 donne les résultats d'analyse du carbone et de l'azote organiques totaux des alginates adsorbant l'enzyme dans différentes conditions, comme il a été indiqué dans le paragraphe III.3.1.

Les résultats obtenus montrent la réussite de notre méthode expérimentale pour évaluer et déterminer l'influence des paramètres choisis sur l'immobilisation physique de l' α -amylase sur les deux supports d'alginate. A titre d'exemple, les valeurs élevées de l'azote organique total des produits des expériences 1, 2, 4 et 5 signifient l'immobilisation d'une grande quantité de l'enzyme par les deux supports d'alginate, dans le cas où on augmente la concentration de l'enzyme durant son incubation à pH=4,7. Les faibles valeurs de l'azote organique total dans les expériences 8, 9 et 11 confirment le résultat précédent, et montrent que l'incubation dans un pH neutre donne des taux plus bas d'immobilisation. Ces résultats peuvent être d'une grande importance dans les études d'adsorption et de désorption de cette enzyme sur des supports d'alginate.

III.3.3.2 Calcul du taux d'immobilisation physique de l'enzyme

- **Données :**

Selon le fournisseur : la masse moléculaire de l'amylase est $M_{enz}=51200$.

Le calcul des masses moléculaires des alginates par SEC/MALLS donne les valeurs suivantes : alginate B : $M_n(M/G=1,2)=215000$, alginate C : $M_n(M/G=0,5)=130000$.

Pour l'alginate après immobilisation :

- **Modèle de calcul du taux d'immobilisation physique :**

Etant donné que l'alginate contient une quantité négligeable d'azote selon le tableau III.6 et en considérant que les teneurs en carbone et en azote dans l'alginate et l'enzyme sont d'origine organique seulement, nous proposons l'équation III.1,

$$\left[\begin{array}{c} \%C \\ \%N \end{array} \right]_{seq. alg} = \frac{72 + 12nx}{14mx} = \left[\begin{array}{c} T_C \\ T_N \end{array} \right]_{seq. alg} \quad (III.1)$$

Avec :

$\left[\frac{\%C}{\%N} \right]_{seq.alg} = \left[\frac{T_C}{T_N} \right]_{seq.alg}$ est le rapport des pourcentages du carbone et de l'azote dans

l'alginate après séquestration avec l'enzyme qui est égal au rapport des valeurs du carbone organique total et de l'azote organique total déterminés expérimentalement.

x : le taux d'immobilisation de l'enzyme exprimée en nombre de molécule d'enzyme adsorbée par monomère d'alginate anhydre.

n : le nombre d'atomes de carbone de l'enzyme adsorbée et séquestrée.

m : nombre d'atomes d'azote de l'enzyme adsorbée et séquestrée.

72= 6 × 12 : la masse du carbone dans le monomère d'alginate anhydre, qui contient six atomes de carbone dans sa molécule.

Le taux d'azote dans l'alginate après séquestration (seq.alg) peut être déduit de l'équation III.1. On peut exprimer les pourcentages du carbone et de l'azote dans l'enzyme par les deux équations III.2 et III.3.

$$\%C=12n/M_{enz} \quad (III.2)$$

et

$$\%N=14m/M_{enz} \quad (III.3)$$

D'où on peut calculer les valeurs des quantités n et m à partir des valeurs du tableau III.6 et la valeur de la masse moléculaire de l' α -amylase $M_{enz}=51200$ (selon le fournisseur)

$$n=M_{enz}.\%C/12=51200.(36,73/120)/12=1290,66$$

et

$$m=M_{enz}.\%N/14=51200.(8,917/120)/14=272$$

Le taux d'immobilisation x par monomère d'alginate anhydre peut être calculé à l'aide de l'équation III.4, déduite de l'équation (III.1) :

$$x = \frac{72}{\left[\frac{T_C}{T_N} \right]_{seq.alg} \times 14m - 12n} \quad (III.4)$$

Les résultats de calcul des valeurs du taux d'immobilisation physique dans les différentes conditions opératoires d'immobilisation (III.3.1) selon le modèle mathématique proposé sont donnés dans le tableau III.8

Tableau III.8 Les valeurs du taux d'immobilisation physique dans les 11 expériences (voir les conditions opératoires des expériences dans le tableau III.5).

N°Expérience	T_C/T_N	x(mole enzyme/mole monomère anhydre). 10^4
1	32,94	6,5
2	21,11	11,09
3	38,49	5,4
4	17,26	14,3
5	25,00	9,03
6	30,13	7,25
7	31,93	6,78
8	55,17	3,70
9	60,63	3,34
10	52,31	3,92
11	54,53	3,74

Les valeurs du tableau III.8 montrent que, pour les alginate B et C, les concentrations en enzyme et en alginate de 3g/l et 10g/l respectivement donnent les meilleures taux de fixation de l'amylase à un pH de 4,7 avec une valeur plus élevée pour l'alginate C(M/G=0,5) qui peut être expliquée par l'effet gélifiant de l'acide guluronique permettant ainsi un meilleur piégeage de l'enzyme .

L'immobilisation dans les différentes solutions en faisant varier le pH montre que les interactions sont favorisées par un pH acide (4,7) ; ceci peut venir du fait qu'à un pH acide les extrémités amines de l'enzyme sont plutôt sous la forme NH_3^+ et s'associent donc avec les extrémités COO^- de l'alginate, tandis qu'à un pH neutre l'enzyme possède d'avantage d'extrémités NH_2 qui défavorisent les interactions.

Le taux de fixation de l'amylase diminue avec l'augmentation du temps et ceci peut être expliqué par le phénomène inverse de l'adsorption après une certaine durée de contact avec l'alginate.

III.3.4 Essais d'hydrolyse des amidons purs par l' α -amylase immobilisée par méthode physique sur l'alginate

Afin d'évaluer l'activité de l'enzyme immobilisée sur l'alginate, nous avons étudié son action d'hydrolyse sur des substrats purs d'amidon de pomme de terre, de blé et de maïs (ROQUETTE, Lestrem, France).

- **Préparation des billes d'hydrogel**

nous avons réticulé physiquement dans les conditions optimales d'immobilisation physique de l'alginate en introduisant goutte à goutte la solution obtenue par mélange de 0,5g d'alginate(C) et 0,15g d'amylase dans 50 ml d'eau milli-Q (tampon acétate pH 4,7) pendant 24h dans une solution de chlorure de calcium (0,1 M) sous agitation à l'aide d'une pipette Pasteur. La masse de billes obtenue est de 4,6533 g, elles sont lavées trois fois après séparation sur buchner puis conservées au réfrigérateur en présence de papier filtre humide. On pèse des masses de 0,35g qui seront engagées dans des réactions d'hydrolyse d'amidons.

- **Préparation des solutions d'amidon**

Des solutions de pomme de terre, blé et maïs à 1% (m/v) sont préparées. On introduit 1g d'amidon de pomme de terre dans un tricol équipé d'un réfrigérant contenant 100 mL d'eau distillée, le mélange est alors porté à reflux à 120°C pendant 30 min et sous agitation magnétique. Après refroidissement du mélange, on ajoute un peu d'azide de sodium. Le mélange obtenu est un liquide limpide qui se dissout parfaitement dans l'eau.

Des solutions de maïs et blé sont préparées de la même manière mais présentent une solubilité moindre dans l'eau.

- **Réaction d'hydrolyse des amidons purs de pomme de terre, de blé et de maïs**

On mélange 5 mL de la solution d'amidon 1% (m/v) à 5 mL de solution tampon à pH=6 (acide citrique/phosphate) dans un bécher de 20 ml. A ce mélange sont ajoutées les billes d'alginate physiquement greffé de masse $m=0,35g$, le tout est placé dans un bain thermostaté à 25°C et l'on réalise le suivi cinétique sur 7h. Des prélèvements de 0,2 mL, toutes les 15 minutes, puis toutes les heures sont alors effectués, puis l'on complète ces

prélèvements à 1 mL d'eau distillée. Ces prélèvements sont conservés au réfrigérateur dans un cristalliseur plein de glace avant d'être analysés par spectrophotométrie.

Après chaque hydrolyse, les billes sont lavées à l'eau distillée sur Büchner et conservées au réfrigérateur.

On réalise des mesures d'absorbance afin de doser les sucres réducteurs de tous les échantillons selon la méthode de SOMOGYI NELSON (en diluant pour être dans le domaine de validité de la méthode).

- **Résultats**

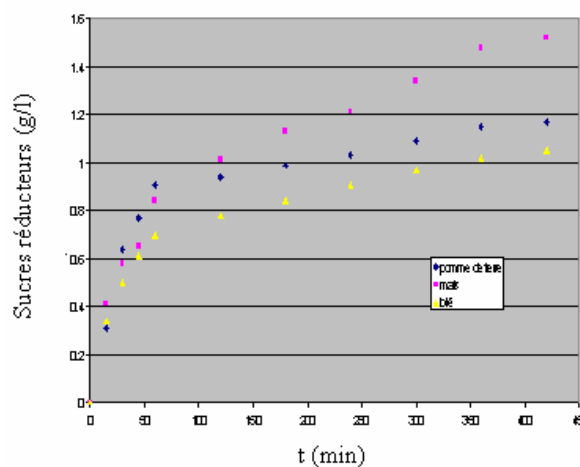


Figure III.11 Courbes d'hydrolyse des amidons de pomme de terre, de maïs et de blé 0,5%(m/v) à 25°C par l' α -amylase d'*Aspergillus Oryzae* fixée physiquement sur l'alginate $m_{\text{billes}}=0,35\text{g}$.

Les trois courbes d'hydrolyse (Fig III.11) montrent que l' α -amylase fixée physiquement sur l'alginate est active à 25°C et agit sur les amidons de pomme de terre, de maïs et de blé.

Elles indiquent que les valeurs des vitesses initiales sont très proches. On note une différence appréciable entre les valeurs des vitesses après un taux d'avancement supérieur à 100 minutes. le classement des vitesses par ordre décroissant est comme suit : l'amidon de maïs, l'amidon de pomme de terre et enfin l'amidon du blé ; ceci montre la différence des réactivités des trois substrats vis-à-vis de l'enzyme immobilisée physiquement (adsorption suivie par une séquestration).

Cependant, nous avons constaté une instabilité thermique des alginates greffés physiquement avec la dissolutions des billes pour des températures supérieures à 40°C ; ce qui diminue l'importance de ces résultats par rapport aux conditions optimales d'hydrolyse en

présence de notre enzyme, sachant que l'activité optimale de l'enzyme libre est 50°C. Par contre ces résultats peuvent être d'une très grande importance pour d'autres applications, comme la séparation et la purification des enzymes ou d'autres matières protéiques ou comme agent transporteur de composés bioactifs.

CHAPITRE IV. L'IMMOBILISATION CHIMIQUE DE L' α -AMYLASE SUR LES ALGINATES

IV.1 Test d'immobilisation chimique

Un test de la réaction de greffage est réalisée sur l'alginate B ($M/G = 1,2$, $M_w=310000$, $M_n=215000$). La solution préparée contient l'alginate, de l'EDCI et l'amylase dissous dans la solution tampon à pH 4,7. Elle est laissée sous agitation à température ambiante pendant 24h.

La solution est alors purifiée par ultrafiltration sur membrane. La membrane laisse passer les masses molaires inférieures à 100 000, c'est-à-dire toutes les impuretés et surtout l'amylase n'ayant pas réagi, mais pas l'alginate qui possède une masse molaire en nombre de plus de 200 000. Les eaux de filtration sont récupérées et leurs conductivités sont mesurées tous les 50 mL environ (Tableau IV.1). La filtration a été maintenue jusqu'à ce que la conductivité des eaux soit proche de celle de l'eau milli-Q (Tableau IV.1). Le filtrat obtenu est conservé au congélateur, ensuite il a subi une vaporisation à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis une lyophilisation pendant 4 jours.

Afin de vérifier si l' α -amylase a bien été greffée sur l'alginate ou non, on effectue plusieurs analyses au COT/NOT de l'alginate greffé, de l'alginate seul et l' α -amylase seule.

Tableau IV.1 Conductivité des eaux de filtration de la solution après le test d'immobilisation chimique

Echantillon	Conductivité (μ S)	Echantillon	Conductivité (μ S)
1	2590	10	95
2	1228	12	86,5
3	487,9	13	95,6
4	272,9	14	55,4
5	108,6	15	36,8
6	110	16	63,5
7	73	17	60,5
8	80,8	18	73,9
9	138,1		

Les résultats du tableau.IV.2 nous indiquent alors que le taux d'azote dans le polymère greffé serait plus élevé que dans l'alginate. Or, cet azote ne peut pas provenir de l'alginate car

il n'en contient que des quantités négligeables (voir III.3.3.1), ce qui montre que l'immobilisation de l'enzyme sur l'alginate a bien eu lieu.

Tableau IV.2. Carbone et azote organiques totaux de l'alginate (B) avant et après le test de greffage chimique par l' α -amylase et de l' α -amylase dialysée.

	α -amylase greffée chimiquement 0,135 g/l Sur l'Alginate (B)	alginate(B) 0,28 g/l	α -amylase dialysée 0,12g/l
TC (mg/L)	64,37	130,4	36,76
TN (mg/L)	6,984	0,55	8,917

Nous analysons également notre alginate greffé en SEC/MALLS pour confirmer l'immobilisation de l' α -amylase sur l'alginate (B).

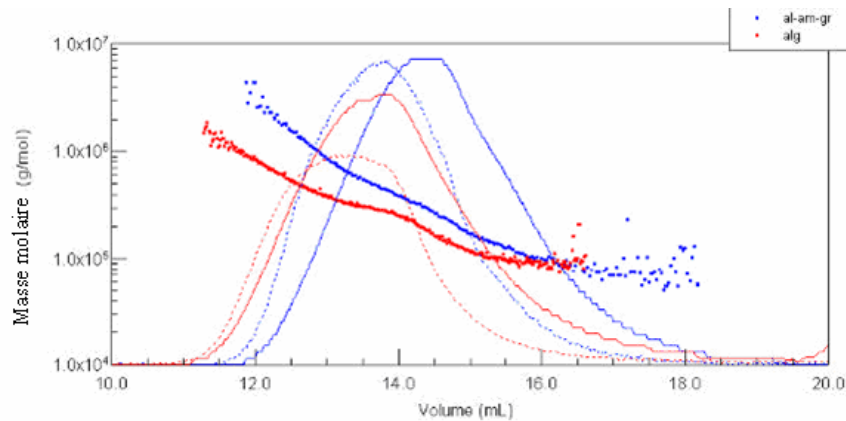


Figure IV.1 Chromatogrammes des distributions des masses molaires de l'alginate B : (1) avant et (2) après le test de greffage chimique. filtration 0,45 μ m, débit 0,5 mL/min, dn/dc 0,15 mL.g⁻¹, Zimm 1, angles 7 à 17.

(1) alg : alginate (M/G= 1,2) seul à 1,8 g/L,

(2) alg-am- gr : α -amylase greffée chimiquement sur l'alginate (M/G=1,2), 0,135 g/L

Les résultats de la détermination des masses moléculaires en poids (M_w) et en nombre (M_n) par analyse SEC/MALLS de l'alginate (B) avant et après le test d'immobilisation chimique (Fig IV.1) donne $M_w = 310\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ et $M_n = 215\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ pour l'alginate seul et $M_w = 370\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ et $M_n = 200\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ pour l'alginate greffé. Ces résultats montrent que l'alginate greffé a un volume hydrodynamique plus petit que l'alginate seul mais sa masse molaire est plus élevée. L' α -amylase est donc bien greffée sur le polymère et la structure obtenue est plus compacte comparée à l'alginate seul.

IV.2 Etude de l'influence de certains paramètres sur l'immobilisation chimique de l' α -amylase sur les alginates

Après la réussite du test d'immobilisation chimique de l'enzyme avec l'alginate (B) nous avons planifié un nombre d'expériences afin d'étudier l'influence de certains paramètres sur l'immobilisation chimique de l' α -amylase sur les alginates. Les paramètres étudiés sont la masse molaire, le rapport des deux monomères (M/G) des alginates, le rapport entre les quantités de l'activateur et le nombre de mole du monomère de l'alginate $R = n_{\text{EDCI}}/n_{\text{an.alginate}}$, la concentration initiale de l'enzyme et le pH de l'immobilisation.

Deux échantillons d'alginates (A) et (C) de masses molaires et rapports M/G différents ont été choisis comme supports d'immobilisation

IV.2.1 Expériences d'immobilisation chimique

❖ Expérience 1

- dissoudre 0,8911g d'alginate (A) (M/G=1,2) dans 50ml de tampon acétate pH=4,69 sous agitation pendant 12h.
- Ajouter 0,8540g d'EDCI sous agitation.
- ajouter 0,1083g d' α -amylase (31,80U/mg) sous agitation.
- La température de la réaction $T=25^{\circ}\text{C}$.
- La durée de la réaction $t=24\text{h}$.

❖ Expérience 2

- dissoudre 0,8908g d'alginateA(M/G=1,2) dans 50ml de tampon acétate pH=4,69 sous agitation pendant 12h.
- Ajouter 0,8519g d'EDCI sous agitation .
- ajouter 0,3017g d' α -amylase (31,8U/mg) sous agitation.
- La température de la réaction $T=25^{\circ}\text{C}$.
- La durée de la réaction $t=24\text{h}$.

❖ Expérience 3

- dissoudre 0,8919g d'alginate C(M/G=0,5) dans 50ml de tampon acétate pH=4,7 sous agitation pendant 12h.
- Ajouter 0,4270g d'EDCI sous agitation .
- ajouter 0,1100g d' α -amylase (31,8U/mg) sous agitation.
- La température de la réaction $T=25^{\circ}\text{C}$.

La durée de la réaction $t=24h$.

❖ **Expérience 4**

On introduit 0.8914 g ($4,5 \cdot 10^{-3}$ moles) d'alginate (C) ($M/G=0,5$) dans 50 mL de solution tampon acide acétique/acétate de sodium à pH 4,7. Le mélange est alors placé sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète de l'alginate de sodium. On introduit ensuite 0,4308g ($2,25 \cdot 10^{-3}$ moles) d'1-éthyl-3-[3-(diméthyl amino) propyl] carbodiimide hydrochlorique (EDCI). 0.3002 g d' α -amylase sont alors ajoutés sous agitation. Le mélange réactionnel est alors mis sous agitation magnétique pendant 24h à 25°C.

❖ **Expérience 5**

- dissoudre 0,8915g d'Alginate A(1,2) dans 50ml de tampon acétate pH=3,7 sous agitation pendant 12h.
- Ajouter 0,8527g d'EDCI sous agitation.
- ajouter 0,3015g d'amylase (31,8U/mg) et laisser dissoudre sous agitation.
- La température de la réaction $T=25^{\circ}C$.
- La durée de la réaction $t=24h$.

❖ **Expérience 6**

On introduit 0.8911 g ($4,5 \cdot 10^{-3}$ moles) d'alginate A ($M/G=1,2$) dans 50 mL de solution tampon acide acétique/acétate de sodium à pH 4,7. Le mélange est alors placé sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète de l'alginate de sodium. On introduit ensuite 0.4308 g ($2,25 \cdot 10^{-3}$ moles) d'1-éthyl-3-[3-(diméthyl amino)-propyl] carbodiimide hydrochlorique (EDCI). 0.1002 g d' α -amylase sont alors ajoutés sous agitation jusqu'à dissolution totale de l'enzyme. Le mélange réactionnel est alors mis sous agitation magnétique pendant 24h à 25°C.

Après chaque expérience, on ajoute une solution de NaCl 0,5M par dissolution de 1,461g dans les 50 ml pour éliminer l'adsorption (physique) de l' α -amylase sur l'alginate.

IV.2.2 Purification des produits de l'immobilisation

La purification du mélange obtenu a lieu sur une membrane d'ultrafiltration en polyéther sulfone, sous une pression de l'azote entre 0,6 à 0,8 bars. L'ultrafiltration est suivie par mesure conductimétrique des eaux ultrafiltrées. L'ultrafiltration est arrêtée lorsque la conductivité des eaux récupérées est faible (de l'ordre de 12 μS ou inférieure). Le produit est ensuite conservé au congélateur avant d'être lyophilisé.

Les résultats des mesures conductimétriques des eaux ultrafiltrées dans les six expériences sont donnés dans le tableau IV.3.

On remarque que le degré de pureté souhaité pour nos produits d'immobilisation a été atteint après un volume de filtrat se situant entre 700 et 900 mL.

Tableau IV.3. Conductivités des eaux de lavage des produits des réactions de greffage

N° FILTRAT	CONDUCTIVITE / μ S					
	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4	EXP 5	EXP 6
1	10400	10480	1760	1970	5520	1902
2	12970	12480	1387	1777	4004	1370
3	10520	17120	1473	1483	4597	1311
4	6820	6060	905	1034	1191	1235
5	3901	5560	639	838	837	1022
6	2698	1605	590,	595,3	657	750
7	1738	853	589,6	495,6	268	673
8	673	443	220,3	322,3	189,	579
9	193	388	108,2	114,6	110,1	590
10	67,5	148	84,9	97,8	129,4	304,2
11	51,5	79	67,0	70,1	80,9	196,8
12	166,6	55,9	27,9	43,61	59,0	140,3
13	35,60	67,132	17,4	28,43	60,3	122,5
14	30,40	29,9	20,5	19,41	10,	115,8
15	27,20	29,1	18,04	17,04	5,15	34,60
16	18,46	65,5	10,68	11,58	9,92	15,34
17	28,19	28,2	9,70	10,65	6,15	5,02
18	30,62	18,43	11,04	11,03	3,87	
19	12,39	11,97			3,39	
20	10,37	11,35				
21	12,60	12,12				
22	12,31					

IV.2.3 Analyse des taux de carbone et d'azote totaux dans les produits d'immobilisation chimique

Afin d'étudier l'immobilisation chimique de l'enzyme sur les alginates, nous avons déterminé les teneurs en azote et carbone organique totaux dans les produits d'immobilisation, les supports d'alginate et dans l'enzyme libre. Les produits des six expériences

d'immobilisation conservés après purification dans le réfrigérateur ont été d'abord lyophilisés puis analysés par l'instrument d'analyse COT/NOT. Les résultats d'analyse sont donnés dans les tableaux de IV.4 à IV.9.

Ces résultats confirment les résultats obtenus dans le test d'immobilisation chimique et montrent que dans les conditions choisies (IV.2.1), l' α -amylase a été immobilisée sur l'alginate par la formation de liaison covalente après activation du support par l'EDCI. La comparaison des résultats des différentes expériences montre que les paramètres suivants influent sur le phénomène d'immobilisation étudié, à savoir : la nature et les propriétés de l'alginate, les concentrations de l'enzyme et de l'activateur et le pH.

Tableau IV.4 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction de greffage chimique1.

	alginate(1,2)A	α -amylase(purifiée*)	alginate(1,2)A+ α -amylase
C(g/l)	0,266	0,12	0,164
T _C (mg/l)	71,14	36,73	49,89
T _N (mg/l)	0,581	8,917	3,110
T _C /T _N	-	4,09	16,04

Tableau IV.5 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction 2.

	alginate(1,2)A	α -amylase(purifiée*)	alginate(1,2)A+ α -amylase
C(g/l)	0,266	0,12	0,156
T _C (mg/l)	71,14	36,73	53,01
T _N (mg/l)	0,581	8,917	3,406
T _C /T _N	-	4,09	15,56

Tableau IV.6 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate C avant et après réaction 3.

	alginate(0,5)C	α -amylase(purifiée*)	alginate(0,5)C+ α -amylase
C(g/l)	0,24	0,12	0,172
T _C (mg/l)	68,48	36,73	59,11
T _N (mg/l)	0,77	8,917	5,010
T _C /T _N	-	4,09	11,79

Tableau IV.7 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate C avant et après réaction 4.

	alginate(0,5)C	α -amylase(purifiée*)	alginate(0,5)C+ α -amylase
C(g/l)	0,24	0,12	0,162
T _C (mg/l)	68,48	36,73	52,84
T _N (mg/l)	0,77	8,917	2,26
T _C /T _N	-	4,09	23,38

Tableau IV.8 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction 5.

	alginate(1,2)A	α -amylase(purifiée*)	alginate(1,2)A+ α -amylase
C(g/l)	0,266	0,12	0,160
TC(mg/l)	71,14	36,73	46,84
TN(mg/l)	0,581	8,917	1,844
TC/TN	-	4,09	25,40

Tableau IV.9 Carbone et azote organiques totaux de l'alginate A avant et après réaction 6.

	alginate(1,2)A	α -amylase(purifiée*)	alginate(1,2)A+ α -amylase
C(g/l)	0,266	0,12	0,110
T _C (mg/l)	71,14	36,73	24,57
T _N (mg/l)	0,581	8,917	2,63
T _C /T _N	-	4,09	9,30

*la purification de l'enzyme a été faite par dialyse suivie par une lyophilisation

IV.2.4 Mesure des masses molaires

La mesure des masses molaires des alginates activés par l'EDCI et des produits de réaction purifiés se fait par SEC/MALLS.

Le tableau IV.10 regroupe les valeurs des masses moléculaires des alginates activés dans les mêmes conditions opératoires des réactions d'immobilisation ainsi que les valeurs des masses moléculaires des produits d'immobilisation purifiés. L'augmentation des valeurs de ces masses moléculaires indique que le greffage a eu lieu. Cependant, nous constatons une diminution des masses moléculaires des produits de la réaction 5, qui a été réalisée à pH=3,7 ; ceci peut être interprété par une dégradation partielle de l'alginate à cette valeur de pH.

Tableau IV.10 Les valeurs des masses moléculaires des alginates activés et des produits purifiés des expériences d'immobilisation chimique

Alginates actives A* ou C* et alginates greffés d'enzymes **	R (nEDCI/alginate)	M _w /(g/mol)	M _n /(g/mol)
Alginates.act A*	1	215000	140000
Alginates.act A*	0,5	215000	142000
Alginates.act C*	0,5	230000	140000
Alginates.gr.1A**	1	230000	140000
Alginates.gr.2 A**	1	230000	160000
Alginates.gr.3 C**	0,5	250000	171000
Alginates.gr.4 C**	0,5	245000	170000
Alginates.gr.5 A**	1	200000	125000
Alginates.gr.6 A**	0,5	245000	150000

** le nombre indique le numéro de l'expérience d'immobilisation

IV.3 Etude et calcul du taux d'activation et d'immobilisation chimique de l'enzyme sur l'alginate

Afin d'évaluer l'étape d'activation du support et la formation des liaisons entre l'alginate et l'enzyme après l'activation, nous avons proposé deux modèles mathématiques de calcul. Le premier modèle (les équations IV.1, IV.2, IV.6, IV.7 et IV.8) est déduit à partir du schéma réactionnel d'immobilisation (Figure.IV.2) de l' α -amylase sur l'alginate de sodium proposé dans des travaux antérieurs [54,58]. Les calculs des taux d'activation et d'immobilisation à l'aide de ce premier modèle dans les différentes expériences ont été

effectués à l'aide des résultats des taux de carbone et d'azote organique déterminés expérimentalement dans les alginates activés par l'EDCI et les alginates greffés par l'enzyme. L'autre modèle de calcul (équations IV.3, IV.4 et IV.5) sert à calculer le taux de substitution de l'alginate par l'activateur à partir des résultats de dosage des groupements carboxyliques de l'alginate par conductimétrie.

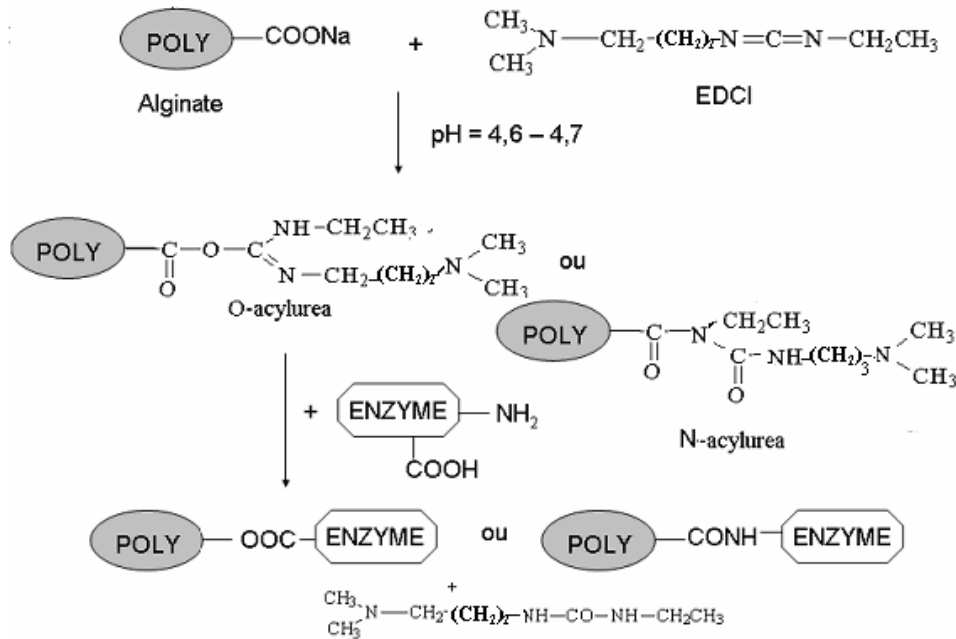


Figure IV.2 Schéma de l'immobilisation chimique de l' α -amylase sur l'alginate de sodium

IV.3.1 Calcul du degré de substitution de l'alginate par l'EDCI

Pour vérifier si l'alginate forme des liaisons avec l'EDCI et calculer le degré de substitution de l'alginate par l'activateur, les deux modèles de calcul ont été appliqués. Le premier modèle se base sur les résultats d'analyse des taux de carbone et d'azote totaux et le deuxième modèle se base sur la détermination des volumes de neutralisation acido-basique déterminés par conductimétrie.

IV.3.1.1 Calcul du degré de substitution à partir des résultats d'analyse du T_C et T_N

Selon le schéma d'immobilisation (Fig IV.2) l'EDCI peut former des liaisons stables avec l'alginate par réarrangement de l'alginate activé de la forme O-acylurée à la forme N-acylurée [58]. Nous avons activé trois alginates (Alginate A(R=1), alginate A(R=0,5) et Alginate C(R=0,5)) et calculé les taux de carbone et d'azote dans l'alginate avant l'activation et l'alginate ultrafiltré et lyophilisé, après son activation. En négligeant le taux d'azote de

l'alginate, le rapport des taux de carbone et d'azote organiques totaux dans l'alginate activé est donné par l'équation IV.1. :

$$\left[\frac{T_C}{T_N} \right]_{ac.alg} = \frac{(8.x + 6).12}{14.3.x} \quad (IV.1)$$

Avec :

8 est le nombre d'atomes de carbone de carbone par molécule d'EDCI

6 est le nombre d'atomes de carbone par anhydroglucose du Na-alginate

3 est le nombre d'atomes d'azote par molécule d'EDCI

12 et 14 sont les masses atomiques du carbone et d'azote respectivement.

x le degré de substitution de l'alginate par l'EDCI est calculé par l'équation IV.2 :

$$x = \frac{72}{42 \cdot \left(\frac{T_C}{T_N} \right)_{ac.alg} - 96} \quad (IV.2)$$

Le tableau (IV.11) donne les résultats de mesure du carbone et azote organiques totaux dans les alginates activés dans les mêmes conditions des réactions d'immobilisation et les valeurs du degré de substitution de l'EDCI sur l'alginate activé.

Tableau IV.11 Résultats d'analyse du carbone et azote organiques totaux des alginates seuls et activés et les valeurs du degré de substitution (x) des alginates A et C activés par l'EDCI

alginates seuls et activés	M/G	C/(g/l)	R	T _C /(mg/l)	T _N /(mg/l)	$\frac{T_C}{T_N}$	x/(mole EDCI/mole an.alg)
Alginate. A	1,2	0,266	-	71,14	0,58	-	-
Alginate .act A	1,2	0,168	1	41,89	1,738	24.10	0,079
Alginate .act A	1,2	0,171	0,5	42,33	1,744	24.27	0,078
Alginate C	0,5	0,24	-	68,48	0,77	-	-
Alginate .act C	0,5	0,172	0,5	46,56	1,259	36,98	0,0493

Ces résultats montrent que, pour l'alginate (A) la variation du rapport $R(n_{EDCI}/n_{an.lginate})$ n'affecte pas le degré de substitution (x) de l'alginate par l'EDCI, alors que l'augmentation de la quantité de l'acide L-gulonique (G) (diminution de M/G) le diminue considérablement ; ceci peut être interprété par le caractère gélifiant de G qui freine le mouvement de l'EDCI.

IV.3.1.2 Calcul du degré de substitution par dosage conductimétrique

Pour confirmer les résultats trouvés par l'analyseur COT/NOT, des dosages conductimétriques des groupements $-COO^-$ par HCl (0,1M) de l'alginate A seul et de l'alginate A activé (R=1) ont été effectués sous gaz inerte (l'argon). Le calcul des degrés de substitution par le sodium de l'alginate par monomère anhydre (DS_1) se fait par l'équation (IV.3)

$$DS_1 = \frac{C_{HCl} \cdot V_{1.eq}}{\frac{m_{alg}}{198}} = \frac{C_{HCl} \cdot V_{1.eq} \cdot 198}{m_{alg}} \quad (IV.3)$$

Où C_{HCl} est la concentration de la solution de HCl (0,1M)

$V_{1.eq}$ le volume de neutralisation des COO^- de l'alginate seul

m_{alg} la masse de l'alginate en g.

198 est la masse molaire du monomère anhydre de l'alginate.

Le degré de substitution du monomère anhydre d'alginate activé par le sodium se fait par l'équation (IV.4)

$$DS_2 = \frac{C_{HCl} \cdot V_{2.eq}}{\frac{m_{alg.ac}}{198 + x(M_{EDCI} - M_{Na})}} = \frac{C_{HCl} \cdot V_{2.eq} (198 + 132x)}{m_{alg.ac}} \quad (IV.4)$$

Où : $V_{2.eq}$ est le volume de neutralisation des COO^- de l'alginate activé

m_{alg} est la masse de l'alginate en g.

$m_{alg.ac}$ est la masse de l'alginate activée en g.

M_{EDCI} est la masse molaire de l'EDCI, égale à 155

M_{Na} est la masse molaire du sodium, égale à 23.

le degré de substitution de l'alginate par l'EDCI

Ce qui donne :

$$x = DS_1 - DS_2 = \frac{DS_1 - \frac{C_{HCl} \cdot V_{2.eq} \cdot 198}{m_{alg.ac}}}{1 + \frac{C_{HCl} \cdot V_{2.eq} \cdot 132}{m_{alg.ac}}} \quad (IV.5)$$

Les résultats obtenus par analyse du carbone et azote organiques totaux et par conductimétrie, respectivement, montrent, d'une part, l'augmentation du taux d'azote (tableau IV.11) et la diminution des groupements $-\text{COO}^-$ dans l'alginate activé, d'autre part la méthode conductimétrique a permis la détermination des volumes de neutralisation des COO^- par HCl (0,1M). Les volumes de neutralisation sont $V_{1.eq} = 7,26$ ml (Fig IV.3) pour une masse d'alginate seul $m_{alg} = 209$ mg et $V_{2.eq} = 7,03$ ml (Fig. IV.4) pour une masse de l'alginate activé $m_{alg.ac} = 250$ mg ; ce qui donne respectivement un degré de substitution par l'EDCI de 0,079 par analyse du carbone et azote organiques totaux (Eq IV.2) et 0,095 par conductimètre (Eq IV.5), montrant ainsi que presque 9% des carboxylates sont liés à l'EDCI, dont une partie peut être liée par des liaisons stables après réarrangement de la forme O-acylurée à la forme N-acylurée selon le schéma réactionnel (Figure IV.2), d'où la nécessité de tenir compte de l'azote provenant de l'EDCI pour le calcul du taux d'immobilisation de l' α -amylase sur l'alginate

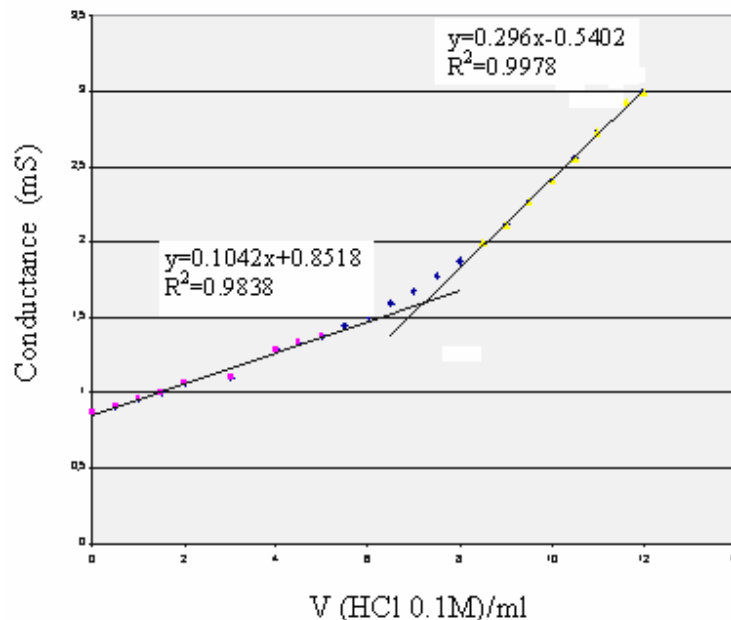


Figure IV.3 Dosage conductimétrique des COO^- de l'alginate A seul

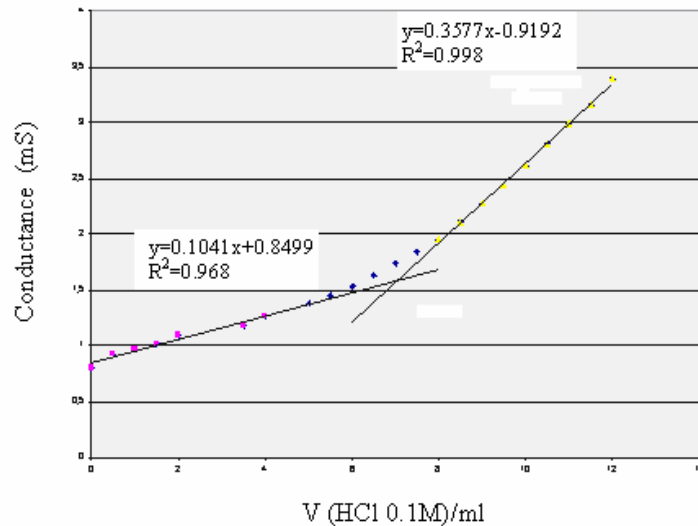


Figure IV.4 Dosage conductimétrique des COO⁻ de l’alginate A activé par l’EDCI (R=1)

IV.3.2 Calcul du taux d’immobilisation chimique de l’enzyme sur l’alginate

L’alginate de sodium purifié contient une quantité négligeable d’azote, ce qui nous a permis de considérer l’EDCI (C₈H₁₇N₃) comme la seule source d’azote dans l’alginate activé (ac.alg). L’EDCI peut former des liaisons stables avec l’alginate par réarrangement de l’alginate activé de la forme O-acylurée à la forme N-acylurée, comme il peut céder sa place à l’enzyme pour former une liaison covalente avec l’alginate (Fig IV.1) [58]. L’équation (IV.1) donne le rapport entre le carbone et l’azote dans l’alginate activé $\left(\frac{T_C}{T_N}\right)_{ac.alg}$, ultrafiltré

et lyophilisé, permettant ainsi le calcul du degré de substitution (x) de l’EDCI sur l’alginate équation (IV.2).

En tenant compte de l’azote provenant de l’EDCI et sachant que, pour y moles d’enzymes greffées, y moles d’EDCI sont libérées par une unité d’anhydroglucose activée (ac.alg), le rapport entre le carbone et l’azote contenus dans l’alginate greffé (gr.alg) peut être calculé par l’équation (IV.6) [59] :

$$\left(\frac{T_C}{T_N}\right)_{gr.alg} = \frac{12.(6 + 8x + y(n - 8))}{14.(3x + y(m - 3))} \quad (IV.6)$$

où n et m sont les nombres d'atomes de carbone et d'azote dans une molécule d'enzyme, ce qui permet le calcul du taux d'immobilisation (y), qui exprime le nombre de moles d'enzymes fixées par mole de monomère anhydre de l'alginate, par l'équation (IV.7) [59] :

$$y = \frac{6 + x \cdot \left(8 - \frac{7}{2} \left(\frac{T_C}{T_N} \right)_{gr.alg} \right)}{\frac{7}{6} \left(\frac{T_C}{T_N} \right)_{gr.alg} \cdot (m - 3) - (n - 8)} \quad (IV.7)$$

et le nombre de (mg) de l'enzyme par (g) de l'alginate greffé est donné par l'équation (IV.8) :

$$z = \frac{y \cdot M_{enz}}{y \cdot M_{enz} + M_{an.alg} + (x - y) M_{EDCI}} \quad (IV.8)$$

Avec $M_{an.alg}$: masse moléculaire du monomère anhydre d'alginate ($198 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Les résultats du tableau (IV.12) montrent que pour l'alginate A ($M/G=1,2$) et $R=1$ l'augmentation de la concentration de l'enzyme affecte peu le taux d'immobilisation de l'enzyme (de $0,59 \cdot 10^{-3}$ à $0,64 \cdot 10^{-3}$ moles d'enzymes par mole de monomère anhydre d'alginate), alors que pour l'alginate (C) ($M/G=0,5$) et $R=0,5$ l'augmentation de la concentration de l'enzyme diminue le taux d'immobilisation (de $1,87 \cdot 10^{-3}$ à $0,43 \cdot 10^{-3}$). Pour l'alginate (A) pour une concentration en enzyme de 2 g/l , la diminution de (R) de la valeur 1 à la valeur 0,5 augmente considérablement le taux d'immobilisation (de $0,59 \cdot 10^{-3}$ à $2,5 \cdot 10^{-3}$).

Tableau IV.12 Variation des masses moléculaires et du taux d'immobilisation en fonction des conditions opératoires dans les expériences d'immobilisation

Enzyme , Alginate actives et alginate greffés	M _w / (g/l)	M _n / (g/l)	C/(g/l) COT/NOT	C _{0.enz} /(g/l)	pH	R	T _C / (mg/l)	T _N / (mg/l)	$\frac{T_C}{T_N}$	y (mol.enz/mo l. an.Alg)
Alginate.act A	215000	140000	0,168	-	-	1	41,89	1,738	24,10	-
Alginate.act A	215000	142000	0,171	-	-	0,5	42,33	1,744	24,27	-
Alginate.act C	230000	140000	0,172	-	-	0,5	46,56	1,259	36,98	-
α-amylase	-	-	0,120	-	-	-	36,73	8,92	4,12	-
Alginate.gr.1A	230000	140000	0,164	2	4,7	1	49,89	3,11	16,04	0,59 10 ⁻³
Alginate.gr.2 A	230000	160000	0,156	6	4,7	1	53,01	3,41	15,56	0,64 10 ⁻³
Alginate.gr.3 C	250000	171000	0,172	2	4,7	0,5	59,01	5,01	11,78	1,87 10 ⁻³
Alginate.gr.4 C	245000	170000	0,162	6	4,7	0,5	52,84	2,26	23,38	0,43 10 ⁻³
Alginate.gr.5 A	200000	125000	0,160	6	3,7	1	46,84	1,84	25,40	-
Alginate.gr.6 A	245000	150000	0,110	2	4,7	0,5	24,54	2,63	9,30	2,5 10 ⁻³

Le nombre dans la première colonne indique le numéro de l'expérience d'immobilisation

Comme on constate que l'augmentation du rapport M/G (réaction.3 : M/G=0,5 et réaction.6 :M/G=1,2) augmente le taux d'immobilisation (de 1,87 10⁻³ à 2,5 10⁻³) ; ces deux résultats peuvent être interprétés par la diminution de la réaction secondaire de l'alginate avec l'EDCI qui transforme l'alginate activé de la forme O-acylurée à la forme plus stable N-acylurée par réarrangement et la diminution du phénomène de gélification avec la diminution de l'acide L-gulonique (G) (augmentation de M/G) qui favorise plus la réaction ce qui est conforme avec la littérature (car l'acide L-gulonique favorise la gélification). Enfin, la

diminution du pH jusqu'à la valeur 3,7 défavorise la réaction et ceci peut être expliqué par l'élévation de la viscosité des alginates à des pH acides.

En définitive, nous pouvons dire que le rendement maximal pour cette série d'expériences est observé pour la réaction 6 pour une concentration en enzyme 2g/l, un pH=4,7, un R=0,5, M/G=1,2 et une concentration en alginate de 18g/l.

IV.4 Essais d'hydrolyse des amidons purs de pomme de terre, maïs et blé par l' α -amylase immobilisée par voie chimique et réticulée

Afin de vérifier l'activité de l' α -amylase immobilisée chimiquement, on effectue des essais d'hydrolyse des substrats purs de pomme de terre, de maïs et de blé en adoptant le même mode opératoire par l'enzyme adsorbée (III.3.4) mais à une température égale à 50°C.

- **Préparation des billes d'hydrogel**

Nous avons utilisé le produit d'immobilisation de l'expérience (6) pour la préparation des billes d'hydrogel.

On introduit au goutte à goutte, à l'aide d'une pipette Pasteur, la solution d'alginate (M/G=1,2) greffé à 0,02 g/mL dans une solution de CaCl₂.2H₂O à 0,1 M sous agitation. La solution d'alginate-enzyme est obtenue par dissolution de 0,0450 g d'alginate greffé dans 2 mL d'eau milli-Q. Les billes d'hydrogels d'alginate greffé ainsi obtenues sont filtrées sur Büchner avec précaution et rincées trois fois à l'eau milli-Q. Elles sont alors conservées au réfrigérateur dans un pot en présence d'un papier filtre humidifié jusqu'à utilisation. La masse de billes obtenues est 1,6384g.

- **Préparation des solutions d'amidon et hydrolyse**

La préparation des solutions d'amidon 0,5% et les réactions d'hydrolyse sont réalisées de la même façon que lors de l'hydrolyse par l'amylase immobilisée physiquement. Les essais d'hydrolyse sont effectués à 50 °C car c'est la température d'activité optimale, d'une part, et, d'autre part, les billes sont stables jusqu'à 70°C à l'inverse des billes d'alginate greffées physiquement qui se dissolvent à partir de 40°C.

- **Résultats**

La figure IV.5 représente les courbes cinétiques d'hydrolyse des trois substrats purs d'amidon par l'enzyme immobilisée chimiquement et réticulée sous forme de billes d'hydrogel. Les valeurs des vitesses initiales sont distinctes ; la valeur de la vitesse initiale de l'amidon de blé est inférieure aux valeurs des vitesses initiales d'hydrolyse de la

pomme de terre et de maïs. Les taux de conversion après 250 minutes on atteint une valeur estimable pour les amidons de pomme de terre et de maïs par rapport à celle du blé. Ces résultats montrent que les réactivités des trois substrats sont différentes vis-à-vis de l'enzyme immobilisée par voie chimique et réticulée. Ces résultats sont d'une très grande importance pour les études d'optimisation du procédé d'hydrolyse enzymatique des amidons en présence de l' α -amylase, et ouvre la voie à d'autres études cinétiques afin de connaître le mécanisme d'action de l'enzyme dans ces conditions.

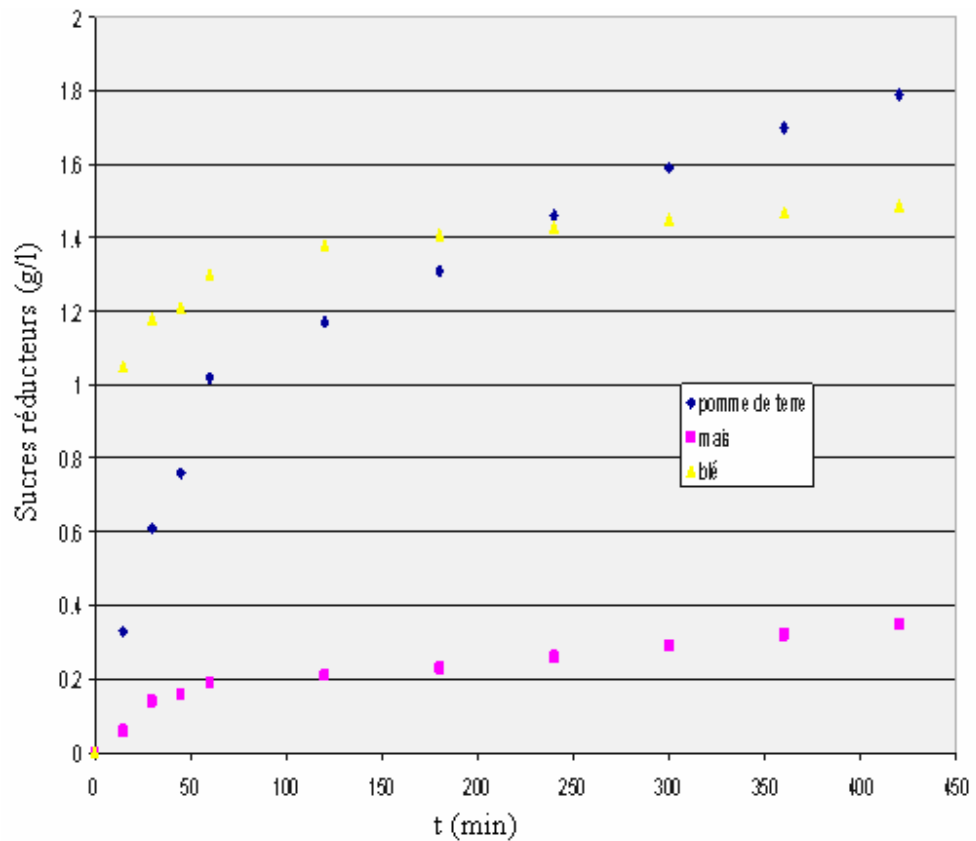


Figure IV.5 Hydrolyse des amidons de pomme de terre , de maïs et de blé par l' α -amylase greffée chimiquement.

Références de la première partie

- [1] Jamai, L., Ettayebi, K., El Yamari, J., & Ettayabi, M. (2006). Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. *Bioresources Technology* online.
- [2] Reshmi, R., Sanjay, G., & Sugunan, S. (2007). Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communications*, 8, 393–399.
- [3] Bryjak, J. (2003). Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 347.
- [4] Changa, M. Y, Juang, R. S. (2005). Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 75–82.
- [5] Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2006). Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41, 343
- [6] Silman, I.H., Katchalski, E. (1996). Water in soluble derivatives of enzymes, antigens and antibodies. *Ann RevBiochem*, 35, 837–877.
- [7] Vandamme, E.J. (1983). Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology. *Enzyme MicrobTechnol*, 5, 403–415.
- [8] Schulze, B., & Wubbolts, M.G. (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 609–615.
- [9] Stetter, H.(1951). *Enzymatische Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim, .
- [10] Kircka, L.J., & Thorpe, G.H.G. (1986). Immobilised enzymes in analysis. *Trends Biotechnol*, 4, 253–258.
- [11] Dunlap, B.R. (1974). *Immobilised chemicals and affinity chromatography*. Plenum Press, New York.
- [12] Nelson, J. M., & Griffin, E. G. Adsorption of invertase. (1916). *J Am Chem Soc*, 38, 1109–1115.
- [13] Harkins, W.D., Fourt., L, & Fourt, P.C. (1940). Immunochemistry of catalase II. Activity in multilayers. *J Biol Chem*, 132, 111–118.
- [14] Gale, E.F., Epps, M.R. (1944). Studies on bacterial amino-acid decarboxylases 1. 1-(+)-lysine decarboxylase. *Biochem J*, 38, 232–242.
- [15] Michel., F., & Evers, J. (1949). Synthesis of cellulose-bound proteins. *MacromolChem.*, 3, 200–209.

- [16] Brandenberg, H. (1955). Methods for linking enzymes to insoluble carriers. *Angew Chem* , 67:661–661.
- [17] Grubhofer, N., & Schleith, L. (1954). Coupling of proteins on diazotized polyaminostyrene. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* , 297,108–112.
- [18] Brandenberg, H. (1955). Methods for linking enzymes to insoluble carriers. *Angew Chem* , 67,661–66.
- [19] Campbell, D.H., Luescher, F.L., & Lerman, L.S. (1951). Immologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* , 37,575–578
- [20] Isliker, H. C. (1953). Purification of antibodies by means of antigens linked to ion exchange resin. *Ann NY Acad Sci* ,3,225–238.
- [21] Grubhofer, N., & Schleith, L. (1953). Modified ion exchange resins as specific adsorbent. *Naturwissenschaften* , 40, 508–508.
- [22] Newirth, T.L., Diegelman, M. A., Pye, E. K., & Kallen, R. G. (1973). Multiple immobilized enzyme reactors. Determination of pyruvate and phosphoenolpyruvate concentrations using immobilized lactate dehydrogenase and pyruvate kinase. *Biotechnol Bioeng* , 15,1089–1100.
- [23] Dickey, F.H. (1955). Specific adsorption. *J Phys Chem* , 59,695–707
- [24] Chang, T. M. S. (1964). Semipermeable microcapsules. *Science* ,146,524-525
- [25] Leuschner, F. (1966). Shaped structures for biological processes. German Patent 1,227-855.
- [26] Bernfeld, P., & Wan, J. (1963). Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattice of synthetic polymers. *Science* , 142, 678–679.
- [27] Haynes, R., & Walsh, K.A. (1969). Enzyme envelopes on colloidal particles. *Biochem Biophys Res Commun* , 36:235–242.
- [28] Quioco, F.A., & Richards, F.M. (1964). Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. *Proc Natl Acad Sci USA*,52,833-839,
- [29] Quioco, F.A., & Richards, F.M. (1966). Enzyme behavior of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry* , 5, 4062–4076
- [30]] Cao, L. (2005). Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications and design. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [31] Axen, R., Porath, J., & Ernback, S. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to poly-saccharides by means of cyanogens halides. *Nature* , 214,1302–1304.

- [32] Manecke, G., & Gunzel, G. (1967). Polymere Isothiocyanate zur Darstellung hochwirksamer Enzymharze. *Naturwissenschaften* , 54,531–533.
- [33] Patel, R. P., Lopiekes, D. V., Brown, S.R., & Price,S. (1967). Derivatives of proteins II. Coupling of α -chymotrypsin to carboxyl containing polymers by use of *N*-ethyl-phenylisoxazolium-3'-sulfonate. *Biopolymers* , 5,577–582.
- [34] Kay, G., & Crook, E. M. (1967). Coupling of enzymes to cellulose using chloro-*s*-triazines. *Nature* , 216,514–515.
- [35] Goldstein, L., Levin, Y., Pecht, M., & Katchalski, E. (1964). A water-insoluble polyanionic derivatives of trypsin, effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behaviour of the bound trypsin. *Biochemistry* , 3,1914–1919.
- [36] Monsan, P. et al.. (1971). Nouvelle Méthode de Préparation d'Enzymes Fixes sur des Supports Minéraux, *C R Acad Sci Paris*, 273,33–36.
- [37] Bartling, G. J., Brown, H. D, & Chattopadhyay, S. K. (1973). Synthesis of matrix-supported enzyme in non-aqueous conditions. *Nature (London)*, 243, 342–344.
- [38] Mosbach, K. (1970). Matrix bound enzymes, Part 1. The use of different acrylic copolymers as matrix. *Acta Chem Scand* , 24,2084–2092.
- [39]Zarbosky, O.R. (1974). Immobilisation of enzymes with imidoester-containing polymers. In: Olson AE, Cooney CL (Eds) *Immobilised enzymes in food and microbial processes*. Plenum Press, New York.
- [40] Marshall, J.J. (1978). Manipulation of the properties of enzyme by covalent attachment of carbohydrate. *Trends Biochem Adv Enzymol* , 57,179–249
- [41] Carcases, P., & Parikh, I.(1972). Adsorbents for affinity chromatography, Use of Nhydroxysuccinimide ester of agarose. *Biochemistry* , 11:2291–2299.
- [42] Porath, J., & Sundberg, I. (1972). High capacity chemisorbents for protein immobilisation.*Nature (London) New Biology* , 238, 261–262.
- [43] Klibanov, A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol* , 15, 97–101.
- [44] Zaks, A., & Klibanov, A. (1985). M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA* , 82, 3192–3196.
- [45] St Clair, N.L., & Navia, M.A. (1992). Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J Am Chem Soc* , 114,7314–7316.
- [46] Margolin, A.L. (1996). Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol* , 14,223–230.

- [47] Cao, L., & Elzinga, J. (2003). Cross-linked enzyme aggregates and crosslinker agents therefore, US Patent Application 20030149172 by Avantium International B.V. Ltd., 2003
- [48] Cao, L., Rantwijk, F., & Sheldon, R.A. (200). Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett* , 2, 1361–1364.
- [49] Boadi, D.K., & R.J. Neufeld, R.J. (2001). Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 590-595.
- [50] Tiourina, O.P., & Sukhorukov, G.B. (2002). Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin and controlled release study, *Int. J. Pharm*, **242**, 155–161.
- [51] Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., & Arıca, M. Y. (2004). Properties of a thermo-stable α -amylase covalently immobilized onto poly(hydroxyethylmethacrylate/glycidylmethacrylate) reactive film, *Food Chemistry*, 84 , 591–599.
- [52] Bryjak, J. (2003). Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic Carriers. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 347–355
- [53] Kara, A., Osman, B., Yavuz, H., [Besirli](#), N., & Denizli, A. (2005). Immobilization of α - amylase on Cu^{2+} chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole) matrix via adsorption. *Reactive & Functional Polymers*, 62 , 61–68.
- [54] Dulong, V., Le Cerf, D., Picton, L., Muller, & G. (2006). Carboxymethylpullulan hydrogels with a ionic and/or amphiphilic behavior : swelling properties and entrapment of cationic and/or hydrophobic molecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 274, 163-169.
- [55] De Baets, S., Vandamme, E. J., & Steinbüchel, A. (2002). Biopolymers Biology Chemistry Biotechnology Applications. PolysaccharidesII. Polysaccharides *from Eucariotes*. WILEY.VCH Verlag GmbH Weinheim, Volume 6, pp 216-240.
- [56] Luc PICTON. (1996). Propriétés en solutions aqueuses d'ethers cellulosiques associatifs. Influence des cosolutés et de la température : conséquences rhéologiques. Thèse de Doctorat de l'université de rouen.
- [57] Southgate, D. A. T. (1976). Determination of food carbohydrates (pp.105-106). 288 *Applied science publishers LTD*. London.
- [58] Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for biconjugaison in aqueous media. *Biconjugate Chem*, 6, 123-130.
- [59] Djabali, D., Belhaneche, N., Nadjemi, N., Dulong, V., & Picton, L. (2008). Relationship between potato starch isolation methods and kinetic parameters of hydrolysis by free and immobilized α -amylase on alginate. *Journal of Food Composition and Analysis* (Accepted paper sous presse)

CHAPITRE V. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES AMIDONS

V.1 Structure chimique de l'amidon natif

Les granules d'amidon sont des particules blanches semi-cristallines, insolubles dans l'eau à température ambiante et dont la taille varie entre 1 et 100 μm . La taille et la forme des granules sont spécifiques de chaque espèce végétale. Les constituants de l'amidon sont essentiellement représentés par des polyholosides (98 à 99 %), la fraction non glucidique (1 à 2 %) étant donc minoritaire [1].

V.1.1 Fraction glucidique

L'hydrolyse acide complète de l'amidon libère de 98 à 99 % de D-glucose. Le D-glucose se trouve dans sa conformation chaise la plus stable (C_1), les groupements hydroxyyles C_2 , C_3 , C_4 , et C_6 étant en position équatoriale. Les unités monomères de D-glucose sont liées majoritairement par des liaisons de type α -(1-4) (95-96 %) et dans une moindre mesure par des liaisons de type α -(1-6) (4-5 %) [2]. Chaque molécule possède en son extrémité C_1 une fonction pseudo-aldéhydique réductrice. La fraction glucidique est un mélange de deux polymères : l'amylose, molécule essentiellement linéaire et l'amylopectine, molécule ramifiée [3-5]. L'existence d'une structure intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine a été évoquée par la suite [6-10].

- **Amylose**

L'amylose (Fig.V.I) représente 20 à 35 % de l'amidon naturel suivant son origine botanique ; l'amidon cireux peut contenir moins de 15% d'amylose et les amidons riches en amylose peuvent contenir jusqu'à 40% [11]. Il s'agit d'une macromolécule de structure linéaire formée de résidus glucopyranoses reliés entre eux par des liaisons α -(1-4). Toutefois, on note une faible quantité (~1%) de liaisons α -(1-6) [6,11]. Sa masse molaire moyenne est de 1×10^5 à 1×10^6 [12,13], avec un degré de polymérisation DP_n de 690 (amylomais) à 4920 (pomme de terre) et entre 9 et 20 points de branchement par molécule . Les chaînes d'amylose contiennent entre 200 et 700 unités de glucose [14] et le nombre de molécules d'amylose moyen dans un granule d'amidon est $1,8 \times 10^9$ [13]. La distribution en masses moléculaires de l'amylose est bien décrite par une distribution logarithmique [15] . Cependant, la dimension, la structure et la polydispersité de l'amylose varient avec son origine botanique [11].

Du fait de son caractère essentiellement linéaire, lié à la présence quasi-exclusive de liaisons α -(1-4), l'amylose est susceptible de complexer les molécules hydrophobes (iode, acides gras, chaînes hydrocarbonées). En particulier, la complexation de l'iode est à la base de sa caractérisation analytique [16]. L'étude du comportement hydrodynamique de l'amylose en solution diluée montre que la molécule adopte une conformation en pelote statistique et ne présente pas de conformation hélicoïdale en milieu aqueux neutre [17].

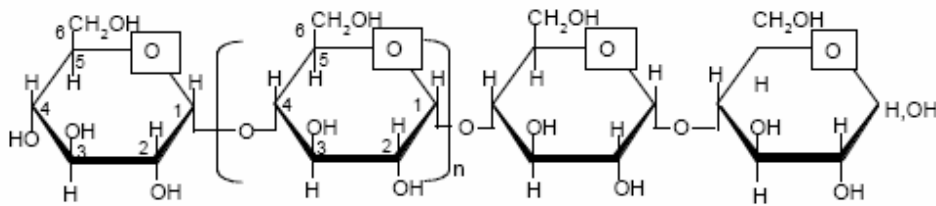


Figure V.1 structure chimique de l'amylose

- **Amylopectine**

Les détails chimiques de la structure de l'amylopectine sont jusqu'à nos jours sujets de débats [18]. L'amylopectine (Fig.V.2) est une macromolécule de masse moléculaire, comprise entre 10^7 et 10^9 [12,14], et dépend de l'origine botanique, de la variété et des conditions physiologiques lors de sa biosynthèse [6]. Elle est formée par l'association de résidus glucopyranoses principalement (95%) reliés entre eux par des liaisons α -(1,4) et par presque 5 % de liaisons α -(1,6) qui lui donnent sa structure ramifiée [20]. Cette structure peut être représentée par un ensemble de grappes de chaînes courtes (S) reliées entre elles par des chaînes plus longues (L) [20] (fig.V.3). Les chaînes courtes de degré de polymérisation (DP) voisin de 15-20, forment les arborescences terminales. Les chaînes longues (DP 40-45) forment l'ossature de la molécule et une chaîne de DP supérieur à 60 porte l'unique extrémité réductrice de la chaîne. Les différences structurales dues à l'origine botanique portent essentiellement sur le rapport chaînes longues sur chaînes courtes : ce dernier est de l'ordre de 5 pour les amylopectines des tubercules [21], de 8 à 10 pour les amylopectines de céréales [22] et de légumineuses.

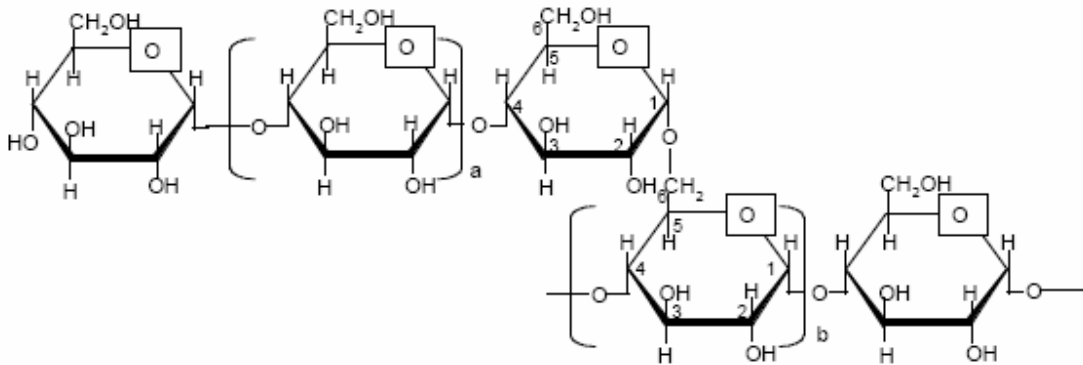


Figure V.2 Structure chimique de l'amylopectine

Les chaînes de l'amylopectine sont divisés en trois types [23] , (fig.V.3 et fig.V.4):

- les chaînes de type A définies comme étant des chaînes non substituées.
- les chaînes de type B substituées.
- Et les chaînes de type C qui contiennent le groupement réducteur.

Les chaînes de type B sont subdivisées en quatre types de chaînes selon leurs positions ; les chaînes B₁ : ce sont de courtes chaînes appartenant à une grappe, les chaînes B₂ qui sont des longues chaînes traversant deux grappes, les chaînes B₃ qui traversent trois grappes et les chaînes B₄ qui traversent quatre grappes, ou en chaînes Ba liées à une extrémité A et chaînes Bb directement liées à l'extrémité d'une chaîne B (fig.V.4). Les longueurs de chaînes (CL) typiques de A₁, B₁, B₂, B₃ et B₄ pour quatre différents amidons sont 12-16, 20-24, 42-48, 69-75 et 101-119 unité de glucose respectivement[24,25].

Les chaînes de l'amylopectine sont aussi divisées en chaînes externes et internes ; les chaînes externes s'étendent des branchements externes et comprennent toutes les chaînes de type A et quelques chaînes de type B alors que le reste de chaînes de type B sont des chaînes internes [23,26,27] (fig.V.4).

• **Matériel intermédiaire**

Le matériel intermédiaire peut constituer de 5 à 10 % du poids total des amidons. Les espèces botaniques à teneur en amylose normale (20 à 35 %) telles que les céréales ou la pomme de terre en contiennent peu. Par contre, dans les amidons riches en amylose tels que l'amidon de pois ridé [8] ou l'amylomais [6], il peut dépasser 10 %. Sa structure et

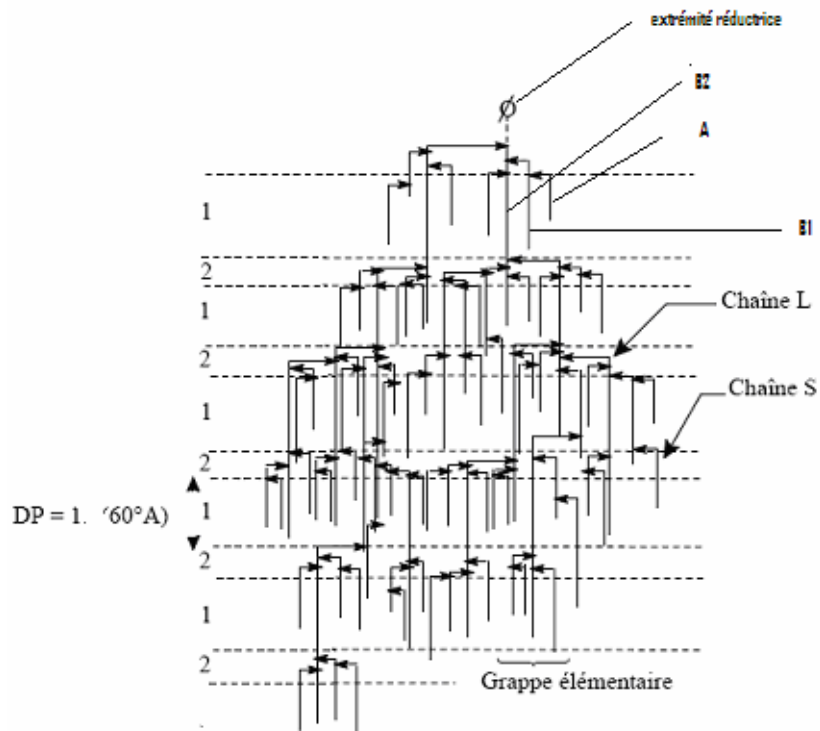


Figure.V.3 Chaines ramifiées de l'amylopectine[4]

ses propriétés sont intermédiaires entre celles de l'amylose et de l'amylopectine (capacité de liaison à l'iode, β -amylose). Ce matériel est composé des mêmes chaînes de DP 15 à 45 que l'amylopectine. Toutefois, le rapport DP 15 / DP 45 est très faible, ce qui explique sa capacité élevée à complexer l'iode. Certains maïs mutants contiennent des α -glucanes solubles semblables au glycogène animal d'où leur nom : phytoglycogène.

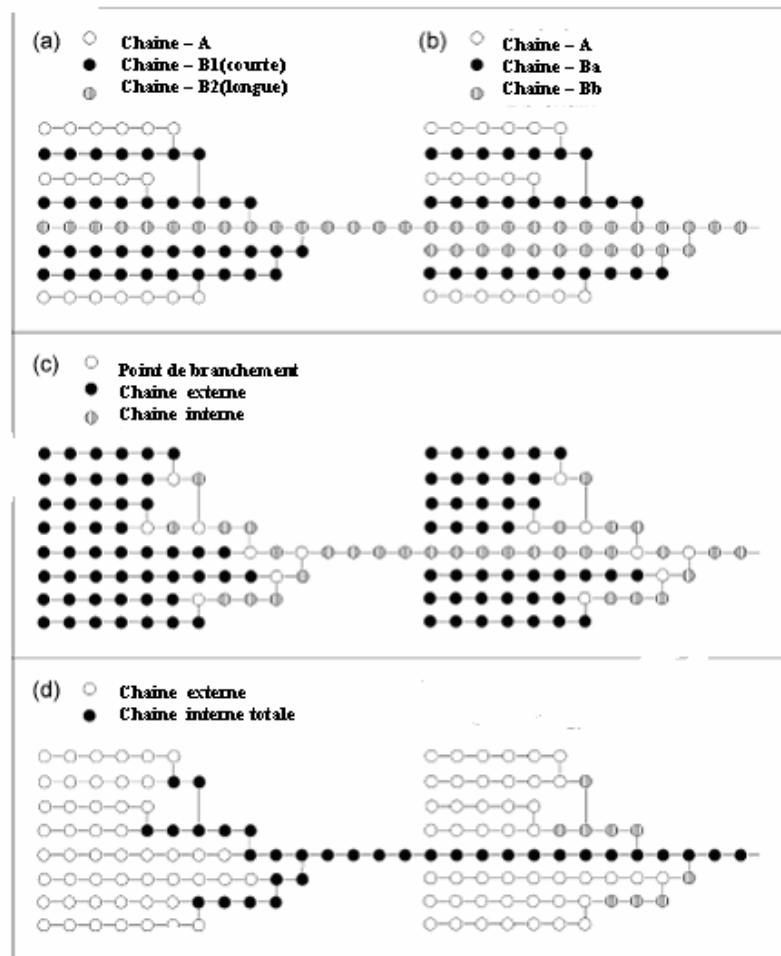


Figure.V.4 Définition des types de chaînes dans la structure branchée de l'amylopectine [27]

V.1.2 Fraction non glucidique

La fraction non glucidique représente 1 à 2 % du poids total des amidons selon l'origine botanique et le procédé d'extraction (tableau V.1).

V.1.2.1 Lipides

Les lipides sont les constituants non glucidiques les plus importants. On distingue deux types de lipides :

- Les lipides de surface des grains d'amidon des céréales constitués de triglycérides (facilement extractibles par des solutions eau-butanol), de glycolipides, de phospholipides et d'acides gras qui dérivent de la membrane d'amyloplaste et d'autres sources .

- Les lipides internes, essentiellement monoacylés (ils nécessitent une gélatinisation pour être récupérables par des solvants polaires). Ils sont composés d'acides gras libres et de lysophospholipides (LPL) [28-31]. Ces lipides internes sont en quantité limitée dans les amidons de tubercules ou de légumineuses, et en quantité supérieure dans les amidons de céréales (de 0,6 à 0,8 % pour le maïs et de 0,8 à 1,2 % pour le blé). Ils ont la capacité de former des complexes d'inclusion dans l'hélice d'amylose. Cette fraction lipidique a une influence non négligeable sur les propriétés physico-chimiques de l'amidon et joue un rôle essentiel au niveau de la transformation de l'amidon [32].

Tableau.V.1 Composition non glucidique de différents amidons en fonction de leurs origines botaniques (en % d'amidon sec) [33] .

	Lipides	Protéines	Cendres	Phosphore
Céréales				
Maïs normal	0,61 – 0,65	0,3	0,1	0,015
Maïs cireux	0,23	0,1	0,1	0,003
Amylomaïs	1,11	0,5	0,2	0,03
Blé	1,12	0,33	0,3	0,05
Avoine	1,3	0,24	-	-
Orge	1	0,11	-	0,03
Riz	1,04	-	-	-
Seigle	0,54 – 0,62	-	-	-
Tubercules				
Pomme de terre	0,009	0,05	0,3	0,04
Manioc	0,1	0,1	0,3	-
Légumineuses				
Féverole	0,06	0,16	0,07	0,02
Pois lisse	0,18	0,19	0,05 - 0,22	0,04
Pois ridé	-	0,23	0,11	0,03
Fruits				
Banane	-	0,32	-	0,02
Mangue	-	0,25	-	0,02
Pomme	-	0,1	-	0,03

V.1.2.2 Fraction azotée et protéines

La fraction azotée est constituée de protéines, d'enzymes, d'acides aminés et d'acides nucléiques. Cette fraction généralement trouvée en surface est abondante dans l'amidon de blé [34].

Les protéines associées avec les granules d'amidon dérivent des tissus de la plante et sont fortement liées ou font partie de la structure du granule ; les protéines intégrées ont une masse moléculaire plus élevée que les protéines associées à la surface (50-150 KDa et 14-30 KD respectivement) et sont probablement les résidus d'enzymes qui participent à la synthèse de l'amidon [11]. La présence de protéines affecte principalement les propriétés rhéologiques et l'aptitude des grains d'amidon à l'hydrolyse enzymatique.

V.1.2.3 Fraction minérale

la fraction minérale est essentiellement composée de phosphore (qui se trouve sous trois formes ; phosphate monoester, phospholipide et phosphate inorganique) et des très petites quantités de calcium, magnésium, de potassium et de sodium. L'amidon de pomme de terre contient une fraction importante de phosphate représentant de 0,06 à 0,1 % de la matière sèche. Ces phosphates confèrent à l'amylopectine de pomme de terre des propriétés polyélectrolytes (échangeur de cations) [35]. Les sites de phosphorylation varient avec le génotype de l'amidon de pomme de terre [36].

V.2 Structure granulaire

Les fractions glucidiques sont organisées en structure granulaire dont la taille de 1 à 100 μm , la forme, la morphologie, la position du hile sont sous contrôle génétique et en conséquence sont fonctions de leur origine botanique (tableau.V.2).

Tableau.V.2 Teneur en amidon et forme selon l'origine botanique [33] .

	% Amidon	Forme
Maïs normal	71 – 74	Polyédrique
Blé	67,2 – 68,4	Lenticulaire, polyédrique
Orge vêtue	54,8 – 59,3	Lenticulaire
Pomme de terre	65 – 85	Ellipsoïdale
Féverole	30 – 43	Sphérique ovoïde
Pois lisse	43 – 48	Réniforme

V.2.1 Observation morphologique

La taille et la forme du grain dépendent de l'origine botanique de la matière première [37].

- Observations en microscopie optique :

En lumière naturelle, les grains d'amidon secs sont blancs. Dans certains cas (amidon de pomme de terre), des couches concentriques autour du hile sont visibles après hydratation (fig.V.3). Le hile, centre initial de croissance du grain d'amidon, est une région moins organisée pouvant contenir une partie des constituants non glucidiques.

En lumière polarisée, les grains d'amidon se comportent comme des cristaux spiralés, déformés, à biréfringence positive. Ils présentent une « croix noire » encore appelée croix de Malte dont les branches se rejoignent au niveau du hile. La figure V.5 met en évidence l'état granulaire de l'amidon de pois natif par microscopie optique, la présence de cristallites et donc de croix de Malte par biréfringence et la disparition de la forme d'une partie des cristallites après un traitement thermique [38].

- Observations en microscopie électronique à balayage (MEB) :

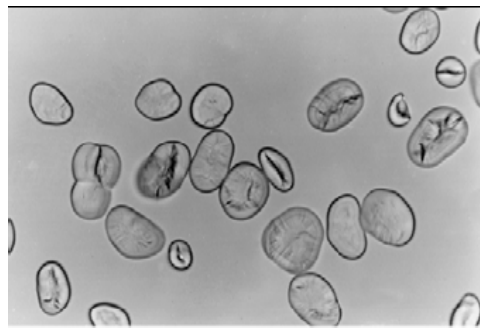
La surface des grains d'amidon natif apparaît lisse et dépourvue de pores ou fissures.

Soumis à des traitements acides ou enzymatiques, les grains d'amidon se craquellent et exposent une structure de type lamellaire [39, 40].

- Observations en microscopie électronique à transmission (MET) :

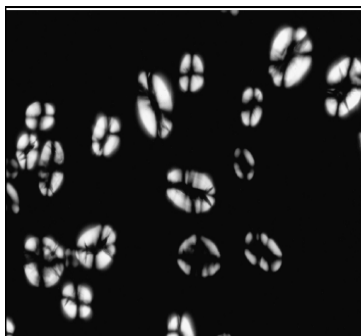
Cette méthode permet d'établir un lien entre les méthodes précédentes d'analyse morphologique et celles qui permettent une analyse au niveau moléculaire (rayons X,

analyses chimiques...). Une technique d'oxydation a montré l'existence d'une structure radiale répétitive de période 6-7 nm, indiquant une disposition correspondante à la moyenne des grappes dans la molécule d'amylopectine ; cela suppose que l'amylopectine est disposée radialement au sein du grain (figV.6). Ces anneaux pourraient être des cristallites bidimensionnels, où la longueur de 5 nm correspondrait à des chaînes courtes de 14 unités glucosyles organisées en doubles hélices. Deux types d'organisations au sein du grain d'amidon peuvent ainsi être observés : d'une part, une organisation radiale des molécules d'amylose et d'amylopectine et, d'autre part, une organisation tangentielle, où les molécules d'amylopectine et dans une moindre mesure d'amylose, établissent des liaisons hydrogène intermoléculaires. Singh et al [41], ont montré une différence morphologique entre amidons de différentes origines botaniques (fig V.7).

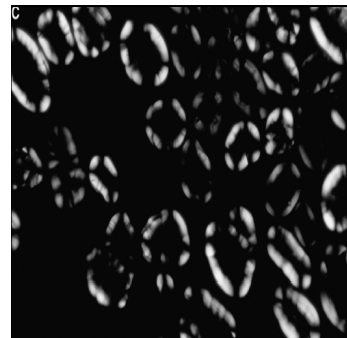


(A)

(B)



(C)



FigureV.5 Microscopie des grains d'amidon de pois : normale (A), en biréfringence (B) et transformé thermiquement (C) [38].

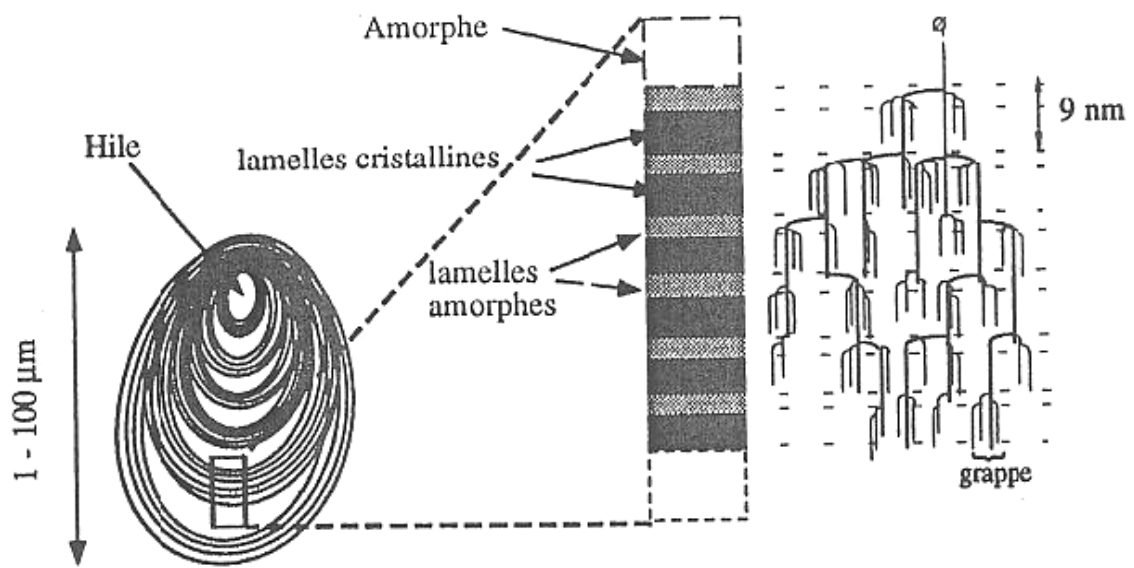


Figure V.6 Différents niveaux d'organisation au sein d'un grain d'amidon [42].

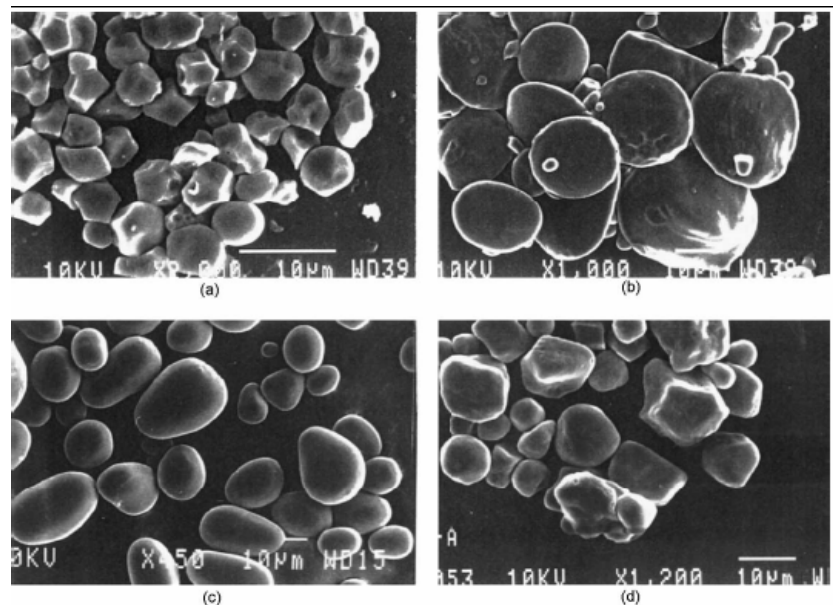


Figure V.7 Microscopie électronique d'amidon de différentes sources : riz (a), blé (b), pomme de terre (c) et maïs (d) [41].

V.2.2 Organisation moléculaire

L'amylose et l'amylopectine sont disposées au niveau d'entités granulaires semi-cristallines. On distingue trois types de morphologie selon leur diagramme de diffraction aux rayons X [1] :

- Morphologie A : caractéristique des amidons de céréales.
- Morphologie B : caractéristique des amidons de tubercules, de céréales riches en amylose (> 40 %) et des amidons rétrogradés.
- Morphologie C : intermédiaire entre les deux autres et caractéristique des amidons de légumineuses et de racines.

Le plus souvent, il est admis que la cristallinité des amidons est essentiellement due aux molécules d'amylopectine bien qu'aucune preuve n'existe pour en exclure l'amylose.

L'amylose et l'amylopectine ont un degré d'association plus ou moins important suivant l'amidon considéré. Zobel [43] a comparé des amidons de maïs et de pomme de terre sur des critères de solubilité, de diffraction aux rayons X et d'attaque enzymatique. Il suggère que l'amylose et l'amylopectine sont localisées dans des zones bien différenciées des grains d'amidon de maïs, tandis que ces deux fractions sont plus intimement mélangées dans les grains d'amidon de pomme de terre. Il est difficile de décrire dans le détail l'organisation d'un grain d'amidon, même si des modèles tentent d'illustrer sa complexité [43](fig.V.8).

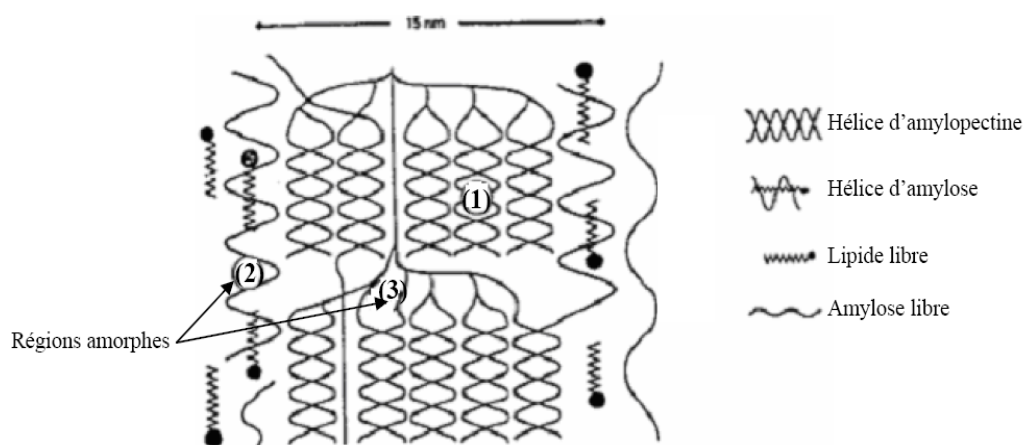


Figure V.8 Modélisation de la structure du grain d'amidon montrant les positionnements possibles et les interactions entre les différents composants : (1) : microcristaux, (2) : fraction plus ou moins complexée avec les lipides, (3) : fraction interfaciale rigide [38].

V.2.3 Complexation de l'amylose

La complexation de l'amylose est possible en présence d'iode. En présence d'iode moléculaire I_2 , l'amylose en solution forme un complexe d'inclusion de structure hélicoïdale dans lequel l'iode est piégé au centre de la cavité et stabilise la conformation [5]. Les chaînes d'amylose adoptent une conformation hélicoïdale avec un pas d'hélice de 6 unités de glucose par tour. Plus l'hélice formée est longue et linéaire, plus la quantité d'iode fixée est importante. L'amylose, dont le DP moyen est supérieur à 1000, absorbe généralement 19 à 19,5 g d'iode pour 100 g de polymère, en formant un complexe bleu dont l'absorption maximale (λ_{\max}) se situe à 650 nm. L'amylopectine ne fixe que 0,3 à 0,5 g d'iode pour 100 g de polymère en formant un complexe brun ($\lambda_{\max} = 540$ nm) [6]. Cette complexation se produirait au niveau des chaînes courtes de DP 15 à 45.

Tous les lipides monoacylés (acides gras libres, lysophospholipides monoglycérides d'acide-gras) peuvent complexer l'amylose. Les plus efficaces sont ceux comprenant une chaîne saturée à 14, 16 ou 18 atomes de carbone [44]. Tous ces complexes sont insolubles et ne se dissocient qu'à environ 100°C [5].

CHAPITRE VI. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'EXTRACTION ET L'HYDROLYSE DES AMIDONS

VI.1 Etude bibliographique sur l'extraction des amidons

Les méthodes d'extraction de l'amidon dépendent de l'état du matériel végétal utilisé. Un ramollissement préalable des graines ou tubercules s'effectue par trempage dans des conditions de température et de temps définis en milieu tamponné, additionné d'un agent inhibiteur d'activité enzymatique susceptible de dégrader l'amidon, comme le chlorure mercurique [45] et l'acide lactique qui diminue le pH du milieu de trempage et limite la culture de la plupart des organismes [46] ou d'un agent qui réagit avec les protéines d'endospermes, facilitant ainsi la séparation des amidons des protéines comme l'anhydride sulfureux [47-51] ou l'hydroxyde de sodium [48,52-56] auquel on ajoute souvent des enzymes dégradant les protéines comme l'optimase Apl-440 et la caséine [55], la pronase dans un milieu tamponné de tris-HCl [51] ou la protéase neutre (de *Bacillus subtilis*) [56]

Les matières premières trempées sont ensuite broyées afin de faciliter la séparation des amidons des autres composés; une première filtration à travers des tamis de porosité variant de 75 μ m [55] et 38 μ m [50] pour le riz, 420 μ m-74 μ m et 53 μ m pour le maïs et le millet, 74 μ m et 53 μ m pour le sorgho ([47, 53] pour retenir les fibres et une partie des protéines.

Le filtrat riche en amidon subit ensuite une centrifugation avec différentes vitesses selon des matières premières; 400xg ou 460xg pendant 20 minutes ou 760xg pendant 10 minutes pour le sorgho [48, 52], 25000xg pendant 20 minutes pour le millet et le maïs [53, 54, 57], 3000xg pendant 20 minutes et 100xg pendant 15 min à 6°C et 1400xg pendant 10 minutes pour le riz [6,11], donnant lieu à une couche de protéines de couleur jaunâtre facilement séparable. Après la séparation de la couche de protéine les opérations de lavage à l'eau distillée et de centrifugation de l'amidon brute sont répétées jusqu'à l'obtention de l'amidon pur, de couleur blanche.

L'extrait d'amidon pur ainsi obtenu est séché dans une étuve à 40°C pendant 24h à 48h pour le sorgho et le riz [52, 55] ou à 45°C jusqu'à ce que l'humidité devienne de l'ordre de 12% pour le sorgho [53] ou à l'air libre pour le maïs [49]

Un tamisage supplémentaire à travers des tamis de porosité 250 μ m et 150 μ m est effectué par certains auteurs [50,53,54]

L'efficacité de la séparation et de la purification, à l'échelle du laboratoire sont cependant dépendantes de l'habileté de l'expérimentateur qui perd très souvent de petits granules d'amidon qui adhèrent aux protéines dites associées aux grains d'amidon (starch granule

associated protéins). La quantité de ces protéines dans les amidons purs bien lavés varie de 0,25 à 0,3% et reste difficile à extraire bien qu'elles soient à l'origine d'indésirables odeurs, goûts et couleur dans les dérivés d'amidon [57].

VI.2 Etude bibliographique sur l'hydrolyse des amidons

Pendant 120 ans l'amidon a été une importante source de produits sucrés. La conversion de l'amidon en glucose par l'acide sulfurique a été réalisée par le chimiste allemand G.S.Kirchoff en 1811, obtenant un mélange qui remplaça le sucre et ce fut le point de départ pour les différentes conversions acides des amidons pendant presque soixante ans.

La seconde découverte a été réalisée par le chimiste français Anselme Payen, qui en 1833 isola une substance à partir de l'extrait de malt ayant la faculté de convertir l'amidon en sucre en l'appelant diastase (Grec diastasis=séparation). Le terme enzyme (Grec enzyme=in leaven) a été utilisé ultérieurement par le physiologiste allemand Willy Kuhne.

En 1896, Buchner a démontré qu'un extrait cellulaire pouvait fermenter le sucre, et ainsi le potentiel d'enzymes extracellulaires devint apparent. Cependant, les enzymes n'ont été utilisées pour la production des sucres qu'en 1938.

Avec la découverte de l' α -amylase bactérienne thermostable dans les années 1970, l'utilisation des enzymes devint très importante dans l'hydrolyse des amidons et au milieu des années 1980, le sirop de fructose a été commercialisé.

A la fin des années quatre vingt dix , environ 70% des amidons sont transformés en sucres dans plus de 200 usines à travers le monde [58].

VI.2.1 Les enzymes dégradant l'amidon

Les enzymes qui dégradent l'amidon ont été classées en quatre classes selon leurs modes d'action [59]:les endoamylases, les exoamylases, les enzymes débranchantes et les enzymes qui servent à transférer un groupement d'atomes.

VI.2.1.1 Les endoamylases

Les endoamylases, connues aussi par 'enzymes liquéfiantes' sont des enzymes qui coupent les liaisons α -1,4 glycosidiques présentes dans les parties internes des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine. Les produits d'hydrolyse, qui sont moins visqueux , sont des dextrines et des oligosaccharides avec des chaînes variées ayant une configuration α en C₁ des unités réductrices du glucose d'où le nom α -amylase [60- 61].

VI.2.1.2 Les exoamylases

Les exoamylases coupent toutes les liaisons α -1,4 glycosidiques comme la β -amylase (EC.3.2.1.2), ou les liaisons α -1,4 et α -1,6 glycosidiques comme l'amyloglucosidase (la glucoamylase) (EC.3.2.1.3) et l' α -glucosidase (EC.3.2.1.20).

Les exoamylases agissent sur les unités de glucoses externes de l'amylose et de l'amylopectine et produisent uniquement du glucose (glucoamylase et α -glucosidase), ou du maltose et des β -dextrines limites (β -amylase).

La glucoamylase et l' α -glucosidase diffèrent en leur préférence vis-à-vis des substrats ;

- l' α -glucosidase agit d'une façon meilleure sur les petits maltooligosaccharides et libère le glucose avec une configuration α .
- La glucoamylase hydrolyse mieux les chaînes longues des polysaccharides.

Les β -amylases et les glucoamylases sont trouvées dans une variété de microorganismes [62]. Contrairement à l'action des endoamylases, l'hydrolyse se fait avec une lente diminution de la viscosité [61].

VI.2.1.3 Les enzymes débranchantes

Cette classe d'enzymes catalyse les réactions d'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,6, qui participent à un débranchement des chaînes de glucose de l'amidon. Parmi cette classe, on peut citer l'isoamylase (EC.3.2.1.68) et la pullulanase (EC.3.2.2.48) ; la première est spécifique aux liaisons de l'amylopectine, la deuxième est spécifique aux liaisons de l'amylopectine et du pullulane.

VI.2.1.3 Les enzymes du quatrième groupe

Cette classe d'enzymes catalyse la rupture d'une liaison α -1,4 dans une molécule donneuse et le transfert d'une partie de la molécule à une autre molécule réceptrice capable de former une nouvelle liaison glucosidique de nature α -1,4 ou α -1,6. Parmi ces enzymes on peut citer l'amyloamylase (EC.2.4.1.25) et la cyclodextrine glucotransférase (EC.2.4.1.19).

VI.2.2: caractéristiques et mécanisme réactionnel des α -amylases. (Fig VI.1)

L' α -amylase (EC.3.2.1.1) est une endoamylase. Les produits finaux de l'action de l' α -amylase sur l'amidon sont des oligosaccharides avec différentes longueurs de chaînes et des α -dextrines limites qui constituent des oligosaccharides branchés [59].

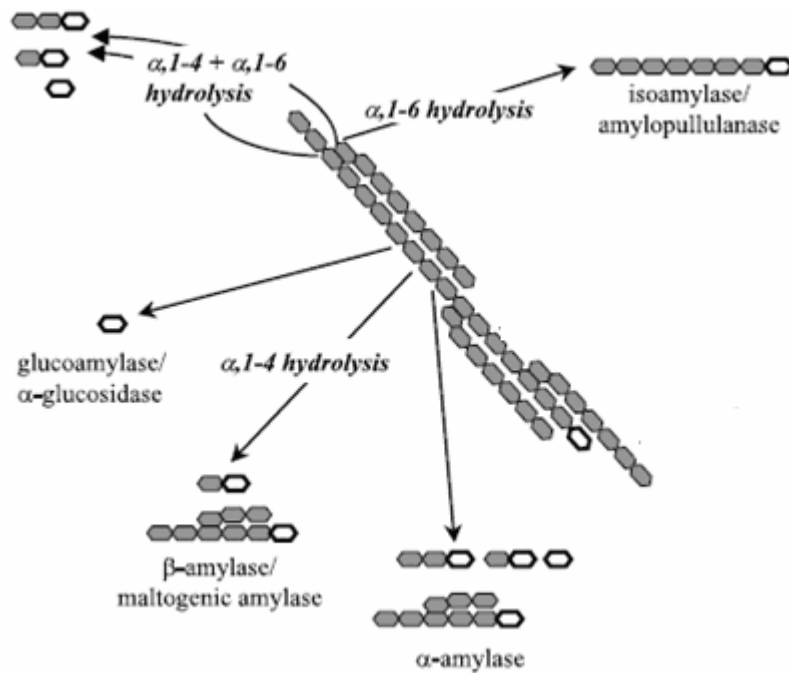


Figure VI.1 différentes enzymes dégradant l'amidon. Le cycle ouvert symbolise l'extrémité réductrice de la molécule polyglucose [59].

Tous les enzymes qui dégradent l'amidon possèdent des séquences d'acides aminés similaires : la famille des α -amylases est la 13^{ème} famille dans la classification qui se base sur les séquences d'acides aminées (classification de Henrissat) [63]. Ce groupe comprend les enzymes qui possèdent les propriétés suivantes :

- Elles agissent sur les liaisons α -glycosidiques ($\alpha,1-4$ ou $\alpha,1-6$ ou les deux) et hydrolysent ces liaisons pour produire des mono et/ ou oligosaccharides sous la forme α -anomères.
- Elles possèdent la structure $(\beta/\alpha)_8$ ou **TIM barrel** (figVI.2) contenant le site catalytique.
- Elles ont quatre régions conservées dans leur structure primaire (tableau VI.1) qui contiennent les acides aminés qui forment le site catalytique, et d'autres acides aminés qui sont essentiels pour la stabilité de la topologie de **TIM Barrel**.



Figure VI.2 la structure $(\beta/\alpha)_8$ (A) ou **TIM barrel** (B) contenant le site catalytique [61].

Tableau VI.1 Les quatre régions des acides aminés qui forment le site catalytique [61].

	I β_2	II β_4	III β_5	IV β_7
Amylomaltase	EALGIRIIGDMPIFVAED	LFHLVRIDHFRG	VPVLAEDLGVI	VVYTGTHENDT
Amylosucrase	HEAGISAVVDFIFNHTSN	GVDILRMDAVAF	VFFKSEAIVHP	VNYVRSHDDIG
CGTase	HAKNIKVIIDFAPNHTSP	GIDGIRMDAVKH	VFTFGEWFLGV	VTFIDNHMER
CMDase	HDNGIKVIFDAVFNHCGY	DIDGWRLDVANE	AIIVGEVWHDA	FNLIGSHDTER
BE	HQAGIGVILDWVPGHFCK	HVDGFRVDVAN	ILMIAEDSTDW	FILPFSHDEVV
Isoamylase	HNAGIKVYMDVVYNHTAE	GVDGFRFDLASV	LDLFAEPWAIG	INFIDVHDGMT
M.amylase	HQKAIRVMLDAVFNHSGY	DIDGWRLDVANE	AYILGEIWHDA	FNLLGSHDTPR
Pullulanase	HAHGVRVILDGVFNHTGR	GVDGWRLDVPNE	AYIVGEIWEAA	MNLLTSHDTPR
Sucrose Pase	LGECSHLMFDFVCNHMSA	GAEYVRLDAVGF	TVIITETNVPH	FNFLASHDGGIG
BLamylase	HERGMYLMVDVVANHMGY	SIDGLRIDTVKH	VYCIGEVLDGD	GTFVENHDNPR

Le site actif se divise en deux parties (figVI.3) (a) le site de liaisons formées par un nombre de sous-sites et (b) le site catalytique formé par 2-3 groupes de donneurs de protons (électrophiles) et accepteurs de protons (nucléophiles). Le nombre de subsites et leur arrangement en conjugaison avec les groupes catalytiques déterminent le type des produits formés. La rétention de la configuration ayant lieu pendant l'action de l'enzyme suggère un mécanisme à double déplacement avec des intermédiaires covalents.

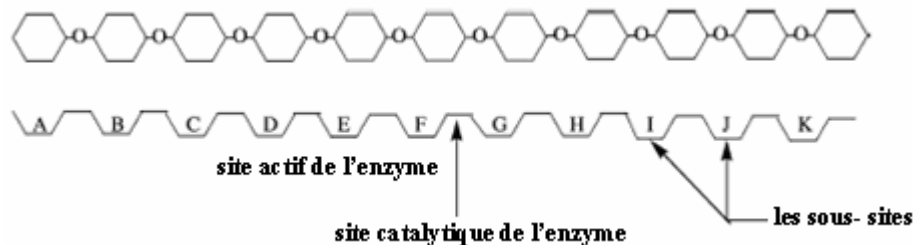


Figure VI.3 représentation des sites actif et des sous-sites de l' α -amylase [60].

Un tel mécanisme est montré dans la figure VI.4 qui propose que les liaisons α -1,4 et α -1,6 sont catalysées de la même manière avec laquelle elles ont été formées.

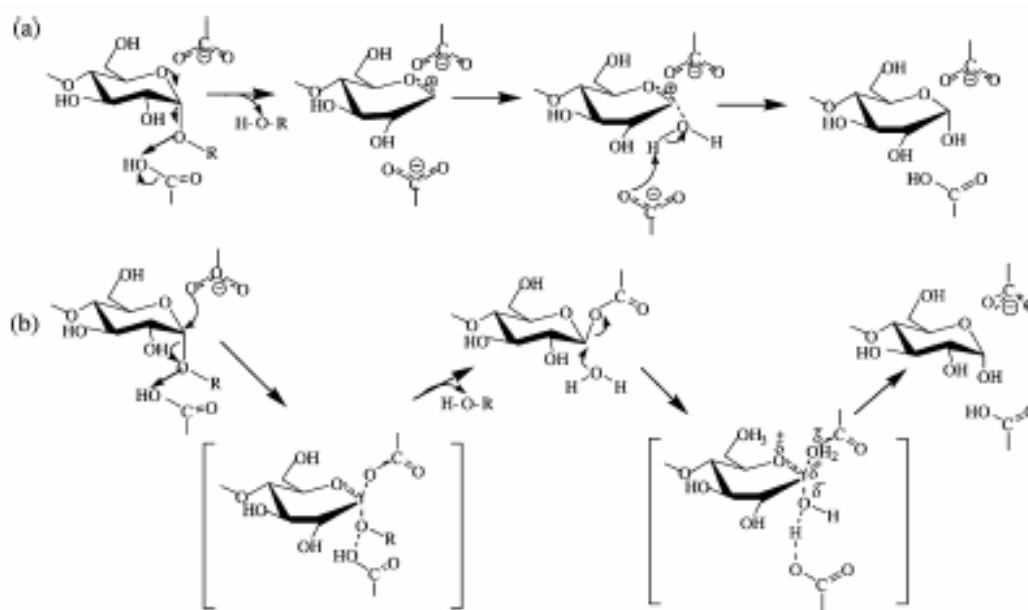


Figure VI.4 les mécanismes catalytiques possibles de l' α -amylase (a) réaction S_N1 via un ion carbonium intermédiaire. (b) réaction S_N2 via la formation d'un complexe glycosyl-enzyme par liaison covalente[61].

VI.2.3 La cinétique enzymatique

Comme dans tout procédé catalytique, il est important, avant d'utiliser une enzyme dans une synthèse ou une analyse, d'en connaître le comportement cinétique. Un rappel sur la cinétique enzymatique est donné en **Annexe 2**.

VI.2.4 Modèles cinétiques de l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase

Les résultats, de plusieurs auteurs, de la cinétique d'hydrolyse de l'amidon par l'enzyme libre sont conformes au modèle de Michaelis [64-68], et les paramètres cinétiques trouvés sont fonctions des origines botaniques des amidons ainsi que leurs prétraitements. Pour l'hydrolyse des amidons par l'amylase immobilisée, la plupart des résultats montrent une augmentation de K_m et une diminution de V_m ; ce qui est justifié par des phénomènes de diffusion qui ralentissent la rencontre substrat-enzyme et par des changements structurels des enzymes immobilisées [69-71]. Cependant, quelque auteurs ont trouvé des valeur V_{max} plus grandes pour l'amylase immobilisée [72, 73] (Tableau VI.2)

Tableau VI.2 Valeurs de K_m et V_{max} des cinétiques d'hydrolyse des amidons par l' α -amylases libre et immobilisées

catalyseur	K_m	V_{max}	référence
amylase libre	2,51(g/dm ³)	1,67 10 ⁻³ (g/dm ³ .min)	[70]
amylase sur Poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) active par CDI (1)	3,13	6,16 10 ⁻⁴	
amylase sur Poly(dimer acid-co-alkyl polyamine)active par EDA (2)	3,47	7,34 10 ⁻⁴	
amylase sur Poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) active par HMDA (3)	3,17	3,30 10 ⁻⁴	
amylase libre	2,51 10 ⁻⁴ (mole/ml)	1,02 10 ⁻⁴ (mole/ml.min)	[71]
amylase sur zirconium calciné à 500°C	9,53 10 ⁻⁴	0,15 10 ⁻⁴	
amylase sur zirconium calciné à 700°C	7,07 10 ⁻⁴	0,86 10 ⁻⁴	
amylase libre	15,8 mM	213 10 ³ (U/mg)	[72]
amylase sur poly(EGDMA-VIM)-Cu ⁺² (4)	22,5	234 10 ³	
Amylase libre	21(mg /ml.s)	15,3	[73]
Amylase immobilisée sur Chitosane	22,4	37,9	

(1) (CDI : Carbodiimide)

(2) (EDA : ethylene diamine)

(3) (HMDA : hexamethylene diamine)

(4) (EGDMA-VIM)-Cu⁺² : Cu⁺² chelaté sur Poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole).

CHAPITRE VII. EXTRACTION ET HYDROLYSE DES AMIDONS DE POMME DE TERRE LOCALE PAR L'AMYLASE LIBRE ET IMMOBILISEE

VII.1 Isolation de l'amidon de pomme de terre

La pomme de terre de variété SPUNTA (récolte de l'année 2005) cultivée dans la région d'El Oued a été utilisée comme source d'amidon. L'isolation de l'amidon a été effectuée par deux méthodes humides : la méthode bisulfite qui se base sur le trempage des féculs de pomme de terre dans une solution contenant du SO₂ et la méthode alcaline se basant sur le trempage de ces féculs dans une solution de NaOH.

VII.1.1 La méthode bisulfite

L'isolation de l'amidon a été effectuée en se basant sur les méthodes citées dans les références [49,74]. 200g de pomme de terre ont été lavés et trempés dans une solution bisulfite (pH=3) à 58°C pendant 2h, puis lavés à l'eau distillée trois fois, broyés dans un broyeur (IKA LABORTECHNIC A10), tamisés à l'eau distillée à travers des tamis de taille 150µm, centrifugés à 5500tr/min durant 10 min. Après centrifugation la couche de protéines est enlevée; Les opérations de centrifugation et de séparation de l'enzyme sont répétées jusqu'à l'obtention d'un extrait d'amidon blanc. L'amidon est ensuite séché dans une étuve à 48°C pendant 48h.

VII.1.2 La méthode alcaline

200g de pomme de terre ont été lavés et trempés dans une solution NaOH(0.30%) à 8°C pendant 24h [51,75], puis lavés à l'eau distillée trois fois, broyés dans un broyeur (IKALABORTECHNIC A10), tamisés à l'eau distillée à travers des tamis d'ouvertures de 150µm, centrifugés à 5500tr/min durant 10min. Après centrifugation, la couche de protéines est enlevée. Les opérations de centrifugation et de séparation de l'enzyme sont répétées jusqu'à l'obtention d'un extrait d'amidon blanc. L'amidon est ensuite séché dans une étuve à 48°C pendant 48h.

VII.2 Caractérisation partielle des amidons extraits

VII.2.1 L'Humidité:

La détermination de la teneur en eau des amidons a été effectuée selon la méthode normalisée AACC(1983). Une masse de 5 g d'échantillon pesée avec une précision 0,0001g dans un creuset préalablement séché et taré. Le creuset est ensuite introduit dans une étuve Memmert UL-40 (schwaback,Allemagne) à 130°C pendant 2heures.

La teneur en humidité est donnée par la formule VII.1 :

$$\%H=[(M_2-M_0)/M_1].100 \quad (\text{VII.1})$$

avec:

M_0 :masse du creuset séché et refroidi dans un dessiccateur en g

M_1 : masse de la prise d'essai en g

M_2 : masse du creuset et la prise d'essai après séchage

La teneur de la matière sèche est déterminée par la relation ci-dessous :

$$\%MS=100-\%H \quad (\text{VII.2})$$

VII.2.2 L'amidon total (TS) dans l'extrait d'amidon

- dosage de l'amidon:

le dosage de l'amidon se fait par le dosage du glucose produit par hydrolyse enzymatique de l'amidon dissout dans une solution de KOH en se référant aux méthodes [76-78].

on disperse 50mg de l'échantillon pesé avec une précision 0,0001g dans 6ml d'une solution KOH(2M), on agite dans un vortex, puis on laisse le mélange pendant 1 à 2 heures à température ambiante jusqu'à la dissolution totale de l'amidon et on neutralise avec l'acide acétique. On ajoute 3ml d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,4M(pH=4,75) et 1ml de l'enzyme amyloglucosidase (300U/ml, Sigma,A-7255),Le mélange est introduit dans un bain thermostaté à 60°C pendant 45 minutes avec agitation de temps à autre. On dilue le mélange réactionnel dans une fiole de 50ml avec de l'eau distillée. On prend 1ml de la solution obtenue et on dilue à 10ml avec de l'eau distillée pour obtenir une concentration en glucose inférieure à 100µg/ml.

On dose le glucose produit par la méthode GOD-POD (Glucose Oxydase-Peroxydase) et le taux d'amidon est obtenu en multipliant le taux de glucose par 0,9.

- **La méthode Glucose Oydase-Peroxydase (GOD-POD)**

le glucose produit par la réaction de l'amidon avec l' amyloglucosidase réagit avec la glucose oxydase en présence de l'oxygène donnant lieu à l'eau oxygénée H₂O₂ qui réagit avec la peroxydase en présence du phénol et amino-4-antipyrine(4-AAP) pour donner un complexe rose d'absorbance proportionnelle avec la concentration du glucose: on mesure l'absorbance à 500nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

On prépare une solution mère de glucose avec une teneur 10g/l et on dilue jusqu'à l'obtention des solutions de teneurs : 25, 50, 75, 100 (µg/ml)(domaine de validité de la méthode).

On met 1ml de l'enzyme (Glucose Oydase-Peroxydase,Biomaghreb TUNISIA) dans un tube à essai. On ajoute 0,2ml de l'échantillon (et des solutions de la courbe d'étalonnage)

On agite et on laisse à une température 37°C pendant 45 minutes.

On mesure l'absorbance à une longueur d'onde à 500nm (la couleur reste stable pendant 1heure) et ainsi on obtient la courbe d'étalonnage (FigureVII.1) et la concentration en glucose dans les échantillons.

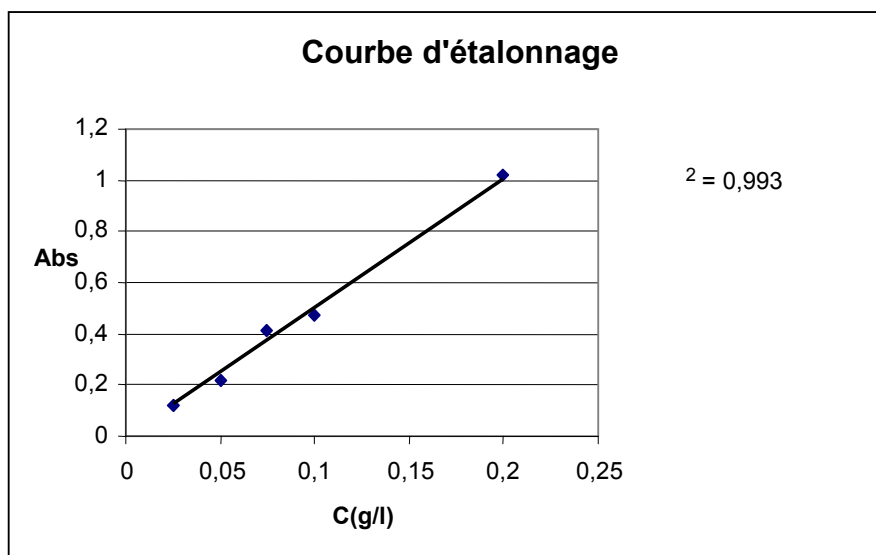


Figure VII.1 Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en glucose

Le taux de l'amidon par matière sèche été calculé utilisant l'équation suivante:

$$\% \text{ TS} = (\text{Abs} \cdot f \cdot V \text{ (ml)} \cdot 0.9) / (\text{P} \cdot m \text{ (g)} \cdot \text{MS} \%) \quad (\text{VII.3})$$

%TS : teneur des échantillons en amidon.

Abs : l'absorbance.

f: facteur de dilution.

V : le volume en (ml).

m : la masse de l'échantillon en (g).

P : pente de la courbe d'étalonnage

MS: pourcentage en matière sèche de l'amidon

VII.2.3 le rendement d'extraction ($R_{EX}\%$)

Le rendement d'extraction de l'amidon par rapport à la matière première sèche (pomme de terre) est calculé par l'équation (VII.4) :

$$R_{EX} \% = \frac{m \cdot \left(1 - \frac{H\%}{100}\right) \cdot TS\%}{50} \quad (\text{VII.4})$$

Où m : masse de l'extrait d'amidon en g

H% : le pourcentage d'humidité dans l'extrait d'amidon

50 : Etant la masse sèche en (g) dans 200 g de pomme de terre (l'humidité de la pomme de terre étant égale à 75%)

TS : l'amidon total dans l'extrait d'amidon.

VII.2.4 Photos microscopiques des grains d'amidon

On introduit une petite quantité de grains d'amidon extraits dans une solution d'iode (0,2% I_2 + 2% KI). Une goutte du mélange est introduite entre la lame et la lamelle du microscope optique en lumière polarisée, muni d'un appareil photo numérique (Canon Power Shot A70) permettant la prise des photos des grains.

VII.3 Hydrolyse des amidons de pomme de terre locale extraits par l' α -amylase libre et immobilisée

Une solution de substrat à 10% est préparée par dissolution de l'amidon sous reflux à 105°C dans un bain d'huile sous agitation. Après gélatinisation et refroidissement, des dilutions sont effectuées pour obtenir des solutions de concentrations (0.1%-5%). 10mL de chaque solution à 50°C sont ajoutés à 10mL d'une solution phosphate (pH 6) à 50°C en

présence de l'enzyme libre (12 U/ml) ou immobilisée (0,35 g de perles d'alginate greffé). La réaction est laissée pendant 2 h sous agitation. Au cours de la réaction d'hydrolyse, des échantillons sont pipetés avec une micropipette. Le taux d'hydrolyse est estimé par le calcul de la quantité des sucres réducteurs libérés, mesurés par la méthode Nelson-Somogyi (voir II.2.3). La concentration des sucres réducteurs est calculée par l'équation (VII.5).

$$C_{\text{sucres}} = \frac{DO}{0.0033} \times f \times M_{\text{glucose}} \times 10^{-6} \text{ en g.l}^{-1} \quad (\text{VII.5})$$

Avec :

D.O : Densité optique de l'échantillon traité et dilué

f : Facteur de dilution factor pour chaque échantillon

M_{glucose} : Masse molaire du glucose

et 0,0033 pente de la courbe d'étalonnage obtenue avec le glucose (Chap.III)

VII.4 Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme libre et immobilisée sur l'alginate

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme libre et immobilisées, sont déterminés par les vitesses initiales des réactions d'hydrolyse des solutions d'amidons à différentes concentrations (0,1–5,0% m/v), utilisant l'équation de Lineweaver- Burk (équation VI.9 Annexe.II)

VII.5 Résultats

VII.5.1 L'Isolation et la caractérisation partielle de l'amidon

Le tableau VII.1 donne les résultats des expériences d'isolation des amidons à partir d'une prise d'essai de pomme de terre égale environ à 200g.

L'isolation de l'amidon par la méthode bisulfite donne un rendement élevé comparé à la méthode alcaline (56,1% devant 38,9% par matière première sèche). Cependant, l'extrait d'amidon obtenu par la méthode alcaline est plus pur (99,31% d'amidon total contre 97,39%) tableau (tableauVII.1).

Tableau VII.1 Masse humide d'extrait (m), Amidon total (TS) et rendement d'extraction (R_{EX}) d'amidon par matière sèche en fonction des méthodes d'extraction (pour 50g de matière sèche de pomme de terre).

	m(g)	TS%	H%	R_{EX}%
Méthode alcaline	23,0	99,31	14,77	38,9
Méthode bisulfite	33,8	97,39	14,85	56,1

VII.5.2 La morphologie des grains d'amidon

Les photos microscopiques des grains d'amidon extraits par les deux méthodes (SO_2 et NaOH) montrent que les grains d'amidon ont une forme ellipsoïde conforme à la littérature. Les longueurs des grains se situent entre 10 et 90 μm pour les amidons extraits par la méthode bisulfite et entre 20 et 70 μm pour les amidons extraits par la méthode NaOH. Cependant nous remarquons que la croix de malte est plus claire dans les grains extraits par la méthode bisulfite indiquant ainsi que ce procédé n'affecte pas la nativité des grains d'amidon à l'opposé de la méthode alcaline.

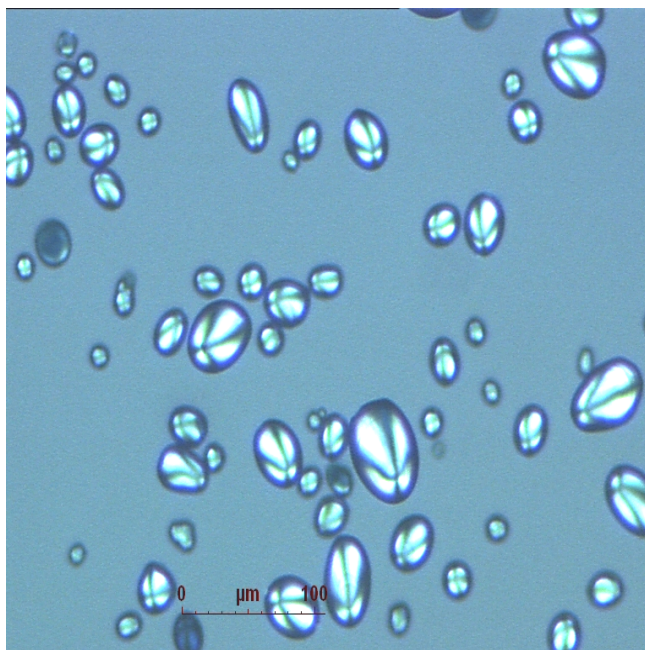


Figure VII.2. Photo microscopique des grains d'amidon de pomme de terre (SPUNTA 2005) extraits par la méthode bisulfite

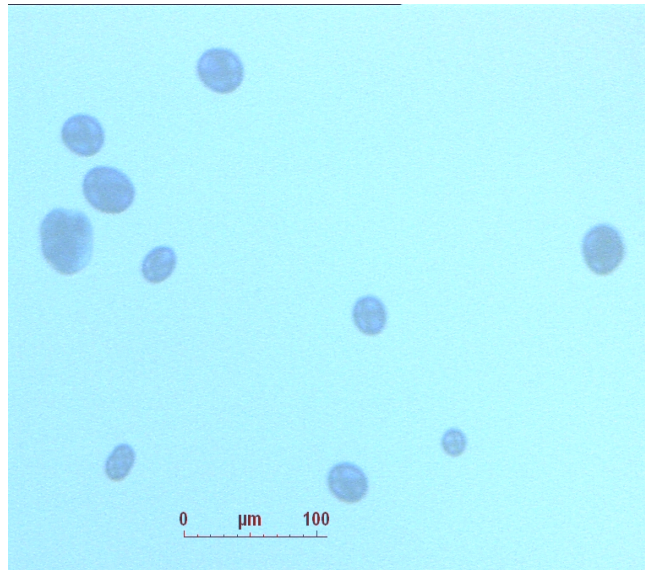


Figure VII.3 Photo microscopique des grains d'amidon de pomme de terre (SPUNTA 2005) extrait par la méthode NaOH.

VII.5.3 Hydrolyse des amidons et mesure des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme libre et immobilisée sur l'alginate

Les courbes cinétiques (figures de VII.4 à VII.15) montrent que dans un réacteur agité l'amylase libre ou immobilisée agit sur les amidons de pomme de terre locale extraits par les deux méthodes (alcaline et bisulfite) selon le modèle de Michaelis-Menten; ce qui montre que le phénomène de diffusion n'est pas limitant et que la distribution du substrat entre la phase liquide et la matrice est un phénomène déterminant, ce qui est en accord avec la littérature dans le cas d'un substrat de masse moléculaire élevée [80].

Les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} (tableau VII.2) calculées à partir des courbes de Lineweaver-Burk (figures VII.6, VII.9, VII.12 et VII.15) dépendent du processus d'extraction et de l'état de l'enzyme. Les valeurs de k_m augmentent avec la diminution de V_{max} (tableau VII.2) avec l'immobilisation chimique de l'amylase sur l'alginate ce qui est conforme avec la littérature [81,82]. Ceci peut être expliqué par la diminution de l'activité de l'enzyme après immobilisation [80]. Cependant, les valeurs de V_{max} et K_m , qui dépendent des deux méthodes d'extraction, varient de la même manière par rapport aux deux méthodes d'extraction, indépendamment de l'état de l'enzyme; V_{max} et k_m sont plus grands pour les amidons extraits par la méthode alcaline; ceci peut être interprété par la formation d'un complexe enzyme-substrat à faible réactivité pour les amidons extraits par la méthode bisulfite comparés à ceux extraits par la méthode alcaline.

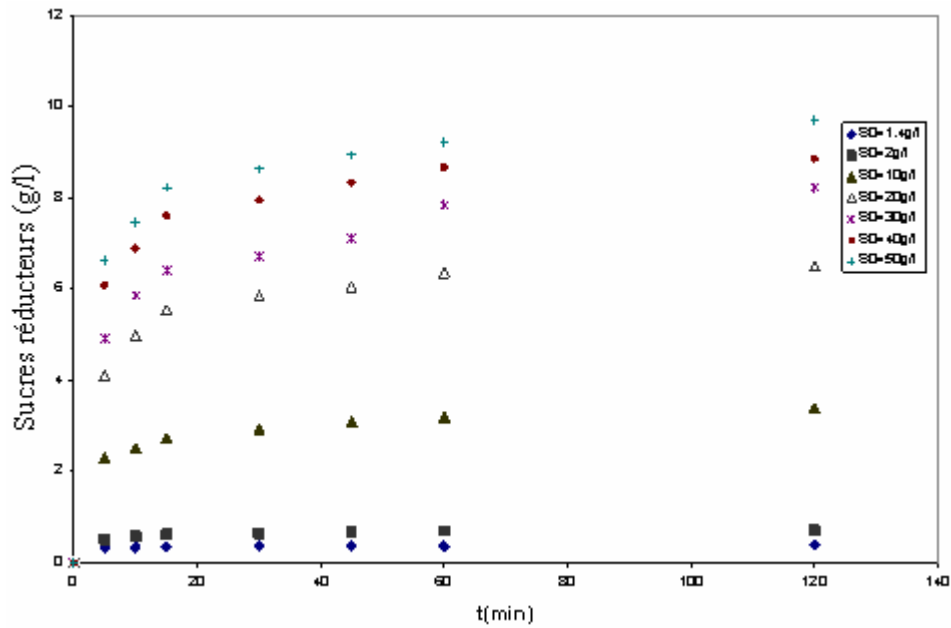


Figure VII.4 Courbes cinétiques d'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* libre- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.

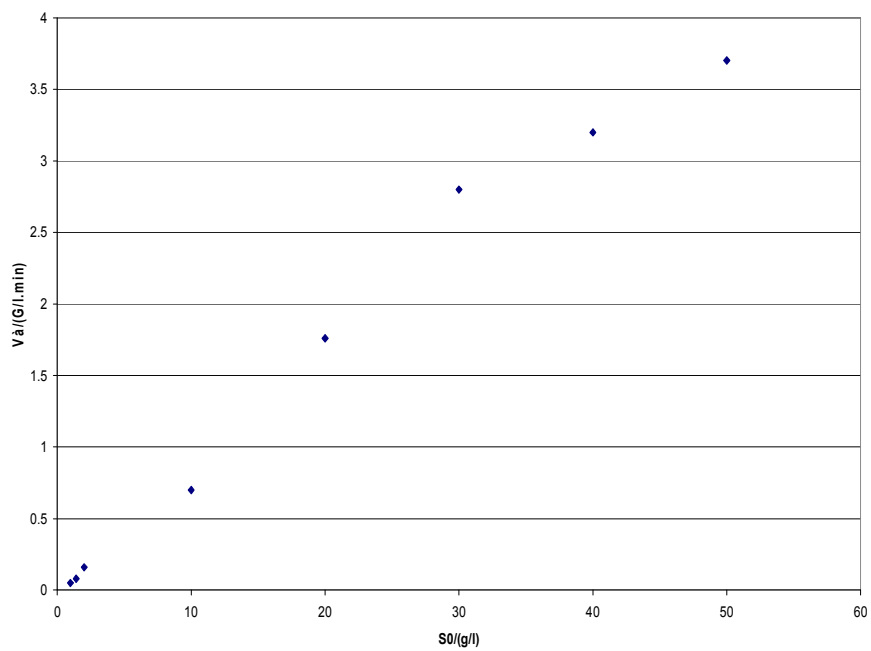


Figure VII.5 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'El Oued (sud d'Algerie) extrait par SO_2 à pH 3 et $t=2h$ par l' α -amylase d'*Aspergillus Oryzae* 6U/ml à 50°C

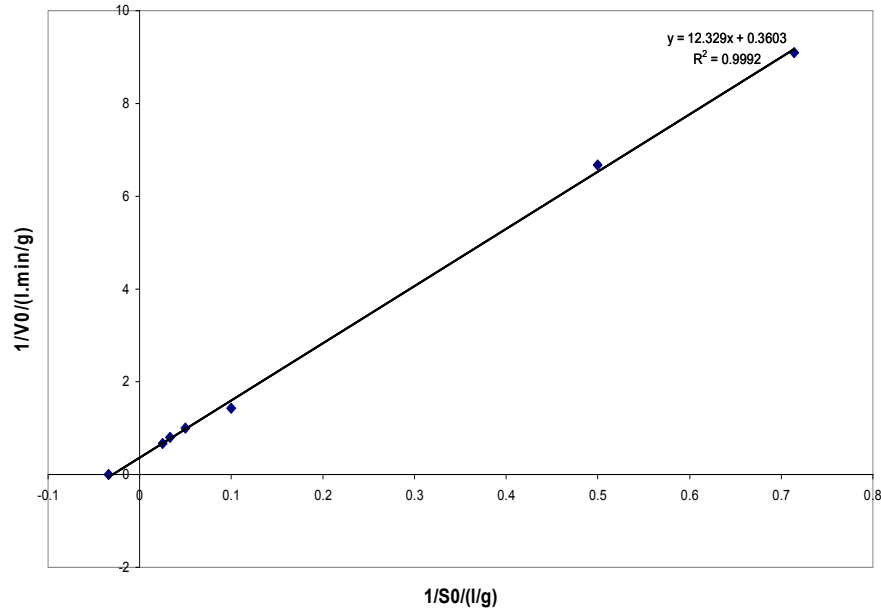


Figure VII.6 Courbe de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* libre pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.

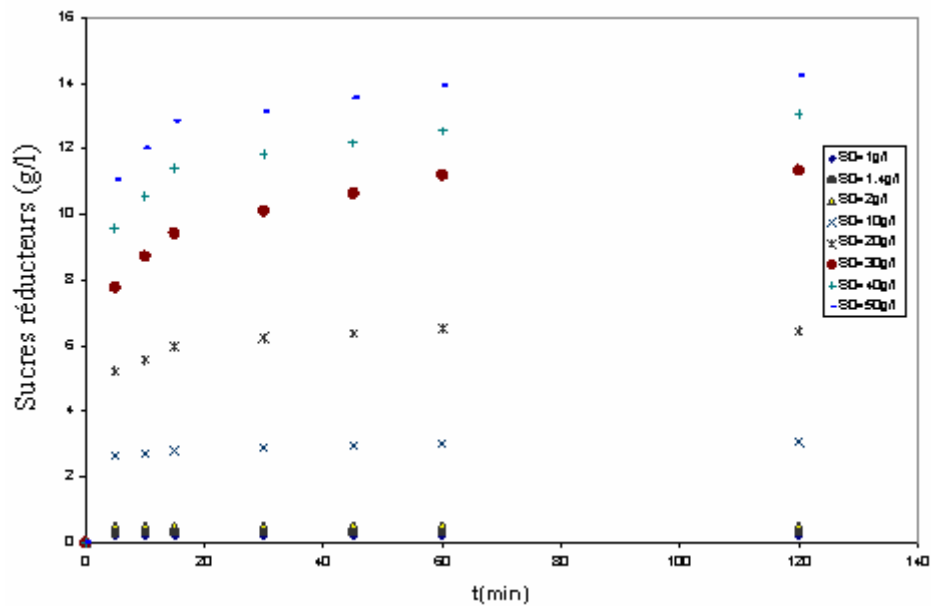


Figure VII.7 Courbes cinétiques de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* libre- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.

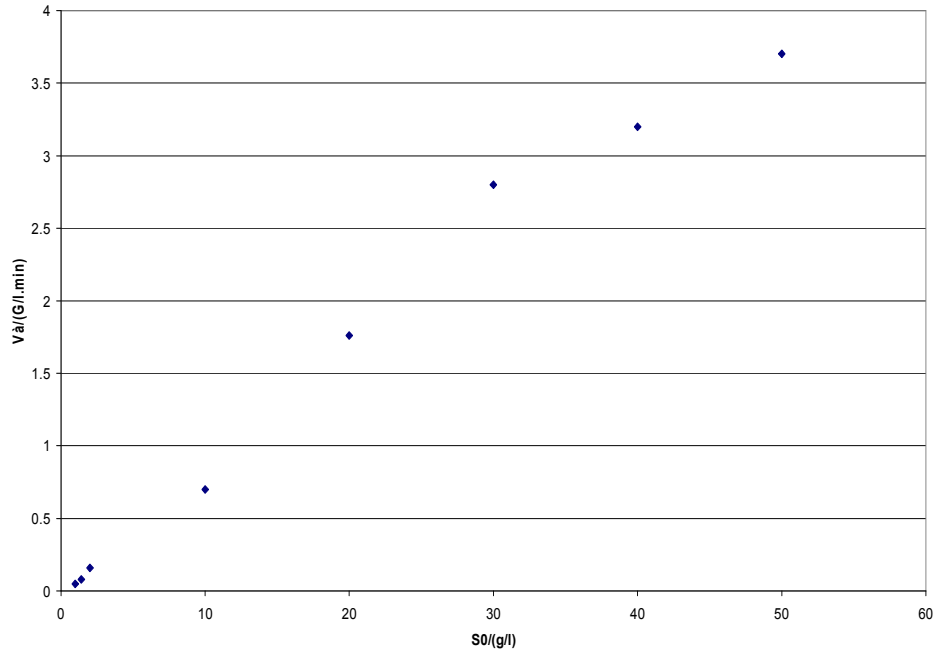


Figure VII.8 V₀ en fonction de S₀ de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'El Oued (sud d'Algérie) extrait par NaOH C=0,30% et t=24h par l' α -amylase d'Aspergillus Oryzae 6U/ml à pH=6 et 50°C.

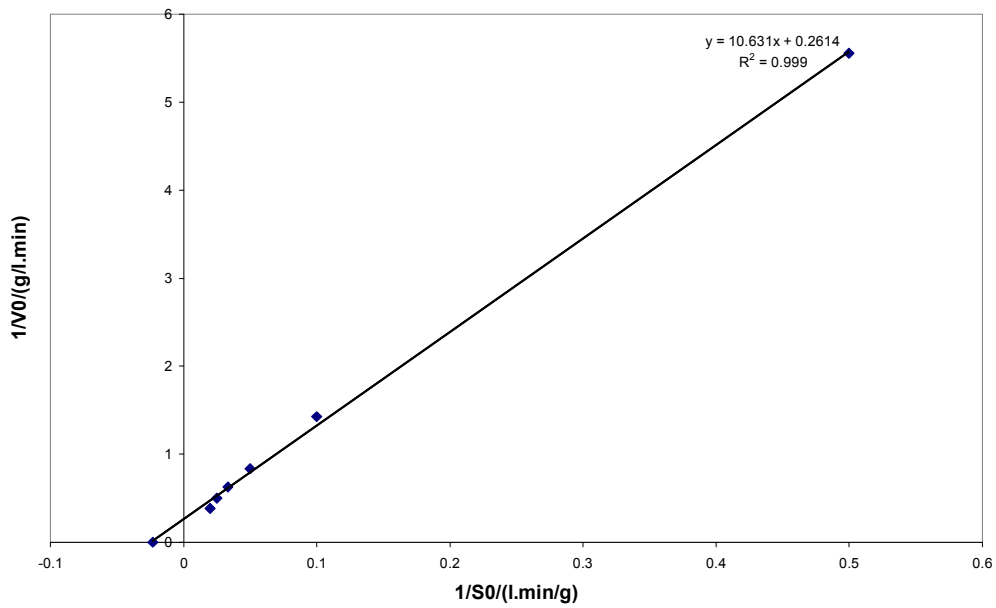


Figure VII.9 Courbe de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d'Aspergillus oryzae libre pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C.

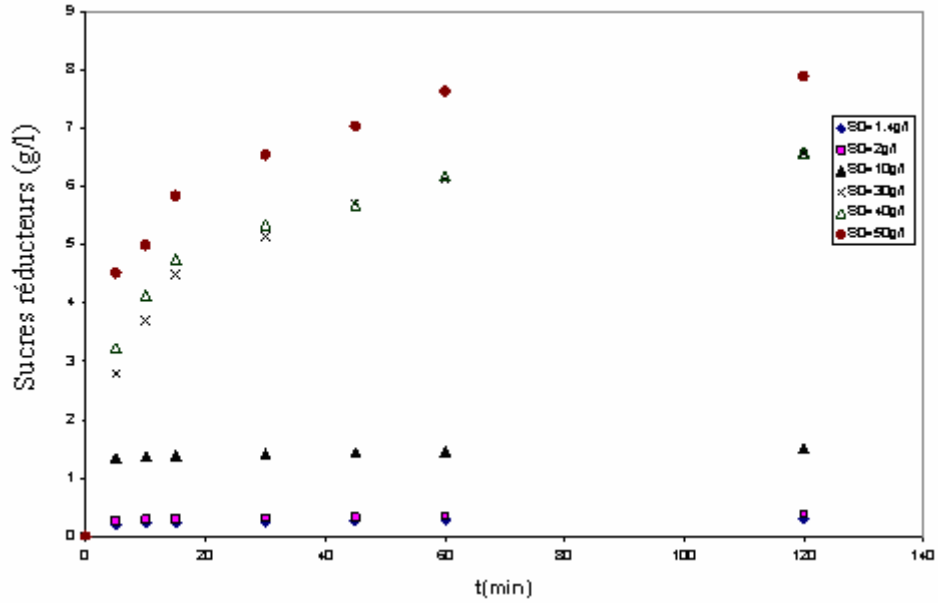


Figure VII.10 Courbes cinétiques de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase from *Aspergillus oryzae* immobilisée- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 and 50°C.

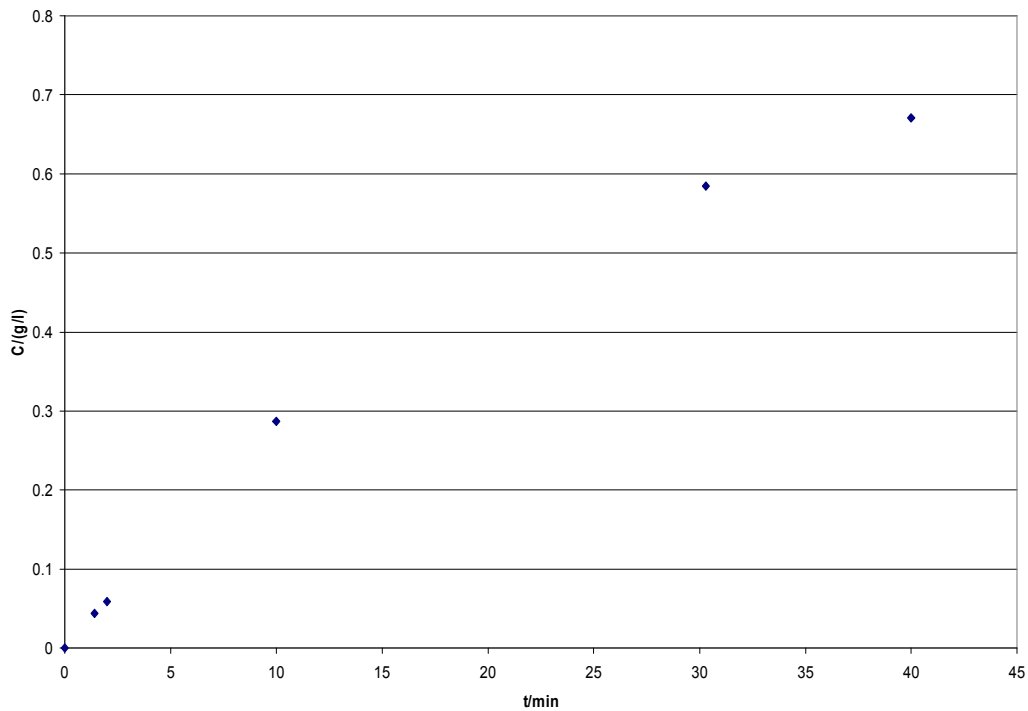


Figure VII.11 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'El Oued (sud d'Algérie) extrait par SO_2 à pH 3 et t=2h par l' α -amylase d'*Aspergillus Oryzae* immobilisée 6U/ml, pH=6 et à 50°C

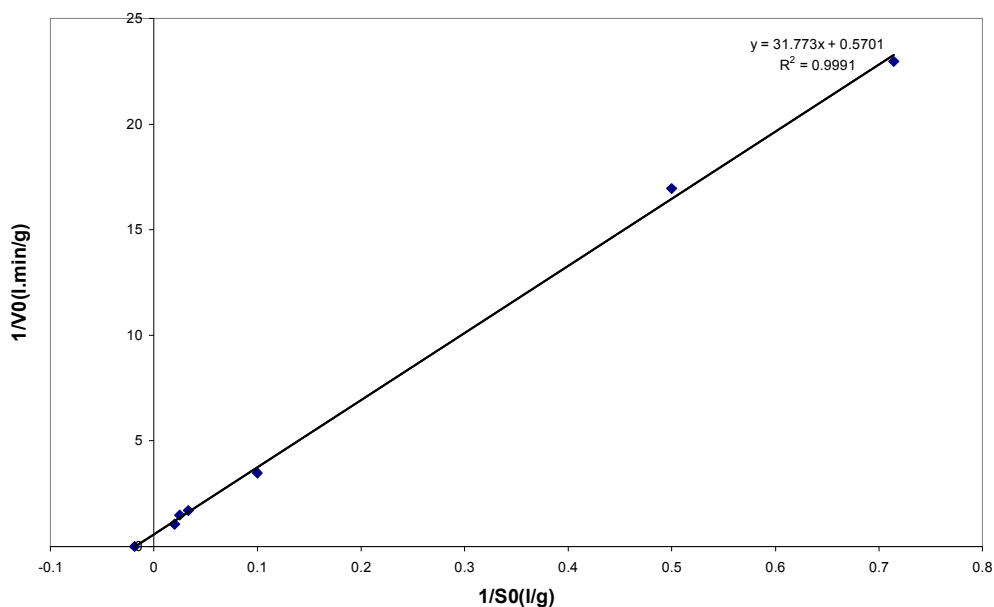


Figure VII.12 Courbe de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode bisulfite par l' α -amylase d' *Aspergillus oryzae* immobilisée pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C

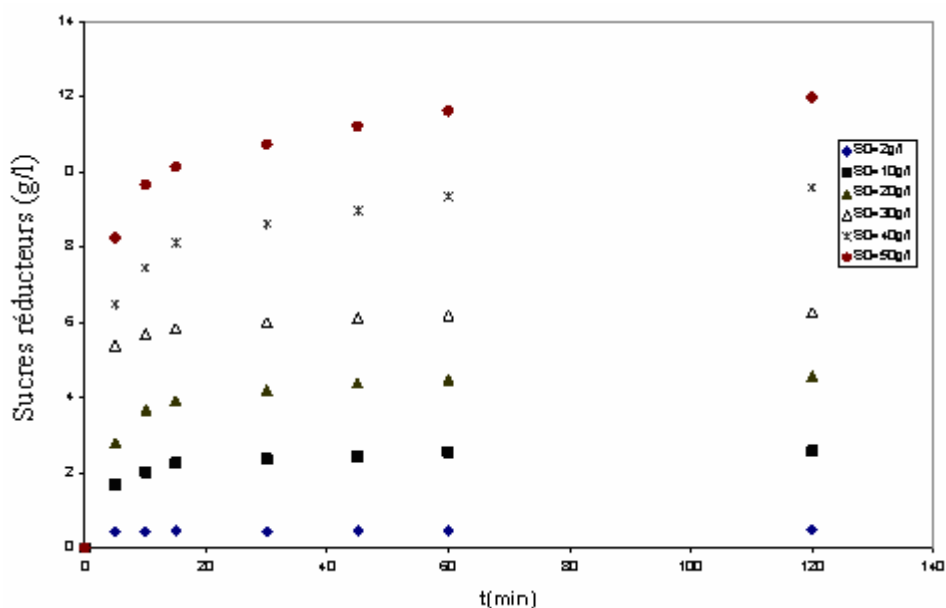


Figure VII.13 Courbes cinétiques de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d' *Aspergillus oryzae* immobilisée- effets des concentrations initiales des amidons pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et 50°C

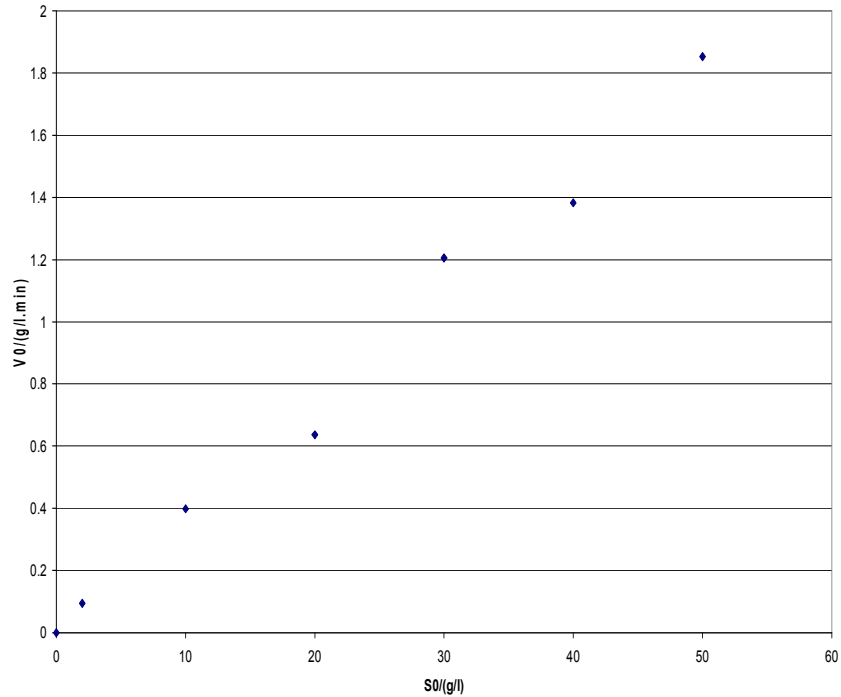


Figure VII.14 V_0 en fonction de S_0 de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre (Spunta) de la région d'El Oued (sud d'Algérie) extrait par NaOH C=0,30% et t=24h par l' α -amylase d'*Aspergillus Oryzae* immobilisée 6U/ml, pH=6 et à 50°C

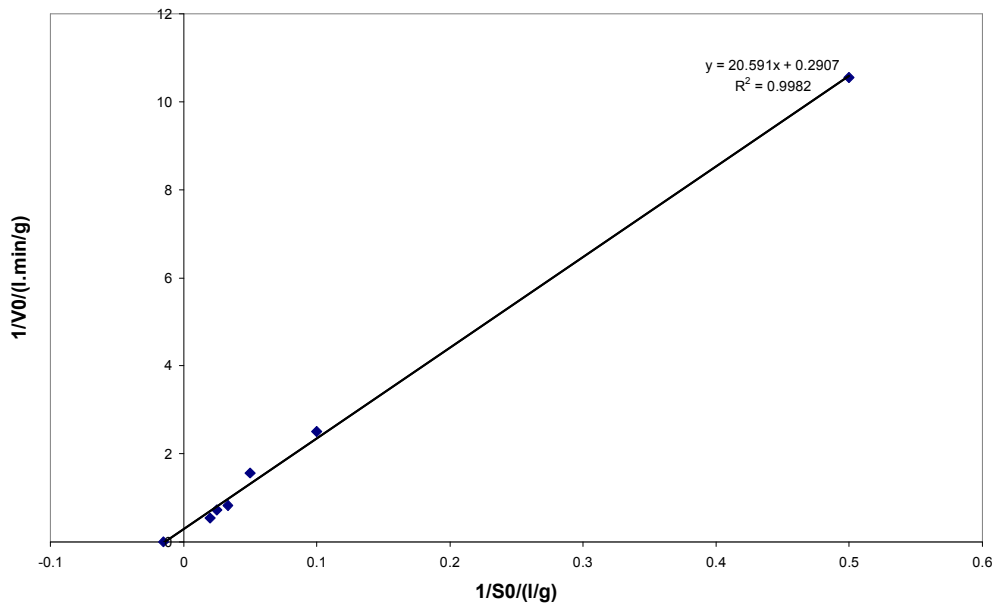


Figure VII.15 Courbe de Lineweaver-Burk des données de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par la méthode alcaline par l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* immobilisée pour une activité d'enzyme 6U/ml ,pH=6 et à 50°C

Tableau VII.2 Paramètres cinétiques (K_m and V_{max}) de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par les méthodes alcaline et bisulfite par l'enzyme libre et immobilisée

Méthode d'isolation		$V_{max}(g.l^{-1}.min^{-1})$	$K_m(g.l^{-1})$
Méthode alcaline	libre	3.8	40.7
	Immobilisée	3.4	70.8
Méthode bisulfite	libre	2.8	34.2
	Immobilisée	1.7	55.7

VII.6 Conclusions

Ces résultats nous permettent de faire les conclusions suivantes :

- Les rendements d'extraction des amidons dépendent des méthodes d'extraction ; la méthode bisulfite donne un meilleur rendement alors que la méthode alcaline donne une meilleure pureté en amidon.
- La méthode alcaline affecte la nativité des grains d'amidon extraits ce qui peut être interprété par une modification chimique partielle de ces amidons.
- L'immobilisation réduit l'activité catalytique de l'enzyme et l'affinité substrat-enzyme ; ceci peut être interprété par les phénomènes stériques et de diffusion dans les pores des perles.
- L'étude cinétique de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par les deux méthodes par l'enzyme libre ou immobilisée montre que cette cinétique obéit au modèle de Michaelis-Menten.
- Les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} dépendent des méthodes d'extraction et de l'état de l'enzyme.
- Les deux méthodes d'extraction donnent deux substrats de réactivités différentes vis-à-vis l' α -amylase de source *Aspergillus Oryzae*.
- Les amidons extraits avec une meilleure pureté se dégradent mieux par l' α -amylase de source *Aspergillus Oryzae*.

Références de la deuxième partie

- [1] French D., *Organization of Starch Granules*. (1984). In: *Starch: Chemistry and Technology*. 2nd Ed. Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F., Academic press, Orlando, 184-274.
- [2] Williams, J.M. (1968). *Starch and its Derivatives*. Ed. Radley J.A., Chapman and Hall.
- [3] Schoh T.J. (1945). *Carbohydrate Chemistry*. Ed. Pigman W.W., Wolfrom M.L., Vol.1, Academic Press, New-York, 247-277.
- [4] French, D. (1972). Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *Denpun Kagaku*, 19, 8-25.
- [5] Seib, P.A. (1994). Wheat starch: isolation, structure and properties. *Oyo tshitsu.Kagulu*, 41, 49-69.
- [6] Banks, W., Greenwood C.T. (1975). *Starch and its Components*. Ed. Banks W., Greenwood C.T., Edinburg Univ. Press.
- [7] Paton, D. (1979). Oat starch: Some recent developments. *Starch/Stärke*, 31, 184
- [8] Colonna, P., & Mercier, C. (1984). Macromolecular Structure of Wrinkled and Smooth Pea Starch Components. *Carbohydr. Res*, 126, 233-247, .
- [9] Wang, L.Z., & White, P.J. (1994). Structure and properties of amylose, amylopectin and intermediate materials of oat starches. *Cereal Chemistry*, 71, 263-268.
- [10] Tester, R.F., Morrison, W.R., Gidley, M.J., Kirkland, M., & Karkalas, J. (1994). Properties of damaged starch granule. III. Microscopy and particle size analysis of undamaged granules and remnants. *Journal of Cereal Science*, 20, 59-67.
- [11] De Baets, S., Vandamme, E. J., and Steinbüchel, A. (2002). Biopolymers Biology Chemistry Biotechnology Applications. Polysaccharides II. Polysaccharides from Eucariotes. WILEY.VCH Verlag GmbH Weinheim, Volume 6, pp 216-240.
- [12] Biliaderis, C.G. (1998). Structures and phase transitions of starch polymers. In: Walter, R.H, (Eds), Polysaccharides Association structures in Foods. Marcel Dekker, New York, pp, 57-168
- [13] Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Balls, S. (1998). Starch granule: structure and Biosynthesis . *International journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- [14] Morrison, W.R., & Karkalas, T. (1990). Starch. In: Dey, P.M, (Eds), Methods in Plant Biochemistry, Vol.2. Academic Press, London, pp, 323-352.
- [15] Ring S.G., I'Anson K.J., & Morris V.J. (1985). Static and Dynamic High Scattering Studies of Amylose Solutions. *Macromol*, 18, 182-188.

- [16] John M., Schmidt J., & Kneifel H. (1983). Iodine Maltosaccharine Complexes: Relation between Chain Length and Colour. *Carbohydr. Res*, 119, 254-257.
- [17] Banks, W., & Greenwood C.T. (1971). The Conformation of Amylose in Dilute Solution. *Starch*, 23,300-314.
- [18] Huang, J., Schol, H.A., Jin, Z., and Sulman, E. (2007). Characterization of differently sized granule fraction of yellow pea, cowpea and chickpea starches after modification with acetic anhydride and vinyl acetate. *Carbohydrate Polymers*, 67, 11-20.
- [19] Whistler, R.L., & Daniel, J.R. (1984). Molecular Structure of Starch. In: *Starch Chemistry and Technology*. 2nd Ed. Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F., Academic press, Orlando, p. 153-182.
- [20] Blanshard, J.M.V. (1997). Starch: What Starch is, Structure of the Granule, Comparison Properties of Wheat, Corn and Potato. Seminar Practical Extrusion Workshop: Process conditions. Nottingham University.
- [21] Robin, J.P., Mercier, C., Charbonniere, R., & Guilbot A. (1974). Lintnerized Starches. Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starch. *Cereal Chem*, 51, 389-406.
- [22] Robin J.P. (1976). Comportement du grain d'amidon à l'hydrolyse acide ménagée. Etude physico-chimique et enzymatique de la fraction insoluble. Contribution à la connaissance de la structure de l'amylopectine. Thèse, Université de Paris VI, 1976.
- [23] Bertoft, E. (2004). On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydrate Polymers*, 57, 211-224.
- [24] Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 141, 295-306.
- [25] Hizukuri, S. & Maehara, Y. (1990). Fine structure of wheat amylopectin: the model of the A to B chain binding. *Carbohydrate Polymers*, 206, 145-159.
- [26] Seib, P.A. 1997. Principles of preparing of food-grade modified starches. In *Proceeding of the 3rd CAFST International Symposium on granular and molecular structure of starch*, 117-163.
- [27] Eliasson, A.C. (2004). starch in food structure, function and applications.. CRC Press Boca Raton, Boston New York Washington,DC, Woodhead publishing limited , Cambridge, England)
- [28] Morrison, W.R (1985). Lipids in cereal starches. In :Hill, R.D. Munck, L, (Eds), *New approaches to research on cereal carbohydrates*, Elsevier, Amsterdam, pp,61-70.
- [29] Morrison, W.R (1988). Lipids in cereal starches: a review. *Journal of cereal science*, 8, 1-15.

- [30] Morrison, W.R (1993). Cereal starch granule developpement and composition. In : shewry, P.R, Stobart, R., (Eds), Seed Storage Compounds : Biosynthesis , Interaction and Manipulation, Oxford Science Publications, Oxford, pp 175-190.
- [31] Morrison, W.R (1995). Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World*, 40, 437-446.
- [32] Le Meur, M. (1984). L'amidon de maïs: comportement rhéologique, rôle des lipids en technologie. Thèse, Université de Nantes.
- [33] Duprat, F., Gallant D., Guilbot A., Mercier C., & Robin J.P., *L'amidon*. In: Les polymères végétaux. Ed. Gauthier B.M. Villars, Bordas, p. 176-231, 1980.
- [34] Seguchi, M., & Yamada Y. (1989). Study of Proteins Extracted from the Surface of Wheat Starch Granules with Sodium Dodecyl Sulfate. *Cereal Chem*, 66,193-196.
- [35] Palasinski, M. (1980). Über Die Phosphorsäure der Kartoffelstärke. *Starch*, 32, 405-408.
- [36] Muhrbeck, P., & Tellier C. (1991). Determination of the Phosphorylation of Starch from Native Potato Varieties by P NMR. *Starch*, 43 , 23-27.
- [37] BeMiller, J.N. (1991). Starch, Encyclopaedia of Food Science and Technology. Ed. Hui Y.H., Wiley Interscience, 2418-2424.
- [38] Blanshard, J.M.V. (1987). Starch Granules *Structure and Function: A Physicochemical Approach*. In : Critical Reports on Applied Chemistry. Starch: Properties and Potential. Ed. Gilliard T. New-York, 13, 16-54.
- [39] Gallant, D.J., & Guilbot, A. (1969). Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparations en microscopie électronique. *Starch*, 21, 156-163,.
- [40] Gallant, D.J., & Guilbot, A. (1973). Développement des connaissances sur l'ultrastructure du grain d'amidon. I. L'amidon de blé. *Starch*, 25, 335-342.
- [41] Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh, S.N., & Singh, G.B. (2003). Morphological, Thermal and Rheological Properties of Starches from Different Botanical Sources. *Food Chemistry*, 81, p. 219-231.
- [42] Jenkins, P.J., & Donald, A.M. (1995). The Influence of Amylose on Starch Granule Structure. *Int J Biol Macromol.*, 17,. 315-321.
- [43]Zobel, H.F. (1988). Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch*,40 ,44-50.
- [44]Krog, N. (1971). Amylose Complexing Effect of Food Grade Emulsifiers. *Starch*, 23, 206-210.
- [45] Duprat, F., .Mercier, A.C., & Robin, J.P. (1984). les polymères végétaux, , Collection Biochimie appliquée.

- [46] Whistler, R.L, & Pashall, E.F. (1967). Starch : chemistry and technology, , VolumeII, ,Academic Press, New york and london.
- [47] J-Xie, X., Seib,P.A (2002).Laboratory wet milling of grain sorghum abbreviated steeping to give two products. *Starch/stärke*, 54, 169-178.
- [48] Eduvyes, E., Sira, P., Lares, M., & Amar Z. (2004), a laboratory scale method for isolation of starch from pigmented sorghum..*Journal of food engineering*,64,515-519.
- [49] Pérez, O.E., Haros, M., & Suarez, C.(2001),Corn steeping : influence of time and lactic acid on isolation and thermal properties of starch, *Journal of food engineering*,48,251-256.
- [50] Ver Wimp, T.V., Vande Putte, G.E., Marsant, K., & Delcour, J.A.(2004), Isolation and characterisation of rye starch. *journal of cereal science*,39,85-90.
- [51] Vasanthan, T., Bergthaller, W., Driedger, D., Yeung, J., & Sporus, P..(1999), Starch from Alberta potatos: wet-milling and some physico chemical properties
- [52] Trust, B., and Harold, C. (2001). Genetic and environmental variation sorghum starch. *Journal of cereal science*,34,261-268,
- [53] Choi, H., Kim, W., Shin, M.(2004). Properties of corean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches.
- [54] Waduge, R.N., Hoover, R., Vasanthan,, T., Guo, J., & Li., J. (2005).Effect of annealing the structure and physico chemical properties of barley starches of varying amylose content. *Food Research International*, article in press.
- [55] lumdubwang, N., & Seib. (2002). Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flower. *Journal of Cereal Science*,31,63-74.
- [55] Wang, L., & wang, Y.(2004). Rice starch isolation by neutral protease and high- intensity *Ultrasound Journal of cereal Science*, 39,291-296.
- [56] Baldwin, P. M.(2001), Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review, *Starch/starke*, 53,475-503.
- [57]. Shenk R. & Hebeda. (1992). Starch hydrolysis products world wide technology: production and applications VCH Publishers New York 62
- [58]Hil, R. D., McGregory, A. W. 1988. In: Y.Pomeranz , Advances in cereal science and technology (Vol.9), pp, 217-261. St Paul, USA: AACC.
- [59] Marc J.E.C. van der Maarel, Bart van der Veen , Joost C.M. Uitdehaag , Hans Leemhuis , L. Dijkhuizen . (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes ofthe α -amylase family. Review article. *Journal of Biotechnology* ,94, 137–155
- [60] Muralikrishna, G., Nirmala, M., Muralikrishnaa, G., & M. Nirmala. (2005) Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers* ,60, 163–173.

- [61] Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). The concept of α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosc Bioeng* , 87 , 557-565.
- [62] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V.Y., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. App Biochem*, 31, 135-152.
- [63] Henrissat , B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280, 309-324.
- [64] Fujii, M., & Kawamura, Y. (1985). Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis. *Starch.Biotechnology and Bioengineering* , 27,260-265.
- [65] Park, J.T., & Rollings, J.E. (1994). Effects of branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I.Amylose/Amylopectin α -amylase. *Biotechnology and bioengineering*, 44,792-800.
- [66] Karakatsanis, A., & Liakoupoulou-Kiriakide, Thessaloniki., M. (1998). Comparative study of hydrolysis of various starches by alpha-amylase and glucoamylase in PEG-dextran and PEG-Substrate aqueous two phase systems. *Starch/Stark*, 8, 349-353.
- [67]SIMS, K.A., & Munir Cheryan, M. (1992). Continuous production of glucose Syrup in an Ultrafiltration reactor. *Journal of Food Science*, 57, 163-166.
- [68] Gorinstein, S. (1993). Kinetic study during enzyme hydrolysis of potato And cassava starches . *Starch/stark*, 3,91-95.
- [69] Kumar, R. S. S., Vishwanath, K. S., Singh , S. A., & Rao, A.G.A. (2006). Entrapment of a-amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry* ,41, 2282–2288.
- [70] Hasirci, N., Aksoy,S., & Tunturk, H.(2006). Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase. *Reactive & Functional Polymers* , 66, 1546–1551.
- [71] Reshmi, R., Sanjay, G., & Sugunan, S. (2007). Immobilization of a-amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communications* ,8, 393–399
- [72] Kara , A., Osman, B , Handan Yavuz, H., Besirli, N., Denizl, A. (2005). Immobilization of a-amylase on Cu^{2+} chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole) matrix via adsorption. *Reactive & Functional Polymers* ,62, 61–68,
- [73] Changa, M.Y., & Juang, R.S. (2005). Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 75–82,
- [74] Hung, P. V., & Morita, N. (2005). Physicochemical properties and enzymatic digestibility of starch from edible-Canna (*Canna edulis*) grown in Vietnam. *Carbohydrate Polymer*, 61, 314-321.

- [75] Yang, P., & Seib, P. A. (1996). Wet milling of grain sorghum using a short period. *Cereal Chem*, 73, 751-755.
- [76] Goni, I., Garcia-Alosa, A., Saura-Calixto, F. (1997). Starch Hydrolysis Procedure to Estimate Glycemic Index. *Nutrition Research*. 17 , 427-437.
- [77] Rosin, P. M., Lajolo, F. M., & Menezes. E.W. (2002). Measurement and Characterization of Dietary Starches. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 367-377.
- [78] Hu, P., Zhao, H., Duan, Z., Linlin, Z., Wu, D. (2004). Starch Digestibility and the Estimated Glycemic Score of Different Type of Rice Differing in Amylose Contents. *Journal of Cereal Science*. 40: 231-237.
- [79] Southgate, D. A. T. (1976). Determination of food carbohydrates (pp.105-106).288 *Applied science publishers LTD*. London.
- [80] Berezin, I. V., Antonov, V. K and. Martinek, K.-M (editors), (1976). physico-chemical aspects of immobilized enzymes, In *Immobilized Enzymes* [in. Russian], Vol. 2(1st ed)(pp.5-108), Moscow State University, Moscow
- [81] Hasirci, N., Aksoy, S., & Turturk, H. (2006)). Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase. *Reactive & Functional Polymers*, 66,1546–1551.
- [82] Kumar, R. S. S., Vishwanath, K. S., Singh, S. A., & Rao, A. G. A. (2006). Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry*, 41, 2282–2288.

RESULTATS GENERAUX, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis d'élaborer un biocatalyseur sous forme de billes d'hydrogel après immobilisation de l' α -amylase de source *Aspergillus Oryzae* sur un polysaccharide biodégradable par séquestration et par voie chimique entre les fonctions amines de l'enzyme et la fonction carboxylique de l'alginate en présence de l'EDCI.

Les techniques d'analyse (TOC/TON et SEC/MALLS) et de purification (Ultrafiltration et lyophilisation), nous ont permis de proposer des modèles mathématiques pour l'évaluation de la quantité d'enzyme immobilisée.

L'étude de la variation du taux d'immobilisation physique en fonction des sources d'alginate, pH, concentrations en enzyme et en alginate a montré que, pour les alginates B (M/G=1,2, de source *Laminaria Digitata Algae*) et C (M/G=0,5, de source *Lessonia*), les concentrations en enzyme et en alginate de 3g/l et 10g/l respectivement donnent les meilleurs taux de fixation de l'amylase à un pH de 4,7 avec une valeur plus élevée pour l'alginate C (M/G=0,5) qui peut être expliquée par l'effet gélifiant de l'acide guluronique permettant ainsi un meilleur piégeage de l'enzyme. D'autre part l'augmentation du temps de contact défavorise la séquestration ce qui peut être interprété par la désorption de l'enzyme.

L'étude de la variation du taux d'immobilisation chimique en fonction du rapport entre le nombre de mole de l'EDCI et le nombre de mole du monomère de l'alginate anhydre (R), du rapport (M/G), la concentration en enzyme et le pH a été effectuée. Les résultats montrent que la diminution de (R) favorise la réaction d'immobilisation ; ceci peut être interprété par la diminution de la réaction parallèle de réarrangement de l'alginate activé par l'EDCI de la forme o-acylurea à la forme N-acylurea plus stable. La diminution de l'acide guluronique (G) favorise la réaction ; ceci diminue le phénomène de gélification et favorise le contact enzyme-alginate activé. La variation de la concentration d'enzyme affecte peu le taux d'immobilisation par rapport à l'alginate (A), et son augmentation le diminue considérablement par rapport à l'alginate (C), ceci peut être interprété par l'encombrement stérique (l'enzyme étant molécule volumineuse) en plus du phénomène de gélification qui augmente avec l'augmentation de l'acide guluronique (G). Enfin la diminution du pH (pH < 4,7) défavorise la réaction, bien que le pK_a des alginates est compris entre 3,2 et 4,2, car l'alginate est très visqueux à des pH très acide. Le rendement maximal pour cette série

d'expériences est observé pour la réaction (6) pour une concentration en enzyme 2g/l, pH=4,7, R=0,5, M/G=1,2 et une concentration en alginate de 18g/l.

Les essais d'hydrolyse des amidons industriels de blé, maïs et pomme de terre par l'amylase fixée physiquement et chimiquement montre qu'elle garde son activité et agit sur ces substrats différents d'une manière différente. Cependant les billes de biocatalyseur préparées après séquestration sont moins résistants à la température à l'opposé des billes préparées après immobilisation chimique qui restent sous forme de billes à des températures plus élevées à 50°C (température optimale de travail de l'enzyme), d'autre part le rendement d'hydrolyse des amidons industriels par les enzymes immobilisées chimiquement est plus important.

L'extraction de l'amidon de pomme de terre locale a été effectuée par les méthodes alcaline et bisulfite. La méthode bisulfite donne un rendement élevé comparé à la méthode alcaline (56.1% devant 38.9% par matière première sèche). Cependant, l'extrait d'amidon obtenu par la méthode alcaline est plus pur (99.31% d'amidon total contre 97.39%). Les photos microscopiques montrent que les grains d'amidon ont une forme ellipsoïde, et que le procédé bisulfite n'affecte pas la nativité des grains d'amidon (apparence claire de la croix de malt sous la lumière polarisée) à l'opposé de la méthode alcaline.

L'étude cinétique de l'hydrolyse des amidons de pomme de terre extraits par les deux méthodes par l'enzyme libre ou immobilisée montre que cette cinétique obéit au modèle de Michaelis-Menten. Les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} dépendent des méthodes d'extraction et de l'état de l'enzyme; la diminution de V_{max} montre que l'immobilisation réduit l'activité catalytique de l'enzyme et l'affinité substrat-enzyme; ceci peut être interprété par les phénomènes stériques et de diffusion dans les pores des perles. Les deux méthodes d'extraction donnent deux substrats de réactivités différentes vis-à-vis l' α -amylase de source *Aspergillus Oryzae*, avec une meilleur dégradation des amidons extraits par la méthode alcaline.

Ces résultats présentent une contribution importante dans le domaine d'immobilisation des enzymes d'une façon particulière (et/ou des protéines d'une façon générale) sur des polysaccharides fonctionnalisés, de part la technique expérimentale simple dans un milieu aqueux et de part les méthodes de quantification des enzymes immobilisées sur le support polysaccharidique qui se base sur des modèles mathématiques simples exprimant l'analyse élémentaire simple par l'analyse de l'azote et du carbone organiques totaux. Ce qui nous ouvre la porte à d'autres applications dans différents domaines industriels.

D'autre part nous avons montré que les procédés d'extraction différents donnent des substrats (amidons) de réactivités différentes par rapport à l'amylase de source *Aspergillus Oryzae*, reste à confirmer ces résultats par rapport à d'autre procédés, à d'autres enzymes et d'autres amidons (d'autres sources).

ANNEXE I

RAPPELS THEORIQUES DE LA DIFFUSION DE LA LUMIERE.

Dans une solution S illuminée par un faisceau incident monochromatique de longueur d'onde λ_0 , chaque particule se comporte comme un dipôle électrique et diffuse la lumière dans toutes les directions, de l'espace à la même fréquence que le faisceau incident (Figure AI-1).

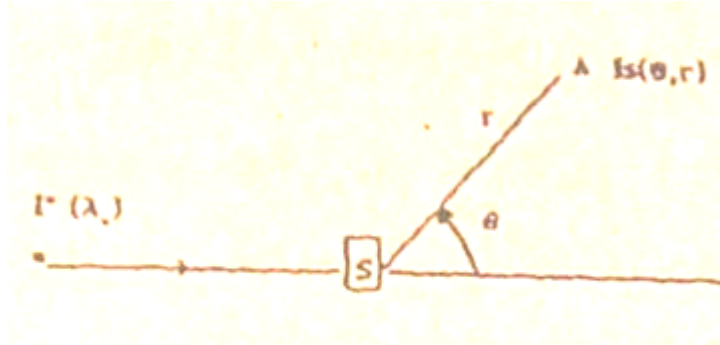


Figure AI-1 Schéma du principe de la diffusion de la lumière.

On définit cette intensité diffusée $I_s(\theta, r)$ par rapport à l'intensité incidente I^0 telle que :

$$I_s(\theta, r) = \frac{8\pi^2 N \alpha^2}{\lambda_0^4 r^2} I^0 (1 + \cos^2 \theta) \dots\dots (AI-1)$$

Avec :

θ : angle auquel on mesure l'intensité diffusée par rapport à l'intensité incidente.

r : distance (S A) entre les particules diffusantes et le point de mesure.

α : polarisabilité des particules en solution.

N : nombre de particules indépendantes par unité de volume tel que :

$$C = \frac{N}{Na} Mw \dots\dots\dots (AI-2)$$

Avec, N_a le nombre d'Avogadro, C la concentration de la solution et Mw la masse moléculaire moyenne en poids.

L'intensité mesurée résulte en fait de la somme de l'intensité diffusée par le solvant ($I_{SOLV}(\theta/r)$) et par les particules ($I(\theta, r)$) dans le volume diffusant de sorte que :

$$\Delta I(\theta, r) = I_s(\theta, r) - I_{SOLV}(\theta, r) \dots\dots\dots (AI-3)$$

Cette intensité étant dépendante de I^0 et de r , on définit alors le rapport de Rayleigh (ΔR_θ)

$$\Delta R_\theta = \Delta I(\theta, r) \frac{r^2}{I^0} \dots\dots\dots (AI-4)$$

$$\Delta R_{\theta} = \frac{8\pi^2 N^2 \alpha^2}{\lambda_0^4} (1 + \cos^2 \theta) \dots\dots\dots(\text{AI-5})$$

On montre que la polarisabilité (α) est une fonction de l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc), et de l'indice de réfraction du solvant (n_0), ainsi :

$$N.\alpha^2 = \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 n_0^2 \frac{CMw}{4\pi^2 Na} \dots\dots\dots(\text{AI-6})$$

L'expression du rapport de Rayleigh devient alors :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 Na} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 CMw(1 + \cos^2 \theta) \dots\dots\dots(\text{AI-7})$$

La plupart des appareils fonctionnent en lumière verticalement polarisée (sources laser). La contribution à l'intensité diffusée de la composante horizontale n'existe donc pas. Ainsi,

l'éclairement $e_0 = \frac{I^0}{r^2}$ est divisé par 2 et la relation AI-7 devient :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 Na} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 CMw \dots\dots\dots(\text{AI-8})$$

Cette relation idéalisée pour des solutions très diluées dans lesquelles les particules diffusantes sont petites devant λ_0 et sont indépendantes les unes des autres ne peut pas s'appliquer aux polymères. La théorie des fluctuations (liées notamment aux fluctuations de la concentration du soluté) permet alors de prendre en compte les interférences entre les vibrations lumineuses des macromolécules en solution. Le rapport de Rayleigh intègre donc un nouveau terme en développement limite qui est fonction de la concentration en polymère :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 Na} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \frac{C}{\frac{1}{Mw} + 2A_2C + 3A_3C^2 + \dots} \dots\dots\dots(\text{AI-9})$$

Où A_2 et A_3 , sont respectivement les second et troisième coefficients du viriel. On simplifie cette expression en intégrant les paramètres fixes dans une constante, ainsi :

$$\frac{KC}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{Mw} + 2A_2C + 3A_3C^2 + \dots \dots\dots\dots(\text{AI-10})$$

Avec

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^2 Na} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \dots\dots\dots (\text{AI-11})$$

A dilution infinie, le terme en A_3 du développement du Viriel est négligeable et cette relation permet donc d'accéder à Mw et à A_2 .

Pour autant cette expression n'est vraie que pour des particules qui diffusent la lumière dans tout l'espace de façon identique (molécules optiquement isotropes). On considère généralement qu'une particule présente cette propriété optique lorsque son rayon de giration est au plus égal à $\lambda_0/20$. Les macromolécules sont la plupart du temps de dimension bien trop importante au regard des longueurs d'onde utilisées et diffusent la lumière dans l'espace de façon anisotrope (Figure AI-2).

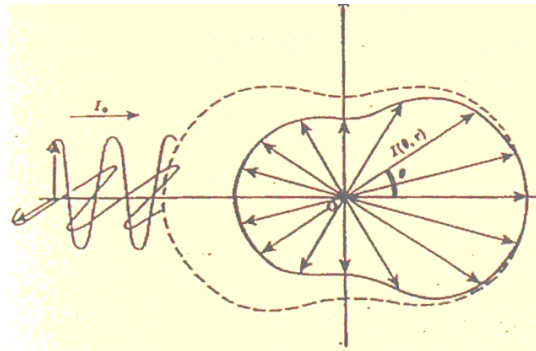


Figure AI-2 Diffusion anisotrope de la lumière.

Il est donc nécessaire de faire intervenir un facteur correctif, appelé aussi facteur de forme ($P(\theta)$), qui est fonction de l'angle et de la dimension de la particule (Rg) à la longueur d'onde considérée.

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} Rg^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \dots\dots\dots(\text{AI-12})$$

Ainsi l'équation générale II-11 devient :

$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \left(\frac{1}{Mw} + 2A_2C \right) \frac{1}{P(\theta)} \dots\dots\dots(\text{AI-13})$$

Aux faibles valeurs de θ , $1/P(\theta)$ peut s'écrire :

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} Rg^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \dots\dots\dots(\text{AI-14})$$

On obtient ainsi la relation générale de la diffusion de la lumière :

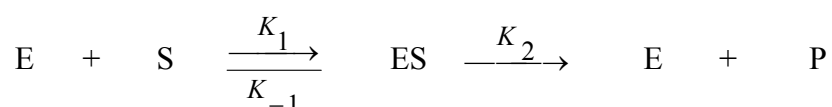
$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{Mw} + \left(\frac{16\pi^2 n_0^2 Rg^2}{3\lambda_0^2 Mw} \right) \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + 2A_2C + 3A_3C^2 + \dots\dots\dots(\text{AI-15})$$

ANNEXE II : LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Comme dans tout procédé catalytique, il est important, avant d'utiliser une enzyme dans une synthèse ou une analyse, d'en connaître le comportement cinétique. Un rappel sur la cinétique enzymatique est donné ci-dessous :

Équation de Michaelis-Menten

De façon simplifiée, nous allons admettre pour une réaction enzymatique le schéma réactionnel suivant :



Avec :

E enzyme libre

S substrat

ES complexe enzyme-substrat

P produit

La réaction est considérée au début, c'est-à-dire quand peu de produit P s'est accumulé, de façon à ce que la réaction en retour soit négligeable. De plus, on admet que l'on a atteint **l'état stationnaire**.

Soient [E], [S], [ES] et [P] les concentrations des différentes espèces au temps t . Si l'on admet que la concentration en enzyme est beaucoup plus petite que celle du substrat et que le taux d'avancement de la réaction est faible de façon à pouvoir négliger la variation de la concentration en substrat, la vitesse de la réaction est

$$V = \frac{d[P]}{dt} = K_2[ES] \quad (\text{AII.1})$$

L'état stationnaire implique que la concentration de ES reste constante pendant la mesure de la vitesse. Donc

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - K_2[ES] - K_{-1}[ES] = 0 \quad (\text{AII.2})$$

D'où

$$[E] = \left(\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \right) \frac{[ES]}{[S]} \quad (\text{AII.3})$$

Or la quantité totale d'enzyme $[E]_0$ ne varie pas. Donc :

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] \left[1 + \left(\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \right) \frac{1}{[S]} \right] \quad (\text{AII.4})$$

Et la vitesse devient

$$V = \frac{K_2[E]_0}{1 + \left(\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \right) \frac{1}{[S]}} \quad (\text{AII.5})$$

Ainsi l'étude de la vitesse en fonction de $[E]_0$ et de $[S]$ permet de déterminer k_2 et $(K_{-1} + K_2) / K_1$, mais pas k_1 et k_{-1} . Le coefficient $(K_{-1} + K_2) / K_1$ est appelé **constante de Michaelis** (K_m) et l'expression de la vitesse devient :

$$V = \frac{K_2[E]_0}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (\text{AII.6}) \quad (\text{équation de Michaelis-Menten})$$

Si la formation et la dissociation du complexe ES sont rapides par rapport à la transformation décrite par k_2 , la constante de Michaelis est voisine de la constante de dissociation du complexe enzyme substrat ES : $K_s = k_{-1} / k_1$; dans ce cas l'affinité de substrat vers l'enzyme est inversement proportionnelle à la valeur de la constante de Michaelis.

L'étude de l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse montre qu'à concentration élevée de S par rapport à K_m (condition *saturante*), la vitesse est constante. En effet, si $[S]$ est très grand par rapport à K_m , la vitesse devient :

$$V = K_2[E]_0 = V_{\max} \quad (\text{AII.7})$$

La moitié de cette **vitesse maximale** est atteinte quand $[S]$ est égal à K_m . L'équation de Michaelis-Menten devient alors l'**équation de Michaelis**

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (\text{AII.8})$$

La détermination des constantes cinétiques V_{\max} et K_m n'est pas simple à partir des données expérimentales et de l'équation de Michaelis-Menten. Aussi a-t-on transformé cette équation de façon à avoir une relation linéaire, par exemple la **relation de Lineweaver-Burk** :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (\text{AII.9})$$

Ainsi $1/V$ est une fonction linéaire de $1/[S]$ pour les réactions qui obéissent au modèle de Michaelis. Les valeurs de V_{\max} et de K_m sont déterminées graphiquement (FigVI.5). Les enzymes ont, en fait, un mécanisme de réaction plus complexe que celui décrit dans l'équation chimique précédente.

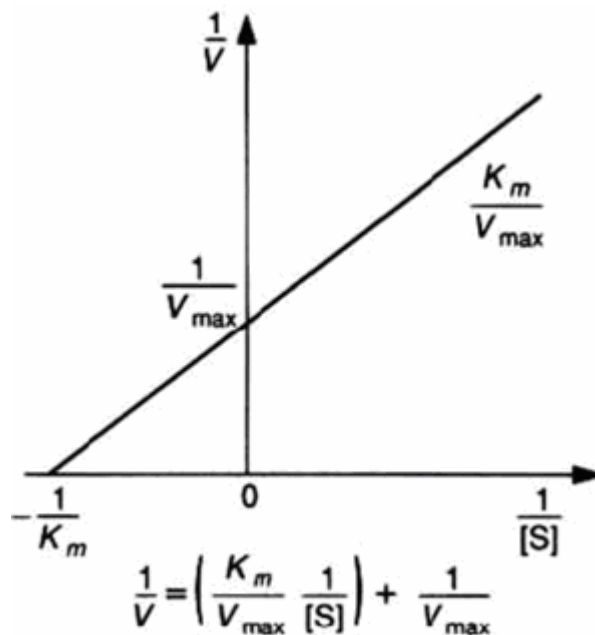


Figure AII.1 Représentation graphique de la relation de Lineweaver-Burk

ANNEXE III

• Réalisation de la droite d'étalonnage

On prépare 7 solutions de glucose pur à 99% aux concentrations : 15, 30, 45, 60, 75, 90 et 105 $\mu\text{mole/l}$ en prélevant respectivement à la micropipette 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 et 0,7 ml d'une solution mère de glucose à 150 $\mu\text{mole/L}$ et en complétant ces prises d'essai à 1 mL.

la solution mère de glucose à 150 $\mu\text{mole/L}$ est préparée en diluant deux fois une solution à 300 $\mu\text{mole/L}$. Cette dernière est préparée par dilution de 0,029 g de glucose dans 500 mL d'eau à l'aide d'une fiole jaugée.

• Mode opératoire de la méthode de SOMOGYI -NELSON

- Prendre 1 mL de solution à analyser
- Ajouter 1 mL de réactif D,
- Mettre au bain-marie à 100°C pendant 20 minutes,
- Ajouter 1 mL de réactif C,
- Laisser refroidir 10 minutes,
- Diluer à 5 mL
- Mesurer l'absorbance à 600nm.

• Préparation des solutions

Réactif A :

- 200 g de sulfate de sodium Na_2SO_4 ,
- 25 g de carbonate de sodium Na_2CO_3 ,
- 25 g de tartrate double de sodium et potassium $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$,
- 20 g de bicarbonate de sodium NaHCO_3 ,

Dissoudre les produits précédent dans 1 L d'eau distillée, en chauffant pour solubiliser si nécessaire.

Réactif B :

Dissoudre 30 g de sulfate de cuivre pentahydraté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 200 mL d'eau distillée contenant 4 gouttes d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré.

Réactif C :

Dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium $\text{MO}_7\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans 450 mL d'eau distillée.

Ajouter 21 mL d'acide sulfurique à 98%.

Ajouter 3 g d'arsenate de sodium $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissout dans 25 mL d'eau distillée.

Mettre au bain-marie à 55°C pendant 30 minutes.

Réactif D :

Mélanger 25 volume de solution A pour un volume de solution B

Conserver à l'abri de la lumière.

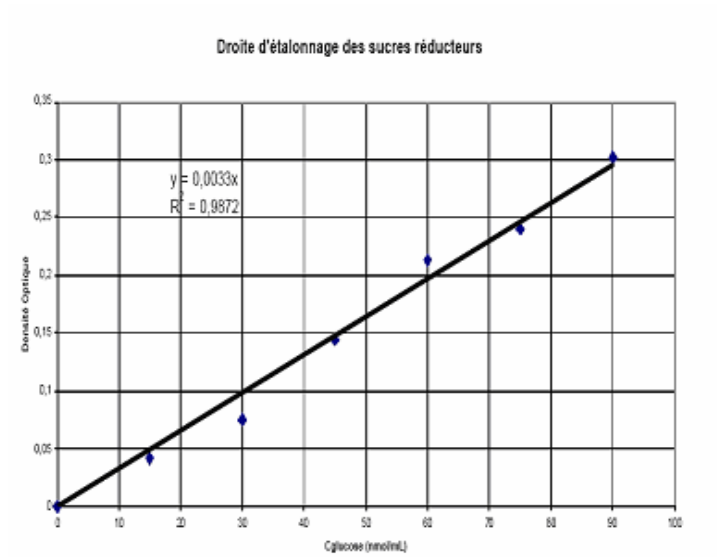


Figure AIII courbe d'étalonnage des sucres réducteurs

