

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT SCIENCES DE LA MATIERE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique appliquée

Par :

AMMI SAID Khaled

HOUACHE Omar Elfarouk

THEME

***Evaluation *in vitro* de l'index d'activité amylolytique des amidons
du blé dur (*Triticum turgidum*) et de l'orge (*Hordeum vulgare*)***

Soutenu publiquement le 20 Juin 2019 devant le jury composé de :

M.	Mohamed YOUSFI	Pr.	Président
M ^{me}	Chahrazed HAMIA	MCB	Examinatrice
M.	Rachid SOUILAH	MCB	Examineur
M.	Amar DJERIDANE	Pr.	Encadreur
M ^{lle}	Reguia MAHFOUDI	MCB	Co-encadreur

Année universitaire 2018-2019



Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail

A ma Mère

*Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.
Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la
reconnaissance que je te porte.*

A mon père,

*L'épaule solide et la personne la plus digne de mon estime et de
mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que
Dieu te préserve et te procure santé et longue vie.*

A mes frères : Hassan, Abdelouahab, Redwan

A ma sœur : Djamila

A ma grand-mère qui m'a aidée par sa prière

A toute ma grande famille

A mes enseignants chacun à son nom

*A mes meilleurs amis : Ayoub; Toufik; Lyes; Mohamed; Ali;
Yacine; Souheila; Wissam; et mon binôme Omarelfarouk. H*

A Tous ceux qui me connaissent et que je n'ai pas pu citer.

Khaled. A





Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu

A ma mère

*Qui m'a toujours apporté amour et affection et m'a soutenu
dans mes études.*

A mon père

*Puisse ce travail faire honneur à ton courage et aux valeurs
que tu m'as transmises. Puisse-t-il te rendre fier de moi de là-
haut.*

A tous mes frères et mes sœurs

*Qui je leur souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de
réussite*

A tous mes meilleurs amis :

HM Toufic , MS Ayoub, HS Iyes et mes collègues M, Wissam et M, Souheila

A mon cher ami

Khaled AMMI SAID

A toute la promotion 2018-2019.

Omar Elfarouk. H



Remerciements

Tout d'abord, louange à «ALLAH» qu'il nous a conduit guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail, qu'il nous a inspiré les bons pas et les justes réflexes et qu'il nous a donné la volonté et le courage. Sans son aide, ce travail n'aurait pas abouti. "El Hamd Wa Chokr Li ALLAH".

Notre mémoire a été réalisé au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat sous la direction du **Pr. YOUSFI Mohamed**, directeur du laboratoire des sciences fondamentales que nous tenons à le remercier pour la disponibilité, les conseils et notamment le respect durant les années d'université.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur **Pr. DJERIDANE Amar** qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse, son encouragement continu et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail.

Son encadrement était le plus exemplaire. Méritent toute l'admiration.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide à notre co-promotrice, **M^{lle}. MAHFOUDI Reguia**, on la remercie pour la qualité de ses conseils exceptionnels, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier les membres du jury qu'ils ont bien voulu accepter de valoriser ce travail. Le président **Pr. YOUSFI Mohamed** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et les examinateurs **Dr. HAMIA Chahrazed** et **Dr. SOUILAH Rachid** pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.

À tous les enseignants du département de science de la matière, ont particulier **Dr. BENALIA Mohamed** et **Dr. HAMIA Chahrazed**, sans oublier tous les employés de la bibliothèque de la faculté des sciences et technologies de l'université Ammar Telidji de Laghouat.

Liste des sigles et abréviations

Abs	: Absorbance
EC 3.2.1.1	: Code structurale de l' α -amylase pancréatique de porc
FAO	: Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
IDDM	: Diabète insulino-dépendant (<i>Insulin –Dependent Diabets Mellitus</i>)
IG	: Index glycémique
k_{cat}	: Constante catalytique
KDa	: Kilo Dalton
k_M	: Constante de Michaëlis
k_{sp}	: Constante de spécificité
l	: Longueur de la cuve
m_0	: Masse initiale de la farine
m_1	: Masse de l'amidon extrait
NDDM	: Diabète non insulino-dépendant (<i>Non insulin –Dependent Diabets Mellitus</i>).
OMS	: Organisation mondiale de la santé
ONFAA	: Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires
P	: Valeur de probabilité
PDB	: Banque de données des protéines (<i>Protein Data Bank</i>)
R^2	: Coefficient de détermination
R	: Coefficient de corrélation
TA	: Teneur en amidon
UI	: Unité International
v_i	: Vitesse initiale
v_{max}	: Vitesse maximale

Liste des tableaux

Tableau 1:	Classification botanique, localité et photos du Blé dur, Frik, Orge et Mermez	6
Tableau 2:	Produits chimiques utilisés dans ce travail	7
Tableau 3:	Photos des amidons extraits et leurs rendements d'extraction	13
Tableau 4:	Constantes cinétiques de l' α -amylase pancréatique sur les amidons	17
Tableau 5:	Matrice de corrélation des résultats de l'activité amylolytique sur les quatre amidons étudiés ($p=0,05$).	19
Tableau 6:	Résultat de la cinétique d'apparition du maltose	23
Tableau 7:	Résultat de la cinétique d'apparition du glucose	25

Liste des figures

Figure 1:	Photographies de plantes du Blé dur (à gauche) et d'Orge (à droite)	2
Figure 2:	Représentation schématique d'amylose (a) et d'amylopectine (b)	2
Figure 3:	Complexe entre amylase pancréatique porcine (en blanc), molécules d'eau (en bleu ; seul l'atome d'oxygène est repéré) et trois fragments d'amidon (coloration par type d'atome). Un sillon dans lequel est présent l'un des fragments d'amidon est repérable	7
Figure 4:	Rendement d'extraction des amidons	14
Figure 5:	Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité amylolytique de l' α -amylase pancréatique sur les quatre amidons préparés	16
Figure 6:	Courbe d'étalonnage du maltose	21
Figure 7:	Cinétique d'apparition du maltose par hydrolyse amylolytique des amidons étudiés	22
Figure 8:	Courbe d'étalonnage du glucose	24
Figure 9:	Cinétique d'apparition du glucose par hydrolyse amylolytique des amidons étudiés	24

Sommaire

Remerciement	I
Liste des sigles et abréviations	II
Liste des tableaux	III
Liste des figure	IV
I. Introduction générale	1
II. Matériel et méthodes	6
II.1. Matériel végétal	6
II.2. L'enzyme α -amylase pancréatique de porc	7
II.3. Produits chimiques	7
II.4. Extraction de l'amidon	8
II.5. Détermination des paramètres cinétique de l' α -amylase sur les amidons préparés	8
II.5.1. Courbe d'étalonnage du maltose	9
II.5.2. Test d'activité enzymatique	9
II.6. Cinétique d'apparition du maltose	10
II.7. Cinétique d'apparition du glucose par l'activité amylolytique	10
II.7.1. Principe du dosage du glucose	10
II.7.2. Courbe d'étalonnage du glucose	10
II.7.3. Cinétique de la réaction	11
II.8. Analyse statistique	11
III. Résultats et discussions	12
III.1. Extraction d'amidon	12
III.2. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase	15
III.3. Cinétique d'apparition du maltose et du glucose par l' α -amylase pancréatique	21
IV. Conclusion générale	27
V. Références	29

Introduction générale

I. Introduction générale

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans les systèmes agricoles. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale. Le Blé et l'Orge font partie des quatre céréales les plus cultivées dans le monde avec le riz et le maïs. La production mondiale de Blé s'élève à 750 millions de tonnes et 140 millions de tonnes pour l'Orge en 2018 (FAO, 2018).

En Algérie, le secteur des céréales (Blé et Orge) se situe au premier ordre des priorités économiques et sociales du pays vu le rôle important que jouent le Blé et l'Orge dans le régime alimentaire du peuple algérien. Toutefois, d'après l'Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires (ONFAA, 2018), le total de la production nationale des céréales de la campagne 2017-2018 a atteint 60,5 millions de quintaux, soit 31,5 millions de quintaux de Blé dur et de 19,5 millions de quintaux d'Orge et 7,9 millions de quintaux de Blé tendre (REVUE DE PRESSE, 2018). L'importation des céréales fut de 40 % par rapport à la consommation totale (DJERMOUN A., 2009).

La majorité des utilisations du Blé et de l'Orge concerne l'alimentation humaine et animale tel que dans l'alimentation humaine utilisée principalement la farine pour la fabrication de semoule, pâtes, pain, couscous, viennoiseries, pâtisseries et biscuits. Outre ces utilisations classiques, de nouvelles utilisations à l'échelle industrielle apparaissent depuis quelques années telles que la fabrication de bioplastiques à base de gluten ou d'amidon. Les principaux débouchés sont les sacs plastiques, les plastiques agricoles, les emballages et certains produits d'hygiène. Ces bioplastiques ont l'avantage par rapport à leurs homologues d'origine fossile d'être biodégradables et renouvelables (BENATALLAH L., 2009).

Dans le règne végétal le Blé dur et l'Orge (**Figure 1**) appartient à la famille des Graminées (ou *Poaceae*), de sous-famille des Festucoïdées (ou *Pooideae*) à la Tribu des *Triticeae* de Genre *Triticum* (Blé et Frik) et *Hordeum* (Orge et Mermez) (KHELFALLAH A., 2013). Les grains du Blé et de l'Orge sont un réservoir de nutriments essentiels à l'alimentation humaine. Ils ont en commun sur le poids sec, une forte teneur en glucides (60 % à 70 %) dont le constituant le plus essentiel est l'amidon, une teneur significative en protéines (10 % à 12 %) et une teneur faible

mais variable en lipides (2 % à 4 %). Egalement, les céréales sont des sources importantes de fibres-sons (8 %) telles que les lignines, les celluloses et les hémicelluloses (CLEMENT D., 2010).



Figure 1 : Photographies de plantes du Blé dur (à gauche) et d'Orge (à droite) (DJERIDANE A., 2019)

L'amidon est après la cellulose la principale substance glucidique présente dans le monde végétale, il est synthétisé sous forme de réserve, par les végétaux supérieur à partir de l'énergie solaire, il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants et de l'homme en particulier. L'amidon est aussi considéré comme source de glucides capable de donner par voie chimique ou enzymatique toute une gamme de produits alimentaires intermédiaires utilisés dans les filières de l'industrie agro-alimentaire (MOUAS K., 2016). L'amidon est synthétisé à partir du D-glucose, sucre simple produit pendant la photosynthèse des plantes par des réactions enzymatiques. Il se forme d'un polysaccharide de formule chimique $(C_6H_{10}O_5)_n$, composé de deux fractions principales (98-99 %) : l'amylose et l'amylopectine. La répartition de ces deux constituants principaux dépend de l'origine de la plante, mais en général, elle est d'environ d'un rapport 1: 4 (MOUAS K., 2016). Les impuretés restantes sont des protéines (0,2-0,3 %), des enzymes liées à la surface des granules et des lipides, principalement des phospholipides (0,5-1,1 %). Les structures générales de l'amylose et de l'amylopectine sont présentées ci-dessous (Figure 2).

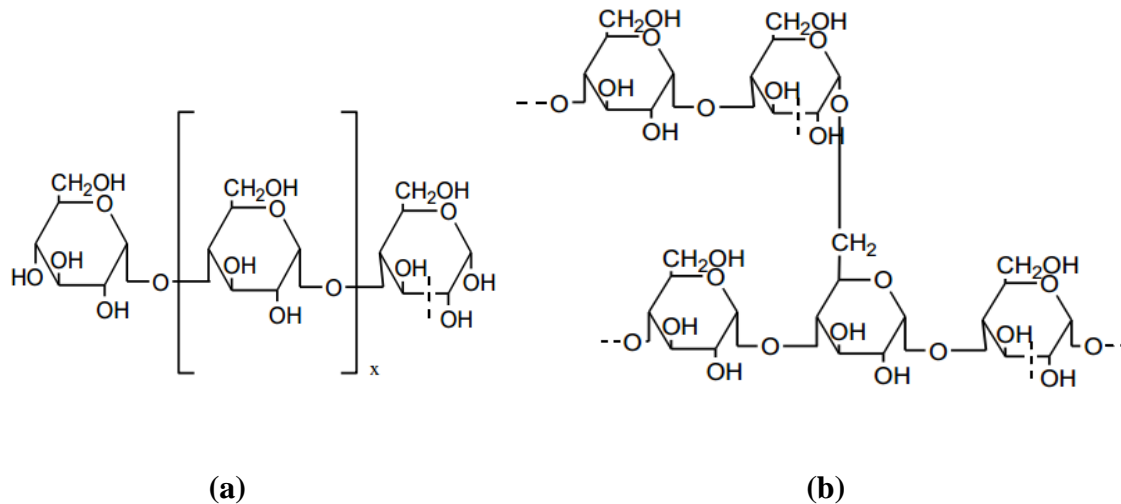


Figure 2: Représentation schématique d'amylose (a) et d'amylopectine (b)

L'amylose (14-27 %) est composée de chaînes de glucoses linéaires, liées par des liaisons α -(1,4). Son poids moléculaire varie de 100 à 1000 kDa, les chaînes d'amylose peuvent ainsi former une double hélice, qui peut contenir des inclusions lipidiques. Les structures secondaires et tertiaires de la molécule sont stabilisées par des ponts hydrogènes et par des forces de Van der Waals. L'amylopectine (73-86%) est composée de chaînes de glucoses linéaires, reliées par des liaisons α -(1,4) avec des branchements entre les molécules (toutes les 5 à 20 unités de glucose) par des liaisons de type α -(1,6). Son poids moléculaire varie entre 10 000 et 100 000 kDa en fonction des conditions physiologiques rencontrées lors de la synthèse (VAN DENEINDE R., et al., 2003). La cristallinité des grains d'amidon est essentiellement due aux molécules d'amylopectine. En effet, la solubilité de l'amylose dans l'eau chaude étant supérieure à celle de l'amylopectine, il est possible de retirer cette fraction des granules sans pour autant affecter la cristallinité. De plus, les amidons très riches en amylopectine présentent une forte cristallinité, alors que ceux des mutants très riches en amylose voient leur cristallinité diminuer fortement (BJORCK A., et al., 1990).

La base de l'organisation de la molécule d'amidon repose sur 3 types de chaînes A, B et C, définies par le degré de polymérisation. Les chaînes A ne portent pas d'autres chaînes, alors que les chaînes B portent une ou plusieurs autres chaînes ; enfin les chaînes C sont censées représenter les chaînes initialement biosynthétisées dans la mesure où elles sont les seules à posséder un résidu réducteur (MOUAS K., 2016). L'amidon des céréales est surtout constitué par

des chaînes de type A tandis que l'amidon des racines et tubercules présente davantage de chaînes de type B ainsi que des mélanges (A et B) appelés alors de type C. Certains amidons, provenant d'espèces spécifiques, sont constitués de teneurs particulières en amylose et amylopectine, comme l'amidon de maïs ciré qui présente une teneur en amylopectine d'environ 99 %, ou les amidons de certaines légumineuses, qui atteignent une teneur maximale en amylose de 85 % (**RICHARD F., *al* 2004**). D'autre part, dans le corps humain la molécule complexe d'amidon doit être hydrolysé et simplifiée en molécules de maltoses et glucoses au niveau des intestins pour que celui-ci absorbe par les vaisseaux sanguins, donc augmenter le niveau de glucose dans le sang.

Le diabète sucré est la maladie non infectieuse la plus fréquente. Il a été estimé que 425 millions de personnes ont été touchées globalement en 2017 et il sera 622 millions en 2040. C'est un trouble complexe causé par une augmentation de la production hépatique de glucose, une diminution de l'insuline et aucune production d'insuline, conduisant à augmenter le niveau de glucose dans le sang. Il est classé en deux types : le diabète de type 1 (IDDM) et le diabète sucré de type 2 et la forme la plus prévalent de cette maladie est le diabète sucré non insulino-dépendant (NIDDM 2), lié à une hyperglycémie postprandiale élevée (**GOLDENBERG R. et PUNTHAKEE Z., 2013**). Toutefois, les tentatives thérapeutiques sont très intenses dans ce domaine et diverses approches pharmacologiques sont utilisées pour améliorer le traitement du diabète par différents modes d'action. Parmi ces stratégies est de réduire ou ralentir la digestion et l'absorption des glucides alimentaires par l'intermédiaire de l'inhibition des principales enzymes hydrolysant les glucides ingérés l' α -amylase et l' α -glucosidase dans les organes digestifs (**ALICE Y.Y. et *al.*, 2013**). Cependant, il existe de nombreuses enzymes digestives chez l'homme dont la plus importante est l'alpha-amylase pancréatique (EC 3.2.1.1), qui hydrolyse les liaisons alpha-1,4 glycosidiques de l'amidon, l'amylopectine, l'amylose, le glycogène et de nombreuses maltodextrines.

L'étude *in vitro* et la modélisation sont souvent très intéressantes pour approcher la réalité biologique, mais il arrive parfois que des principes apparemment logiques s'avèrent erronés. Ainsi la classification des hydrates de carbones selon leur formule chimique, en glucides simples et en glucides complexes, a-t-elle naturellement conduit à l'extrapolation usuelle en sucres « rapides » et sucres « lents ». En toute logique, les glucides simples sont immédiatement

disponibles, alors que les glucides complexes tel que l'amidon doivent d'abord être hydrolysés pour pouvoir être assimilés. L'hydrolyse nécessitant du temps, les glucides complexes sont disponibles plus tardivement et sont donc des sucres lents (**ROSSI F.,1998**). Ainsi, l'index glycémique détermine le pouvoir glycémiant d'un aliment dans les deux heures suivant son absorption. Les aliments à indice glycémique bas font monter progressivement la glycémie. Les aliments à indice glycémique élevé provoquent rapidement une élévation de la glycémie. Parmi les aliments à indice glycémique faible sont le pain aux céréales (**HUBER S., 1990**).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail de mémoire qui s'attèle à l'étude de l'index amylolytique *in vitro* de quatre amidons issus de deux céréales fondamentales dans le régime alimentaire du peuple algérien (Blé dur et Orge). Le programme de recherche s'articule autour de trois axes principaux, Le premier axe porte sur la comparaison des rendements d'extraction de l'amidon de quatre échantillons : Blé, Frik, Orge et Mermez. Le second axe sera focalisé sur l'étude *in vitro* de l'affinité de ces amidons vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique du porc par la détermination de leurs paramètres cinétiques à savoir, la constante de Michaëlis (k_M), la vitesse maximale (v_{max}), la constante catalytique (k_{cat}) et la constante de spécificité (k_{sp}). Le troisième axe porte sur l'étude de la cinétique d'apparition du maltose et du glucose par action amylolytique de l' α -amylase sur les amidons ainsi préparés afin de les classer par rapport à la réponse biologique consécutive à l'ingestion de glucides qui peut être appliquée à la gestion du diabète et la prise en charge de l'obésité.





Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Les échantillons utilisés dans ce travail sont fournis de plusieurs régions différentes en Algérie (Tableau 1).

Tableau 1: Classification botanique, localité et photos du Blé dur, Frik, Orge et Mermez

Nom	Classification botanique	Région	Photo
Blé dur	Embranchement : Angiospermes Sous embranchement : Spermaphytes Classe : Monocotylédones Ordre : Glumiflorales Super ordre : Comméliniflorales Famille : Gramineae	Bougadir (Chlef) 2018	
	Tribu : Triticeae Sous tribu : Triticinae Genre : <i>Triticum</i> Espèce : <i>Triticum durum</i> Desf	Z'ribet El-oued (Biskra) 2018	
Orge	Embranchement : Angiospermes Sous embranchement : Spermaphytes Classe : Monocotylédones Ordre : Glumiflorales Super ordre : Comméliniflorales	El-hadjeb (Laghouat) 2018	
	Famille : Gramineae Tribu : Triticeae Sous tribu : Triticinae Genre : <i>Hordeum</i> Espèce : <i>Hordeum vulgare</i>	Sidi Makhlouf- (Laghouat) 2018	

II.2. L'enzyme α -amylase pancréatique de porc

L'amylase est formée de deux domaines principaux : un domaine catalytique et un domaine dit déliaison aux glucides (CBM pour "Carbohydrates Binding Module") dont le rôle est encore discuté. L' α -amylase pancréatique de porc (A3176, Sigma-Aldrich) utilisée dans notre travail est caractérisée par un poids moléculaire de 51–54 kDa et une activité enzymatique spécifique de 10 units/mg solide (**Figure 3**).

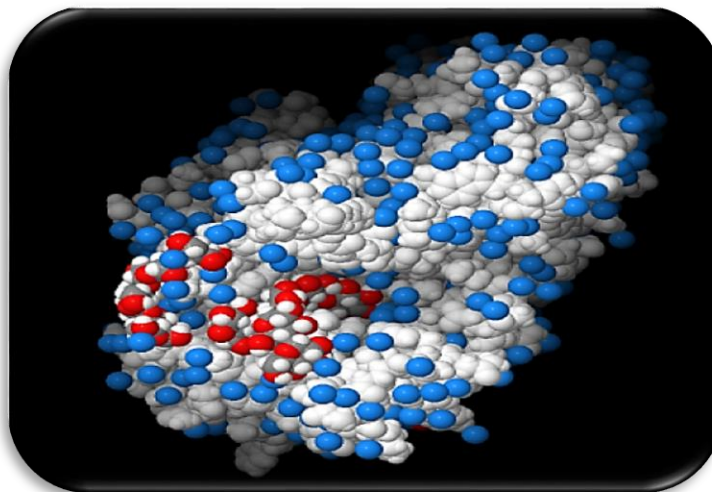


Figure 3 : Complexe entre amylase pancréatique porcine (en blanc), molécules d'eau (en bleu ; seul l'atome d'oxygène est repéré) et trois fragments d'amidon (coloration par type d'atome). Un sillon dans lequel est présent l'un des fragments d'amidon est repérable (**PDB**).

II.3. Produits chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Produits chimiques utilisés dans ce travail

Produit	Firme
carbonate de sodium (Na_2CO_3), Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), D-(+)-maltose monohydraté ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12} \cdot \text{H}_2\text{O}$).	Riedel-de Haën (Allemagne)
Néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline), Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dihydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4), hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), D-(+)-glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), α -amylase pancréatique de porc type VI-B.	Sigma-Aldrich (Allemagne)
Chlorure de potassium (KCl).	VWR-Prolabo (France)
Réactive 'glucose oxydase/peroxydase'.	SPINERECT

II.4. Extraction de l'amidon

Plusieurs procédés ont été inventés, ils se différencient par les quantités d'eau ajoutées à la farine en début de fabrication et par les techniques de séparation de l'amidon et du gluten (lavage à l'eau, décantation, centrifugation, hydrocyclone) les méthodes les plus extrêmes sont représentées par les procédés Martin (séparation solide-solide) et Raisio (séparation liquide-solide) (SRABONI K. *et al.*, 2016).

Dans notre travail et afin d'isoler une quantité maximale d'amidon, le principe de l'extraction consiste généralement en un lavage à l'eau. Les grains des échantillons sont d'abord broyés à sec par un broyeur à la meule de pierre, associé à un tamisage pour séparer la farine du son. Ensuite, la farine qui est constituée environ 98% de gluten et de l'amidon est traitée par voie humide par le principe de la lixiviation. Cette opération (procédés Martin) permet de séparer l'amidon d'une part et le Gluten vital d'autre part (SRABONI K. *et al.*, 2016).

Pour extraire l'amidon, 10g (m_0) de farine est d'abord fortement malaxée avec 6ml d'eau distillée pour former un pàton. Après 30 min de repos, un lavage par tamisage est ensuite effectué du pàton sous un mince filet d'eau tout en malaxant. A la fin de lixiviation, on obtient le lait d'amidon. Ce dernier est ensuite passé sur un tamis fin de $63\mu\text{m}$ pour isoler l'amidon des fibres. Lait d'amidon obtenu est séché à $T = 37^\circ\text{C}$ avant d'être pesé (m_1). La teneur en amidon (TA) est exprimée en pourcentage de la fraction massique de l'échantillon initial selon l'équation suivante :

$$\text{TA (\%)} = \frac{m_1}{m_0} * 100$$

II.5. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase sur les amidons préparés

Dans la présente étude on s'intéresse à déterminer les paramètres enzymatiques (k_M , v_{max} , k_{cat} et k_{sp}) *in vitro* de l' α -amylase pancréatique de porc vis-à-vis des amidons extraits auparavant. L'activité enzymatique est dosée sur l'amidon comme substrat. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits. Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement grâce à son pouvoir réducteur. Il réagit avec une solution basique de la glycine-cuivrique, en développant une coloration jaune-orangé en présence de la

néocuproïne. Cette coloration est mesurable à 454 nm et son intensité est proportionnelle à la quantité du produit libéré (DYGERT S. *et al.*, 1965).

II.5.1. Courbe d'étalonnage du maltose

En vue de doser les sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase, une courbe d'étalonnage du maltose (0,01-0,05g/l) préalablement établie. A cet effet, une prise de 500 μ l de chaque dilution du maltose est mélangée avec 1 ml de la solution cuivrique A ((la glycine (0,21 M), Na_2CO_3 (0,38 M) et le CuSO_4 (1,8 mM)) et 1ml de la solution B ((Néocuproïne (4.9 mM)). Le mélange est ensuite porté à l'ébullition pendant 10 min. Après refroidissement, 4 ml d'eau distillée est ajouté à chaque solution. Le complexe jaune orangé formé est mesuré à 454 nm sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800).

II.5.2. Test de la cinétique enzymatique

Dans des tubes à essai, on a introduit 100 μ l de chaque extrait d'amidon à différentes concentrations (0.025 à 3 g/l), et 300 μ l du tampon phosphate salé (pH=7). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 100 μ l de la solution enzymatique (0.2 g/l) est ajoutée. La réaction est stoppée après 2 minutes en ajoutant 1ml de la solution cuivrique A et 1ml de la solution B. Ensuite, le mélange est porté à l'ébullition à 100°C pendant 10 min. Après l'ajout de 4 ml d'eau distillée, la lecture de la densité optique à 454 nm a été effectuée immédiatement sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800).

Les résultats ainsi obtenus nous ont permis de déterminer la concentration du maltose libéré dans le milieu réactionnel et par conséquent, de calculer les vitesses enzymatiques initiales (v_i) de l'hydrolyse de l'amidon selon l'équation suivante :

$$v_i = \frac{\Delta A / \epsilon \cdot l}{\Delta t}$$

Où :

ΔA : absorbance ou densité optique après 2 minutes (Δt) ; l : longueur de la cuve (1 Cm) ; ϵ : Coefficient d'extinction molaire du maltose ($0.016 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{Cm}^{-1}$).

Les paramètres cinétiques de l'enzyme α -amylase (k_M et v_{max}), sont ensuite déterminés selon l'hypothèse d'une cinétique Michaëlienne à l'aide de l'équation en double inverse de Lineweaver Burk. Les essais ont été réalisés en triplicatas au minimum pour chaque concentration d'amidon testé.

II.6. Cinétique d'apparition du maltose

Dans le but de déterminer le temps nécessaire pour l'accomplissement de la réaction enzymatique de l' α -amylase sur les quatre échantillons d'amidons ainsi préparés, nous avons suivis l'apparition du maltose libéré à différents temps de la réaction enzymatique en se basant sur la courbe d'étalonnage du maltose préalablement établie. La cinétique enzymatique a été effectuée en suivant le même protocole, décrit précédemment avec une concentration d'amidon fixe égale à 1 g/l (partie I.5.2).

II.7. Cinétique d'apparition du glucose par l'activité amylolytique

II.7.1. Principe du dosage du glucose

Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. La première réaction enzymatique étroitement spécifique (glucose-oxydase) oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant à l'oxydation de l'o-dianisidine (chromogène) en un produit coloré (quinonéimine) qui peut être dosé spectrophotométriquement à 506 nm. Alors, à partir d'une courbe d'étalonnage du glucose préalablement établie, on peut déterminer graphiquement la concentration en glucose dans une solution inconnue.

II.7.2. Courbe d'étalonnage du glucose

A partir d'une solution mère de glucose, une gamme de dilution a été préparée (0,01-0,1g/l). 1 ml de chaque solution fille a été mélangé avec 1 ml du réactif du glucose oxydase. Les mélanges ont été agités puis maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. La densité optique de chaque solution est enregistrée à 506 nm contre un blanc en utilisant un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800).

II.7.3. Cinétique de la réaction

La cinétique d'apparition du glucose a été déterminée par le dosage du glucose libérée lors de l'hydrolyse des amidons étudiés par l' α -amylase. Donc, des tubes à essai contenant un mélange de 100 μ l du substrat (2g/l) et 300 μ l du tampon phosphaté salé sont pré-incubés pendant 10 min à 37°C. La réaction enzymatique est débutée par l'ajout de 100 μ l d'enzyme (2g/l) préparé dans un tampon phosphaté (pH=7). Après des différents intervalles de temps, la réaction est stoppée par chauffage (100°C) pendant 10 min. Après refroidissement, 1 ml du réactif de glucose oxydase a été ajouté et la lecture de la densité optique à 506 nm a été effectuée après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800).

II.8. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois à quatre essais en utilisant le logiciel Excel 2013. Le coefficient de corrélation de Pearson a été déterminé afin d'établir la relation entre les différents paramètres cinétiques de l'enzyme α -amylase pancréatique porcine sur les quatre échantillons des amidons ainsi purifiés.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Extraction d'amidon





L'amidon est un polymère naturel, renouvelable et biodégradable synthétisé par les végétaux supérieurs à partir de l'énergie solaire. Il est l'un des matériaux de biomasse les plus abondants dans la nature, et il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants et de l'homme en particulier. On le trouve dans les organes de réserves des plantes telle que les céréales (30-80% de la matière sèche (ms)), les tubercules (60-90% ms), et les légumineuses (25-50 ms) (**BENHAJ S., 2015**). Il est composé de deux types de polymères de glucose, l'amylose et l'amylopectine qui représentent approximativement 98 à 99% du poids sec. L'amidon chez les céréales contient des lysophospholipides et des acides gras libres dont la présence est fortement corrélée à la quantité d'amylose. Ainsi la teneur en amylose est en moyenne comprise entre 18 et 35% mais peut, dans le cas des amidons totalement waxys, être de l'ordre de 1% ou, au contraire, dans les amidons riches en amylose proche de 60% (**CLEMENT D., 2010**).

L'extraction de composé cible de haute valeur alimentaire, dans notre cas l'amidon, suscite actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur pouvoir hyperglycémie postprandiale très élevé. La technologie d'extraction de l'amidon est un ensemble d'opérations unitaires, à savoir : le lavage, le broyage par voie humide, le tamisage, la décantation et le séchage.

La séparation des granules d'amidon, après mouture, se fait à l'eau. Les granules sont entraînés à travers un tamis de 63 μm de diamètre. On récupère donc l'eau d'extraction chargée d'amidon et le résidu composé de fibres, lipides et protéines reste dans le tamis. Le choix du tamis dépend de la taille des granules d'amidon et des propriétés de la matière première. Généralement, le diamètre des grains pouvant varier de 2 à 200 μm , selon les origines botaniques (**DJELTI H., 2014**). Pour le Blé dur et l'orge, le diamètre maximum des tamis est de 50 μm (**CLEMENT D., 2010**). Or, dans notre travail nous avons utilisé un tamis de 63 μm de diamètre vue la non disponibilité d'autres tamis.

Après extraction solide-liquide des extraits d'amidon sec avec l'eau distillée par la méthode de lixiviation, la composition globale exprimée en pourcentages de matière sèche de la farine des amidons est donnée dans **Tableau 3**.

Tableau 3 : Photos des amidons extraits et leurs rendements d'extraction

Echantillon	Photo	Rendement (%)	Echantillon	Photo	Rendement (%)
Blé		55,58 ±7,24	Orge		37,06±0,98
Frik		12,57±2,23	Mermez		12,65±2,19

Les amidons obtenus se présentent sous forme poudres de couleurs différentes. L'amidon du Blé est de couleur blanche, l'Orge présente une couleur verte claire, le Frik montre une couleur verte ainsi une couleur marron clair a été détectée pour le Mermez. Or, généralement l'amidon, après extraction des organes de réserve des végétaux supérieurs et purification, se présente sous la forme d'une poudre blanche constituée d'entités microscopiques, nommées grain d'amidon, de 2 à 100 µm de diamètre selon l'origine botanique (MBOUGUENG P., 2009). De ce fait, les différentes couleurs obtenus de nos amidons purifiés pourrait être due à la présence d'autres composés mineurs substances non glucidiques extractibles par l'eau. Cependant, l'amidon contient des constituants mineurs tels que les protéines, les lipides et les minéraux. Ces constituants, bien que présents en faibles quantités (<2%), sont susceptibles de modifier le comportement général de l'amidon sans toutefois en changer les bases physicochimiques (MBOUGUENG P., 2009). La taille et la répartition granulométrique des amidons sont liées

également à l'origine botanique et dans une certaine mesure au type de broyeur utilisé et de la teneur en eau des amidons. Dans un souci de clarté, nous présentons dans l'histogramme suivant (**Figure 4**) les différentes valeurs du contenu en amidon des échantillons étudiés.

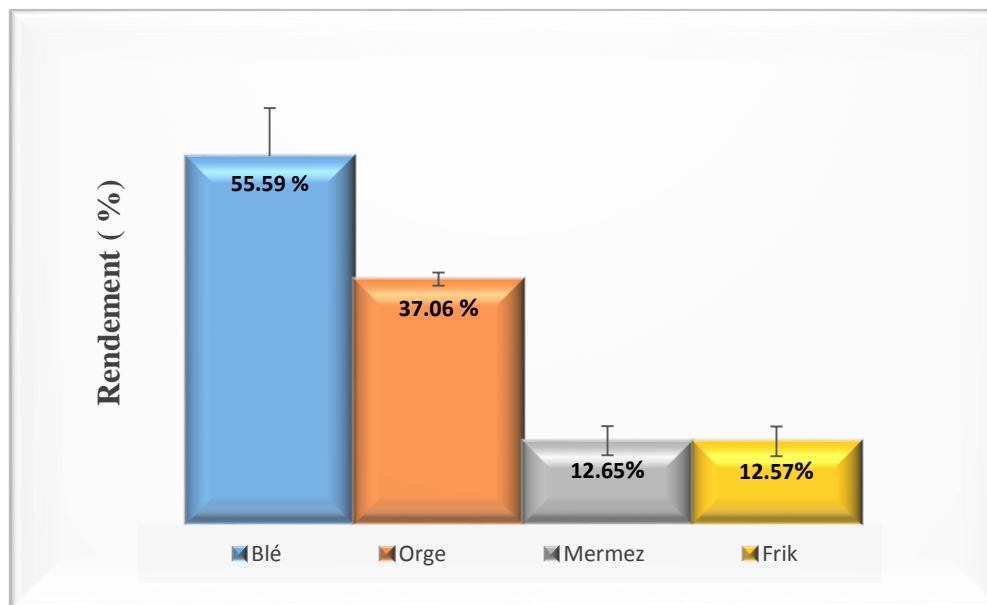


Figure 4 : Rendement d'extraction des amidons

Le rendement d'extraction varie de $12,57 \pm 2,23$ à $55,58 \pm 7,24$ %. On remarque que l'extrait brut d'amidon de farine du Blé enregistre un fort rendement de l'ordre de $55,58 \pm 7,24$ % suivi par l'extrait de la farine de l'Orge de $37,06 \pm 0,98$ %. En ce qui concerne les autres rendements nous notons une réduction significative de la quantité d'amidon extrait dont $12,65 \pm 2,19$ % pour Mermez et $12,57 \pm 2,23$ % pour le Frik.

D'un point de vue comparatif, la teneur en amidon dans la farine du Blé est proche à celle trouvée par d'autres chercheurs (ZHUGE Q. *et al.*, 1991 ; ROSSI F., 1998). Par contre, la composition brute dans cinq variétés d'Orge a donné un contenu en amidon de 53 à 59% (BJORCK A. *et al.*, 1990 ; MURRAY S. *et al.*, 1999) qui est plus important que notre échantillon. En ce qui concerne le Mermez et le Frik, l'étude de ces deux échantillons cette plante est encore rare et fragmentaire et ils n'ont jamais été étudiés auparavant du point de vue phytochimique.

A la lumière de ces résultats, il ressort que la teneur en amidons est influencé par plusieurs facteurs à savoir ;

- Les facteurs extrinsèques : la qualité du sol, climat, les conditions de conservation.
- Les facteurs intrinsèques : la génétique et la maturité de la plante
- Les conditions expérimentales : la polarité du solvant utilisé (la présence des molécules solubles dans l'eau comme, protéines (gluten) et des acides organiques), la méthode utilisée pour l'extraction et l'erreur de l'expérimentateur.

Par ailleurs, à température ambiante, les grains d'amidon natifs sont insolubles dans l'eau. En présence d'un excès d'eau et à une température supérieure à 60 °C, le grain d'amidon passe successivement par trois états : gonflement, gélatinisation et solubilisation. Au cours de refroidissement, un gel physique se forme, c'est la rétrogradation. D'autre part, l'amylopectine est une molécule insoluble dans l'eau. Par contre, l'amylose est une molécule d'amidon soluble dans l'eau. Alors, la teneur en amylose influence les propriétés fonctionnelles des amidons telles que la capacité de rétention d'eau et la rétrogradation lors de leur solubilisation dans l'eau distillée (BJORCK A. *et al.*, 1990). Les amidons du Blé et d'Orge qui se solubilisent plus facilement que ceux du Mermez et notamment du Frik pourrait être due à la présence des teneurs en amylose élevées. Toutefois, les conditions physiologiques lors de la synthèse de l'amylose et le cultivar peuvent expliquer cette différence.

III.2. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase

L'étude cinétique a permis d'établir les courbes cinétiques de l'hydrolyse enzymatique et l'évaluation des paramètres cinétiques. L'exploitation des résultats a visé, en premier lieu, la mise en évidence des systèmes (amidon-enzyme) qui obéissent, durant l'hydrolyse, au modèle de Michaëlis-Menten dans les conditions expérimentales choisies. Ce modèle décrit l'évolution de la réaction dans deux états à savoir l'état quasi-équilibre et l'état pré-stationnaire. Il est exprimé par l'équation de Michaëlis-Menten. L'application du modèle de Michaëlis-Menten se fait par la représentation graphique des transformées linéaires qui devraient illustrer des droites. Dans cette étude, la représentation de Lineweaver-Burk appelée aussi la représentation des doubles inverses (l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration initiale de l'amidon) a

été adoptée pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. Dans un second lieu, les constantes cinétiques suivantes ont été évaluées :

- La vitesse initiale maximale v_{\max} ,
- La constante de Michaëlis k_M qui correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale mesurée est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale, v_{\max} , ou la constante de dissociation du complexe substrat-enzyme k_s ,
- La constante catalytique k_{cat} qui se définit comme le nombre de molécules de substrat transformées par unité de temps et par molécule d'enzyme dans des conditions expérimentales données,
- La constante de vitesse d'ordre 2 (deux), k_{cat}/k_M appelée aussi constante de spécificité (k_{sp}).

Les mesures d'activités enzymatiques sont basées sur le suivi au cours du temps de la libération par clivage enzymatique du maltose à partir des quatre amidons purifiés. La quantité de produit libéré est calculée à partir de la courbe d'étalonnage du maltose. L'augmentation de l'absorbance au cours du temps détermine la vitesse initiale de la réaction. Les essais sont réalisés à concentration saturante en substrat, qui permet d'assurer la linéarité de la courbe $\text{Abs}=f(t)$ pendant le temps requis pour les mesures et de mesurer la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse. Les courbes cinétiques représentant les inverses des vitesses initiales de l'hydrolyse par l' α -amylase en fonction de l'inverse des concentrations initiales des amidons sont illustrées à la **Figure 5**.

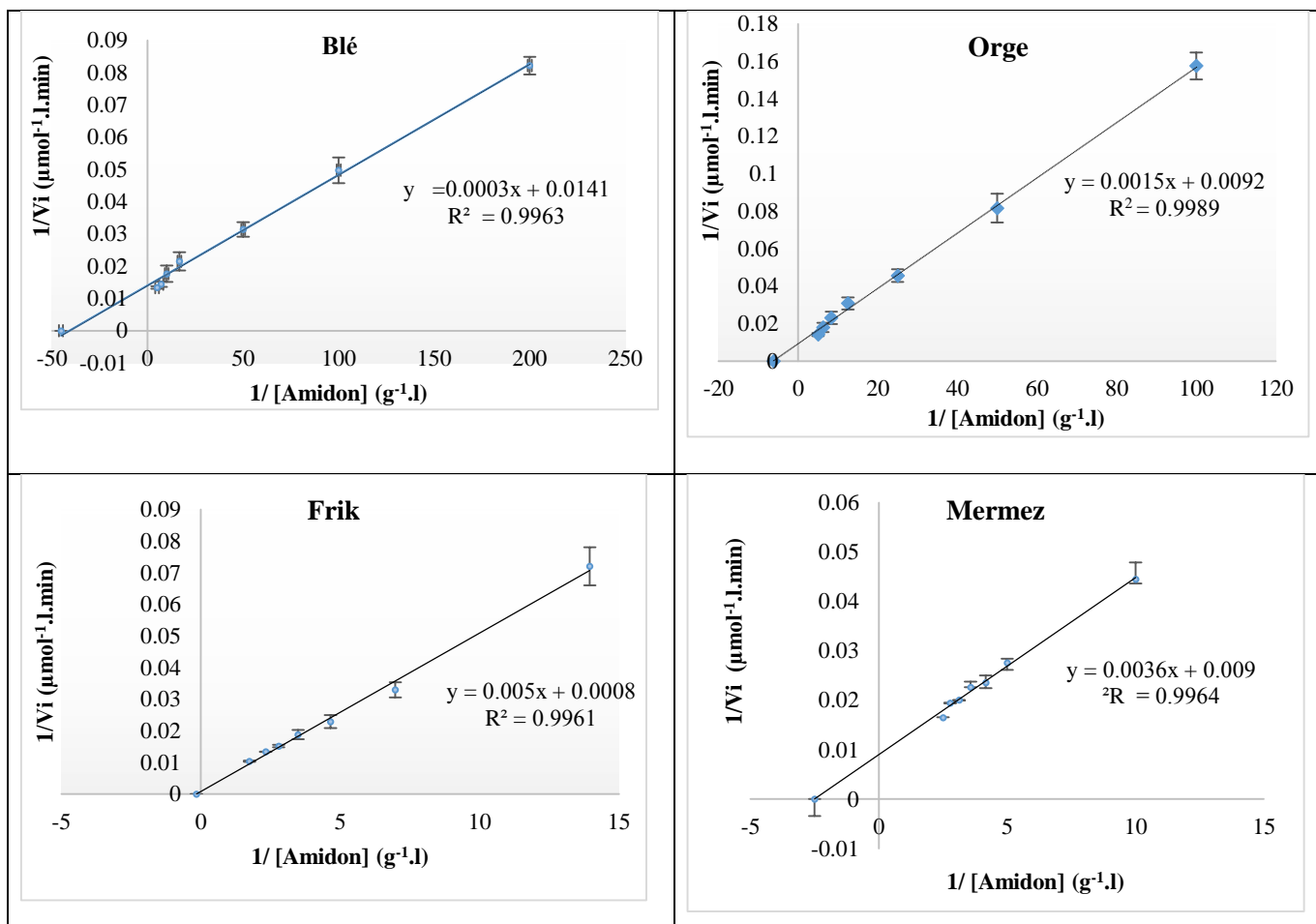


Figure 5 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité amylolytique de l' α -amylase pancréatique sur les quatre amidons préparés

Il ressort que, dans l'intervalle de concentration des amidons et de l'enzyme utilisées, l'hydrolyse obéit aux équations de vitesses données par le modèle de Michaëlis-Menten. Les courbes cinétiques obtenues pour les amidons Blé, Orge, Mermez et Frik sont des hyperboles distinctes et les représentations graphiques de Lineweaver-Burk sont des droites avec des coefficients de détermination $R^2 \geq 0,99$.

Les constantes cinétiques de l'activité amylolytique des amidons étudiés ont été déterminées à partir des transformées linéaires de Lineweaver-Burk et récapitulées au **Tableau 4**.

Tableau 4 : Constantes cinétiques de l'α-amylase pancréatique sur les amidons

	k_M (g/l)	v_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{sp} ($\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{l}$)
Blé	0,022±0,007	75,18±11,56	97,74±15,03	4333,51±48,15
Orge	0,16±0,02	108,69±17,76	141,31±23,09	688,70±30,95
Mermez	0,400±0,114	111,11±19,04	144,45±24,67	361,13±18,05
Frik	6,25±1,65	1111,11±69,44	1444,50±31,59	231,12±22,74

A cause de la nature hétérogénique des molécules d'amidon, les masses moléculaires des substrats ne pouvaient pas être déterminées. De ce fait les valeurs de k_M ont été exprimées en mg/ml au lieu des concentrations molaires (**Tableau 4**). Le k_M apparent pour l'amidon du Frik est plus élevé que ceux de l'amidon du Mermez, de l'amidon de l'Orge et de l'amidon du Blé, impliquant une faible affinité de l'enzyme pour ce substrat, l'activité enzymatique de l'amidon du Frik présente une constante de Michaëlis plus de 284, 39 et 15 fois plus faible que celle des amidons du Blé, de l'Orge et du Mermez respectivement. Par contre, les vitesses maximales des amidons du Mermez, de l'Orge et du Blé sont moins élevées et relativement similaires par rapport à celle de l'amidon du Frik.

Les valeurs de la constante catalytique sont très voisines dans le cas de l'hydrolyse des amidons de l'Orge et du Mermez. Elles ont donc relativement la même efficacité catalytique. Par contre, l'amidon du Blé présente une constante catalytique très faible (<16 fois) que celle de l'amidon du Frik. Cependant, l'enzyme possède cependant l'efficacité catalytique la plus faible pour l'amidon du Blé. Cela pourrait être due que l'hydrolyse de l'amidon pourrait être limitée par la disponibilité de l'extrémité non réductrice, et plus probablement par sa solubilité dans l'eau. La rapidité d'hydrolyse de l'amidon et de l'amylopectine par rapport à l'amylose avait également été rapportée pour les α-amylases des plantes (**BJORCK A. et al., 1990**).

La constante catalytique k_{cat} mesure l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat et la constante de Michaelis mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Un enzyme peut avoir une très grande affinité mais avec une constante catalytique faible et inversement. L'un des deux paramètres ne suffit pas à caractériser le couple enzyme/substrat. C'est la constante de spécificité qui reflète la spécificité globale d'un enzyme vis-à-vis d'un substrat. Les valeurs des constantes de spécificité k_{sp} de l'action amylolytique sur les amidons sont déduites et rassemblées au **Tableau 4**.

Les valeurs de k_{sp} obtenus sont très différentes. Une valeur très faible a été observée pour l'amidon du Frik, ce qui confirme sa faible susceptibilité à l'hydrolyse en sucres réducteurs relativement aux autres amidons. Par contre, une valeur très élevée a été enregistrée pour l'amidon du Blé, ce qui affirme sa grande habilité à l'hydrolyse en sucres réducteurs. On peut en déduire que la susceptibilité aux différentes étapes d'hydrolyse des quatre amidons par l' α -amylase est différente et que cette enzyme présente donc de spécificité vis-à-vis des quatre amidons.

D'autre part, les résultats de plusieurs auteurs, sur la cinétique d'hydrolyse de l'amidon par l'enzyme libre sont conformes au modèle de Michaelis, et d'après les résultats déjà publiés, (**LEE C. et al., 1992**) ont rapporté des valeurs de $k_M = 0,139$ g/l et du $v_{max} = 1218,33$ $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ plus fortes pour l'amidon du Blé (Maltoheptaose). Même constatations ont été trouvées par (**BOUDRIES-KACI N., 2017**) qui ont obtenu pour l'amidon de Blé des valeurs de k_M de 1,34 g/l et de v_{max} de 720 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Mais comparativement à d'autres types d'amidon, on a remarqué des valeurs très élevées de k_M de 7,83 ; 8,94, 7,79 ; 12,54 g/l pour l'amidon soluble, l'amidon de riz, l'amidon de pomme de terre et l'amidon de maïs respectivement. Les vitesses maximales v_{max} ont été évaluées respectivement à 0,170 ; 0,166 ; 0,186 ; 0,139 $\text{g.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (**KONSULA Z. et al., 2004**). Ce résultat pourrait être expliqué en fonction de l'origine botanique des amidons ainsi que de leurs prétraitements. Pour l'hydrolyse des amidons par l'amylase immobilisée, la majorité des résultats montrent une augmentation de k_M et une diminution de v_{max} , ce qui est justifié par les phénomènes de diffusion qui ralentissent le contact du substrat avec l'enzyme ainsi que par les changements structurels des enzymes immobilisées (**BOUDRIES-KACI N., 2017**). D'autres auteurs ont trouvé des valeurs v_{max} plus grandes pour l'amylase liber (**BOUDRIES-KACI N., 2017**). Les constantes cinétiques obtenues dans notre

étude et ceux publiés montrent l'influence de l'origine botanique de l'amidon et donc sa structure et ses propriétés physicochimiques et fonctionnelles ainsi que celle de la source d'enzyme sur son affinité vis-à-vis de l'amidon.

La réalisation d'une matrice des corrélations permet une analyse deux à deux des corrélations entre variables explicatives. Il est d'usage de considérer que l'obtention de coefficients de corrélations supérieurs à 0,5 est révélatrice d'un problème de multi colinéarité entre les variables concernées. Dans notre étude, la matrice de corrélation est présentée dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Matrice de corrélation des résultats de l'activité amylolytique sur les quatre amidons étudiés ($p=0,05$).

Variables	Temps	[glucose]	[maltose]	k_M	v_{max}	k_{cat}	k_{sp}
Temps	1						
[glucose]	-0,784	1					
[maltose]	-0,827	0,985	1				
k_M	0,800	-0,413	-0,547	1			
v_{max}	0,781	-0,393	-0,530	0,999	1		
k_{cat}	0,781	-0,393	-0,530	0,999	1,000	1	
k_{sp}	-0,704	0,961	0,979	-0,466	-0,454	-0,454	1

Le **Tableau 5** reprend les corrélations établies entre les constantes cinétiques de l'action de l' α -amylase. Les relations entre le temps de libération du maltose et tous les autres paramètres suivent des corrélations positives et négatives non significatives ($r > 0,70$, $p= 0,173-0.296$) pour tous les amidons étudiés. En effet, une corrélation positive hautement significative ($r = 0,985$, $p= 0,015$) a été enregistrée entre les concentrations en glucose et en maltose libérés. Cela explique que 98,5 % de l'hydrolyse amylolytique des amidons libère le maltose et le glucose en même temps. De même, la relation entre les concentrations du glucose et du maltose avec le k_{sp} suit des corrélations positives très significatives ($r = 0,961$, $p= 0,039$ pour le glucose et $r = 0,979$, $p=0,021$ pour le maltose, traduisant que plus de 96 % de la libération du maltose et du glucose est liée directement à la spécificité de l'enzyme α -amylase vis-à-vis des amidons isolés. Par contre, les concentrations du glucose et du maltose sont très peu corrélées non significativement avec le

v_{\max} , le k_{cat} et le k_M ($r < 0,55$; $p > 0,45$). D'autre part, les paramètres v_{\max} , k_M et k_{cat} sont faiblement corrélés avec le k_{sp} ($r < 0,47$; $P > 0,53$).

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que tous les amidons isolés sont susceptibles à l'hydrolyse par l' α -amylase porcine, donnant lieu à la formation de sucres réducteurs et la cinétique d'hydrolyse obéit au modèle de Michaëlis-Menten dans les conditions opératoires utilisées. Cependant, les résultats montrent que la fiable affinité à l'action amylolytique est obtenue pour l'amidon du Frik. Cela suggère que le Frik est susceptible d'avoir des effets positifs sur l'amélioration de la réponse glycémique postprandiale.

III.3. Cinétique d'apparition du maltose et du glucose par l' α -amylase pancréatique

L' α -amylase pancréatique (EC 3.2.1.1) est une enzyme clé dans le système digestif et catalyse l'étape initiale d'hydrolyse de l'amidon en maltose et finalement en glucose. La dégradation de cet amidon alimentaire se fait rapidement et conduit à une hyperglycémie postprandiale élevée. Il a été démontré que l'activité de l' α -amylase pancréatique humaine dans l'intestin grêle est corrélée à une augmentation des taux de glucose postprandial, dont le contrôle est donc un aspect important dans le traitement du diabète (BENNACER H., 2017).

Pour mesurer l'activité enzymatique de l' α -amylase sur les quatre échantillons d'amidon ainsi préparés, nous avons utilisé la courbe d'étalonnage du maltose (Figure 6). Nous avons pu déterminer les concentrations en sucres réducteurs, exprimées en équivalent en maltose libéré dans le milieu réactionnel pour une concentration fixé d'amidon pour les quatre échantillons.

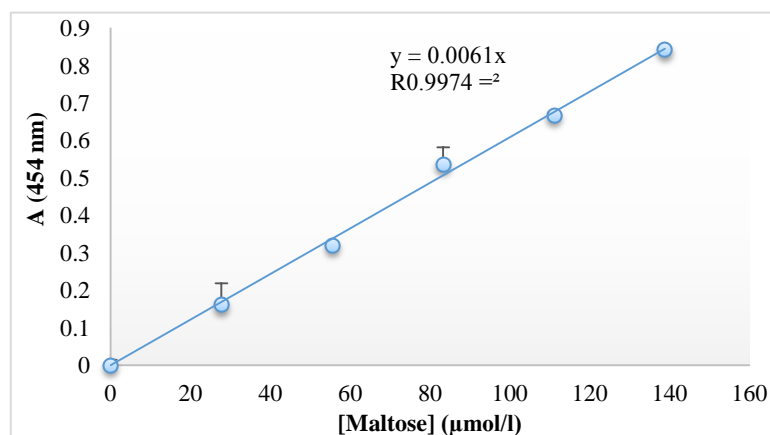


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du maltose

Le suivi de l'apparition du maltose en fonction du temps nous a permis de tracer la courbe donnant la variation de la concentration du maltose ($\mu\text{mol/l}$) en fonction du temps (min) (**Figure 7**).

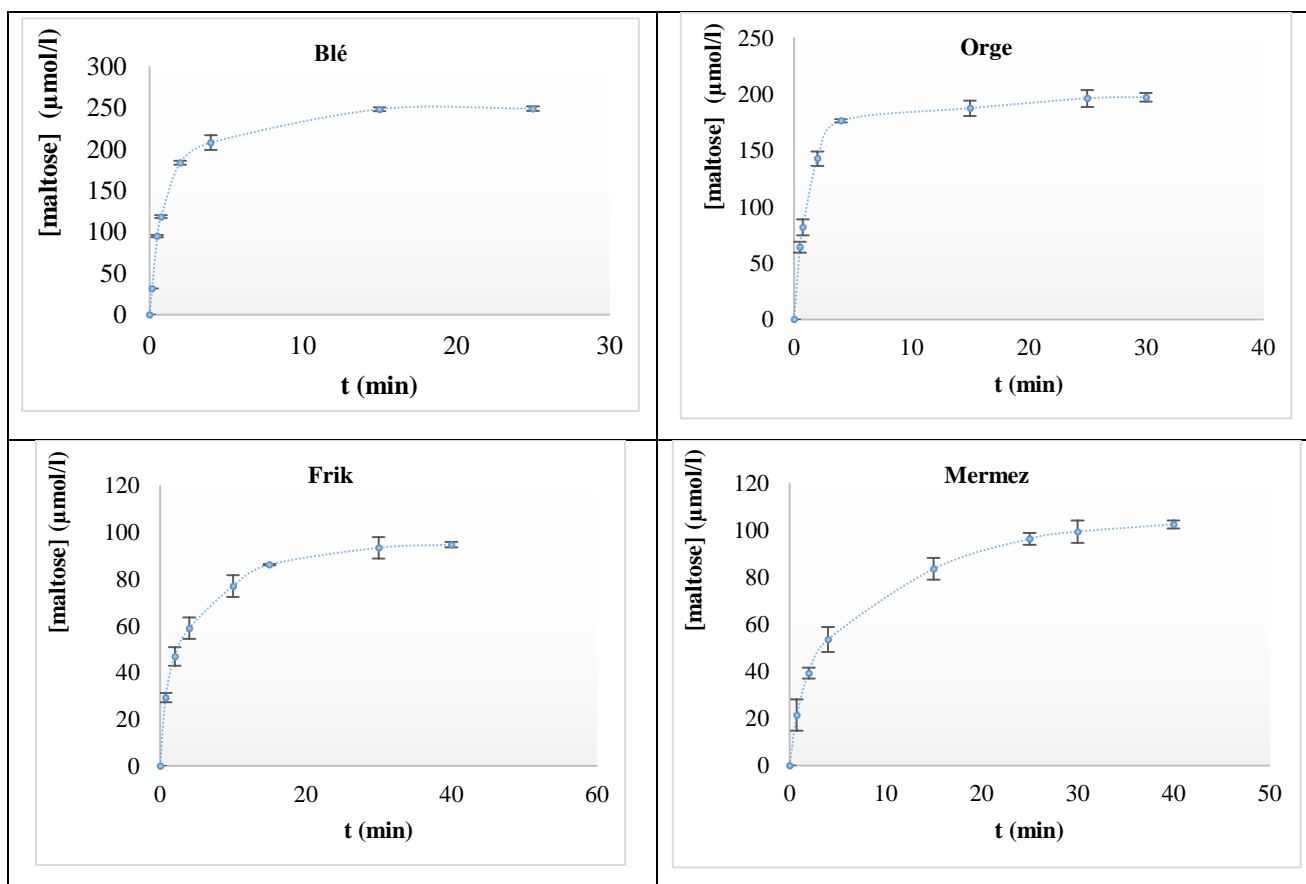


Figure 7 : Cinétique d'apparition du maltose par hydrolyse amyolytique des amidons étudiés

A l'aide de la courbe de la **Figure 7**, nous avons déterminé la concentration maximale du maltose libéré et le temps nécessaire pour atteindre l'hydrolyse amyolytique totale des amidons étudiés. Les résultats de l'effet amyolytique sur les quatre échantillons d'amidon sont mentionnés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Résultat de la cinétique d'apparition du maltose

	Temps de stabilisation (min)	Concentration maximale du maltose libéré ($\mu\text{mol/l}$)	Les vitesses initiales ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Blé	4	249,02 \pm 2,62	190,00 \pm 2,78
Orge	5	148,42 \pm 3,94	108,96 \pm 6,66
Mermez	15	102,54 \pm 1,73	23,44 \pm 1,39
Frik	20	94,75 \pm 1,15	19,67 \pm 0,81

La cinétique de libération totale du maltose varie de façon significative dans un intervalle de 4 à 20 min selon la source de l'amidon. Les temps varient et peuvent atteindre un rapport de 1/5 pour la même concentration en substrat. L'amidon du Blé semble être le plus rapide à hydrolyser relativement aux autres amidons, alors que l'amidon du Frik se dégrade avec la plus faible vitesse 19,67 \pm 0,81 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Cela pourrait être dû à la nature de l'amidon ou à la présence des autres constituants du grain qui influent aussi sur la vitesse de l'hydrolyse amylasique. Celle-ci est maximale quand l'amidon est isolé. L'hydrolyse des amidons déprotéinés et délipidés donne des vitesses similaires. Toutefois, la comparaison des réactivités des substrats amylicés en présence de la même enzyme, montrent l'influence de la source botanique des amidons et donc de la structure de l'amidon. En effet, (LIN L. et al., 2016). Ont constaté que les teneurs élevées en amylose, les composés intermédiaires, et les longues chaînes d'amylopectine augmentent la résistance de l'amidon à l'hydrolyse enzymatique et la digestion *in vitro*.

D'autre part, le **Tableau 6** montre que les valeurs maximales du maltose libéré en présence de l' α -amylase pancréatique sont comprises entre 94,75 \pm 1,15 et 249,02 \pm 2,62 $\mu\text{mol/l}$. L'amidon de la farine du Blé a donné la meilleure teneur en maltose par rapport à tous les autres amidons avec une valeur de 249,02 \pm 2,62 $\mu\text{mol/l}$. En revanche, la plus faible teneur en maltose libéré a été obtenu pour l'amidon isolé du Frik. En effet, il ne dépasse pas 33 % de celui du Blé. Concernant l'amidon de l'Orge, le taux d'hydrolyse en maltose est aussi plus faible que celui d'amidon du Blé mais plus élevé de celui de l'amidon de Mermez.

D'autre part, nous avons suivi l'évolution de l'apparition du glucose en se basant sur la courbe d'étalonnage du glucose (**Figure 8**). Nous avons pu déterminer les concentrations du glucose libéré dans le milieu réactionnel pour une concentration fixée d'amidon pour les quatre échantillons.

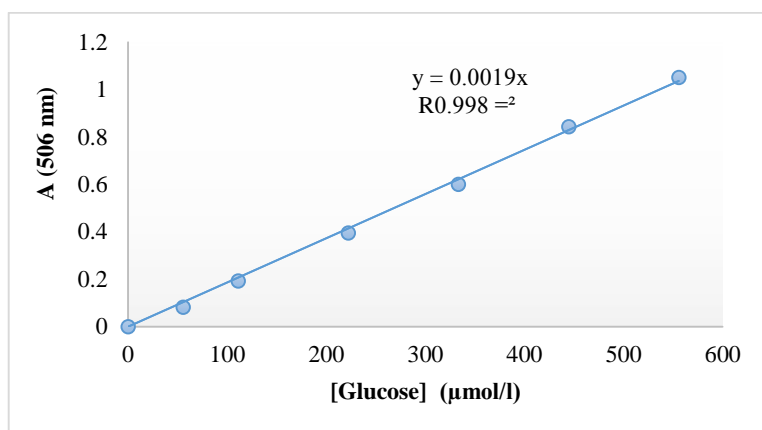


Figure 8 : Courbe d'étalonnage du glucose

Les valeurs obtenues des concentrations en glucose, nous ont permis de tracer les courbes de la cinétique d'apparition du glucose pour chaque échantillon d'amidon (**Figure 9**).

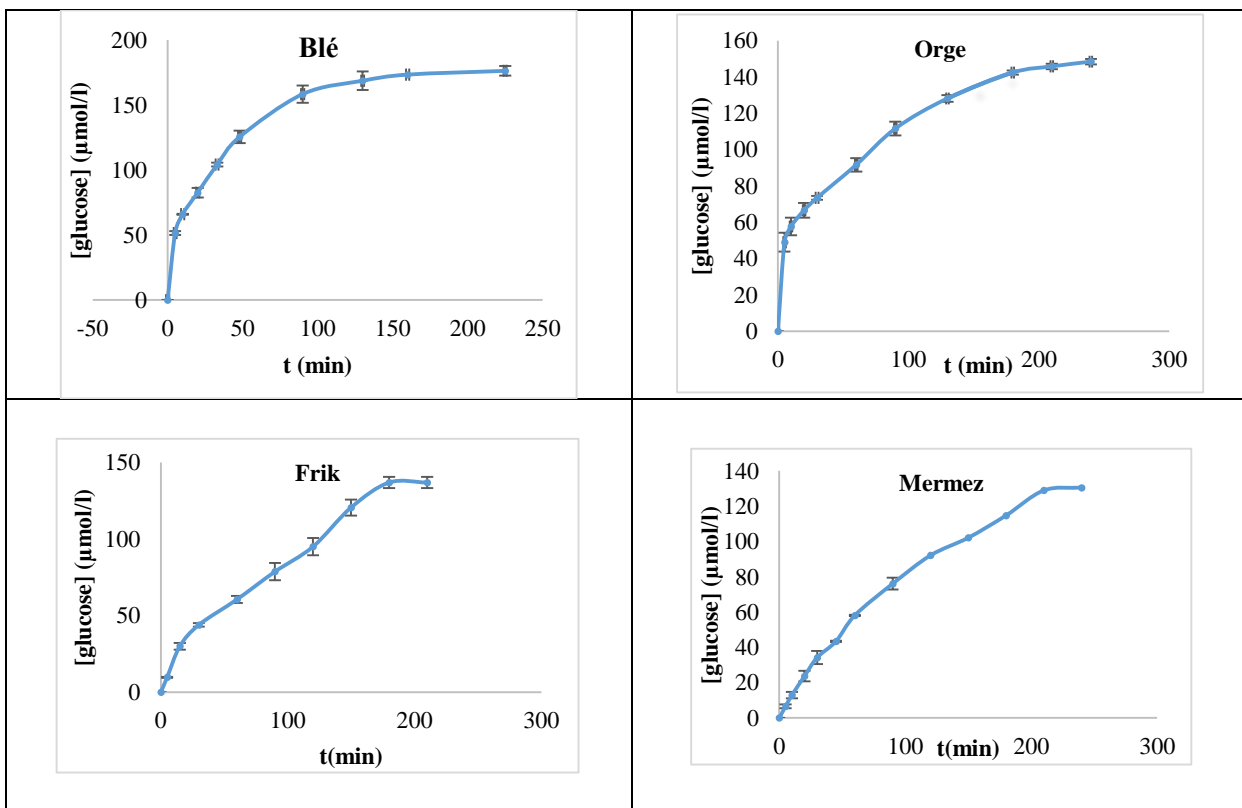


Figure 9 : Cinétique d'apparition du glucose par hydrolyse amylolytique des amidons étudiés

D'après la **Figure 9**, on remarque que tous les amidons testés sont capables de libérer le glucose. Les résultats obtenus montrent l'influence de la source d'amidon utilisé sur la teneur du glucose libéré. Les concentrations en glucose dosées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique sont différentes. Le **Tableau 7** regroupe les résultats des concentrations maximales du glucose libéré et le temps nécessaire pour atteindre l'hydrolyse amylolytique totale des amidons étudiés.

Tableau 7 : Résultat de la cinétique d'apparition du glucose

	Temps de stabilisation (min)	Concentration maximale du glucose libéré ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Les vitesses initiales ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Blé	90	176,32 \pm 0,37	10,31 \pm 0,21
Orge	190	148,42 \pm 1,48	9,78 \pm 0,73
Frik	180	136,84 \pm 3,72	2,00 \pm 0,10
Mermez	240	130,53 \pm 1,40	1,28 \pm 0,13

La **Figure 9** et le **Tableau 7** montrent que les domaines du temps d'enzyme capable d'assurer une saturation en glucose sont compris entre 90 min et 240 min dès l'addition de l'enzyme α -amylase pancréatique 2g/l. Les temps d'hydrolyse des amidons en glucose de l'Orge et du Frik sont relativement proches. Par contre, le temps de l'activité amylolytique de l'amidon du Mermez se distingue, il est relativement plus élevé à qui lui confère une faible vitesse amylolytique 1,28 \pm 0,13 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$. L'amidon du Blé présente un temps d'hydrolyse le plus faible.

D'autre part, on remarque que les valeurs des concentrations maximales de glucose sont comprises entre 130,53 \pm 1,40 et 176,32 \pm 0,37 $\mu\text{mol/l}$. La plus grande teneur est obtenue pour l'amidon du Blé suivi de l'amidon de l'Orge puis l'amidon du Frik et en fin l'amidon du Mermez. Cependant, la concentration totale en glucose libéré par les amidons du Mermez et Frik sont légèrement comparable. La teneur en glucose de l'amidon du Mermez est la plus faible. Toutefois, on remarque que la susceptibilité des trois amidons de libérer le glucose du Frik, du Mermez et de l'Orge sont relativement voisine.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que la quantité de glucose libéré de l'hydrolyse amidonnerie par l' α -amylase est très faible par rapport à la quantité du maltose. Ce résultat peut être expliqué que l'enzyme α -amylase n'est pas spécifique à la production du glucose. Cela explique qu'au moment où l'enzyme α -amylase produit le maltose, elle libère quelque unité de glucose. En générale les ramifications de l'amylopectine est la source des unités en glucose (**MAZUR K. et HIROSHI N., 1993**). Donc, la différence de la quantité du glucose libéré peut être expliquée par la différence du pourcentage de l'amylopectine présents dans les quatre amidons. Aussi par la différence d'affinité enzyme-substrat.

D'autre côté, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation positive et significative entre les concentrations en maltose et glucose libérés ($r = 0,985$; $p = 0,015$) (**Tableau 5**). Ce résultat suggère que les amidons qui ont fourni un taux de maltose important exposent également une teneur en glucose aussi forte. C'est-à-dire, 98,5 % de la composition des amidons étudiés présentent le même rapport quantitatif amylose/amylopectine.

La diététique joue un rôle majeur dans l'équilibre du diabète. Compte tenu de ses effets sur l'équilibre glycémique, l'alimentation est une préoccupation constante pour la personne diabétique qui doit bien choisir ses aliments en fonction de sa vie courante et de chaque situation.

Il existe un classement nutritionnel des glucides selon leur capacité à élever la glycémie. Cependant, pour chaque aliment est associée la notion d'index glycémique (IG). L'IG reflète la rapidité avec laquelle les glucides d'un aliment sont digérés, convertis et retrouvés sous forme de glucose dans le sang. Plus le niveau de glucose sanguin augmente à la suite de la consommation d'un aliment, plus l'IG de cet aliment est élevé (**ROSSI F., 1998**). Alors, la connaissance de cet index permet de classer les aliments et d'orienter le conseil nutritionnel vers la consommation d'aliments à IG faible. Les résultats obtenus confirment les informations existantes sur le profil nutritionnel antidiabétique du Frik et du Mermez. En outre les amidons du Frik et du Mermez qui ont donné des cinétiques amylolytiques lentes avec des quantités en sucres réducteurs et glucose faibles, peuvent contenir des quantités appréciables de glucides non digestibles qui sont associées aux réponses au glucose sanguin postprandial. Cela suggère qu'ils sont susceptibles d'avoir des effets positifs sur la santé et la fonction du côlon en ralentissant la vidange gastrique, retardant l'absorption de glucose et améliorant la réponse glycémique postprandial.

Conclusion générale

IV. Conclusion générale

Le secteur des céréales (Blé, Orge, Mermaz et le Frik) se situe au premier ordre des priorités économiques et sociales du pays vu le rôle important que jouent le Blé et l'Orge dans le régime alimentaire du peuple algérien. Cette importance ont suscité notre attention et ont fait l'objet de cette étude en vue de leur valorisation dans le domaine des aliments diététiques antidiabétiques.

De ce fait, le travail a consisté en une purification partielle des amidons ainsi que la connaissance de leurs teneurs dans ces quatre échantillons des deux céréales, la cinétique enzymatique a été adoptée pour étudier la susceptibilité de ces amidons à l'hydrolyse par l' α -amylase pancréatique porcine.

Les résultats obtenus montrent que l'amidon a été isolé avec une pureté supérieure selon le procédé d'isolement proposé par Martin. Il faut relever les difficultés d'isolement des amidons à partir des grains de Frik et du Mermez par rapport aux Blé et Orge à cause de la composition et la structure du grain et notamment la composition des protéines. Les teneurs des amidons sont variables entre les différents grains des céréales investiguées. La teneur la plus élevée est constatée dans les graines de Blé. Tandis que, la teneur la plus faible a été enregistrée pour les grains de Frik et Mermez.

Par ailleurs, l' α -amylase pancréatique de porc est capable d'hydrolyser les amidons des quatre échantillons investiguées. Les résultats de l'étude cinétique ont montré l'influence de la source de l'amidon sur l'hydrolyse enzymatique en sucres réducteurs équivalents en maltose et en glucose. Ainsi, la faible affinité à l'action amylolytique est obtenue pour les amidons du Frik et du Mermez. En outre ces deux derniers amidons ont donné des cinétiques amylolytiques lentes avec des quantités en sucres réducteurs et glucose faibles. Cela suggère que le Frik et le Mermez sont susceptible d'avoir des effets positifs sur l'amélioration de la réponse glycémique postprandiale et sur la fonction du côlon en ralentissant la vidange gastrique.

Les résultats obtenus confirment les informations existantes sur le profil nutritionnel antidiabétique du Frik et du Mermez. Cependant, le Frik et le Mermez sont très appréciés du point de vue organoleptique et nutritionnel. Alors, la production du Frik et du Mermez donne un avantage économique pour les agriculteurs locaux, car il est habituellement vendu à un prix qui est trois fois plus élevé que le Blé et que l'Orge.

Conclusion générale

Enfin, ces résultats mériteraient d'être approfondis et ce travail n'est cependant pas encore terminé, les prochaines étapes consisteront à étudier expérimentalement *in vitro* et/ou *in vivo* :

- L'étude de l'action amylolytique sur des amidons d'autres variétés du Blé, d'Orge, du Mermez et du Frik.
- L'étude de l'effet inhibiteur de deux enzymes, l' α -amylase et l' α -glucosidase par les différents extraits des sons.
- L'étude *in vivo* de l'effet hypoglycémiant des amidons et des sons des graines du Blé, Orge, Frik et Mermez.

Références

V. Références

- **ALICE Y.Y. et DAVID C.W. 2013.** The Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines Raising the Bar and Setting Higher Standards. Canadian Journal of Diabetes, volume 37:137-138.
- **BENHAJ S. 2015.** Nanoparticules d'amidon : préparation, pouvoir renforçant et utilisation comme agent de stabilisation. Thèse doctorat, Université de Grenoble – France.
- **BENNACER H. 2017.** Effet inhibiteur des extraits de *Zygophyllum geslini* sur l'activité d'alpha-amylase. Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen – Algérie.
- **BENATALLAH-BENCHIKH EL FEGGOUN L. 2009.** Couscous et pain sans gluten pour malades cœliaques : aptitude technologique de formules à base de riz et de légumes secs. Thèse doctorat, université mentouri de constantine – Algérie.
- **BOUDRIES-KAC N. 2017.** caractérisation des es amidons de sorgho et de mil perle cultivés dans le sahara algérien. Thèse doctorat, université de liège – Belgium.
- **BJORCK A., ELIASSON C., DREWS A., GUDMUNDSSON M. et KARLSSON R. 1990.** Some Nutritional Properties of Starch and Dietary Fiber in Barley Genotypes Containing Different Levels of Amylose. Journal of Cereal Chemistry, volume 67:327-333.
- **CLEMENT D. 2010.** Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyseprotéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse doctorat, l'Université Blaise Pascal – France.
- **DJERMOUN A. 2009.** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques, Département d'Agronomie. Université de Hassiba Benbouali de Chlef – Algérie.
- **DJELTI H. 2014.** étude de la qualité du blé tendre utilise en meunière al génienne, université abou bekr belkaid – tlemcen – Algérie.
- **DYGERT S., FLORIDA D. A. et THOMA J.A. 1965.** Determination of Reducing Sugar with Improved Precision. Journal of analytical biochemistry, volume 13:367-374
- **FAO.2018-2019.** Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization). <http://www.fao.org/home/ar/>.
- **GOLDENBERG R. et PUNTHAKEE Z. 2013.** Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome, Canadian Journal of Diabetes, volume 37: 8-11.
- **HUBER S. 2015.** Le diabète de type 1 et ses défis alimentaires quotidiens : apport de l'insulinothérapie fonctionnelle avec l'exemple de Samy. Sciences pharmaceutiques. Thèse doctorat, l'Université Bordeaux – France.

- **HÉNIN F. 2018.** une production céréales mondial largement insuffisante. La France Agricole, <https://www.terre-net.fr/marche-agricole/actualite-marche-agricole/article/la-planete-manque-de-ble-dur-1395-111066.html>.
- **KHELFALLAH A. 2013.** Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Mémoire Magister Université Constantine 1 – Algérie.
- **KONSULA Z., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. 2004.** Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Process Biochemistry*, volume 39: 1745–1749.
- **LEE C., KIM C.H., RHEE S.K. et TAEJON K.1992.** A kinetic model and simulation of starch saccharification and simultaneous ethanol fermentation by amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioprocess Engineering*, volume 7: 335-343.
- **LIN L., Guo D., HUANG J., ZHANG X. et ZHANG L.,2016.** α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. *Journal of Food hydrocolloids*, Volume 58, : 246-254
- **MAZUR K. et HIROSHI N. 1993.** Multuole attck mechanisn in the porcine pancreatic alpha amylase hydrolysis of amylose and amylopectin. *Journal of biochemistry and biophysics*, volume 306:29–38.
- **MBOUGUENG P. 2009.** influence des amidons natifs ou acetyles de manioc et de pomme de terre sur les proprietes physico-chimiques et texturales de la pâte de bœuf (*bos indicus*). Thèse doctorat, universite de ngaoundere – Cameroon.
- **MURRAY S. M., FAHEY G. C., MERCHEN N. R., SUNVOLD G. D. et REINHART G. A. 1999.** Evaluation of Selected High-Starch Flours as Ingredients in Canine Diets. *Journal of Animal Science*, volume 77:2180–2186.
- **MOUAS K. 2016.** Extraction, purification et caractérisation d’une enzyme amylolytique issue de *Bacillus amyloliquefaciens*, Mémoire de master, universite m’hamed bougara boumerdes – Algérie.
- **ONFAA.** Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires. <http://onfaa.inraa.dz/>.
- **REVUE DE PRESSE. 2018.** Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires (ONFAA, 2018).
- **RICHARD F., KARKALAS J. et XIN Q. 2004.** Starch composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, volume 39: 151–165.
- **ROSSI F. 1998.** alimentation et insuline résistance Chez L E Diabétique, Non-insuline dépendant. *Journal of diabète et métabolisme paris*, volume 24, 89-93.

- **SRABONI K., TANVIR M., AZIZUR R. et AL-AMIN F. 2016.** Extraction of Starch from Different Sources: Their Modification and Evaluation of Properties as Pharmaceutical Excipient. Dhaka University, journal of science, volume 59: 263-266.
- **VAN DENEINDE R.M. VAN DERGOOT A.J. BOOM R.M. 2003.** Understanding molecular weight reduction of starch during heating – shearing processes. journal of food science volume 68: 2396-2404.
- **ZHUGE Q., PERSAUD J.N., POSNER E.S., DEYOE C.W., SEIB P.A. et CHUNG D.S. 1991.** Isolation of gluten and starch from ground, pearled wheat compared to isolation from flour. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, volume 90:78-84.

ملخص :

تم التطرق في هذا العمل إلى دراسة مخبرية حول فعالية تفكيك الأنزيم ألفا-أميلاز الخنزير للنشاء المستخلص من طحين القمح الصلب والشعير و المرمرز و الفريك. أظهرت نتائج إستخلاص النشاء باستعمال طريقة الرشح أن مردود الاستخلاص تراوح بين 12,57% و 55,58% سجلت فرينة القمح أعلى نسبة مردود نشاء بقيمة (58,55%). أما بالنسبة للمرمرز و الفريك فقد سجلا أدنى مردود للنشاء بقيمة 12,57% و 12,65% تتابعا. بينت دراسة الحركيات الأنزيمية لظهور السكريات المرجعة والجليكوز أن الوقت اللازم لثبات انتاج المالتوز والجليكوز بين 4 و 20 دقيقة وبين 90 و 240 دقيقة تتابعا. من جهة أخرى، أظهر تقدير الثوابت الحركية للعملية الأميلوليتيكية (amylytique) أن قيم ثوابت الخصوصية (k_{sp}) جد مختلفة. لوحظ وجود قيمة منخفضة للغاية لنشاء الفريك مما يؤكد انخفاض قابلية تفككه إلى سكريات مرجعة بالنسبة لعينات النشاء الأخرى. هذا يشير إلى أن الفريك من المرجح أن يكون له آثار إيجابية على مستوى نسبة السكر في الدم بعد الأكل. في الختام، إن النتائج المتحصل عليها في هذا العمل مشجعة للغاية وتشير إلى أن الفريك و المرمرز يمكن أن يستهلكا كغذاءين للحمية ضد ارتفاع نسبة السكر في الدم.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، شعير، مرمرز، فريك، نشاء، ألفا-أميلاز، الثوابت الحركية، داء السكري.

Résumé :

Ce travail a étudié *in vitro* l'efficacité de l' α -amylase pancréatique du porc sur la dégradation des amidons extraits à partir des farines du Blé dur, d'Orge, du Mermez et du Frik. L'extraction de l'amidon réalisée par la méthode de lixiviation a montré des rendements d'extraction qui varient entre 12,57% et 55,58%. L'amidon de farine du blé a enregistré le plus important rendement (55,58%). Alors que, les quantités d'amidon les plus faibles étaient trouvées dans les farines du Mermez et du Frik avec des rendements similaires de 12,65% et 12,57% respectivement. La cinétique enzymatique d'apparition des sucres réducteurs et du glucose montre que les temps nécessaires pour la stabilisation de la production de maltose et du glucose sont de 4 à 20 minutes et de 90 à 240 minutes, respectivement. D'autre part, la détermination des paramètres cinétiques de l'action amylytique a montré que les valeurs des constantes de spécificité (K_{sp}) obtenus sont très différentes. Une valeur très faible a été observée pour l'amidon du Frik, ce qui confirme sa faible susceptibilité à l'hydrolyse en sucres réducteurs relativement aux autres amidons. Cela suggère que le Frik est susceptible d'avoir des effets positifs sur l'amélioration de la réponse glycémique postprandiale. En conclusion, les résultats obtenus dans ce travail sont très encourageants et suggèrent que le Frik et le Mermez peuvent être consommé comme des aliments diététiques hypoglycémiant.

Mots-clés: Blé, Orge, Mermez, Frik, amidon, α -amylase, constantes enzymatiques, diabète.

Abstract :

This work investigated the *in vitro* efficacy of porcine pancreatic α -amylase on the degradation of starches extracted from durum wheat, barley, Mermez and Frik flours. The extraction of starch carried out by the lixiviation method, showed extraction yields ranging from 12.57% to 55.58%. The wheat flour starch has recorded the highest yield (55.58%). While, the lowest amounts of starch were found in the Frik and Mermez flours with similar yields of 12.65% and 12.57% respectively. The enzymatic kinetics of reducing sugars and glucose appearance shows that stabilization times of maltose and glucose production are ranged from 4 to 20 minutes and from 90 to 240 minutes, respectively. On the other hand, the determination of the kinetic parameters of the amylytic action showed that the obtained specificity constants values (K_{sp}) are very different. A very low value was observed for the Frik starch, which confirms its low hydrolysis susceptibility to reducing sugars relatively to the other starches. This fact suggests that Frik is susceptible to positive effects for the amelioration of postprandial glycemic response. In conclusion, the obtained results in this work are very encouraging and suggest that the Frik and the Mermez can be avoided as dietetic hypoglycemia foods.

Keywords: Wheat, Barley, Mermez, Frik, starch, enzymatic constants, diabete.