

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

العلمي والبحث وزارة التعليم العالي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

عمار ثلجي بالاغواط جامعة

UNIVERSITE AMAR TELIDJI, LAGHOUAT



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم: علوم المادة

Département : Science de la Matière

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Matière
Filière : Chimie
Option : Chimie moléculaire et matériaux
inorganique

Présenté par

KERMA OUMELKHEIR

THEME

Hydrolyse enzymatique d'amidon

Soutenu Publiquement devant le jury:

Mr.KORIBA.BAKTI	MAA	Président
Mr. SEBIANE SOFIANE	MAA	Examineur
Mme. NOURDDINE ASMA	MAA	Examinatrice
Mr. HERIZI ABDALLAH	MAA	Encadreur

Promotion 2016/2017

DEDICACES

Ce travail est dédié à toute ma famille:

A ma mère, à mon père.

A ma chère sœur.

A mes chers frères

A tous mes proches et tous mes amis

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à Allah, le tout puissant, clément et miséricordieux pour m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce travail.

Au terme de ce travail nous remercier en premier lieu Je remercie très chaleureusement mes parents, pour leurs patiences, leurs encouragements et leurs aides précieuses tout au long de ma vie, sans eux je n'en serai pas arrivé là.

Mes remerciements vont particulièrement à
Mon encadreur de mémoire, Mr. HERIZI Abdellah Maitre Assistant
Classe A à l'Université de Laghouat. pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation. , pour son aide précieuse, pour ses surtout pour le temps qu'elle nous a accordée et ceci malgré ses nombreuses charges.

Mes remerciements également les membres du jury : Mr.KORIBA. B
Classe A à l'Université de Laghouat. d'avoir accepter de présider notre mémoire.

Mes remerciements Mme. NOURDINE.A Classe A à l'Université de Laghouat. pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour sa participation au jury.

Mes remerciements Mr. SEBIEN.S Classe A à l'Université de Laghouat. pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour sa participation au jury.
Mes remerciements à tous nos enseignants durant ces cinq ans d'études universitaires.

Mes remerciements le chef de département des Sciences de la Matière à l'Université Amar Telidji de Laghouat Mr. Hamdi Ahmed.

Enfin Je ne peux pas oublier le soutien de ma sœur et mes frères et toute ma famille et mes amis.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1
Première Partie : Synthèse Bibliographique	
I. Les amidons.....	2
I .1.Introduction.....	2
I.2. Définition.....	2
I .3. Structure de l'amidon.....	3
I .3.1-L'amylose.....	3
I .3.2 -L'amylopectine.....	4
I .4. Les amidons natifs et Les amidons modifiés.....	4
I .4. 1. Les amidons natifs.....	4
I .4. 2. Les amidons modifiés.....	5
I .5. Les Propriétés d'amidons.....	5
I .5.1. Les Propriétés d'amidons natifs.....	5
a)- Propriétés physiques.....	5
b)- Propriétés chimiques.....	6
I .5.2. Les Propriétés d'amidons modifiés.....	6
II .Les enzymes.....	8
II .1.Introduction.....	8
II .2.Historique.....	8
II .3.Définition.....	9
II .4.Structure des enzymes.....	9
II .4.1.Site actif des enzymes.....	10
II .5.Propriétés de catalyseur.....	11
II .6.Classification des enzymes.....	11
III. cinétique enzymatique.....	12
III.1.Introduction.....	12
III.2.Cinétiques enzymatiques.....	12
III.2.1.Modèle de Michaëlis-Menten.....	12
III.3.Méthodes d'analyse des données cinétiques.....	13

III.3.1.Méthode graphique de Line weaver et Burk.....	14
III.3.2.Méthode graphique d'Eadie Hofstee.....	15
III.4.Les constantes cinétiques.....	15
Deuxième Partie : expérimentale et calcul entrepris.	
I.Méthodes	17
I.1. La méthode expérimentale pour étude l'hydrolyse de l'amidon (la méthode DNS).....	17
I .1.1.Principe de la méthode.....	17
I .1.2. produits utilisés.....	17
I .1.3.préparation des solutions.....	17
I .1.4.Test de l'activité de l'enzyme libre.....	18
a)-Définition de l'activité de l'enzyme.....	18
b)-Mesure de l'activité par la méthode DNS (MILLER 1959).....	18
I.1.5. Effet de quelques facteurs sur l'activité de l'enzyme libre.....	20
a)-L'effet de la température.....	20
b)-.Effet du PH.....	21
I.2. Hydrolyse d'amidon.....	22
I.2.1.Détermination des constantes cinétiques de l' α -amylase libre.....	22
I.2.1.1.La méthode DNS.....	22
I.2.1.2. La détermination des constantes cinétiques.....	24
a)-Méthode graphique de Line weaver et Burk.....	24
b)-Méthode graphique d'Eadie Hofstee.....	24
Conclusion général.....	26

Liste des abréviations

DNS : dinitrosalicylique

E : l'enzyme.

ES : complexe enzyme-substrat.

K : Constante de la vitesse de la réaction.

K_M : Constante de Michaelis.

K_{cat} : Constante catalytique

P : produit.

S : substrat.

V_M : Vitesse maximale

Liste des figures

Figure. 1. Structure interne d'un grain d'amidon	3
Figure 2. Schématique de l'amylose et l'amylopectine	3
Figure. 3. Structure chimique de l'amylose.....	4
Figure .4. Structure moléculaire de l'amylopectine.....	4
Figure.5. digestion de l'amidon par l'amylose.....	7
Figure.6.Représentation schématique de la structure tertiaire.....	10
Figure.7. schématique de la structure quaternaire.....	10
Figure.8. Schéma du mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique (site actif).....	11
Figure.9.La représentation de Lineweaver-burk. de $1/v$ en fonction de $1/[S]_0$	14
Figure.10.La représentation d'Eadie Hofsteede ven fonction de $\frac{v}{[S]_0}$	15
Figure.11. : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.....	17
Figure.12.Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre de la concentration du maltose oxydé $A=f(C_{\text{maltose}})$	19
Figure.13.Représentation graphique $n_{\text{maltose}}=f(m_{\text{enzyme}})$	20
Figure.14.Graph Représente le domaine d'activité de l'amylose (domaine linéaire)....	20
Figure .15. Représentation graphique activité relative $=f(T)$	21
Figure .16. Représentation graphique activité relative $=f(\text{pH})$	22
Figure .17. Représentation graphique nombre de mol des sucre produit de l'hydrolyse en fonction de temps de l'enzyme avec des concentrations différent pour l'amidon égale $n_{\text{maltose}}=f(T)$	23
Figure.18. Représentation graphique de Lineweaver et Burck $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$	24
Figure .19.Représentation graphique d'Eadie Hofstee de v en fonction de $\frac{v}{[S]_0}$	25

Liste des tableaux

Tableau. 1. Teneur en amylose et amylopectine des amidons.....	3
Tableau.2. Additifs autorisés.....	5
Tableau.3. Classification des enzymes.....	11
Tableau.4. Etapes d'élaboration de la courbe d'étalonnage des sucres réducteurs (équivalent en maltose).....	18
Tableau.5. Variation de la concentration des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse en fonction de la concentration de l'enzyme ($C_{\text{amidon}}=1\% \text{ m/v}$).....	20
Tableau.6. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température.....	21
Tableau.7. Variation de l'activité enzymatique en fonction PH.....	21
Tableau.8. de vitesse de la réaction de chaque concentrations de l'amidon de pomme de terre.....	23
Tableau.9. Les constantes cinétiques par deux méthodes.....	25

Introduction générale

Introduction générale

Les amidons sont des polysaccharides d'origine végétale se trouvant principalement dans les grains de céréales et dans les tubercules. Certains fruits peuvent également être riches en amidon. Les amidons diffèrent les uns des autres par la forme et la taille de leurs granules, et par les proportions respectives des chaînes d'amylose et d'amylopectine qui conditionnent leurs propriétés physiques. Le rôle nutritionnel des amidons est particulièrement important puisqu'ils constituent, après hydrolyse digestive en glucose, la principale source de calories de l'alimentation humaine. Les amidons jouent également un rôle important en technologie alimentaire. [1] qui suscite un intérêt croissant dans des applications alimentaires et non alimentaires. Les applications de l'amidon sont diverses et variées dans de nombreux secteurs industriels non alimentaires : la production papetière, l'industrie pharmaceutique, cosmétique, textile etc...

Il est devenu également ces dernières années une matière première intéressante pour la production de matières plastiques biodégradables ainsi que pour la production de bioéthanol, en tant que carburant. Néanmoins, dû à leurs valeurs nutritionnelles, les amidons sont surtout utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Mis à part cette valeur nutritive propre aux glucides, les amidons sont ajoutés aux préparations alimentaires car ils exercent une grande influence sur la viscosité, la texture et le goût des produits dans lesquels ils sont incorporés. Les amidons natifs sont adaptés à la plupart des applications industrielles. Cependant, il peut être nécessaire, dans certains cas, d'améliorer leurs performances par un ensemble de modifications physiques, chimiques et enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques et nutritionnels spécifiques. Les principaux utilisateurs des amidons modifiés sont les industries alimentaires [2] L'objectif de notre travail c'est la détermination des conditions optimale pour obtenir une meilleur activité d'enzyme alpha amylase (*Aspergillus Oryzae*), l'étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique d'amidon de pomme de terre et détermine les paramètres.

La présentation du mémoire est structurée comme suit : La Premières partie c'est une étude bibliographie (généralités sur les amidons, les enzymes et la cinétique enzymatique) dans la deuxième partie seront des méthodes utilise au cours du travail et partie expérimentale et consacré à la discussion des résultats de la modification de l'amidon ainsi qu'à l'analyse des produits obtenus par les différentes méthodes de caractérisations.

Une conclusion générale sera donnée à la fin du mémoire et par laquelle nous récapitulerons succinctement les différents travaux entrepris dans ce mémoire et mettrons en valeur les principaux résultats obtenus.

Première Partie :
Synthèse
Bibliographique

I .Les amidons

I .1.Introduction

Les amidons sont des ingrédients naturels et traditionnels de l'industrie alimentaire.

Outre leur valeur nutritive et énergétique propre aux glucides, les amidons ont de multiples propriétés : lier, épaissir, texturer, stabiliser, gélifier... [3]

Et c'est souvent pour un ensemble de propriétés que l'amidon est utilisé dans la constitution d'un plat: onctuosité, légèreté, aspect brillant...

A titre d'exemple, l'amidon permet d'obtenir, au contraire de textures trop longues qui tapissent le palais, les textures plus courtes et non couvrantes recherchées aujourd'hui, qui laissent s'exprimer les profils aromatiques et la matière grasse.

Les propriétés des amidons sont bien connues, même si les connaissances continuent de progresser dans la compréhension des bases physico-chimiques de leurs applications.

L'amidon est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire, en particulier dans le secteur en plein développement des plats préparés, mais aussi de plus en plus dans l'industrie papetière, dans la pharmacie et dans la chimie notamment des plastiques. Dans ce domaine, l'amidon peut se substituer aux dérivés du pétrole avec comme double avantage que l'amidon est constitué de carbone renouvelable et que les bioplastiques issus de l'amidon sont biodégradables. [4]

I .2.Définition

L'amidon est le sucre de réserve des plantes. C'est à dire que c'est surtout sous cette forme que les plantes mettent en réserve leurs surplus de glucose.

On retrouve de l'amidon surtout dans les racines, les graines et les fruits [5]. L'amidon est particulièrement abondant dans les céréales (riz, blé, maïs, etc.) et les tubercules (pommes de terre).

La formation d'amidon dans les plantes provient de la photosynthèse [6].

Permet à la plante d'absorber le carbone de l'atmosphère et de le transformer en glucose, pour se synthétiser ensuite en amidon. Les deux principaux polymères contenus dans l'amidon sont l'amylose et l'amylopectine. Leur proportion varie selon l'origine botanique et influence les caractéristiques et les propriétés de l'amidon. L'extraction d'amidon consiste à séparer les composants de la plante, à savoir l'amidon, les protéines, les germes et les fibres de cellulose. Le processus industriel implique une série de phases de séparation physique simples telles que le broyage, le tamisage, la centrifugation, la concentration et le séchage. Finalement, l'amidon arrive sur le marché sous une forme poudreuse sans odeur ni saveur. [5]

I.3. Structure de l'amidon

L'amidon est un mélange de deux homopolymères, l'amylose polymère linéaire et l'amylopectine polymère fortement branché.

La teneur en chacun des constituants est différente suivant l'origine de l'amidon

Tableau. 1. Teneur en amylose et amylopectine des amidons. [7]

Source botanique	Amylose (%)	Amylopectine (%)
Maïs	28	72
Pomme de terre	21	79
Blé	28	72
Maïs cireux (1)	0	100
Amylomaïs	50-80	50-20
Riz	17	83
Pois	35	65
Manioc	17	83

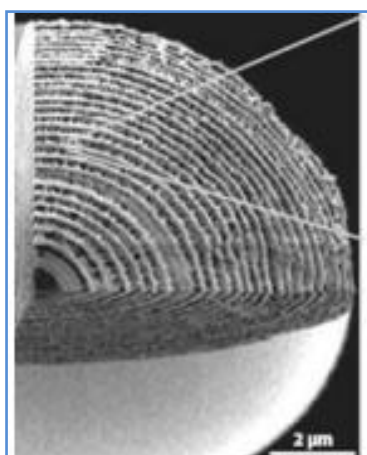


Figure 1. Structure interne d'un grain d'amidon [5]

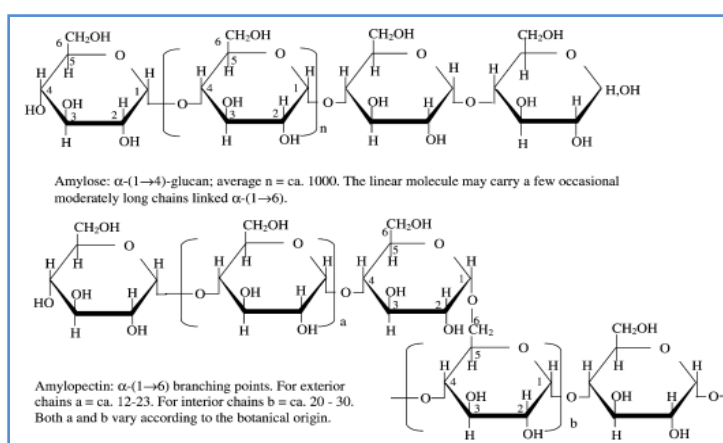


Figure 2. Schématique de l'amylose et l'amylopectine [8]

composés d'unités D-anhydroglucopyranose qui appartiennent à la famille des polysaccharides (ou polyosides) de formule chimique générale $(C_6H_{10}O_5)_n$. [9] Les unités sont liées entre elles par des liaisons α (1-4), en général caractéristiques des polyosides de réserve (à l'exception de l'inuline) et des liaisons α (1-6) qui sont à l'origine de ramifications dans la structure de la molécule. Ces deux homopolymères, qui diffèrent par leur degré de branchement et leur degré de polymérisation sont :

I.3.1-L'amylose

L'amylose est une structure linéaire constituée par un enchaînement de résidus de D-glucose. L'amylose représente 20 à 30% de la masse en amidon mais on peut caractériser des variétés botaniques où cette teneur est de l'ordre de 70% (amylomaïs) voire même voisine de 0% (waxy maïs).

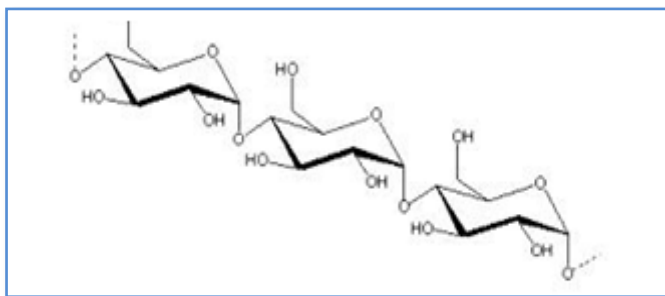


Figure. 3. Structure chimique de l'amylose [1]

I.3.2 -L'amylopectine

Elle représente 70 à 85% de la masse de l'amidon. Elle diffère de l'amylose du fait qu'il s'agit d'un polymère ramifié : -les glucoses des chaînes : liaison α -(1,4)-D-glucosidique
branchements entre chaînes : liaison α -(1,6)-D-glucosidique.

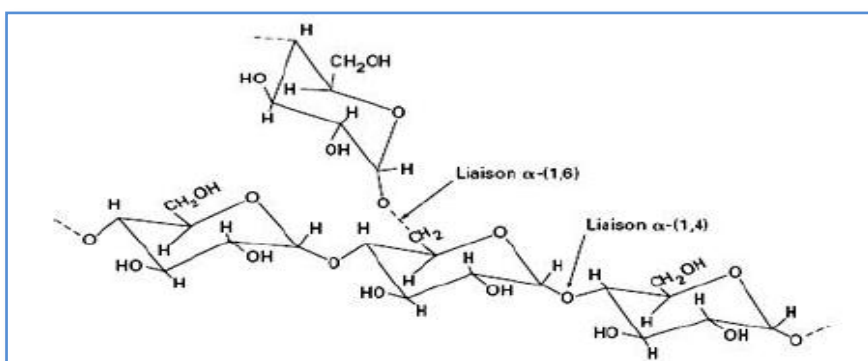


Figure .4. Structure moléculaire de l'amylopectine [10]

I.4. Les amidons natifs et Les amidons modifiés

I.4.1. Les amidons natifs

L'amidon natif correspond au produit brut, extrait sans modification de la molécule. Il est synthétisé à partir du D-glucose, sucre simple .produit pendant la photosynthèse des plantes
Les amidons jouent un rôle important en technologie alimentaire du fait de leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles. On le retrouve dans les graines (de céréales et de légumineuses) ainsi que dans les tubercules, les racines, les bulbes et les fruits. Les amidons natifs sont parfaitement adaptés à la plupart des applications, alimentaires et non alimentaires, où leurs propriétés demeurent irremplaçables. [1]

Cependant, il peut être nécessaire, dans certains cas, d'améliorer les performances des amidons et de répondre aux attentes des industries clientes, en leur procurant d'autres fonctions ou des comportements améliorés : solubilité à l'eau froide, viscosité plus stable aux variations de

température, fluidité à chaud, meilleure stabilité... On parle dans ce cas d'amidon modifié ou transformé.

I .4. 2. Les amidons modifiés

Il existe différentes technologies qui permettent d'obtenir des amidons modifiés en changeant la structure de base d'une molécule d'amidon. Les amidons modifiés sont des substances obtenues au moyen d'un ou plusieurs traitements chimiques d'amidon alimentaire. Ils peuvent avoir été soumis à un traitement physique ou enzymatique. Ces modifications visent à conserver leurs propriétés texturantes ou leur rôle d'épaississants sous des températures excessives ou dans les milieux acides au cours des procédés de transformations des aliments. en vue d'améliorer leurs propriétés intrinsèques.

Le code des amidons modifiés commence par E 14 : par exemple, E 1451 pour l'amidon oxydé acétylé ou E 1414 pour le phosphate de diamidon acétylé. Ces modifications fournissent des propriétés telles que la viscosité et la stabilité dans les produits laitiers

Tableau.2. Additifs autorisés. [11]

	Additifs autorisés
E 1404	amidon oxydé
E 1410	phosphate d'amidon
E 1412	phosphate de di-amidon
E 1413	phosphate de di-amidon phosphaté
E 1414	phosphate de di-amidon acétylé
E 1420	amidon acétylé
E 1422	adipate de di-amidon acétylé
E 1440	amidon hydroxypropylé
E 1442	phosphate de di-amidon hydroxypropylé
E 1450	octényle succinate d'amidon sodique

I .5. Les Propriétés d'amidons

I .5.1. Les Propriétés d'amidons natifs

a)- Propriétés physiques :

L'amidon a, comme tout produit, des propriétés physiques qui lui sont propres. Plusieurs facteurs entrent en jeu :

-Influence de la température : l'amidon est insoluble dans l'eau. Il forme, en revanche à chaud (70°C) une solution colloïdale qui épaissit en donnant un gel communément appelé empois. [12]

-La solubilité Les granules d'amidon sont insolubles dans l'eau à la température ambiante, mais vont gonfler à son contact. Ainsi, les molécules d'eau pénètrent rapidement dans les régions amorphes du granule, ce qui va avoir comme résultat la formation des ponts d'hydrogène avec les chaînes d'amylose et d'amylopectine. En chauffant la suspension d'amidon ou en l'ajoutant dans un milieu alcalin, il est possible de dissoudre les granules d'amidon. Ce processus se fait en deux étapes: la solubilisation de l'amylose qui sort du granule et la destruction du grain avec la libération de l'amylopectine. [13]

-Température de gélification : la gélification commence graduellement à partir de 50°C mais est effective ensuite à une température dépendante de l'agitation moléculaire, de la grosseur des grains, de la nature de l'amidon, de l'eau employée et de la concentration en amidon. [12]

-Hydrolyse enzymatique : Réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau et qui aboutit à la scission d'un composé. (réaction qui rompt une liaison par addition d'eau).

b)- Propriétés chimiques :

1-Au contact d'une solution iodo-iodurée, l'amidon prend une teinte violette (réaction entre l'amylose et l'iode). [14]

2-L'amidon est insoluble dans les solvants aqueux dans des conditions normales de température et de pression.[15] .Dans le cas des solvants organiques, l'amidon est soluble dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) dans des conditions douces. [16]

3- Action chimique et enzymatique : les acides entraînent une hydrolyse partielle de l'amidon qui conduit à la formation de dextrans. Le gel formé est moins épais. Cette hydrolyse est accélérée par une augmentation de température. L'amidon peut subir aussi l'action d'enzymes comme des enzymes végétales, ou animales (amylase) ou microbiennes. On constate que les amidons natifs ont déjà beaucoup d'influence sur la texture cependant leur fragilité face à certains paramètres comme la température ont conduit à l'utilisation d'amidons modifiés.[17]

I .5.2. Les Propriétés d'amidons modifiés

- Action de la chaleur et traitement acide L'action conjuguée de l'acidité et de la température (>100°C) permet une hydrolyse efficace.

Les coupures des chaînes d'amidon se font au hasard, d'où une action liquéfiante entraînant une diminution brutale de la viscosité. Ces deux technologies permettent aux amidons d'être solubles dans l'eau froide, et d'obtenir des préparations dont l'épaississement reste modéré. [18]

- Traitement enzymatique

Il permet une plus large diversité dans la composition glucidique. L'amidon est hydrolysé par différentes espèces d'amylase :

L'alpha amylase : elle coupe les liaisons 1-4 des amyloses, au hasard, c'est une enzyme liquéfiante.

La bêta amylase : elle libère surtout du maltose par rupture des liaisons 1-4 : hydrolyse saccharifiante, son action est stoppée au niveau des ramifications (1-6) de l'amylopectine.

L'amylo 1-4 glucoronidase : utilisé dans la fabrication du dextrose : elle libère du glucose (dextrose) par rupture des liaisons (1-4) [12]

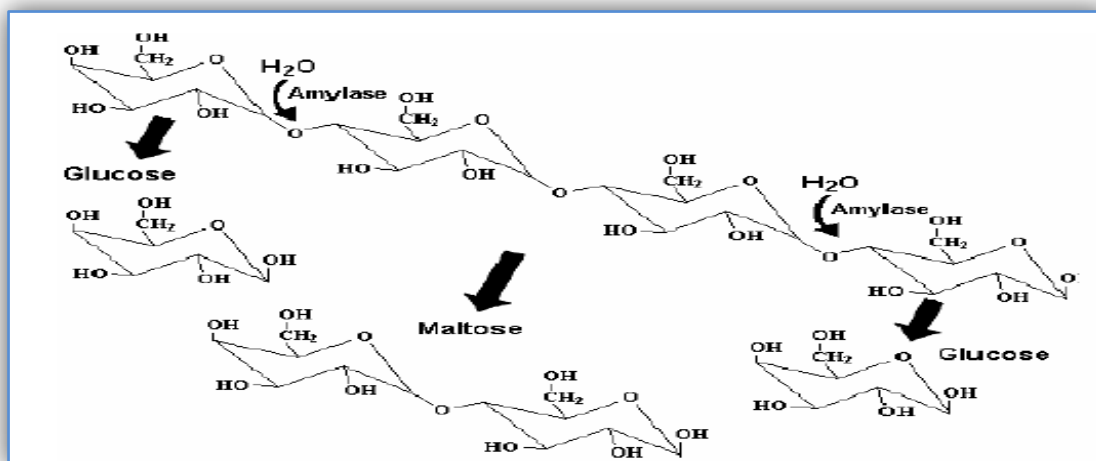


Figure.5. digestion de l'amidon par l'amylase. [18]

II .Les enzymes

II .1.Introduction

L'organisme humain est le siège de nombreuses réactions chimiques sans qu'elles ne soient déclenchées par une source de chaleur.

Le métabolisme catalyse ces réactions en utilisant des substances qui vont multiplier la vitesse de celles-ci.

Ces substances sont appelées enzymes ou biocatalyseurs.

Une enzyme est une protéine capable d'accélérer les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Elle appartient à la famille des catalyseurs.

Une enzyme, comme toute protéine, est synthétisée par les cellules vivantes à partir des informations codées dans l'ADN. Il existe plus de 3.500 enzymes.

Un catalyseur est désigné comme toute substance capable d'accélérer une réaction chimique.

Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant, cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées. Progressivement, le champ d'application des enzymes s'est élargi, avec notamment des applications dans le domaine médical (comme par exemple le traitement des désordres digestifs par des enzymes pancréatiques), en chimie analytique ou encore dans le domaine agro-alimentaire (par exemple l'utilisation de l'amylase et de la glucose isomérase pour la production de sirop de fructose à partir), pour devenir une science à part entière, l'enzymologie.

En l'absence d'enzymes, la grande majorité des réactions biochimiques ne pourraient pas se produire et la vie telle qu'on la connaît n'existerait pas. En effet, sans catalyse, ces réactions pourraient prendre plus de temps à se réaliser que dure la vie d'un être humain.

II .2.Historique

Il est difficile de situer exactement la découverte de la notion d'enzyme et surtout d'enzyme en tant que seul catalyseur des réactions chimiques qui se déroulent dans les organismes vivants.

Le point important est que l'obtention de cette équation repose sur l'hypothèse qu'il s'établit un équilibre rapide entre les concentrations de l'enzyme, du substrat et du complexe enzyme - substrat .

1955 : Frédéric) Sanger établit la séquence des 600 acides aminés qui compose l'insuline. **[19]**

1958 : Daniel Koshland a proposé le modèle de l'ajustement induit. Le substrat induit un changement conformationnel du site actif de l'enzyme.

1965 : Jacques Monod , Jeffries Wyman et Jean-Pierre Changeux proposèrent un modèle cinétique (modèle MWC) pour les enzymes allostériques (enzymes dont la courbe de vitesse en fonction de la concentration en substrat est une sigmoïdale et non une hyperbole).

1966 : Daniel Koshland, Georges Nemethy et D. Filmer généralisèrent le modèle précédent (modèle KNF) en incluant la notion d'ajustement induit proposé par Koshland.

Pendant les années 80, l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant a apporté de nouvelles compréhensions dues au fait que, pour la première fois, il était possible de modifier l'activité catalytique et la spécificité d'un enzyme de façon rationnelle, et ceci par l'incorporation des mutations à des positions définies en utilisant la mutagenèse dirigée. [20]

II .3.Définition

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique.

Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa.

L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes.

Une enzyme accroît la vitesse d'une réaction chimique, et ne catalyse qu'un seul type de réaction dont elle est spécifique ; L'enzyme est spécifique d'un substrat.

La synthèse de leur partie protéique par les cellules qui les utilisent, selon le phénomène de synthèse protéique. [19]

II .4.Structure des enzymes

Les enzymes sont le plus souvent des protéines, et sont donc constituées de chaînes d'acides aminés. Parfois, les activités enzymatiques sont portées par des ARN, et sont dans ce cas appelées des ribozymes.

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit.

Chaque enzyme protéique possède une structure adaptée à sa fonction, et peut être sous forme monomérique, alors que certaines au contraire sont actives sous formes dimériques, voire plus. Elles peuvent alors s'associer à plusieurs chaînes protéiques codées par le même gène (homodimère) ou codées par des gènes différents (hétérodimère).

Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation :

- Structure primaire : se définit par la séquence en acides aminés
- 2- Structure secondaire : La séquence en acides aminés subit des repliements pour former des motifs (hélices α et feuillet β)
- 3- Structure tertiaire : Formée par l'association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine. Cette organisation entraîne une localisation:
 - Des acides aminés polaires en surface externe
 - Les acides aminés non polaires vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne)

C'est au niveau de cette zone que se situe le site actif d'une enzyme

Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.
- 4- Structure quaternaire : Association de plusieurs chaînes protéiques [19]

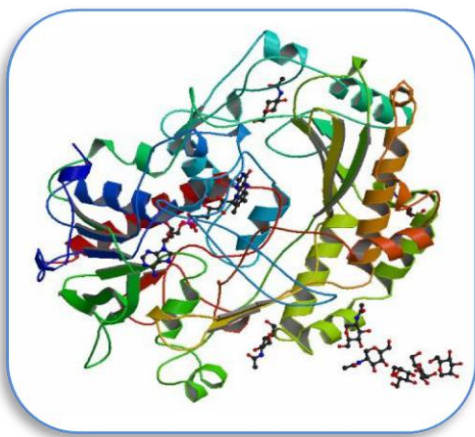


Figure.6. Représentation schématique de la structure tertiaire [19]

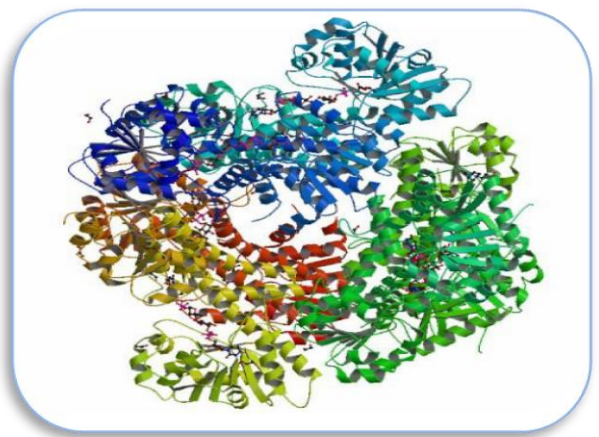


Figure.7. Schématisation de la structure quaternaire

d'une protéine Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

II .4.1.Site actif des enzymes

Le site actif est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone hydrophobe de la protéine, au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme.

Il est subdivisé en 2 parties :

- ❖ Site de liaison, fixation, et reconnaissance :

Reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme

- ❖ b- Site catalytique : Permet la réaction transformant le substrat en produit. [21]

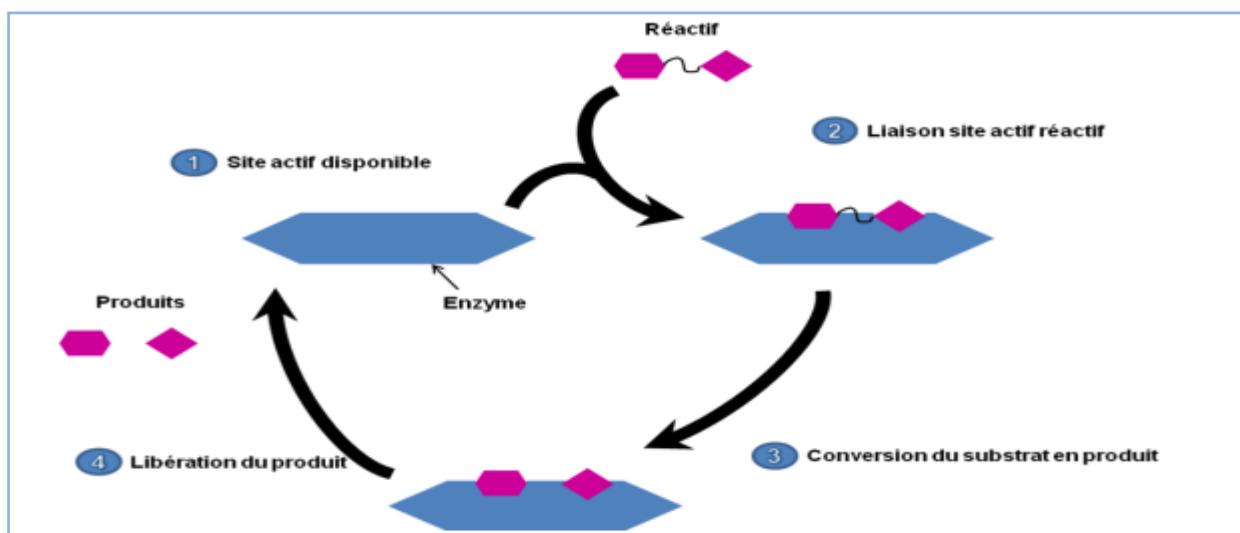


Figure.8. Schéma du mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique (site actif) [19]

II .5.Propriétés de catalyseur

✚ **Efficacité** Un catalyseur accélère une réaction et n'est pas consommé au cours de cette réaction.

✚ **2. Spécificité** Une enzyme catalyse une seule réaction parmi toutes celles possibles. [22]

II .6.Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes

Tableau.3. Classification des enzymes. [19]

EC (classe)	classification	Type de réaction catalysée	Exemples
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction	EC 1.1.1.67- Mannitol
E.C.2	Transférases	Ransfertde groupements fonctionnels	ARNt-méthyl transférases (EC 2.1.1.29)
E.C.3	Hydrolases	Hydrolases	EC3.2.1.4 1,4(1,3;1,4)β-D-glucan4-glucanohydrolase = cellulase
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement etformation de doubles liaisons	Acétoacétate décarboxylase (4.1.1.4)
E.C.5	Isomérases	Isomérisation	Phosphoglycérate mutas (5.4.2.1)
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP	Glutamine synthétase (6.3.1.2)

III. cinétique enzymatique

III.1.Introduction

La cinétique enzymatique est un outil important et nécessaire dans de nombreuses études biochimiques mais sa nature quantitative et sa capacité à prévoir l'évolution d'un processus biochimique au cours du temps, en font également un élément de base de la biotechnologie. La cinétique enzymatique constitue donc une part importante de la culture et de la connaissance biochimique.

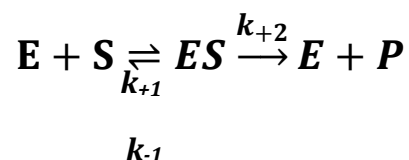
Les réactions chimiques dans les cellules sont faites par des enzymes. Les mesures cinétiques sont parmi les outils les plus puissants pour élucider les mécanismes enzymatiques. C'est donc un des aspects les plus importants de l'enzymologie; ces mesures nous informent sur la spécificité de la réaction enzymatique et sur les caractéristiques physiques de l'enzyme. En pratique, ces mesures sont essentielles en biochimie clinique, puisqu'elles permettent de détecter des anomalies pathologiques.

L'étude de la cinétique enzymatique a commencé en 1902 quand Adrian Brown a examiné la vitesse d'hydrolyse de saccharose par l'enzyme invertase

Brown a démontré que lorsque la concentration de saccharose S dépasse celle de l'enzyme, la vitesse de la réaction devient indépendante de la concentration de saccharose ou ordre zéro par rapport au saccharose.

III.2.Cinétiques enzymatiques

La transformation d'un substrat en un produit, en présence d'une enzyme, peut être schématisée par la réaction suivante :



E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit
 k_{+1} , k_{-1} et k_{+2} sont les constantes de la vitesse de la réaction. [23]

III.2.1.Modèle de Michaëlis-Menten

En 1913, suite aux travaux de Victor Henri, Maud Menten et Leonor Michaëlis résolurent le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices suivantes, suggérées par les études expérimentales :

- 1) les mesures de cinétique seront toujours faites pour des concentrations de produit très faible : c'est la mesure de la vitesse initiale (v_i) pour $[P] \approx 0$ et $[S] \approx [S]_0$. Cette hypothèse permet de négliger la réaction élémentaire $E + P \xrightarrow{k_{-2}} ES$.
- 2) la concentration totale du substrat $[S]_0 \gg [E]_0$.
- 3) dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe (complexe de Michaëlis),

d'hypothèse du quasi-équilibre.

$[E_0]$ est la concentration initiale de l'enzyme,

$[S]$ et $[P]$ sont respectivement la concentration du substrat et la concentration du produit

- ❖ Suivant la théorie de Michaelis et Menten qui suppose un état stationnaire pour ES, la vitesse de la réaction s'écrit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{(a) } V = K_{+2} [ES] \\ \text{(b) } K = \frac{[E][S]}{[ES]} ; K = \frac{K_{-1}}{K_{+1}} \text{ constante de dissociation du complexe ES} \\ \text{(c) } [S]_0 = [S] + [ES] + [P] \\ \text{(d) } [E]_0 = [E] + [ES] \end{array} \right.$$

en remplaçant $[E]$ tiré de l'équation (d) dans l'équation (b),

en simplifiant l'équation (c) en tenant compte des hypothèses (1) et (2)

(1) $[S] \approx [S]_0$ et (2) $[S]_0 \gg [E]_0$ et en remplaçant $[S]$ toujours dans l'équation (b),

nous obtenons une équation simplifiée :

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K + [S]_0}$$

d'où, en remplaçant $[ES]$ dans l'équation (a)

$$V = K_{+2} \frac{[E]_0 [S]_0}{K + [S]_0}, \text{ soit } V_M = K_{+2} [E]_0 \text{ et; } K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$$

la vitesse s'écrit sous la forme : $V = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$ appelée l'équation de Michaelis-Menten.

K_M est la constante de Michaelis.

V_M est la vitesse de réaction maximale. Pour $[S]_0 \gg K_M$.

III.3.Méthodes d'analyse des données cinétiques

La détermination des constantes cinétiques

Pour améliorer la précision de la détermination graphique de ces deux constantes, il existe des représentations graphiques qui linéarisent les résultats, permettant des extrapolations plus précises. La méthode la plus connue est celle de Lineweaver et Burk dans laquelle on représente $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{[S]_0}$ et d'Eadie Hofstee.

III.3.2.Méthode graphique de Line weaver et Burk :

➤ Depuis LINEWEAVER et BURK (1934), les biochimistes préfèrent réécrire l'équation de MICHAELIS et MENTEN sous des formes conduisant à une représentation linéaire des résultats. La manière la plus communément utilisée est le graphique en double inverse, Le réciproque de l'équation de Michaelis-Menten est très utile pour l'analyse des données de cinétique

$$V = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \rightarrow \frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]_0}{V_M [S]_0}$$

et qui se simplifie en

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M [S]_0} + \frac{[S]_0}{V_M [S]_0}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \left(\frac{1}{[S]_0} \right) + \frac{1}{V_M}$$

➤ **Représentation de Lineweaver-Burk :** C'est la représentation la plus utilisée qui fût publiée en 1934 par Hans Lineweaver et Dean Burk :

$$\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$$

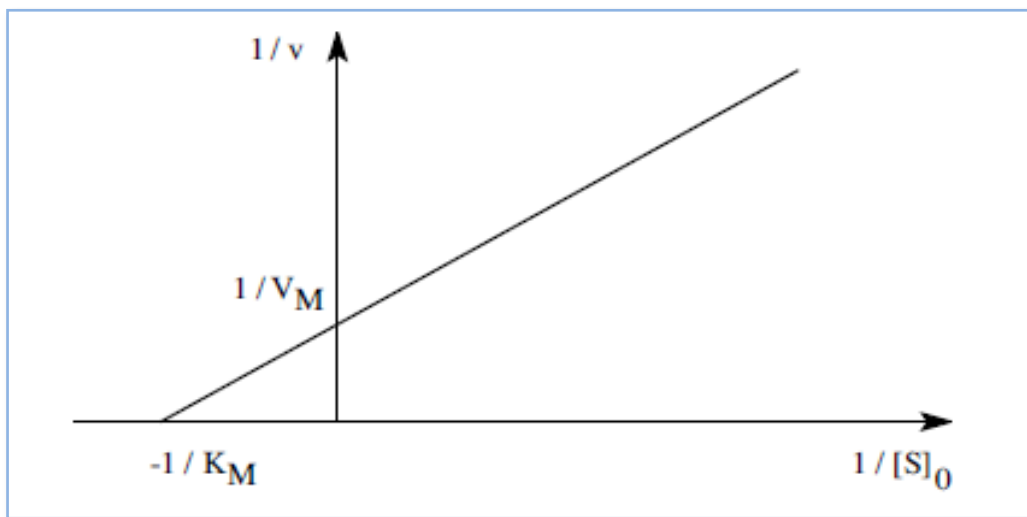


Figure.9. La représentation de Lineweaver-burk. de 1/v en fonction de 1/[S]₀.

III.3.1. Méthode graphique d'Eadie Hofstee:

$$V = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

$$V(K_M + [S]_0) = V_M [S]_0 \rightarrow V = -K_M \left(\frac{V}{[S]_0} \right) + V_M$$

➤ Représentation Eadie-Hofstee

Cette représentation fût publiée par George Eadie en 1942 et Baren Hofstee en 1959 :

$$V = f\left(\frac{V}{[S]_0}\right)$$

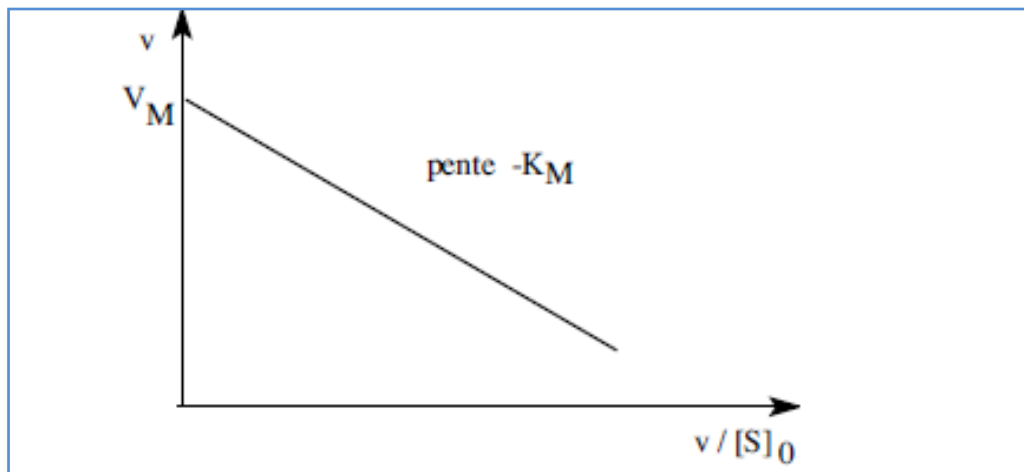


Figure.10. La représentation d'Eadie Hofsteede v en fonction de $\frac{v}{[S]_0}$

Cette représentation est une droite de pente $-K_M$ et qui coupe l'axe des v au point V_M . [25]

III.4. Les constantes cinétiques

✚ Constante de Michaëlis

la constante de Michaëlis $K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$ est égale à $\frac{K_{-1}}{K_{+1}}$ dans le cas où $K_{-1} \gg K_{+2}$

la valeur de la constante de Michaëlis est égale à la valeur de la constante de dissociation du complexe ES en S et E, elle traduit l'affinité du substrat pour l'enzyme

✚ Vitesse maximale

La vitesse de la réaction est maximale (V_M) lorsque toute l'enzyme est sous forme de complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire lorsque la concentration en complexe est égale à la concentration totale en enzyme $[E]$.

la vitesse maximale initiale v atteinte pour la concentration $[E]_0$ et pour une concentration très grande de $[S]_0$ devant K_M : $[S]_0 \gg K_M$ [23]

On peut écrire :

$$V_M = K_{+2} [E]_0 \quad ; \quad V = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{si} \quad [S]_0 \rightarrow \infty \quad V \rightarrow V_M$$

$$V = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} = V_M$$

Constante catalytique

k_{cat} (ou K_{+2}) est une **constante de vitesse du premier ordre** (unités s^{-1} , c'est une fréquence).

k_{cat} Représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique lorsque l'enzyme

est saturé en substrat ($k_{cat} = \frac{V_M}{[E]_0}$)

est la durée d'un cycle catalytique lorsque l'enzyme est saturé en substrat. La valeur de k donne la

mesure de l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat. [26]

Deuxième Partie : expérimentale et calcul entreprise

I. Méthodes :

I.1. La méthode expérimentale pour étude l'hydrolyse de l'amidon (la méthode DNS):

I .1.1.Principe de la méthode:

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé, Le produit de la réaction possède un maximum d'absorption à 540 nm. Cette méthode permet de doser des concentrations en sucres réducteurs allant de 0 à 1 g/l.

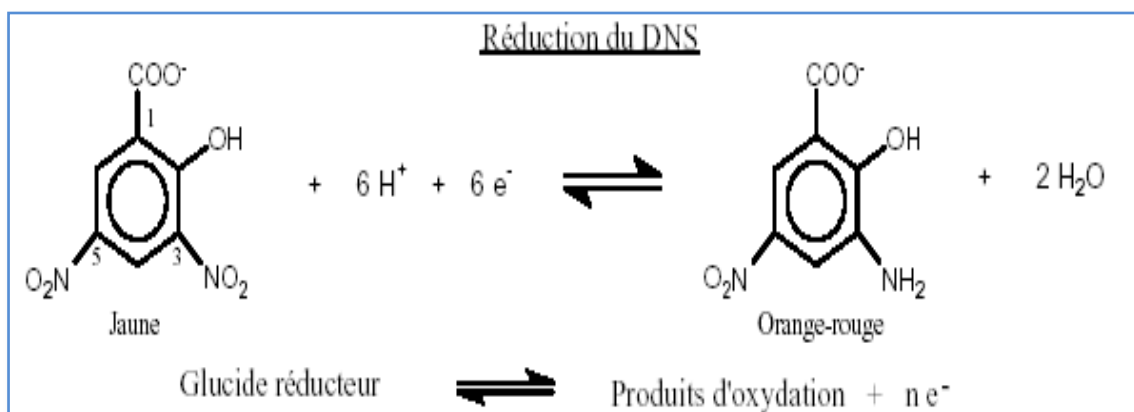


Figure.11. : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS

I .1.2. produits utilisés:

NaOH (1 M, 2M)

- Phosphate de sodium.

Chlorure de sodium(NaCl).

- Amidon soluble.

Tartrate de sodium et potassium.

- L'acide 3,5-Dinitrosalicylique.

Maltose.

I .1.3.préparation des solutions

🚦 La solution tampon

Phosphate de sodium 20mM (m=0,2840g) + 6,7mM NaCl(0,03915g) dans 100ml d'eau distillée.

Le pH est réglé à la valeur 6 à l'aide d'un pH-mètre par NaOH 1M.

🚦 La solution d'amidon

Amidon 1% (1,18 g dans 100 ml de la solution tampon pH=6, l'humidité étant 11%).

🚦 La solution C

12 g de sodium potassium tartrate dans 8 ml NaOH 2M.

🚦 La solution D

L'acide 3,5-dinitrosalicylique 96 mM (M=228,12 g/mole).

La solution E

On mélange le réactif C avec 20 ml du réactif D. complété avec l'eau distillée jusqu'à 40 ml.

La solution F

La solution de maltose 0,2 % (m/v) ou 2g/l (0,05262 g du maltose monohydrate ($C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$) dans 25 ml d'eau distillée).

I .1.4. Test de l'activité de l'enzyme libre :

a)- Définition de l'activité de l'enzyme :

Une unité U est définie par la masse d'enzyme qui libère 1 μ mole de sucre réducteur par minute à 25°C et à pH=6 le substrat : l'amidon soluble Zulkowsky.

b)- Mesure de l'activité par la méthode DNS (MILLER 1959)

➤ la courbe d'étalonnage

Pour tracer la courbe d'étalonnage on utilise le maltose comme sucre réducteur et on suit les étapes indiquées dans le tableau 4.

On prépare la solution mère du maltose (c=2g/l) .à partir de cette solution on peut préparer des solutions diluées.

Tableau.4.Etapes d'élaboration de la courbe d'étalonnage des sucres réducteurs (équivalent en maltose).

	Blanc	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
Réactif F (maltose)	-----	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.8 ml	1 ml
L'eau distillée	2 ml	1.8 ml	1.6ml	1.4 ml	1.2 ml	1 ml
Réactif E(DNS)	1 ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

On incube la solution de maltose (2 ml) à 25°C pendant 3 minutes puis on ajoute 1 ml de la solution E(DNS) et on chauffe à ébullition pendant 15 minutes.

On laisse refroidir, on ajoute 9 ml d'eau distillée et on mesure l'absorbance à $\lambda = 540$ nm.

La variation de l'absorbance en fonction de la concentration du maltose oxydé selon la méthode DNS

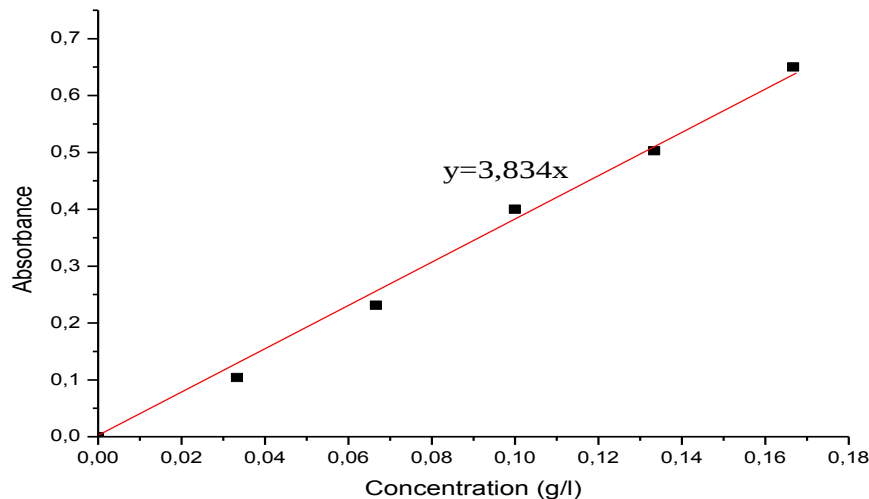


Figure.12. Courbe d'étalonnage du Absorbance en fonction de concentration du maltose oxydé ($A=f(C_{\text{maltose}})$)

➤ **Détermination du domaine de mesure de l'activité de l'amylase (domaine linéaire)**

Le domaine de mesure de l'activité enzymatique est le domaine linéaire de la variation de la quantité de sucres réducteurs en fonction de la masse d'enzyme utilisée pour une concentration donnée de substrat (amidon soluble 1%).

On prend 10 ml de la solution G (enzyme 0,5g/l) et on dilue jusqu'à 50 ml; on obtient une solution G' (0,1 g/l). A partir de cette solution on effectue des nouvelles dilutions

On incube 1 ml de chaque solution d'enzyme préparée avec 1 ml de la solution d'amidon (1%) à 25°C pendant 3 minutes, on ajoute 1 ml de la solution E(DNS) et on laisse le mélange à ébullition pendant 15 min. après refroidissement on ajoute 9 ml d'eau distillée et on mesure l'absorbance à 540nm.

➤ **Résultats**

Tableau.5. Variation de la concentration des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse en fonction de la concentration de l'enzyme ($C_{\text{amidon}}=1\% \text{ m/v}$)

$$n_{\text{maltose}} (\mu\text{mole}) = \frac{A \cdot 1200 \cdot 5}{(3,8336 \cdot 342,31 \cdot 2)}$$

$$= A \cdot 2,28609814816$$

$C_{\text{enzyme}}/(\text{mg/ml})$	$n_{\text{maltose}} (\mu\text{mole})$
0,01	0,167
0,02	0,389
0,04	0,635
0,05	0,777
0,08	1,372
0,1	1,600
0,2	1,952
0,4	2,069

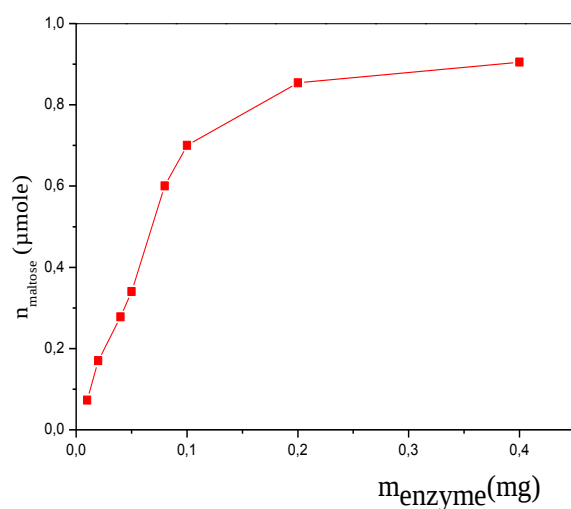


Figure.13.Représentation graphique $n_{\text{maltose}} = f(m_{\text{enzyme}})$

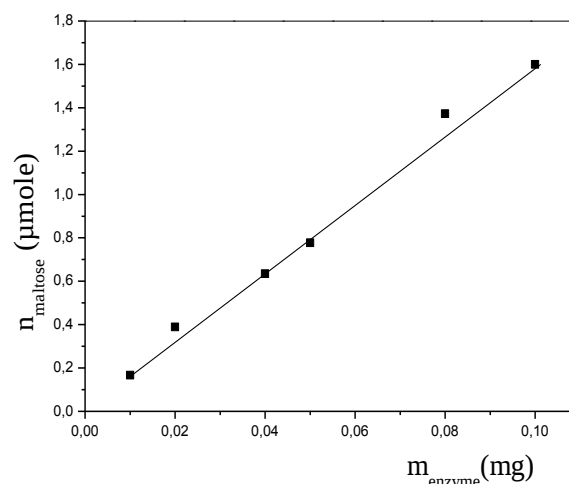


Figure.14.Graph Représente le domaine d'activité de l'enzyme (domaine linéaire)

La pente de la courbe de la figure 3. nous donne directement l'activité de l'enzyme

$$A = 22 \text{ U/mg}_{\text{enzyme}}$$

On constate que l'enzyme est encore active, bien qu'elle a perdu près de 36 % de son activité (l'activité à la date d'achat étant 37U/mg).

I.1.5. Effet de quelques facteurs sur l'activité de l'enzyme libre

a)-L'effet de la température : Pour la détermination de la température optimale de l'enzyme, des essais de la détermination de l'activité enzymatique (avec la méthode DNS), sont réalisés à des températures allant de 25°C à 70°C

Résultats

les résultat obtenu résume dans le tableau ci-dessous :

Tableau.6. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température

T (°C)	25	30	35	40	45	50	55	60	70
Activité relative %	37	47,5	61	75,5	90	100	86	64	25

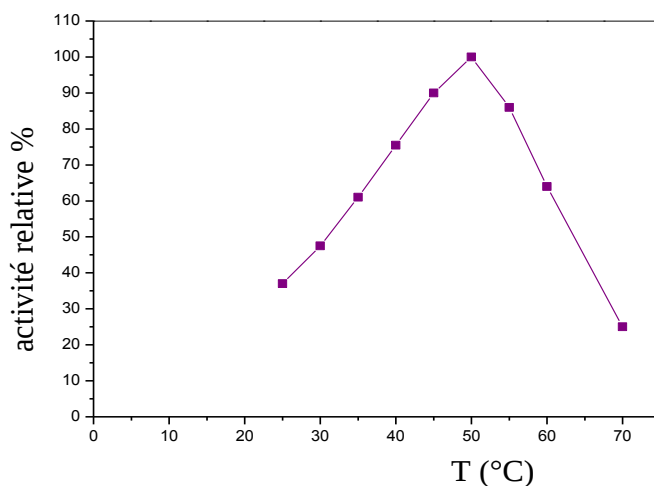


Figure .15. Représentation graphique activité relative en fonction de température

Le graphe qui représente l'activité enzymatique en fonction de la température (t) du milieu, est une courbe ascendante jusqu'à une température (50°C.) où l'activité de l'enzyme est la plus grande, (la température optimale de l'enzyme pour l'activité enzymatique $T_{\max} = 50^{\circ}\text{C}$)

b)- Effet du pH

Pour la détermination du pH optimum :

- On prépare plusieurs solutions tampons phosphate (pour les pH élevés) et acétate (pour les faibles pH) avec un pH varie de 2.0 à 8.
- On dissout l'amidon soluble dans ces solution avec une concentration de 1%.

Résultats

les résultat obtenu résume dans le tableau ci-dessous

Tableau.7. Variation de l'activité enzymatique en fonction pH

pH	2	3	4	5,5	6	6,5	7	8
Activité relative %	7,407	74,07	89,29	96,70	97,937	100	52,26	20,57

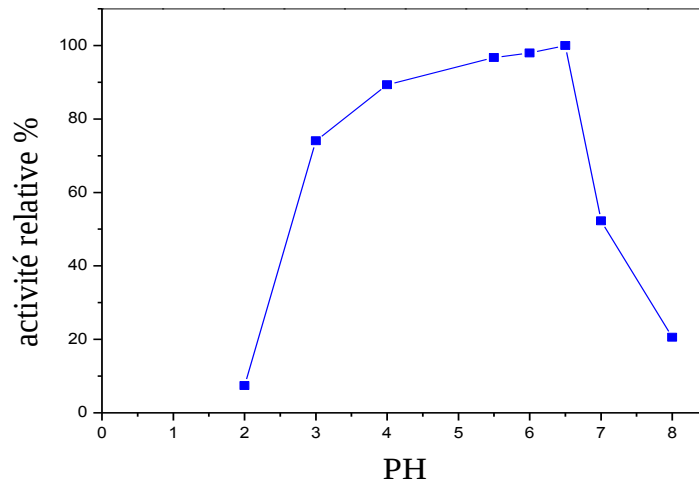


Figure .16. Représentation graphique activité relative =f(pH)

Le graphe qui représente l'activité enzymatique en fonction de la pH du milieu, est une courbe ascendante jusqu'à un pH (6,5) où l'activité de l'enzyme est la plus grande, (la pH optimale de l'enzyme pour l'activité enzymatique $pH_{max} = 6,5$)

I.2. Hydrolyse d'amidon :

La concentration de l'enzyme égale 0.01mg/ml

L'hydrolyse et l'étude des paramètres cinétiques de l'amidon de pomme de terre locale:

Pour l'étude de la réaction d'hydrolyse de l'amidon de pomme de terre locale on a travaillé sur une concentration de l'enzyme égale à 0.01mg/ml avec différentes concentrations de l'amidon de pomme de terre (1, 2, 4, 6, 8,10g/l).

Avec chaque concentration de l'amidon, on mesure l'activité enzymatique en fonction du temps par la méthode DNS et la méthode colorimétrique.

I.2.1.Détermination des constantes cinétiques de l' α -amylase libre:

I.2.1.1.La méthode DNS :

- On prend 60 ml de l'amidon de pomme terre locale 1%(m /v).
- On ajoute 12 ml de la solution d'enzyme (0.01g/l).
- On laisse réagir, et après un temps précis (3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, et 35 minutes).
- On prend 2 ml du mélange réactionnel.
- on ajoute 1 ml de DNS et on laisse à l'ébullition pendant 15 minutes.
- Après refroidissement on ajoute 9ml de l'eau distillée et on mesure l'absorbance à 540 nm.
- Le blanc étant 5 ml de l'amidon plus 1ml de l'eau distillée.

mesure l'activité enzymatique en fonction du temps avec différentes concentrations de l'amidon de pomme de terre (1, 2, 4, 6, 8,10g/l)

$$n_{\text{maltose}} (\mu\text{mole}) = A \cdot 2,286$$

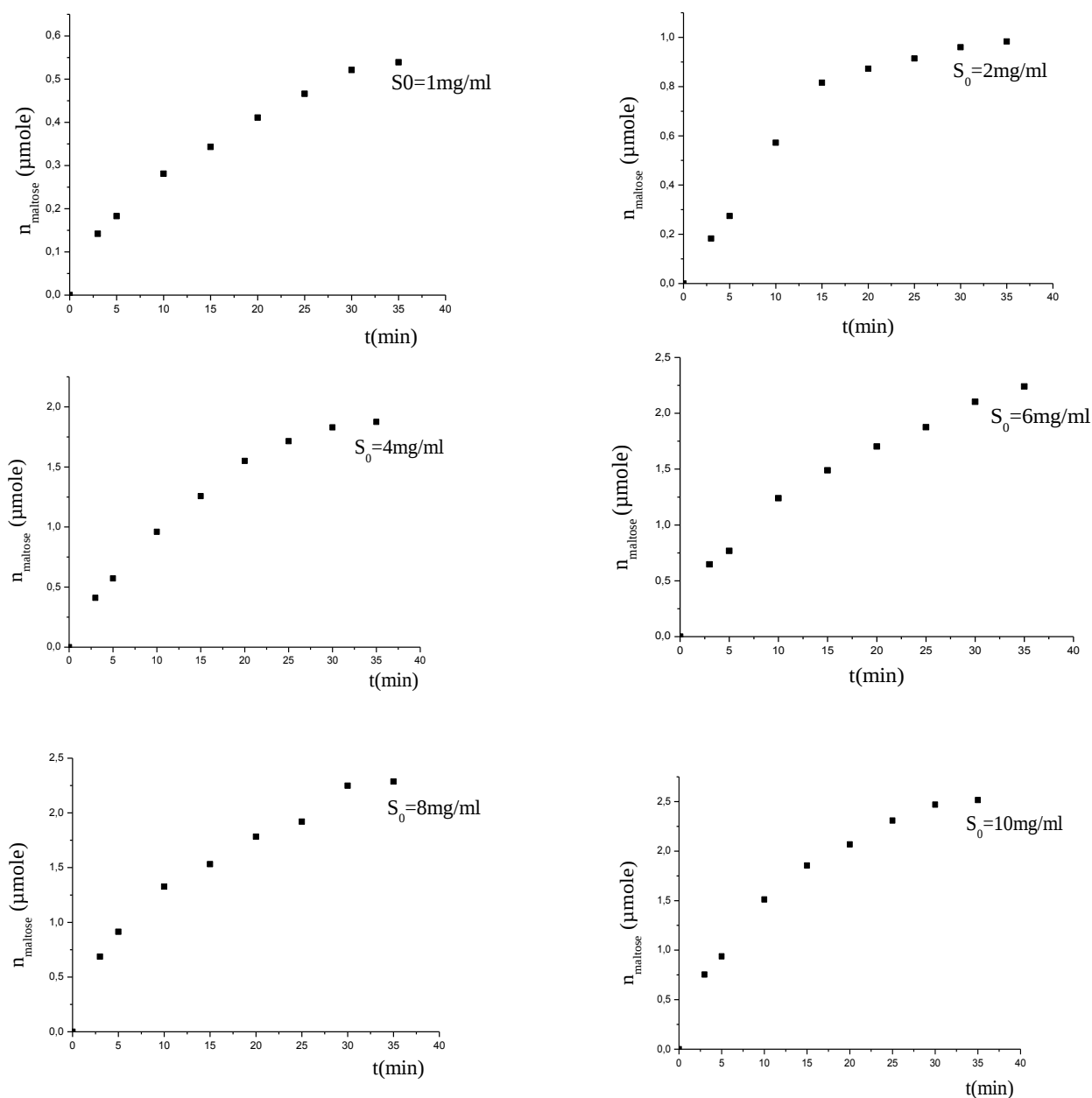


Figure .17. Représentation graphique nombre de mol des sucre produit de l'hydrolyse en fonction de temps de l'enzyme avec des concentrations déferent pour l'amidon égale $n_{\text{maltose}} = f(T)$

La pente chaque courbe a $t=0\text{min}$ représente la vitesse de la réaction

Tableau.8. de vitesse de la réaction de chaque concentrations de l'amidon de pomme de terre.

$[S]_0$ (mg/mL)	1	2	4	6	8	10
V ($\mu\text{mole} / \text{min}$)	0,047	0,06	0,15	0,22	0,23	

I.2.1.2. La détermination des constantes cinétiques

a)-Méthode graphique de Line weaver et Burk

les données obtenu dans le tableau ci-dessous

$[S]_0$ (mg/mL)	1	2	4	6	8	10
V (μmole /min)	0,047	0,055	0,12	0,129	0,228	
$1/[S]_0$ (mL/ mg)	1	0,5	0,25	0,167	0,125	0,1
$1/V$ (min / μmole)	21,2765957	18,1818181	8,33333333	7.751937	4,38596491	4

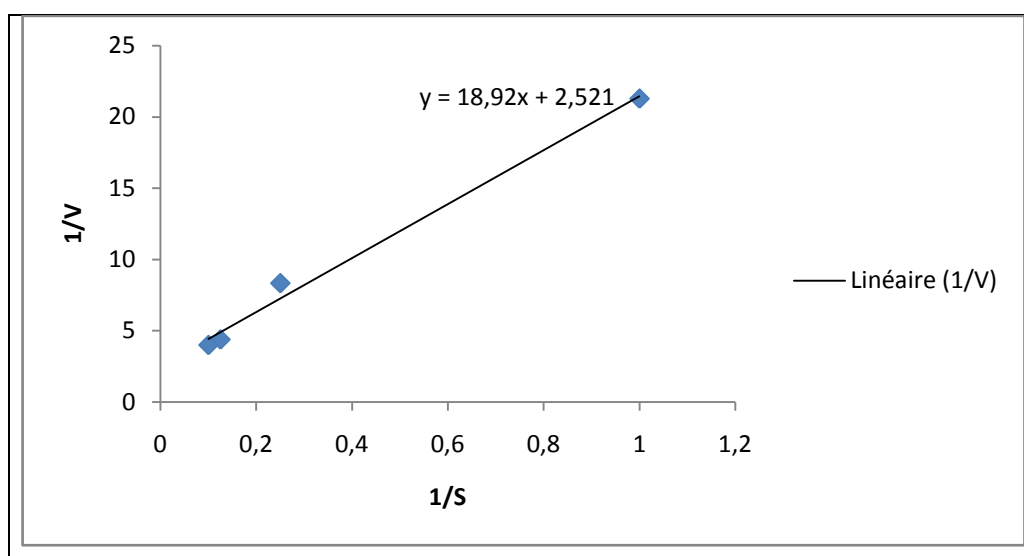


Figure.18. Représentation graphique de Lineweaver et Burck $1/V$ en fonction de $1/[S]_0$

Chaque point correspond à une mesure de V_i pour une concentration en substrat $[S]$ donnée. Les intersections avec les axes permettent de remonter au K_m et à la V_{max} .

b)- Méthode graphique d'Eadie Hofstee:

les données obtenu dans le tableau ci-dessous

$[S]_0$ (mg/mL)	1	2	4	6	8	10
V (μmole /min)	0,047	0,055	0,12	0,129	0,228	
$V/[S]_0$ ($\frac{\mu\text{mole}}{\text{min}}$ / mL / mg)	0,047	0,0275	0,03	0,0215	0,0285	0,025

trace la courbe $V = f\left(\frac{v}{[S]_0}\right)$

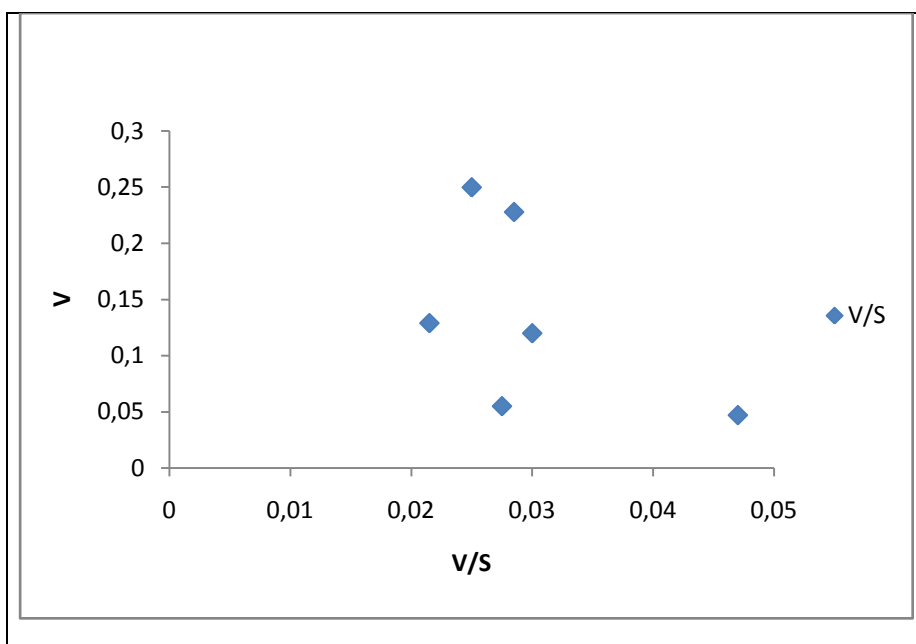


Figure .19.Représentation graphique d'Eadie Hofstee de v en fonction de $\frac{v}{[S]_0}$

Les constantes cinétiques

Tableau.9. Les constantes cinétiques par deux méthodes

Constantes Méthodes	V_M (μmole /min)		
Line weaver et Burk	0,39	7,69	39
Eadie Hofstee	-	-	-

Résultat:

Cette étude nous permet de déterminer les constantes cinétiques (V_{max} , K_M , K_{cat}) en fonction de la méthode de Lineweaver-burk:

$$V_M = \mathbf{0,39} ; \quad K_M = \mathbf{7,69}; \quad K_{cat} = \mathbf{39}$$

Et la méthode de Eadie Hofstee n'est pas utilisée pour déterminer les constantes cinétiques.

Conclusion général

Conclusion générale

L'hydrolyse de l'amidon est une réaction entre l'amidon et l'eau. Les macromolécules d'amidon de pomme de terre sont cassées et transformées en maltose en une ou plusieurs étapes. L'intérêt de l'hydrolyse est d'avoir des molécules plus petites. Et l'intervention de l'enzyme (α -amylase) accélère spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon en maltose.

Cela nous a permis les travaux expérimentaux de déterminer les constantes cinétiques par la méthode Lineweaver-Burk,

en fin de réaction les produits de cette hydrolyse enzymatique d'amidon : (maltose, glucose.....) et l'enzyme α -amylase.

On conclut que :

- ✚ on peut doser les produits de cette réaction (les sucres réducteurs) par la méthode DNS .
 - ✚ L'enzyme α amylase (*Aspergillus Oryzae*) a une activité maximale dans les conditions $T=50^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}=6,5$
 - ✚ Le substrat l'amidon de pomme de terre capable de dégrader par l'enzyme α amylase (*Aspergillus Oryzae*) dans les conditions expérimentales.
 - ✚ On peut déterminer les paramètres cinétiques de la réaction d'hydrolyse d'amidon de pomme de terre par l'enzyme α amylase (*Aspergillus Oryzae*)
 - ✚ La vitesse maximale (V_M) calculée par la méthode de Lineweaver= $0,39$
 - ✚ la constante de Michaelis (K_M) calculée par la méthode de Lineweaver= $7,69$
 - ✚ la Constante catalytique (K_{cat}) par la méthode de Lineweaver= 39
- la méthode de Eadie Hofste ne détermine pas les constantes cinétiques .

Référence Bibliographiques

- [1] : H. ATROUS TURKI, Intitulé : Etude des propriétés rhéologiques et microstructurales des amidons de blé et de pomme de terre irradiés, Mémoire mastère en Industries Alimentaires, Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis, 2011.
- [2] : S. Bahrani, Médication des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couples chaleur-masse, thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, Français ,2012.
- [3] : A. STANOJLOVIC et DAVIDOVIC, Matériaux biodégradables à base d'amidon expansé renforcé de fibres naturelles - Application à l'emballage alimentaire, thèse de Doctorat, Université du Sud Toulon-Var, Français, 2006.
- [4] :C.MASSAUX, et al, L'amidon natif du grain de blé : un composé naturel à valoriser par la connaissance de ses propriétés techno-fonctionnelles?, livre blanc (céréales), F.U.S.A.et CRA-W Gembloux, 2006
- [5] : G .LEBAS, Etude du métabolisme carboné et azoté de Miscanthus x giganteus, Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne, 2012.
- [6] : M .PHILIPPE, Dérivés carboxyliques de l'amidon riche en amylose comme excipients pharmaceutiques: aspects structuraux et formulations d'enzymes pancréatiques, Université du Québec à Montréal, 2007.
- [7] : J.Luc WERTZL, l'amidon et le PLA : deux biopolymères sur le marché, document valbiom, Gembloux Agro-Bio Tech,2011.
- [8] : R. Tester, et al, Starch—composition, fine structure and architecture, Journal of Cereal Science 39 (2004) 151–165
- [9] : M. BASTIEN JALLABERT, Etude du comportement sous pression mécanique Uniaxiale de la cellulose et de l'amidon (natif et Amorphe): influence de la température et du taux D'hydratation, thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2014.
- [10] : A. Rosu, Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant, thèse de doctorat, Université du Littoral Cote d'Opale, Français , 2011.
- [11] : M. PIERRE DESIRE, Influence des amidons natifs ou acetyles de manioc et de pomme de terre sur les propriétés physico-chimiques et texturales du pâte de bœuf (bos indicus), thèse de Doctorat, Université de Ngaoundéré, 2009.
- [12] : M. BEDREDDINE, Hydroxyéthylamidon, synthèse, propriétés et applications, Mémoire de Master en Chimie, université Abou-Bakr Belkaid,Tlemcen, 2013.

- [13] : C. CALINESCU, Matrices à base de carboxyméthyl amidon pour Des formulations pharmaceutiques d'agents Bioactifs à administration orale, thèse de Doctorat , Université du Québec à Montréal, 2011.
- [14] : H .TUNCAY, La génétique formelle chez chlamydomonas reinhardtii :un outil puissant de dissant de dissection du catabolisme de l' amidon, thèse de Doctorat , Université de lille 1- sciences et technologies ,2013.
- [15] : W. LAOUINI, Propriétés fonctionnelles de l'amidon irradié , Projet de Fin d'Etudes Pour l'obtention du Diplôme National d'Ingénieur, Université du 7 Novembre, Carthage, 2011.
- [16] : A. GARCIA, Contribution a l'étude du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre caractéristique physico-chimique de ses constituants, thèse de Doctorat Ingénieur, Université des sciences et technique de Lille, 1981.
- [17] : J.L.MULTON, Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les IAA, Collection sciences et techniques agro-alimentaires, éditions technique et documentation. Lavoisier, 1992.
- [18] : A. KARA SLIMANE, Préparation des copolymères hydrosolubles à base d'amidon, Modification et contrôle des propriétés, Mémoire Magister en Chimie, université Abou-Bakr Belkaid, Tlemcen, 2010.
- [19] : H. JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles , Thèse de Doctorat , Ecole nationale superieure de chimie de montpellie , 2011.
- [20] :<http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/1COURS1/111Cours.htm> ,24/ 3/2017
- [21] : I. Laouar , Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholin-estérase , Mémoire de Master Académique, Université d'EL-Oued, 2014.
- [22] : D. Garcia et L.G.Antar, Cinétique Enzymatique, université paris 12 val de marne.
- [23] : S. Kumaran Immobilisation d'enzymes pour la realisation debiocapteurs : Analyse par injection en ux continu(FIA) : Applications au dosage des composes polluants, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard- Lyon I, Français, 1991.
- [24] : Introduction à la cinétique enzymatique [Licence SV – Biochimie 2 : Cinétique enzymatique].
- [25] : C .BOWDEN, M . JAMIN et V.SAKS, cinétique enzymatique, publié en (1995, 2004) est publié par arrangement avec portland press, londres, isbn 2-86883-742-5.
- [26] :A. Raisonnier, Enzymologie élémentaire, Université Pierre et Marie Curie, 2002.

Résumé

L'objectif de cette étude est de suivre l'hydrolyse enzymatique d'amidon extrait de pommes de terre par une enzyme alpha amylase, les produits de cette réaction sont des sucres réducteurs. Dans lequel on étudie deux influences sur l'activité de l'enzyme l'alpha-amylase (*Aspergillus oryzae*) sont la température (T) et le pH. Les conditions optimales pour l'activité maximale d'enzyme sont ($T_{opti} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{opti} = 6,5$). Nous avons suivi la réaction de l'hydrolyse par la méthode (DNS) et les résultats obtenus indiquent que le substrat capable d'être hydrolysé par cette enzyme dans les conditions expérimentales. Cette étude nous permet de déterminer les constantes cinétiques (V_{max} , K_M , K_{cat}) en fonction de la méthode de Lineweaver-burk.

Mots clés : enzyme, hydrolyse, amidon, , alpha amylase.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة تفاعل التحلل المائي الإنزيمي لنشاء مستخلص من البطاطا، لينتج عن هذا التفاعل سكريات مرجعة. إن نواتج التحلل الإنزيمي ذات استعمال واسع في الصناعات الغذائية وصناعة الورق والنسيج ... ، قمنا من خلالها بدراسة عاملين مؤثرين على نشاط إنزيم ألفا أميلاز (*Aspergillus Oryzae*) هما درجة الحرارة (T) و الأس الهيدروجيني (pH) فكانت الشروط المثلى لعمل الإنزيم هي ($T_{opti}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{opti}=6,5$) ، تتبعنا سير التفاعل بطريقة الـ (DNS) فكانت النتائج المتحصل عليها تشير إلى أن هذه الرافعة قابلة للتحلل باستخدام هذا الإنزيم وفي الشروط التجريبية و تمكنا من تعيين ثوابت الحركة (V_{max} , K_M , K_{cat}) اعتمادا على طريقة Lineweaver-burk .

كلمات المفتاحية : الإنزيم، التحلل، النشا ، ألفا الأميلاز .

Summary

The objective of our study is the hydrolysis of starch catalyzed by α -amylases (*Aspergillus Oryzae*) to products with low molecular weight, is one of the most important commercial enzyme processes. The hydrolyzed products are widely applied in food, paper and textile industries. we study the effect of pH and temperature on the activity on enzyme, and we result that the high activity of enzyme it became at ($T_{opti}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{opti}=6,5$) we were study this reaction by the DNS method ,we result that this starch can be degraded by the alpha amylase in the optimum conditions.

We can determine the Kinetic parameters, maximum velocity (V_{max}), and Michaelis-Menten constant (K_M), by Lineweaver-burk method.

Keywords : Enzyme, hydrolysis, starch, alpha amylase.