

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université AboubekrBelkaid de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Mémoire
En vue d'obtenir le diplôme de
Master en biologie
Spécialité : Microbiologie et contrôle de qualité

Sur le thème

**Contribution à l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase
extraite de *Saccharomyces cerevisiae* et sa valorisation
alimentaire pour les diabétiques**

Présenté par : **Melle Rania Kourdi**
Melle Meryem Kebbas

Soutenue publiquement le 26 juin 2025 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme. TriquiChahinez	Maître de Conférences B	Université de Tlemcen	Présidente
Mme Medjdoub Houria	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme. LemeriniWafaa	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Rapporteur

Laboratoire de chimie organique substances naturelles et analyses (COSNA)
Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE)

2024-2025

Remerciement

Avant tout, nous exprimons notre gratitude à Allah, Le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la santé, la patience et la force nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à adresser nos plus profonds remerciements à **Mme Sebaa née Lemerini Wafaa**, notre encadrante, pour sa confiance, son accompagnement rigoureux, la richesse de ses conseils et sa disponibilité tout au long de ce projet. Son encadrement a été d'un apport inestimable tant sur le plan scientifique que personnel.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres du jury pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant d'assister à notre soutenance, de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement l'ensemble des membres au laboratoire COSNA – doctorants et masterants – pour leur disponibilité, ainsi que pour les échanges enrichissants et l'entraide dont ils ont fait preuve tout au long de notre travail.

Nous adressons une mention particulière à **Chaima**, pour sa bienveillance et l'aide précieuse qu'elle nous a apportée durant notre stage au sein du laboratoire.

Nous exprimons notre sincère gratitude à tous les enseignants du Département de Biologie, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours académique, depuis les premiers pas jusqu'aux cycles supérieurs. Leur encadrement, leur patience et leur passion pour l'enseignement ont marqué notre chemin et nourri notre soif de savoir. Que chacun d'eux trouve ici l'expression de notre reconnaissance la plus profonde.

À toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, nous adressons nos remerciements les plus sincères.

Dédicace

Grâce à l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À ma très chère mère, femme courageuse et infatigable, merci pour ton amour inconditionnel, tes prières qui m'ont portée jusque-là. Tu es la lumière de ma vie et la source de ma force.

À mon père respecté, merci pour ton soutien calme, ta sagesse et ta confiance discrète. Ton intégrité et ton sérieux m'ont enseigné la valeur du travail et de l'honneur.

À ma chère sœur Dounia, confidente et alliée fidèle, ta tendresse et ton regard éclairé ont été une douce force tout au long de ce parcours.

À mon frère Mohammed, brillant et réfléchi, ta vivacité, ta culture et ta sensibilité m'inspirent chaque jour. Tu représentes un espoir lumineux pour l'avenir.

À ma tante défunte, que Dieu t'accorde Sa miséricorde et t'ouvre les portes du paradis. Ton souvenir reste vivant dans mon cœur, et ton amour ne sera jamais oublié.

À mon oncle Kadour, merci pour ton soutien et ta gentillesse constante.

À ma chère amie et binôme Meryem, depuis le lycée jusqu'à aujourd'hui, tu as été une présence fidèle et précieuse. Ton amitié sincère, ton soutien discret et ton sérieux ont marqué ce parcours. Merci à toi et à ta famille pour votre bienveillance tout au long de ces années.

À mes chères amies Ikram et Nour, merci pour les moments partagés, votre bonne humeur et votre présence à mes côtés. Votre amitié a apporté de la légèreté et de la joie à ce parcours, et je vous en suis sincèrement reconnaissante.

À mon encadrante, Mme Sebaa née Lemerini Wafaa, que j'admire profondément, merci pour votre encadrement et votre bienveillance tout au long de ce travail.

À la mémoire du professeur Naoum Mourad, il nous a appris que le savoir laisse une empreinte même après le départ, et que la bonne réputation grave le souvenir de l'homme dans les cœurs et les mémoires.

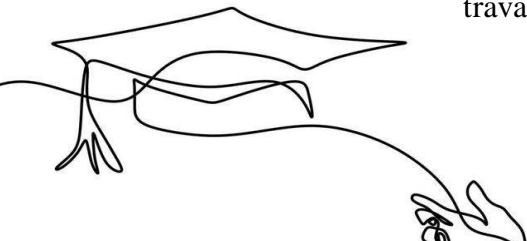
Qu'Allah lui accorde Sa miséricorde et fasse de son savoir et de sa bonté un poids en sa faveur.

À nos frères et sœurs, étudiants de Gaza, martyrs de la connaissance et de la dignité, qui ont rêvé d'achever leur parcours académique.

Votre courage face à l'injustice inspire nos plumes et élève notre conscience. Que Dieu accueille vos âmes en paix et accorde la liberté à votre terre.

Aux personnes atteintes de diabète, en espérant que ce modeste travail puisse, un jour, contribuer à alléger votre quotidien et vous aider à mener une vie plus douce, plus saine, et plus naturelle.

À toutes celles et ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin, merci du fond du cœur. Ce travail vous est dédié avec reconnaissance et affection.



Dédicace

Du fond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

À mes chers parents, Benamer et Samira

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très-Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

Je remercie mes sœurs, Hadjer et Halima,

Pour leur amour inconditionnel et leur patience, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Leur soutien constant, leurs mots d'encouragement et leur tendresse ont été ma plus grande source de motivation, et un véritable refuge dans les moments de doute. Grâce à elles, je n'ai jamais perdu confiance en moi.

À mes petites nièces, Djamila et Assil,

Vos rires, votre innocence et votre présence joyeuse ont été pour moi une source de réconfort et de bonheur vos petites présences lumineuses ont été pour moi des sources de réconfort et de bonheur tout au long de ce parcours.

À mes amies, Nour et Ikram,

Votre amitié a été une source de joie constante tout au long de ce parcours. Merci pour votre écoute, votre patience, vos rires partagés et votre présence indéfectible. Sans vous, ce chemin aurait été bien plus difficile. Votre amitié est un trésor que je chéris profondément.

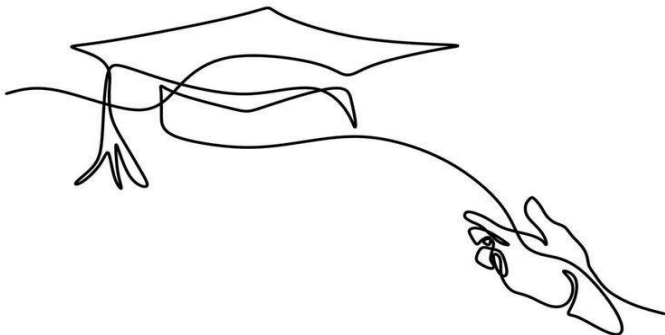
Sans oublier mon binôme, Rania,

Mon amie et ma sœur avant même d'être ma partenaire dans ce travail. Nous avons souvent veillé tard ensemble, avec le même objectif : réussir ensemble. Et nous voilà aujourd'hui, arrivant au terme de ce parcours comme nous l'avons commencé — côte à côte. Merci pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de cette aventure. Ta collaboration sincère, ton sérieux et ton engagement ont été d'une valeur inestimable.

À mon encadrante, Mme Lemerini Wafaa,

Je vous adresse mes sincères remerciements pour votre accompagnement tout au long de ce travail. Votre expertise, vos remarques constructives et votre disponibilité ont été pour moi une source d'enrichissement et de motivation. Votre encadrement exigeant contribué à la qualité de ce mémoire. Merci pour votre confiance.

Je dépose ces pages comme une offrande à ceux qui ont éclairé mes pas lorsque tout semblait flou. Merci du fond du cœur.



Kebba Meruem

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION	2
I. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
I.1. Généralités	6
I.2. Définition	6
I.3. Classification	7
I.4. Caractéristiques microbiologiques	7
I.4.1. Morphologie et structure	7
I.4.2. Reproduction	8
I.4.2.1. La reproduction végétative (asexuée)	8
I.4.2.2. La reproduction sexuée	9
I.5. Métabolisme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
I.5.1. Le métabolisme oxydatif	10
I.5.2. Le métabolisme fermentaire	10
I.6. Caractéristiques biochimiques	11
I.7. Condition de culture de <i>S. cerevisiae</i>	11
I.7.1. Besoins physico-chimique	11
I.7.2. Besoins nutritionnels	12
I.8. Les principales applications de <i>S. cerevisiae</i> dans l'industrie	13
I. <i>L'invertase</i>	15
I. Généralités	15
II. Définition et rôle physiologique	15
III. Localisation et régulation	15
IV. Mécanisme d'Action de l'invertase	16
V. Caractérisation de l'invertase	17
V.1. Hydrolyse du substrat	17
V.2. Facteurs physicochimiques influençant l'activité enzymatique de l'invertase	18
VI. Immobilisation de l'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
VI.1. Les techniques d'immobilisation de l'invertase	20
VI.1.1. Méthodes physiques d'immobilisation	20
VI.1.2. Méthodes chimiques d'immobilisation	22
I. Valorisation alimentaire de l'invertase pour les diabétiques	24
I. Généralités	25
II. Le sucre inverti	25
II.1. Le pouvoir sucrant	26
II.2. Index glycémique (IG)	26
II.3. Amélioration des produits sensoriels	26
II.4. Effet sur le métabolisme énergétique	27
III. Comparaison entre le sucre inverti et les édulcorants	28
III.1. Stevia rebaudiana (E960)	28
III.2. L'aspartame (E951)	29
I. Principaux réactifs utilisés	33
II. Extraction de l'invertase de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	34

II.1. Protocole d'extraction	34
II.2. Dosage des protéines de la préparation enzymatique	36
II.2.1. Principe de la méthode de Biuret	36
II.2.1.1. Préparation de la gamme d'étalonnage	36
II.2.1.2. Détermination de la concentration protéique	37
II.2.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet	38
II.2.2. 1. Principe	38
II.2.2.2. Mode opératoire	38
III. Dosage des sucres réducteurs	39
III.1. Principe	39
III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage	39
IV. Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique	41
IV.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase	42
IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique de l'invertase	42
IV. 3. Détermination de l'activité spécifique de l'invertase	43
IV. 4. Effet de la concentration en saccharose sur l'activité enzymatique (Enzyme libre)	43
IV. 5. Hydrolyse enzymatique du saccharose dans un produit alimentaire (Biscuit)	44
V. Immobilisation de l'invertase	44
V.1. Principe	45
V.2. Mode opératoire	45
V.3. Cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée	45
V.4. Effet de la concentration du saccharose sur l'activité de l'invertase immobilisée	46
I. Etude de la cinétique enzymatique de l'invertase libre	49
I.1. Recherche de l'activité « invertase » dans la préparation enzymatique	49
I.2. Détermination des activités volumique et spécifique de l'invertase	50
I.3. Etude de la stabilité de la préparation d'invertase	51
I.4. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse	52
I.5. Application de l'hydrolyse de l'invertase sur un produit commercial (biscuit)	55
II. Etude de la cinétique enzymatique de l'invertase immobilisée	57
II.1. Étude de la stabilité de l'enzyme immobilisée	58
II.2. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse	59
III. Comparaison entre l'activité enzymatique de l'invertase libre et immobilisée	61
Conclusion et perspectives	65
Les références bibliographiques	66
Annexes	77
Résumé	79

Liste des abréviations

% : Pourcentage

CaCl₂:Chlorure de sodium

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique (réactif utilisé pour doser les sucres réducteurs)

DO: Densité optique

g:Gramme

GI:Index glycémique (Glycemic Index)

K_m:Constante de Michaelis

M: Molaire (mol/L) – concentration molaire

mg:Milligramme

min:Minute(s)

ml:Millilitre

NaCl:Chlorure de calcium

NaOH:Hydroxyde de sodium

nm :nanometer

S.C:*Saccharomyces cerevisiae*

t:Temps (seconde, minute ou heure)

T: Température (°C)

T°: Température

tr: Tour

UI:Unité Internationale

UV:Ultra-violet (spectrophotomètre)

V_{max}:Vitesse maximale de la réaction enzymatique

µm:Micro-mètre

µmol:Micromole

Liste des figures

Figure 1. Micrographie électronique à balayage du <i>S. cerevisiae</i>	6
Figure 2. Représentation schématique d'une cellule de levure de bière	8
Figure 3. Micrographie électronique d'une cellule de levure avec plusieurs cicatrices de bourgeon	8
Figure 4. Etapes clés de la reproduction asexuée chez les levures	9
Figure 5. Cycle de reproduction de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Figure 6. Mécanisme catalytique de l'invertase de levure	17
Figure 7. L'hydrolyse de Saccharose en Glucose et Fructose	18
Figure 8. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme	20
Figure 9. Immobilisation par adsorption	21
Figure 10. Immobilisation par inclusion	21
Figure 11. Illustration du concept d'encapsulation par le gel de Silice	22
Figure 12. Liaison covalente d'une enzyme à un support fonctionnalisé	23
Figure 13. Métabolisme du fructose	27
Figure 14. La suspension après 45 heures d'incubation	34
Figure 15. Homogénéisation du mélange après addition d'eau distillée	35
Figure 16. Préparation des échantillons avant centrifugation et réglage de la centrifugeuse à 4000 tr/min pendant 15 minutes	35
Figure 17. (A) Filtration de l'extrait enzymatique à l'aide de papier filtre ; (B) Extrait enzymatique obtenu après la deuxième centrifugation	35
Figure 18. Réaction de Biuret	36
Figure 19. Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret (Absorbance = 0,0502 X [protéines] ; r ² = 0,9651)	37
Figure 20. Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de sucre	39
Figure 21. Gamme étalons du sucre inverti de 0,5 à 5 mmol/L, après réaction au DNSA	40
Figure 22. Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur (Absorbance = 0,0505X [Sucre inverti] ; r ² = 0,9988).	40
Figure 23. Immobilisation de l'invertase par inclusion en gel d'alginate	45
Figure 24. Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée	46
Figure 25. Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (◆) et en absence (■) d'extrait enzymatique. ([Saccharose]=0,1M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M-pH 4,6; 25°C)	49
Figure 26. Évolution de l'activité enzymatique de l'extrait d'invertase entre le premier et le 20ème jour de stockage à 4°C	52
Figure 27. Représentation de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en saccharose selon le modèle de Michaelis-Menten	53

Figure 28. Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en saccharose _____	54
Figure 29. Activité de l'invertase sur un extrait de biscuit en fonction du temps d'incubation _____	56
Figure 30. Évolution de l'absorbance au cours de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée _____	57
Figure 31. Évolution de l'activité relative de l'enzyme immobilisée au cours de dix jours _____	59
Figure 32. Effet de la concentration en saccharose sur l'activité de l'enzyme immobilisée _____	60
Figure 33. Représentation de Lineweaver-Burk pour l'enzyme immobilisée _____	60
Figure 34. Évolution de l'activité relative (%) de l'invertase libre et immobilisée au cours du temps _____	62

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Tableau 2. Applications et avantages des produits issus de <i>S. cerevisiae</i>	13
Tableau 3. Comparaison entre le sucre inverti, la Stevia et l'aspartame.	30
Tableau 4. Dilution de la solution mère de la gélatine	36
Tableau 5. Dilutions de la solution mère enzymatique	38
Tableau 6. Protocole de préparation des échantillons du sucre inverti	40
Tableau 7. Protocole de préparation des échantillons pour déterminer l'activité de l'invertase	42
Tableau 8. Activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions standards	50
Tableau 9. Comparaison de la concentration en protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et par méthode du biuret de l'extrait enzymatique	50
Tableau 10. Paramètres cinétiques de l'invertase obtenus selon les modèles de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk	54
Tableau 11. Paramètres cinétiques de l'invertase immobilisée obtenus à partir des différentes équations	60
Tableau 12. Paramètres cinétiques de l'invertase libre et immobilisée selon les modèles de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk	63

Introduction

INTRODUCTION

Face à une crise sanitaire mondiale marquée par l'augmentation alarmante du diabète sucré — une maladie qui affecte plus de 500 millions de personnes selon la fédération internationale du diabète — la recherche de solutions alimentaires plus saines et innovantes s'impose comme un enjeu de santé publique prioritaire. Parallèlement, les biotechnologies modernes permettent aujourd'hui de revaloriser des ressources naturelles millénaires, telles que les levures, en leur conférant de nouvelles fonctions thérapeutiques et industrielles(**Walker et Stewart, 2016**).

Depuis l'Antiquité, les levures ont été utilisées de manière empirique, notamment dans la panification et la fermentation alcoolique, sans que leurs mécanismes d'action ne soient véritablement compris. Ce n'est qu'au XIX^e siècle que *Louis Pasteur* démontre scientifiquement leur rôle fondamental dans les fermentations, créant ainsi les bases de la microbiologie moderne(**Barnett, 2000**). Parmi ces levures, *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place centrale, tant dans la recherche fondamentale que dans les applications industrielles. Cette levure eucaryote, unicellulaire, est exploitée pour sa croissance rapide, sa manipulation aisée et sa capacité à produire des biomolécules d'intérêt, notamment la β -fructofuranosidase connu sous le nom d'invertase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose, formant un sirop connu sous le nom de « sucre inverti ». Ce dernier est apprécié pour son pouvoir sucrant élevé, sa stabilité, sa solubilité et sa résistance à la cristallisation, ce sucre est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire(**Nguyen et al., 2018**).

Cependant, l'utilisation industrielle de l'invertase sous forme libre présente plusieurs limites : instabilité thermique, sensibilité au pH, et impossibilité de réutilisation, ce qui engendre un coût élevé. Pour surmonter ces obstacles, des techniques d'immobilisation enzymatique ont été développées, visant à fixer l'enzyme sur un support solide afin d'en améliorer la durabilité, la stabilité et la performance lors d'applications répétées.

Dans le contexte actuel où la nutrition fonctionnelle devient un levier thérapeutique stratégique, le sucre inverti se présente comme une alternative prometteuse aux édulcorants synthétiques, parfois controversés pour leurs effets sur la santé à long terme. Grâce à son index glycémique modéré et à sa composition en monosaccharides

assimilables, il pourrait être intégré dans des produits destinés aux personnes diabétiques, contribuant à une alimentation plus équilibrée. C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail, qui vise à :

- ✚ Extraire l'invertase produite par *Saccharomyces cerevisiae* et déterminer ses paramètres cinétiques;
- ✚ Immobiliser l'enzyme sur un support solide et évaluer son activité et ses paramètres cinétiques.
- ✚ Ce mémoire s'inscrit ainsi à la croisée des biotechnologies, de la nutrition préventive et de l'innovation alimentaire, avec pour ambition de proposer une solution fonctionnelle, accessible et adaptée aux besoins nutritionnels spécifiques des diabétiques.

Partie

bibliographique

Chapitre1.
Saccharomyces cerevisiae

I.1. Généralités

Les levures sont les premiers microorganismes utilisés par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation. Elles sont également les premiers microorganismes à être observés au microscope par Van Leewenhoeken 1680 (**Bouix et Leveau, 1991**).

Les levures sont des organismes eucaryotes hétérotrophes appartenant au groupe des champignons. Elles se reproduisent généralement par un processus appelé bourgeonnement (figure 1). Cependant, dans certains cas, les bourgeons ne se détachent pas, ce qui conduit à la formation d'une courte chaîne de cellules appelée hyphe (**Tortura et al., 2003**). Considérablement plus grandes que les bactéries, les levures constituent le groupe de microorganismes le plus important en termes de quantité et d'économie à des fins industrielles (**Jacques et al., 2003**), elles sont également un organisme modèle en biologie avec un métabolisme connu (**Goffeau et al., 1996**).

I.2. Définition

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) est la principale levure utilisée en biotechnologie dans le monde, principalement en raison de sa physiologie unique et des rôles clés qui lui sont associés dans de nombreuses fermentations alimentaires et d'autres processus industriels (**Johnson et Echavarri-Erasun, 2011**)

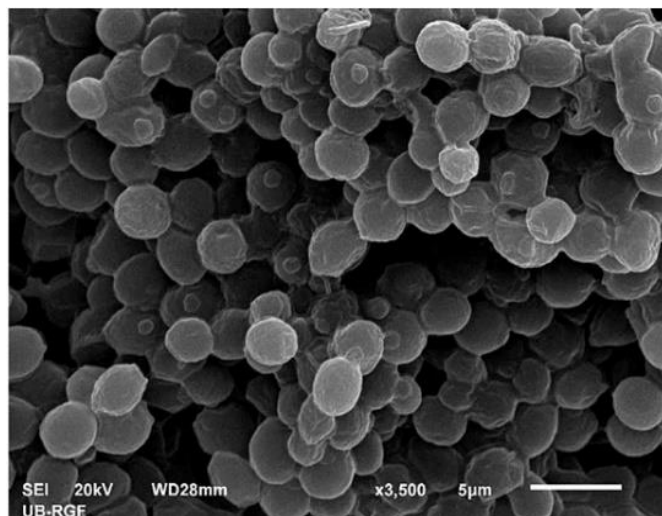


Figure 1: Micrographie électronique à balayage de *S. Cerevisiae* (**Margetić et Vujčić, 2017**).

L'étude systématique de cette levure a commencé avec la découverte, par *Pasteur*, de leur rôle dans la fermentation alcoolique puis par les travaux de *Buchner* sur l'enzymologie de la fermentation (**Cherrak., 2003**). *Saccharomyces cerevisiae* se révèle être une excellente candidate pour la production industrielle d'enzymes (**Margetića et Vujčićb, 2017**).

En 1996, la souche *S288c* de *S. cerevisiae* est devenue le premier eucaryote dont le génome complet a été séquencé. Les résultats ont montré qu'une cellule haploïde contient environ 12000 kilo-bases d'ADN génomique, portant approximativement 6 000 gènes répartis sur 16 chromosomes (**Goffeau et al., 1996**).

I.3. Classification

Le genre *Saccharomyces* appartient à la classe des ascomycètes (comportant des espèces produisant des spores « ascospores » et qui sont regroupées à l'intérieur de sacs appelés « asques »), à la sous classe des Hémiascomycetes, à l'ordre des endomycétales, à la famille des Saccharomycetaceae et à la sous-famille des *Saccharomycetoïdeae* (**Cherrak, 2003; Castan, 2016**).

I.4. Caractéristiques microbiologiques

I.4.1. Morphologie et structure

La levure *S. cerevisiae* est un microorganisme unicellulaire, immobile, doté d'un noyau et d'autres organites liés à la membrane (figure 2) (**Tortura et al., 2003; Guiraud, 2003; Goffeau et al., 1996**). Elle présente des cellules de forme ovale ou ronde dont la taille varie généralement entre 2.5 à 10.5 µm de largeur et 4.5 à 21 µm de longueur, bien que certaines espèces puissent mesurer jusqu'à 30 µm de long (**Cherrak, 2003**). La taille moyenne des cellules varie en fonction du stade du cycle de croissance, des conditions de croissance et de l'âge de la cellule (**Jacques et al., 2003**).

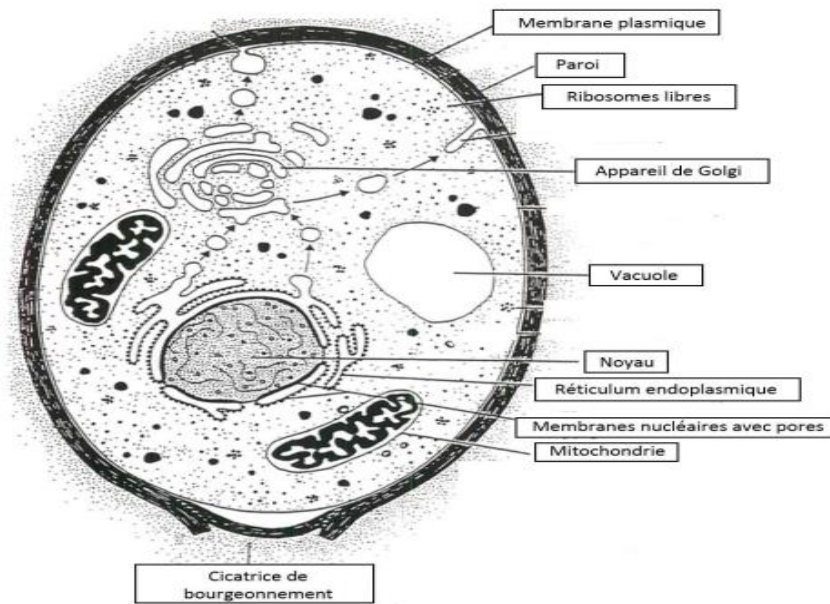


Figure 2: Représentation schématique d'une cellule de levure de bière (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997**).

I.4.2. Reproduction

I.4.2.1. La reproduction végétative (asexuée)

Dans des conditions de croissance idéales, qui incluent une source de nourriture, de chaleur et d'oxygène, les cellules de levure se multiplient rapidement par bourgeonnement. Un bourgeon commence par une petite protubérance qui pousse à partir de la surface de la cellule mère. Au fur et à mesure que le bourgeon s'agrandit, le noyau de la cellule mère se divise. Le bourgeonnement s'achève lorsque la cellule fille, entièrement développée, se sépare de la cellule mère et laisse une cicatrice visible au microscope électronique à balayage (Figure 3) (**Levure Anchor, 2022**).

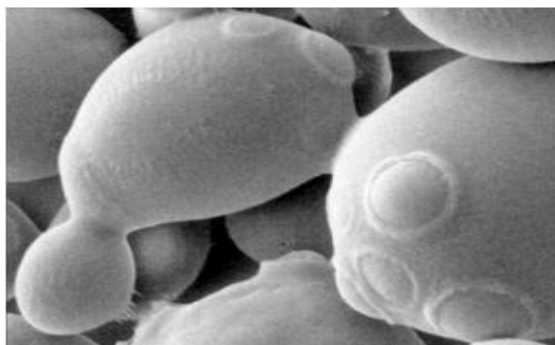


Figure 3 : Micrographie électronique d'une cellule de levure avec plusieurs cicatrices de bourgeon (**Jacques et al., 2003**).

Une cellule doit subir le processus de duplication de tous ses composants et les séparer, plus ou moins uniformément, en deux cellules filles de sorte que chaque fille dispose des informations et de la dynamique nécessaires pour répéter le processus. En effet, le cycle cellulaire de la levure bourgeonnante se compose de quatre phases : G1, S, G2 et M. Avant d'entrer en phase S, la cellule doit être suffisamment grande et avoir un ADN non endommagé. Avant d'entrer en phase M, la synthèse de l'ADN doit être terminée (**Hong et al., 2012**).

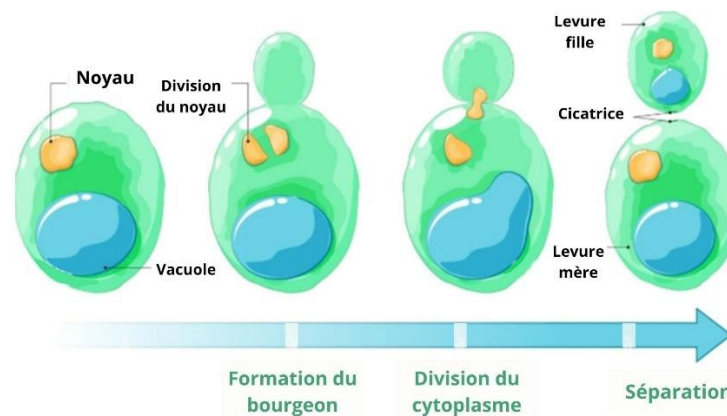


Figure 4 : Étapes clés de la reproduction asexuée chez les levures (<https://www.alamyimage.fr/>)

I.4.2.2. La reproduction sexuée

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la conjugaison sexuelle entre des cellules haploïdes de type opposé (**a** et **α**) aboutit à la formation d'un zygote diploïde. Ce processus complexe implique la reconnaissance intercellulaire, l'interaction mutuelle et finalement la fusion aboutissant à la formation d'un zygote diploïde. Les cellules haploïdes se regroupent pour former des agrégats de plusieurs cellules, à l'intérieur desquels les zygotes diploïdes s'accouplent (**Tkacz et MacKay, 1979**).

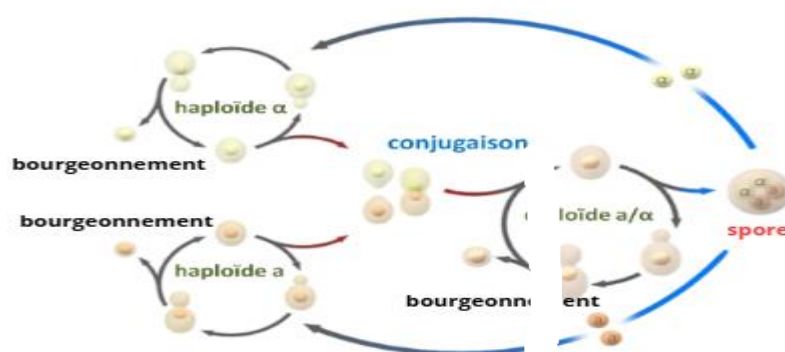


Figure 5 : Cycle de reproduction de *Saccharomyces cerevisiae* (<https://gdc.sdv.univ-paris-diderot.fr/cours/genetique/chap/00.html>).

I.5. Métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

Grâce à la dégradation des molécules organiques produites, les levures tirent l'énergie nécessaire pour leur développement. En effet, *Saccharomyces cerevisiae* utilise deux types de métabolisme différents pour produire de l'énergie; selon la présence ou l'absence d'oxygène. Il s'agit du métabolisme oxydatif (en aérobiose) et du métabolisme fermentaire (en anaérobiose) (De Deken, 1966 ; NguyenetCastan, 2016).

I.5.1. Le métabolisme oxydatif

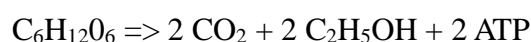
Les levures consomment le glucose en présence d'oxygène, ce qui signifie que leur métabolisme est entièrement respiratoire et que le pyruvate est oxydé via le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (Larpen, 1991). Selon (Guinet et Godon, 1994), l'équation globale de la respiration est la suivante:



En effet, toute l'énergie contenue dans le glucose étant libérée, la levure peut donc entrer en croissance et se multiplier. À des concentrations élevées de glucose, même en présence d'oxygène, la levure favorise la fermentation plutôt que la respiration. Cet effet, connu sous le nom d'effet Crabtree, est un mécanisme de régulation important pour l'adaptation aux conditions environnementales (Fiechter et Seghezzi, 1992).

I.5.2. Le métabolisme fermentaire

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud et al., 2004). La dégradation du glucose en CO₂ et en alcool est estimée à 95 % ; les 5 % restants servent à la formation de produits secondaires. L'équation globale de la fermentation est la suivante (Guinet, Godon, 1994):



I.6. Caractéristiques biochimiques

Saccharomyces cerevisiae est une levure largement utilisée en biotechnologie en raison de ses capacités fermentaires et métaboliques. Son aptitude à utiliser différentes sources de carbone varie selon la nature du substrat. Certains sucres sont efficacement fermentés, tandis que d'autres ne sont pas métabolisés ou présentent une assimilation variable (Guiraud et Galzy, 1998). Le tableau suivant résume les principales caractéristiques biochimiques de cette levure.

Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques de *Saccharomyces cerevisiae* (Guiraud et Galzy, 1998)

Type de substrat	Substrats spécifiques	Capacité d'utilisation
Source d'azote	Nitrate, urée	Non utilisées (-)
Sucre fermentescible	Glucose, Saccharose, Raffinose.	Fermentés (+F)
Sucres partiellement fermentés	Galactose, Tréhalose, Cellobiose, Ethanol.	Variable (X)
Sucres non métabolisés	Lactose, Mélibiose, Xylose.	Non utilisés (-)

(-) : Substrat non utilisé. (+F) : Substrat utilisé par fermentation. (X) : Utilisation variable ou non déterminée

I.7. Condition de culture de *S.cerevisiae*

La croissance d'un microorganisme peut être considérée comme une série d'interactions entre les cellules et l'environnement (Bouix et al., 1993), la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* dépend étroitement de divers facteurs physico-chimiques et nutritionnels qui influence son métabolisme et son rendement.

I.7.1. Besoins physico-chimique

- **Le pH:** *S. cerevisiae* présente l'avantage de croître sur un milieu acide, pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un pH compris entre 4 et 4,5 (Revuz, 1979).
- **La température:** La température de croissance convenable pour la levure *S. cerevisiae* se situe entre 25°C et 35°C. Ce sont des mésophiles (Larrent et al., 1985).
- **La pression osmotique:** *S. cerevisiae* est une espèce osmophile qui se développe sur des milieux à forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme lent au contraire de certaines espèces (Larrent et Gourgoud, 1985).

- **L'aération** : la levure s'adapte à deux modes de vie en présence et en absence d'oxygène (**Revuz, 1979**).

I.7.2. Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit fournir tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires de la levure, ainsi qu'à ses besoins énergétiques.

- **Le carbone** : Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, etc. Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose, le raffinose, la cellobiose et le galactose et peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique et l'acide citrique (**Aguilar, 2003**).
- **L'azote** : L'azote est un élément essentiel pour la croissance des levures, qui peuvent l'utiliser sous forme d'ions ammonium et d'urée pour la synthèse de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (**Larpen, 1992**). Selon **Bourgeois et al. (1996)**, la levure *S. cerevisiae* ne peut pas utiliser le nitrate comme source d'azote.
- **Le phosphore** : *S. cerevisiae* utilise l'orthophosphate, préférentiellement sous forme d'ion monovalent, comme unique source de phosphore (**Winter, 1988**). **Jones et collaborateurs (1981)** notent que cet élément sert à la synthèse des lipides, des hydrates de carbone et participe au maintien de l'intégrité membranaire.
- **Le soufre** : Selon **Rose et Harrison (1971)**, le soufre est assimilé généralement sous forme inorganique. Il est transformé dans la cellule sous forme d'un acide aminé qui est la méthionine.
- **Le potassium** : C'est l'élément minéral quantitativement le plus important. Source de potassium: phosphate mono et dipotassique (K_2HPO_4 ou KH_2PO_4).
- **Le zinc** : Il joue un rôle crucial en tant que co-facteur enzymatique nécessaire dans le processus de la glycolyse. Il est essentiel pour la production de vitamines (riboflavine), favorise l'activité du magnésium ainsi que l'absorption du maltose et du maltotriose. La carence en traces de zinc réduit le pouvoir fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae*. (**Guinet et Godon, 1994; Leveau et Bouix, 1993**).
- **Les oligo-éléments** : Bien qu'ils ne soient présents qu'en quantités infimes, de l'ordre du « mg/L » dans le milieu de culture, ils sont essentiels pour la levure. Ils participent également à l'activation de certaines réactions enzymatiques et à la synthèse de certaines vitamines et coenzymes (**Bourgeois et al., 1996**).

- **Les vitamines:** l'apport de vitamine est indisponible pour assurer une bonne croissance et une meilleure activité fermentaire de la levure *S.cerevisiae*, les besoins en biotine sont de l'ordre de 1 mg/L. la quantité nécessaire en vitamines B6 est de 6.25 mg/L (**Bouix et al.,1993**).

I.8. Les principales applications de *S. cerevisiae* dans l'industrie

Saccharomyces cerevisiae occupe une position de choix dans les activités industrielles. Utilisée depuis des millénaires par l'homme, cette levure est essentielle pour la production de boissons et de produits fermentés tels que le vin, la bière et le pain, jouant ainsi un rôle crucial dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agent de fermentation et pour la création de produits dérivés (**Tortora et Anagnostakos, 1987**). Elle sert également de micro-usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt (**Mercier, 1997; Blin, 2002**). Dans les domaines pharmaceutique et médical, *S. cerevisiae* est utilisée pour produire des vaccins et des probiotiques (**Rose et Harrison, 1971**). De plus, elle joue un rôle clé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits de commodité, tels que l'acide lactique utilisé dans la fabrication de plastiques, ainsi que dans le domaine des énergies renouvelables et des biocarburants, notamment le bioéthanol (**Parrou et al., 1997**).

Tableau 2 : Applications et avantages des produits issus de *S.cerevisiae*.

Produits de <i>S. cerevisiae</i>	Domaines	Applications	Avantages
Alcool et CO ₂	Industrie alimentaire	Fabrication du pain, du vin, de la bière. (Hurteau et Tremblay, 2015)	Favorise la fermentation, donne une texture aérée aux produits de boulangerie
Ethanol	Industrie pharmaceutique, biocarburants	Solvant (Smeets et al., 2016)	Agent antimicrobien, Source d'énergie renouvelable
Glycérol	Chimie, Industrie pharmaceutique, Cosmétique	Chimie des matières plastiques. (Zigha et al., 2015)	Retient l'humidité, stabilisant dans les formulations.
Protéines alimentaires (à partir des mélasses)	Industries agroalimentaire, alimentation animale	Aliments pour humain et bétail (Duport et al., 2015)	Source de protéines bon marché, améliore la nutrition
Invertase	Industries sucrière	Confiserie (Silveira et al., 2016)	Améliore la douceur, empêche la cristallisation du sucre.

Chapitre2.

L'invertase

I. Généralités

Les enzymes sont des protéines dotées de capacités catalytiques leur permettant d'intervenir dans certaines réactions biochimiques en les accélérant sans affecter le produit final. Ces biocatalyseurs actuellement utilisés à des fins de recherche ou pour des applications industrielles proviennent de différentes origines végétales, animales ou microbiennes. En général, ceux d'origine microbienne sont les plus utilisés à l'échelle industrielle (Wallach, 1997). Ils peuvent être dérivés de bactéries, de levures ou de moisissures, ce qui permet la catalyse dans différentes conditions de pH, de température ou de pression contrairement aux catalyseurs chimiques, avec une grande rentabilité d'une part, et une meilleure productivité d'autre part (Schmid et al., 2001; Schmid et al., 2002).

En effet, les levures produisent et libèrent diverses enzymes, comme la β -fructosidase, qui fut l'une des premières enzymes décrites par Persoz en 1833 (Pol, 1996; Bacha, 2008).

II. Définition et rôle physiologique

L'invertase, ou la β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26), est une enzyme largement présente chez les plantes et les micro-organismes. Elle catalyse l'hydrolyse du saccharose. Cette enzyme appartient à la famille des glycoside-hydrolases et joue un rôle crucial dans le métabolisme des sucres fermentescibles (Sainz-Polo et al., 2013). Les espèces de levures du genre *Saccharomyces*, telles que *S. cerevisiae*, sont la principale source d'invertase. En effet, il existe deux formes d'invertase, à savoir : interne et externe. L'invertase externe, qui représente 95 % de toutes les invertases de la levure, est soumise à la répression catabolique par les hexoses, tandis que l'invertase interne ne l'est pas (Vitolo, 2021). Dans l'industrie alimentaire, l'invertase est principalement employée dans la fabrication de sucre inverti à partir du saccharose.

III. Localisation et régulation

L'invertase existe sous deux formes distinctes en fonction de sa glycosylation et de sa localisation cellulaire. L'invertase extracellulaire, sous sa forme glycosylée, est sécrétée dans l'espace périplasmique grâce à la présence d'un signal peptidique à son extrémité N-terminale, qui facilite son orientation et son export. En revanche, l'invertase intracellulaire, dépourvue de ce signal et non glycosylée, reste confinée dans le cytosol, ce

qui empêche son transport vers l'espace périplasmique et entraîne son accumulation dans le compartiment intracellulaire (**Reddy et Maley, 1990**). Les deux formes proviennent de la transcription du même gène structurel, à savoir le gène *SUC2*. D'après **De Alteris et al. (1999)**, ce gène code pour les deux formes d'invertase à partir de deux ARN messagers différents; un ARNm de 1,9 kb dont l'expression est régulée par la répression métabolique du glucose, et qui code pour l'invertase externe ; et un second ARNm de 1,8 kb qui code pour la forme intracellulaire constitutive.

IV. Mécanisme d'Action de l'invertase

Le mécanisme d'action de l'invertase repose sur une interaction complexe entre l'enzyme et son substrat, suivant principalement deux modèles : celui de l'ajustement induit et celui de la complémentarité stérique (**Mouranche, 1985**). Ces modèles décrivent l'adaptation dynamique entre l'enzyme et le substrat, formant des intermédiaires réactionnels instables qui permettent de diminuer la barrière énergétique de la réaction. Cette réduction de l'énergie d'activation « E_a » est essentielle pour accélérer la vitesse de réaction, en la reliant à la différence d'énergie libre entre l'état de transition et l'état fondamental de la réaction.

Le mécanisme catalytique de l'invertase, décrit par **Reddy et Maley (1996)**, repose sur la protonation de l'oxygène de la liaison glycosidique du saccharose par le résidu glutamate (Glu 204), qui agit comme un donneur de proton. Cette protonation facilite l'attaque nucléophile du résidu aspartate (Asp 23) sur le carbone anomérique C2 du fructose, entraînant la formation d'un complexe covalent entre l'enzyme et le fructosyl. Ce complexe permet la libération du glucose. Ensuite, le résidu « Glu 204 », agissant comme une base, extrait un proton d'une molécule d'eau, ce qui permet au groupe hydroxyle de déplacer le fructose et de restaurer la conformation active de l'enzyme. Le mécanisme se déroule donc en deux étapes successives, ce qui est essentiel pour sa fonction catalytique (**Reddy et Maley, 1996; Kaplan et al., 1997**).

Des recherches supplémentaires ont montré que le résidu « Asp 23 » est crucial dans ce processus catalytique. La substitution de l'aspartate par l'asparagine (Asn) entraîne l'inactivation complète de l'enzyme, confirmant ainsi son rôle essentiel dans la réaction (**Naumoff, 1999**). De plus, des études sur l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* ont révélé que lorsque le « Glu204 » est remplacé par un autre résidu tel que l'alanylle, l'activité catalytique de l'enzyme est fortement réduite. Ce glutamate est donc nécessaire

pour assurer l'efficacité de l'hydrolyse de la liaison glycosidique du saccharose en servant de donneur de proton (**Reddy et Maley, 1996**).

En résumé, le mécanisme catalytique de l'invertase repose sur une interaction précise entre des résidus spécifiques du site actif, en particulier « Glu 204 » et « Asp 23 », impliqués dans la protonation, l'attaque nucléophile et la réactivation de l'enzyme. Ce processus en deux étapes est fondamental pour l'hydrolyse efficace du saccharose (**Reddy et Maley, 1996; Kaplan et al., 1997; Naumoff, 1999**).

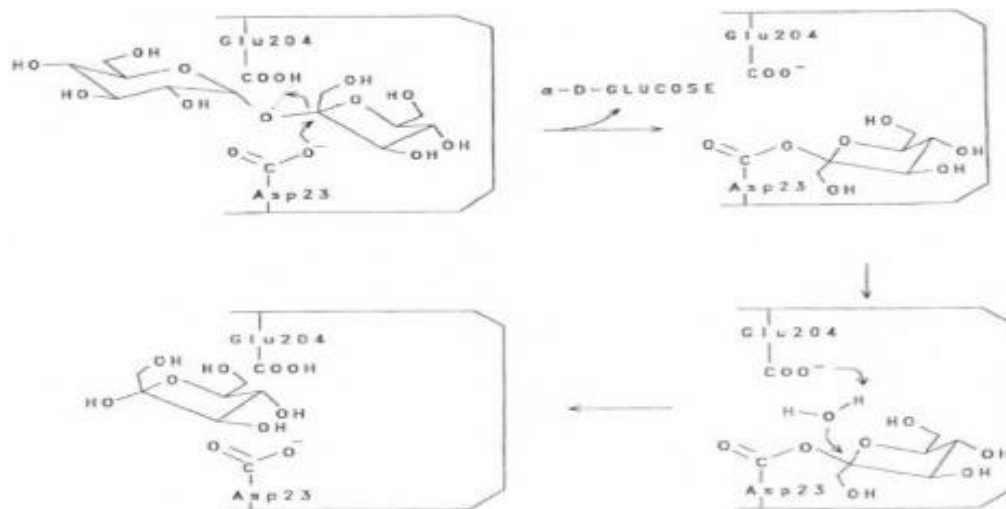


Figure 6 : Mécanisme catalytique de l'invertase de levure (**Reddy et Maley, 1996**).

V. Caractérisation de l'invertase

V.1. Hydrolyse du substrat

Le saccharose ou sucre de table est un diholoside non réducteur, son nom systématique est l' α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside. Il est composé d'une molécule de α -D-glucose et d'une molécule de β -D-fructose, liées par une liaison osidique (**Salgarolo, 1990 ; Vrabel et al., 1994**). Lorsque cette liaison glycosidique est clivée par hydrolyse, un mélange équimolaire de glucose et de fructose, appelé « sucre inversé », est obtenu. L'inversion du saccharose en glucose et fructose (monosaccharides solubles) peut être réalisée par hydrolyse chimique (à l'aide d'acide) ou biochimique (enzymatique) (**De Almeida et al., 2005**). L'hydrolyse enzymatique du saccharose n'entraîne pas la formation d'agents aromatiques indésirables ni d'impuretés colorées; elle est donc préférable à l'hydrolyse acide (**Nadeem et al., 2015**).

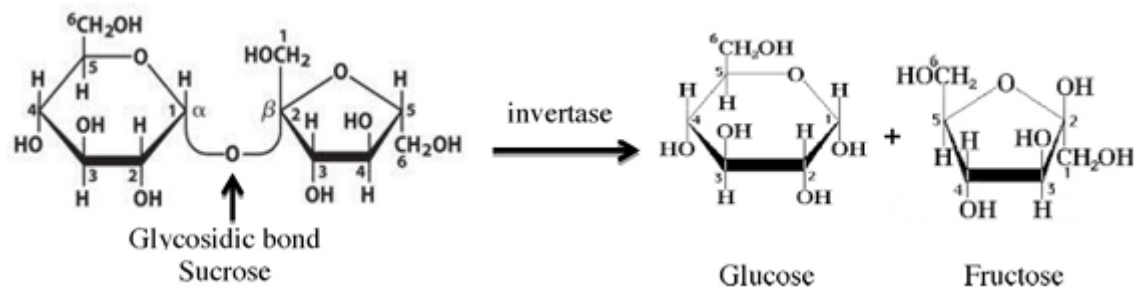


Figure 7 : L'hydrolyse du Saccharose en Glucose et en Fructose (Nadeem et al., 2015).

V.2. Facteurs physicochimiques influençant l'activité enzymatique de l'invertase

La cinétique enzymatique dépend non seulement de la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais aussi des propriétés du milieu réactionnel.

- La température :** Les enzymes fonctionnent de manière optimale à une température spécifique, mais leur activité diminue rapidement en dehors de cette zone (Singh et al., 2014). Deux facteurs clés influencent les conditions d'un processus enzymatique : l'énergie d'activation de la réaction et la stabilité thermique de l'enzyme. Une augmentation de la température accélère la réaction en surmontant l'énergie d'activation, mais au-delà d'un certain seuil, elle provoque la dénaturation et l'inactivation de l'enzyme (Robinson., 2015). Selon Margetić et Vujčić (2017), l'invertase présente une activité maximale à 60°C. Les propriétés thermodynamiques des enzymes sont généralement étudiées pour connaître leur stabilité à la chaleur, qui est l'un des facteurs les plus importants auxquels le biocatalyseur doit faire face dans les processus industriels (Nadeem et al., 2015). En particulier dans la préparation des aliments, qui inclut généralement une exposition à des températures élevées (Yucekan et Onal., 2012). L'amélioration de la stabilité des enzymes pour les processus industriels permet de réduire les coûts de production et d'améliorer la qualité des produits. Bien qu'une augmentation de la température accélère généralement les réactions enzymatiques, elle réduit également la stabilité des enzymes. En effet, à des températures élevées, les enzymes se dénaturent, ce qui entraîne leur inactivation (Margetić et Vujčić, 2017).

- Le pH :** Le pH influence la protonation des groupes fonctionnels des résidus d'acides aminés, ce qui affecte le repliement des protéines, la fonctionnalité du site actif et la

stabilité de l'enzyme. De plus, le pH peut modifier la protonation de certains substrats, influençant ainsi leurs interactions ioniques avec les sites actifs des enzymes. Chaque enzyme possède un pH optimal pour une réaction spécifique, et il est essentiel que le processus enzymatique se déroule à ce pH optimal ou à une valeur proche pour garantir une activité maximale (**Kabir et Lu-Kwang, 2023**). L'invertase de *S. cerevisiae* présente une activité maximale à un pH allant de 3,5 à 5,0 (**Andjelkovic et al., 2010**).

- **La concentration en substrat** : Un complexe de Michaelis enzyme-substrat (ES) se forme lors d'une réaction catalytique. La vitesse de réaction augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à ce que l'enzyme soit saturée. La vitesse initiale atteint un maximum donc et ne peut plus être augmentée, même avec une concentration supplémentaire de substrat (**Murray et al., 2003**).

- **Les inhibiteurs** : Un inhibiteur est une substance qui provoque l'inactivation partielle ou totale en se fixant sur une enzyme, entraînant ainsi une réduction de la vitesse de la réaction enzymatique (**Berg et al., 2015**). Les métaux lourds sont de puissants inhibiteurs de l'invertase. Une inhibition de 50 % de l'activité de l'invertase avec les ions d'argent (Ag^+) à une concentration de 4 mmol/kg de solution (**Hüttl et al., 1999**). En outre, l'inhibition compétitive par les produits de la réaction (glucose et fructose) se produit lorsque ces derniers entrent en compétition avec le substrat pour se lier au site actif de l'enzyme (**Berg et al., 2015**).

VI. Immobilisation de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

L'immobilisation des enzymes consiste à fixer une enzyme dans une phase solide (matrice/support) différente de celle des produits ou des substrats (**Datta et al., 2013**). Cette technique permet de rendre l'enzyme insoluble grâce à un traitement physique ou chimique approprié (**Alnajjar, 2001**). L'application des enzymes pour la production à l'échelle industrielle est limitée par leur coût élevé de production et de stabilisation lors du stockage. Au cours de l'utilisation de l'enzyme, sa stabilité diminue en raison de l'altération du pH, de la température et des changements structurels. En outre, les enzymes étant solubles, il n'est pas facile de les récupérer pour les réutiliser à partir d'un mélange de produit et de substrat, ce qui rend le processus enzymatique encore plus coûteux (**Tanriseven et Dogan., 2001; Danisman et al., 2004; Emregul et al., 2006; Idris et al., 2008**).

Les propriétés de l'enzyme immobilisée dépendent fortement des caractéristiques de la matrice et de la méthode utilisée pour fixer l'enzyme. Les matrices hydrophiles, comme le Sephadex, le Sepharose et la cellulose, sont couramment employées car elles contribuent à stabiliser l'enzyme. En revanche, les matrices telles que le polystyrène et les supports inorganiques offrent d'autres avantages, notamment une meilleure résistance aux forces mécaniques et à la contamination bactérienne par rapport aux matrices hydrophiles (Kotwal et Shankar, 2009).

La technologie d'immobilisation des enzymes a remplacé les réactions enzymatiques conventionnelles en raison de plusieurs avantages. En plus de leur stabilité et leur réaction catalytique facilement contrôlée, les enzymes immobilisées peuvent convertir une grande quantité de substrat en produit et l'enzyme peut être simplement isolée du mélange pour être réutilisée (Manoochehri et al., 2020).

VI.1. Les techniques d'immobilisation de l'invertase

L'invertase a été immobilisée par adsorption, inclusion et immobilisation covalente sur divers supports (Amaya-Delgado et al., 2006).

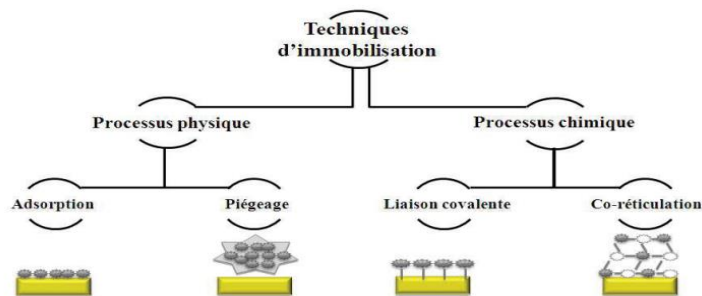


Figure 8 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme (Boisse, 2013).

VI.1.1. Méthodes physiques d'immobilisation

- **Immobilisation par adsorption :** La méthode d'adsorption peut être définie comme l'une des méthodes simples d'immobilisation réversible qui reposent sur la fixation de la molécule enzymatique à la surface d'un support grâce à des interactions secondaires (figure 10). Ces interactions incluent les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les liaisons ioniques, qui se forment entre les groupes fonctionnels du support et ceux de l'enzyme (Cherrak, 2003 ; Mohamadet al., 2015).

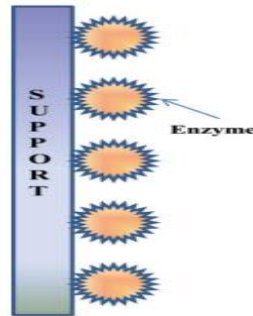


Figure 9 : Immobilisation par adsorption (Mohamad *et al.*, 2015).

L'adsorption physique nécessite généralement de tremper le support dans une solution d'enzyme, puis de l'incuber pour laisser le temps à l'adsorption de se produire. Une autre méthode consiste à laisser sécher une solution d'enzyme sur la surface des électrodes, puis à rincer les enzymes qui ne sont pas adsorbées (Mohamad *et al.*, 2015). Cependant, ces forces non spécifiques relativement faibles souffrent d'inconvénients tels que des fuites d'enzymes de la matrice (Tosa *et al.*, 1966).

- **Immobilisée par inclusion:** L'immobilisée par inclusion (piégeage) est définie comme une méthode irréversible d'immobilisation des enzymes où les enzymes sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau, ou emprisonnées à l'intérieur de microcapsules délimitées par une membrane semi-perméable (Subramanian *et al.*, 1999; Klotzbach *et al.*, 2008), qui laissent passer le substrat et les produits mais conservent l'enzyme (Costa *et al.*, 2005; Aehle, 2007). Le piégeage est également décrit comme une restriction physique de l'enzyme dans un espace ou un réseau confiné (Won *et al.*, 2005). Dans cette méthode, l'enzyme n'est pas liée à la matrice de support, contrairement aux autres méthodes (Sirisha *et al.*, 2016).

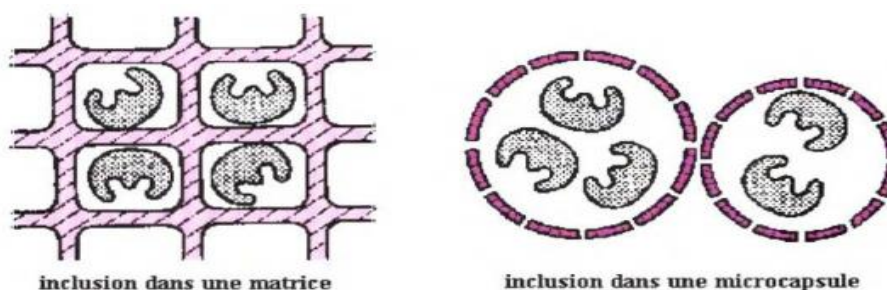


Figure 10 : Immobilisation par inclusion (Cherrak, 2003).

Le processus d'immobilisation enzymatique par inclusion comprend trois étapes principales :

- **La préparation de la matrice** : Le choix de la matrice de support est crucial et doit tenir compte des propriétés physico-chimiques de l'enzyme, des conditions de réaction et des exigences du système (wang et Shim, 2004).
- **L'encapsulation de l'enzyme** : Elle peut être réalisée par l'une des méthodes suivantes : par inclusion de l'enzyme dans une matrice polymère hautement réticulée, par dissolution de l'enzyme dans une phase non aqueuse, ou par séparation de l'enzyme d'une solution en vrac à l'aide d'une microcapsule semi-perméable (Sirisha et al., 2016).
- **La caractérisation de la biocatalyse immobilisée** : est cruciale pour évaluer sa stabilité et son efficacité. Des techniques telles que la spectroscopie, la microscopie et la mesure de l'activité enzymatique sont utilisées pour analyser ses propriétés physico-chimiques (Sheldon, 2007).

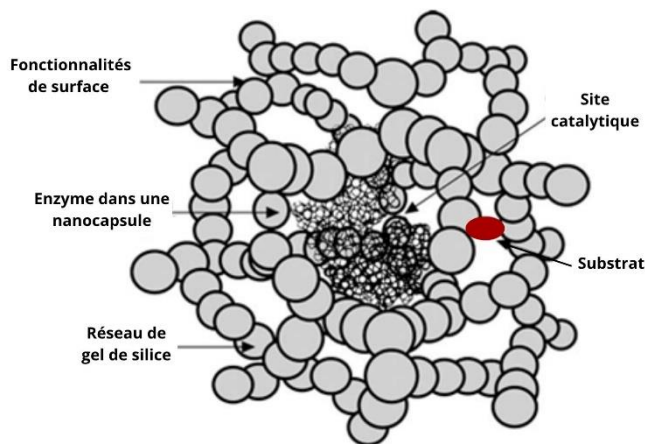


Figure 11: Illustration du concept d'encapsulation par le gel de Silice (Pierre, 2004).

VI.1.2. Méthodes chimiques d'immobilisation

Immobilisation par liaison covalente : Cette technique repose principalement sur la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et le matériau de support. La formation de ces liaisons se fait par l'intermédiaire des chaînes latérales d'acides aminés (Sirisha et al., 2016), telles que la lysine (groupe amine), de la cystéine (groupe thiol) et des acides aspartique et glutamique (groupe carboxylique, groupes imidazole et phénolique qui ne sont pas essentiels pour l'activité catalytique de l'enzyme) (Mohamadet al., 2015).

Le processus d'immobilisation enzymatique par liaison covalente se déroule en quatre étapes (**Brady et Jordaan, 2009**) : En premier, la préparation du support adapté, compatible avec l'enzyme et possédant des propriétés physico-chimiques appropriées (résines d'échange d'ions). En suite, l'activation chimique du support par les méthodes fréquemment utilisées comprend l'emploi de réactifs comme le glutaraldéhyde, ces réactifs permettent de créer des groupes réactifs à la surface du support pour la fixation de l'enzyme. Enfin, la purification du produit immobilisé afin d'éliminer les enzymes non fixées et les impuretés. Les méthodes fréquemment employées pour cela sont la filtration et la centrifugation. L'un des principaux avantages de cette technique est la stabilité des liaisons formées entre l'enzyme et la matrice, ce qui empêche la libération de l'enzyme dans la solution lors de son utilisation (**Brena et al., 2013**).

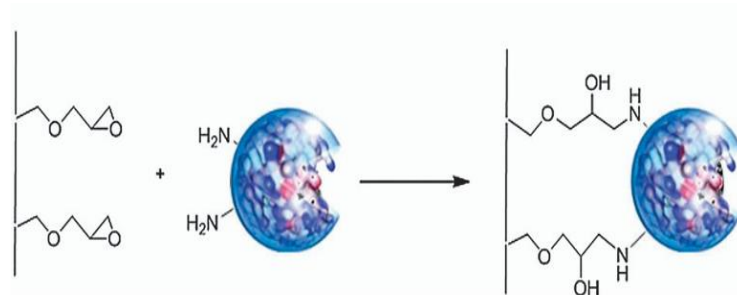


Figure 12 : Liaison covalente d'une enzyme à un support fonctionnalisé (**Sheldon et van Pelt, 2013**).

Chapitre 3.

*Valorisation alimentaire de
l'invertase pour les diabétiques*

I. Généralités

Le diabète est un trouble métabolique non transmissible caractérisé par une hyperglycémie, résultant soit d'une sécrétion insuffisante d'insuline par les cellules « β » pancréatiques, soit d'une résistance à son action physiologique (insulinorésistance), ou d'une combinaison des deux (*Canadian Diabetes Association, 2013; Kharroubi et Darwish, 2015*). Les données épidémiologiques révèlent qu'en 2022, environ 14 % de la population adulte était atteinte de diabète, avec un taux de progression annuelle de la prévalence variant entre 4,7 et 8,5% (*OMS, 2024*).

La prévalence croissante du diabète sucré dans le monde, en particulier du diabète de type 2, a suscité un intérêt majeur pour le développement d'alternatives sucrantes naturelles, capables de remplacer le saccharose sans provoquer de pics glycémiques élevés. En effet, la consommation excessive de sucres simples est l'un des facteurs aggravants de l'hyperglycémie chronique et des complications métaboliques associées chez les patients diabétiques (*OMS, 2021*). Dans ce contexte, la recherche de solutions naturelles, efficaces et technologiquement compatibles avec les procédés alimentaires constitue un enjeu majeur. Parmi ces alternatives, le sucre inverti représente une option intéressante. Il est obtenu par hydrolyse enzymatique par l'invertase du saccharose. L'intérêt de l'invertase ne se limite pas à sa capacité de production du sucre inverti, mais s'étend également à son potentiel d'application dans des formulations alimentaires destinées aux personnes diabétiques, grâce à une modulation plus douce de la réponse glycémique comparée au saccharose pur (*Ahmed et al., 2018*).

Ce chapitre a donc pour objectif d'examiner la valeur nutritionnelle et fonctionnelle du sucre inverti, en lien avec les besoins spécifiques des patients diabétiques, tout en le comparant aux autres édulcorants naturels et synthétiques disponibles sur le marché.

II. Le sucre inverti

Le sucre inverti est un mélange équimolaire de glucose (dextrose) et de fructose (lévulose) obtenu par hydrolyse du saccharose, réalisée soit par des acides faibles (comme l'acide citrique ou tartrique), soit par l'action enzymatique de l'invertase (*Qi et Tester, 2019; Schnepel et Hoffmann, 2013*). Ce phénomène est qualifié « d'inversion » en raison du changement de la rotation optique de la solution, passant de dextrogyre à lévogyre (*Jordan, 1924*).

Dans une perspective de valorisation nutritionnelle pour les personnes diabétiques, le sucre inverti présente plusieurs avantages fonctionnels et métaboliques. Il est pertinent d'en analyser les propriétés sensorielles, son index glycémique, son impact sur le métabolisme énergétique, ainsi que son pouvoir sucrant.

II.1. Le pouvoir sucrant

Le sucre inverti possède un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose, comme l'ont démontré **Sale et Skinner** dès **1922**. Leurs travaux révèlent que 100g de sucre inverti offrent une douceur équivalente à environ 117 g de saccharose. Ce pouvoir sucrant est généralement 20 % plus élevé que celui du saccharose, permet de réduire significativement les quantités nécessaires pour obtenir une saveur sucrée similaire (**Qi et Tester, 2019**). Cette caractéristique présente un double avantage : elle permet de diminuer l'apport énergétique total et de réduire la charge glucidique, ce qui est particulièrement bénéfique pour la régulation glycémique chez les diabétiques.

II.2. Index glycémique (IG)

Le sucre inverti présente un index glycémique (IG) potentiellement inférieur à celui du saccharose. Cela est dû à la présence du fructose, qui possède un IG bas (~19), comparé au glucose (~100) et au saccharose (~65). Toutefois, l'IG global du sucre inverti dépend du ratio glucose/fructose et du contexte alimentaire de consommation (**Stamm, 1937**). Cette caractéristique pourrait représenter un avantage pour les patients diabétiques, notamment dans le contrôle postprandial de la glycémie, surtout lorsque le sucre inverti est utilisé à des doses modérées.

II.3. Amélioration des produits sensoriels

Le sucre inverti, largement utilisé dans l'industrie alimentaire, offre des avantages sensoriels et technologiques uniques. Contrairement au saccharose pur, il ne forme pas de cristaux, ce qui améliore significativement la texture des produits dans lesquels il est incorporé. De plus, sa forte teneur en humidité, similaire aux glycérols, aide à améliorer la rétention d'humidité dans les matrices alimentaires. Ces propriétés combinées entraînent un changement radical dans la texture et la stabilité des produits, prolongeant ainsi leur douceur et leur durée de conservation, et garantissant une excellente stabilité du produit final (**Jordan, 1924; Nadeem et al., 2015; Stamm, 1937**).

Le sucre inversé, dérivé de l'hydrolyse enzymatique par l'invertase, donne un goût plus doux, lisse et légèrement miellé. Cela se compare aux sirops d'hydrolyse acide, qui peuvent parfois laisser une sensation granuleuse dans la bouche (Sale et Skinner, 1922). De plus, ce processus enzymatique a l'avantage de ne pas produire de sous-produits indésirables, ce qui le rend parfaitement adapté à la consommation (Nadeem et al., 2015).

II.4. Effet sur le métabolisme énergétique

Sur le plan métabolique, le fructose présente des caractéristiques métaboliques distinctes (White, 2008). Majoritairement métabolisé au niveau hépatique, il contribue au métabolisme des glucides en se transformant en métabolites intégrables dans la glycolyse. Au sein du foie, il est converti en glycéraldéhyde-3-phosphate, qui peut soit entrer directement dans la glycolyse, soit produire du glucose ou du glycogène via le fructose-1,6-diphosphate (figure13) (Wagner, 2012).

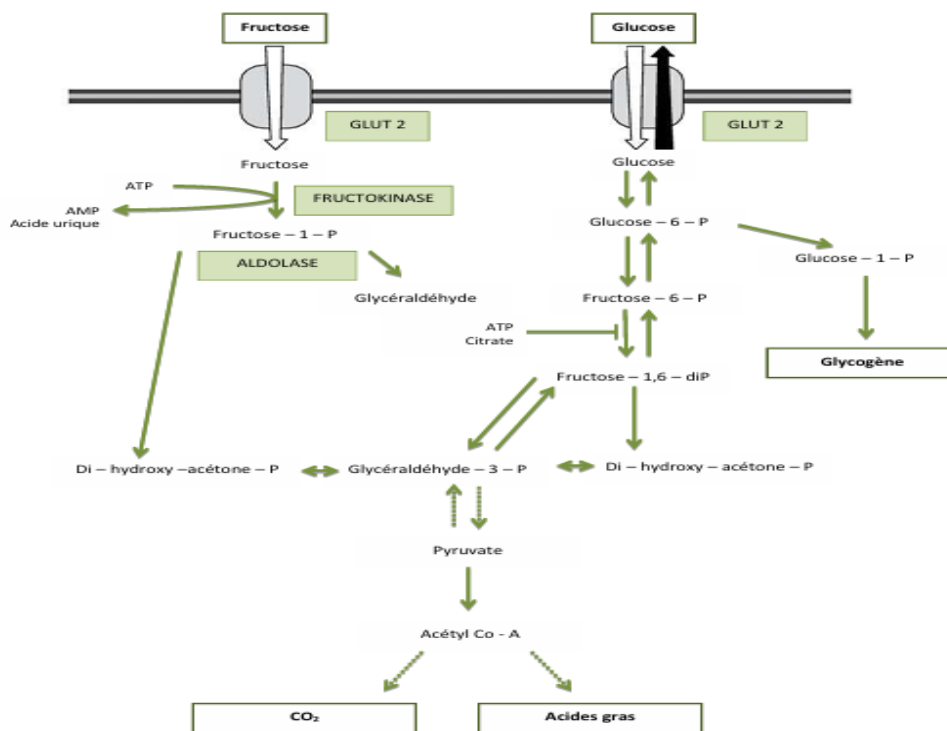


Figure13: Métabolisme du fructose(Wagner, 2012).

Par ailleurs, en raison de son absorption intestinale plus lente que celle du glucose, le fructose induit une sécrétion insulínique réduite et une augmentation glycémique minime, ce qui se traduit par un indice glycémique bas (Clemens et al., 2016; Qi et Tester, 2019).

Le glucose, source d'énergie universelle, principalement métabolisé en adénosine triphosphate (ATP) via le métabolisme aérobie et anaérobie, fournit l'énergie nécessaire à toutes les fonctions physiologiques (**Hantzidiamantis et al., 2024**). Le glucose est absorbé rapidement et stimule la sécrétion d'insuline, alors que le fructose est métabolisé lentement par le foie, sans provoquer de réponse insulinaire immédiate (**Jordan, 1924**). Ainsi, le sucre inverti permet une libération énergétique plus progressive et un effet modéré sur la glycémie, ce qui est particulièrement intéressant pour les diabétiques. Cependant, une consommation excessive de fructose est déconseillée, car elle peut être associée à des effets indésirables comme la stéatose hépatique non alcoolique (**Stamm, 1937**). Il convient donc d'intégrer le sucre inverti dans un régime contrôlé et équilibré.

Le fructose et le glucose, ces sucres naturels qui sont omniprésents dans les fruits et légumes (**Qi et Tester, 2019**), ont un métabolisme si particulier qu'ils font du sucre inverti un édulcorant idéal pour les diabétiques.

III. Comparaison entre le sucre inverti et les édulcorants

Dans le cadre du développement de produits alimentaires adaptés aux besoins des personnes diabétiques, le choix de l'agent sucrant est un enjeu crucial. Parmi les alternatives au saccharose, on distingue les sucres modifiés tels que le sucre inverti, ainsi que les édulcorants naturels comme la Stévia et les édulcorants synthétiques tels que l'aspartame. Chacun possède des caractéristiques spécifiques qui influencent leur intérêt nutritionnel et technologique.

III.1. *Stevia rebaudiana* (E960)

La stévia est un édulcorant d'origine naturelle extrait des feuilles de *Stevia rebaudiana*. Elle est composée principalement de glycosides de stéviol, des molécules responsables de son pouvoir sucrant intense (**Samuel et al., 2018**), estimé entre 200 à 300 fois supérieur à celui du saccharose (**Soejima et al., 2017**). Elle est non calorique et possède un index glycémique nul, ce qui la rend particulièrement adaptée aux régimes diabétiques. Cet édulcorant est particulièrement utilisé en boulangerie en raison de sa grande stabilité thermique, qui permet son incorporation dans les produits cuits (**Singh et al., 2020**). Toutefois, certains consommateurs rapportent un arrière-goût légèrement régressif, surtout à fortes concentrations (**Lemus-Mondaca et al., 2012**).

La stévia présente des effets contrastés sur le microbiote intestinal, elle exerce une action bactéricide contre *Escherichia coli entérohémorragique* (EHEC), agent responsable de diarrhées hémorragiques aiguës. À l'inverse, ses glycosides (stévioside et rébaudioside A) inhibent la croissance de *Lactobacillus reuteri*, une bactérie bénéfique naturellement présente dans l'intestin et couramment utilisée comme probiotique dans les aliments (Deniņa et al., 2014; Tomita et al., 1997).

Contrairement au sucre inverti qui contient du fructose et du glucose et présente un IG modéré (~50–60), la stévia ne provoque aucun pic glycémique. En revanche, le sucre inverti offre un goût plus proche du sucre classique et une texture plus agréable dans les produits humides (sirops, confiseries...), alors que la stévia peut présenter des limites sensorielles. En termes de calories, la stévia a l'avantage d'être totalement dépourvue d'énergie métabolisable. Néanmoins, son coût relativement élevé représente un frein potentiel à son emploi généralisé dans les formulations industrielles.

III.2. L'aspartame (E951)

L'aspartame est un édulcorant de synthèse, constitué de trois composés chimiques : la phénylalanine, l'acide aspartique et le méthanol (Ashok et al., 2015). Son pouvoir sucrant est environ 180 à 220 fois supérieur à celui du saccharose (Magnuson et al., 2007). Il apporte 4 kcal/g, mais il est inclus dans le groupe des édulcorants non caloriques, en raison de son fort pouvoir sucrant et son index glycémique nul (Jorge, 2003). Son goût est proche de celui du sucre, sans arrière-goût prononcé. Toutefois, sa stabilité thermique est faible, ce qui limite son usage dans les produits soumis à des températures élevées.

L'aspartame reste un sujet controversé. Bien que largement utilisé dans les produits agroalimentaires, cet édulcorant est suspecté d'avoir des effets néfastes sur la santé même à la dose journalière autorisée (40 mg/kg), ce qui rend son utilisation controversée (Ardalan et al., 2017; Choudhary et Pretorius, 2017; Moriconi et al., 2020). Il est contre-indiqué chez les personnes atteintes de phénylcétonurie, une maladie génétique rare qui se traduit par une accumulation toxique de phénylalanine due à l'incapacité de la métaboliser (Chattopadhyay et al., 2014). Une étude à long terme menée sur des rats a révélé un potentiel cancérigène, même à des doses inférieures aux limites réglementaires actuelles (20 mg/kg de poids corporel) - soit la moitié de la dose journalière autorisée recommandée en Europe et aux États-Unis (Belpoggi et al., 2006).

Si l'aspartame ne contient ni calories ni glucides assimilables, contrairement au sucre inverti, ce dernier reste plus polyvalent technologiquement grâce à sa meilleure stabilité thermique et son effet structurant dans certaines matrices alimentaires. En revanche, l'aspartame est à privilégier dans les boissons froides et les édulcorants de table, notamment pour sa neutralité gustative. Cependant, sur le plan de la tolérance physiologique, le sucre inverti pourrait représenter une option plus douce et moins controversée, notamment pour les populations sensibles.

Le remplacement des édulcorants caloriques par des édulcorants non caloriques réduit bien la densité énergétique des aliments, mais cela n'entraîne pas systématiquement des bénéfices métaboliques ou une amélioration de la santé. L'effet de « trompeur » sur le cerveau, induit par l'absence de calories associée au goût sucré peut perturber les signaux de récompense alimentaire, augmentant les envies de sucre et le risque de dépendance. En effet, la désynchronisation répétitive entre le goût et l'énergie affaiblit les réponses physiologiques conditionnées (comme la sécrétion d'insuline ou la satiété). Cela perturbe la régulation fine de l'homéostasie énergétique, réduisant l'efficacité de l'utilisation des nutriments.

Tableau 3 : Comparaison entre le sucre inverti, la *Stevia* et l'aspartame.

Critères	Sucre inverti	<i>Stevia</i>	Aspartame
Origine	Hydrolyse du saccharose	Naturel (feuille de <i>Stevia</i>)	Synthétique (acides aminés)
Pouvoir sucrant	117	200-300	180-220
Index glycémique	50-60	0	0
Apport calorique	4Kcal/g	0Kcal/g	0Kcal/g
Stabilité thermique	Bonne stabilité	Très bonne	Faible

Le sucre inverti présente un potentiel intéressant dans la formulation de produits destinés aux personnes diabétiques. Son pouvoir sucrant élevé, supérieur à celui du saccharose, permet de réduire la quantité totale de sucre ajoutée tout en conservant une perception sucrée satisfaisante. Des stratégies innovantes ont été proposées pour optimiser l'utilisation du sucre inverti dans des aliments fonctionnels adaptés aux diabétiques. Par exemple, son incorporation dans des matrices riches en fibres solubles, telles que l'inuline ou les bêta-glucanes, permet de ralentir l'absorption intestinale des sucres simples, réduisant ainsi l'indice glycémique global des produits (**Giuntini et al., 2022**). Ce type de formulation est particulièrement utile dans les confitures allégées ou les yaourts sucrés destinés à une population diabétique. De plus, grâce à ses propriétés hygroscopiques, le

sucre inverti est utilisé pour la conception de barres énergétiques spécialement formulées pour les diabétiques. Il améliore la texture en maintenant l'humidité sans avoir recours aux sirops à indice glycémique élevé, comme le sirop de glucose. Par ailleurs, il a été intégré avec succès dans des produits laitiers fermentés probiotiques, où il agit à la fois comme substrat pour les micro-organismes bénéfiques et comme édulcorant naturel, réduisant le besoin en édulcorants artificiels (**Eroglu et Ozcan, 2024**).

Ces applications ouvrent la voie à une alimentation fonctionnelle et personnalisée, où le sucre inverti n'est plus un simple édulcorant, mais un ingrédient technologique adapté aux besoins spécifiques de certains groupes de population, comme les diabétiques. L'invertase, par sa capacité à produire du sucre inverti, représente une piste prometteuse dans la formulation d'aliments adaptés aux personnes diabétiques. Grâce à ses propriétés organoleptiques, technologiques et nutritionnelles, le sucre inverti se distingue comme une alternative intéressante, à condition d'être utilisé de manière modérée et maîtrisée.

Par rapport aux édulcorants naturels ou synthétiques, le sucre inverti offre une meilleure compatibilité sensorielle avec les produits alimentaires, tout en aidant à préserver un équilibre métabolique satisfaisant. Une valorisation réfléchie de cette enzyme pourrait ainsi contribuer à améliorer le quotidien des patients diabétiques, en alliant sécurité nutritionnelle, plaisir gustatif et respect de leur dignité alimentaire.

Partie pratique

I. Principaux réactifs utilisés

- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3)
- Acétate de sodium (CH_3COONa)
- Acide acétique
- Levure boulangère commerciale (Saf-instant) : *Saccharomyces cerevisiae*
- Gélatine
- Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Tartrate double de sodium et de potassium
- Hydroxyde de sodium
- Iodure de potassium (KI)
- Alginate de sodium
- CaCl_2
- Acide 3,5-dinitrosalicylique
- Soude (NaOH)
- Saccharose
- Glucose
- Fructose

II.Extraction de l'invertase de *saccharomyces cerevisiae*

II.1. Protocole d'extraction

L'extraction de l'invertase constitue une étape cruciale pour l'isolement de l'enzyme dans un état fonctionnel, indispensable à son étude. La méthode retenue dans cette étude repose sur une lyse contrôlée des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, utilisant un tampon permettant de préserver l'intégrité et l'activité enzymatique. Cette approche, fondée sur la plasmolyse suivie d'une clarification par centrifugation et filtration, vise à séparer efficacement l'enzyme des débris cellulaires tout en assurant la stabilité du produit extrait. Ainsi, cette procédure garantit un extrait enzymatique brut, limpide, conservant ses propriétés biologiques pour les analyses.

Deux solutions ont été préparées séparément :

- 0,42 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) dissous dans 50 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,1 M.
- 0,0410 g d'acétate de sodium (CH_3COONa) dissous dans 50 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,01 M.
- Les deux solutions ont été mélangées pour former 100 ml d'un tampon bicarbonate/acétate.
- Ce tampon a été versé dans un bécher de 250 ml, suivi de l'ajout de 50 g de levure sèche (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Le mélange a été agité jusqu'à dissolution complète de la levure. Le bécher a ensuite été couvert avec une feuille d'aluminium préalablement perforée à l'aide d'aiguilles fines, permettant une aération tout en limitant la contamination microbienne.
- La suspension a été incubée à température ambiante pendant 45 heures, pour permettre la plasmolyse et la libération des constituants intracellulaires, notamment l'enzyme.



Figure 14 : La suspension après 45 heures d'incubation.

- À la fin de l'incubation, 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés, et le tout a été homogénéisé soigneusement.



Figure 15: Homogénéisation du mélange après addition d'eau distillée.

- Le mélange a été ensuite soumis à une première centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu a été récupéré, puis acidifié avec de l'acide acétique jusqu'à atteindre un pH d'environ 4, condition favorable à la conservation de l'activité enzymatique.



Figure 16: Préparation des échantillons avant centrifugation et réglage de la centrifugeuse à 4000 tr/min pendant 15 minutes.

- Une seconde centrifugation a été effectuée dans les mêmes conditions. Le surnageant final a ensuite été filtré à l'aide de papier filtre pour éliminer les résidus insolubles et obtenir une solution claire. L'extrait enzymatique obtenu, contenant principalement l'invertase, est de couleur jaune pâle, relativement limpide a été conservé à 4°C afin de préserver son activité biologique et d'éviter la dénaturation ou la formation de précipités.

[A] [B]



Figure 17 : (A) Filtration de l'extrait enzymatique à l'aide de papier filtre ; (B) Extrait enzymatique obtenu après la deuxième centrifugation

II.2. Dosage des protéines de la préparation enzymatique

II.2.1. Principe de la méthode de Biuret

La méthode de Biuret se distingue par des caractéristiques spécifiques, à savoir sa simplicité, sa rapidité et sa fiabilité, qui en font une technique largement utilisée dans le dosage des protéines. Les composés possédant au moins deux liaisons peptidiques réagissent avec le réactif du biuret dans un milieu alcalin pour former un complexe pourpre. Cette coloration provient de la formation d'un complexe de coordination entre l'atome de cuivre (Cu^{2+}) et deux atomes d'azote issus des chaînes peptidiques, comme illustré dans la figure 18. L'intensité colorimétrique maximale est atteinte après 15 minutes d'incubation (Janairo et al. 2011) et l'absorbance du complexe est proportionnelle à la concentration en protéines.

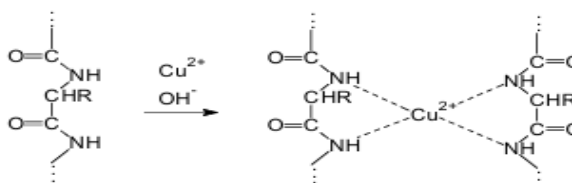


Figure 18: Réaction de Biuret (Janairo et al., 2011).

II.2.1.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

Une solution mère de gélatine à 10 g/L a été préparée en dissolvant 1 g de gélatine en poudre dans 100 ml d'eau distillée.

- Une série de dix solutions de protéines, 2 ml pour chacun, a été préparée par dilution de la solution mère (10 g/L) dans des tubes à essai, selon les concentrations suivantes: 1; 2; 3; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 et 10 g/L (tableau 4). On y ajoute 3 ml de réactif de biuret et on agite à l'aide d'un vortex.

Tableau 4 : Dilution de la solution mère de la gélatine

Concentration en protéine (g/l)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de la solution mère (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
Volume de l'eau distillée (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0

- Pour le contrôle, 3 ml de réactif biuret (La composition du réactif de biuret est indiquée dans la partie « annexes ») a été ajouté à 2 ml d'eau distillée.
- Laisser incuber les tubes à l'obscurité pendant 30 minutes, à température ambiante.
- Les absorbances ont été mesurées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, puis une courbe d'étalonnage a été tracée afin de déterminer la concentration protéique de la solution enzymatique de l'invertase (figure 19).

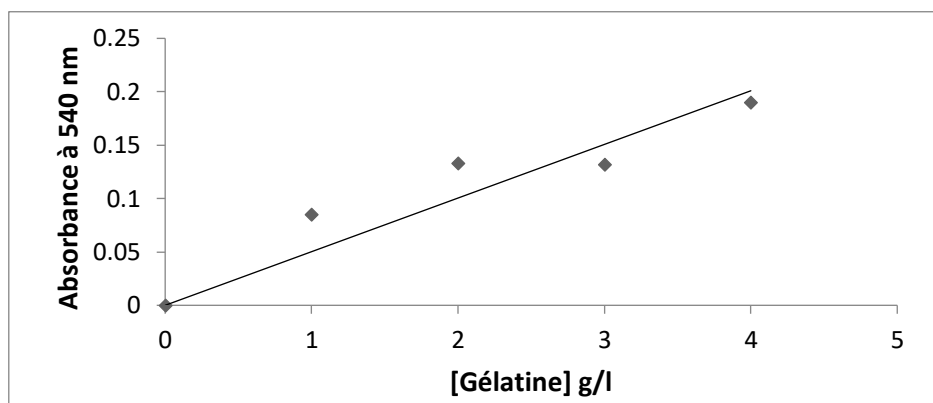


Figure 19: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret (Absorbance = 0,0502 X [protéines]; $r^2 = 0,9651$).

Pour garantir la précision du dosage, une courbe d'étalonnage adaptée doit présenter une réponse linéaire aux solutions étalons, couvrant la gamme de concentration de l'inconnu (invertase). Une courbe linéaire permet d'interpoler avec fiabilité la concentration de l'échantillon analysé (Janairo *et al.*, 2011).

II.2.1.2. Détermination de la concentration protéique

- Différentes dilutions de la préparation enzymatique ont été réalisées.
- Pour chaque dilution, 2 ml de la solution ont été prélevés auxquels 3 ml de réactif du biuret ont été ajoutés. Les mélanges ont ensuite été homogénéisés avant d'être incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.
- L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 540 nm contre un blanc réactif, et la concentration en protéines a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage. Elle est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Protéine}] (\text{g.l}^{-1}) = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance l.g}^{-1})}$$

- La concentration de l'invertase est calculée en prenant la moyenne des quatre concentrations déterminées expérimentalement.

II.2.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet

II.2.2. 1. Principe

Un spectrophotomètre permet de mesurer la quantité de protéines dans une solution en se basant sur l'absorption du rayonnement UV par les acides aminés aromatiques (tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp) et phénylalanine (Phe)). Cette méthode est rapide, non destructive et permet la récupération de l'échantillon (**Aitken et Learmonth, 2002**). La quantification des protéines par spectrophotométrie UV repose sur des mesures d'absorbance à 280 nm, correspondant au pic d'absorption caractéristique des acides aminés aromatiques. La mesure complémentaire à 260 nm constitue un contrôle essentiel, permettant de détecter la présence potentielle des contaminants tels que les acides nucléiques. Ces derniers présentant une absorption marquée à cette longueur d'onde (**Hyvönen, 2017**). Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation suivante (**kamoun, 1997**).

$$[\text{Protéines}](\text{g.l}^{-1}) = 1.55A - 0.76A'$$

Avec :

A : Absorbance à 280nm.

A' : Absorbance à 260nm.

Cependant, la fiabilité de cette méthode est étroitement liée à la présence de résidus aromatiques dans les échantillons. Elle est généralement considérée comme fiable pour la plupart des protéines, à condition qu'elles contiennent une quantité suffisante de ces résidus. En l'absence ou en cas de faible quantité de résidus aromatiques, la méthode peut fournir des résultats non fiables (**Hyvönen, 2017**).

II.2.2.2. Mode opératoire

- La mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet est effectuée à partir des dilutions suivantes de l'extrait d'invertase (3 essais pour chaque dilution).
- L'absorbance est mesurée pour chaque dilution de la solution mère enzymatique à 280 nm et à 260 nm contre un blanc réactionnelle contenant uniquement le tampon acéto-acétique.

Tableau 5 : Dilutions de la solution mère enzymatique

Dilution	0	1/20	1/10	3/20
Volume de l'extrait d'invertase (ml)	0	0.1	0.2	0.3
Volume de tampon acéto-acétique (ml)	2	1.9	1.8	1.7

III. Dosage des sucres réducteurs

III.1. Principe

L'invertase est une enzyme capable d'hydrolyser le saccharose, un disaccharide non réducteur, en deux monosaccharides réducteurs : le glucose et le fructose. Ces sucres réducteurs possèdent la capacité de réduire le réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, sous l'effet de la chaleur et en milieu alcalin (Figure 20). Ce produit de réaction est de couleur jaune-orangée, et son intensité est proportionnelle à la concentration des sucres réducteurs formés. La mesure spectrophotométrique de cette coloration à 530 nm permet ainsi de quantifier indirectement l'activité enzymatique de l'invertase (Brenfeld, 1955).

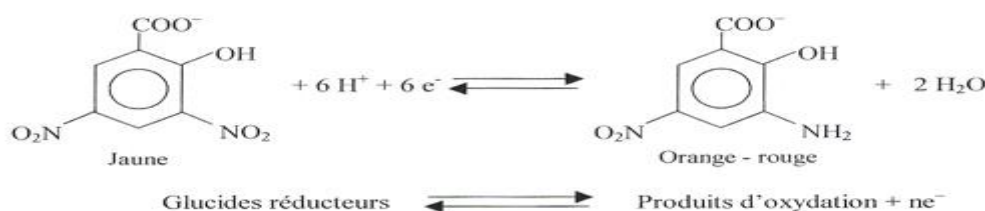


Figure 20: Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de sucre (Maktouf et al., 2013).

III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage permet de déterminer avec précision la concentration des sucres réducteurs libérés après l'action de l'invertase sur le saccharose. Elle repose sur des solutions étalons de sucre inverti (mélange équimolaire de glucose et de fructose), préparées à des concentrations connues. La courbe d'étalonnage obtenue est ensuite utilisée pour estimer les concentrations dans les échantillons testés.

- Une solution mère de sucre inverti à 5 mmol/L (2,5 mmol/L de glucose + 2,5 mmol/L de fructose) a été préparée dans un tampon acétate 0,1 M - pH 4,6.
- Dix dilutions de 0,5 à 5 mmol/L ont été réalisées. Pour chaque dilution, 0,75 ml ont été mélangés avec 0,25 ml de tampon acétate et de 1 ml de réactif DNSA dans un tube.
- Après agitation, les tubes ont été chauffés 5 minutes au bain-marie bouillant, puis rapidement refroidis dans un bain glacé.
- Ensuite, 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés pour diluer et stabiliser la coloration.

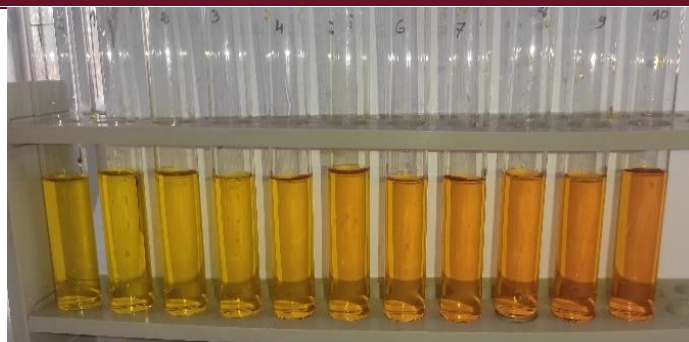


Figure 21: Gamme étalon du sucre inverti de 0,5 à 5 mmol/L, après réaction au DNSA.

- L'absorbance est mesurée à 530 nm contre un blanc contenant du tampon à la place du sucre. La courbe obtenue (figure 22) a permis d'estimer les concentrations de sucres réducteurs dans les échantillons enzymatiques.

Tableau 6: Protocole de préparation des échantillons du sucre inverti

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration (mmol/L)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Volume de la solution mère (ml)	0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Tampon acétate (ml)	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Volume réactif DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubation pendant 5 min dans de l'eau bouillante puis refroidissement											
Ajout de 10ml d'eau distillée											
Mesure de l'absorbance à 530 nm											

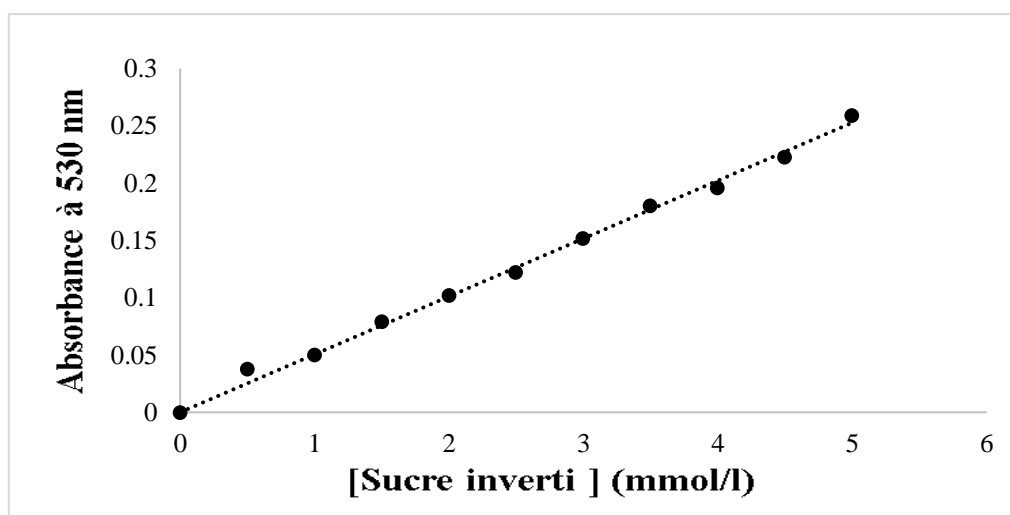


Figure 22 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur (Absorbance = 0,0505X [Sucre inverti]; $r^2 = 0,9988$).

IV. Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique

Il est généralement difficile de mesurer directement la concentration d'une enzyme, notamment lorsqu'elle n'est pas purifiée. C'est pourquoi on évalue plutôt son activité enzymatique, qui correspond à la quantité de substrat transformée par unité de temps (**Pelmont, 1993**).

Dans notre étude, l'activité de l'invertase a été estimée en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés après hydrolyse du saccharose, à l'aide du réactif DNSA, qui réagit spécifiquement avec ces sucres pour donner une coloration mesurable par spectrophotométrie. Afin d'évaluer la stabilité de l'enzyme au cours du temps, ce protocole a été réalisé avec deux extraits enzymatiques distincts :

- ✓ Un extrait utilisé immédiatement après extraction.
- ✓ Un extrait conservé, stocké à 4 °C pendant 20 jours.

Les deux extraits ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales afin de comparer leur activité enzymatique respective.

- ✓ Une dilution 1/150 de l'extrait enzymatique a été préparée dans du tampon acétate 0,1M - pH 4,6. Le substrat utilisé était une solution de saccharose à 0,1 M, préparée en dissolvant 0,68 g de saccharose dans 20 ml de tampon acétate.
- ✓ Dans des tubes à essai, 0,75 ml de cette solution de saccharose ont été mélangés à 0,25ml de la solution enzymatique diluée. La réaction s'est déroulée à 25°C, avec des temps d'incubation variant de 0 à 300 secondes par intervalles de 30 secondes.
- ✓ Pour arrêter la réaction, 1 ml de réactif DNSA a été ajouté.
- ✓ Pour le tube temps 0 (blanc), le DNSA a été ajouté avant le substrat et l'enzyme, ainsi qu'1 ml d'eau distillée.
- ✓ Après ajout du DNSA, les tubes ont été placés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes, puis refroidis rapidement dans un bain d'eau glacée. Ensuite, 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube pour diluer la réaction et stabiliser la coloration.
- ✓ L'absorbance a été mesurée à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant le blanc comme référence. Chaque mesure a été réalisée 3 fois.

Tableau 7 : Protocole de préparation des échantillons pour déterminer l'activité de l'invertase.

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de la solution de saccharose (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Volume de l'extrait enzymatique (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Temps d'incubation (Seconde)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
Réactif DNSA(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubation pendant 5 min dans de l'eau bouillante puis refroidissement											
Ajout de 10ml d'eau distillée											
Mesure de l'absorbance à 530 nm											

IV.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase

L'activité enzymatique est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale de la réaction, cette vitesse doit être exprimée par la quantité de substrat transformé par unité de temps et par unité de volume du milieu réactionnel. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$V_{in} = \frac{b \cdot 10^3}{2 \cdot b'}$$

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ; b : Pente de la droite « absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps » (unités d'absorbance. min^{-1}) ; b' : Pente de la droite d'étalonnage.

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique de l'invertase

L'activité enzymatique peut être exprimée en unités internationales. Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une μmole de substrat par minute dans des conditions définies et si possible optimales. L'activité volumique est déterminée par l'équation suivante :

$$AV = \frac{V_{in} \cdot V_r \cdot F}{10^3 \cdot V_e}$$

AV : Activité volumique (UI/ml) ; V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ; V_r : Volume du milieu réactionnel (1 ml) ; V_e : Volume d'enzyme (0,25 ml) ; F : Facteur de dilution.

IV. 3. Détermination de l'activité spécifique de l'invertase

L'activité spécifique correspond au nombre d'unités enzymatiques par milligramme de protéines totales présentes dans la solution enzymatique (**Pelmont, 1993**). Elle reflète ainsi le degré de pureté de la préparation : plus l'enzyme est purifiée, plus son activité spécifique est élevée, atteignant un maximum lorsque l'enzyme est entièrement purifiée (**Loncle, 1992**). Elle est déterminée par la formule suivante :

$$As = \frac{AV}{[\text{Protéine}]}$$

Avec :

As : Activité spécifique (UI/mg).

AV : Activité volumique (UI/ml).

[Protéine] : Concentration en protéine (mg/ml).

IV. 4. Effet de la concentration en saccharose sur l'activité enzymatique (Enzyme libre)

Pour évaluer l'effet de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique de l'invertase, différentes concentrations de saccharose ont été préparées : 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 et 0,2 M, en dissolvant les quantités appropriées dans du tampon acétate 0,1M- H 4,6.

- ✓ Pour chaque concentration, 0,75 ml de la solution de saccharose ont été mélangés à 0,25 ml de l'extrait enzymatique dilué (1/150), la réaction s'est déroulée à 25 °C, avec des temps d'incubation variant de 0 à 300 secondes par intervalles de 30 secondes.
- ✓ Afin d'arrêter la réaction, 1 ml de réactif DNSA a été ajouté. Pour le tube temps 0 (blanc), le DNSA a été ajouté avant le substrat et l'enzyme, ainsi qu'1 ml d'eau distillée.
- ✓ Les tubes ont été placés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes, puis refroidis rapidement dans un bain d'eau glacée. 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube pour diluer la réaction et stabiliser la coloration.
- ✓ L'absorbance a été mesurée à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant le blanc comme référence. Chaque mesure a été réalisée 3 fois.
- ✓ L'activité enzymatique a été déterminée pour chaque concentration de substrat, et les résultats ont permis de tracer la courbe de Michaelis-Menten.

IV. 5. Hydrolyse enzymatique du saccharose dans un produit alimentaire (Biscuit)

L'utilisation d'enzymes dans l'amélioration des produits alimentaires ouvre de nouvelles perspectives pour adapter leur composition aux besoins spécifiques, notamment chez les personnes diabétiques. Dans ce contexte, l'invertase a été testée sur un biscuit afin d'examiner son action sur les sucres présents. L'objectif est de simuler une application industrielle réaliste où l'enzyme pourrait modifier la teneur en sucres simples, favorisant ainsi une meilleure gestion glycémique. Donc, le biscuit est préparé en suspension dans un tampon acétate, puis incubé avec l'invertase sous conditions contrôlées.

- ✓ 12 g de biscuit ont été finement broyés à l'aide d'un mortier, puis suspendus dans 20 ml de tampon acétate 0,1 M -pH 4,6. La suspension a été centrifugée deux fois à 4000 tr/min pendant 10 minutes afin d'éliminer les particules solides. Le surnageant clair obtenu a été filtré et utilisé comme substrat.
- ✓ Pour le test enzymatique, 0,75 ml de cette solution sont mélangés à 0,25 ml d'invertase diluée (1/150). Les mélanges ont été incubés à 25°C pendant des temps variés : 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 et 300 secondes.
- ✓ La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 1 ml de réactif DNSA. Les tubes ont ensuite été chauffés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour permettre le développement de la coloration, puis rapidement refroidis dans un bain d'eau glacée.
- ✓ Enfin, 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés.
- ✓ L'absorbance est mesurée à 530 nm.

V. Immobilisation de l'invertase

V.1. Principe

L'immobilisation de l'invertase par inclusion en gel d'alginate est une technique couramment utilisée en biotechnologie pour stabiliser l'enzyme et prolonger son activité. Cette méthode consiste à emprisonner l'enzyme dans une matrice de gel d'alginate de sodium, formant ainsi des billes qui permettent une utilisation répétée de l'enzyme tout en limitant sa diffusion dans le milieu réactionnel (El-Sayed et al., 2015).

V.2. Mode opératoire

- 0,15 g d'alginate de sodium ont été dissous dans 5 ml de tampon acétate 0,1 M-pH 4,6 à température ambiante. La solution a été agitée délicatement à faible vitesse afin d'éviter la formation de bulles d'air.
- 5 ml d'extrait enzymatique d'invertase ont été ensuite ajoutés à la solution, le mélange a été homogénéisé, puis laissé au repos pour permettre le dégazage.
- Le gel ainsi obtenu a été introduit dans une seringue. À l'aide du piston, le mélange enzyme-alginate a été déposé goutte à goutte dans un bécher contenant 50 ml de solution de CaCl_2 0,1 M, tout en comptant le nombre de billes formées
- Le bécher est agité doucement et régulièrement afin de favoriser la gélification des billes et après un temps de contact minimal de 15 minutes, les billes sont séparées de la solution de CaCl_2 à l'aide d'un tamis, puis rincées successivement à l'eau distillée et au tampon acétate.
- Les billes obtenues sont soit utilisées immédiatement, soit conservées au réfrigérateur dans une solution tampon acétate additionnée de CaCl_2 à 0,005 M pour une utilisation ultérieure.



Figure 23 : Immobilisation de l'invertase par inclusion en gel d'alginate.

V.3. Cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée

- 21 tubes à essai contenant chacun 1 ml du réactif DNS ont été préparés à l'avance.
- Cinq minutes avant l'initiation de la réaction enzymatique, 200 ml de solution de saccharose 0,6 M ont été préparés dans un tampon acétate 0,1 M -pH 4,6, puis pré-incubés à 37 °C dans un bain-marie.
- 10 ml de billes contenant l'enzyme immobilisée ont été rapidement ajoutés dans la solution de saccharose. Le mélange a été agité, et un premier échantillon de 1 ml a été prélevé immédiatement (temps t_0) et introduit dans un tube contenant le DNS.

- Un prélèvement a été effectué toutes les minutes jusqu'à $t = 20$ min.
- Tous les tubes ont été couverts puis placés 5 minutes dans un bain-marie bouillant, avant d'être refroidis rapidement sous un courant d'eau froide.
- Ensuite, 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube.
- L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 530 nm, contre un blanc



Figure 24 :Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée.

Remarque :Cette méthode a été répétée trois fois, respectivement le premier, le quatrième et le dixième jour, afin d'évaluer la stabilité temporelle de l'activité enzymatique de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate. Après chaque utilisation, les billes d'alginate ont été rincées avec de l'eau distillée, puis avec du tampon acétate 0,1M-pH 4,6, et ont été conservées à 4 °C dans une solution tampon additionnée de CaCl_2 à 0,005 M.

V.4. Effet de la concentration du saccharose sur l'activité de l'invertase immobilisée

Afin d'étudier la cinétique de l'invertase immobilisée en fonction de la concentration du saccharose, la procédure suivante a été réalisée :

- Avant le début de la réaction enzymatique, 21 tubes à essais ont été préparés. Chaque tube contient 1 ml du réactif DNSA (acide 3,5-dinitrosalicylique). Les tubes sont numérotés de 0 à 20, correspondant aux temps en minutes auxquels les échantillons seront prélevés.

- Une série de solutions de saccharose à différentes concentrations (0,025; 0,05; 0,1; 0,15 et 0,6M) a été préparée dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4,6.
- Pour chaque concentration, 200 ml de solution de saccharose ont été placés dans un bécher maintenu à 37°C dans un bain-marie pendant 5 minutes pour stabilisation thermique.
- Après cette période, 10 ml de la solution d'invertase immobilisée ont été ajoutés au bécher. Le mélange est agité soigneusement pour homogénéisation.
- Immédiatement après l'ajout de l'enzyme, un prélèvement de 1 ml du milieu réactionnel a été effectué dans le tube DNSA numéroté « 0 », correspondant au temps zéro.
- Ensuite, un prélèvement de 1 ml a été réalisé toutes les minutes, jusqu'à 20 minutes, et chaque échantillon a été transféré dans les tubes DNSA numérotés de 1 à 20, afin d'arrêter instantanément la réaction enzymatique.
- Les tubes ont ensuite été placés 5 minutes dans un bain-marie bouillant pour développer la coloration puis refroidis rapidement sous un courant d'eau froide. Un volume de 10 ml d'eau distillée est ajouté dans chaque tube.
- L'absorbance des échantillons a été mesurée à 530 nm afin de quantifier les sucres réducteurs libérés.
- La vitesse initiale de la réaction a été calculée à partir des premiers points, permettant ainsi de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} pour chaque concentration de saccharose.

Résultats et

Discussion

I. Etude de la cinétique enzymatique de l'invertase libre

I.1. Recherche de l'activité « invertase » dans la préparation enzymatique

L'extraction enzymatique de l'invertase à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été optimisée en exploitant le phénomène de plasmolyse. Cette approche a permis une libération efficace du contenu cellulaire tout en minimisant la dégradation des enzymes. Le volume de l'extrait enzymatique obtenu après centrifugation et filtration est de 53 ml, représentant la quantité finale du liquide contenant l'enzyme d'intérêt, prête pour une analyse ou une utilisation ultérieure.

La figure 25 met en évidence l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose en présence de l'extrait enzymatique préparé. Aucun signe d'hydrolyse n'a été observé lors des essais témoins réalisés en l'absence d'enzyme, ce qui confirme que l'activité observée est bien due à l'invertase. En effet, *Saccharomyces cerevisiae*, couramment utilisée dans la boulangerie, est connue comme l'une des sources principales de cette enzyme. Des études récentes, notamment celle de **Margetić et Vujčić (2017)**, confirment la présence d'invertase sous deux formes chez cette levure : une forme soluble et une autre liée à la paroi cellulaire, toutes deux actives dans l'hydrolyse du saccharose.

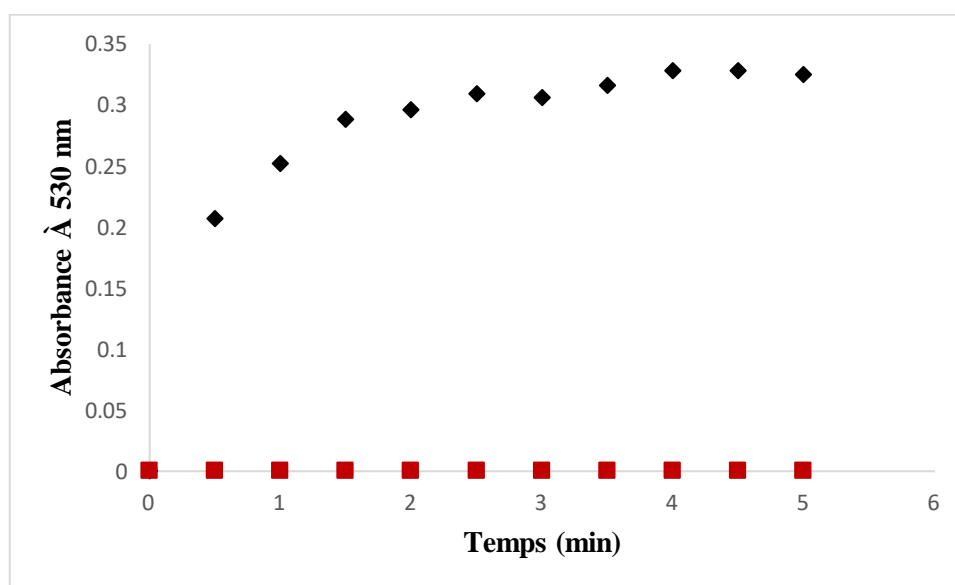


Figure 25: Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (◆) et en absence (■) d'extrait enzymatique. ([Saccharose]=0,1M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M-pH 4,6; 25°C).

I.2. Détermination des activités volumique et spécifique de l'invertase

Le tableau 8 regroupe les résultats obtenus des activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions opératoires standards ([Saccharose] = 0,1M; Tampon acéto-acétique (0,1M - pH 4,6); Température = 25°C; Dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); Durée de la réaction: 5 min).

Tableau 8: Activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions standards.

[protéines] (g/l)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$)	Activité volumique (UI/ml)	Activité spécifique (UI/mg)
20,23	883,16	280,2	26,18

Le dosage des protéines a été effectué par deux méthodes, l'absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et la méthode colorimétrique de biuret. La concentration en protéines de l'extrait enzymatique obtenue par la méthode du biuret a donné des résultats du même ordre de grandeur mais supérieure à ceux obtenus par absorption dans l'ultraviolet à 280 nm comme le montre le tableau 9. En effet, l'absorption directe dans l'ultraviolet ne constitue pas un dosage précis du fait de la variabilité de la teneur en acides aminés aromatiques des protéines et de l'interférence éventuelle avec d'autres molécules.

De plus, lors de nos manipulations, des cuves en plastique - non adaptées aux mesures UV- ont été utilisées plutôt que des cuves en quartz, ce qui peut influencer la précision des mesures spectrophotométriques (Huffman et al., 2014). La méthode du biuret a donc été adoptée dans cette étude pour le dosage des protéines en raison de sa fiabilité, de sa rapidité et essentiellement de la non influence de la nature des protéines (Lemerini, 2006).

Tableau 9 : Comparaison de la concentration en protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et par méthode du biuret de l'extraite enzymatique.

	Méthode du biuret	Absorptiométrie directe dans l'ultraviolet
	[Protéine](g/l)	
Extrait enzymatique de l'invertase	20,23	6,65

I.3. Etude de la stabilité de la préparation d'invertase

Afin d'évaluer la stabilité de l'activité enzymatique de l'extrait d'invertase, une mesure de l'activité volumique a été réalisée au premier jour de l'extraction, puis après 20 jours de stockage à 4°C. Durant cette période, quelques gouttes d'acide acétique ont été ajoutées à titre de conservateur.

L'activité enzymatique a été mesurée dans des conditions réactionnelles strictement contrôlées : Saccharose à une concentration de 0,1 mol/L, le tampon acéto-acétique à pH 4,6, la température de 25 °C, et une dilution préalable de l'extrait enzymatique au 1/150. Les résultats obtenus après 20 jours de conservation montrent une augmentation significative de l'activité relative d'environ 50% par rapport à la valeur de référence du premier jour 1 (figure 26). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette évolution. Premièrement, selon **Cryer et Bartley (1974)**, l'augmentation d'activité observée pourrait être liée à la disparition progressive d'inhibiteurs endogènes naturellement présents dans les extraits bruts, ou à un phénomène de stabilisation structurale survenant après l'extraction. Deuxièmement, comme le suggèrent **Henzler-Wildman et Kern (2007)**, les enzymes sont des macromolécules flexibles capables de réajustement conformationnel au fil du temps, ce qui pourrait favoriser un meilleur accès du substrat au site actif, améliorant ainsi l'efficacité catalytique. Troisièmement, l'effet stabilisant potentiel de l'acide acétique — bien qu'ajouté en très faible quantité — ne peut être exclu. En maintenant un environnement acide, celui-ci pourrait avoir limité les phénomènes de dénaturation protéique, contribuant ainsi à la préservation de la conformation active de l'invertase (**Bayramoglu et al., 2001**). En outre, une autre explication d'ordre expérimental doit également être considérée. En effet, les extraits enzymatiques des jours 1 et 20 ayant été préparés séparément, une variabilité entre les deux échantillons est possible, notamment en ce qui concerne le degré de purification ou la présence de résidus microbiens. Il est possible que certaines cellules de *Saccharomyces cerevisiae* soient restées viables dans l'extrait conservé, poursuivant une production d'invertase pendant la période de stockage. Ce phénomène pourrait donc contribuer à l'augmentation observée de l'activité enzymatique, qui résulterait à la fois d'une meilleure stabilité de l'enzyme initiale et d'une biosynthèse enzymatique additionnelle post-extraction.

En effet, l'isolement de l'invertase dans ce travail offre l'avantage que les protéines extracellulaires, en général, ont tendance à être beaucoup plus stables que les protéines intracellulaires. Cette observation a été attribuée à la glycosylation, qui

représente près de 50 % de la composition de l'invertase et qui joue un rôle essentiel en protégeant la protéine contre la dégradation et l'inactivation. Cette protection pourrait expliquer la conservation de l'activité enzymatique même après une longue période (**Ward, 2012**).

La centrifugation, bien qu'efficace pour éliminer certaines impuretés, n'est pas totalement parfaite, et certains composants peuvent persister dans l'extrait enzymatique. Ces composants résiduels jouent un rôle important dans la stabilisation enzymatique en fournissant des cofacteurs essentiels tels que Mn^{2+} et Mg^{2+} , comme le montre l'étude de **Klibanon (1983)**.

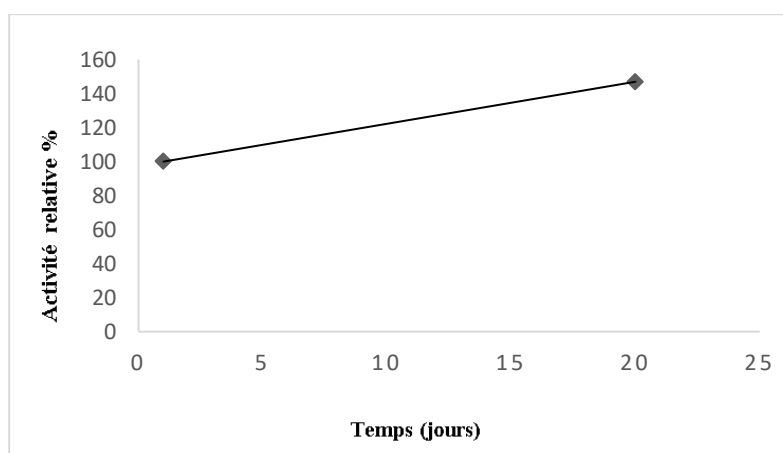


Figure26 : Évolution de l'activité enzymatique de l'extrait d'invertase entre le premier et le 20^{ème} jour de stockage à 4°C.

En comparaison, **Alnajjar (2001)** a suivi la stabilité de l'enzyme libre sur une période de quatre semaines, avec et sans ajout d'acide acétique. Dans son étude, l'activité enzymatique a montré des variations importantes durant les premières semaines, traduisant une instabilité apparente. Toutefois, malgré ces fluctuations, une tendance globale à l'augmentation de l'activité enzymatique, similaire à celle observée dans notre travail. La principale différence réside dans la fréquence de suivi : alors que notre étude se limite à deux points, celle d'**Alnajjar (2001)** comprend une série de mesures hebdomadaires.

I.4. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse

Afin d'étudier l'influence de la concentration en substrat sur le comportement cinétique de l'enzyme, nous avons incubé une préparation d'invertase diluée 150 fois avec différentes concentrations de saccharose : 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 et 0,2 mol·l⁻¹.

Les vitesses initiales d'hydrolyse ont été déterminées pour chaque concentration, puis représentées graphiquement selon le modèle de Michaelis-Menten (figure 27). Les constantes cinétiques K_m (constante de Michaelis-Menten) et V_{max} (vitesse maximale) ont été calculées à partir de la courbe obtenue.

Le paramètre K_m permet d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour son substrat, tandis que V_{max} indique la capacité catalytique maximale de l'enzyme lorsque tous les sites actifs sont saturés.

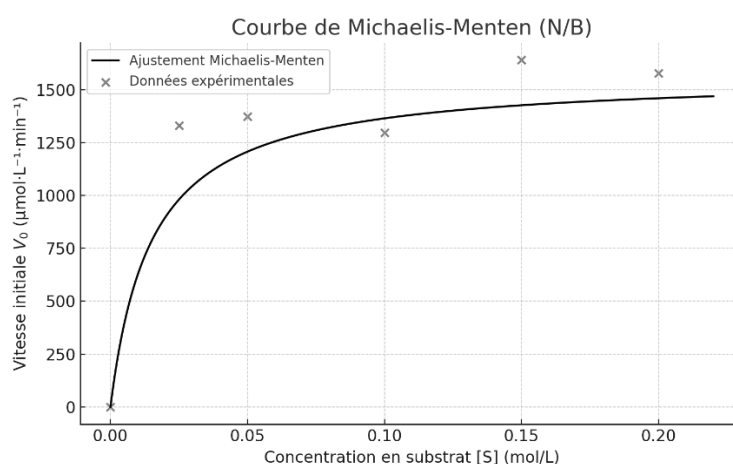


Figure 27 : Représentation de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en saccharose selon le modèle de Michaelis-Menten.

La courbe obtenue présente une allure hyperbolique caractéristique des enzymes suivant à une cinétique de type Michaelis-Menten. Elle met en évidence une augmentation progressive de la vitesse initiale (V_{in}) en fonction de la concentration en substrat ($[S]$), suivie d'un plateau, traduisant la saturation des sites actifs de l'enzyme.

L'équation de Michaelis-Menten utilisée est la suivante :

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Avec :

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

V_{max} : Vitesse maximale d'hydrolyse ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

$[S]$: Concentration en substrat (Saccharose) ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ;

K_m : Constante de Michaelis ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), elle correspond à la valeur de $[S]$ pour laquelle $V_{in} = V_{max}/2$.

L'ajustement de la courbe a permis d'estimer les valeurs suivantes : $V_{max}=1569,20 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $K_m=0,00557 \text{ mol.l}^{-1}$.

Pour affiner ces valeurs, nous avons également tracé la représentation linéaire selon Lineweaver-Burk, qui consiste à reporter les inverses de la vitesse initiale et de la concentration en substrat :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Cette représentation (figure28) permet une estimation plus précise, bien qu'elle soit plus sensible aux erreurs expérimentales, notamment à faibles concentrations.

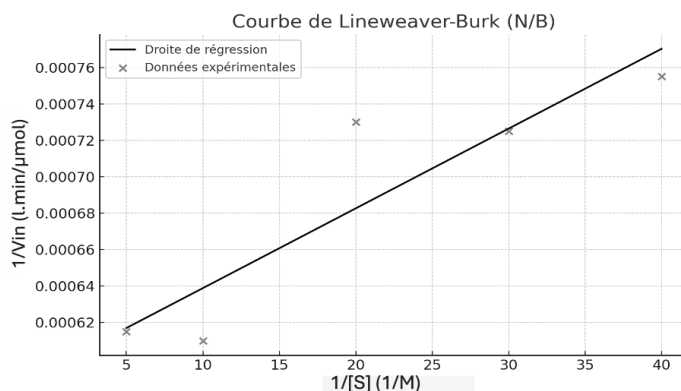


Figure 28 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en saccharose.

Les résultats obtenus sont :

$V_{max} = 1539,44 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $K_m = 0,00462 \text{ mol.l}^{-1}$.

Tableau 10: Paramètres cinétiques de l'invertase obtenus selon les modèles de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk

Equations cinétiques	$V_{max} (\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1})$	$K_m (\text{mol.l}^{-1})$
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$	1569,20	0,00557
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$	1539,44	0,00462

Ces valeurs indiquent que l'enzyme présente une affinité élevée pour le saccharose, ainsi qu'une capacité catalytique importante. L'analyse combinée des deux

méthodes confirme le comportement typique d'une enzyme suivant la cinétique de Michaelis-Menten.

Par ailleurs, on remarque que la vitesse initiale augmente jusqu'à environ 0,15 M de saccharose, au-delà de laquelle on observe une légère diminution de l'activité enzymatique. Ce phénomène pourrait être attribué à une inhibition par excès de substrat, un comportement rapporté chez certaines enzymes lorsque la concentration en substrat devient très élevée, entraînant une saturation extrême ou une interaction avec des sites allostériques inhibiteurs.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature met en évidence une certaine variabilité des paramètres cinétiques, pour l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* sous conditions expérimentales similaires. Par exemple, **Cherrak (2003)** a déterminé une V_{max} de $1640 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un K_m de $0,081 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, alors que **Alnajjar (2001)** a obtenu une V_{max} nettement inférieure, de l'ordre de $454 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, accompagnée d'un K_m plus faible, de $0,011 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. **Benziane (2003)** a mesuré une V_{max} intermédiaire, proche de $1035 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, et un K_m de $0,0314 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Plus récemment, **Benmjahed (2017)** a rapporté une V_{max} avoisinante à $3300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un K_m compris entre $0,033$ et $0,038 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ selon les modèles de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk. Dans notre étude, nous avons obtenu une V_{max} de $1539,44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, soit une valeur intermédiaire dans l'ensemble des données rapportées. En revanche, le K_m mesuré, de $0,00462 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, est significativement plus faible que ceux décrits précédemment, ce qui suggère une affinité accrue de l'enzyme pour le saccharose. Ces écarts peuvent être attribués à des différences dans la pureté enzymatique, les méthodes d'extraction, la concentration des extraits enzymatiques, ou encore les conditions expérimentales utilisées. Cette variabilité souligne l'importance des conditions opératoires dans l'interprétation des paramètres cinétiques et justifie une rigueur méthodologique accrue lors de leur détermination.

I.5. Application de l'hydrolyse de l'invertase sur un produit commercial (biscuit)

Dans le cadre de cette étude, une tentative d'application de l'invertase a été menée sur un produit industriel - un biscuit commercial - afin d'évaluer le potentiel de l'enzyme dans une matrice alimentaire complexe. L'expérience a consisté à broyer 12 g de biscuit, puis les solubiliser dans 20 ml du tampon acétate et à ajouter une solution

enzymatique d'invertase diluée au 1/150 (V/V). Le mélange a été incubé à 25°C, et la cinétique de l'hydrolyse a été suivie par spectrophotométrie.

La courbe d'absorbance en fonction du temps (Figure 29) révèle une activité enzymatique globalement négligeable comparée à celle obtenue avec une solution de saccharose. En dehors des deux pics d'absorbance vers 3 et 5 minutes, la réponse enzymatique reste pratiquement nulle.

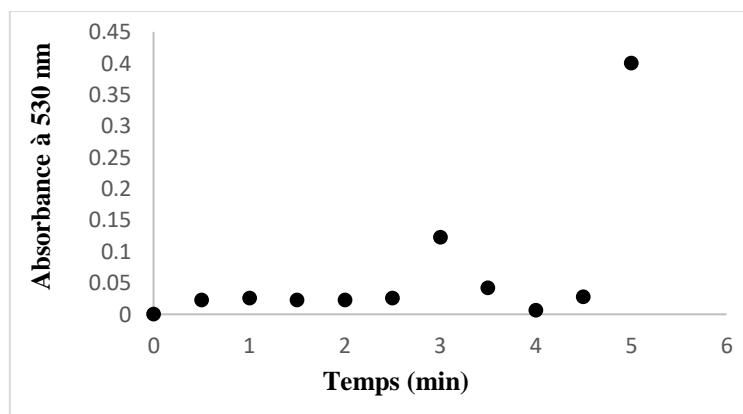


Figure 29: Activité de l'invertase sur un extrait de biscuit en fonction du temps d'incubation.

Cette faible activité pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la nature du sucre présent dans le biscuit n'est pas clairement indiquée sur l'étiquetage. Conformément au règlement (UE) n°1169/2011, les fabricants ne sont pas tenus de spécifier le type exact des sucres ajoutés (saccharose, sirop de glucose-fructose, etc.), ce qui rend l'identification du substrat cible difficile (*European Commission, 2011*). De plus, il est probable que la formulation du biscuit contienne des composés susceptibles d'inhiber l'activité enzymatique, comme certaines matières grasses, émulsifiants, ou conservateurs, connus pour interagir avec les enzymes (*Gupta et al., 2020*). L'expérience souligne donc la limite de l'application directe d'enzymes sur des matrices industrielles sans caractérisation préalable. Comme le recommande *Wrolstad (2005)*, les produits alimentaires transformés nécessitent une analyse plus fine, via des techniques telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC), afin d'identifier précisément les sucres accessibles à l'hydrolyse. Enfin, cette situation met en évidence une problématique nutritionnelle : l'absence de transparence dans la composition exacte des sucres nuit non seulement à l'interprétation scientifique des résultats, mais aussi à la compréhension nutritionnelle du produit par les consommateurs, notamment ceux atteints de diabète ou suivant des régimes spécifiques.

II. Etude de la cinétique enzymatique de l'invertase immobilisée

L'invertase a été immobilisée avec succès par encapsulation dans une matrice d'alginate de sodium, suivie d'une réticulation dans une solution de chlorure de calcium (0,1 M). Cette méthode a permis la formation de billes sphériques homogènes, indiquant une bonne reproductibilité du protocole.

L'activité catalytique de l'enzyme immobilisée a été évaluée en incubant les billes dans une solution de saccharose à 0,6 mol/L, préparée dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4,6, à une température constante de 25°C. L'apparition de fructose et de glucose a été quantifiée par méthode colorimétrique en mesurant l'absorbance à 530 nm toutes les minutes pendant 20 minutes.

La Figure 30 illustre l'évolution de l'absorbance au cours du temps. Une augmentation rapide de l'absorbance est observée durant les 10–11 premières minutes. Cette progression indique une activité enzymatique efficace au début de l'incubation. Par la suite, la courbe tend vers un plateau avec de faibles variations, suggérant un ralentissement de la vitesse de réaction. Cette phase stationnaire peut être attribuée à une diminution progressive de la concentration en substrat, mais surtout à des limitations diffusionnelles dues à la matrice d'alginate, qui empêche l'accès du saccharose aux sites actifs de l'enzyme.

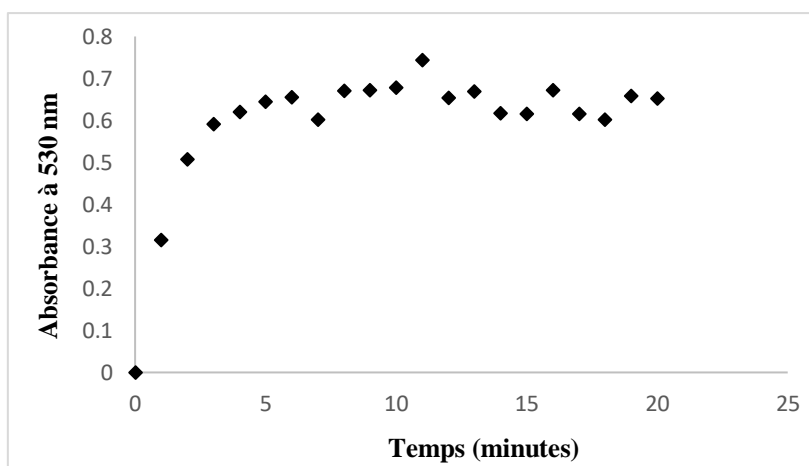


Figure 30 : Évolution de l'absorbance au cours de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée.

Cette cinétique typique d'une enzyme immobilisée peut être influencée par plusieurs facteurs:

- Une modification de la conformation de l'enzyme due à l'immobilisation
- Des limitations diffusionnelles dans la matrice d'alginate ralentissant l'accès du substrat aux sites actifs.
- De légères variations du pH à l'intérieur des billes.
- Un encombrement stérique affectant l'accessibilité du substrat.

Des études antérieures confirment ces observations. Par exemple, **Arruda et Vitolo (1999)** ont montré que l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate de calcium conserve une activité catalytique significative, bien que légèrement inférieure à celle de l'enzyme libre, en raison des limitations diffusionnelles et des modifications conformationnelles possibles induites par l'immobilisation.

De plus, **Milovanović et collaborateurs (2007)** ont observé que l'invertase immobilisée présente une stabilité thermique accrue et une activité suffisante pour des applications en continue, ce qui confirme le potentiel de cette méthode d'immobilisation pour des applications industrielles.

II.1. Étude de la stabilité de l'enzyme immobilisée

L'évaluation de la stabilité d'un système enzymatique immobilisé constitue un critère fondamental pour juger de sa performance à long terme, en particulier dans les applications industrielles. Dans notre étude, l'enzyme a été immobilisée à l'aide d'alginate de sodium, un polymère naturel largement utilisé pour ses propriétés biocompatibles et sa facilité de gélification ionique. L'évolution de l'activité relative de l'enzyme immobilisée a été suivie sur une période de dix jours (figure 31), en prenant comme référence l'activité mesurée au premier jour (100 %).

Une diminution marquée de l'activité est observée au quatrième jour, atteignant 52,1 %. Cette chute peut s'expliquer par plusieurs facteurs liés à l'effet initial de l'immobilisation dans la matrice d'alginate. En effet, le réseau tridimensionnel formé lors de la gélification peut limiter la diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme. De plus, un changement conformationnel temporaire peut perturber l'activité enzymatique, en particulier si le site catalytique est partiellement masqué ou mal orienté (**Mateo et al., 2007; Sheldon, 2007**). Ce phénomène est fréquent lors de l'utilisation de l'alginate, surtout dans les premiers jours après la gélification, car la structure du gel peut être trop

compacte, réduisant la mobilité interne de l'enzyme ainsi que l'échange efficace entre le substrat et le catalyseur. Cependant, à partir du cinquième jour, une reprise progressive de l'activité est observée, pour atteindre 92 % au dixième jour. Cette récupération suggère un phénomène d'adaptation structurelle. L'enzyme semble retrouver une configuration plus favorable à l'activité catalytique, probablement grâce à une réorganisation conformationnelle qui améliore l'accessibilité au site actif (Hanefeld et al., 2009). Par ailleurs, il est probable que la matrice d'alginate elle-même subisse des modifications physiques au fil du temps, telles qu'un relâchement du réseau polymérique ou une augmentation de la porosité due à l'hydratation, ce qui permet une meilleure diffusion du substrat (Mohamad et al., 2015).

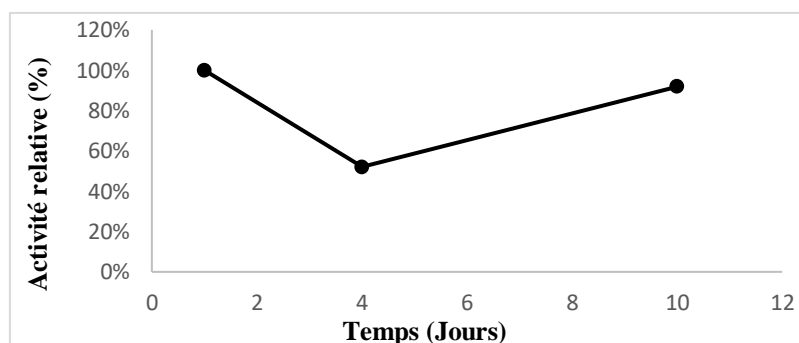


Figure 31 : Évolution de l'activité relative de l'enzyme immobilisée au cours de dix jours.

Ces observations traduisent la capacité de l'enzyme immobilisée à surmonter une phase transitoire d'instabilité et à regagner une activité significative. Ce comportement, confirmé par plusieurs études antérieures (Tang et al., 2006; Vieira et al., 2009), met en évidence une résistance intéressante du système enzymatique. En effet, cette stabilité fonctionnelle représente un avantage stratégique pour les procédés biotechnologiques, en garantissant à la fois la durabilité et la réutilisabilité du biocatalyseur.

II.2. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse

Les vitesses initiales ont été déterminées pour différentes concentrations de saccharose, dans des conditions de température de 25°C et à un pH de 4,6. Les constantes V_{max} et K_m ont été déterminées par régression non linéaire (figure 32).

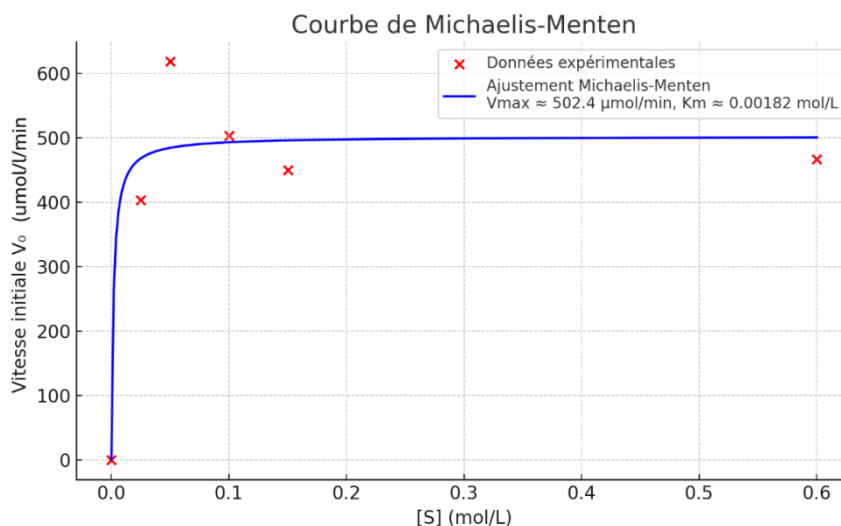


Figure 32 : Effet de la concentration en saccharose sur l'activité de l'enzyme immobilisée.

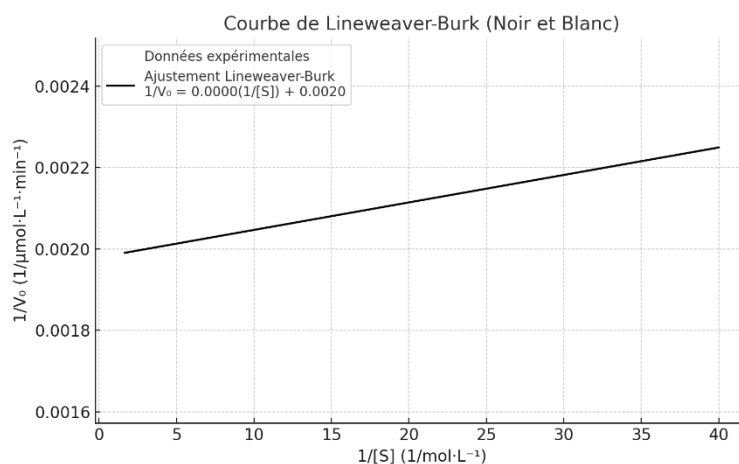


Figure 33: Représentation de Lineweaver-Burk pour l'enzyme immobilisée.

Les résultats obtenus à partir de la figure 32 et 33 sont résumés dans le tableau 11

Tableau 11: Paramètres cinétiques de l'invertase immobilisée obtenus à partir des différentes équations.

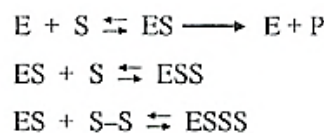
Equations cinétiques	Vmax (μmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	Km (mol.l ⁻¹)
$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$	502,4	0,00182
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$	503,64	0,0033

La courbe de Michaelis-Menten (Figure 32) montre une augmentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, jusqu'à atteindre une valeur maximale de $502,4 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Au-delà de cette concentration, la vitesse se stabilise, traduisant une cinétique de saturation. Cela signifie que l'enzyme atteint sa capacité catalytique maximale, tous ses sites actifs étant occupés; ainsi, l'ajout de substrat supplémentaire n'augmente plus la vitesse de réaction (Mbira, 2024).

Lors de la mesure des vitesses initiales d'hydrolyse, un phénomène d'inhibition peut être observé. Deux hypothèses sont proposées :

La théorie allostérique, formulée par **Monod, Wyman et Changeux(1965)**, décrit un mécanisme de régulation enzymatique où la fixation d'un ligand (substrat) sur un site allostérique (distinct du site actif) entraîne un changement conformationnel dans la structure de l'enzyme, modifiant ainsi son activité catalytique. Dans le cas présent, à forte concentration, le substrat pourrait interagir avec des sites allostériques, conduisant à une forme moins active de l'enzyme, ce qui expliquerait la diminution de la vitesse initiale malgré l'abondance du substrat (**Monod et al., 2019**).

Selon **Combes et Monsan (1983)** le phénomène d'inhibition par excès de substrat peut être attribué à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre molécules de saccharose conduisant ainsi à une agrégation du substrat. Cette agrégation génère des complexes étendus de type ESS ou ESSS, moins réactifs voire inactifs, comme le décrit le schéma suivant :



Cette hypothèse est renforcée par les travaux de **Benziane(2003)** et **Alnajjar(2001)**, qui ont observé une diminution de la vitesse d'hydrolyse à forte concentration en saccharose, associée à un comportement non classique vis-à-vis du modèle de Michaelis-Menten.

III. Comparaison entre l'activité enzymatique de l'invertase libre et immobilisée

Les résultats ont révélé une différence significative dans la stabilité de l'activité relative entre l'invertase libre et immobilisée. L'activité a été normalisée à 100 % pour les deux formes au premier jour, servant de point de référence.

Pour l'enzyme **immobilisée**, une baisse marquée de l'activité a été observée au jour « 4 » (52,1 %), suggérant une perte temporaire de performance catalytique. Cette diminution peut être attribuée à des altérations structurales de l'enzyme induites par le procédé d'immobilisation ou à une limitation de diffusion du substrat vers le site actif. Toutefois, une récupération notable de l'activité a été constatée au jour 10 (92 %), indiquant une possible réorganisation conformationnelle favorable ou une adaptation progressive de l'enzyme à son environnement support (**Mohamad et al., 2015**).

En revanche, l'enzyme **libre** a montré une évolution inattendue : son activité a augmenté au vingtième jour à environ 50% de plus que dans le premier jour. Ce phénomène peut être expliqué par une activation progressive de l'enzyme, une amélioration de sa conformation catalytique au fil du temps, ou encore par la libération de cofacteurs ou ions nécessaires à l'activation enzymatique. Des études antérieures ont rapporté ce type de comportement, notamment chez certaines enzymes dont l'activité augmentait temporairement après stockage (**Bartley, 1974**), ainsi que chez la glutamine synthase, dont l'activité s'est améliorée après conservation à basse température (**Martínez De la Barrera, 2025**).

Cette comparaison est représentée dans la figure, qui illustre clairement la chute d'activité initiale suivie d'une remontée pour l'enzyme immobilisée, ainsi que l'augmentation régulière de l'activité pour l'enzyme libre.

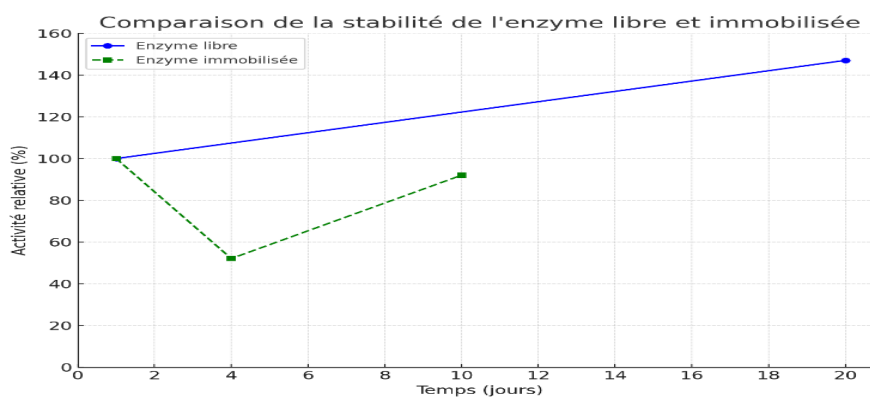


Figure 34: Évolution de l'activité relative (%) de l'invertase libre et immobilisée au cours du temps.

Ces observations suggèrent que la stabilité enzymatique ne suit pas systématiquement le modèle classique selon lequel l'immobilisation confère une meilleure durabilité. D'autres paramètres physico-chimiques liés à l'enzyme, au support et aux conditions de

conservation peuvent jouer un rôle clé, et doivent être considérés dans les perspectives d'applications industrielles ou alimentaires.

Les paramètres cinétiques de l'invertase ont également été comparés pour les formes libre et immobilisée, selon les deux modèles classiques, Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau12: Paramètres cinétiques de l'invertase libre et immobilisée selon les modèles de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk.

Invertase	Modèle cinétique	Vmax ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Km (mol.l^{-1})
libre	Michaelis-Menten	1569,20	0,00557
	Lineweaver-Burk	1539,44	0,00462
immobilisée	Michaelis-Menten	502,4	0,00182
	Lineweaver-Burk	503,64	0,0033

Ces résultats montrent que l'invertase immobilisée présente une diminution notable de Vmax, ce qui pourrait être dû à une diffusion limitée du substrat ou à des contraintes stériques induites par le support. En revanche, la réduction des valeurs de Km, notamment selon le modèle de Michaelis-Menten, indique une affinité accrue de l'enzyme immobilisée pour son substrat, ce qui peut constituer un avantage dans certaines conditions industrielles où une efficacité accrue à faible concentration de substrat est souhaitée. Ces différences montrent que l'immobilisation modifie de manière significative le comportement enzymatique, nécessitant une optimisation adaptée aux applications visées.

Conclusion et

Perspectives

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail, plusieurs objectifs fondamentaux ont été atteints, allant de l'extraction de l'invertase à partir de *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à son application sur un produit alimentaire. Ce travail a permis l'étude de la cinétique de cette enzyme, tant sous sa forme libre qu'immobilisée, en évaluant ses paramètres cinétiques, sa stabilité, ainsi que son potentiel d'utilisation dans le domaine nutritionnel, notamment pour la formulation de produits adaptés aux régimes à faible index glycémique.

L'enzyme sous forme libre a montré une activité catalytique significative (280,2 UI/ml), avec une constante de Michaelis ($K_m = 0,00557 \text{ mol/l}$) et une vitesse maximale ($V_{\max} = 1569,20 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$) selon le modèle de Michaelis-Menten, traduisant une bonne affinité pour le saccharose. Après immobilisation dans des billes d'alginate, l'activité maximale a diminué ($V_{\max} = 502,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$), tandis que le K_m ($0,00182 \text{ mol/l}$) suggère une affinité apparente plus élevée envers le substrat. Ces résultats confirment que l'immobilisation, bien que favorable à la réutilisation, ne garantit pas systématiquement une efficacité catalytique supérieure.

L'étude de la stabilité au cours du temps a mis en évidence une augmentation de l'activité de l'enzyme libre après stockage, tandis que l'enzyme immobilisée a montré une baisse initiale suivie d'une récupération partielle, traduisant une phase d'adaptation au support. L'application de l'hydrolyse par l'invertase sur un biscuit industriel a révélé une faible activité enzymatique, probablement due à l'absence du saccharose libre ou à la présence d'édulcorants non hydrolysables, limitant ainsi l'action de l'enzyme.

En effet, cette étude met en lumière le potentiel biotechnologique de l'invertase issue de *S. cerevisiae*, tout en soulignant certaines limites liées à sa stabilité, son efficacité catalytique post-immobilisation. Ces observations ouvrent la voie à de nombreuses perspectives de recherche et d'optimisation :

- Exploiter des souches locales de *S. cerevisiae* pour améliorer le rendement enzymatique.
- Optimiser les conditions opératoires (température, pH, cofacteurs).
- Tester de nouveaux supports d'immobilisation (gélatine, silice, polymères naturels...).
- Appliquer l'enzyme sur d'autres matrices alimentaires (confitures, yaourts, jus...).
- Intégrer des analyses sensorielles pour évaluer l'impact organoleptique du sucre inverti.
- Réaliser des études *in vivo* pour mesurer la réponse glycémique au sucre inverti chez les personnes diabétiques.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques



1. Aehle, W. (2007). *Enzymes in industry* (3e éd.). Wiley-VCH.
2. Aguilar, B. R. (2003). Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en œuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat, INSA Toulouse.
3. Aitken, A., & Learmonth, M. P. (2002). Proteindetermination by UV absorption. In J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press.
4. Alnajjar, A. (2001). Préparation et études cinétiques de la β -fructosidase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) soluble et immobilisé. Magister, Université Aboubekr Belkaid.
5. Amaya-Delgado, L., Hidalgo-Lara, M. E., & Montes-Horcasitas, M. C. (2006). Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, 99(2), 299–304.
6. Andjelkovic, U., Picuric, S., & Vujcic, Z. (2010). Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, 120(3), 799–804.
7. Ardalan, M. R., Tabibi, H., Attari, V. E., & Mahdavi, A. M. (2017). Nephrotoxic effect of aspartame as an artificial sweetener: A brief review. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 11(5), 339–343.
8. Arruda, L. M. D. O., & Vitolo, M. (1999). Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81(1), 23–33.
9. Ashok, I., Sheeladevi, R., & Wankhar, D. (2015). Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. *Journal of Biomedical Research*, 29(5), 390–396.



10. Bacha, A. (2008). Production et l'étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur substrat à base de datte. Thèse de Magister, Université El Hadj Lakhdar.
11. Barnett, J. A. (2000). A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850. *Yeast*, 16(8), 755–771.
12. Bayramoglu, G., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2001). Investigation of stabilization of catalase by immobilization onto bentonite and poly(acrylamide-b-vinylalcohol). *Process Biochemistry*, 36(8–9), 729–736.
13. Belpoggi, F., Soffritti, M., Padovani, M., Degli Esposti, D., Lauriola, M., & Minardi, F. (2006). Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076, 559–577.
14. Benmedjahed, L., & Bengrine, K. (2017). Étude des paramètres cinétiques de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*. Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen.

15. BENZIAN, S. I. (2003). Immobilisation de la β -Fructosidase de *Saccharomyces cerevisiae* et étude des phénomènes de transfert de matière. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.
16. Benziane, S. (2003). Immobilisation de la β -fructosidase de *Saccharomyces cerevisiae* et étude des phénomènes de transfert de matière. Université AboubekrBelkaïd Tlemcen.
17. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (8^e éd.). Macmillan Learning.
18. Bernfeld, P. (1955). Amylases α et β methods. *Methods in Enzymology*, 1, 149–150.
19. Blachere, H., Corrieu, G., Peringer, P., & Lane, A. G. (2009). A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* with experimental determination of parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 431-454.
20. Blin, C. P. (2002). Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne France.
21. Boisse, T. T. N. (2013). *Microbiocapteurs conductimétriques utilisant des oxydoréductases : De la conception à l'application à l'environnement et l'agroalimentaire*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I.
22. Bouix, M., Leveau, J.Y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau Y.J. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Lavoisier-Tec & Doc.
23. Bourgeois, C. M., & Larpent, J. P. (1996). *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Lavoisier.
24. Bousmaha, L., Ouhssine, M., & El Ychioui, M. (2014). Isolement et caractérisation de *Candida guilliermondii* productrice d'une β fructofuranosidase endocellulaire. *Laboratoire de Biotechnologie Microbienne*, 10(2), 311 – 317.
25. Brady, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1639–1650.
26. Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1051, 15–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
27. Burnstein, C. (2000). Biotechnologie enzymatique : Mode d'emploi – Industrie alimentaire - Environnement - Médical. Poly Technica.



28. Castan, C. (2016). La levure de bière : un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté. Thèse de doctorat. Université de Montpellier.
- Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2014). Artificial sweeteners – A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 611–621.
29. Cherrak, S. A. (2003). Mise en œuvre de la β -fructosidase de *Saccharomyces cerevisiae* dans un bioréacteur à lit fluidisé. Mémoire de Magister, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.
30. Choudhary, A. K., & Pretorius, E. (2017). Revisiting the safety of aspartame. *Nutrition Reviews*, 75(9), 718–730

31. Clemens, R. A., Jones, J. M., Kern, M., Lee, S.-Y., Mayhew, E. J., Slavin, J. L., & Zivanovic, S. (2016). Functionality of sugars in foods and health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 433–470.
32. Combes, D., & Monsan, P. (1983). Sucrose hydrolysis by invertase: Characterization of products and substrate inhibition. *Carbohydrate Research*, 117, 215–225.
33. Costa, S. A., Azevedo, H. S., & Reis, R. L. (2005). Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. In *Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine*.
34. Cryer, A., & Bartley, W. (1974). The effect of storage on enzyme activities in tissues. *Biochemical Journal*, 144(3), 433–434.
35. Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). *Saccharomyces boulardii* has been found to be an effective probiotic in double-blind clinical studies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767–778.



36. Danisman, T., Tan, S., Kacar, Y., & Ergene, A. (2004). Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA–GMA membrane. *Food Chemistry*, 85(3), 461–466.
37. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3, 1–9.
38. De Almeida, A. C. S., de Araújo, L. C., Costa, A. M., de Abreu, C. A. M., Lima, M. A. G. A., & Palha, M. L. A. P. F. (2005). Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 54–62.
39. De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44(2), 149–156.
40. Decloux, M. (2002). Procédé de transformation en sucrerie (partie 1). *Technique de l'ingénieur*.
41. Deniņa, I., Semjonovs, P., Fomina, A., Treimane, R., & Linde, R. (2014). The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 58(3), 278–284.
42. Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee, Punthakee, Z., Goldenberg, R., & Katz, P. (2018). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian journal of diabetes*, 42 Suppl 1, S10–S15.
43. Durand, G., & Monsan, P. (1982). Les enzymes : production et utilisations industrielles. Gauthier-Villars.



44. El-Sayed, E.-S. M., El-Sayed, S. T., Youssef Elmallah, M. I., & Shehata, A. N. (2015). Immobilization, optimization and properties of pea invertase within sodium alginate gel. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 1213–1215.
45. Emregul, E., Sungur, S., & Akbulut, U. (2006). Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry*, 97(4), 591–597.
46. Eroglu, E., & Ozcan, T. (2024). Pro-pre and postbiotic fermentation of the dietetic dairy matrix with prebiotic sugar replacers. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16, 726–736.
47. European Commission. (2011). *Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers. Official Journal of the European Union*.



48. Fiechter, A., & Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 27(1), 27-45.



49. Giuntini, E. B., Sardá, F. A. H., & de Menezes, E. W. (2022). The Effects of Soluble Dietary Fibers on Glycemic Response: An Overview and Future Perspectives. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(23), 3934.

50. Glazer, A. N., & Nikaido, H. (1995). *Microbial technology: Fundamentals of applied microbiology*. W. H. Freeman and Company.

51. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., & Davis, R. W. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-574.

52. Gothie, J. D. (2017). Influence de la signalisation thyroïdienne et du métabolisme mitochondrial sur le choix de destin des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire chez la souris adulte. Thèse de doctorat, Université Sorbonne.

53. Goulet, O. (2009). Un probiotique pas comme les autres : d'une histoire tropicale à des propriétés biologiques et des effets cliniques prouvés. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 22(6), 269-272.

54. Guinet, R., & Godon, B. (1994). *La panification française*. Tec & Doc Lavoisier.

55. Guiraud, J. P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Dunod.

56. Guiraud, J. P., & Galzy, P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod.

57. Guiraud, J. P., & Rose, J. P. (2004). *Pratique de normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR.

58. Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2020). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.



59. Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38, 453-468.

60. Hantzidiamantis, P. J., Awosika, A. O., & Lappin, S. L. (2024). Physiology, Glucose. In *Stat Pearls*. Stat Pearls Publishing.

61. Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172), 964-972.

62. Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536-553.

63. Hong, C., Lee, M., Kim, D., Kim, D., Cho, K., & Shin, I. (2012). A checkpoints capturing timing-robust Boolean model of the budding yeast cell cycle regulatory network. *BMC Systems Biology*, 6, 129.

64. <https://gec.sdv.univ-paris.diderot.fr/cours/genetique/chap/00.html>

65. <https://www.alamyimage.fr/>

66. Hu, C., Xuan, Y., & Zhang, X. (2022). Immune cell metabolism and metabolic reprogramming. *Molecular Biology Reports*, 49(10), 9783-9795.

67. Huffman, S., Soni, K., & Ferraiolo, J. (2014). UV-Vis based determination of protein concentration. *BioProcess International*, 12, 8.

68. Hurteau, P., & Tremblay-Pépin, S. (2015). *Doit-on privatiser la SAQ?* Institut de recherche et d'informations socio-économiques.
69. Hüttl, R., Oehlschlager, K., & Wolf, G. (1999). Calorimetric investigations of the enzyme-catalyzed sucrose hydrolysis. *Thermochimica Acta*, 325(1), 1–4.
70. Hwang, E. T., & Shim, J. H. (2004). Immobilization of enzymes on polymeric supports. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(2), 69–75.
71. Hyvönen, M. (2017). *Protein concentration measurement by UV*. University of Cambridge.



72. Idris, A., Zain, N. A. M., & Suhaimi, M. S. (2008). Immobilization of baker's yeast invertase in PVA–alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry*, 43(4), 331–338.



73. Jacques, K. A., Lyons, T. P., & Kelsall, D. R. (2003). *The alcohol textbook: Understanding yeast fundamentals* (4th ed). Nottingham University Press.
74. Janairo, G., Sy, M. L., Yap, L., Llanos-Lazaro, N., & Robles, J. (2011). Determination of the sensitivity range of Biuret test for undergraduate biochemistry experiments. *e-Journal of Science & Technology*, 5(6), 77–83.
75. Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). *The yeasts: A taxonomic study*. (5e éd., Vol. 1).
76. Jones, B.H. *et al.* (1983). Observations of a Persistent Upwelling Center off Point Conception. (eds) Coastal Upwelling Its Sediment Record. NATO Conference Series.
77. Jordan, S. (1924). Commercial invert sugar: its manufacture and uses. *Industrial and Engineering Chemistry*, 16(3), 307–310.
78. Jorge, K. (2003). Soft drinks: Chemical composition. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (2nd ed., pp. 5346–5352). Elsevier.



79. Kabir, M. F., & Lu-Kwang, J. (2023). On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry*, 130, 734–746.
80. Kamoun, P. (1997). *Appareils et méthodes en biochimie*. Flammarion, Médecine-Sciences.
81. Kaplan, O., Bakir, U., & Erarslan, A. (1997). Thermal inactivation of native and crosslinked invertases. *Biotechnology Techniques*.
82. Kern, G., Kern, D., Jaenicke, R., & Seckler, R. (1993). Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from yeast. *Protein Science*, 2(1), 1862–1868.
83. Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), 850–867.
84. Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in applied microbiology*, 29, 1–28.

85. Klotzbach, T. L., Watt, M. M., Ansari, Y., & Minter, S. D. (2008). Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion polymers. *Journal of Membrane Science*, 311, 81–88.
86. Kotwal, S. M., & Shankar, V. (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, 27(4), 311–322.
87. Kreger-Van Rij, N. J. W. (1984). *The yeasts: A taxonomic study*. Elsevier.



88. Larpent, J.-P. (1991). *Biotechnologie des levures*. Paris, France: Masson.
89. Larpent, J.-P. (1991). *Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (produits laitiers et carnés)*. Paris, France: APRIA.
90. Larpent, J.-P., & Gourgaud, M. (1985). *Éléments de microbiologie*. Paris, France: Hermann.
91. Larpent, J.-P., & Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie* (3^e éd.). Cachan, France: Tec & Doc Lavoisier.
92. Leblond. (1988). Étude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. Thèse de doctorat, Université Nancy 1.
93. Lefebvre, T. (1991). Le Dr Doyen, sa Staphylase et sa Mycolysine. *Revue d'histoire de la pharmacie*, 79(289), 193–198.
94. Lehninger, A. L. (1977). *Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires* (2^e éd.). Paris, France : Flammarion.
95. Lemerini, W. (2006). Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbitapepomedullosa*). Ébauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. Magister. Université Abou bekr Belkaid Tlemcen.
96. Leveau, I. V., & Bouix, M. (1993). *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Paris, France : Tec & Doc Lavoisier.
97. Levure Anchor. (2022). Qu'est-ce qu'une levure ? Anchor. Institut Français de la Vigne et du Vin.
98. Lilly, d. M., & Stillwell, r. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science (new york, n.y.)*, 147(3659), 747–748.
99. Loncle, D. (1992). *Génie enzymatique*. Paris, France : Doin.



100. Maktouf, S., Kamoun, A., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., Ghribi, D., & Chaabouni, S. E. (2013). A new raw-starch-digesting α -amylase: Production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 531–541.
101. Manoochehri, H., Hosseini, N. F., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H., & Nouri, F. (2020). A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101599.
102. Margetić, A., & Vujčić, Z. (2017). Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(3), 305–311.

- 103.** Martínez, D. N., & de la Barrera, E. (2025). Enzymatic activity responses to transport and low-temperature storage. *Nitrogen*, 6(1), 5.
- 104.** Mateo, C. et al. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463.
- 105.** Mbira, C. (2024). Influence of substrate concentration on enzyme activity in biocatalysis. *Journal of Chemistry*, 3(1), 48–58.
- 106.** Mercier, C. (1997). Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à des fins nutritionnelles. *Intérêts nutritionnels et diététiques du lait de chèvre*. Nord-France.
- 107.** Milovanović, A., Božić, N., & Vujčić, Z. (2007). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food Chemistry*, 104, 81–86.
- 108.** Mohamad, N. R. et al. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 29(2), 205–220.
- 109.** Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1971). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 131(4), 339–356.
- 110.** Moriconi, E., Feraco, A., Marzolla, V., Infante, M., Lombardo, M., Fabbri, A., & Caprio, M. (2020). Neuroendocrine and metabolic effects of low-calorie and non-calorie sweeteners. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 444.
- 111.** Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Biochimie de Harper* (25e éd). De Boeck Université.



- 112.** Nadeem, H., Rashid, M. H., Siddique, M. H., Azeem, F., Muzammil, S., Javed, M. R., Ali, M. A., Rasul, I., & Riaz, M. (2015). Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, and physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 50(8), 1202–1210.
- 113.** Nadeema, H., Rashid, M. H., Siddique, M. H., Azeem, F., Muzammil, S., Javed, M. R., Ali, M. A., Rasul, I., & Riaz, M. (2015). Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, and physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 50(8), 1202–1210.
- 114.** Naumoff, D. G. (1999). Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional O-xylosidases and α -L-arabinases. *FEBS Letters*, 488, 177–179.
- 115.** Nguyen, T. D. (2016). Protection de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.
- 116.** Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (2018). Saccharomyces cerevisiae: Invertase production and applications in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289–302.



- 117.** OMS. (2024). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.



- 118.** Parrou, J. L., Teste, M. A., & François, J. (1997). Effect of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143, 1891–1900.

119. Pelmont, J. (1993). *Les enzymes*. Alger : Office des publications universitaires.
120. Pierre, A. C. (2004). The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(3), 145–170.
121. Pol, D. (1996). *Travaux pratiques de biologie des levures*. Paris : Ellipses.

Q

122. Qi, X., & Tester, R. F. (2019). Fructose, galactose and glucose in health and disease. *Clinical Nutrition ESPEN*, 33, 18–28.

R

123. Reddy, A., & Maley, F. (1990). Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 10817–10820.
124. Revuz, B. (1979). *Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur mûlasse)*. Paris : Lavoisier.
125. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41.
126. Rose, A. H., & Harrison, J. S. (1971). *The Yeast : Yeast Technology* (2^e éd., Vol. 4).

S

127. Sale, J. W., & Skinner, W. W. (1922). Relative sweetness of invert sugar. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(6), 522–524.
128. Salgarolo, P. (1990). Pratique des manipulations de chimie à usage des biologistes.
129. Samuel, P., Ayoub, K. T., Magnuson, B. A., Wölwer-Rieck, U., Jeppesen, P. B., Rogers, P. J., Rowland, I., & Mathews, R. (2018). Stevia leaf to stevia sweetener: Exploring its science, benefits, and future potential. *The Journal of Nutrition*, 148(7), 1186–1205
130. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307.
131. Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235.
132. Silveira, M. C., Oliveira, E. M., Carvajal, E., & Bon, E. P. (2016). Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* invertase: Role of the URE2 gene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86, 247–254.
133. Singh, R., Kumar, V., & Kapoor, V. (2014). Partial Purification and Characterization of a Heat Stable α -Amylase from a Thermophilic Actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme research*, 2014, 106363.
134. Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in food and nutrition research*, 79, 179–211.
135. Smeets, E., Junginger, M., Faaij, A., Walter, A., Dolzan, P., & Turkenburg, W. (2016). The sustainability of Brazilian ethanol – An assessment of the possibilities of certified production. *Biomass and Bioenergy*, 32(8), 781–813.
136. Stamm, A. J. (1937). Treatment with sucrose and invert sugar. *Industrial and Engineering Chemistry*, 29(7), 833–835.

137. Subramanian, A., Kennel, S. J., Oden, P. I., Jacobson, K. B., Woodward, J., & Doktycz, M. J. (1999). Comparison of techniques for enzyme immobilisation on siliconsupports: Effect of cross-linker chainlength on enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1), 26–34.



138. Tang, Z. et al. (2006). Immobilization of alkaline phosphatase on chitosan nanoparticles. *Process Biochemistry*, 41(7), 1560–1565.

139. Tanriseven, A., & Doğan, S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36(11), 1081–1083.

140. Tkacz, J. S., & MacKay, V. L. (1979). Sexual conjugation in yeast: Cell surface changes in response to the action of mating hormones. *Journal of Cell Biology*, 80(2), 326–339.

141. Tomita, T., Sato, N., Arai, T., Shiraishi, H., Sato, M., Takeuchi, M., & Kamio, Y. (1997). Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Berton towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiology and Immunology*, 41(12), 1005–1009.

142. Tortora, G. J., & Anagnostakos, N. P. (1987). *Principes d'anatomie et de physiologie* (5e éd., pp. 688–693). INC.

143. Tortura, G. J., Funke, B. R., & Case, C. I. (2003). *Introduction à la microbiologie*. Édition du Renouveau pédagogique.

144. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., & Chibata, I. (1966). Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia*, 31, 214–224.



145. van der Aa Kühle, A., & Jespersen, L. (2003). The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Systematic and applied microbiology*, 26(4), 564–571.

146. Vieira, T. A., Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., & Gonçalves, L. R. B. (2009). Enzyme immobilization on agarose: Influence of activation conditions on performance. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(5–6), 350–356.

147. Vrabel, P., Polakovič, M., & Bálaš, V. (1994). Modelling of inactivation phenomena in oligomeric enzymes. *Computers & Chemical Engineering*, 18(1), S681–S685.



148. Wagner, V. (2012). De *Stevia rebaudiana* à la stévia : Parcours chaotique de l'« herbe sucrée » parmi les édulcorants. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

149. Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30.

150. Wallach, J. (1997). Les enzymes. Paris : Nathan

151. Ward, W. (2012). The isolation of invertase from baker's yeast – An introduction to protein purification strategies. *Protein purification*. InTech.

152. White, S. J. (2008). Straight talk about high-fructose corn syrup: What it is and what it ain't. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1716S–1721S.

153. Winter, J. W. (1988). Ecological specialization of mammals in Australian tropical and subtropical rainforest: Refugial or ecological determinism? *Proceedings of the Ecological Society of Australia*, 15, 127–138.

154. Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W., & Moon, S. J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, 40(6), 2149–2154.

155. Wrolstad, R. E. (2005). *Food carbohydrate chemistry*. Wiley-Interscience.

y

156. Yucekan, I., & Onal, S. (2012). Physicochemical properties of invertase partitioned in an aqueous two-phase system of polyethylene glycol/sodium sulfate. *Hacettepe J. Biol. Chem*, 40(2), P : 139-147.

y

157. Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., & Duport, C. (2015). Anaerobic cells of *S. cerevisiae* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Archives of Microbiology*, 185, 222–233.

Annexes

1. Préparation du réactif du biuret

- 1g du sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 6g du tartrate double de sodium et de potassium
- 30g d'hydroxyde de sodium
- 1gd'iodure de potassium (KI)
- 1000ml d'eau distillée

Le réactif du biuret doit être conservé à l'abri de la lumière dans un flacon soigneusement bouché (Wallach et al., 1996 ; Lemerini et Raib, 2003) .

2. Préparation du tampon acéto-acétique

Pour préparer le tampon acéto-acétique 0,1M – pH 4,6, utilisé comme solvant de l'invertase et de son substrat (saccharose), il faut procéder à la préparation des solutions suivantes :

- Solution « A » d'acide acétique 0,2 M : 11,55 ml de CH_3COOH dilués dans 1000 ml d'eau distillée .
- Solution « B » d'acétate de sodium 0,2M : 27,2g $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 1000 ml d'eau distillée .
- Mélanger 25,5 ml de la solution « A » et 24,5ml de la solution « B », compléter à 200 ml avec de l'eau distillée pour obtenir une solution tampon à 0,1M de pH 4,6 .

Composition du réactif de l'acide 3,5-dinitrosalicyclique (DNSA)

Pour préparer 100 ml de réactif du DNSA nous avons procédé aux pesées suivantes :

- 1g de DNSA dissoudre dans 20 ml de soude pour obtenir une solution 2 N .
- 30 g de tartrate double de sodium et de potassium dissout dans 50 ml d'eau distillée .
- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et agiter jusqu'à obtention d'une solution homogène de couleur orange-rouge (si nécessaire, chauffer légèrement le mélange) .

Conserver ce réactif DNSA dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière.

Abstract

Given the rapid rise of diabetes and the need to develop safe, effective, and suitable dietary alternatives, this study aims to evaluate the feasibility of using invertase extracted from *Saccharomyces cerevisiae* as a biocatalyst for the production of low-glycemic-index foods. The methodology was structured in three stages: enzyme extraction, immobilization on a biocompatible alginate matrix, and kinetic study of the free and immobilized forms. The results revealed a decrease in catalytic activity after immobilization, accompanied by improved substrate affinity. Enzyme stability was found to depend on the physicochemical properties of the support and storage conditions. When applied to a food model (industrial biscuit), very limited enzymatic activity was recorded, likely due to the presence of potential inhibitors. This research highlights the potential of invertase in developing functional products for diabetics and encourages the optimization of immobilization processes as well as industrial-scale validation.

Keywords: Invertase, Immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, Glycemic Index.

الملخص

نظرًا للانتشار السريع لداء السكري والحاجة إلى تطوير بدائل غذائية آمنة وفعالة ومناسبة، تهدف هذه الدراسة إلى تقييم كمحفز حيوي لإنتاج أطعمة ذات مؤشر *Saccharomyces cerevisiae* إمكانية استخدام إنفرتاز المستخرج من جلايسيمي منخفض. تم تنظيم المنهجية في ثلاث مراحل: استخلاص الإنزيم، تثبيته على مصفوفة ألجينات متوافقة حيويًا، ثم دراسة الحركية للإنزيم في شكله الحر والمثبت. أظهرت النتائج انخفاضًا في النشاط التحفيزي بعد التثبيت، مصحوبًا بزيادة في الألفة تجاه الركيزة. وتبين أن استقرار الإنزيم يعتمد على الخصائص الفيزيائية والكيميائية للدعامة وظروف التخزين

وعند التطبيق على نموذج غذائي (بسكويت صناعي)، تم تسجيل نشاط إنزيمي محدود جدًا، ربما بسبب وجود مثبطات محتملة. تسلط هذه الدراسة الضوء على إمكانيات إنفرتاز في تطوير منتجات وظيفية لمرضى السكري، وتشجع على تحسين عمليات التثبيت والتحقق من جدواها على المستوى الصناعي

الكلمات المفتاحية: المؤشر الجلايسيمي *Saccharomyces cerevisiae* إنفرتاز، تثبيته الإنزيم

Résumé

Face à la progression rapide du diabète et à la nécessité de concevoir des alternatives alimentaires sûres, efficaces et adaptées, cette étude a pour objectif d'évaluer la faisabilité d'utilisation de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* en tant que biocatalyseur pour la production d'aliments à faible index glycémique. La méthodologie s'est articulée autour de trois étapes : extraction de l'enzyme, immobilisation sur une matrice d'alginate biocompatible, puis étude cinétique des formes libre et immobilisée. Les résultats ont révélé une diminution de l'activité catalytique après immobilisation, accompagnée d'une meilleure affinité pour le substrat. La stabilité enzymatique s'est avérée dépendante des propriétés physico-chimiques du support et des conditions de stockage. Lors de l'application sur un modèle alimentaire (biscuit industriel), une activité enzymatique très limitée a été enregistrée, probablement en raison de la présence d'inhibiteurs potentiels. Cette recherche met en lumière le potentiel de l'invertase dans le développement de produits fonctionnels destinés aux diabétiques, et encourage l'optimisation des procédés d'immobilisation ainsi que des validations à l'échelle industrielle.

Mots clés : Invertase, Immobilisation, *Saccharomyces cerevisiae*, Index glycémique.