

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du
DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT EN GENIE BIOLOGIQUE

Thème

**Utilisation de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'essai de
production de sucre inverti ($\geq 96\%$) à partir d'un sucre hydrolysé
chimiquement à 80 - 85%.**

Présenté par :

Mlle AKKOUCHE Ryma

Mlle KHERBOUCHE Ilhem

Devant le jury :

Présidente : M^{me} ARKOUB Warda.

Examineur : M^r HEBAL Hakim.

Encadreur : M^r GAGAOUA Mohammed.

Co-Promotrice : M^{me} BOUCHERBA Nawel.

Année universitaire : 2011 - 2012.

Remerciements

*Nous adressons une profonde reconnaissance à monsieur **GAGAOUA Mohammed**, qui a encadré ce travail depuis les premiers instants, qui nous a aidé à donner le meilleur de nous mêmes. Sa pédagogie, son écoute, sa vision à la recherche scientifique ont largement contribué à l'évolution de ce travail.*

*Nous souhaitons témoigner nos remerciements tout aussi sincères à madame **BOUCHERBA Nawel**, pour avoir accepté de nous encadrer, et pour l'intérêt qu'elle a montré à l'égard de ce travail.*

*Nos remerciements vont également à madame **ARKOUB Warda**, pour avoir bien voulu présider le jury, et à monsieur **HEBAL Hakim**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi au directeur de l'unité sucre liquide, monsieur **RACHEDI Nadir**, pour nous avoir accueilli au sein de la siroperie de Cevital, et également à monsieur **BOUCHEBBAH Fares**, pour le temps qu'il nous a accordé pour répondre à toutes nos questions.*

En fin, nous tenons à remercier sincèrement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes parents et grands parents

A ma sœur et mes deux frères

A mon oncle, sa femme et ses enfants

A mes tantes, leurs maris et leurs enfants

A toutes mes amies, plus particulièrement mon binôme et meilleure amie Ryma.

A toutes celles et à tous ceux qui m'aiment.

Ilhem.

A la mémoire de mon grand-père

A mon cher époux Amar

A mes chers parents et grands parents

A ma belle famille

A mon frère et mes deux sœurs

A mes tantes et leurs maris

A mes oncles

A mes cousins et cousines, en particulier Yanis

A toutes mes amies, surtout mon binôme et meilleure amie Ilhem

A toutes celles et à tous ceux qui m'aiment

Ryma.

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

aw : Affinité pour l'eau.

BSA : Albumine du sérum bovin.

Bx : Brix.

cm : Centimètre.

DNS : Dinitrosalysilate.

EO : Eau osmosée.

EC : Enzyme commission.

g : Gramme.

HMF : Hydroxyméthyl furfural.

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance.

K_m : Constante de Michaelis.

kDa : Kilo Dalton.

m/v : Masse/volume.

m: Mètre.

μ L : Microlitre.

μ m : Micromètre.

μ mole : Micromole.

ml : Millilitre.

m mole : Millimole.

min: Minute

nm : Nanomètre.

NR : Not reported.

PM : Poids moléculaire.

pH : Potentiel hydrogène.

PS : pouvoir sucrant.

PDHA : Produit de la dégradation alcaline des hexoses.

SID : Sucre inverti dilué.

SLI : Sucre liquide inverti.

SRT : Sucres réducteurs totaux.

t: Temps.

UI : Unité ICUMSA.

V_{max} : Vitesse maximale.

SOMMAIRE

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction..... 1

Revue bibliographique

I. Généralités sur la canne à sucre et le saccharose

I.1. Canne à sucre..... 3

I.1.1. Définition..... 3

I.1.2. Production mondiale et historique..... 3

I.1.3. Composition chimique de la canne à sucre..... 4

I.2. Saccharose..... 5

I.2.1. Définition..... 5

I.2.2. Propriétés du saccharose..... 5

I.2.2.1. Aspect..... 5

I.2.2.2. Solubilité et densité..... 5

I.2.2.3. Pouvoir rotatoire et pureté..... 6

I.2.2.4. Point d'ébullition et de congélation..... 7

I.2.2.5. Inversion..... 7

I.2.2.6. Propriété sensorielle et point de fusion..... 7

I.2.3. Rôles technologiques du sucre et des sirops de sucre dans les Industries Agro-alimentaires (IAA)..... 8

II. Technologie sucrière

II.1. Technologie d'extraction du sucre de canne..... 9

II.2. Technologie de raffinage du sucre roux de canne..... 10

II.2.1. Affinage et refonte..... 10

II.2.1.1. Affinage..... 10

II.2.1.2. Refonte..... 10

II.2.2. Epuration et carbonatation..... 10

II.2.3. Filtration..... 11

| | |
|---|----|
| II.2.4. Décoloration..... | 11 |
| II.2.4.1. Principaux colorants présents dans le sucre..... | 11 |
| II.2.4.2. Procédé de la décoloration..... | 12 |
| III. Sirops du saccharose et du sucre inversi | |
| III.1. Sucre liquide inversi..... | 14 |
| III.2. Technologie de fabrication du sucre liquide inversi..... | 14 |
| III.2.1. Déminéralisation..... | 16 |
| III.2.2. Hydrolyse..... | 16 |
| III.2.2.1. Hydrolyse chimique par les résines échangeuses d'ions..... | 16 |
| III.2.2.2. Hydrolyse enzymatique..... | 17 |
| III.2.3. Charbon-filtration..... | 21 |
| III.2.4. Pasteurisation –Filtration stérile..... | 21 |
| III.2.5. Concentration..... | 21 |
| III.3. Propriétés du sucre liquide inversi..... | 21 |
| III.3.1. Viscosité..... | 21 |
| III.3.2. Affinité pour l'eau (aw)..... | 21 |
| III.3.3. Stabilité microbiologique..... | 22 |
| III.3.4. Le pouvoir sucrant..... | 22 |
| III.4. Rôles technologiques du sucre liquide inversi..... | 22 |

Partie pratique

IV. Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| IV.1. Echantillonnage et Caractérisation de la matière première (substrat)..... | 23 |
| Paramètres physicochimiques | |
| IV.1.1. Mesure du pH..... | 24 |
| IV.1.2. Mesure du Brix..... | 24 |
| IV.1.3. Mesure de la polarisation..... | 25 |
| IV.1.4. Mesure du taux d'inversion..... | 25 |

| | |
|--|----|
| IV.1.5. Mesure de la couleur..... | 27 |
| IV.1.6. Mesure du trouble..... | 27 |
| IV.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de l'invertase..... | 28 |
| IV.2.1. Origine de l'enzyme..... | 28 |
| IV.2.2. Préparation des dilutions..... | 28 |
| IV.2.3. Réalisation des courbes d'étalonnage..... | 29 |
| IV.2.4. Méthodes analytiques..... | 30 |
| IV.2.5. Caractérisation de l'invertase..... | 32 |
| IV.2.5.1. Détermination du pH optimum de l'enzyme | 32 |
| IV.2.5.2. Détermination de la température optimale..... | 33 |
| IV.2.5.3. Etude de la thermostabilité de l'enzyme..... | 33 |
| IV.2.5.4. Détermination de la vitesse initiale de la réaction enzymatique..... | 33 |
| IV.2.5.5. Détermination de K_m et V_{max} de la réaction enzymatique..... | 34 |
| IV.3. Détermination du pourcentage d'hydrolyse..... | 34 |
| IV.4. Estimation du poids moléculaire..... | 35 |
| IV.4.1. Préparation de l'échantillon pour l'électrophorèse..... | 35 |
| IV.4.2. Détermination de la pureté de l'échantillon contenant l'enzyme (invertase) par méthode électrophorétique en conditions dénaturantes..... | 35 |
| IV.4.3. Coloration au bleu de Coomassie R-250..... | 36 |
| V. Résultats et discussions | |
| V.1. Caractéristiques de la matière première..... | 38 |
| V.2. Evolution des paramètres -physico-chimiques du sucre liquide inverti au cours des étapes de fabrications..... | 39 |
| V.2.1. Evolution du Brix durant les étapes de fabrication du sucre liquide inverti (SLI)..... | 39 |
| V.2.2. Evolution du pH..... | 40 |
| V.2.3. Evolution de la couleur..... | 41 |
| V.2.4. Evolution du taux d'inversion..... | 42 |
| V.3. Les conditions optimales de l'invertase libre..... | 43 |

| | |
|--|----|
| V.3.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme..... | 43 |
| V.3.2. Effet de la température sur l'activité de l'invertase..... | 45 |
| V.3.3. La stabilité thermique de l'invertase..... | 46 |
| V.3.4. Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} | 49 |
| V.3.5. Estimation de la vitesse initiale..... | 50 |
| V.4. Le pourcentage d'hydrolyse..... | 51 |
| V.5. Détermination de la quantité d'invertase nécessaire | 53 |
| V.6. Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)..... | 53 |
| V.7. Caractéristiques du produit fini..... | 55 |
| Conclusion générale | 56 |
| Références bibliographiques | 57 |

Annexes

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Représentation schématique de la canne à sucre..... | 3 |
| Figure 02 : Consommation du sucre dans différentes parties du monde..... | 4 |
| Figure 03 : Solubilité du saccharose en fonction de la température..... | 6 |
| Figure 04 : Extraction du sucre roux de canne..... | 9 |
| Figure 05 : Le pouvoir rotatoire des différents sucres..... | 14 |
| Figure 06 : Diagramme général de fabrication du sucre liquide inverti..... | 15 |
| Figure 07 : Hydrolyse acide du saccharose..... | 17 |
| Figure 08 : Clivage du saccharose par l'invertase..... | 18 |
| Figure 09 : Représentation structurale de l'invertase ou β -Fructofuranosidase..... | 18 |
| Figure 10 : La cuite V220 (milieu de prélèvement)..... | 23 |
| Figure 11 : Profil chromatographique de la matière première étudiée..... | 26 |
| Figure 12 : Préparation des dilutions de solution stock..... | 29 |
| Figure 13 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode 3,5-DNS..... | 31 |
| Figure 14 : Evolution du Brix..... | 39 |
| Figure 15 : Evolution du pH | 40 |
| Figure 16 : Evolution de la couleur..... | 41 |
| Figure 17 : Evolution du taux d'inversion..... | 42 |
| Figure 18 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase utilisée à 40°C..... | 43 |
| Figure 19 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase utilisée à 70°C..... | 43 |
| Figure 20 : Effet de la température sur l'activité de l'invertase libre..... | 45 |

| | |
|---|----|
| Figure 21 : La thermostabilité de l'invertase libre à différentes températures..... | 47 |
| Figure 22 : Représentation des paramètres cinétiques de l'enzyme étudiée selon Lineweaver-Burk..... | 49 |
| Figure 23 : Evolution de la concentration du produit en fonction du temps..... | 50 |
| Figure 24 : Pourcentage d'hydrolyse au cours du temps..... | 52 |
| Figure 25 : Profil électrophorétique de la pureté de l'invertase utilisée pour la production du sucre inverti..... | 54 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Composition moyenne de la canne à sucre..... | 4 |
| Tableau II : Principaux colorants présents en sucrerie de canne..... | 12 |
| Tableau III : Principales sources industrielles de l'invertase..... | 19 |
| Tableau IV : Autres sources de l'invertase..... | 20 |
| Tableau V : Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs..... | 30 |
| Tableau VI : Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines..... | 31 |
| Tableau VII : Caractérisation de la matière première utilisée lors de cette étude..... | 38 |
| Tableau VIII : Résultats des essais pour la détermination du pourcentage d'hydrolyse..... | 51 |
| Tableau IX : Poids moléculaire de l'invertase de différentes souches de levure..... | 54 |
| Tableau X : Caractéristiques du produit fini..... | 55 |

Introduction

Introduction

La production mondiale annuelle de saccharose est de 80 millions de tonnes dont 74% proviennent de la canne à sucre (Arzate, 2005). Cette dernière est la source principale de sucre en Afrique, en Amérique du sud et en Asie. Le traitement du sucre en solution, par hydrolyse chimique ou enzymatique aboutit à un mélange équimolaire de D-glucose et D-fructose connu sous le nom de sucre inverti (Clarke, 1995).

Vu son pouvoir sucrant élevé et sa très bonne facilité d'incorporation, le sucre inverti possède d'importantes applications dans les boissons et industries alimentaires pour la fabrication et préparation de certaines denrées alimentaires, tels que, les confitures, chocolats, miel artificiel, sirops à haut pouvoir sucrant ...etc. (Collins et *al.*, 1993). Il peut être fabriqué à partir du saccharose, comme précurseur significatif et ceci, soit par voie chimique ou enzymatique. Le procédé classique de production comprend l'hydrolyse acide du saccharose, ayant un faible rendement de conversion, une consommation importante en énergie et donc un coût élevé de production (Kumar et *al.*, 2008).

Tandis que sa production, par la seconde voie en utilisant des enzymes comme catalyseurs d'hydrolyse est privilégiée (moins d'inconvénients inhérents) (Kotzelski et Staude, 1996 ; Danisman et *al.*, 2004). Cette dernière (hydrolyse enzymatique) utilise l'invertase sous sa forme libre ou immobilisée. L'invertase ou β -D-fructofuranosidase (E.C.3.2.1.26) est une glycoprotéine très efficace à la conversion du saccharose en un mélange équimolaire de glucose et de fructose (Marquez et *al.*, 2008) ;

L'hydrolyse catalysé par l'invertase produit un sirop de haute qualité avec une faible concentration en 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) et sans développement de la couleur contrairement à l'hydrolyse acide (Chen et *al.*, 2000 ; Cao, 2005).

L'objectif de notre étude est l'utilisation de l'invertase de la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, en système batch pour produire du sucre inverti (>96 %) à partir d'un sirop décoloré, déminéralisé et hydrolysé chimiquement (80 – 85 %) par une résine échangeuse d'ions. Nous avons couplé la méthode d'hydrolyse enzymatique à l'hydrolyse chimique afin d'obtenir un produit de haute qualité, avec une faible concentration en HMF et sans développement de la couleur initiale.

Notre étude a été effectuée au sein du laboratoire de l'unité du sucre liquide du complexe agro-alimentaire, Cevital, de Bejaia et au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Une synthèse bibliographique sert de support de compréhension, elle comporte des généralités sur la canne à sucre et le saccharose ainsi que la technologie sucrière et les sirops de saccharose et du sucre inversé.

Une partie méthodologie, qui illustre les différentes techniques et méthodes utilisées durant notre étude.

La partie résultats et discussions, dans laquelle nous avons interprété et discuter les différents résultats que nous avons obtenu.

Et en fin, nous avons conclu le travail par une conclusion générale et perspectives.

Revue
Bibliographique

I. Généralités sur la canne à sucre et le saccharose

I.1. Canne à sucre

I.1.1. Définition

La canne à sucre est une plante herbacée, de la famille des graminées (CEDUS, 2002). Son nom botanique est *Saccharum officinarum*. La teneur en sucre dans ses tiges varie entre 11 et 18% selon le climat, le terrain et son stade végétatif (Jeantet et al., 2006).

Les tiges peuvent atteindre une hauteur de 4 m et entre 1,5 et 6 cm de diamètre (Arzate, 2005). La reproduction sexuée n'étant pas possible, la canne à sucre repousse chaque année, soit à partir du rhizome laissé en terre lors de la récolte soit par bouturage (AFISUC, 2002).

La figure 01 montre la représentation schématique de la canne à sucre.

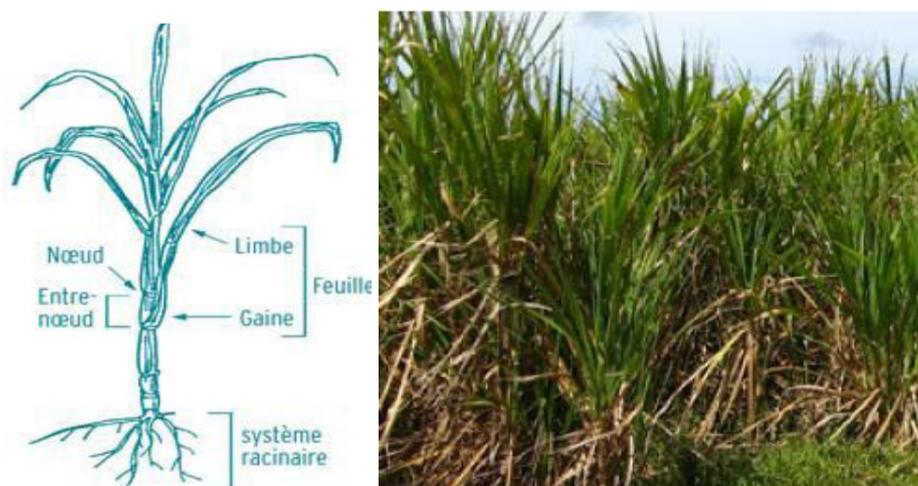


Figure 01 : Représentation schématique de la canne à sucre (Baron et al., 1994).

I.1.2. Production mondiale et historique

Plusieurs millénaires avant J.C, la canne à sucre apparaît déjà à l'état de roseau sauvage en Inde (Bonie, 2004), le mot sucre a d'ailleurs une origine indienne ; (sarkara) qui signifie (grain) (Vierling, 1999).

Le miel était la seule source de saveur sucrée que l'homme connaissait avant que les expéditions de Darius découvre en Inde la canne à sucre et qu'il ramène en Perse, et au VII^{ème} siècle avant J.C, les Arabes découvrent ce roseau et l'implantent dans les pays conquis : la

Syrie, la Palestine, l’Egypte, l’Afrique du nord, les Iles Baléares et même l’Espagne (Corinne, 1989).

Le premier moulin de sucre en Amérique du Nord vit le jour en 1535. De l’autre côté de la planète, la production du sucre commença en 1747 à l’île Maurice, dans l’océan Indien (Alfa, 2005). L’union européenne est actuellement le principal producteur de sucre (Mathlouthi, 1995), et 74% de la production mondiale du sucre est issue de la canne à sucre (Arzate, 2005).

La figure 02 illustre la consommation du sucre dans différentes parties du monde.

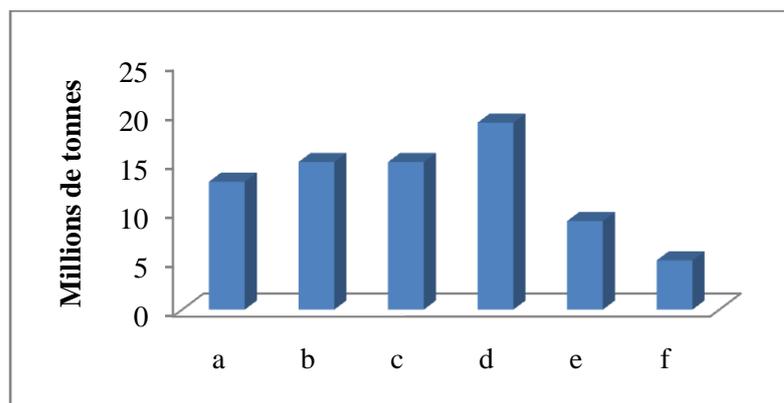


Figure 02 : Consommation du sucre dans différentes parties du monde (moyenne des ventes de 1988 à 1991). (a) Amérique du Nord, (b) Amérique Latine, (c) Europe de l’Ouest, (d) Europe de l’Est, (e) Afrique, (f) Moyen-Orient (Vlitos, 1995).

I.1.3. Composition chimique de la canne à sucre

Les principaux constituants de la canne à sucre sont illustrés dans le tableau I.

Tableau I : Composition moyenne de la canne à sucre (Chi Chou et Chen, 1993).

| Composants | Teneur en (%) (g/g) |
|------------------|---------------------|
| Eau | 70 |
| Fibres ligneuses | 14 |
| Saccharose | 14 |
| Impuretés | 2 |
| Total | 100 |

I.2. Saccharose

Le saccharose existe presque dans toutes les plantes contenant de la chlorophylle, la fabrication ne fait appel qu'à des procédés d'extraction et de purification très simple, sans aucune utilisation d'additifs ni de produit de synthèse (Multon, 1992).

I.2.1. Définition

Le saccharose est le sucre de table classique, il est produit de la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), ou bien de la betterave sucrière (*Beta vulgaris*) (Mathlouthi, 1995).

Le saccharose est un disaccharide de formule brute $C_{12}H_{22}O_{11}$, composé d'une molécule de glucose et une molécule de fructose, liées entre elles par une liaison glucosidique (Mathlouthi, 1995).

C'est un sucre non réducteur de masse molaire 342,30 g/mol. Il se présente sous forme cristalline avec une densité de 1588 kg/m³ et un point de fusion qui varie entre 182 et 192°C (Decloux, 2002).

Son nom officiel selon la nomenclature internationale est : α -D-glucopyranosyl(1→2)- β -D-fructofuranose (β -D-Fruf-(2-1)- α -D-Glcp) (Doucet, 1992).

I.2.2. Propriétés du saccharose

I.2.2.1. Aspect

La morphologie du cristal de saccharose à été décrite en étudiant toutes les faces qui caractérisent son habitus externe (Vaccari et Mantovani, 1995). Le sucre de canne se présente sous forme de poudre cristalline blanche et brillante. Il est inodore et de saveur caractéristique (Doucet, 1992).

I.2.2.2. Solubilité et densité

La solubilité du saccharose dans l'eau est due à sa structure moléculaire qui contient huit (08) groupement hydroxyles (-OH) libre, dont aux moins cinq (05) peuvent favoriser la formation de liaison hydrogène avec les molécules d'eau (Mathlouthi, 1995).

Elle croit avec la température, mais aussi elle est influencée par les solvants organiques et inorganique présents dans les solutions industrielles (Vaccari et Mantovani,

1995). En effet elle est d'une importance fondamentale dans la détermination de la structure du saccharose (Bubnik et Kadlec, 1995).

La figure suivante montre la solubilité du saccharose en fonction de la température.

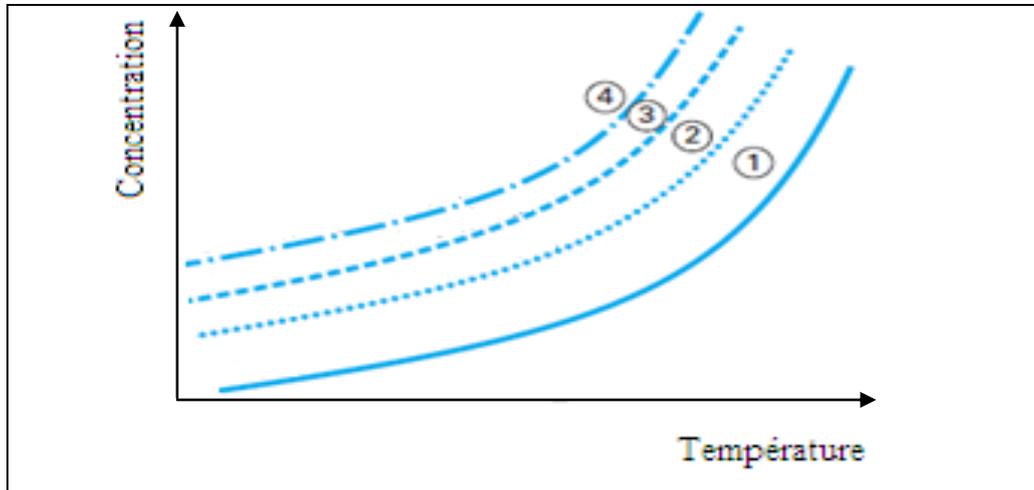


Figure 03 : Solubilité du saccharose en fonction de la température.

Zone (1) : solubilité, zone (2) : nucléation secondaire surfacique, zone (3) : nucléation primaire hétérogène et zone (4) : nucléation primaire homogène (Puel et al, 2008).

La mesure de la densité du cristal de saccharose à 15°C par Plato dès 1901 a donné la valeur de 1587,9 kg/m³, une valeur valable pour des utilisations pratiques (Reiser et al., 1995).

I.2.2.4. Pouvoir rotatoire et pureté

Le saccharose en solution est une molécule active, elle dévie le plan de la lumière polarisée vers la droite, c'est une substance dextrogyre. Elle se distingue des autres sucres car sa rotation spécifique demeure constante dans le temps (Mathlouthi, 1995).

Le pouvoir rotatoire en degré pour une concentration en g/m³ et pour la longueur d'onde de la raie du sodium égale à 589,4 nm à 20°C $[\alpha] = + 56.5^\circ$ (Raiser et al., 1995).

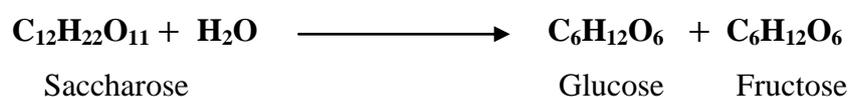
La pureté du saccharose cristallisé s'élève à plus de 99.9%. Il est ainsi un ingrédient de haute pureté qui présente des caractéristiques chimique, physiques et microbiologiques très intéressantes pour l'industrie alimentaire (Clarke, 1995).

I.2.2.6. Point d'ébullition et de congélation

En solution, le saccharose provoque un abaissement de la pression de vapeur, ce qui entraîne une augmentation significative du point d'ébullition et une diminution du point de congélation. Ces propriétés sont d'une importance capitale pour la fabrication des produits sucrés, qui comporte une ébullition et une congélation dans leur procédé (Mathlouthi, 1995).

I. 2.2.7. Inversion

L'hydrolyse du saccharose prend le nom d'inversion, elle aboutit à la transformation du saccharose en un mélange équimoléculaire de glucose et de fructose (Clarke, 1995), suivant la réaction :



L'hydrolyse du saccharose est irréversible, elle peut s'effectuer soit en présence d'un acide, soit sous l'action d'une enzyme (invertase) (CEDUS, 2002).

La solution obtenue prend le nom d'inverti ou sucre inverti, en raison du changement du signe du pouvoir rotatoire qui passe du positif (+) (dextrogyre) vers le négatif (-) (lévogyre) (Clarke, 1995).

Nous détaillerons cette partie d'hydrolyse du saccharose dans la partie III « sirops du saccharose et du sucre inverti ».

I.2.2.8. Propriétés sensorielles et point de fusion

La saveur sucrée des sucres demeure leur caractéristique la plus remarquable (Mathlouthi, 1995). En comparaison au saccharose, le pouvoir sucrant relatif du glucose est moins élevé contrairement à celui du fructose (Clarke, 1995).

Le pouvoir sucrant est défini en unité PS (pouvoir sucrant) qui est égale à 1 pour le saccharose (Kiger, 1967), et 1,6 pour le fructose (Dodson, 1975)

Le pouvoir sucrant dépend de la forme solide ou liquide du saccharose, du degré de chauffage et de la concentration de l'édulcorant dans l'aliment (Clarke, 1995).

Chauffé lentement à sec, le sucre commence à fondre vers 185°C (Asadi, 2007), puis se transforme en caramel avant de brûler vers 190°C, en donnant un résidu de charbon de sucre (Doucet, 1992).

Déjà cité précédemment, la valeur du point de fusion du saccharose varie entre 182 et 192°C, selon la pureté de l'échantillon (Mathlouthi, 1995).

I.2.3. Rôles technologiques du sucre et des sirops de sucre dans les industries agroalimentaires (IAA)

Le saccharose joue un rôle technologique important dans les produits de cuisson, confiseries et autres aliments. Plusieurs IAA l'utilisent, on le trouve entre autres :

a) Dans les produits laitiers :

- Il abaisse la température de congélation, suffisamment pour maintenir une texture de qualité dans les crèmes glacées et les desserts surgelés ;
- Dans le lait concentré sucré, il apporte la saveur sucrée et joue un rôle de conservateur par élévation de la pression osmotique ;
- Il permet la dispersion des matières grasses dans les crèmes glacées, et augmente la viscosité des produits à teneur réduite en matière grasse (Clarke, 1995).

b) Dans les boissons :

- Il apporte le goût sucré ;
- Sa bonne qualité microbiologique, sa pureté et sa turbidité réduite, sont des critères importants pour préserver la saveur et l'aspect des boissons (Clarke, 1995).

c) Dans les pains, gâteaux et biscuits sucrés :

- Il sert de support de fermentation pour les levures ;
- Le saccharose augmente la température de gélatinisation de l'amidon et permet aussi une levée plus prononcée de la pâte à pain ;
- Il contribue à la saveur, couleur, texture et au moelleux des gâteaux en prolongeant leur durée de conservation (Clarke, 1995).

II. Technologie sucrière

II.1. Technologie d'extraction du sucre roux de canne

Le saccharose est devenu synonyme de sucre dans le langage courant. Il est produit par photosynthèse par un nombre de plantes saccharifères, parmi les quelles la canne à sucre (*Saccharum officinarum*, L) dont on l'extrait industriellement (Jeantet et al., 2006).

La figure suivante représente les différentes étapes de l'extraction du sucre roux de canne.

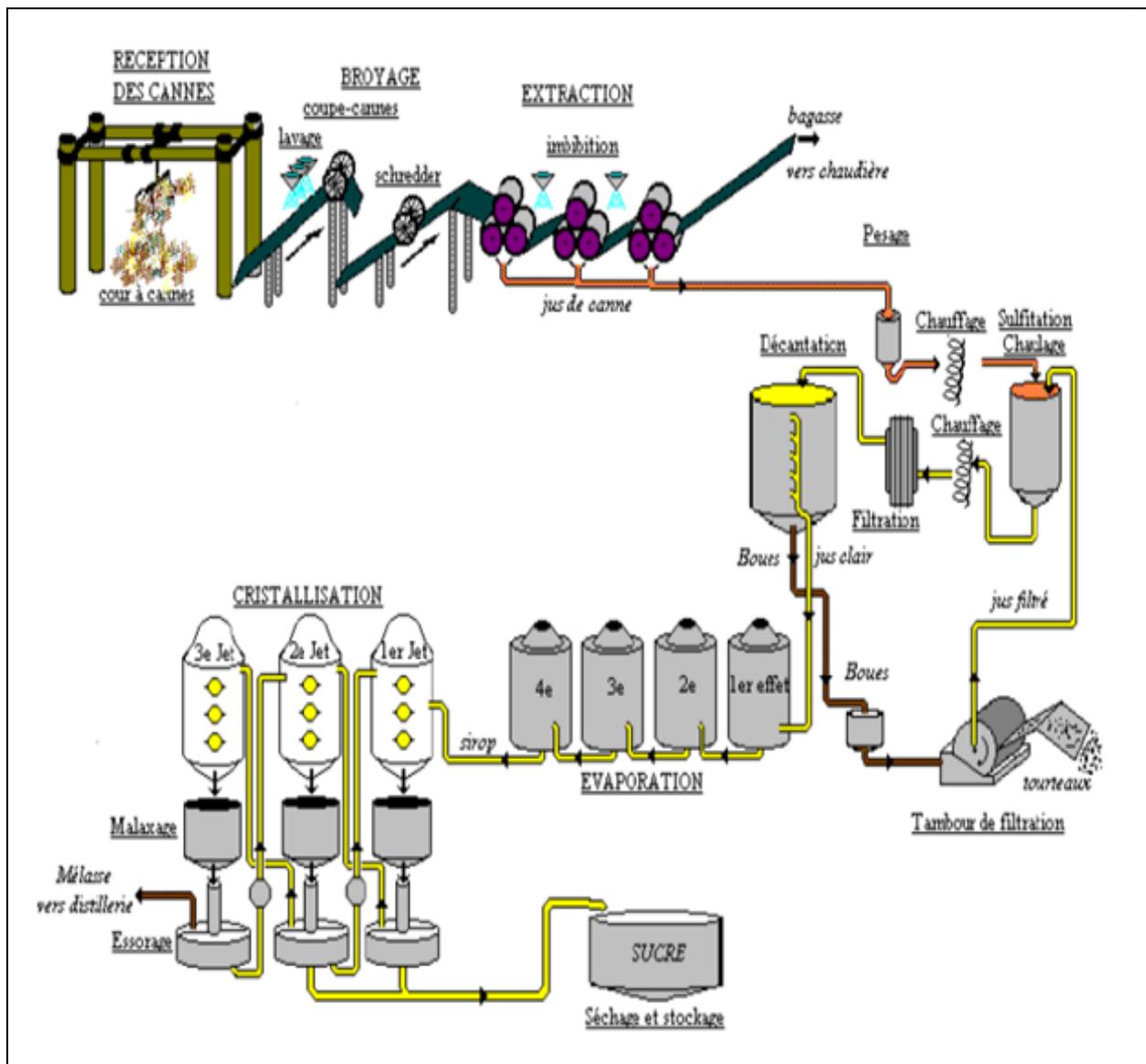


Figure 04 : Extraction du sucre roux de canne (CTCS, 1997).

D'après Hugot (1986), les opérations de base de procédé d'extraction du sucre roux de canne sont :

- a) Extraction (Milling train) ;
- b) Epuration (Heater and clarifier) ;
- c) Evaporation (évaporator station) ;
- d) Cristallisation (crystallization) ;
- e) Malaxage, turbinage (centrifugals) ;
- f) Séchage (sugar diers) ;
- g) Emballage, entreposage (bulk sugar hanging).

II.2. Technologie de raffinage du sucre roux de canne

II.2.1. Affinage et fonte

II.2.1.1. Affinage

Au cours de cette opération, le sucre roux est empâté dans un sirop légèrement sous saturé pour favoriser la dissolution de la partie périphérique du cristal plus concentrée en non sucres (Decloux, 2002). La masse cuite ainsi produite est essorée avec clairçage. Le sucre obtenu est un sucre d'affinage, ayant un Brix variant entre 80 à 85% (Mathlouthi et Rogé, 2004).

II.2.1.2. Refonte

Le sucre affiné passe dans des turbines d'affinage pour être débarrassé des impuretés et matières colorantes sur la surface des cristaux, puis fondu dans un fondoir avec de l'eau sucré et chaude à 80°C qui abouti à la l'obtention d'un sirop de fonte (Asadi, 2007).

II.2.2. Epuration et carbonatation

Cette étape a pour but d'éliminer au maximum les non-sucres solubles et insolubles dans le sirop tout en évitant la dégradation du saccharose (Decloux et *al.*, 1999).

Le chaulage consiste à une alcalinisation du milieu afin de précipiter certaines impuretés (Jeantet *et al.*, 2006). La chaux, sous l'action du gaz carbonique se transforme en carbonate de calcium (Decloux et *al.*, 1999), à la surface de ces molécules s'adsorbent certains non-sucres qui se trouvaient en solution (Decloux, 2001).

Le lait de chaux est constitué d'un mélange de chaux et du petit jus provenant de la filtration. La chaux est insoluble dans l'eau, mais soluble en milieu sucré en formant des saccharates (Burzawa, 1999).

Le sirop chaulé est envoyé vers la première chaudière pour subir la première carbonatation qui permet de précipiter la chaux en excès (Decloux, 2001). Quant au gaz carbonique, il est pompé à un débit régulé par une vanne jusqu'à une valeur du pH égale à 11 puis le produit est mélangé et, est envoyé dans la deuxième chaudière pour subir la deuxième carbonatation (Hugot, 1986).

Le rôle de la deuxième carbonatation est d'enlever le maximum de calcium encore en solution dans les jus clairs filtrés de la première carbonatation (Jeantet et *al.*, 2006). Cette carbonatation se fait sur les jus réchauffés à 95°C et le point de fin de carbonatation sera l'alcalinité correspondant au minimum de sels de chaux, le point de fin se situe en général entre pH 9.1 et 9.3 (Burzawa, 1999).

Les impuretés précipitées par la chaux ou adsorbées sur les carbonates de calcium sont retenues par filtration avec des filtres rotatifs sous vide (Jeantet et *al.*, 2006).

II.2.3. Filtration

Le but de la filtration est d'éliminer le carbonate de calcium en suspension. Le sirop passe à travers des filtres à bougie, le liquide sort tandis que les particules sont arrêtées (AFISUC, 2002).

II.2.4. Décoloration

Le premier objectif du raffinage du sucre est l'élimination de la couleur, et ce afin de produire un sucre de bonne couleur et aboutir à une bonne homogénéité cristallographique (Theoleyre et *al.*, 1999).

II.2.4.1. Principaux colorants présents dans le sucre

Les colorants du sucre sont des macromolécules ayant un comportement d'acides faibles, ils se présentent sous forme de longues chaînes carbonées hydrophobes et possèdent une extrémité hydrophile au niveau de leur fonction acide faible (Theoleyre et *al.*, 1999).

Le tableau II représente les principaux colorants présents en sucrerie de canne.

Tableau II : Principaux colorants présents en sucrerie de canne (Decloux *et al.*, 1999).

| Origine | Colorants | Formation | Caractéristiques |
|--|------------|---|---|
| Pigments et précurseurs de colorants de la canne | Flavones | -- | Composés phénoliques pâles en milieu acide, jaune-verts en milieu |
| | Mélanines | Brunissement enzymatique des composés polyphénoliques présents dans la canne | basique Polymères colorés bruns ou noirs |
| Colorants de fabrication | Caramels | Dégradation thermique du saccharose | -- |
| | Mélanoïdes | Produits de la réaction de Maillard : Entre un sucre réducteur et un acide aminé | Composés azotés d'une couleur très foncée. |
| | PDAH | 1. Inversion du saccharose en milieu acide 2. Dégradation des hexoses en acides et produits colorés en milieu basique. | Molécules difficilement distingués des précédents : acides, couleur brune |

II.2.4.2. Procédé de la décoloration

Le procédé utilisé pour décolorer les sirops de sucre de canne est celui des résines échangeuses d'ions.

Les deux types de résines utilisées pour la décoloration des sirops de sucre diffèrent par leur squelette : copolymère de styrène ou d'acide acrylique (qui a un comportement très hydrophobe) et divinylbenzène (avec un comportement moins hydrophobe), sur lesquelles sont greffées des fonctions amines qui constituent un pôle hydrophobe. Ces résines sont utilisées pour décolorer des refontes de sucre roux après affinage, présentant une couleur d'environ 1000 Unité ICUMSA (Theoleyre *et al.*, 1999).

Les deux mécanismes intervenants dans la décoloration sont :

1. Interaction hydrophobe entre la chaîne carbonée du polymère et du colorant, il s'agit de liaison faible.
2. L'échange d'ion ou échange entre Cl^- fixé sur la résine et les acides organiques (colorants) présents dans la solution à traiter (Theoleyre *et al.*, 1999).

Le sirop sortant des colonnes de décoloration est concentré, cristallisé, puis séché et on obtient ainsi du sucre cristallisé. Ce même sirop décoloré provenant de la raffinerie, peut être acheminé vers la siroperie et qui est utilisé pour la fabrication du sucre inverti soit par hydrolyse chimique ou enzymatique.

III. Sirops du saccharose et du sucre inverti

III.1. Sucre liquide inverti

L'hydrolyse du saccharose permet sa conversion en sucres invertis, c'est-à-dire glucose et fructose, qui sont largement utilisés dans les industries alimentaires (Hoydonck et *al.*, 2004 ; Corma et *al.*, 2007), où le fructose est préférable au saccharose car il est doux et il ne se cristallise pas facilement (Bagal et *al.*, 2007 ; Kotwal et Shankar, 2009).

Etant plus soluble que le saccharose, la teneur en inverti d'un sirop influence ses propriétés de cristallisation (ACER, 1998), sa solubilité est en fonction de la température et du pourcentage d'inversion (Hyonak et bollenback, 1966).

Le sucre inverti est Lévoogyre et réducteur, son pouvoir rotatoire est : $[\alpha] = -22^\circ$ (Doucet, 1992). La figure 06 représente le pouvoir rotatoire des différents sucres.

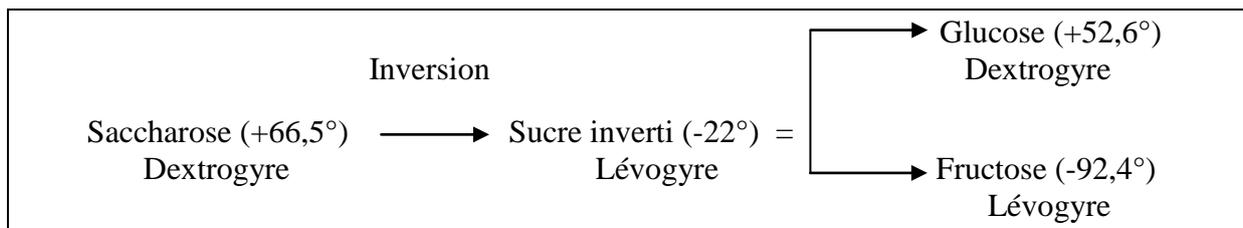


Figure 05 : Le pouvoir rotatoire des différents sucres (Athel et *al.*, 2004).

Le pH du sucre liquide inverti est de l'ordre de 4 – 5,5, au-delà du pH 6, un brunissement de la couleur est noté au cours des traitements thermiques (Kong, 1947 ; Morosz et *al.*, 1973).

III.2. Technologie de fabrication du sucre liquide

L'unité sucre liquide utilise comme matière première le sirop prédécoloré qui provient de l'unité de raffinage du sucre roux, ce dernier subit certaines opérations de transformation.

Dans notre cas, nous discuterons uniquement des opérations utilisées au niveau de la siroperie de Cevital de Bejaia (lieu de réalisation de notre étude).

Le diagramme suivant représente les différentes opérations de fabrication du sucre liquide inverti.

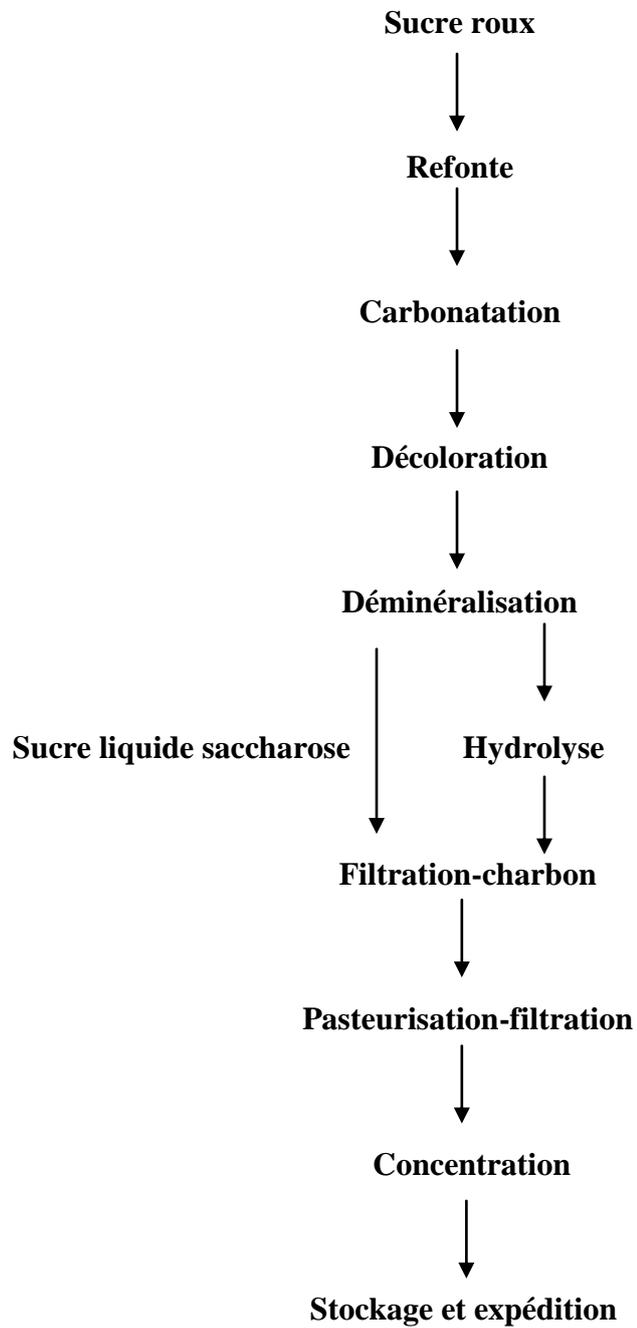


Figure 06 : Diagramme général de fabrication du sucre liquide inversé (Manuel Opérateur interne de Cevital, 2002).

III.2.1. Déminéralisation

L'objectif principal de la déminéralisation est d'obtenir du sucre liquide de haute qualité tout en éliminant les minéraux et d'éventuelles matières colorantes (Theoleyre et *al.*, 1999). Ceci est réalisé par le biais de résines échangeuses d'ions (faiblement cationiques et fortement anioniques) (Bali, 1992).

III.2.2. Hydrolyse

L'objectif de cette opération est la production de sucre liquide inverti à partir de sirop décoloré et déminéralisé. Deux procédés d'hydrolyse se distinguent : Hydrolyse chimique et enzymatique

III.2.2.1. Hydrolyse acide par les résines échangeuses d'ions

Le procédé classique de fabrication du sucre inverti comprend l'hydrolyse acide du saccharose à 80°C qui donne un faible rendement de conversion (< 95%), consommation d'énergie élevée et donc un coût élevé de production (Kumar et *al.*, 2008).

L'hydrolyse acide a été identifiée comme méthode chimique pour l'inversion du saccharose en glucose et fructose. L'acidité produite peut être causée par une action directe d'acide (hydrolyse homogène), ou d'un H⁺ libéré par les résines cationiques (hydrolyse hétérogène). Toutefois, les sirops obtenus par ces deux méthodes chimiques sont très colorés en raison des conditions extrêmes de la réaction (pH et température) (Arruda et Vitole, 1999). D'autre part, l'acidité produite par la résine cationique peut entraîner une perte de sucre à travers la dégradation, conduisant à la formation des HMF et à la coloration du sirop (Rodriguez et *al.*, 1995).

Le pourcentage d'inversion est obtenu en variant la température ou la vitesse de percolation (addition des sirops de saccharose, hydrolysé et non hydrolysé, à des débits différents). L'inversion décroît avec le degré d'épuisement de la résine. A partir d'un certain niveau d'épuisement, la résine doit être régénérée par un acide fort (solution d'acides chlorhydrique ou sulfurique dilué) (Guerin et *al.*, 1978).

La figure 07ci-dessous représente l'hydrolyse acide du saccharose.

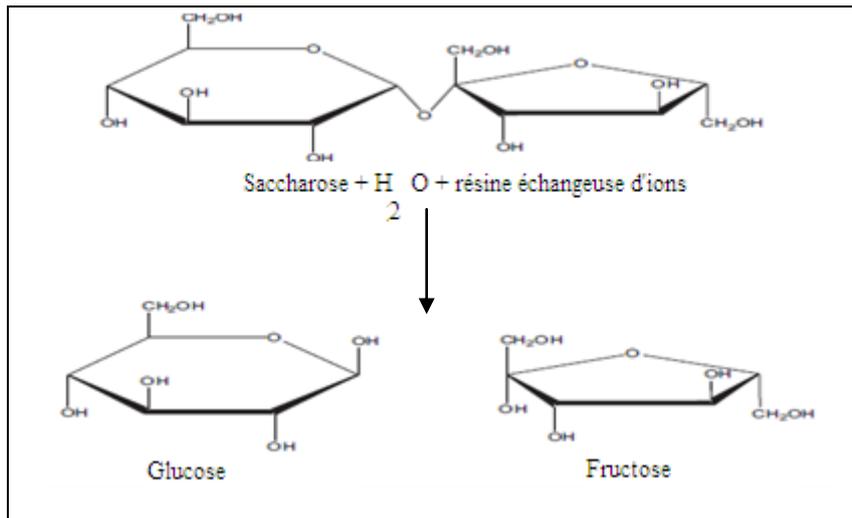


Figure 07 : Hydrolyse acide du saccharose (Pito et al., 2009).

III.2.2.2. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique du saccharose est réalisée par le biais d'une enzyme, l'invertase ou β -fructofuranosidase, ayant une efficacité de conversion de 100%. Le produit obtenu par l'invertase a l'avantage d'être incolore comparé à celui obtenu par hydrolyse acide (Kotzelski et Stode, 1996 ; Danisman et al., 2004).

Les enzymes sont les principaux catalyseurs industriels utilisés pour l'hydrolyse du saccharose, mais ils présentent des inconvénients différents, tels que la production de déchets, la faible stabilité thermique, le coût élevé et les problèmes de séparation et de récupération de l'enzyme à partir du produit fini (Okuhara, 2002).

a) Définition de l'invertase

Les enzymes d'intérêt commercial proviennent des souches de *Saccharomyces sp*, une levure qui produit une invertase de type β -fructofuranosidase (Kulp, 1975). L'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Tanaka et al., 1984) ou β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26), est une enzyme qui catalyse le clivage de la liaison 1-4 glycosidique (extrémité non réductrice) du saccharose (Bulchholz et al., 2005 ; Milovanovic et al., 2007) et libère un mélange équimolaire de D-glucose et D-fructose connu sous le nom de sucre inverti (Belcarz et al., 2002).

La figure 08 ci après montre le clivage du saccharose par l'invertase.

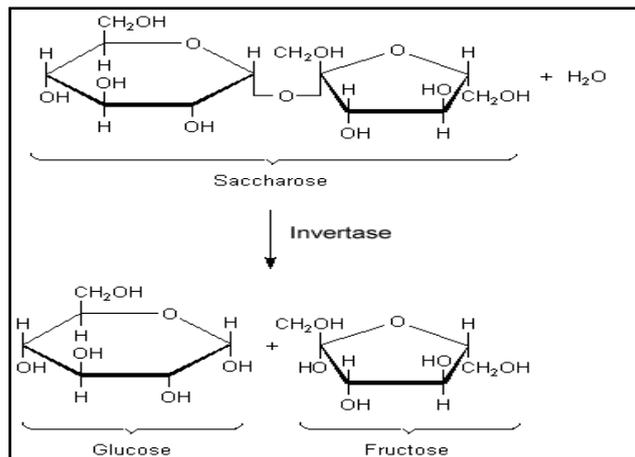


Figure 08 : Clivage du saccharose par l'invertase (Dides et Fabre, 2007).

Le saccharose est le principal substrat de cette enzyme (Sturm, 1999). Son activité hydrolytique augmente avec l'augmentation de la concentration du saccharose dans le milieu réactionnel (Chen et Liu, 1996).

L'hydrolyse du saccharose par l'invertase libre ou immobilisée produit un sirop de haute qualité avec de faibles concentrations en 5-hydroxyméthyl-furfural (HMF) (Chen et *al.*, 2000 ; Cao, 2005) à l'inverse du procédé chimique.

L'invertase de levure boulangère a un poids moléculaire de 270 kDa et un point isoélectrique entre 3,4 et 4,4 et ne nécessite pas de cofacteur pour son activité (David et *al.*, 2006).

La figure 09 représente la structure tridimensionnelle de l'invertase obtenue dans la banque de données protéiques PDB (*Protein Data Bank*).

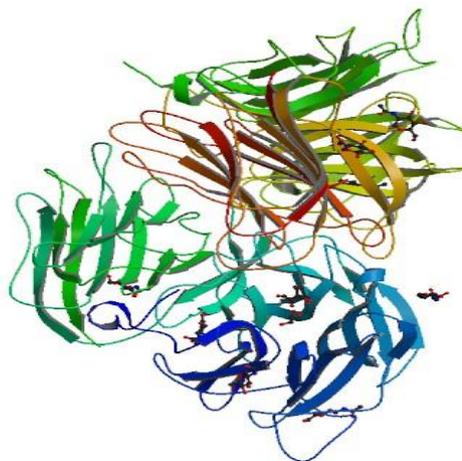


Figure 09: Représentation structurale de l'invertase ou β -Fructofuranosidase (code PDB, 3kf5, tiré le 17/04/2012).

b) Les micro-organismes producteurs

L'invertase est ubiquitaire, elle se retrouve chez les bactéries, les champignons, les insectes, les mammifères et les légumes (tomate). Cependant les principales sources industrielles sont les levures (Isik et *al.*, 2003 ; Vicente et Pereparac, 2000).

Le tableau suivant illustre les différentes sources industrielles de l'invertase.

Tableau III : Principales sources industrielles de l'invertase.

| Source | PM (kDa) | pH | Température (° C) | Références |
|---------------------------------------|-------------|---------|----------------------|---|
| <i>Aspergillus aculeatus</i> | 134 | 5.0-7.0 | 60 | (Ghazi et <i>al.</i> , 2007) |
| <i>Aspergillus niger</i> (SucB) | NR | 5.0 | 40 | (Goosen et <i>al.</i> , 2007) |
| <i>Aspergillus japonicus</i> ATCC 206 | 340 | 5.0 | 50 | (Hidaka et <i>al.</i> , 1988 ; Hirayama et <i>al.</i> , 1989) |
| <i>Candida utilis</i> | 300 | 4.4 | 70 | (Belcarz et <i>al.</i> , 2002) |
| <i>Pichia anomala</i> | 254 | 4.0-6.0 | 38 | (Rodriguez et <i>al.</i> , 1995) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 270 | 3.5-5.5 | 50 | (Farine et <i>al.</i> , 2001 ; Gascon et <i>al.</i> , 1968 ; Moreno et <i>al.</i> , 1990) |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | 85,175 | 5.5 | 45-55 | (Alvaro et <i>al.</i> , 2007) |
| <i>Uromyces fabae</i> | NR | 4.6 | 40 | (Voegele et <i>al.</i> , 2006) |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | >200 | 5.0-6.5 | 65-70 | (Dolores et <i>al.</i> , 2008) |

NR : non rapporté.

c) Autres organismes producteurs de l'invertase

L'invertase peut être obtenue à la fois des organismes eucaryotes et procaryotes (Warchol et *al.*, 2002).

Le tableau IV ci après représente les différentes autres sources de l'invertase.

Tableau IV : Autres sources de l'invertase.

| Source | Références |
|--|----------------------------|
| <i>Paecylomyces variotti</i> (Champignon filamenteux) | (Belcarz et al., 2002) |
| <i>Rodotorela glutinis</i> (Champignon filamenteux) | (Rubio et al., 2002) |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> (Bactérie) | (Warchol et al., 2002) |
| <i>Zea Bambusa edulis</i> (Mais) | (Madhusudhan et al., 2011) |
| <i>Nicotiana tobaccum</i> (cellules végétales) | (Madhusudhan et al., 2011) |
| <i>Cupressus funeb</i> (cellules végétales) | (Madhusudhan et al., 2011) |
| Saccharase ou α -glucosidase (de l'intestin humain) | (Mathlouthi, 1995) |

d) Mécanisme d'action de l'invertase

La β -Fructofuranosidase de *S. cerevisiae* est classée dans la famille 3.2 des glycosyl hydrolases (GH) en se basant sur leur séquence d'acides aminés. Le mécanisme catalytique proposé pour l'invertase de *S. cerevisiae* implique un aspartate emprisonnée à l'extrémité N-terminale (Asp-D23) qui agit comme un nucléophile, et un glutamate (Glu-E204) qui agit comme catalyseur Acide/Base (Reddy et Maley, 1996).

e) Invertase libre et immobilisée

L'immobilisation des enzymes sur des supports insolubles a été un sujet de recherche actif, car elle est essentielle pour l'application des enzymes aux procédés industriels (Arica et al., 2000).

L'utilisation d'enzymes immobilisées peut avoir certains avantages par rapport à l'enzyme libre (Gordon, 1997 ; Peterson et Kennedy, 1997 ; Uhlich et al., 1999), tel que :

- Stabilité de l'enzyme ;
- L'utilisation répétée de l'enzyme et réduction des coûts ;
- Facilite la séparation de l'enzyme à partir du produit.

Les enzymes peuvent être immobilisées soit dans l'Alginate (Fukushima et al., 1978), soit dans des capsules d'alcool de polyvinyle (Ding et Vorlop, 1995), ou dans des biais de polystyrène (Filippuson et Hornby, 1970). L'immobilisation dans des résines échangeuses d'ions est effectuée par le biais d'une procédure simple, il s'agit d'une interaction ionique et

électronique entre les ions de la protéine et les ions de résine. L'inconvénient est la possibilité que l'enzyme se détache du support en raison de changement du pH et des forces ioniques du milieu (Collins *et al.*, 1993 ; Tomotoni et Vitolo, 2006)

III.2.3. Charbon-filtration

L'objectif de cette opération est de désodoriser le sirop et d'éliminer les dernières traces des colorants. Le charbon actif est utilisé vu sa capacité à capter les particules volatiles et des colorants restant dans le sirop. Le charbon actif est filtré à travers des filtres à plaque (de type Niagara), sur lesquels est formée au préalable une précouche de terre blanche, puis le sirop est passé à travers des filtres à panier et à cartouche afin de filtrer les débris qui sont passés et de retenir d'éventuelle débris.

III.2.4. Pasteurisation-Filtration stérile

Selon le *codex Alimentarius*, la température de la pasteurisation varie entre 62 et 88°C, si cette température est dépassée on attaque l'intégrité chimique de certains éléments du produit. La pasteurisation réduit de manière significative le nombre de microorganisme dans le produit, mais certaines formes, comme les spores, résistent (Codex STAN 212, 1999).

III.2.5. Concentration

L'évaporation sous vide permet d'atteindre le Brix adéquat sans risque d'apparition de colorants ou de caramélisation. L'évaporation se réalise à 60°C (Jeantet *et al.*, 2006).

III.3. Propriétés et caractéristiques du sucre liquide inversi

III.3.1. La viscosité

Cette propriété est dépendante du poids moléculaire, en conséquence le sucre inversi (180 g/mol) est nettement plus fluide que le sucre liquide (342.30 g/mol) (Bussiere *et al.*, 1990).

III.3.2. Affinité pour l'eau-activité de l'eau (aw)

L'activité de l'eau d'un produit dépend particulièrement de l'eau liée, qui est fonction de la concentration des différents ingrédients en solution, ainsi que de leur poids moléculaire. Le sucre inversi abaisse plus fortement l'aw, autrement dit, il augmente la capacité de rétention d'eau (Zimmermann, 1992).

III.3.3. Stabilité microbiologique

L'activité de l'eau conditionne l'aptitude des micro-organismes à se développer, en conséquence le sucre inverti, en abaissant l'*a_w*, réduit les risques de prolifération microbienne (Bussiere *et al.*, 1990).

III.3.4. Pouvoir sucrant

La saveur sucrée, de nature purement sensorielle, ne peut être estimée que par dégustation (Zimmermann, 1992). L'inversion a pour intérêt de faire apparaître le fructose qui présente le pouvoir sucrant le plus élevé (Bussiere *et al.*, 1990)

Le pouvoir sucrant du sucre inverti, exprimé en unité PS (pouvoir sucrant), est égale à 1,2 (Jackson, 1924).

III.4. Rôles technologiques du sucre liquide inverti

- Production de sucre non cristallisable utilisé pour la production des chocolats (Wiseman, 1978) ;
- Production de miel artificiel (Bussiere *et al.*, 1990) ;
- Production des confitures (Cheetham et Wiseman, 1995) ;
- Industries des boissons (jus, boissons gazeuses) (Kurup *et al.*, 2005) ;
- Production de crèmes glacées (Corma *et al.*, 2007).
- Fabrication des gâteaux et pâtes de fruits (Hoydonck *et al.*, 2004).

*Matériel
et Méthodes*

IV. Matériel et méthodes

L'objectif de notre étude est l'essai de production de sucre inverti $\geq 96\%$ à partir d'un sucre inverti hydrolysé chimiquement à 80 - 85% en utilisant une enzyme spécifique l'invertase produite par *Saccharomyces cerevisiae*, et de déterminer ainsi les caractéristiques physico-chimiques du produit fini d'hydrolyse.

L'échantillonnage a été réalisé au sein du complexe agroalimentaire Cevital de Bejaia, unité de production du sucre liquide. Le prélèvement a été effectué au niveau de la jonction de sortie de la colonne d'hydrolyse (Figure 11).

Enfin, pour réaliser notre étude, les échantillons sont acheminés au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université d'Abderrahmane Mira de Bejaia pour déterminer les conditions optimales de l'enzyme ainsi que le pourcentage d'hydro

IV.1. Echantillonnage et Caractérisation de la matière première (substrat)

Afin d'avoir un échantillon représentatif et ayant les caractéristiques désirés en fonction de l'objectif recherché, nous avons effectué différents prélèvements, à différents temps. Pour cela nous avons récupéré environ cinq litres du sucre inverti et ceci au niveau de la jonction en sorti de la colonne d'hydrolyse anionique (Figure 10).

Les prélèvements des échantillons ont été effectués au niveau de la cuite V220 (sortie évaporateur), et au niveau de l'unité de production du sucre liquide.

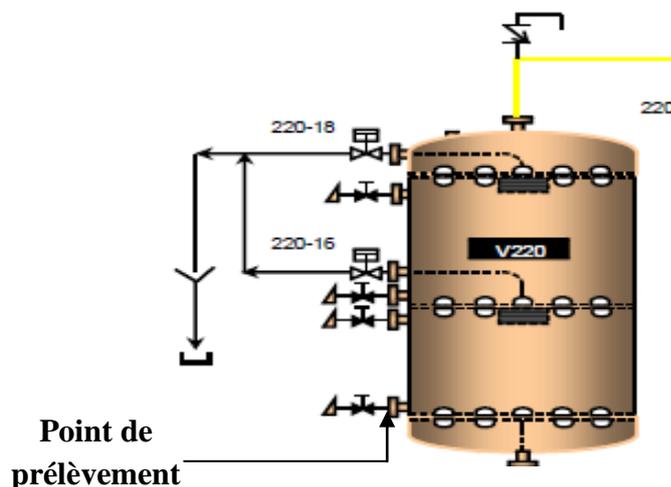


Figure 10 : La cuite V220 (Manuel Opérateur interne de Cevital, 2002).

Paramètres physicochimiques

IV.1.1. Mesure du pH (ICUMSA, 2007)

1. Object

Cette méthode est utilisée pour déterminer l'acidité du sucre liquide inversi (SLI).

2. Principe

Le principe de cette méthode est la mesure potentiométrique du pH du sucre liquide inversi à 50% de Brix et à 20°C.

Les électrodes sont étalonnées au moyen de solution tampons, rincées à l'eau distillé et plongées dans la solution sucrée, la lecture intervient après une attente de 5 min lorsqu'on peut estimer que le potentiel d'équilibre entre les électrodes est atteint.

3. Mode opératoire

- Préparer un sirop de sucre inversi dilué (SID) à un Brix de 50% (diluteur automatique de type DP 64) à partir de l'échantillon à analyser avec de l'eau osmosée ;
- Laisser agiter jusqu'à homogénéisation ;
- Immerger les électrodes dans la solution à analyser, agiter soigneusement et ne lire la mesure qu'au moins 5 min après.

4. Expression des résultats

Noter la valeur du pH de la solution après stabilisation à 20 °C ou à une température proche ($\pm 2^\circ\text{C}$).

IV.1.2. Mesure du Brix (ICUMSA, 2007).

1. Objet

Cette méthode est utilisée pour mesurer la teneur en matière sèche des produits de sucrerie.

2. Mode opératoire

- Diluer le produit à analyser au 1/5, en utilisant de l'eau distillée ;
- Procéder à l'homogénéisation de la solution à l'aide d'un agitateur ;
- Verser la solution dans le réfractomètre (REM 340) après avoir vérifié le zéro de l'appareil avec de l'eau distillée.

3. Expression des résultats

Lire la valeur de Brix de la solution directement sur le réfractomètre, puis le calculer en multipliant la valeur par le facteur de dilution.

$$\text{Brix} = N \times 5$$

Dont : N est la valeur affichée sur le réfractomètre.

IV.1.3. Mesure de la polarisation (ICUMSA, 2007)

1. Objet

Cette méthode est utilisée pour déterminer la teneur en saccharose.

2. Principe

Toutes les molécules optiquement actives (possèdent au moins un carbone asymétrique) ont le pouvoir de dévier le plan de la lumière polarisée, cette déviation est proportionnelle à la teneur en substance à doser.

3. Mode opératoire

- Préparer une dilution de 1/5 à partir de l'échantillon à analyser, en utilisant de l'eau distillée ;
- Procéder à l'homogénéisation de la solution à l'aide d'un agitateur ;
- Introduire la solution dans le polarimètre (POLASER-S/R.E.I.).

4. Expression des résultats

Lire la valeur de polarisation affichée sur le polarimètre.

IV.1.4. Mesure du taux d'inversion par HPLC (ICUMSA, 2007)

1. Objet

Cette méthode est utilisée pour déterminer l'ensemble des sucres présents dans une solution sucrée (sucre liquide).

2. Principe

Le principe de cette méthode se base sur le dosage par chromatographie en phase liquide haute performance du glucose, fructose et saccharose dans le sucre inverti dilué dans l'eau distillée à 1/1000.

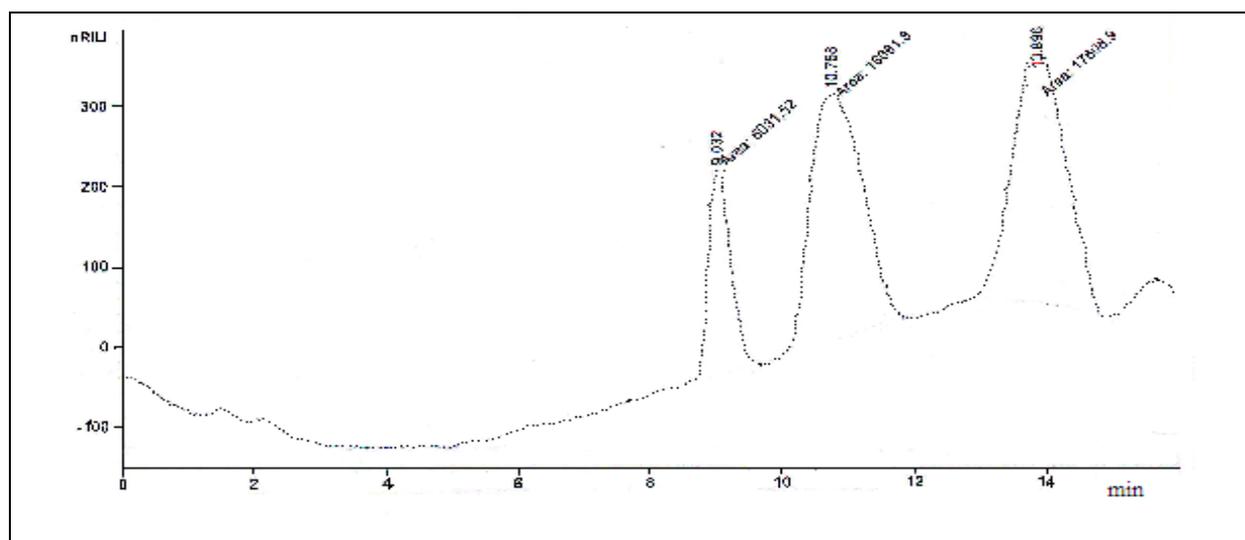
3. Mode opératoire

- Peser 0,1 g de sucre inverti ;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge d'une fiole de 100 ml ;
- Agiter jusqu'à homogénéisation ;
- Filtrer environ 1,5 ml de la solution à travers un filtre de 0,2 µm dans un tube de 2 ml ;
- Lancer l'analyse sur HPLC (ICUMSA, 2007).

4. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) par calcul de l'aire de chaque pic du chromatogramme. Les différentes molécules du glucose, fructose et saccharose sont identifiés par leurs temps de rétention.

La figure 11 montre le profil chromatographique de notre échantillon.



| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [nRIU*s] | Area % | Name |
|--------|---------------|------|-------------|---------------|---------|-----------|
| 1 | 9.032 | MM | 0.3908 | 6031.51709 | 14.9657 | sacharose |
| 2 | 10.768 | MM | 0.8978 | 1.66618e4 | 41.3422 | glucose |
| 3 | 13.896 | MM | 0.9144 | 1.76089e4 | 43.6921 | fructose |

Figure 11 : Profil chromatographique de la matière première étudiée (SID).

IV.1.5. Mesure de la couleur (ICUMSA GS 2/3-10, 2007)

1. Objet

Cette méthode est utilisée pour déterminer la couleur du sirop de sucre en solution.

2. Principe

Le sirop de sucre est dissout dans l'eau distillée à raison de 50° Bx. La solution est filtrée à travers un filtre de 0,45µm et l'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 420 nm.

3. Mode opératoire

- Préparer un sirop de Brix 50% à partir de l'échantillon à analyser ;
- Laisser agiter jusqu'à homogénéisation ;
- Filtrer à travers un filtre de 0,45 µm de porosité ;
- Se débarrasser de la première fraction de la solution (10 ml environ) ;
- Récupérer le filtrat dans un bêcher ;
- Lire l'absorbance de la solution à 420 nm au spectrophotomètre (HERIOS gamma) dans une cuve visible de 5 cm de trajet optique après avoir réalisé le témoin dans la même cuve avec de l'eau distillée.

4. Expression des résultats

$$\text{Couleur ICUMSA} = \frac{1000 \cdot \text{Abs}}{\text{b} \cdot \text{c}}$$

Dont :

Abs : absorbance de la solution à 420 nm.

b : longueur (cm) de la cellule.

c : concentration (g/ml) de la solution de sucre.

IV.I.6. Mesure du trouble (ICUMSA Méthode GS 2/3-18, 2007)

1. Objet

Cette méthode est utilisée pour déterminer le trouble des sucres liquides n'excédant pas une couleur de 50 U ICUMSA.

2. Principe

Le principe de cette méthode se base sur la comparaison de l'absorbance d'une solution sucrée à 50° Brix avant et après filtration sur membrane de 0,45 µm. Le résultat est exprimé en unité ICUMSA.

3. Mode opératoire

- Préparer une solution à un Brix 50% ;
- Laisser agiter jusqu'à homogénéisation ;
- Mesurer la couleur de la solution N_1 tout en éliminant les stries de la solution dans la cuve de mesure ;
- Filtrer l'échantillon restant à travers une membrane de 0,45 µm ;
- Enfin mesurer la couleur N_2 par spectrophotométrie à 420 nm.

4. Expression des résultats

Le trouble est exprimé comme suit :

$$T = N_1 - N_2$$

IV.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de l'invertase

Afin de déterminer les conditions opératoires de l'invertase au sein du milieu réactionnel, nous avons opté à l'optimisation des différents paramètres physico-chimiques aboutissant aux conditions optimales.

Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata, et les valeurs données sont des moyennes de deux tests.

IV.2.1. Origine de l'enzyme

L'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, a été fournie par le complexe agroalimentaire Cevital de Bejaia, et provenant de la ferme suisse Novozyme.

IV.2.2. Préparation des dilutions

a) Préparation de la solution de sucre inverti dilué (solution stock = SID)

Cette solution a été préparée en diluant trois fois le sucre inverti prélevé dans l'eau osmosée (dilution 1/3), ce qui aboutit à l'obtention du sucre inverti dilué (SID).

La solution stock a été préparée dans des tubes de 100 ml en mélangeant 40 ml du sucre inverti dilué (SID) et 60 ml d'eau osmosée (EO).

La figure 12 est la représentation schématique des différentes dilutions préparées.

10 ml de la dilution 1/10 + 90 ml d'eau osmosée (EO) 10 ml de la dilution 1/100 + 90 ml d'EO 40 ml de la dilution 1/1000 + 90 ml d'EO.

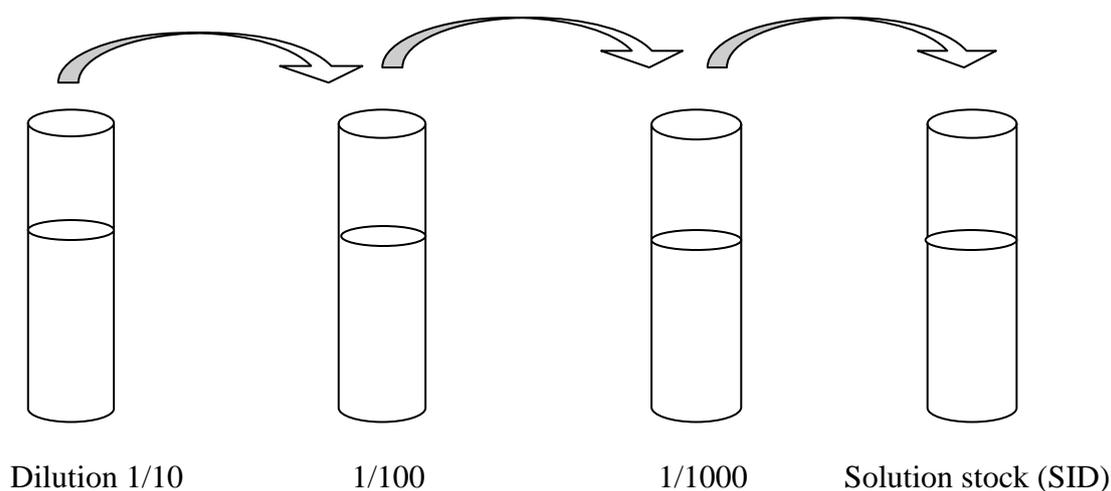


Figure 12 : Préparation des dilutions de solution stock.

b) Préparation de la dilution d'enzyme

Pour réaliser la dilution d'enzyme, l'invertase sous forme lyophilisée a été solubilisée dans le tampon approprié (tampon glycine pH 3,0, tampon acétate de sodium pH 4,0 et 5,0 et en fin tampon phosphate pH 6,5) à raison de 0,2 g/ 20ml (m/V), suivie d'une douce agitation de 10 à 15 min sur une plaque agitatrice (AM4 VELP Scientifica) (Marquez et al., 2008).

IV.2.3. Réalisation des courbes d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage ont été réalisées avec une solution d'invertose (glucose + fructose) à des concentrations respectives de : 0 - 0,4995 - 0,999 - 1,498 - 1,998 - 2,497 - 2,997 - 3,497 - 3,996 - 4,496 - 4,995 $\mu\text{mol/ml}$ (tableau V).

Tableau V : La gamme d'étalonnage utilisée pour le dosage des sucres réducteurs.

| | | | | | | | | | | | |
|--|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Saccharose (100mM) en µl | 1000 | 900 | 800 | 700 | 600 | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 0 |
| Concentration saccharose (mg/ml) | 34,23 | 30,78 | 27,36 | 23,94 | 20,52 | 17,1 | 13,68 | 10,26 | 6,84 | 3,42 | 0 |
| Invertose (5 mM) en µl | 0 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 |
| Concentration invertose (µmol/ml) | 0 | 0,4995 | 0,999 | 1,498 | 1,998 | 2,497 | 2,997 | 3,497 | 3,996 | 4,496 | 4,995 |
| Tampon (30 mM), pH 3.0, 4.0, 5.0 ou 6.5 en µl | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| Mélange final en µl | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 | 2500 |
| 3,5-DNS en µl | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |

3,5-DNS : acide 3,5 Dinitrosalicylique.

Les courbes d'étalonnage réalisées avec des pH_s allant de 3,0 – 6,5 dans des tampons différents (30 mM), nous ont permis de déterminer la concentration des sucres réducteurs totaux (SRT) dans les différents tests qu'on a effectué, afin de calculer le pourcentage d'hydrolyse. La concentration des sucres réducteurs totaux (SRT) est déterminée par extrapolation de la valeur d'absorbance sur la courbe d'étalonnage (voir annexe).

IV.2.4. Méthodes analytiques

a) Dosage de l'activité de l'invertase

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959), le mélange réactionnel contient 450 µl de sucre inverti dilué (solution stock), 450 µl du tampon approprié et 100 µl de la solution d'invertase (0,2g d'enzyme/20 ml de tampon approprié). La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

Le témoin correspond à la solution de sucre (SID) incubée sans solution d'enzyme à la température désirée pendant 3 min, puis on ajoute 1,5 ml de 3,5-DNS. Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm.

b) Dosage des sucres réducteurs

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (Figure 13).

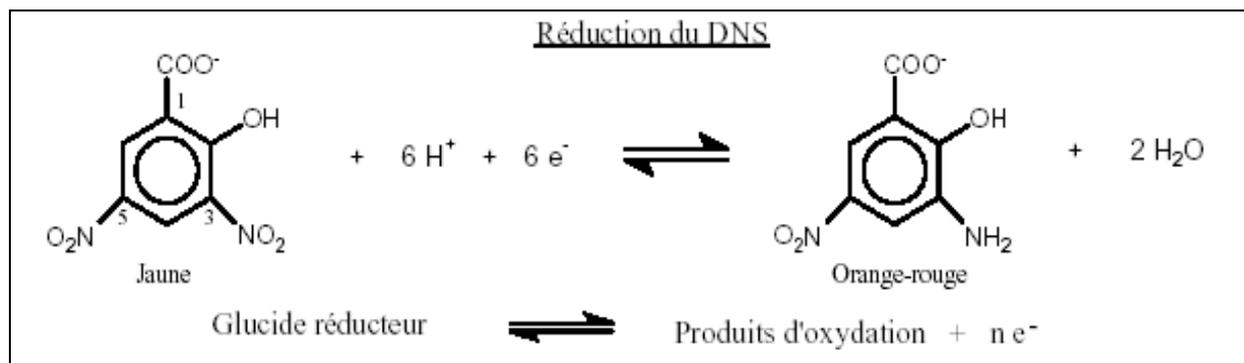


Figure 13 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode 3,5-DNS

(Bailey et al., 1992).

c) Dosage des protéines

• Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

Le mécanisme de base de l'essai est la liaison du colorant à pH acide au résidu de l'arginine, l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Sur la protéine de liaison, un changement métachromatique à 595 nm est observé en raison de la stabilisation de la forme anionique du colorant. La majorité du signal observé est dû à l'interaction avec les résidus arginine, résultant dans la variation protéine-protéine issue de la gamme de dosage Bradford.

• Macrométhode

Cette technique permet de doser des protéines comprises entre 0,2 et 1 mg/ ml. Le dosage consiste, dans un premier temps à ajouter 100 µl d'échantillon convenablement dilué, à 5 ml de réactif de Bradford. Le mélange, après homogénéisation est ensuite placé 5 min à l'obscurité et l'absorbance est mesuré à 595 nm (UV 1240 SHIMADZU).

Les concentrations des protéines ont été calculées par interpolation linéaire à partir d'une gamme d'étalon contenant l'albumin de serum bovin.

La gamme d'étalon BSA à 1 mg/ml à été réalisée comme est cité dans le tableau VI.

Tableau VI : La gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----|-------|-------|-------|------|-------|
| BSA µl | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| BSA (mg/ ml) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Eau déminéralisée µl | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Absorbance à 595 nm | 0 | 0,219 | 0,344 | 0,546 | 0,66 | 0,789 |

d) Activité de l'enzyme

Une unité d'activité invertase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucres réducteurs, par trois minutes, dans un volume de 1 ml de l'extrait brut ou de l'enzyme pure et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessous. L'activité invertase est calculée selon Bailey *et al.*, (1992) :

$$\text{Activité invertase U/ ml} = (C_x - C_t)D / t$$

Dont :

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (μ mole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (μ mole/ml).

D : Facteur de dilution.

t: Temps d'incubation (min).

IV.2.5.Caractérisation de l'invertase**IV.2.5.1. Détermination du pH optimum de l'enzyme**

Afin de déterminer le pH et les profils de température de l'invertase libre, des tests d'activité ont été réalisés aux pH_s (3,0, 4,0, 5,0 et 6,5) aux température respectives de 40, 50, 60 et 70°C (Rebros *et al.*, 2007).

Dans le but de réaliser le mélange réactionnel, nous avons adopté la méthode d'Akgol *et al.* (2001). Ce mélange contient 450 μ l de la solution stock (SID) et 450 μ l de tampon approprié (30 mM) dans des tubes à hémolyse. Le mélange est agité (vortex VELP scientifica) et incubé pendant 5 min à la température désirée, l'essai a été initié par addition de 100 μ l de la solution d'enzyme. Puis une incubation de trois min au bain marie (Memmert) a été réalisée afin d'activer l'enzyme. Après le temps d'incubation, le mélange réactionnel a été placé dans un bain marie (GFL) réglé à une température de 100°C pendant 5 min pour achever la réaction enzymatique et inactiver l'enzyme (Akgol *et al.*, 2001 ; Giraldo *et al.*, 2011).

Les sucres réducteurs libérés sont quantifiés selon Miller (1959) en utilisant le 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS). La mesure de l'absorbance a été effectuée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV 1240 SHIMADZU).

IV.2.5.2. Détermination de la température optimale

La température optimale a été déterminée en changeant les conditions de dosage de l'activité de l'invertase tampon (30 mM) de pH 3,0 – 6,5, à des températures variant de 20 - 90 °C (Tanriseven et Dogan, 2001).

Pour préparer le mélange réactionnel, nous avons adopté la méthode de Giraldo et *al.* (2011). Il contient la solution stock (SID) (450 µl), le tampon acétate de sodium, pH 4,0 (450 µl) et la dilution de l'enzyme (100 µl) dans des tubes à hémolyse, et qui a été agité et incubé pendant 5 min à la température désirée. Après ajout du 3,5-DNS (1,5 ml) et dénaturation à 100 °C pendant 5 min, l'activité relative a été déterminée en mesurant l'absorbance à 540 nm (Giraldo et *al.*, 2011).

IV.2.5.3. Mesure de la thermostabilité

La stabilité thermique de l'invertase a été déterminée en mesurant l'activité résiduelle de l'enzyme exposée à trois températures différentes (40, 60 et 70 °C) dans les tampons adéquats (30 mM ; pH 3.0, 4.0, 5.0 et 6.5) (Ghazi et *al.*, 2005).

Afin de réaliser le mélange réactionnel, nous avons adopté la méthode de Rubio et *al.* (2002). Ce dernier contient 450 µl de la solution stock (SID), 450 µl de tampon approprié et 100 µl de la solution enzymatique dans des tubes à hémolyse.

Les tubes contenant le mélange réactionnel ont été incubés aux températures désirées (40, 60 et 70 °C) à des intervalles de temps de : 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130 et 150 min, un tube a été prélevé et 1,5 ml de 3,5-DNS ont été rajoutés ; puis un traitement à l'eau bouillante (100 °C) dans un bain marie pendant 5 min a été effectué. L'activité résiduelle de l'enzyme a été déterminée en mesurant l'absorbance des sucres réducteurs libérés à 540 nm.

IV.2.5.4. Détermination de la vitesse initiale de la réaction enzymatique

Pour déterminer la vitesse initiale de la réaction, nous avons adopté la méthode de De Almeida et *al.* (2005). Le mélange réactionnel réalisé dans des tubes à hémolyse contient la solution stock (450 µl), le tampon adéquat (30 mM, pH 4,0) et 100 µl de la solution enzymatique (0,2 g/20 ml de tampon acétate de sodium pH 4,0). Après homogénéisation au vortex, ce dernier a été incubé pendant 18 min à 40°C (De Almeida et *al.*, 2005).

A des intervalles de temps de trois minutes, un tube a été prélevé et la réaction enzymatique a été achevée en incubant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 5 min. La concentration des sucres réducteurs totaux a été déterminée à l'aide de 3,5-DNS.

IV.2.5.5. Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max}

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la réaction enzymatique ont été déterminés à 40 °C en changeant la composition du mélange réactionnel (tampon et solution stock). K_m et V_{max} ont été calculés à partir de la représentation de Lineweaver-Burk (1934), de l'inverse de la vitesse et de la quantité de sucres réducteurs totaux obtenue après 15 min (Tanriseven et Dogan, 2001).

En adoptant la méthode de Rebros *et al.* (2007), le mélange réactionnel réalisé dans des tubes à hémolyse contient la solution stock (0 - 900 μ l), le tampon acétate (900 - 0 μ l) et 100 μ l de la dilution d'enzyme. Les tubes ont été incubés pendant 15 min à 40 °C sous agitation à 200 tr/min (Rebros *et al.*, 2007). Puis, 1,5 ml de 3,5-DNS ont été additionnés et l'enzyme a été dénaturée en mettant le mélange réactionnel dans l'eau bouillante pendant 5 min.

IV.3. Détermination du pourcentage d'hydrolyse

Le pourcentage d'hydrolyse a été déterminé suivant la méthode de De Almeida *et al.* (2005). Les tests ont été réalisés en batch (mode discontinu) dans un Erlenmeyer de 250 ml sous agitation (200 tr/min) à 40 °C pendant 150 min (De Almeida *et al.*, 2005).

Le pourcentage d'hydrolyse est déterminé par la formule :

$$\% \text{ d'hydrolyse} = [\text{SRT}]/S_0 \times 100$$

Dont : SRT : sucres réducteurs totaux en μ M et S_0 : concentration initiale en saccharose en μ M.

En adoptant cette méthode, nous avons réalisé deux tests différents afin de déterminer le pourcentage d'hydrolyse théorique et en utilisant le réfractomètre. Son principe se base sur l'exploitation propriétés réfractométrique ainsi que le taux des disaccharides dans la solution.

a) Test 01

Le mélange réactionnel contient 270 ml de la solution stock et 27 ml de la solution d'enzyme fraîchement préparée à la température ambiante (0,2 g d'enzyme lyophilisée/20 ml de tampon acétate de sodium à 30 mM, pH 4,0). Après ajustement du pH à 4,0 (pH mètre de

type HANNA pH 210) le mélange a été incubé pendant 150 min à 40°C sous agitation (plaque agitatrice de type AM4 VELP Scientifica).

A des intervalles de temps de 10 min, un échantillon de 1,5 ml a été pipeté et la réaction enzymatique a été stoppée en incubant l'échantillon à 100°C pendant 5 min au bain marie bouillant (GLF). Les sucres réducteurs totaux sont ensuite déterminés.

b) Test 02

Le mélange réactionnel contient 90 ml de sucre inverti (solution mère), 90 ml d'eau osmosée et 20 ml de la solution d'enzyme fraîchement préparée (0,2 g d'enzyme lyophilisée/20 ml de tampon acétate de sodium à 30 mM, pH 4,0).

Le mélange a été incubé pendant 150 min à 40°C sous agitation. Puis à chaque : 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130 et 150 min, un échantillon de 10 ml a été récupéré dans un tube à essai et le mélange a été incubé pendant 5 min à 100°C.

IV.4. Estimation du poids moléculaire de l'invertase

IV.4.1. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Dans des tubes eppendorf, on met 1000 µl de l'échantillon à analyser avec l'ajout de 200 µl de tampon dénaturant (de solubilisation 5x). Il se compose de Tris/HCl 312,5 mM, EDTA 0,4 mM, SDS 7,5 %, glycérol 25 %, β-mercaptoéthanol 0,1 % et bleu de bromophénol 0,05 %, le tout ajusté à pH 6,8. Le SDS permet de conférer à l'ensemble des protéines une charge globale négative et le DTT (Dithiothréitol) permet de protéger l'oxydation des protéines et de rompre les ponts disulfures. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes dans l'eau bouillante au bain marie afin de compléter la dénaturation. L'échantillon est conservé jusqu'à son utilisation à - 20°C après ajout d'une à deux gouttes du glycérol pour augmenter leur densité.

IV.4.2. Détermination de la pureté de l'échantillon contenant l'invertase par méthode électrophorétique en conditions dénaturantes

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines car elle demeure une technique robuste et reproductible (Garfin, 2003).

L'analyse électrophorétique de l'échantillon contenant l'invertase, en conditions dénaturantes, est effectuée en présence du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (3%) un agent

tensioactif et de 2-mercaptoéthanol (1%) sur des gels d'acrylamide à 12 % (bis-acrylamide 0,8%) selon la méthode décrite pour la SDS-PAGE par Laemmli (1970).

Le SDS, en solubilisant les protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéines) et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction de la taille des protéines et de la taille des mailles du gel. Le 2-mercaptoéthanol est un agent réducteur des ponts disulfures et permet de mettre en évidence les différentes sous-unités d'une protéine. Elles vont donc être séparées suivant leurs poids moléculaires : les protéines de fortes tailles auront des difficultés à traverser les mailles du gel d'acrylamide.

Les dépôts (5, 10 et 15 µl de l'échantillon) sont réalisés dans les puits formés dans les gels après polymérisation. Puis on dépose les gels dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse ou tampon de migration, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, et 2-mercaptoéthanol 0,05 % à pH 8,3. Puis, la cuve est reliée à un générateur, générant un courant électrique faisant migrer les protéines, d'abord à 80 volts pendant 15 à 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel de stacking (gel de concentration), et ce fort courant électrique force la migration de la glycine et des protéines qui vont stocker au front de migration des ions chlorure et d'obtenir ainsi de très fines bandes de protéines concentrées à la limite supérieure du second gel.

Ensuite, ce dernier gel de séparation (résolving), permet de séparer les protéines selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire, en augmentant le potentiel électrique à 140 volts pendant 2 heures environ. Toute cette opération est réalisée à température ambiante.

Pour colorer et par conséquent mettre en évidence les protéines, la coloration au bleu de Coomassie R250 est utilisée.

IV.4.3. Coloration au bleu de Coomassie R-250

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution d'éthanol 30 %, acide acétique 5 %. Pour l'utilisation du Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), le gel de polyacrylamide est directement mis à incubation avec le bleu de Coomassie R 250, solubilisé dans la solution de coloration contenant de l'éthanol 40 %, acide acétique 10 % et 2,9 mM du bleu de Coomassie R 250 pendant au moins 20 minutes sous agitation. Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans une solution de décoloration, qui est la même solution que celle ayant servi à la fixation des protéines jusqu'à bonne visibilité des

bandes protéiques. La masse moléculaire de l'invertase est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage (voir annexe II).

$$\mathbf{Rf = f (log PM)}$$

Rf : rapport frontal qui est calculé selon cette formule :

| |
|---|
| $\mathbf{Rf = Distance\ parcourue\ par\ la\ protéine / Distance\ de\ migration\ du\ bleu\ de\ bromophénol}$ |
|---|

*Résultats
et discussions*

V. Résultats et discussion

Notre étude réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée, avait pour objectif d'une part, la détermination des conditions optimales et paramètres cinétiques de l'invertase libre, et ceci afin de l'utiliser en système batch pour produire du sucre inverti $\geq 96\%$ à partir d'un sirop hydrolysé chimiquement (ayant un taux d'hydrolyse de 80 – 85%).

D'autre part, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des paramètres physico-chimiques de la matière première récupérée (prélevée) au niveau de l'unité du sucre liquide du complexe Agro-Alimentaire « Cevital » de Bejaia. Pour cela nous avons suivi l'évolution de certains paramètres physico-chimiques au cours du processus de fabrication du sucre inverti liquide.

V.1. Caractéristiques de la matière première

L'ensemble des résultats englobant les caractéristiques physico-chimiques de la matière première sont illustrés dans le tableau VII. Nous constatons que la matière première possède un pH de 3,54 et qui est proche du pH optimal trouvée pour l'enzyme (voir plus loin les résultats partie V.3.1). Le taux d'inversion par l'hydrolyse chimique est de 85 %, avec une couleur de 15 Unité ICUMSA.

Tableau VII : Caractérisation de la matière première utilisée lors de cette étude.

| Paramètre | Résultat |
|-------------------------------|----------|
| Brix (%) | 61,65 |
| Polarisation (°) | -5,26 |
| Taux d'inversion par HPLC (%) | 85 |
| Saccharose (%) | 14,96 |
| Glucose (%) | 41,34 |
| Couleur (U ICUMSA) | 15 |
| pH | 3,54 |

V.2. Evolution des paramètres physico-chimiques du sucre inverti liquide (matière première) au cours de processus de fabrication

La présente étude consiste en une partie, à suivre l'évolution de certains paramètres physico-chimiques au cours des étapes de production du sucre liquide inverti (SLI).

V.2.1. Evolution du Brix

Le Brix est un paramètre important à étudier au cours des étapes de production, du fait qu'il a une relation directe sur l'augmentation ou la diminution de la viscosité du sirop, le taux d'inversion et la vitesse d'écoulement.

La figure 14 illustre l'évolution du Brix au cours des étapes de production du sucre liquide inverti (SLI).

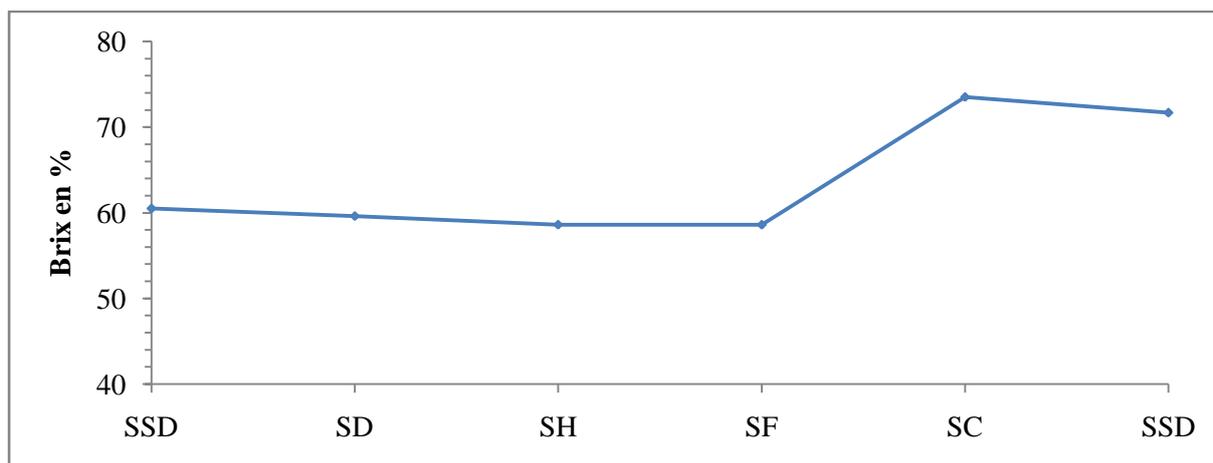


Figure 14 : Evolution du Brix du sucre liquide inverti.

SSD (sirop super décoloré), SD (sirop déminéralisé), SH (sirop hydrolysé), SF (sirop filtré), SC (sirop concentré) et SS (sirop stocké).

Selon les résultats illustrés dans la figure 14, nous remarquons que le Brix diminue légèrement après l'étape de déminéralisation (SD) de 60,5% jusqu'à 59,60%. Cette diminution peut être liée soit à :

- la formation des molécules d'eau après libération des ions H^+ et OH^- par les résines cationique et anionique ;
- ou à la présence d'eau dans la colonne de déminéralisation au début de la production du sirop (ICUMSA, 2007).

Le Brix reste en diminution jusqu'à une valeur de 58,60% au cours des étapes d'hydrolyse et de filtration (SH et SF). Cette chute de Brix est probablement provoquée par l'eau présente dans la colonne d'hydrolyse et les filtres au début de la production (ICUMSA, 2007). Il se stabilise après au cours de l'étape de pasteurisation puisque durant cette dernière, aucune source d'eau n'est disponible pour diluer le sirop. En revanche, l'étape de concentration (SC) est marquée par une élévation brutale du Brix qui atteint 73,52%. Cette augmentation de concentration est due à l'évaporation de l'eau (Jeantet *et al.*, 2006).

Au cours du stockage (SS), nous remarquons une diminution du taux de Brix jusqu'à 71,7%, ce qui s'explique par le mélange de fractions différentes de sirops hydrolysés.

V.2.2. Evolution du pH

La figure 15 montre l'évolution du pH au cours des étapes de fabrication du sucre liquide inverti.

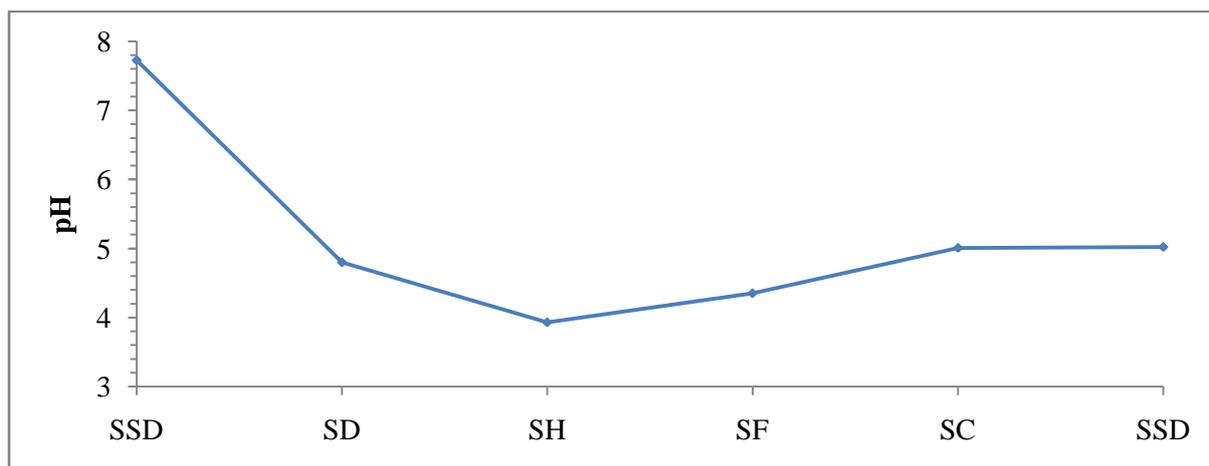


Figure 15 : Evolution du pH du sucre liquide inverti au cours de sa fabrication.

SSD (sirop super décoloré), SD (sirop déminéralisé), SH (sirop hydrolysé), SF (sirop filtré), SC (sirop concentré) et SS (sirop stocké).

Le pH de fonctionnement varie entre 4 et 6 (MO interne de l'usine, 2002). D'après l'allure du graphe de la figure 15, nous constatons que le pH diminue de 7,73 jusqu'à 4,80 après l'étape de déminéralisation du sirop (SD). Ceci est expliqué par la richesse du sirop par les cations (Ca^{2+} , Na^+) (De Bruijn et Bout, 1999), ce qui provoque la libération d'une grande quantité d'ions H^+ après déminéralisation par les résines échangeuses d'ions (Bali, 1992), et par conséquent le milieu devient acide.

Après l'étape d'hydrolyse (SH), le pH diminue encore jusqu'à une valeur de 3,93. Cette très faible valeur, représentée par une acidité importante est provoquée par les H⁺ libérés par les résines cationiques (Aruda et Vitole, 1999).

Néanmoins, une légère élévation du pH est constaté, de 3,93 jusqu'à 4,35 au cours de l'étape de filtration du sirop sur charbon actif (SF). Elle s'explique probablement par l'élimination de matières acides adsorbées au charbon. Quant à l'étape de concentration (SC), elle est marquée par une augmentation du pH jusqu'à une valeur avoisinant un pH de 5,01 après ajout de la soude (ICUMSA, 2007).

Enfin, au cours du stockage (SS), on remarque une légère élévation du pH de 5,01 jusqu'à 5,20, ce qui est du au mélange de fractions de sirops différentes.

V.2.3. Evolution de la couleur

La couleur du sucre liquide inversi a une importance capitale afin d'assurer un produit de bonne qualité pour le consommateur d'une part qui répond aux normes exigées par l'ICUMSA d'autre part.

La figure 16 illustre l'évolution de la couleur au cours des étapes de fabrication du sucre liquide inversi (SLI).

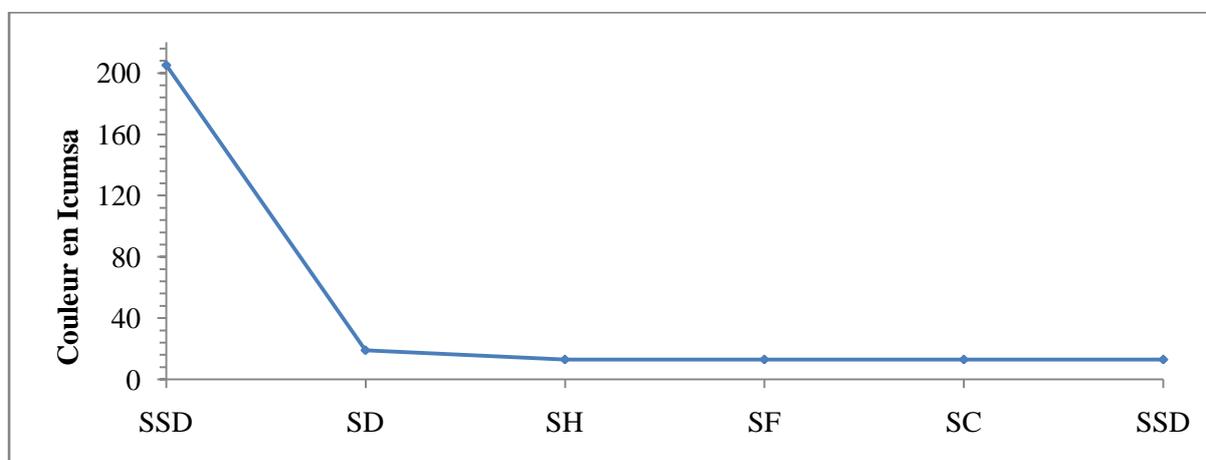


Figure 16: Evolution de la couleur du sucre liquide inversi.

SSD (sirop super décoloré), SD (sirop déminéralisé), SH (sirop hydrolysé), SF (sirop filtré), SC (sirop concentré) et SS (sirop stocké).

D'après la figure 16, nous constatons qu'après l'étape de déminéralisation (SD), la couleur du sirop marque une chute brusque (205 jusqu'à 19 ICUMSA). Le sirop acheminé vers la siroperie est le sirop pré-décoloré provenant de la raffinerie de sucre ayant une couleur d'environ 200 à 300 U ICUMSA. Après le passage par la colonne de déminéralisation, le

sirop suit sa décoloration par la résine échangeuse d'ions. Rappelant que cette dernière joue un double rôle, une déminéralisation et une décoloration.

Après hydrolyse (SH) une légère diminution de la couleur, de 19 à 13 U ICUMSA est constatée. Cette dernière s'explique par l'adsorption des molécules colorantes présentes dans le sirop par la résine cationique. Par ailleurs durant les étapes : filtration (SF), pasteurisation (SF), concentration (SC) et stockage (SS), la couleur reste généralement stable vu qu'elles ne contribuent pas à la décoloration, mais au contraire provoqueront dans certains cas une coloration (ICUMSA, 2007).

V.2.4. Evolution du taux d'inversion

Afin d'avoir un produit de qualité qui répond aux exigences du client, l'évolution du taux d'inversion est soigneusement suivi au cours des étapes de production du sucre liquide inversé (SLI).

La figure 17 représente l'évolution du taux d'inversion au cours des étapes de production du sucre liquide inversé.

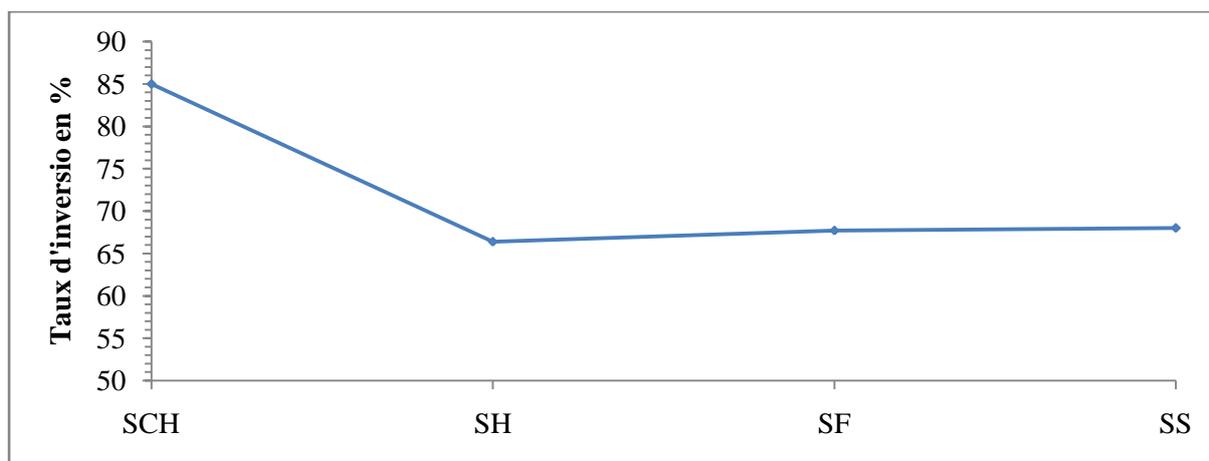


Figure 17 : Evolution du taux d'inversion.

SCH (sortie colonne d'hydrolyse), SH (sirop hydrolysé), SF (sirop filtré) et SS (sirop stocké).

D'après l'allure du graphe, nous remarquons à la sortie de la colonne d'hydrolyse, que le taux d'inversion a atteint la valeur de 85%. Cette unité comprend une résine échangeuse d'ion fortement acide (XA 2001 H) ayant comme groupement fonctionnel (SO_3^-) qui permet l'hydrolyse du saccharose en mélange équimolaire de glucose et fructose (Yang et Montgomery, 2007). Au niveau de la section d'hydrolyse (SH), une forte diminution du taux d'inversion jusqu'à 66,4 % est constatée. Elle s'explique fort probablement par l'addition de

sirop de saccharose à des débits différents, sirop non hydrolysé à un débit de 7 m³/h et hydrolysé à un débit de 24 m³/h (Rachedi, 2002).

Durant l'étape de filtration (SF), nous avons noté une légère augmentation du taux d'inversion jusqu'à 67,72% qui est due à l'acidité du milieu. Quant à l'étape de concentration (SC) le taux d'inversion reste stable. Cependant, au cours du stockage (SS), nous avons remarqué une augmentation du taux d'inversion car à ce niveau, différentes fractions de sirops hydrolysés sont mélangées.

L'analyse des paramètres physico-chimiques de notre matière première, montre que ces derniers répondent aux normes de qualité exigées par le complexe agroalimentaire Cevital.

V.3. Conditions optimales de l'invertase libre

V.3.1. Effet du pH

Les figures 18 et 19 illustrent l'effet du pH sur l'activité de l'invertase aux températures de 40 et 70 °C respectivement.

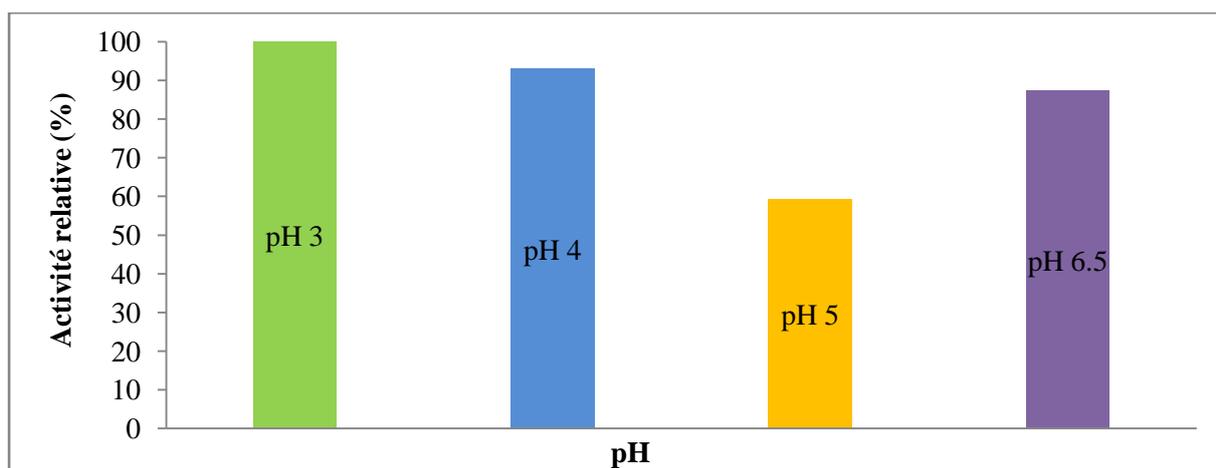


Figure 18 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase utilisée à 40 °C.

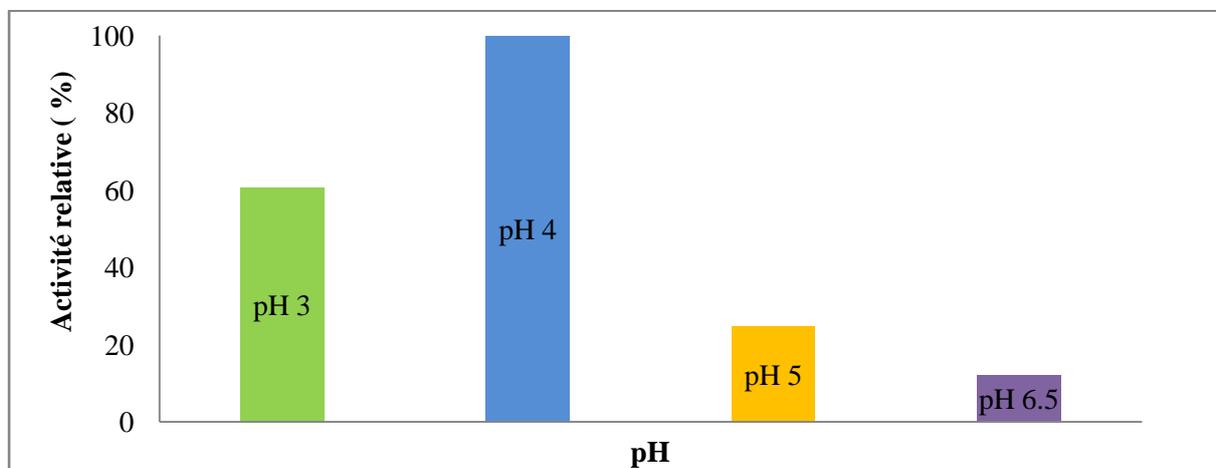


Figure 19 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase utilisée à 70 °C.

A 40 °C et au bout de 3 min, l'invertase a maintenue près de 100% de son activité à pH 3,0, 93% à pH 4,0 et 87% à pH 6,5. En revanche, à pH 5,0, environ 40% de l'activité de l'enzyme est perdue.

A une température élevée (70 °C), l'activité de l'enzyme reste stable à pH 4,0. Tandis qu'aux pH, 5,0 et 6,5, plus de 70% de cette activité est perdue et elle ne maintient que 60% de son activité à pH 3,0. Nous remarquons, d'après ces résultats que le pH a un effet sur l'activité de l'enzyme. Selon Athel et *al.* (2004), l'effet du pH sur les enzymes impliquant un seul groupe acide ou basique, n'est pas différent du cas général d'inhibition. La protonation du groupe basique d'une enzyme est simplement un cas spécial de fixation d'un groupe effecteur sur un site spécifique. Néanmoins, il existe une différence entre les protons et les autres effecteurs, quasiment toutes les enzymes sont affectées par les protons, de telle sorte que ces derniers sont plus importants que n'importe quel autre effecteur. Ils sont beaucoup plus petits que n'importe quel autre composé chimique et n'ont aucun effet stérique ; cela signifie que l'inhibition non-compétitive, est courante avec les protons alors qu'elle est particulièrement rare en général (Athel et *al.*, 2004).

Les résultats du pH obtenus au cours de notre étude sont proches de ceux obtenus par d'autres études, avec des valeurs un peu plus basses. Ceci peut être expliqué soit d'une part, par les conditions opératoires différentes, à savoir l'eau utilisée (dans notre cas nous avons utilisé l'eau osmosée, pour rester dans les mêmes conditions utilisées dans le processus de production de la matière première au niveau de l'usine), et d'autre part, la souche utilisée (*Saccharomyces cerevisiae*).

D'après les résultats obtenus par Tanriseven et Dogan (2001), qui ont utilisé l'enzyme issue du même microorganisme (*S. cerevisiae*) immobilisée dans des capsules d'alginate, montrent que l'immobilisation n'a pas affecté les conditions optimales de l'invertase. Le pH optimum de l'activité de l'enzyme libre obtenu par ces derniers, été de 4,3 (Tanriseven et Dogan, 2001). Nous constatons, que nos résultats corroborent aux leur.

L'activité de l'invertase libre de *S. cerevisiae* étudiée à des pH, allant de 3,2 jusqu'à 6,0, montre que le pH optimal pour l'hydrolyse du saccharose était de 4,5 (Rebros et *al.*, 2007). Ces résultats sont presque similaires aux notre et à ceux de Rubio et *al.* (2002), qui ont travaillé sur une autre souche (*Rhodotulla glutinis*). L'activité de l'invertase été stable entre pH 2,6 – 5,5 et l'activité maximale est enregistrée à pH 4,5 (Rubio et *al.*, 2002).

Nous pouvons ainsi conclure selon les résultats obtenus, que l'activité de l'invertase est stable en milieu acide, et l'activité maximale de l'invertase est observée à pH 4,0. C'est cette valeur du pH avec le tampon respectif (acétate de sodium) qui va être utilisé dans ce qui suit (les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme).

V.3.2. Effet de la température

La figure 20 illustre l'effet de la température sur l'activité de l'invertase aux pH_s : 3,0 – 4,0 – 5,0 et 6,5.

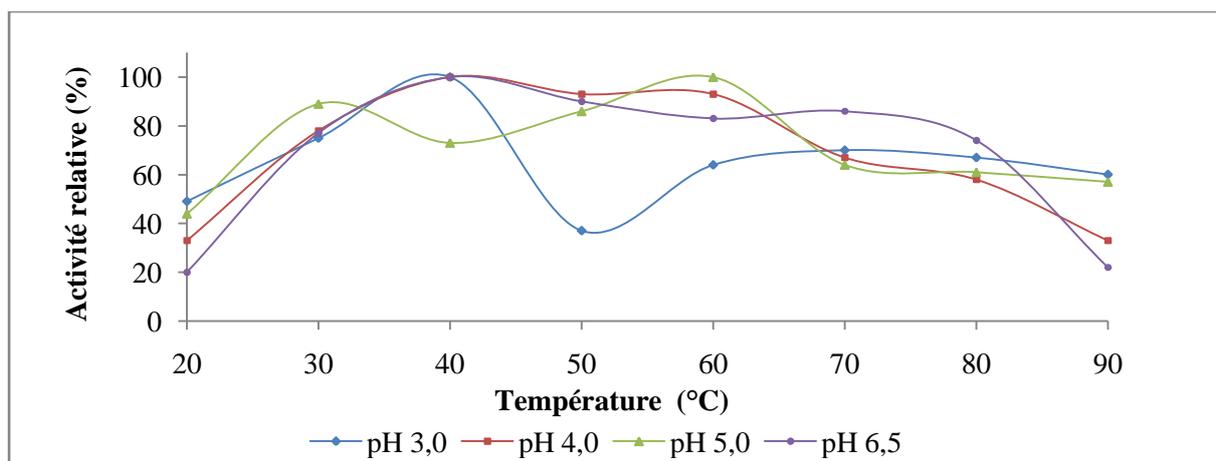


Figure 20 : Effet de la température sur l'activité de l'invertase libre.

Les protéines sont thermolabiles, leur structure native est tributaire des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Athel et *al.*, 2004). La température possède un double effet sur l'activité enzymatique :

- Accroissement de la vitesse de réaction en fonction de l'augmentation de la température (effet réversible) ;
- Dénaturation de l'enzyme à partir d'une température suffisamment élevée (effet irréversible).

L'activité relative de l'invertase libre obtenue à différentes températures : de 20 à 90 °C a été exprimé en pourcentage (%) par rapport à l'activité maximale selon Akgol et *al.* (2001).

A partir des résultats figurants dans la courbe de la figure 21, nous constatons que l'activité de l'invertase varie entre 20 et 90 °C aux pH_s : 3,0 - 4,0 - 5,0 et 6,5. L'activité atteint son maximum approximativement à 40 °C, cette activité reste stable entre 40 et 60 °C aux deux pH de 4,0 et 6,5. L'activité maximale est obtenue à pH 4,0. Au-delà de 80 °C, on

remarque une diminution de l'activité de l'invertase aux pH_s 4,0 et 6,5, et elle décline rapidement jusqu'à environ 20%. L'enzyme est ensuite dénaturée à 90 °C, ce qui explique la perte d'activité.

De plus, dans les travaux réalisés par O'Sullivan et Thompson (1890), qui ont étudié l'hydrolyse du saccharose par l'invertase suivie par polarimétrie, ils ont montré qu'elle n'est ni altérée, ni détruite au cours de l'hydrolyse excepté lorsque opérée aux températures élevées (O'Sullivan et Thompson, 1890).

En revanche, aux pH_s 3,0 et 5,0, l'activité relative de l'enzyme était instable entre 40 et 70 °C. Elle a perdue 20% de son activité à pH 5,0 et plus de 60% à pH 3,0. Au-delà de 80 °C, l'activité de l'enzyme diminue, fort possible en raison de sa dénaturation.

Les résultats d'une autre étude réalisée à des températures entre 20 – 60 °C, montrent que l'activité maximale de l'invertase libre est obtenue à une température avoisinant les 45 °C (Akgol et *al.*, 2001). Ce résultat est en accord à ce qui a été obtenu au cours de notre étude et en désaccord aux résultats de l'étude de Rubio et *al.* (2002) dont l'activité maximale de l'invertase a été observée à une température plus élevée (à 60 °C). Au fait, il a été démontré au cours de cette étude, que l'invertase libre maintient 48% de son activité relative à pH 3,0, cependant, à pH 8,0, environ 93% de son activité relative est perdue (Rubio et *al.*, 2002).

Dans une autre étude similaire, l'activité maximale de l'invertase a été observée quand la température varie de 50 à 70 °C et son activité décroît à des températures plus élevées. Cet abaissement de l'activité est due à la réduction de la stabilité de l'enzyme dénaturée à ces températures élevées (Rodriguez et *al.*, 1995).

V.3.3. Thermostabilité de l'invertase libre

La figure 21 représente la thermostabilité de l'invertase à différentes températures, 40, 60 et 70 °C.

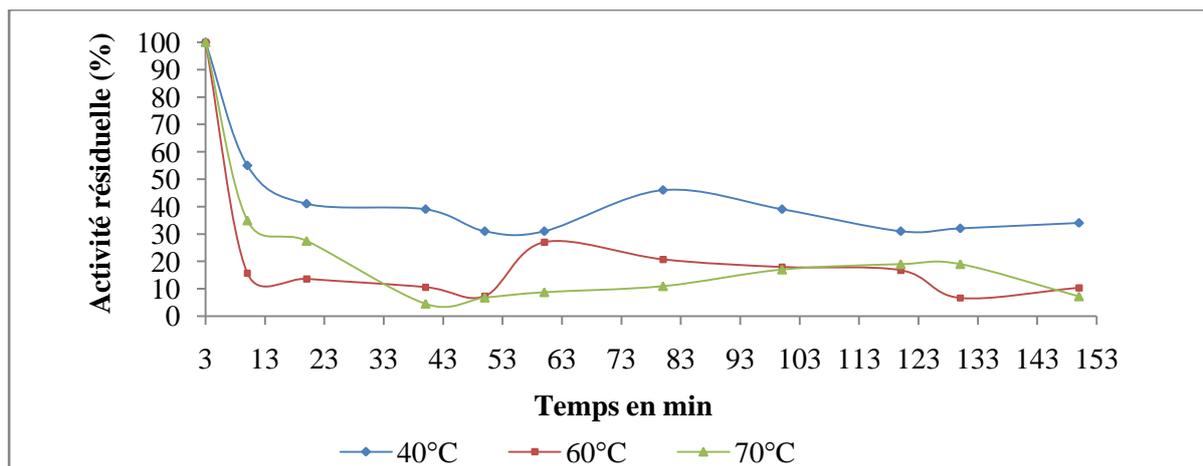


Figure 21 : La thermostabilité de l'invertase libre à différentes températures.

La thermostabilité est la capacité d'une enzyme à rester stable et/ou active après une incubation à une température élevée (Dolores et *al.*, 2008).

La stabilité thermique de l'invertase a été évaluée en incubant l'enzyme pendant 150 minutes à différentes températures (40, 60 et 70 °C) dans un tampon acétate de sodium pH 4,0, puis dosage de son activité résiduelle.

D'après l'allure du graphe de la figure 21, nous constatons qu'au bout de trois minutes, l'activité résiduelle était de 100% et ceci aux trois températures. L'activité maximale est due au fait, que l'invertase était active, et ses sites actifs étaient libres au début de la réaction, ce qui augmente la formation du complexe enzyme substrat catalysant la réaction d'hydrolyse (Athel et *al.*, 2004).

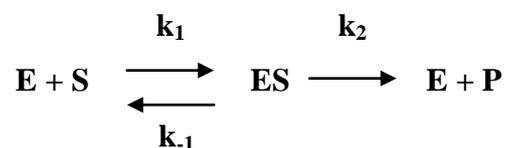
Après 10 min d'incubation, nous remarquons une chute de l'activité résiduelle de l'invertase. Ainsi, 59 et 86,4% de son activité à été perdue à 40 et 60 °C respectivement. Alors qu'à 70 °C, son activité est presque inexistante (96% de perte d'activité). La diminution de l'activité à des températures élevées est associée d'une part à la réduction de la stabilité de l'enzyme en raison de sa dénaturation (De Almida et *al.*, 2005), et d'autre part, fort probablement à la diminution de la concentration de son substrat. Dans leurs études menées sur l'invertase, O'Sullivan et Thompson (1890) ont remarqué que la stabilité thermique de l'enzyme augmentait en présence de son substrat (Athel et *al.*, 2004). Ils indiquent que, lorsqu'elle est mise en présence du saccharose, l'invertase supporte une température de 25 °C supérieur à celle qu'elle supporte à son absence (O'Sullivan et Thompson, 1890).

L'invertase a maintenu 50% de son activité au bout de 15 min d'incubation à 40°C, et 10 min à 70°C et 60°C. Donc l'invertase a une demi-vie de 15 min à 40°C, résultat qui diffère de celui de Kumar *et al* (2008) ainsi qu'au résultat d'Akgol en (2001), qui ont estimé la demi-vie à 70 et 50 min à 65 et 45°C respectivement.

En outre, nous avons aussi constaté que l'enzyme a maintenue environ 25 % de son activité à 40 °C, et ce pendant 20 minutes d'incubation en système batch et seulement 13,6% à 60°C. Ces résultats, ne corroborent pas à ceux obtenus par Akgol et ces collaborateurs (2001), et ces derniers ont montré que l'enzyme préserve 92% de son activité et pendant 100 minutes d'incubation. Tandis que le résultat obtenu à 70 °C est bien en accord, l'activité est presque entièrement perdue car l'enzyme est inactive et instable à des températures élevées (Akgol *et al.*, 2001).

Par ailleurs, et contrairement à l'étude de De La Vega et ces collaborateurs, qui ont utilisé comme enzyme l'invertase de *Rhodotula*. L'enzyme été plus stable à 60 °C et la stabilité été plus intéressante, qu'à ce que nous avons obtenu. Ils rapportent que l'enzyme a perdu seulement 33% de son activité à la même température (70 °C), cela peut être due à la thermophilie de la souche *Rhodotula* comparée à *S. cerevisiae* (De La Vega *et al.*, 1991).

D'autre part, on remarque une perte d'activité d'environ 10% après 43 minutes d'incubation aux trois températures (40, 60 et 70 °C), mais l'enzyme reprend cette activité après 5 à 10 minutes d'incubation. Au-delà, de 85 minutes, l'activité reste stable aux trois températures : 40, 60 et 70 °C. Cela s'explique par le fait qu'au bout de 43 minutes d'incubation tous les sites actifs de l'enzyme étaient saturés (occupés), et après libération du produit, ces derniers se libèrent. Ceci permet par la suite, la formation d'un nouveau complexe enzymatique suivant la réaction (Mudd et Mann, 1963) :



Dont : E : Enzyme, S : Substrat, ES : Complexe enzyme-substrat, P : Produit, k_1 et k_2 : Constante d'association et k_{-1} : Constante de dissociation.

L'analyse de ces résultats, nous montre que l'activité de l'invertase était plus élevée et plus stable à 40 °C pendant tout le temps d'incubation (150 minutes) et elle a préservée environ 50% de son activité au bout de 1h20 minutes de fonctionnement ce qui nous conduit à conclure que la température optimale pour l'invertase est 40 °C.

V.3.4. Les paramètres cinétiques K_M et V_{max}

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide de la représentation linéaire de Lineweaver-Burk, en utilisant la régression linéaire de la courbe $1/v$ par rapport à $1/S$ comme montrée dans la figure 22.

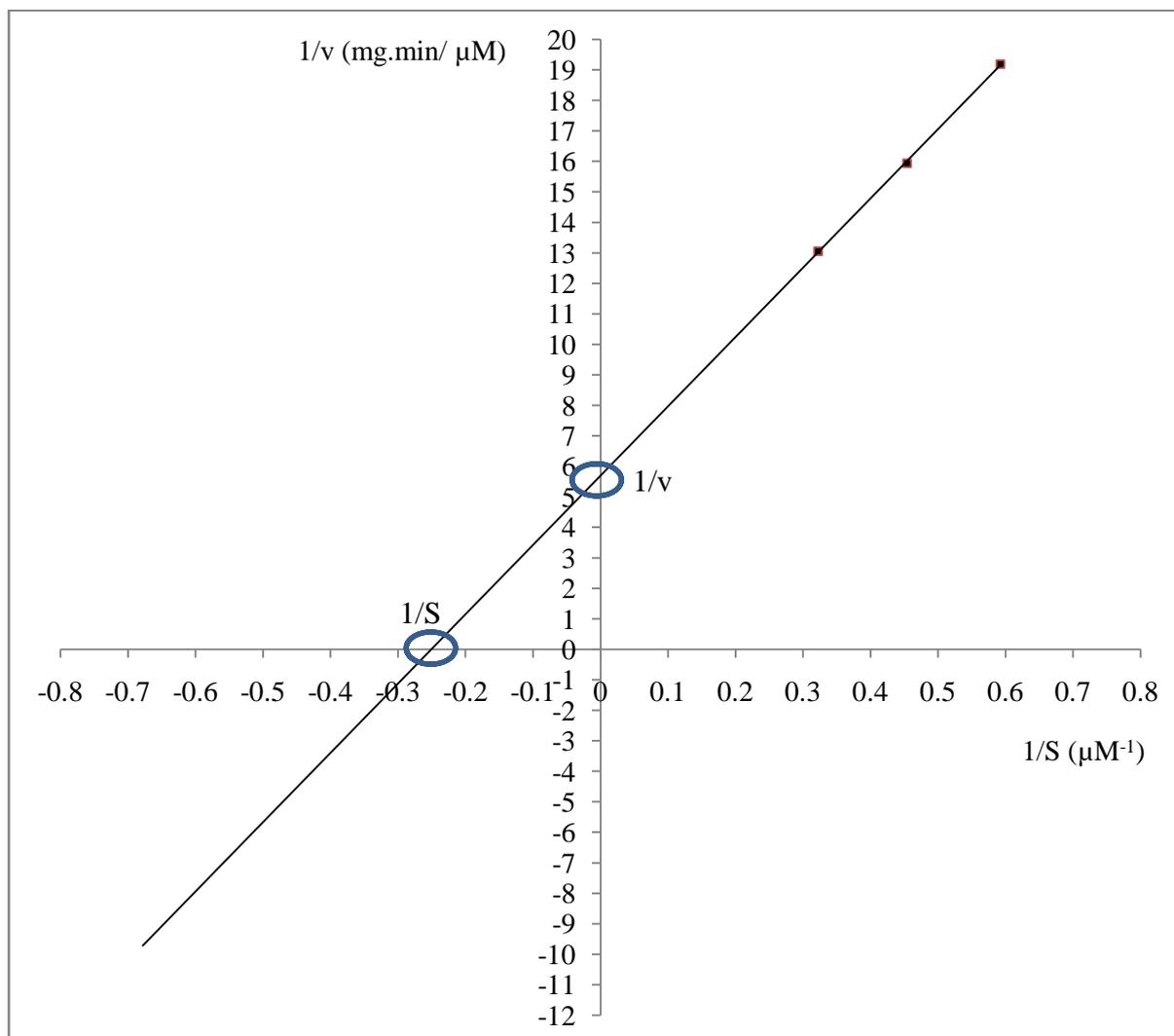


Figure 22 : Représentation des paramètres cinétiques de l'invertase selon Lineweaver-Burk.

La valeur de K_m a été calculé à partir de la représentation de Lineweaver-Burk comme $4 \mu\text{M}/\text{mg}$ d'enzyme, une valeur qui est faible, qui peut s'expliquer par la grande affinité du substrat pour l'enzyme, d'après Athel et *al.*, (2004), l'affinité du substrat pour l'enzyme est d'autant plus grande que la valeur de la constante de Michaelis est petite. V_{max} est notée à $0,75 \mu\text{M}/\text{min.mg}$ d'enzyme. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues par Rubio, qui a estimé la valeur de K_m et V_{max} à $0,227 \text{ M}$ et $0,096 \text{ mmol /min}$ respectivement (Rubio et *al.*, 2002).

D'autre part, ces résultats de K_m et V_{max} sont non similaires à ceux obtenus avec l'invertase de *A. Japonicus* (Hayashi et al., 1992) et semblaient être plus faible que ceux de *S Occidentalis* 0,02 M (Klein et al., 1989) ; et *A. Niger* 0,06 M (Rubio et al., 2002).

Par ailleurs, les valeurs de K_m et V_{max} obtenus étaient plus élevés en utilisant l'invertase extracellulaire de *P. Variotti* (2,5 mM et 481 U.mg protéine) (Giraldo et al., 2011). Il en est de même pour K_m et V_{max} montrés dans la littérature pour l'invertase libre : 24 mM (Akgol et al., 2001) et 46 mM (Tanriveven et Dogan, 2001).

Les valeurs de K_m et V_{max} déterminées dans notre étude sont inférieures à celles déterminées dans les études citées précédemment, ceci est dû d'une part à la faible concentration initiale en substrat (saccharose) dans le mélange réactionnel. D'après Rubio (2002) la concentration initiale en saccharose était de (0,15 – 1M), il a montré que l'activité hydrolytique de l'invertase accroît avec l'accroissement de la concentration initial en saccharose.

D'autre part, cette différence est due à la faible concentration en enzyme, puisque la vitesse maximale est proportionnelle à la concentration totale d'enzyme (Athel et al., 2004).

V.3.5. Estimation de la vitesse initiale de la réaction enzymatique

La vitesse initiale a été déterminé en utilisant le sucre inverti dilué (SID) (450 μ l), le tampon acétate de sodium (450 μ l) et 100 μ l de la solution d'invertase, puis incubation pendant 18 min à 40 °C. La figure 23 montre l'apparition du produit au cours du temps.

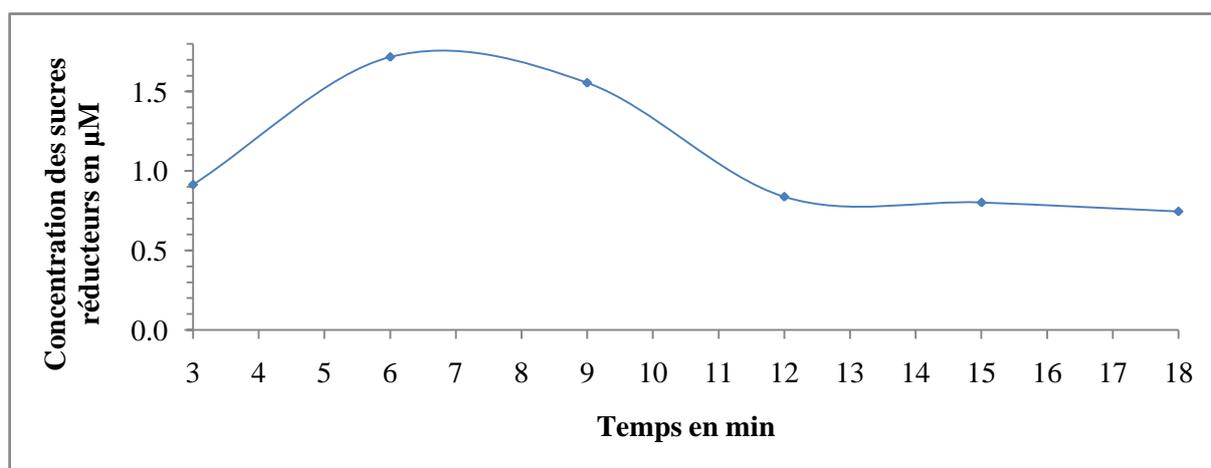


Figure 23 : Evolution de la concentration du produit en fonction du temps.

La courbe représentée dans la figure ci-dessus a la forme d'une hyperbole qui ne passe pas par l'origine, vu que le tube témoin à $t=0$ min ne contient pas d'enzyme et donc aucune réaction d'hydrolyse.

D'après la figure 23, on remarque que l'apparition du produit (sucre inverti) augmente au bout de six minutes, où il atteint son maximum ($1,7 \mu\text{M}$). D'après Athel et *al.* (2004), il est souhaitable de disposer des conditions dans lesquelles la courbe d'avancement de la réaction est quasiment linéaire pendant la période de mesure, mais en théorie un tel résultat n'existe pas. Quelle que soit le mécanisme de la réaction, la vitesse varie au cours du temps (habituellement elle décroît) pour diverses raisons que ce soit parce que le substrat est consommé, ou les produits qui s'accumulent inhibent la réaction ou parce que l'enzyme perd progressivement son activité (Athel et *al.*, 2004).

La valeur de la vitesse initiale est déterminée en traçant la tangente au temps initiale (dans notre étude 3 minute), passant par les premiers points de la partie linéaire de la courbe. Dans notre étude la vitesse initiale est estimée à $0,27 \mu\text{M}/\text{min}$.

V.4. Le pourcentage d'hydrolyse

Le tableau VIII présente les résultats des essais réalisés avec le test 01. Ces essais ont été réalisés en batch dans un Erlenmeyer sous agitation à 200 tr/ min et les résultats ont été donné en terme de pourcentage (%) d'hydrolyse, en utilisant la formule :

$$\% \text{ hydrolyse} = \text{SRT}/S_0 \times 100 \quad (\text{De Almeida et } al., 2005).$$

Tableau VIII : Résultats des essais pour la détermination du pourcentage d'hydrolyse.

| Temps d'hydrolyse en min | 10 | 20 | 30 | 60 | 100 | 120 | 150 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Absorbance à $\lambda = 540$ | 0,258 | 0,266 | 0,276 | 0,28 | 0,281 | 0,29 | 0,29 |
| SRT en μmole | 1,817 | 1,873 | 1,944 | 1,972 | 1,972 | 2,02 | 2,02 |
| S_0 en μmole | 2,052 | 2,052 | 2,052 | 2,052 | 2,052 | 2,052 | 2,052 |
| % d'hydrolyse | 90,85 | 93,66 | 94,72 | 96 | 96,093 | 98,44 | 98,44 |

La figure 24 représente le pourcentage d'hydrolyse obtenu au cours du temps.

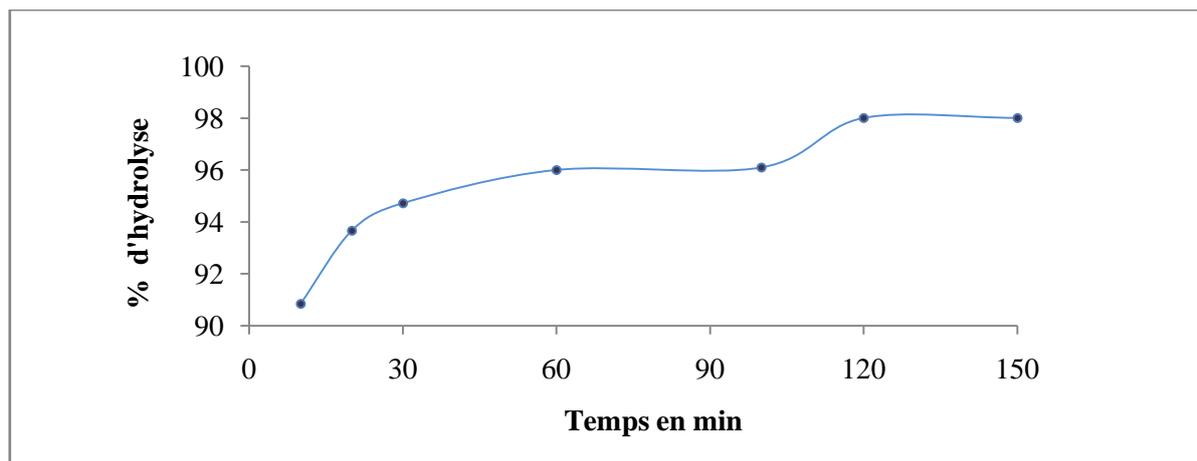


Figure 24 : Pourcentage d'hydrolyse au cours du temps.

Les essais ont été réalisés en batch sous agitation magnétique, cette dernière permet un contact surface liquide-solide plus grand et provoque la réduction du transfert de masse résistance, mais n'a pas d'influence sur l'hydrolyse autant que les autres paramètres (pH et température) (De Almeida *et al.*, 2005).

D'après les résultats illustrés dans le tableau IX et la figure 25, nous remarquons que le taux d'inversion augmente à partir d'une valeur initiale de 5,86% après un temps de 10 min. Nous avons laissé la réaction se poursuivre, et le taux d'inversion obtenu était de 96 % à 60 et 100 min avec les dosages 4 et 5, ce résultat est le même obtenu par Safarik et ses collaborateurs (2009), qui ont déterminé le pourcentage d'hydrolyse, ce dernier a augmenté de 12,83% après 60 min d'incubation (Safarik *et al.*, 2009).

Le taux d'inversion 98% a été observé lors des dosages 6 et 7 respectivement après 120 et 150 min d'incubation.

Nous avons voulu calculé le pourcentage d'hydrolyse on utilisant le refractomètre, pour cela nous avons réalisé un autre test en système batch, en utilisant une solution de sucre inversi à 85% (solution pure 45 ml) dilué dans l'eau osmosée (45 ml) et la solution d'invertase (0,2g d'enzyme/20 ml de tampon). Des prélèvements à des laps de temps différents ont été réalisés, à savoir des volumes de 50 ml après 10, 80 et 150 min de la réaction. Ces derniers, ont été acheminés dans des conditions adéquates au niveau du laboratoire contrôle de qualité de Cevital, afin de mesurer le taux d'inversion par réfractométrie. Un taux d'inversion de 98% a été observé dans les trois échantillons. Après avoir doser les protéines contenues dans les échantillons : 1, 2 et 3, ces derniers contiennent respectivement : 0,02 - 0,027 et 0,037 mg

d'invertase/ml de solution. Le taux d'inversion du saccharose reste stable au cours du temps, ce qui s'explique par la quantité d'enzyme utilisé qui catalyse la réaction pendant 10 min, au-delà aucun changement n'a été remarqué.

A partir de ces résultats, nous avons déterminé la quantité d'enzyme nécessaire pour l'hydrolyse et qui sera utilisée au niveau du complexe agroalimentaire Cevital, pour la production de sucre inverti à environ 98%. On a déterminé la quantité de l'invertase pour la production de 31m³ de sucre liquide inverti.

V.5. Détermination de la quantité d'invertase nécessaire

A partir du résultat obtenu avec l'échantillons « 2 » incubé pendant 80 min en présence de l'invertase, et à partir du résultat obtenu après dosage Bradford des protéines contenues dans le mélange réactionnel, nous avons déterminé la quantité d'enzyme nécessaire pour l'hydrolyse. Cette dernière, elle pourra être utilisée au niveau du complexe agroalimentaire Cevital, pour la production de sucre inverti à environ 98%. Nous avons déterminé la quantité de l'invertase à 837g pour un temps de contact qui est de 80 min, et ce, afin de produire 31m³ de sucre liquide inverti à 98%.

V.6. Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Le profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 12% d'acrylamide permet l'estimation de la masse moléculaire préétablie avec des marqueurs de masse moléculaire connue. Après migration, coloration et décoloration, le profil électrophorétique révèle l'existence d'une seule bande protéique active, donc l'invertase est monomérique. Deux autres bandes ont été révélées sur le profil électrophorétique qui représente la forme inactive de l'invertase ou contaminant (figure 25).

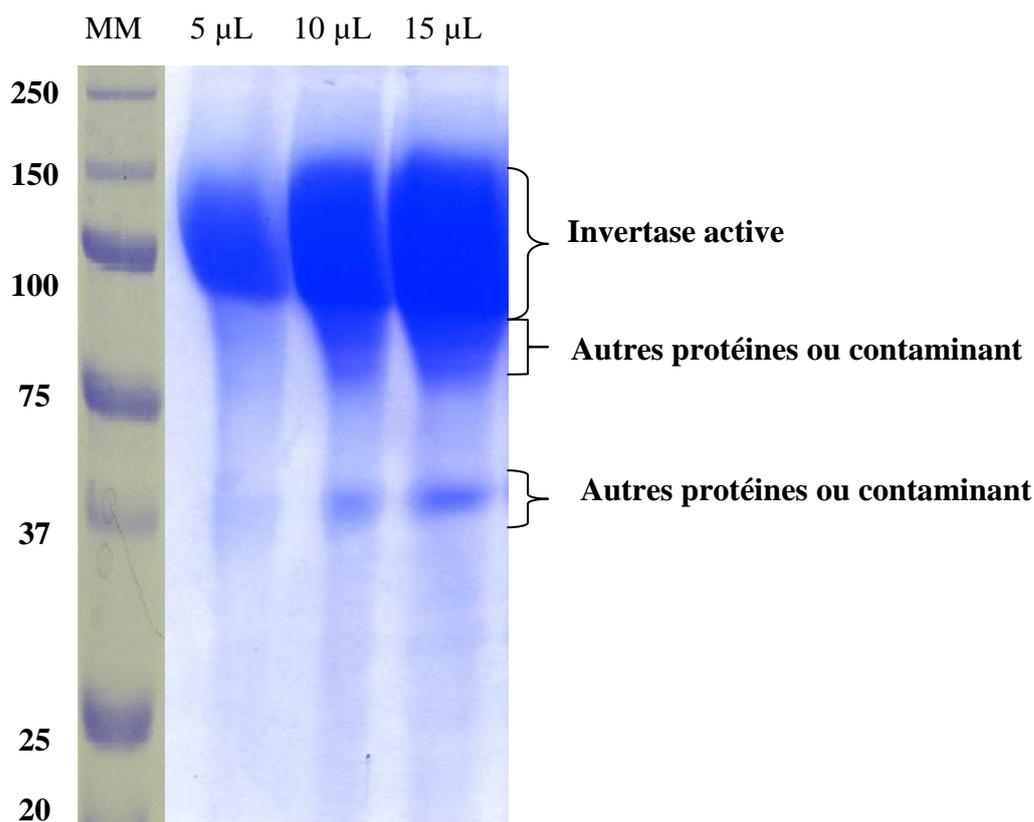


Figure 25 : Profil électrophorétique de la pureté de l'invertase utilisée pour la production du sucre inverti.

La comparaison du poids moléculaire de l'invertase de différentes souches de levures par rapport à l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* est donnée dans le tableau IX.

Le poids moléculaire est estimé à 103 kDa, ce dernier semble être inférieur à celui estimé par Tanriseven et Dogan en 2001 dans leur étude menée sur l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, qui a été estimé à 270 kDa, ce qui est due au fait que notre protéine (enzyme) n'est pas glycosylée.

Tableau IX: Poids moléculaire de l'invertase de différentes souches de levure.

| Microorganisme producteur | MM (kDa) | Références bibliographiques |
|--------------------------------------|----------|--|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 47 | (Rubio <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | 160 | (Dolores <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Condida utilis</i> | 300 | (Belcarz <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 340 | (Hidaka <i>et al.</i> , 1988 ; Hirayama <i>et al.</i> , 1989) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 103 | Notre étude |

V.7. Caractéristiques du produit fini (couleur et trouble)

Les résultats de l'analyse de la couleur et trouble sont cités dans le tableau XX ci après.

Nous constatons d'après les résultats que la couleur du produit fini traité par l'invertase répond aux normes de qualité exigés par ICUMSA. Par contre, le trouble du produit fini a augmenté, cela est dû d'une part au fait que l'invertase n'a pas été extraite du produit fini et d'autre part aux conditions non stériles et aux contaminations.

Tableau X : Caractéristiques du produit fini.

| Echantillon prélevé à partir du test 2 | 1 | 2 | 3 |
|---|----------|----------|----------|
| Temps d'hydrolyse d en min | 10 | 80 | 150 |
| Couleur en U ICUMSA | 15 | 16 | 14 |
| Trouble | 28 | 25 | 25 |
| Taux d'hydrolyse (%) | 98,23 | 98,28 | 98 |

*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Notre étude avait pour objectif, essai de production de sucre inverti $\geq 96\%$ à partir d'un sucre inverti hydrolysé chimiquement tout en utilisant une enzyme d'origine fongique l'invertase produite par *S. cerevisiae* et ceci afin de prévoir son utilisation en système batch pour l'hydrolyse des sirops de sucre au sein de la raffinerie de sucre de Cevital de Bejaia.

Pour la bonne maîtrise du processus de production du sucre liquide par hydrolyse chimique, nous avons effectué les analyses nécessaires sur la matière première, afin de suivre leur évolution au cours des différentes étapes de production. L'ensemble des résultats obtenus pour cette première partie de notre travail répondent aux normes fixées par l'usine et par conséquent aux normes européennes.

Dans l'ensemble des résultats, nous avons constaté que le produit fini répond aux normes de qualité avec un pourcentage d'hydrolyse de 98 %, et qui répond à un des principaux objectifs tracé par les responsables de production de la raffinerie de sucre de Cevital. Nous avons aussi constaté que l'invertase est une enzyme Michaelienne, ayant une affinité pour le saccharose. Les paramètres cinétiques ont été déterminés selon la représentation de Lineweaver-Burk et qui ont été estimés à $4\mu\text{M}$ et $0,75\mu\text{M}/\text{min.mg}$ d'enzyme pour K_m et V_{max} respectivement. Nous avons aussi confirmé par SDS-PAGE que l'invertase étudiée est une protéine monomérique et montrant une large bande ayant un poids moléculaire de 103 kDa.

L'optimisation des conditions opératoires ont révélé que l'invertase est à son activité maximale dans des conditions acides, elle est stable entre pH 3 – 6,5 avec une activité maximale atteinte à pH 4,0, dans le tampon acétate de sodium à 30 mM. Par ailleurs, l'invertase est stable à 40 °C pendant 1h20 min avec un temps de demi-vie à 40°C est d'environ 15 minutes.

Enfin, l'utilisation de l'invertase libre semble être limitée lors de son utilisation par l'industrie sucrière, vu que sa stabilité décroît à cause du changement du pH, de la température, de la conformation et de la pression osmotique imposés par tous ces facteurs lors de l'allongement de la durée de son utilisation. En outre, elle peut être aussi limitée à cause de son coût élevé et la difficulté de sa récupération à la fin de son utilisation. Pour cela, des procédés d'immobilisation seront envisagés comme perspectives d'avenir et ceci soit dans l'Alginate, soit dans des capsules d'alcool de polyvinyle ou même dans des déchets locaux de notre région (grignon d'olive traité) afin de préserver son activité et de rendre son réutilisation (recyclage) possible.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A-

ACER (1998). Techniques pour le dosage du sucre inverti dans le sirop d'érable, Saint-Hyacinthe, Octobre, 5p.

AFISUC (2002). Association pour la formation et le perfectionnement dans les industries sucrières, pp : 8-11.

Akgol S., Kaçar Y., Denizli A. et Arica M.Y. (2001). Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry* 74, pp : 281-288.

Alfa A. (2005). Extraction et raffinage du sucre de canne. Centre de recherche et de développement et de transfert technologique en agriculture (Centre ACER), 41p.

Alvaro-Benito M., de Abreu M.A., Fernandez-Arrojo L., Plou F.G., Jimenez-Barbero J., Ballesteros A., Polaina J. et Fernandez-Lobato M. (2007). Characterization of α -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *Journal of Biotechnology*, pp : 75-81.

Arica M. Y., Senel S., Alaeddinoglu N. G., Patır S. et Denizli A. (2000a). Invertase immobilized on spacer-arm attached pHEMA membrane, preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 75, pp : 1685-1692.

Arruda L.M.O. et Vitolo M. (1999). Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 81, pp : 23-33.

Arzate A. (2005). Extraction et raffinage du sucre de canne, Revue de l'ACER (Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en acériculture), Saint-Norbert-d'Arthabaska, novembre, 41p.

Asadi M. (2007). Extraction et raffinage du sucre de canne, Revue de l'ACER (Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en acériculture), Saint-Norbert-d'Arthabaska, Novembre, 41p.

Athel C.B., Marc J. et Valdur S. (2004). Cinétique enzymatique. Dirigée par : Jean Bornarel. Eds : EDPS Science. 419p.

-B-

Bagal D.S., Vijayan A., Aiyer R.C., Karekar R.N. et Karve M.S. (2007). Fabrication of sucrose biosensor based on single mode planar optical waveguide using coimmobilized plant invertase and GOD. *Biosens Bioelectron*, pp : 22-362.

Bailey M. J., Biely P. et Pontanem K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* ; 23, pp : 257-270.

Bali K. (1992). Etude de la carbonatation de l'eau sur la résine carboxylique et quelque analyses microbiologique lors tu traitement. Mémoire de techniciens supérieurs, option : contrôle de qualité et analyse alimentaire. Université de Bejaja, pp : 6-20.

Baron H., Carriel J.C., Marie-Saine E., Eugenie E. et Abatuci A., (1994). Le manuel du planteur de canne à sucre. CTCS-Martinique, Lamentin, 103 p.

Belcarz A., Ginalska G., Lobarzewski J. et Penel C. (2002). The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochim. Biophys.* pp : 40-53.

Bonie D. (2004). Cours de technologie industrielle : l'usine agro-alimentaire, école polytechnique universitaire de Lille, 42 p.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analetic Biochemical* 72, pp : 248-254.

Bubnik., Z. et Kadlec P. (1995). La solubilité du saccharose, Chap 5. *In : Saccharose propriétés et applications.* Coord (Mathlouthi.M et Reiser.P), pp : 106-130. 311p.

Bulchholz K., Kasche V. et Bornscheuer U.T. (2005). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Current Opinions Biocatalysts and Enzyme Technology*, pp 137-143.

Burzawa E. (1999). Rappel des bases de l'épuration calco-carbonique. Association AVH, 6^{ème} symposium, Reims, 10p.

Bussiere G., Nowak P. et Cotillon M. (1990). Les sucres invertis. *Actualités des industries alimentaires et agro-industrielles*, p 645-649.

-C-

Cao L. (2005). Immobilised enzymes: Science or art? *Current Opinions in Chemical Biology*, pp : 217-226.

CEDUS (Centre d'étude et de documentation du sucre) (2002). Le sucre Memo statistique, 12p, Paris.

Cheetham P.S.J. et Wiseman A. (1995). The applications of enzymes in industry. *In: Handbook of enzyme biotechnology* (Ed. A. Wiseman), pp : 419 - 522. Ellis Horwood, UK.

Chen W. et Liu Ch. (1996). Production of b-fructofuranoside by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme and Microbial Technology*, pp : 153-160.

Chen Y., Kang E.T., Neoh K. G. et Tan K. L. (2000). Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. *European Polymer Journal*, pp : 2095-2103.

Chi Chou C. et Chen J.C.P. (1993). Cane sugar Handbook : A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. Twelfth Edition, John Wiley & Sons Inc., NY. USA. 1075 p.

Clarke M.A. (1995). Valeur technologique du saccharose dans les produits alimentaires. Dans : *Le saccharose : propriétés et applications* (Mathlouthi M. et Reiser P.). Ed. Polytechnica, Paris pp : 236-280. 315p.

Collins C.H., Braga G.L. et Bonato P.S. (1993). *Introdução aos métodos cromatográficos*, Quinta edição, Editora UNICAMP, pp : 79-85.

Codex STAN 212 (1999). Norme codex pour les sucres (Amend. 1-2001). Ed. Codex Alimentarius.

Corma A., Iborra S. et Velty A. (2007). Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Rev.* pp : 2411-2502.

Corinne M. L. (1989). Les aliments : les produits sucrés, le sucre. Ed. Maloine, pp : 131-132.

CTCS (Centre technique de la canne et du sucre de Martinique) (1997). Dix points sur la canne, le sucre et le rhum en Martinique. Ed. Lamentin, 32 p.

-D-

Danisman T., Tan S., Kacar Y. et Ergene A. (2004). Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA–GMA membrane. Food Chemistry, pp: 85-461.

David A. E., Wang N. S., Yang V. C. et Yang A. J. (2006). Journal of Biotechnology, pp : 395-407.

De Almeida A.C.S., de Araujo L.C., Costa A.M., de Abreu C.A.M., de Andrade Lima M.A.G. et de Los Angeles M. P.F.P. (2005). Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*.

De Bruijn J. M. et Bout M. M. (1999). Analytical approach of white sugar quality: anions, cations and their probable origin. Association AVH, 6^{ème} symposium, Reims, 22p.

Decloux M. (2001). Procédé de transformation en sucrerie (partie 2) In : « Technique de l'ingénieur, p 14-17.

Decloux M. (2002). Procédé de transformation en sucrerie (partie 1). Dans : Technique de l'ingénieur, traité Agroalimentaire (F 6 150), 18p.

Decloux M., Tatoud L. et Messad A. (1999). Rétention des impuretés de refonte de sucre roux de canne par filtration tangentielle. Association AVH, 6^{ème} symposium, Reims, pp 58-63.

De la Vega M., Cejudo F. et Paneque, A. (1991). Purification and properties of an extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*. Enzyme Microbial Technology. 13, pp : 267 - 271.

Dides J.J. et Fabre P. (2007). Etude du phénotype invertase de la levure de bière. Etude de l'activité de l'enzyme invertase, 2p.

Ding W.A. et Vorlop K.D. (1995). Gel aus Polyvinylalcohol und Verfahren zu seiner Herstellung. Patent DE, 4327923.

Dodson A. (1975). Saturation solubilities of sugar Systems, Leatherland, BFMIRA, (scientific and surveys n°84), 46p.

Dolores Linde L., Isabel Macias L., Lucía Fernandez-Arrojo, Francisco J., Antonio Jimenez L. et Maria Fernandez-Lobato L. (2008). Molecular and Biochemical Characterization of α -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Doucet J. (1992). Les glucides et dérivés, produits sucrants, et substances glucidique de charge, Chap. 10, le sucre saccharose et ses dérivés traditionnels et nouveaux. *In* : Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A. Coord (Multon J. L). Ed. Lavoisier, Tec & Doc, pp : 258-278. 813p.

-F-

Farine S., Versluis C., Bonnici P. J., Heck A., L'Homme C., Puigserver A. et Biagini A. (2001). Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, pp : 55-60.

Filippusson H. et Hornby W.E. (1970). The preparation and properties of yeast β -fructofuranosidase chemically attached to polystyrene. *Biochemistry*, pp : 120-215.

Fukushima S., Nagai T. et Fujita K. (1978). Hydrophilic urethane prepolymers: convenient materials for enzyme entrapment. *Biotechnology and Bioengenergy*, pp : 9-20.

-G-

Garfin, D.E., (2003). Two-dimensional gel electrophoresis : an overview, *Trends in Analytical Chemistry*, **22** (5), 263 – 272.

Gascon S., Neumann N.P. et J. O. Lampen J.O. (1968). Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *Journal of Biotechnology Chemistry.*, pp : 1573-1577.

Ghazi I., Fernandez-Arrojo L., Garcia-Arellano H., Ballesteros A. et Plou F. J. (2007). Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology*, pp : 204-211.

Giraldo M. A., da Silva T. N., Salvato F., Terenzi H.F., Jorge J.A. et Guimaraes L.H.S. (2011). Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 28, pp : 463-472.

Goosen C., Yuan X. L., Van Munster J. M., Ram A. F., van der Maarel J. L. et Dijkhuizen L. (2007). Molecular and biochemical characterisation of anovel intracellular

invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. Eukaryot cells, pp : 674-681.

Guerin B., Gauthier A. et Ortlieb J. (1978). Les sirops (saccharose, glucose, fructose et autres édulcorants), valeur technologique et utilisation, p 28-29.

Gordon F.B. (1997). Immobilization of enzymes and cells : some practical considerations. *In* : Immobilization of enzymes and cells, pp : 1-12. Totowa, New Jersey: Humana Press.

-H-

Hayashi S., Matsuzaki K., Takasaki Y., Ueno H. et Imada K. (1992). Purification and properties of b-fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. World Journal of Microbiology Biotechnology 8, pp : 276 - 279.

Hidaka H., Hirayama M., et Sumi N. (1988). A fructo oligosaccharides producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biology Chemistry. pp: 1181-1187.

Hirayama M., Sumi N. et Hidaka H. (1989). Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC-20611. Agric. Biology Chemistry, pp : 667-673.

Hoydonck S.E., De Vos D.E., Chavan Suhas A. et Jacobs P.A. (2004).

Esterification and transesterification of renewable chemicals. Top. Catal. pp: 83-96.

Hyonak P. et Bollenback G. (1966). This is liquid sugar. Supplement. Solids tables at 20°C in vacuo and in air for sucrose, dextrose and total invert sugar. Yonkers, New York, Refined sirops and sugars, 259p.

Hugot E. (1986). Handbook of Cane Sugar Engineering. Ed. Elsevier Science Publishing Company Pub. Co. New York, USA, 1185 p.

-I-

ICUMSA. (2007). International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. Méthods GS 2/3-17.

Isik S., Alkan S., Toppare L., Cianga I. et Yagci Y. (2003). Eur. Polym. J., pp : 2375-2381.

-J-

Jackson (1924). The influence of glucose sirop and other carbohydrates on the physical properties and shelf-life of caramels, toffees, fudges conficctionery production, p39, n°4, pp: 207-210.

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G. (2006). Autres constituants des aliments. *In* : Science des aliments, chap. II. Lavoisier. Ed : Tec & Doc, pp : 33-55, 383p.

-K-

Kiger J. (1967). Matières premières 2. Matières sucrantes. *In* : Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie-boulangerie industrielle et artisanale et des produits de régime. Tom I. Paris, pp : 198-225.

Klein R., Deibel M., Sarcich J., Zurcher H., Reardon I. et Heinrikson R. (1989). Purification and characterization of invertase from a novel industrial yeast, *Schwanniomyces occidentalis*. *Biochemistry Journal* 172, pp : 15 - 22.

Kulp K. (1975). Carbohydrases. *In*: Reed G. Editor. *Enzymes in food processing*. New York Academic Press, pp : 53-122.

Kumar S., Chauhan V.S. et Nahar P. (2008). Invertase embedded-PVC tubing as a flowthrough reactor aimed at conversion of sucrose into inverted sugar. *Enzyme Microbial Technology*, pp : 43-517.

Kurup A.S., Subramani H.L., Hidajat K. et Ray A.K. (2005). Optimal design and operation of SMB bioreactor for sucrose inversion, *Chemical Engeenering Journal*, pp : 19-33.

Kong R. (1947). Invert sugar, *In* : Twenty years of conficctionery and chocolate progress. From the proceeding of the 1947 to 1966. Annual production of the Peensylvania Manufacturing confectioners's Association. Westport the Avi publishing company, pp : 670-675. (C.D.I.U.P.A., n°36057).

Kotwal S.M. et Shankar V. (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology Adv*, pp : 27-311.

Kotzelski J. et Staude E. (1996). Kinetics of bonded invertase: asymmetric polysulfone membranes. *Journal Mem. Sci.* pp : 114-201.

-L-

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

-M-

Madhusudhan M.C., Lakshmi M.C. et Raghavaram K.S.M.S. (2011). Aqueous two phase extraction of enzymes for food processing. *In* : Enhancing extraction processes in the food industry. Sun D-W, editor-in-chief. Contemporary food engineering. Taylor and Francis, pp : 437-475.

Manuel opératoire de l'entreprise. (2010). Cevital Bejaia.

Marquez L.D.S., Cabral B.V., Freitas F.F., Cardoso V.L. et Ribeiro E.J (2008). Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **51**, pp 86-92.

Mathlouthi M. (1995). Les propriétés physiques et chimiques du saccharose, dossier CEDUS avec la collaboration de l'université de Reims, 34 p.

Mathlouthi M. et Rogé B. (2004). Chapitre 9 sucreries de canne, dossier CEDUS avec la collaboration de l'université de Reimes, 7p.

Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, P : 429.

Milovanovic A., Bozic N. et Vujcic Z. (2007). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, *Food Chemistry*. pp : 81-86.

Moreno S., Sanchez Y. et Rodríguez L. (1990). Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* pp : 697-702.

Moroz R., Sullivan J., Troy J. et Broeg G. (1973). Levulose and invert sugar. *Sugar y azucar*, **68**, pp : 46-52. (C.D.I.U.P.A., n° 62501).

Mudd S.H. et Mann J.D. (1963). Activation of methionin for transmethylation. Chap : VII. Some energetic and kinetic aspects for the reaction catalysed by the methionine-activating enzyme of bakers' yeast *Journal of Biology Chemistry* **238**, pp : 2164 - 2170.

Multon J.L. (1992). Les fonctions des sucres et leurs produits de substitution dans les aliments. Dans : Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A. (Multon J.L.). Ed. Tec et Doc Lavoisier, pp 2-10.

-O-

Okuhara T. (2002). Water-tolerant solid acid catalysts. Chem. Rev. pp : 102-3641 et pp : 3641-3666.

O'Sullivan C. et Thompson F.W. (1890). *Journal of Chemistry. Soc. (Trans.)* 57, 834 - 931.

-P-

Peterson M et. Kennedy J.F. (1997). Cellulose paper support for immobilization. In F. B. Gordon, Immobilization of enzymes and cells, pp : 153-166. Totowa, New Jersey : Humana Press.

Pito D.S., Fonseca I.M., Ramo A.M., Vital J. et Canstanheiro J.E. (2009). Hydrolysis of sucrose using sulfonated ply (venyl amcool) as catalyst, 5 p.

Puel F., Veesler S. et Mangin D. (2008). Cristallisation : Aspects théoriques, 16 p.

-R-

Rachedi N. (2002). Précèdes de transformation dans la siroperie de Cevital spa. Rapport de formation.

Rebros M., Rosenberg M., Mlichova Z. et Kristofikova Z. (2007). Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. Food Chemistry 102, pp : 784-787.

Rodriguez J., Perez J. A., Ruiz T. et Rodriguez L. (1995). Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. Biochemistry Journal. pp : 235-239.

Reddy A. et Maley F. (1996). Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. Journal of Biology Chemistry, pp : 13953-13957.

Rubio MC, Runco R. et Navarro A.R (2002). Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 61, pp : 605-609.

Reiser.P et Birch. G .G et Mathlouthi. M. (1995). Chap 8. In : Saccharose propriétés et applications. (Mathlouthi M. et Resiser P.).Ed. Polytechnica. Paris, pp : 197-234. 311p.

-S-

Safarik I., Sabatkova Z. et Safaricova M. (2009). Invert sugar formation with *Saccharomyces cerevisiae* cells encapsulated in magnetically responsive alginate microparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321, pp : 1478 – 1481.

Sturm A. (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol*, pp : 121-140.

-T-

Tanaka H., Kurosawa H., Kokufuta E. et Veliky I.A. (1984). Preparation of immobilized glucoamylase using Ca-alginate gel coated with partially quaternized poly (ethyleneimine). *Biotechnol. Bioeng*, pp : 26-1393.

Tanriseven A. et Dogan S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Proces Biochemistry* 36, pp : 1081-1083.

Theoloyre M.A, Cartier S. et Decloux M. (1999). Couplage de la décoloration et de l'ananofiltration des éluants de régénération en raffinerie de canne. Association AVH, 6^{ème} symposium, Reims, 4p.

Tomotoni E.J., Vitolo M. (2006). Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *Journal Food. Engeenering* 80, p 7.

-U-

Uhlich T., Ulbricht M. et Tomaschewski G. (1999). Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinylalcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, pp : 124-131.

-V-

Vaccari G. et Mantovani G. (1995). La cristallisation du saccharose ; chap. III, *In* : Le saccharose propriétés et application. Coord (Mathlouthi M .et Reiser P.). Ed. Polytechnica, pp : 35-76. 311p.

Vierling E. (1999). Aliments et boissons filières et produits, Chap X, *In* : Science des aliments. Dirigé par (Guy Leyral). Ed Lavoisier, pp : 258-278. 813 p.

Vicente A.A. et Preparac (2000). Sacar invertido por meio de invertase imobilizada em silica, Dissertac, ao de mestrado em biotecnologia, Araraquara, 145 p.

Vlitos A.J. (1995). Aspect économique du sucre. *In* : Le saccharose propriétés et applications. Coord. (Mathlouthi M. et Reiser P.), pp : 1-10. 309p.

Voegele R.T., Wirsal S., Moll U., Lechner M. et Mendgen K. (2006). Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant-Microbe Interact*, pp : 625-634.

-W-

Wiseman A. (1978). New and modified invertases and their applications. *In*: Wiseman A, editor. Topics in enzyme and fermentation biotechnology, vol. 3. Chichester: Ellis Horwood, pp : 267-88.

Warchol M., Perrin S., Grill J.P. et Scheneider F. (2002). Caractérisation d'un b fructofurannosidase purifié de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett. Appl. Microbiol*, pp : 462 - 467.

-Y-

Yang B.Y. et Montgomery R. (2007). Alkaline degradation of invert sugar from molasses. *Bioresource Technology* 98, pp : 3084 - 3089.

-Z-

Zimmermann M. (1992). Les sucres issus des amidons (oses : sirop de glucose, fructose, dextrose). *In* : le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides des charges dans les industries agroalimentaires. Ed. TEC et DOC Lavoisier, p 282 - 310.

ANNEXES

ANNEXE I

- **Préparation de la solution DNS**

La solution de dinitrosalicylate (5g DNS, 8g soude (NaOH), 150g Tartrate de potassium sodique /500 mL Qsp d'eau distillée) est préparée à l'abri de la lumière (obscurité) puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium. Pour sa préparation on procède comme suit : mettre 150 g de tartrate de potassium sodique dans une fiole de 500 mL, ajouter 8 g de soude. Dissoudre complètement le mélange dans 300 mL d'eau distillée environ. Ajouter doucement 5g de DNS. Couvrir avec du papier aluminium et attendre jusqu'à dissolution total. Laisser refroidir et compléter le volume à 500 mL. Boucher la fiole et conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- **Préparation du réactif Bradford**

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95% et ajouter 100 ml d'acide phosphorique à 85% en remuant sans cesse. Lorsque le colorant est dissous diluée à 1 L dans l'eau. Le réactif est stable pendant jusqu'à un mois à température ambiante, mais à long terme de stockage conserve à 4 ° C, si les précipitations se produisent avant l'utilisation du filtre.

- **Les réactifs utilisés :**

| Le réactif | MM(g/mol) | Références |
|---------------------------------|-----------|---------------------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 174.18 | Biochem |
| KH ₂ PO ₄ | 136.09 | Biochem |
| Acide acétique | 60.04 | Groupe SAIDAL – FILIALE BIOTIC- |
| Glycine | 75.07 | Perfalgan : GPR. RECTAPUR. |
| Hcl | 36.5 | PROLABO |
| Acétate de soduim | 136.08 | PROLABO |
| 3,5- DNS | 228.12 | ACRO.Organics |
| Tartrate de potassium sodic | 282.23 | BIOCHEM. Chemopharma |
| TEMED | - | BIOCHEMIKA |
| Bleu de coomassie G250 | - | Standart. Fluka |
| 2-meccaptoethanol | 78.13 | Merc- Schuchardt |
| SDS | 288.38 | Fluka- Chemika |
| Acrymalide/bis acrylamide | - | SIGMA-ALDRICH |
| DTT | 154.25 | Fluka. Biochemica |
| Glycérol | 92.09 | BIOCHEM. Chemopharma |
| Glucose | 180 | BIOCHEM |
| Fructose | 180 | BIOCHEM |
| Saccharose | 342.30 | BIOCHEM |

ANNEXE II

- Les courbes d'étalonnage

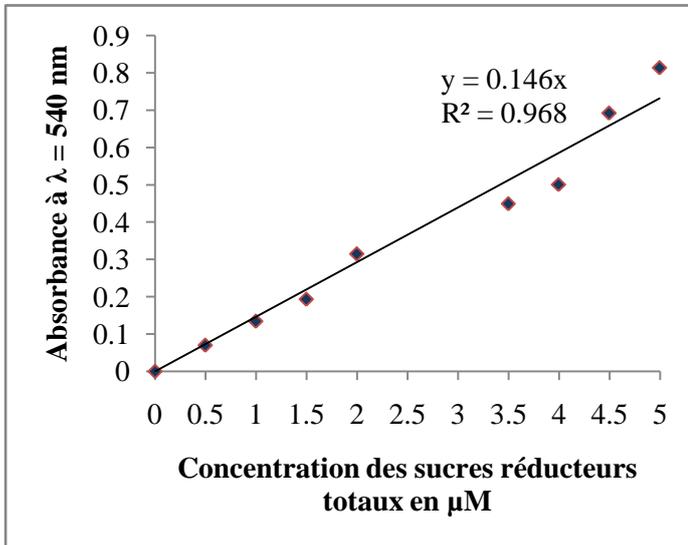


Figure II.1 : Courbe d'étalonnage avec le tampon glycine (30 mM, pH 3,0).

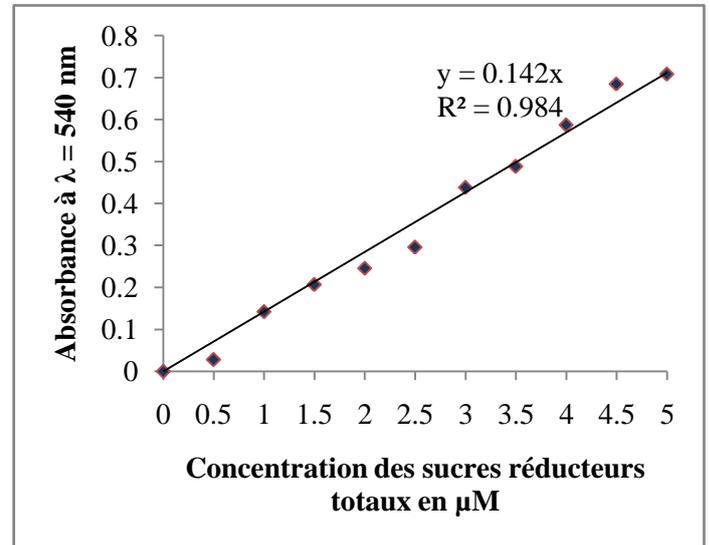


Figure II.2 : Courbe d'étalonnage avec le tampon acétate de sodium (30 mM, pH 4,0).

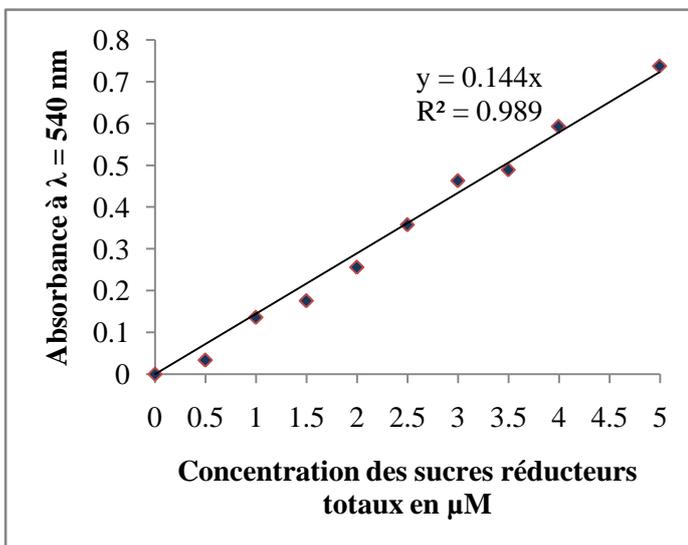


Figure II.3 : Courbe d'étalonnage avec le tampon acétate de sodium (30 mM, pH 5,0).

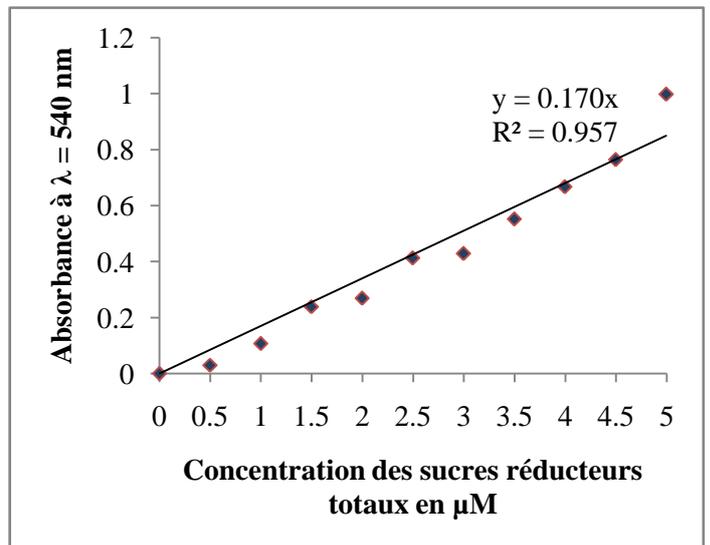
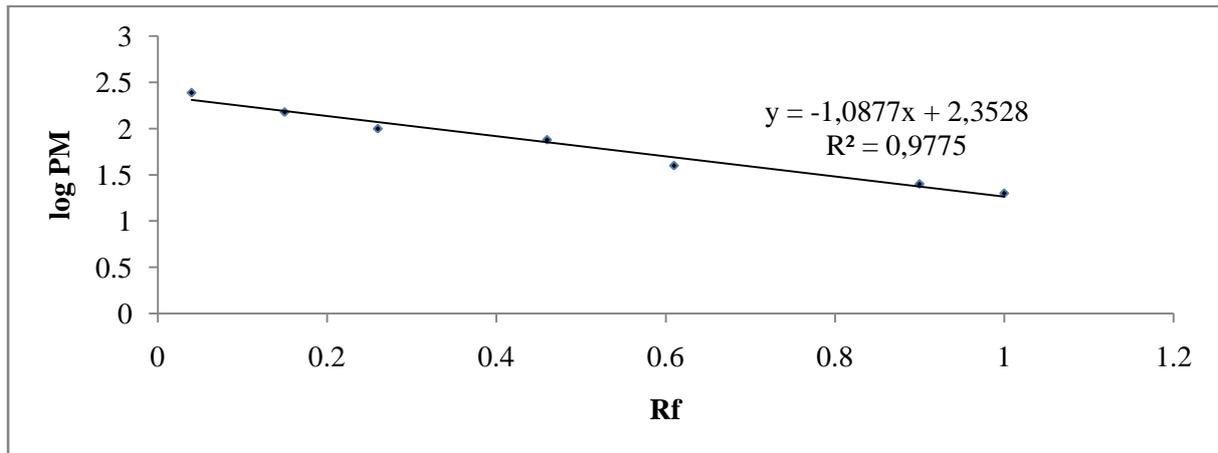


Figure II.4 : Courbe d'étalonnage avec le tampon phosphate (30 mM, pH 6,5).

• Suite annexe II



Rf : Rapport frontal.

Figure II.5 : Courbe étalon pour l'estimation du poids moléculaire.

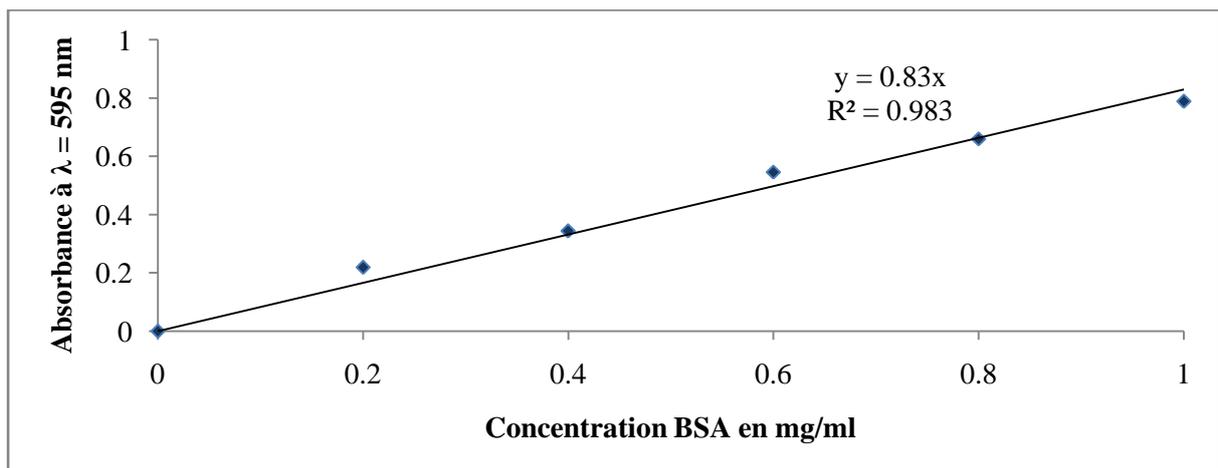


Figure II.6: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.

Résumé

L'invertase ou la β -D-fructofuranosidase est une enzyme de poids moléculaire de 103 kDa révélé par SDS-PAGE dans notre étude.

L'objectif de cette étude est l'utilisation de l'invertase de levure, *S. cerevisiae*, en système batch pour produire du sucre inverti (>96 %) à partir d'un sirop décoloré, déminéralisé et hydrolysé chimiquement par une résine échangeuse d'ions. Nous avons couplé la méthode d'hydrolyse enzymatique à l'hydrolyse chimique afin d'obtenir un produit avec une faible concentration en HMF (5-hydroxymethyl-2-furfural).

L'optimisation des paramètres optimaux montrent que l'activité maximale de l'invertase libre est observée à pH 4,0 en présence de tampon acétate de sodium et à une température de 40 °C avec une demi-vie de 135 min. Les paramètres cinétiques déterminés par la représentation de Lineweaver-Burk ont été de 4 μ M et 0,75 μ M/min pour K_m et V_{max} respectivement, et une vitesse initiale estimée à 0,27 μ M/min. Le taux d'inversion de 98% est observé en utilisant 837g d'invertase pour produire un volume de 31m³ de sucre liquide inverti.

Mots clés : Sucre inverti, Saccharose, Invertase, *S. cerevisiae*, Hydrolyse enzymatique.

Abstract

Invertase or β -D-fructofuranosidase is an enzyme with a molecular weight of 103 kDa, which is revealed by SDS-PAGE in this study.

The objective of this study is the use of *S. cerevisiae* invertase, on batch system to produce invert sugar (> 96%) from syrup discolored, demineralized and chemically hydrolyzed by an ion exchange resin. We coupled the enzymatic hydrolysis method to the chemical one, in order to obtain a product with a low concentration of HMF (5-hydroxymethyl-2-furfural).

The optimization of optimal parameters shows that the maximum activity of free invertase is observed at pH 4,0 in the presence of sodium acetate buffer and at 40 °C with a half-life of 135 min. The kinetic parameters determined by the Lineweaver-Burk representation were 4 μ M and 0,75 μ M/min for K_m and V_{max} respectively, and an initial speed is 0,27 μ M /min. The inversion rate of 98% is observed using 837g of invertase to produce 31 m³ of invert sugar.

Keywords: Invert sugar, sucrose, invertase, *S. cerevisiae*, enzymatic hydrolysis.