



## The 1<sup>st</sup> International Conference on Local Resource Exploitation

[www.lorexp.org](http://www.lorexp.org) / [info@lorexp.org](mailto:info@lorexp.org)  
REF: LOREXP\_2021\_A1056 Pages: 277–287



### Incorporation des protéases partiellement purifiées de *abrus precatorius* (linn.) dans l'alginate de calcium

#### *Incorporation of partially purified proteases from Abrus precatorius (lin.) in calcium alginate gel beads*

Wadji D. N. V.<sup>1</sup>, Mezajoug K. L. B.<sup>1,\*</sup>, Nso E. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Ngaoundéré, IUT, BP 455, Ngaoundéré-Cameroon

<sup>2</sup> University of Ngaoundéré, ENSAI, BP 455, Ngaoundéré-Cameroon

\* Auteur Correspondant : [mezajouglaurette@yahoo.fr](mailto:mezajouglaurette@yahoo.fr)

#### RÉSUMÉ :

*Abrus precatorius* est une plante de la famille des Fabaceae dont les feuilles et tiges sont utilisées localement pour attendrir la viande. Dans le but de conserver l'activité enzymatique des protéases contenues dans les extraits partiellement purifiés obtenus à partir de ses feuilles et tiges, les conditions optimales d'incorporation de ces protéases dans un gel d'alginate de calcium ont été déterminées. Pour optimiser les conditions d'incorporation des protéases partiellement purifiées de *A. precatorius* dans l'alginate de calcium, un plan composite centré a été utilisé avec pour variables : teneur en alginate (1 – 5 %), ratio enzyme/alginate (10 – 30 %), et concentration en CaCl<sub>2</sub> (100 - 400 mmol/L). La réponse mesurée est l'activité enzymatique. Le logiciel Statgraphics centurion XVII a permis d'avoir le modèle polynomial de second degré pour l'incorporation des protéases de *A. precatorius*. Les résultats ont indiqué que l'optimum était obtenu pour une teneur en alginate de 1 %, un ratio enzyme/alginate de 10 % (p/v) et une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 400 mmol/L. Au point optimum, l'activité enzymatique était de 1,5 UI.mL<sup>-1</sup>, le rendement d'immobilisation de 84,07 % et l'efficacité de chargement de 67 %. Les paramètres cinétiques de l'enzyme libre AV (1,78), Km (1,26 mg.mL<sup>-1</sup>), Vmax (153,85 µg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) étaient comparables à ceux de l'enzyme immobilisée à l'optimum AV (1,5), Km (6,83), Vm (46,95), ce qui a montré que l'activité enzymatique des feuilles et tiges de *A. precatorius* peut être conservée dans des billes d'alginate de calcium.

**Mots clés :** *Abrus precatorius*, Protéase, Activité enzymatique, Alginate de calcium, Immobilisation.

#### ABSTRACT:

*Abrus precatorius* is a plant of the Fabaceae family whose leaves and stems are used locally to tenderize meat. In order to preserve the enzymatic activity of the proteases contained in the partially purified extracts obtained from its leaves and stems, the optimal conditions for the incorporation of these proteases in a calcium alginate gel beads were determined. To optimize the conditions for incorporating partially purified proteases from *A. precatorius* into calcium alginate, a centered composite design was used with variables: alginate concentration (1 – 5 %), enzyme / alginate ratio (10 – 30 %), and CaCl<sub>2</sub> concentration (100 - 400 mmol / L). The measured response is protease activity (PA). The Statgraphics centurion XVII software provided the second-stage polynomial model for the incorporation of proteases from *A. precatorius*. The results indicate that the optimum is obtained for an alginate content of 1 %, an enzyme / alginate ratio of 10 % (w / v) and a CaCl<sub>2</sub> concentration of 400 mmol / L. At the optimum point, the protease activity was 1.5 IU.mL<sup>-1</sup>, the immobilization efficiency 84.07 % and the loading efficiency 67 %. The kinetic parameters of the free enzyme PA (1.78), Km (1.26 mg.mL<sup>-1</sup>), Vmax (153.85 µg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) were comparable to those of the enzyme immobilized at the optimum PA (1.5), Km (6.83), Vm (46.95), which showed that the protease activity of the leaves and stems of *A. precatorius* can be preserved in calcium alginate gel beads.

**Keywords:** *Abrus precatorius*, Protease, Protease activity, Calcium alginate, Immobilization.

## 1. INTRODUCTION

Les enzymes sont les biocatalyseurs des réactions thermodynamiquement possibles (Kent et al., 2017). Le marché mondial des enzymes industrielles a connu une croissance d'environ 8 % par an depuis 2013 jusqu'à dépasser 7,1 milliards \$ (2018), et dominé par les protéases (60 %). Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines et peuvent être isolées à partir de trois grandes sources : animales, végétales et microbiennes (Kent et al., 2017).

Les protéases d'origine végétale et contenues dans les extraits de plantes sont utilisées dans les procédés industriels depuis longtemps (González et al., 2011) en biotechnologie et en pharmacologie. Les écorces des arbres (*Acacia albida*), leur sève (*Calotropis procera*), les fruits des plantes (*Adenolichos anchietae*) (Libouga et al., 2006), les feuilles et tiges des plantes (*Abrus precatorius*) (Tressina et al., 2012) sont utilisés pour hydrolyser les protéines contenues dans les systèmes alimentaires.

*A. precatorius* est une légumineuse de la Famille des Fabaceae qui pousse dans les jardins de case de la région de l'Adamaoua au Cameroun et est communément appelé danrai (Glew et al., 2010). Des études récentes ont montré que l'extrait brut de *A. precatorius* pourrait être une source potentielle de protéases après leur purification (Mezajoug et al., 2014 ; Ngangoum et al., 2017). Partiellement purifiées, elles se sont révélées très actives sur divers substrats, tels que la caséine (Ngangoum et al., 2017). Cependant, les études n'ont pas encore été menées en vue de la conservation de leur activité enzymatique. En agro-alimentaire, l'alginate est le polymère le plus utilisé pour les technologies d'immobilisation et de micro-encapsulation pour ses nombreux avantages (Hamza, 2013).

Étant donné que les caractéristiques enzymatiques de *A. precatorius* sont comparables à celles de certaines protéases utilisées dans différents processus industriels et pharmaceutiques (Ngangoum et al., 2017), il serait intéressant d'évaluer les effets de l'incorporation dans un gel d'alginate sur l'activité des protéases partiellement purifiées de *A. precatorius*.

L'objectif général de ce travail est d'inclure les protéases partiellement purifiées de *A. precatorius* dans une mèche d'alginate de calcium en vue de conserver son activité enzymatique. Plus spécifiquement, nous allons déterminer les conditions optimales d'incorporation de l'extrait partiellement purifié dans l'alginate de calcium.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Matériel

Les feuilles et tiges de *Abrus precatorius* ont été récoltées dans la région de l'Adamaoua (longitude : 13°15'0" Est, latitude : 6°49'59" Nord), au Cameroun, pendant le mois de Février 2020. Les extraits brut et partiellement purifié sont obtenus par une méthode modifiée de Ngangoum et al. (2017).

### 2.2. Optimisation des paramètres d'incorporation des protéases de l'extrait partiellement purifié de *A. precatorius* dans un gel d'alginate : méthodologie du plan composite centré

Les paramètres d'immobilisation sont étudiés et optimisés afin de préserver l'activité des enzymes contenues dans les extraits partiellement purifiés de *A. precatorius*. Des variables telles que la teneur en alginate, la concentration en CaCl<sub>2</sub> et le ratio enzyme/alginate sont les trois variables pour l'optimisation de l'immobilisation de ladite protéase. La matrice expérimentale est composée de 17 essais, dont 3 points au centre, 8 points factoriels et 6 en étoile. La matrice expérimentale est présentée dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Matrice expérimentale du dispositif composite centré pour l’incorporation.

N° essais	Valeurs codées			Valeurs réelles		
	A %	B %	C mmol/L	A %	B %	C mmol/L
1	-1	0	0	1	20	250
2	-1	-1	-1	1	10	100
3	-1	-1	1	1	10	400
4	-1	1	1	1	30	400
5	-1	1	-1	1	30	100
6	0	1	0	3	30	250
7	0	0	-1	3	20	100
8	0	0	0	3	20	250
9	0	0	0	3	20	250
10	0	-1	0	3	10	250
11	0	0	1	3	20	400
12	0	0	0	3	20	250
13	1	-1	-1	5	10	100
14	1	1	1	5	30	400
15	1	1	-1	5	30	100
16	1	-1	1	5	10	400
17	1	0	0	5	20	250

**2.3. Incorporation des extraits partiellement purifiés de *A. precatorius* dans l’alginate**

La méthode de préparation des billes d'alginate est une adaptation de la méthode décrite par **Won et al. (2005)**.

**2.4. Détermination de l’activité de l’enzyme immobilisée et de la concentration de protéines**

La méthode utilisée est adaptée d’après les travaux de Benzian (2003). Dans un tube, mélanger 10 mL de substrat (caséine 1% p/v dans le tampon tris 0,5 M pH 8) et 1 mL de la solution d'enzyme. Les temps choisis sont de 1, 5, 10, 15, 30 minutes. Pour le blanc, 1 mL d’eau distillée et 5 mL du substrat ont été utilisés. Le réactif d'arrêt de la réaction est le TCA. Les absorbances ont été lues à 660 nm.

**2.5. Détermination des paramètres cinétiques de l’enzyme libre et immobilisée**

La méthode utilisée est adaptée d’après les travaux de Benzian (2003). Dans les différents tubes, introduire 10 mL de substrat à différentes concentrations (caséine 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 % p/v dans le tampon tris 0,5 M pH 8), 1 mL de la solution d'enzyme et les billes d’alginate. Les temps choisis sont de 1, 5, 10, 15, 30 minutes. Pour le blanc, 1 mL d’eau distillée et 10 mL du substrat ont été utilisés. Le réactif d'arrêt de la réaction est le TCA. Les absorbances ont été lues à 660 nm.

**2.6. Détermination de l’efficacité de chargement**

L’efficacité de chargement permet d’estimer la quantité de protéines enzymatique effectivement retenue dans le réseau de l’alginate de calcium (équation 1). Après la formation des billes d’alginate, la solution CaCl<sub>2</sub> filtrée et l’eau de lavage ont été collectés pour la détermination de l’efficacité du chargement. La quantité de protéine enzymatique est déterminée par la méthode de Lowry décrite plus haut.

$$\text{Efficacité du chargement (\%)} = \frac{(C_i * V_i) - (C_f * V_f)}{C_i * V_i} * 100 \tag{1}$$

Où  $C_i$  est la concentration initiale de protéines,  $V_i$  le volume initial de solution enzymatique,  $C_f$  la concentration de protéines dans le filtrat total, et  $V_f$  le volume total du filtrat (Won et al., 2005).

### 2.7. Détermination du rendement d’immobilisation

Le rendement d’immobilisation permet de rendre compte du pourcentage d’activité enzymatique conservée par la protéase après immobilisation. Le rendement d’immobilisation est obtenue grâce à la formule suivante (équation 2) :

$$\text{Rendement d'immobilisation (\%)} = \frac{AV_{imm}}{AV_{libre}} * 100 \tag{2}$$

Où  $AV_{imm}$  est l’activité volumique de l’enzyme immobilisée (UI/mL) et  $AV_{libre}$  l’activité volumique de l’enzyme libre (UI/mL) (Won et al., 2005).

### 2.8. Validation du modèle mathématique

Selon **Baş et Boyac (2007)**, l’élévation de  $R^2$  et des valeurs de l’analyse de déviation moyenne (AADM) permettent de vérifier l’exactitude du modèle. En effet, le  $R^2$  doit être proche de 1, l’AADM entre les données prévues et observées doit être aussi possible que possible. L’équation (1) permet de calculer l’AADM. Lorsque ces deux paramètres sont acceptables, le modèle définit le comportement vrai du système et peut par conséquent être employé pour extrapoler le domaine expérimental.

Pour confirmer et accepter le modèle, on compare les valeurs théoriques et observées.les équations (2) et (3) permettent de calculer le facteur de Biais et le facteur d’exactitude respectivement. Le tableau 2 présente les paramètres permettant la validation du modèle.

$$AADM = \frac{\sum_{i=1}^N \left( \frac{|y_i \text{ exp} - y_i \text{ cal}|}{y_i \text{ exp}} \right)}{N} \tag{3}$$

$$Bf = 10^{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \log \left( \frac{y_i \text{ cal}}{y_i \text{ exp}} \right)} \tag{4}$$

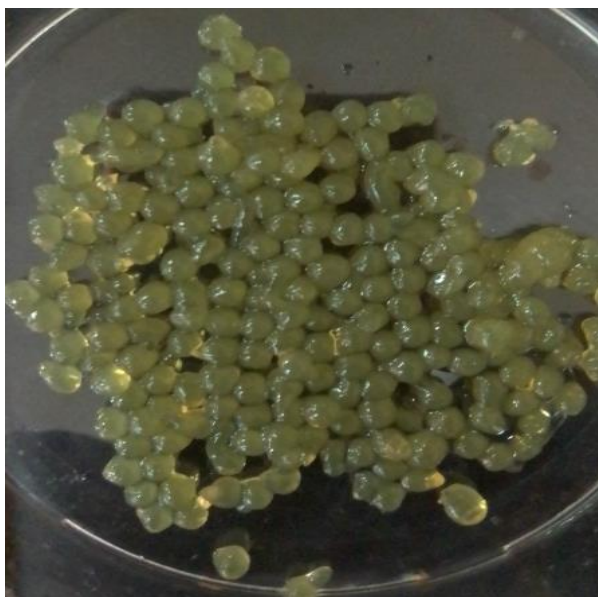
$$Af = 10^{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\log \left( \frac{y_i \text{ cal}}{y_i \text{ exp}} \right)|} \tag{5}$$

**Tableau 2 :** Valeurs des paramètres pour la validation du modèle.

Paramètres de validation	Valeurs	Valeurs	Références
	Standards	Acceptables	
$R^2$	$\approx 1$	/	Joglekar & May (1987)
$R^2$ ajusté	$\approx 1$	$>0,80$	
AADM	0	[0-0,3]	(Baş & Boyac, 2007)
Facteur de biais ( $B_f$ )	1	[0,75-1,25]	Dalgaard & Jorgensen 1998
Facteur d’exactitude ( $A_f$ )	1	[0,75-1,25]	Dalgaard & Jorgensen 1998

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 présente les billes d'alginate emprisonnant les enzymes partiellement purifiées de *A. precatorius*.



**Figure 1** : Billes d'alginate contenant l'extrait enzymatique partiellement purifiées de *A. precatorius*

#### 3.1. Résultats du plan d'expérience

Les réponses expérimentales et calculées des 17 expériences du plan d'expérience appliqué à l'extraction des protéines de *A. precatorius* sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Réponses expérimentales et calculées des expériences

N°	A	B	C	Activité volumique (expérimentale)	Activité volumique (calculée)
1	1	10	100	0,900	0,867
2	1	20	250	1,250	1,200
3	1	10	400	1,429	1,516
4	1	30	100	0,876	0,920
5	1	30	400	0,650	0,602
6	3	30	250	0,602	0,606
7	3	10	250	0,945	0,831
8	3	20	400	0,640	0,556
9	3	20	250	0,618	0,781
10	3	20	250	0,710	0,781
11	3	20	250	0,795	0,781
12	3	20	100	0,708	0,682
13	5	30	100	1,066	1,006
14	5	20	250	0,848	0,788
15	5	10	100	0,467	0,542
16	5	30	400	0,043	0,104
17	5	10	400	0,623	0,607

Le tableau 3 montre que les facteurs étudiés (teneur en alginate (A), concentration en CaCl<sub>2</sub> (B) et ratio enzyme/alginate (C)) influencent la réponse expérimentale observée. En effet quelques soient la combinaison des facteurs, on obtient des réponses différentes. On constate également que pour la plupart, les valeurs expérimentales sont très proches des valeurs calculées.

L'activité volumique exprime l'activité d'un volume de matière. Le logiciel Statgraphics centurion XVII a permis d'avoir le modèle polynomial de second degré pour l'incorporation des protéases de *A. precatorius* qui est le suivant (équation 3) :

$$Y = 0,340314 - 0,404129*A + 0,0383818*B + 0,0078576*C + 0,0533732*A*A + 0,0051375*A*B - 0,000487*A*C - 0,00061907*B*B - 0,00016115*B*C - 0,0000071892*C*C \tag{6}$$

Avec **Y** = activité volumique, **A** = teneur en alginate, **B** = ratio enzyme/alginate et **C** = concentration en CaCl<sub>2</sub>

Ce modèle a un coefficient de détermination (R<sup>2</sup>) de 0,94. Ce coefficient de détermination, combiné au R-carré ajusté de 0,87, à l'AADM de 0,156, au facteur de biais (B<sub>f</sub>) de 1,05 et au facteur d'exactitude (A<sub>f</sub>) de 1,13 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi de l'activité volumique, car il respecte les plages de validation recommandées (Tableau 2). Le modèle proposé est valide et il convient dès lors de voir quels sont les éléments qui ont influencé au seuil de 5 % sur les réponses étudiées.

L'analyse de la variance (ANOVA), pour déterminer si les niveaux différents des facteurs et les interactions ont un effet mesurable sur la réponse, est présenté sur le tableau 4.

**Tableau 4 :** Tableau d'analyse de la variance.

Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne quadratique	Rapport F	Probabilité
A:ALG	0,423536	1	0,423536	35,06	<b>0,0006</b>
B:ENZ ALG	0,127013	1	0,127013	10,52	<b>0,0142</b>
C:CaCl <sub>2</sub>	0,0399424	1	0,0399424	3,31	0,1118
AA	0,122005	1	0,122005	10,10	<b>0,0155</b>
AB	0,0844605	1	0,0844605	6,99	<b>0,0332</b>
AC	0,171113	1	0,171113	14,17	<b>0,0070</b>
BB	0,0103341	1	0,0103341	0,86	0,3858
BC	0,467545	1	0,467545	38,71	<b>0,0004</b>
CC	0,0699722	1	0,0699722	5,79	<b>0,0470</b>
Erreur totale	0,0845536	7	0,0120791		
Total (corr.)	1,54941	16			

**En gras :** Facteurs significatifs.

Il ressort du tableau ANOVA que la teneur en alginate et son effet quadratique, le ratio enzyme/alginate, l'interaction teneur en alginate et ratio enzyme/alginate, l'interaction teneur en alginate et concentration en CaCl<sub>2</sub>, l'interaction ratio enzyme/alginate et concentration en CaCl<sub>2</sub> et l'effet quadratique de la concentration en CaCl<sub>2</sub> influencent significativement l'activité volumique de l'enzyme immobilisée.

▪ **Surface de réponse et contour plot pour la valeur au centre de la concentration en CaCl<sub>2</sub> (250 mmol/L)**

L'effet de l'interaction entre la teneur en alginate et le ratio enzyme/alginate sur l'activité volumique a été étudié et représenté sur les figures 2 et 3, ceci après avoir fixé la concentration en CaCl<sub>2</sub> (250 mmol/L).

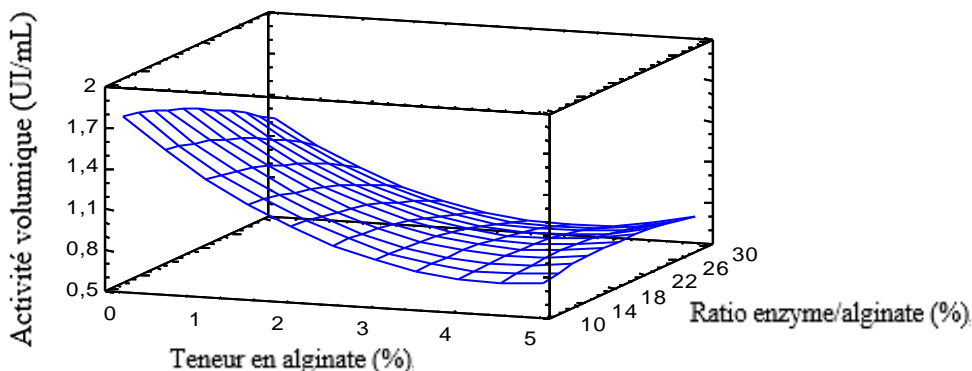


Figure 2 : Surface de réponse pour la valeur au centre de la concentration en CaCl<sub>2</sub> (250 mmol/L)

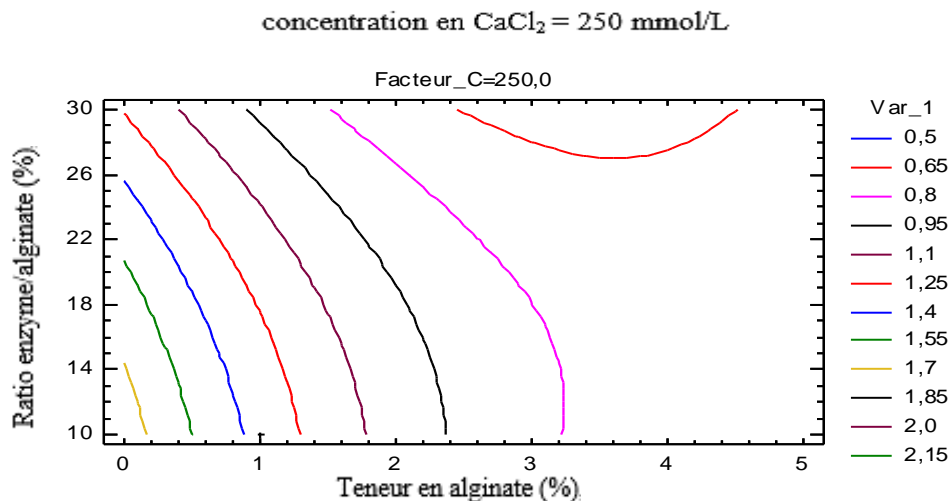


Figure 3 : Graphique des contours de la surface de réponse estimée

Les lignes de contour de la figure 3 nous montrent que les effets combinés de la teneur en alginate et le ratio enzyme/alginate contribuent significativement à diminuer l'activité volumique. Cette diminution serait corrélée à l'augmentation de la valeur de ces deux facteurs. Ainsi, Pour obtenir des billes avec une activité volumique moyenne, il faudrait donc trouver un compromis entre ces deux facteurs en les couplant à une concentration en CaCl<sub>2</sub> appropriée.

**3.2. Vitesse initiale de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée**

Afin d'obtenir la courbe donnant la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, la protéase libre et immobilisée ont été placées en présence de diverses concentrations en caséine (0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 %) dans le tampon Tris 50 mM, pH 8,0 et à 37 °C. La Figure 4 montre les profils de la vitesse de la réaction de l'enzyme libre et l'enzyme immobilisée en fonction de la concentration en caséine.

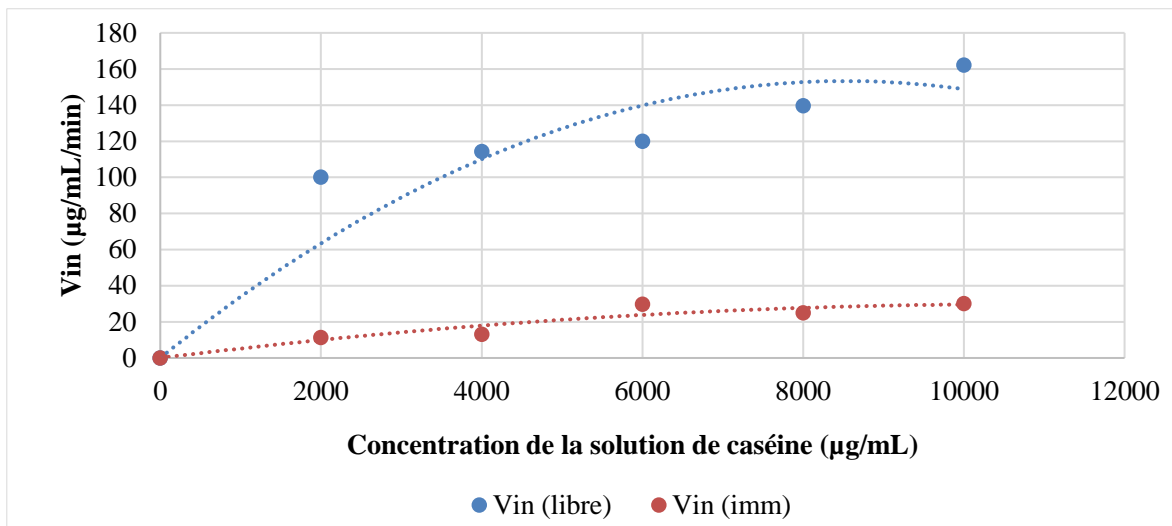


Figure 4 : Vitesse initiale de l’enzyme libre et de l’enzyme immobilisée

On observe un écart croissant de la vitesse de la réaction au fur et à mesure que la concentration en substrat augmente jusqu’à un facteur de stabilité de l’ordre 6 : 1. Au cours de la réaction enzymatique, le pH et la température qui sont deux paramètres influençant la vitesse d’une réaction enzymatique ont été maintenus constants. L’augmentation de la vitesse de réaction enzymatique est liée à celle du substrat. Les valeurs plus élevées avec l’enzyme libre, peuvent se justifier par l’encombrement stérique. En effet, l’encapsulation de l’enzyme par l’alginate réduit considérablement l’accès des sites actifs d’enzyme au substrat car les pores permettant la perméation ou la diffusivité de ce dernier vers l’enzyme piégé est réduit.

### 3.3. Effets de l’immobilisation sur la capacité d’hydrolyse de la protéase de *A. precatorius*

Pour visualiser cet effet, une cinétique d’hydrolyse de la caséine (substrat) a été suivie par mesure de la quantité de tyrosine libérée en fonction du temps. En effet la tyrosine est un acide aminé C-terminal de la caséine. Les courbes de la figure 5 montrent la quantité de la tyrosine libérée en fonction du temps de réaction.

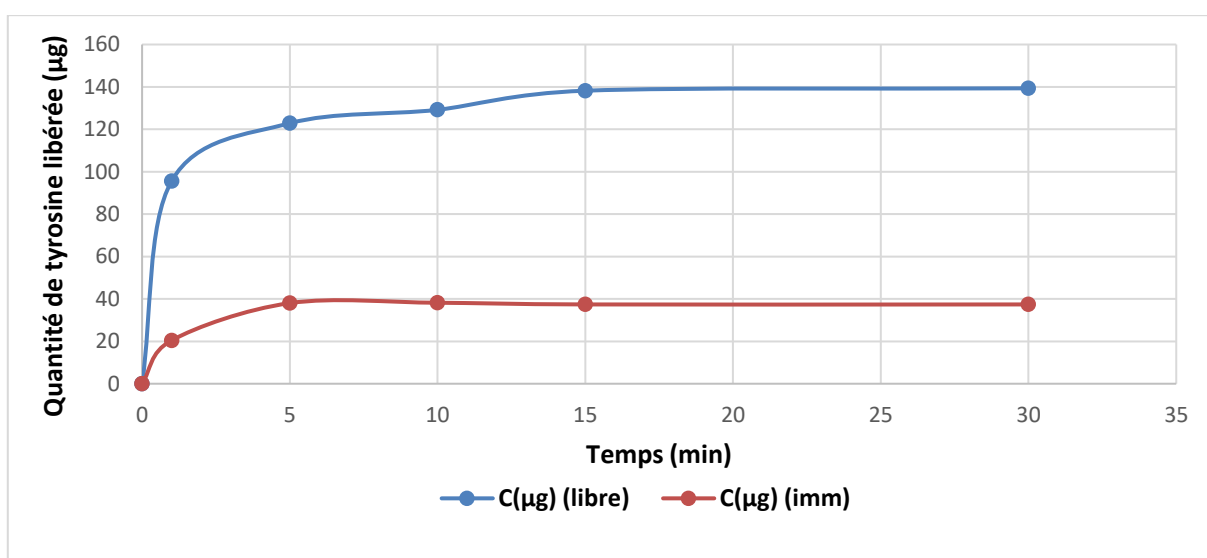


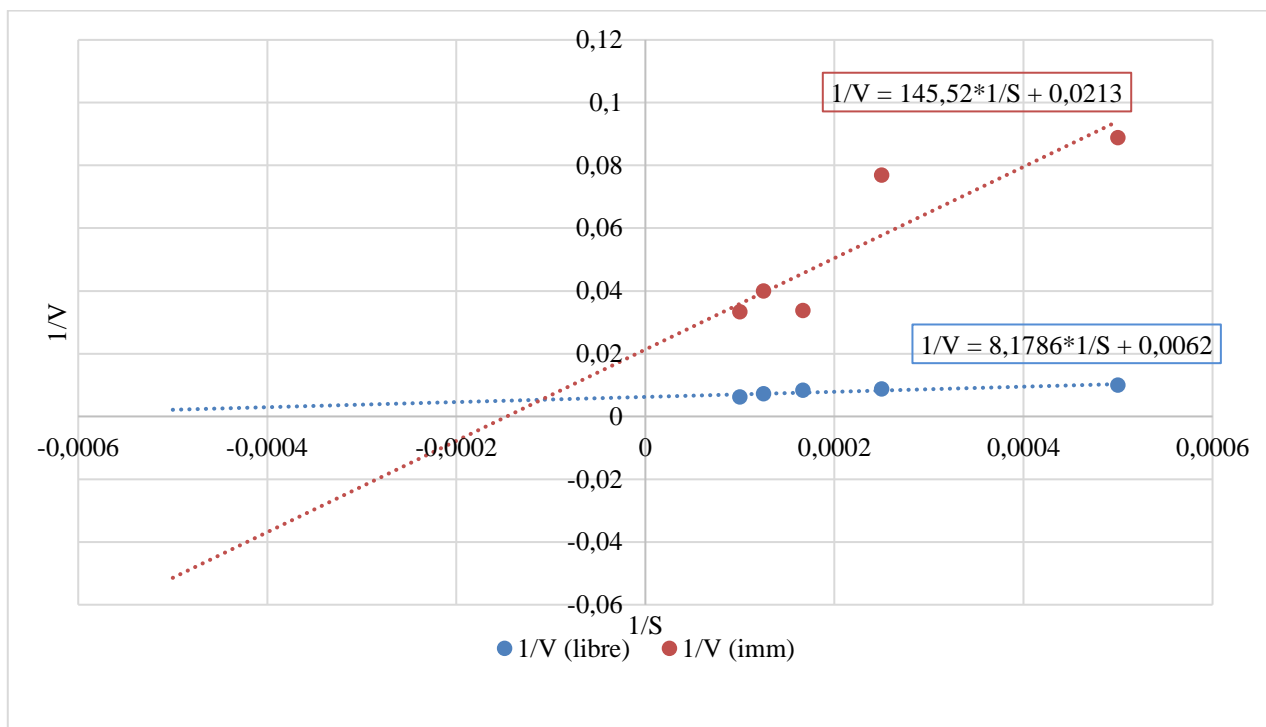
Figure 5 : Quantité de tyrosine libérée en fonction du temps



De cette figure il ressort une fois de plus que le taux de libération du produit (tyrosine), est nettement plus réduit pour l'enzyme immobilisée par rapport à l'enzyme libre, ceci avec un facteur de 1 : 3. On constate également dans les deux cas que la cinétique est instantanée et que les deux courbes ont la même allure car l'immobilisation des enzymes ne change pas le mécanisme de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment.

### 3.4. Vitesse maximale (V<sub>m</sub>) et la constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée

Pour obtenir V<sub>m</sub> et K<sub>m</sub>, on trace les droites de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. Les représentations de Lineweaver-Burk, de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée sont présentées à la figure 6.



**Figure 6 :** Représentation Lineweaver-Burk de l'effet de la protéase de *Abrus precatorius* immobilisée sur la concentration en substrat (solution de caséine 1 %)

La protéase libre de *A. precatorius*, avec une V<sub>m</sub> de 153,85 µg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> hydrolyse plus rapidement la caséine que celle immobilisée qui a une V<sub>m</sub> de 46,95 µg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> sur le même substrat.

La constante de Michealis (K<sub>m</sub>) correspond à la valeur de la concentration du substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la V<sub>m</sub>. Avec une K<sub>m</sub> de 1,26 mg/mL, la protéase libre de *A. precatorius* a une forte affinité pour la caséine comparée à celle immobilisée (6,83 mg/mL).

Cette différence de réactivité pourrait s'expliquer par le fait que l'immobilisation des enzymes affecte leurs propriétés cinétiques selon les indications de Liang et al. (2000). Ainsi, dans le cas de l'immobilisation de la protéase de *Abrus precatorius* dans les billes d'alginate de calcium, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat (caséine) au niveau des sites enzymatiques.

### 3.5. Efficacité de chargement

L'efficacité de chargement permet d'estimer le pourcentage de protéines enzymatiques effectivement retenues dans le réseau de l'alginate de calcium. Cette mesure a été faite au point optimal (1 % ; 10 % ; 400 mmol/L). Le pourcentage de protéines retenues dans les perles au point optimal est de 67 %. Plus de 50 % de la quantité d'enzyme a pu être retenue dans le réseau. L'encapsulation dans l'alginate de calcium est donc efficace pour emprisonner suffisamment d'enzyme.

### 3.6. Rendement d'immobilisation

L'activité d'une enzyme immobilisée est l'activité d'une enzyme dont les propriétés intrinsèques peuvent avoir été modifiées du fait de l'immobilisation et qui est atteinte par des réactants à une concentration différente de celle qui atteint l'enzyme soluble. De plus, toutes les molécules d'enzyme n'ont pas un comportement identique car la modification des propriétés intrinsèques est plus ou moins importante d'une molécule d'enzyme à une autre. Ces modifications vont jouer un rôle déterminant sur l'activité et sur la stabilité de l'enzyme. Les principaux phénomènes à l'origine de ces altérations sont : la modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme sous l'action des contraintes dues à la fixation, la modification du micro-environnement : pH local, interactions électrostatiques, les contraintes diffusionnelles, et l'encombrement stérique (Hamad, 2003).

Le rendement de l'immobilisation a été défini comme le rapport entre l'activité volumique de l'enzyme immobilisée sur celle de l'enzyme libre. Les activités volumiques des enzymes immobilisées sont plus petites (0,04 à 1,42 UI/mL) que celles de l'enzyme libre (1,78 UI/mL). Le rendement de l'activité protéasique immobilisée était de 84,07 %. Des études consultées ont confirmé la perte de 20 à 30 % de l'activité pour l'enzyme immobilisée par rapport à l'activité initiale de l'enzyme libre. Ainsi Loncle et al., (1992) indiquent une diminution d'activité de 25 à 30 % après l'immobilisation de l' $\alpha$ -amylase et la protéase. Lors de ce travail, une perte de 15,93 % a été constaté.

## 4. CONCLUSION

Les effets des conditions d'immobilisation telles que la teneur en alginate, le rapport enzyme / alginate et la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité enzymatique de l'extrait partiellement purifié de *Abrus precatorius* ont été étudiés. L'activité volumique diminue proportionnellement avec la teneur en alginate, l'activité diminue à mesure que la quantité d'enzyme augmente, au-dessus de 200 mmol / L (concentration de  $\text{CaCl}_2$ ), l'activité volumique diminue. Il y a une différence croissante dans la vitesse de réaction lorsque la concentration du substrat augmente jusqu'à un facteur de stabilité de 6 : 1. Pour l'hydrolyse de l'enzyme immobilisée et libre, la cinétique est instantanée et le mécanisme de réaction est le même. L'enzyme immobilisée s'hydrolyse 1 : 3 fois moins que l'enzyme libre. La protéase libre d'*A. Precatorius* a une forte affinité pour la caséine par rapport à celle immobilisée. Le pourcentage de protéine retenu dans les billes au point optimal est de 67 %. Le rendement d'immobilisation est de 84,07 %. Parmi les paramètres testés, la teneur en alginate et le rapport enzyme / alginate étaient plus importants pour le piégeage de la lipase dans les billes de Ca-alginate.

## 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anwar A., Qader S.A.U., Raiz A., Samina I. and Abid A., 2009. Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*, **7**(10), 1281–1286.
- Benzian S.I., 2003. Immobilisation de la  $\beta$ -fructosidase de *saccharomyces cerevisiae* et étude des phénomènes de transfert de matière, mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en biologie ; Option biologie moléculaire et cellulaire ; Université Aboubekr Belkaid Tlemcen ; République Algérienne Démocratique Et Populaire.
- Glew, H.R., Kramer, G.K.J., Hernandez, M., Pastuszyn, A., Jennifer E.J., Djomdi, N.N. and Vanderjagt, J.D., 2010. The Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Contents of Three Species of Human Plants Foods in Cameroon. *Food*, **4**(1), 1– 6.
- González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M.C., 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. *Biotechnology Advances*, **29**, 983–996.
- Hamad H., 2003. Études des méthodes d'immobilisation d'enzyme (trypsine) sur un support solide pour la cartographie peptidique par microréacteur, Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc. en chimie), Université de Montréal, 110 p.
- Kent James A., Tilak V. Bommaraju, Scott D. Barnicki., 2017. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Thirteenth Edition, Springer International Publishing AG, Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland, DOI 10.1007/978-3-319-52287-6.

- Liang J.F., Yang T., Lee S., 2000. Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of pharmaceutical Sciences*, **89**(8), 979–990.
- Libouga, D.G., Vercaigne-Marko, D., Sana, L.D., Choukambou, I. And Ebangi, A.L., 2006. Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*, **24**, 229–238.
- Loncle, M. A., Novella I.S., Garcia L.A. And Diaz M., 1992. Diffusion of proteases in calcium alginate beads. *Enzyme Microb. Technol.*, (14), 586-590,
- Mezajoug Kenfack, L.B., Ngangoum, E.S., Linder, M. and Tchiégang, C., 2014. Proteolytic Enzymes from *Abrus precatorius* Linn., *Burnatia enneandra* Micheli. And *Ziziphus mauritiana* Lam: Optimization of the Extraction Process by Response Surface Methodology. *The Journal of Bioprocess Technology*, **100**, 453–451.
- Ngangoum E. S., Mezajoug Kenfack Laurette L., Kumar S., Tchiégang C. & Vijayalakshmi M., 2017. Extraction, purification, and biochemical characterization of serine protease from leaves of *Abrus precatorius*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI:10.1080/10826068.2017.1373289.
- Tressina, S.P. and Mohan, R.V., 2012. Comparative Assessment on the Nutritional and Antinutritional Attributes of the Underutilized Legumes, *Canavalia gladiata* (JACQ.) DC, *Erythrina indica* LAM. And *Abrus precatorius* L. Tropical and Subtropical Agrosystems, **15**, 539–556.
- Won K. A., Sangbum K., Kwang-Je K., HongWoo P., Sang-Jin M., 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, **40**, 2149–2154.