

- **Président d'honneur :**
Pr.NIAR Abdelatif

 - **Directeur de la revue et de rédaction :**
Pr. DELLAL Abdelkader, *Directeur de Laboratoire d'Agro-Biotechnologie et de Nutrition en Zones Semi Arides*

 - **Directeur de Publication:**
Pr. MAATOUG M'hamed

 - **Comité de rédaction :**
Mr AIT HAMMOU Mohamed
Dr REZZOUG waffa
Dr SASSI mohamed

 - **Contrôle technique et suivi de publications:**
AIT AMRANE Abdsalem, responsable de la bibliothèque de la *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*

 - **Soumission des articles :**
Les manuscrits (original et deux copies) doivent être envoyés à l'adresse suivante :
Revue : Ecologie - Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun BP 78, Tiaret 14000, Algérie
- Tél/Fax : 0021346453494**
Page Web : <http://www.univ-tiaret.dz>
E-mail: revue_eco@mail.univ-tiaret.dz

Comité Scientifique

Pr. DELLAL Abdelkader, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Pr. SAHNOUNE Mohamed, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Pr. MAATOUG M'hamed, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Pr. LATIGUI Ahmed, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Pr. BENABDELLI Khèloufi, Centre Universitaire de Mascara, Algérie.

Pr. GARREC Jean pierre, Laboratoire de Pollution atmosphérique, Nancy, France.

Pr. HELLAL Benchaaben, Université Djillali Liabès, Algérie.

Pr. BELHKODJA Moulay, Université d'Es-Senia, Oran, Algérie.

Pr. LATRECHE Ali, Université Djillali Liabès, Algérie.

Dr. ADDA Ahmed, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Dr. MERAH Othmane, Laboratoire de chimie agroindustrielle, UMR 110 ENCIASET Toulouse, France.

Dr. MOTHE Frédéric, INRA de Nancy France.

Dr. HADJ AHMED Ahmed, Université de Damas, Syrie.

Dr. KHALDI Abdelkader, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Dr. HADJ SAID Aissa, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Dr. ZERARKA Abdelkader, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

Dr. AYMAN suleiman, Université Amman, Jordanie.

Dr. REZZOUG Waffa, Université Ibn Khaldoun, Algérie.

EXTRACTION DE LA CHITINASE A PARTIR DE QUELQUES VARIETES DE CEREALES (BLE, RIZ)

DOUKANI Koula

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun, Algérie

Résumé

Le but de notre étude est d'extraire l'enzyme de la chitinase à partir de quelques variétés de céréales (blé, riz). En utilisant des solutions de pH différents, l'eau distillée (pH 7) est trouvé meilleur comme solution d'extraction de cette enzyme. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la chitinase est modulée par plusieurs facteurs physicochimiques tels que la température, le pH, la stabilité thermique. Le pH optimum est égal à pH 8 avec une température optimale de 40°C pour la chitinase du blé. En revanche, le pH optimum de la chitinase de riz est de pH 7 avec une température optimale de 45°C. La chitinase des deux types de céréales est caractérisée par une grande thermostabilité pendant 2.5 heures entre 40 et 50 °C. Concernant l'étude cinétique de la chitinase, la valeur de Km est égale à 1.58 mg.ml⁻¹ pour la chitinase de blé et 1.11 mg.ml⁻¹ pour la chitinase de riz.

Mots clés: Chitinase, Extraction, Riz, Blé, paramètres physicochimiques, cinétique.

المـلـخـص

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص إنزيم الكيتيناز من بعض أصناف الحبوب (القمح، الأرز) باستخدام محاليل ذي أرقام هيدروجينية مختلفة، وجد أن الماء المقطر أفضل محلول لاستخلاص هذا الإنزيم. تظهر النتائج المتحصل عليها أن فعالية إنزيم الكيتيناز تتغير بعدة عوامل فيزيو كيميائية كدرجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني و الثبات الحراري. - وجد أن درجة الحرارة المثلى لكيتيناز القمح 40 درجة مئوية، و الرقم الهيدروجيني الأمثل 8 أما بالنسبة لكيتيناز الأرز، فكانت درجة الحرارة المثلى 45 درجة مئوية و الرقم الهيدروجيني الأمثل 7. تتميز كيتيناز كلا نوعي الحبوب بثبات حراري عالي ما بين 40 و 50 درجة مئوية لمدة ساعتين و نصف. - أما بالنسبة لحركيات الكيتيناز، كانت قيمة ثابت ميكاليس 1.58 مغ-مل-1 بالنسبة لكيتيناز القمح و 1.11 مغ-مل-1 بالنسبة لكيتيناز الأرز. **الكلمات الدالة:** الكيتيناز، الإستخلاص، الأرز، القمح، العوامل الفيزيوكيميائية، الحركيات.

Abstract

The aim of our study is to extract chitinase from some varieties of cereals (Rice and Wheat). With the utilization of solutions with different pH, distilled water is found to be the best for enzyme extraction. Obtained results showed that chitinase activity is modulated by various physico-chemicals parameters such as temperature, pH, thermal stability. It was found that maximal chitinase activity is obtained at pH 8 and 40°C for wheat and at pH 7 and 45°C for rice. The two types of extracted chitinase was characterized by their higher thermal stability for 2.5 hours between 40 and 50 °C. Concerning chitinase kinetics study, the Km value is found to be 1.58 mg.ml⁻¹ for wheat chitinase and 1.11 mg.ml⁻¹ for rice chitinase.

Key words: Chitinase, extraction, rice, wheat, physico-chemicals parameters, kinetics

Introduction

De mémoire d'homme, les céréales ont toujours constitué le principal aliment de toutes les civilisations. Les céréales complètes sont fondamentales pour l'organisme, contiennent des éléments nutritifs essentiels en quantité importante ; des glucides ou hydrates de carbone présents dans l'amidon, des protéines avec une composition variable en acides aminés, de nombreuses vitamines (surtout celles du groupe B), des minéraux et des oligo-éléments (Bonjean et Picard, 1990). Plus d'un milliard de tonnes de céréales sont produites annuellement dans le monde, les principales céréales sont le blé, le maïs et le riz (Mohtadji, 1989). La production mondiale de tous les types de blés est de 660 millions de tonnes lors de la campagne 2009-2010, c'est-à-dire près de 100 kg par habitant pour l'ensemble de la population mondiale. En volume de production, c'est la quatrième culture mondiale derrière la canne à sucre, le maïs et le riz (C.I.C, 2009). La production générale de riz fluctue moins que celle du blé, du fait notamment des moindres enjeux économiques et politiques. En 2008, la production mondiale de riz paddy s'est élevée à 661 millions de tonnes contre seulement 585 en 2003 (FAO, 2008).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Elles sont des macromolécules qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme (Raisonnier, 2003). Les différents organismes produisent une large variété d'enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats. La chitinase fait partie de ces enzymes qui hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique β (1-4) N-acétylglucosamine. Elle est très répandue dans la nature. On la trouve chez les bactéries, champignons, crustacés, insectes et les plantes spécialement les céréales. Elle joue un rôle important dans la lutte biologique contre les infections fongiques (Perrakis et al., 1994).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la chitinase en raison de son abondance dans les céréales et sa facilité d'extraction. Notre étude a contribué à l'extraction de cette enzyme à partir de quelques variétés de céréales (blé et riz) avec l'évaluation de quelques propriétés physico-chimiques telles que la température, le pH, la stabilité thermique et la concentration en substrat.

Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Technologie alimentaire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret. Cette étude s'est déroulée durant le période du Mars 2010 jusqu'à Novembre 2010. .

Les céréales utilisées dans notre étude sont le blé tendre et le riz. Le blé tendre provient de la variété algérienne (HD1220) et issue de la récolte 2009. Le riz utilisé dans notre étude provient du marché local. C'est un type chinois à grains longs.

Le nettoyage a été fait manuellement. Les grains des céréales ont été débarrassés en toutes leurs impuretés : graines étrangères, graines d'autres céréales, pailles, pierres, pièce métallique, déchets d'animaux (rongeurs, insectes) avant d'être broyées.

Le broyage de nos échantillons a été effectué à sec et à basse température par l'utilisation d'un broyeur de type Moulinex .Le broyat a été tamisé par l'utilisation d'un tamis de

0.25 mm de diamètre fixé sur un agitateur par vibration à vitesse élevée jusqu'à l'obtention d'une farine fine.

Extraction de la chitinase

Trois types de solutions : eau distillée (pH 7), tampon acétate (pH 4) et tampon carbonate (pH 9) ont été utilisés pour extraire la chitinase à partir de deux variétés de céréales (blé et riz). Chaque type de solution d'extraction a été ajouté à 10 g de chaque type de farine pour obtenir un volume de 100 ml (le taux d'extraction de chaque type de farine est 10% P/V). Le contenu a été mélangé en secouant (20 min) sur un agitateur de vitesse de (100 trs/min), puis a été laissé un certain temps pour la sédimentation et par la suite le surnageant a été récupéré pour la détermination de l'activité enzymatique de chaque échantillon (Krishnaveni et al, 1999). L'opération d'extraction se fait dans des conditions réfrigérées (4°C).

Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la chitinase a été déterminée en utilisant la méthode décrite par Pegg (1988). L'extrait enzymatique de chaque type de farine (1 ml) est mélangé avec 1 ml de la chitine colloïdale à 1% dans un tampon citrate de phosphate à (0.05 M, pH 6.6). Ensuite le mélange a été incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 60 min. Après incubation, le mélange a été refroidi dans un bain d'eau glacée et ensuite centrifugé (4000 trs / min) pendant 10 min. Les sucres réducteurs libérés ont été déterminés dans le surnageant en utilisant la méthode de DNSA (Miller, 1959)

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui est capable de libérer 1 µg de GlcNAc par ml en 60 min dans ces conditions.

Détermination des propriétés physico-chimiques de l'activité de la chitinase

1. Détermination du pH optimum

Le pH optimal de la chitinase a été réalisé en faisant varier le pH entre pH 2 et pH 9 en utilisant des différentes solutions tampons.

2. Détermination de la température optimale

La température optimale a été évaluée en effectuant le dosage de l'activité enzymatique dans différentes températures de (15, 25, 35, 45, 55 et 65°C) à pH7 et pH 8 pour l'extrait enzymatique de la farine du riz et du blé respectivement .

3. Détermination de la stabilité thermique

L'extrait enzymatique de chaque échantillon a été incubé dans différentes températures de (40,50, 60 et 70°C) pendant différentes périodes allant jusqu'à 150 min. L'activité résiduelle a été déterminée à 40 et 45°C pour l'extrait enzymatique de la farine du blé et du riz respectivement.

4. Détermination des paramètres cinétiques

La constante de Michaelis (Km) a été déterminée par la mesure de la vitesse initiale dans différentes concentrations de chitine (mg .ml-1) en utilisant la représentation de Lineweaver-Burk (Segel, 1976).

Résultats et Interprétations

Extraction de la chitinase

La chitinase de la farine des céréales étudiées a été extraite par trois types de solution de pH différents : eau distillée (pH7), tampon acétate (pH4) et tampon carbonate (pH9). Les résultats d'activité enzymatique des extraits de nos échantillons sont représentés dans les figures suivantes :

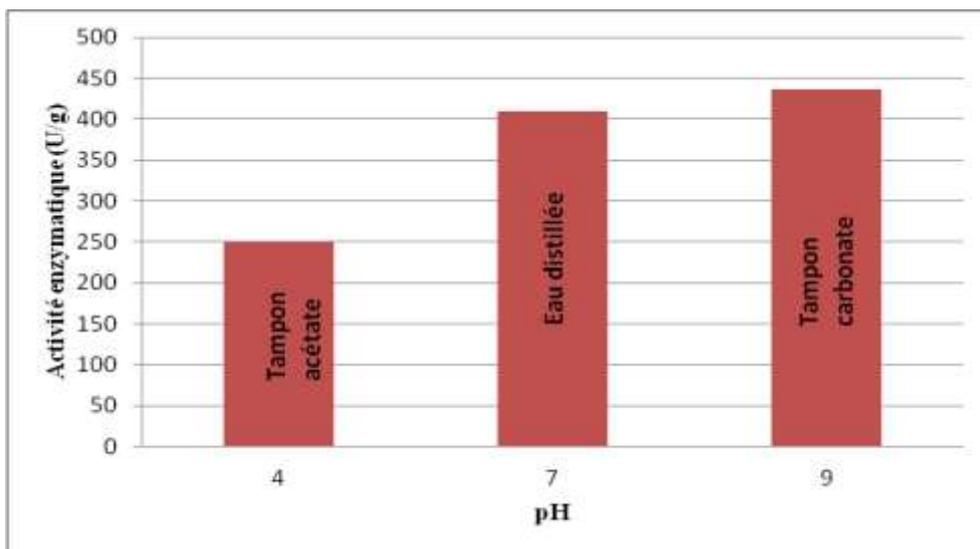


Fig.1 : Effet du pH de la solution d'extraction sur l'activité de la chitinase de la farine du blé.

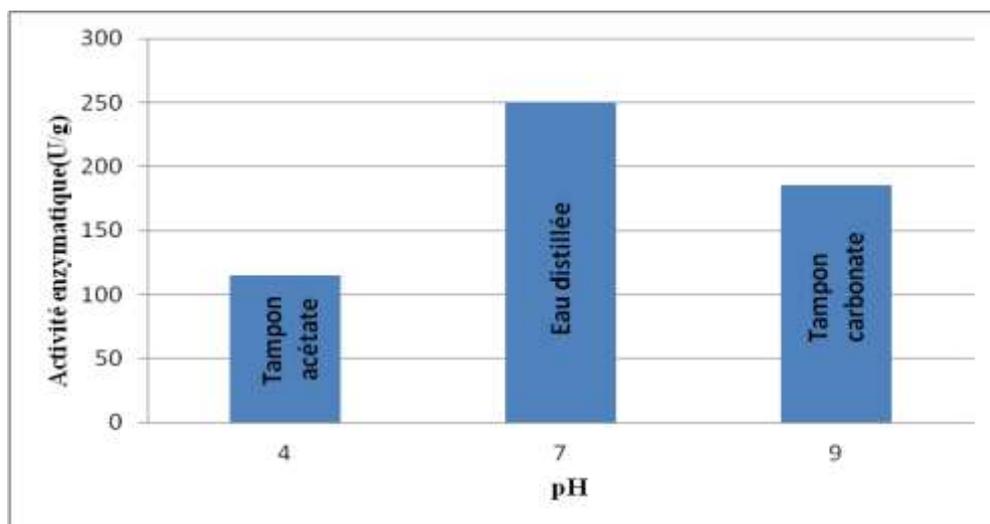


Fig.2 : Effet du pH de la solution d'extraction sur l'activité de la chitinase de la farine du riz.

Les figures 1 et 2 représentent l'effet du pH de la solution d'extraction sur l'activité enzymatique de la chitinase des deux variétés des céréales étudiées. On remarque que l'activité enzymatique varie en fonction du pH de la solution d'extraction. L'extrait enzymatique de la farine de blé a donné une forte activité enzymatique à pH 9 (436U/g) (Fig.1). En revanche, on constate une grande activité chitinolytique pour l'extrait enzymatique de la farine de riz à pH7 (250U/g) (Fig.2). L'activité enzymatique des deux types de farine (blé et riz) est moindre à pH 4 (250U/g) et (115U/g) successivement. Nous observons qu'à pH7 il y a une grande activité enzymatique des deux échantillons testés (Fig.1 et 2). On en déduit que l'eau distillée (pH7) est le meilleur type de solution d'extraction de la chitinase pour les deux types de céréales. Ces résultats coïncident avec ceux trouvés par Helmy et al. (2005) qui ont utilisés l'eau distillée pour extraire différentes variétés de céréales (blé, riz, sorgho, orge et avoine).

Paramètres physico-chimiques de la chitinase

1. pH optimal

L'activité enzymatique est très dépendante du pH. En général une enzyme possède une zone de pH optimum où son activité est maximale. De part et d'autre de cette zone, plus ou moins étroite, l'enzyme est progressivement inactivée. La vitesse initiale des nombreuses réactions enzymatiques donne une courbe en cloche en fonction du pH (Kamoun, 1997). L'étude de l'influence du pH nous a permis de trouver les résultats indiqués dans les figures 3 et 4. La Fig.3 nous montre bien qu'au pH égal à 7 (pH optimum) l'activité enzymatique de la chitinase de l'extrait de la farine de riz atteint une valeur maximale (263 U/g), au dessous et au dessus de cette valeur de pH, l'activité enzymatique diminue. Nous avons également remarqué que la chitinase de l'extrait de la farine de blé atteint son activité maximale à pH 8 (475U/g) (Fig. 4). Ces résultats concordent avec ceux cités par Jollés et Muzzarelli (1999) qui ont montré que le pH optimal des chitinases des plantes se situe entre 4 et 9. Les chitinases sont généralement actives dans un large intervalle de pH de 3-10 (Boller et al., 1983). D'autres travaux ont

montré que certaines chitinases de riz ont une forte activité à des pH extrêmes (2 et 9) (Taira et al., 2005).

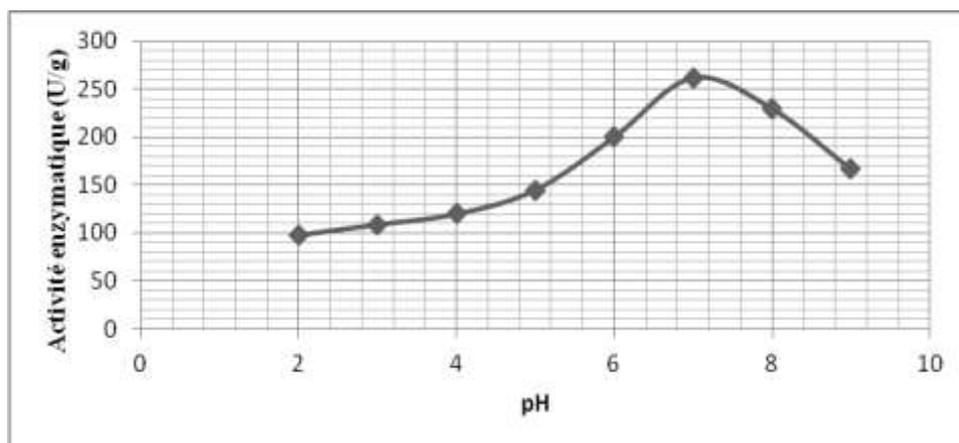


Fig.3 : La variation de l'activité de la chitinase de l'extrait de la farine du riz en fonction du pH.

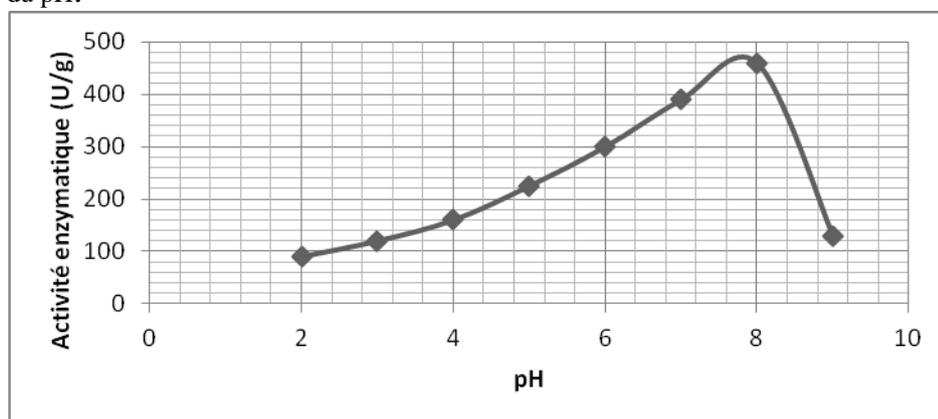


Fig.4 : La variation de l'activité de la chitinase de l'extrait de la farine du blé en fonction du pH.

2. Température optimale

L'activité de la chitinase des extraits enzymatiques de nos échantillons a été déterminée pour différentes températures (15, 25, 35, 45,55 et 65°C) à pH7 (riz) et pH8 (blé). Les figures 5 et 6 représentent l'évolution de l'activité enzymatique des deux types de farine en fonction de la température. Elles donnent des courbes en forme de cloches passant par un maximum d'activité qui correspond à une température de 40°C (farine du blé) (505 U/g) et 45°C (farine de riz) (275 U/g).

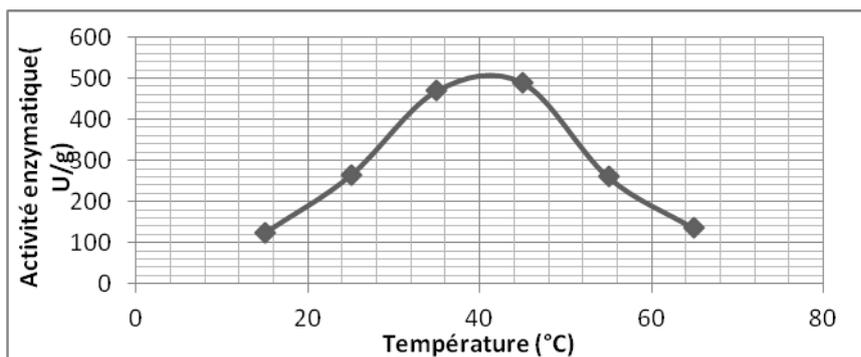


Fig.5 : La variation de l'activité de chitinase de l'extrait de la farine du blé en fonction de la température.

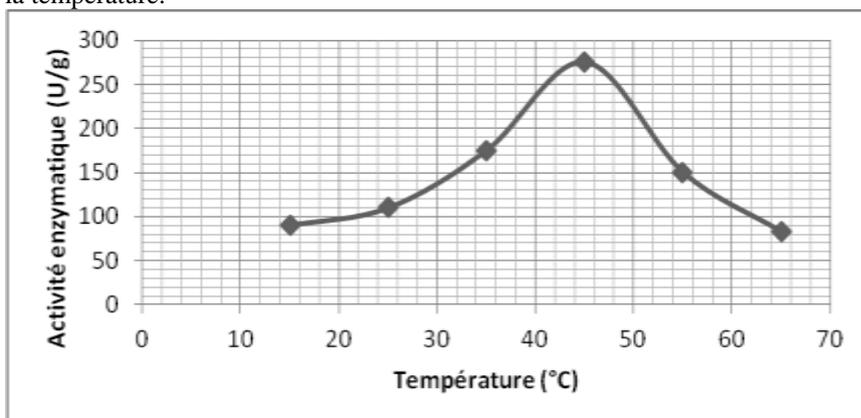


Fig.6 : La variation de l'activité de la chitinase de l'extrait de la farine du riz en fonction de la température.

On souligne qu'une variation de quelques degrés de température se traduit par une modification mesurable de l'activité enzymatique. Selon Hoell et al. (2005), la plupart des chitinases présentent une activité optimale à des températures de 40°C et 50°C. Toutefois, certaines chitinases de riz ont une forte activité à des températures élevées (70°C) (Taira et al., 2005).

3. Stabilité thermique

Les figures 7 et 8 représentent les courbes des activités résiduelles de la chitinase des extraits de nos farines étudiées en fonction de temps qui correspond à la thermostabilité pendant 150 min dans les conditions optimales (pH7, 45°C et pH8, 40°C) pour l'extrait enzymatique des deux farines du riz et du blé respectivement.

Les résultats de la stabilité thermique de la chitinase des deux extraits indiquent que cette enzyme est instable à des températures élevées (Fig. 7 et 8).

La chitinase de l'extrait de la farine du blé est stable à 40°C. Elle retient 85% pendant 2.5 heures mais elle est rapidement inactivée lorsqu'elle est incubée à des températures supérieures à 40°C. Son incubation à 50°C et 60°C pendant 60 et 120 min a résulté des pertes d'activité enzymatique de 15 et 78 %, et 11 et 93 %, respectivement. La chitinase a conservé 70% de son activité originale après incubation à 50°C pendant 2.5 heures. En revanche, elle est complètement inactivée à 60°C pendant cette période. Aucune activité enzymatique n'a été détectée après incubation de la chitinase à 70°C pendant 30 min. Concernant la stabilité thermique de la chitinase de l'extrait de la farine du riz, nous avons remarqué que l'enzyme est instable à des températures supérieures à 50°C. Elle retient 83% et 73% de son activité initiale après incubation à 40°C et 50°C pendant 150 min, respectivement donc elle est stable à des températures de (40-50°C) et perd totalement son activité enzymatique à 60°C pendant cette période. Aucune activité enzymatique n'a été détectée après incubation de la chitinase à 70°C pendant 30 min. L'inactivation thermique de la chitinase est due à la dénaturation des protéines (de sa structure secondaire et tertiaire) (Weinman, 2004). On déduit que la chitinase des extraits de deux types de farine montre une thermostabilité à des températures de (40-50°C) et sensible au phénomène de dénaturation à des températures supérieures à 50°C. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Khan (2002) qui a montré que les chitinases extraites des fraises sont généralement stables à des températures élevées (50°C). Cette stabilité est due à la présence des ponts disulfures dans leur structure tertiaire.

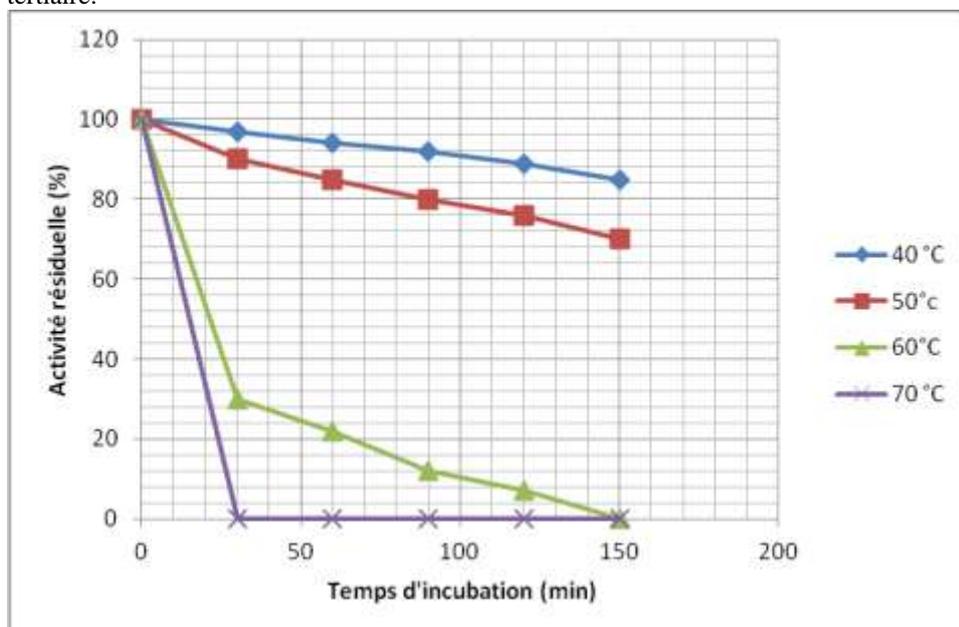


Fig.7 : Stabilité thermique de la chitinase de l'extrait de la farine du blé.

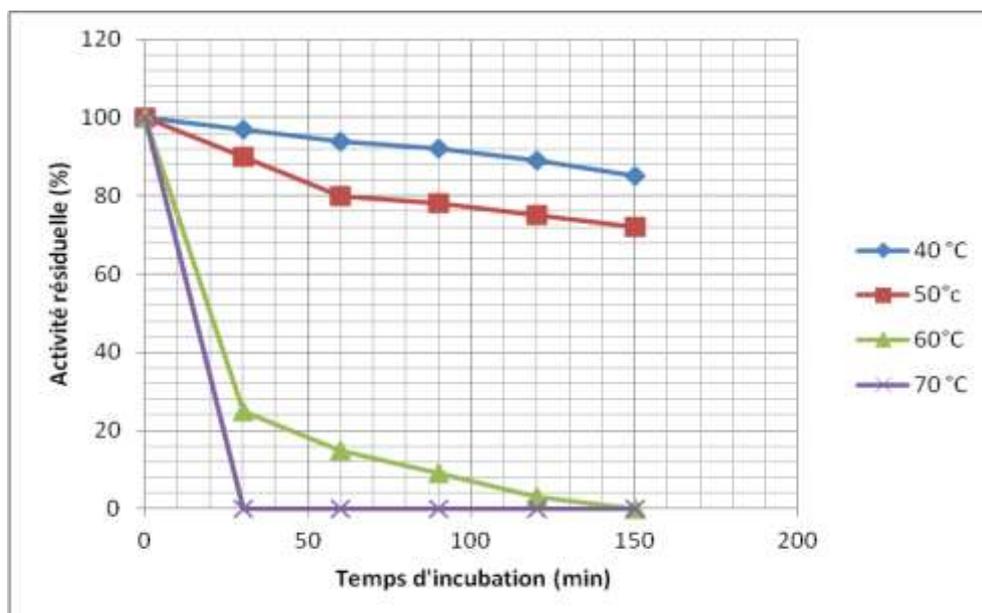


Fig.8: Stabilité thermique de la chitinase de l'extrait de la farine du riz.

4. Etude cinétique de la chitinase

Dans les figures 9 et 10, nous avons présenté la variation de l'activité de la chitinase des deux types de farine en fonction de différentes concentrations de chitine (substrat). On constate d'abord une augmentation rapide de la vitesse enzymatique pour une faible concentration de la chitine, mais si la concentration augmente, la courbe tend vers un plateau. Et pour les valeurs élevées de $[S]$, il y'a plus d'augmentation de la vitesse, laquelle tend asymptotiquement vers une valeur maximale V_{max} (Lehninger, 1977). La concentration optimale de chitine pour donner une valeur maximale d'activité chitinolytique est de 1.2% pour les deux types d'extrait enzymatique. Le graphe représentant la fonction linéaire de $1/V$ en fonction de $1/[S]$ est appelé graphe en double inverse (représentation de Lineweaver et Burk) puisque les deux variables de l'hyperbole V_{max} et K_m peuvent être déterminés expérimentalement en mesurant la vitesse à différentes concentrations de substrat et en exprimant les résultats en inverses des vitesses initiales en fonction des inverses des concentrations du substrat. Cette méthode permet de déterminer par extrapolation les valeurs des paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de la réaction enzymatique (Robert et al., 2002). Par la projection de la ligne droite sur l'axe des abscisses, nous avons trouvé que les valeurs de K_m sont égales à 1.58 mg.ml⁻¹ (Fig .11) et 1.11 mg.ml⁻¹ (Fig.12) pour l'extrait de la farine du blé et du riz respectivement. A partir de ces résultats nous avons déduit que la chitinase montre une bonne affinité pour ce substrat. Ces résultats sont situés dans les limites reportées par Jollés et Muzzarelli (1999) qui ont montré que la valeur de K_m des chitinases des plantes se situe entre 0,38 et 2,24 mg / ml.

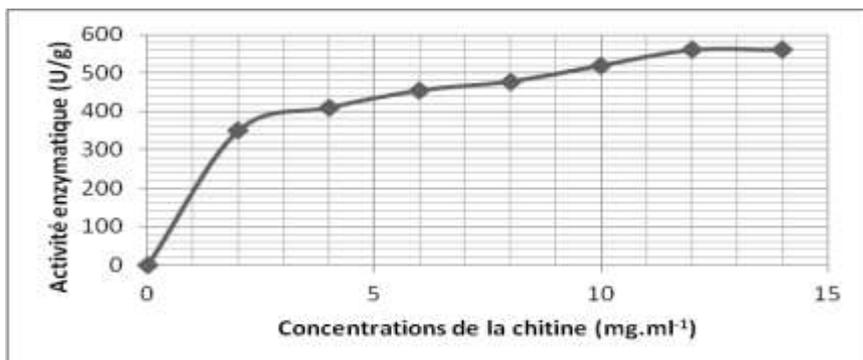


Fig.9 : Représentation graphique de Michaelis-Menten de l'activité enzymatique de la chitinase de l'extrait de la farine du blé.

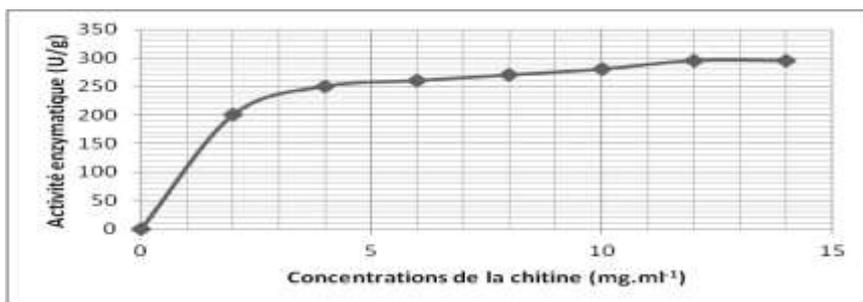


Fig.10 : Représentation graphique de Michaelis-Menten de l'activité enzymatique de la chitinase de l'extrait de la farine du riz.

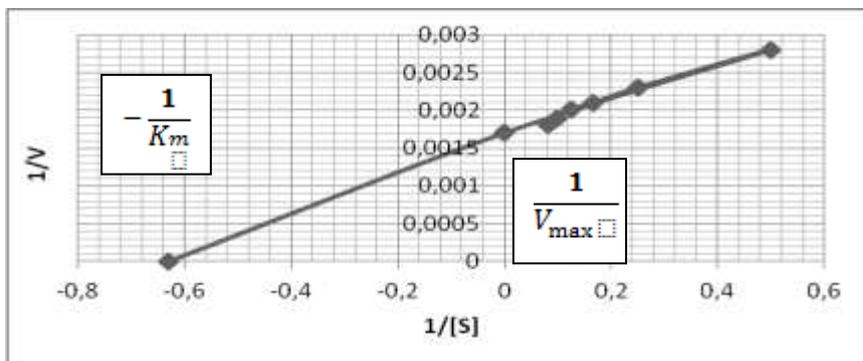


Fig.11 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité chitinolytique de l'extrait de la farine du blé.

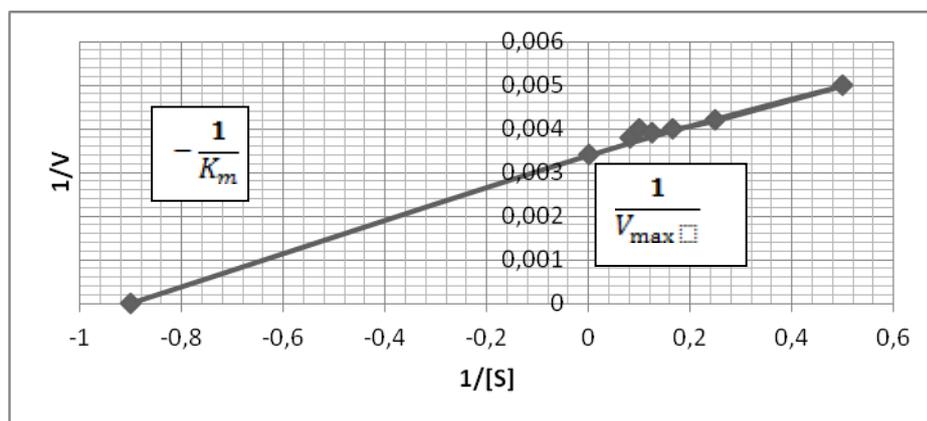


Fig.12 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité chitinolytique de l'extrait de la farine du riz.

Conclusion

L'objectif de notre travail est d'extraire la chitinase à partir de quelques variétés de céréales (blé, riz). Par la suite, quelques paramètres physicochimiques tels que la température, le pH, la stabilité thermique et la concentration en substrat ont été déterminés en vue d'évaluer cette enzyme extraite.

L'étude a visé de choisir la meilleure solution d'extraction parmi trois solutions de pH différents (tampon d'acétate pH 4, eau distillée pH 7 et tampon de carbonate pH 9). Les résultats obtenus montrent que l'activité de la chitinase du blé est maximale à pH 8. Par contre, l'activité enzymatique de la chitinase de riz atteint une valeur maximale à pH 7.

L'étude des propriétés physicochimiques de la chitinase des deux types de céréales nous a permis de trouver les résultats suivants:

- Concernant la chitinase du blé, le pH optimum est égal à pH 8 avec une température optimale de 40°C. En revanche, le pH optimum de la chitinase de riz est de pH 7 avec une température optimale de 45°C. Au dessous et au dessus des deux valeurs optimales obtenues (pH et température) pour les deux types de chitinase, l'activité enzymatique diminue.

- La chitinase des deux types de céréales est caractérisée par une grande thermostabilité pendant 2.5 heures entre 40 et 50°C. Par contre, elle est complètement inactivée à 60°C pendant cette période. Aucune activité n'a été détectée après incubation d'enzyme à 70°C pendant 30 min.

L'étude cinétique de la chitinase des deux types de céréales nous a permis de calculer la valeur de K_m en utilisant la représentation de Line weaver -Burk qui est égal à 1.58 mg.ml⁻¹ pour la chitinase de blé et 1.11 mg.ml⁻¹ pour la chitinase de riz.

Nous espérons que cette modeste étude sera complétée par d'autres travaux tels que :

Purification des chitinasés extraites par différentes méthodes de purification (utilisation des solvants organiques, chromatographies).

Mettre en évidence l'effet antifongique des chitinasés extraites sur certaines espèces comme agents d'altération des céréales telles que *Aspergillus* sp, *Rhizopus* sp .

Etude du mode d'action des chitinasés extraites sur les cellules fongiques.

Utilisation des chitinases extraites comme biopreservatives des produits à base de céréales.

Références Bibliographiques

- Boller, T.A., Gehri, F., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*. 157: 22-31
- Bonjean, A., Picard, E. (1990). Les céréales à paille : origine, historique, économie et sélection. Ed. Nathan, Paris. 235p.
- C.I.C, (2009). Conseil international des céréales. <http://www.igc.int/fr/default.aspx>
- FAO (2008). Evolution du commerce des céréales (FAO statistique).
- Hamses, B., Hopper, N., Houghton, D. (2000). L'essentiel en biochimie. Ed. Berti, Paris. pp 41-61.
- Helmy, S.A., Bazaraa, W.A., Ammar, A.S., Abo el Naga, M.M. (2005). Cereal chitinase as biopreservative for Balady bread. *Bull. Fac. Agric. Cairo University. Egypt*. 56: 779-794.
- Hoell, I. A., Klemsdal, S. S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Eijsink, V.G. (2005). Over expression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride*. *Biochim. Biophys. Acta*.1748: 180-190.
- Jollés, P., Muzzarelli, R.A.A. (1999). Chitin and chitinase. Ed. Birkhäuser, Suisse. pp 112, 119, 130.
- Kamoun, P. (1997). Appareils et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion, Médecine – Sciences. Paris. 199p.
- Khan, A. (2002). Characterization of chitinase activities, cloning, analysis, and expression of genes encoding pathogenesis related proteins in strawberry. Thèse de doctorat. Université d'Agriculture et Mécanique, Louisiana, USA. 147 p.
- Krishnaveni, S., Liang, G. H., Muthukrishnan, S., Manickam, A. (1999). Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. *Plant Sci*. 144:1-7.
- Lehninger, A.L. (1977). Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème Ed. Flammarion. Paris. pp 191 -192, 207 - 208.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31: 426-428.
- Mohtadji, C.L. (1989). Les aliments, Ed. Maloine, Paris. pp 105-106.
- Pegg, G. F. (1988). Chitinase from *verticillium alboatrum*. In: Wood ,W. "Methods in Enzymology" Vol. 161. Ed. Academic Press, New York . pp 474-489.
- Perrakis , A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Biochemical Journal*. 12: 1169-1180.
- Raisonnier, A. (2003). Révisions Biochimie PCEM2. Polycopies. Université Paris-VI. 73 p.
- Robert, J., Nielsen, K., Darvill, A. (2002). Enzymologie. Ed. Dunod, Paris. p 183
- Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations. 2ème Ed. John Wiley & sons, New York, 435 p.
- Taira, P. C. M., Clark, R., Norel, O. (2005). Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Mol. Biol*. 45: 609-618.
- Weinman, S., Méhul, P. (2004). Toute la biochimie. Ed. Dunod, Paris. pp 96-97.