

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
En vue de l'obtention du diplôme de Master en: Biochimie
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie

Thème

Recherche d'activités biologiques dans les graines de *Cucurbita pepo*

Soutenu le : 15. / 06. /2026

Présenté Par :

- 1) M. HICHOURL Halima
- 2) Melle ABDELMALEK Nesrine

Devant le jury composé de :

Pr. Farid BENNABI	Pr	UAT.B. B (Ain Temouchent)	Président
Dr. Ouassila BENHABIB	M C A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr. Sofiane Mourad BENYAMINA	MCB	UAT.B. B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2025/2026

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, de nous avoir donné la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.

Avant d'entamer la présentation de ce mémoire, nous souhaitons adresser nos sincères remerciements à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrant **Dr BENYAMINA**, pour avoir accepté de diriger ce travail. Nous le remercions pour sa disponibilité, ses précieux conseils, son accompagnement constant, ainsi que pour la confiance et l'intérêt qu'il nous a accordés tout au long de cette étude. Sa patience, ses encouragements et son soutien ont été d'une grande valeur dans l'aboutissement de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'évaluer ce mémoire. Nous remercions particulièrement Monsieur **Farid BENNABI** d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que Madame **Ouassila BENHABIB** pour avoir accepté d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs remarques et suggestions pertinentes.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à tous les enseignants du département et de l'université, qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours universitaire grâce à leurs compétences, leurs conseils et leur dévouement.

Enfin, nous exprimons notre profonde reconnaissance à nos très chers parents, pour leurs sacrifices, leur amour, leur soutien indéfectible et leurs encouragements permanents. Nos remerciements vont également à nos frères et sœurs, à nos collègues et à nos amis pour leur présence, leur aide et leur patience tout au long de cette période.

Dédicace

Avant tout, je remercie ALLAH Tout-Puissant, grâce à qui j'ai pu atteindre cette étape de mon parcours universitaire. Chaque réussite n'a été possible que par Sa volonté et Son soutien.

Je dédie ce travail à moi-même, à toutes les expériences que la vie m'a offertes, qu'elles soient positives ou difficiles. Les moments heureux m'ont donné l'espoir et la motivation, tandis que les épreuves m'ont appris la patience, la persévérance et la force. Toutes ces leçons ont contribué à faire de moi une personne déterminée, ambitieuse et persévérante dans la poursuite de la réussite tout au long de mon parcours académique.

À mes chers parents et à mes frères, pour leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien inconditionnel tout au long de mes études. Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude envers eux.

À mon encadrant, Dr Benyamina, pour son accompagnement, ses précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire. Je lui adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

À mon binôme Halima, pour sa collaboration, son engagement et les efforts partagés durant cette aventure universitaire.

À mes collègues et amies Sanaa et Yousra, pour les bons moments, l'entraide, le soutien et les souvenirs partagés durant notre parcours.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont soutenue, encouragée ou aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Nesrine

Dédicace

(وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا) (سورة طه، الآية 114)

Louange à **Allah**, le Très-Haut, source de savoir, de sagesse et de réussite, par Sa grâce infinie et Sa miséricorde, ce travail a pu être accompli.

C'est avec une profonde émotion et une immense reconnaissance que je dédie ce mémoire :

À mon encadrant, **D^r Benyamina Sofiane**, pour votre disponibilité et présence rassurante, vos précieux conseils et votre patience tout au long de ce travail, vos orientations et votre soutien ont été d'une grande valeur dans l'aboutissement de ce mémoire, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

À mon époux **Houari**, mon soutien de chaque instant, merci pour ta patience, ta présence rassurante, tes encouragements et ta confiance en moi, tu as été une source de force et de sérénité dans les moments difficiles.

À mon cher père et mes chères mères, symboles de sagesse, de dignité, de générosité et d'affection, merci pour votre tendresse infinie, vos prières sincères et votre soutien constant.

À mes précieux enfants : **Youssef, Malek, Hanane et Anouar**, vous êtes la lumière de ma vie, ma plus belle motivation et ma plus grande fierté, chaque ligne de ce mémoire porte une part de votre amour et de votre innocence, qu'Allah vous protège, illumine votre avenir et fasse de vous des enfants vertueux et accomplis

À mes chers frères et sœurs, **Kouider, Allele, Amine, Naima, Houria, Fatima**, pour leur affection, leur soutien moral et leurs prières sincères qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours, sans oublier mes belles sœurs, et mes beaux-frères notamment **Samra**, mes neveux et mes nièces, en particulier **khawla**, ainsi que toute ma grande famille. Y compris mes chères cousines, notamment **Houria**.

À tous mes professeurs qui m'ont enseigné, et en particulier à ceux qui ont été une source d'inspiration pour moi, en particulier **D^r Benhabib Ouassila**, et Pr **Bennabi Farid**.

Ainsi qu'à tout le personnel administratif de l'université notamment **D^r. Adjadj** et **M^{me} karima**, le directeur **D^r.Ziadi**, et **D^r Belhmieni**, pour leur disponibilité, leur aide et leurs efforts tout au long de notre parcours universitaire.

À ma binôme, **Nesrine**, pour tous les efforts partagés durant ce mémoire.

À mes très chères amies : **Nadjet** qui m'as transmis l'art d'enseigner, **Wahiba, Hanifa, Khadidja, Samira, Sauraya, Amina, Aalia et Malika**, merci pour votre présence fidèle, vos conseils, vos encouragements et tous les beaux moments partagés, votre amitié a été une véritable source de réconfort et de motivation.

À la directrice du CEM **Fertas Mohamed** où j'enseigne, **M^{me} Azrache Zahra**, pour sa compréhension, son encouragement et le climat professionnel bienveillant qu'elle a su instaurer. Veuillez recevoir ici l'expression de ma profonde reconnaissance, ainsi a mes collègues du travail

À l'inspecteur de la matière de des Sciences de la nature et de la vie de l'enseignement moyen **M^{eur} Khelouf Nasreddine**, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour votre accompagnement, et vos précieux conseils, ainsi que tous mes collègues.

À mes amis, les étudiantes en Master 2 Biochimie, pour leur aide précieuse durant mon parcours, **Nerimene, Henene, Bouchra, Ikhlas, Sanaa, Ahlem**, et **Fatima**, ainsi que toutes celles avec qui j'ai partagé des moments inoubliables.

À mes **chers élèves**, qui donnent chaque jour un sens noble à ma profession et m'inspirent par leur volonté d'apprendre et leur confiance. Je leur souhaite un avenir rempli de réussite et d'épanouissement, et à tous **ceux** qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude, enfin, je prie Allah de faire de ce mémoire une œuvre utile et bénéfique, un savoir profitable et une trace de bien durable ici-bas comme dans l'au-delà.

Halima

Résumé

Les graines de *Cucurbita pepo* sont des structures de réserve végétale qui agissent comme un véritable complexe bio-actif naturel, ces graines se distinguent par leur composition chimique riche qui leur confère plusieurs propriétés biologiques, notamment des activités antioxydantes, enzymatiques, anti-inflammatoires et antimicrobiennes.

Dans cette étude, deux activités biologiques (activité antioxydantes et enzymatiques) ont été recherchées au niveau d'une solution aqueuse des graines de *Cucurbita pepo*. Les activités antioxydantes ont été évaluées par le suivi de la dégradation de l' H_2O_2 (activité catalasique) et par le test de piégeage du radical DPPH, tandis que les activités amylasiques et phytasiques ont été évaluées, respectivement, par détermination de la quantité de l'amidon dégradée et par la quantité de phosphate inorganique libérée en fonction du pH, de la température et de la salinité.

Les résultats obtenus ont montré la présence d'une activité catalasique (dégradation complète de la quantité initiale de l' H_2O_2 (5mM)), et une activité de piégeage du DPPH avec un IC_{50} de 8,36 mg/mL.

Aussi, l'extrait aqueux de ces graines montre, après une incubation de 5 minutes à 30 °C, une activité amylasique (dégradation de 18,18 μg d'amidon/mg de protéines) et une activité phytasique (libération de 0,6 mM de phosphate/mg de protéines), avec des optimaux de 30 °C et pH 9 pour les amylases, et 50 °C et pH 5 pour les phytases. En présence de sel, les deux enzymes sont affectées, les phytases étant plus sensibles. L'étude de la stabilité montre que les amylases conservent peu d'activité après traitement thermique (environ 9%) et sont sensibles aux milieux acide et alcalin (respectivement 25% et 31,81% d'activité résiduelle), mais restent fortement stables en milieu salin (72,72%). À l'inverse, les phytases résistent mieux traitement thermique (25% d'activité résiduelle) et au pH acide (55%), alors qu'elles perdent totalement leur activité en conditions alcalines et salines. Les résultats obtenus confirment que les graines de *Cucurbita pepo* peuvent constituer une source exploitable pour les activités antioxydantes et enzymatiques susceptibles d'être valorisées dans les secteurs industriels et biotechnologique.

Mots clés : *Cucurbita pepo*, graines, activités antioxydantes, activité enzymatique, activité catalasique, DPPH, activité amylasique, activité phytasique.

Abstract

The seeds of *Cucurbita pepo* serve as plant storage structures that function as a genuine natural bioactive complex. These seeds are distinguished by a rich chemical composition, that confers several biological properties, notably antioxidant, enzymatic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities.

In this study, two biological activities (antioxidant and enzymatic activities) were investigated within aqueous solution of *Cucurbita pepo* seeds. Antioxidant activities were evaluated by monitoring the degradation of H_2O_2 (catalase activity) and by the DPPH radical-scavenging assay, whereas amylase and phytase activities were assessed, respectively, by determining the amount of degraded starch and the amount of released inorganic phosphate as a function of pH, temperature, and salinity. The results showed the presence of a catalase activity (complete degradation of the initial H_2O_2 concentration, 5 mM) and a DPPH radical-scavenging activity with an IC_{50} value of 8.36 mg/mL.

Furthermore, the aqueous extract of these seeds exhibited, after 5 min of incubation at 30 °C, an amylase activity (degradation of 18.18 μ g starch/mg protein) and a phytase activity (release of 0.6 mM phosphate/mg protein), with optima at 30 °C and pH 9 for amylases, and 50 °C and pH 5 for phytases. In the presence of salt, both enzymes were affected, with phytases being more sensitive. Stability studies showed that amylases retained little activity after thermal treatment (about 9%) and were sensitive to both acidic and alkaline media (25% and 31.81% residual activity, respectively), while remaining highly stable in saline medium (72.72%). Conversely, phytases withstand thermal treatment (25% residual activity) and acidic pH (55%), but completely lost their activity under alkaline and saline conditions. The results obtained confirm that *Cucurbita pepo* seeds can constitute an exploitable source of antioxidant and enzymatic activities that could be valorized in industrial and biotechnological sectors.

Keywords: *Cucurbita pepo*, seeds, antioxidant activities, enzymatic activity, catalase activity, DPPH, amylase activity, phytase activity.

الملخص

تُعَد بذور *Cucurbita pepo* تراكيب ذات مخزون نباتي يعمل كمعقد طبيعي فعال حيويًا. وتمتاز هذه البذور بتركيب كيميائي غني يمنحها عدة خصائص بيولوجية، ولا سيما أنشطة مضادة للأكسدة وإنزيمية، إضافةً إلى تأثيرات مضادةً للالتهاب ومضادةً للميكروبات.

في هذه الدراسة، تم البحث في نشاطين بيولوجيين (النشاطات المضادة للأكسدة والنشاطات الإنزيمية) في محلول مائي لبذور *Cucurbita pepo*، تم تقييم النشاطات المضادة للأكسدة من خلال متابعة تحلل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (نشاط كاتالازي)، وعن طريق اختبار اصطياد جذر DPPH الحر، في حين تم تقييم نشاطي الأميلاز والفييتاز، على التوالي، من خلال تحديد كمية النشاء المتحلل وكمية الفوسفات غير العضوي المتحرر تبعاً لتغير الأس الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة وكذلك الملوحة. أظهرت النتائج وجود نشاط كاتالازي (تحلل كامل للتركيز الابتدائي من H_2O_2 البالغ 5 ملي مول)، ونشاطاً لاصطياد جذر DPPH بقيمة IC_{50} قدرها 8.36 ملغ/مل.

كما أظهر المستخلص المائي لهذه البذور، بعد حضانة لمدة 5 دقائق عند 30 °م، نشاطاً أميلازياً (تحلل 18.18 ميكروغرام من النشاء/ملغ من البروتين) ونشاطاً فاييتازياً (تحرير 0.6 ملي مول من الفوسفات/ملغ من البروتين)، مع شروط مثلى بلغت 30 °م و pH يساوي 9 بالنسبة للأميلاز، و 50 °م و pH يساوي 5 للفييتاز. في وجود وسط ملحي، تأثر نشاط الإنزيمين كليهما، وكانت إنزيمات الفييتاز أكثر حساسية. أظهرت دراسة الثبات أن إنزيمات الأميلاز تحتفظ بنشاط قليل بعد المعاملة الحرارية (حوالي 9%) وتكون حساسة للوسطين الحمضي والقاعدي (بنسب نشاط متبقية تبلغ 25% و 31.81% على التوالي)، في حين تبقى شديدة الثبات في الوسط الملحي (72.72%). وعلى العكس من ذلك، تُبدي إنزيمات الفييتاز ثباتاً أفضل تجاه المعاملة الحرارية (25% نشاط متبقية) وتجاه الوسط الحمضي (55%)، لكنها تفقد نشاطها كلياً في الظروف القاعدية والملحية. تؤكد النتائج المتحصل عليها أن بذور *Cucurbita pepo* يمكن أن تشكل مصدراً قابلاً للاستغلال للنشاطات المضادة للأكسدة وكذلك الإنزيمية، بما يتيح تنميتها في القطاعات الصناعية والبيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Cucurbita pepo*، بذور، نشاطات مضادة للأكسدة، نشاط إنزيمي، نشاط كاتالازي، DPPH، نشاط أميلازي، نشاط فييتازي.

Sommaire

<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>I</i>
<i>Liste des figures.....</i>	<i>III</i>
<i>Liste des tableaux.....</i>	<i>V</i>
Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	2
1. Les propriétés biologiques.....	3
1.1. Les propriétés antioxydantes	4
1.1.1. Production des espèces réactives d'oxygène et stress oxydatif.....	4
1.1.2. Les antioxydants.....	6
1.1.3. Les applications industrielles des antioxydants.....	7
1.2. Les propriétés enzymatiques	8
1.2.1. Mode d'action des enzymes.....	9
1.2.2. Classification et nomenclature des enzymes	9
1.2.3. Les applications industrielles des activités enzymatiques	11
2. Les autres propriétés biologiques	12
3. Les différences sources naturelles des propriétés biologiques	12
3.1. Les sources microbiennes.....	14
3.2. Les sources animales	13
3.3. Les sources végétales	13
4. Présentation de la plante de <i>Cucurbita pepo</i> et de ses graines	14
4.1. Présentation de la plante de <i>Cucurbita pepo</i>	14
4.2. Présentation des graines de la plante de <i>Cucurbita pepo</i>	16
Matériel et méthodes.....	20
1. Matériel biologique	21
2. Préparation de la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	21
3. Dosage des protéines dans la solution des graines par la méthode de Bradford, 1976	22

4. Recherche d'activités antioxydants dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	20
4.1. Recherche d'activités catalasiques dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	20
4.2. Recherche des capacités de piégeage du DPPH dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i> ..	21
5. Recherche d'activités enzymatiques dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	25
5.1. Recherche d'activités amylasiques dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	25
5.2. Recherche d'activité phytasique dans une solution de graines <i>Cucurbita pepo</i>	26
5.3. Caractérisation des activités amylasiques et phytasiques des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	27
5.4. Effet de différents traitements thermique, pH et NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	28
Résultats et discussion	30
1. Le matériel biologique.....	31
2. Dosage des protéines dans une solution de graines de <i>Cucurbita pepo</i>	31
3. Recherche d'activités antioxydants dans les graines de <i>Cucurbita pepo</i>	31
3.1. Recherche d'activité catalasique dans les graines de <i>Cucurbita pepo</i>	31
3.2. Recherche des capacités de piégeage du DPPH dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	34
4. Recherche des activités enzymatiques des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	39
4.1. Recherche des activités amylasiques des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	39
4.2. Recherche des activités phytasiques des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	40
4.3. Caractérisation des activités amylasiques et phytasiques des graines de <i>Cucurbita</i>	42
4.4. Effet de différents traitements, thermique, pH et NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases des grains de <i>Cucurbita pepo</i>	50
Conclusion générale	63
Références bibliographique	66

Liste des abréviations

- **AH** : Antioxydant (forme réduite / donneur d'hydrogène)
- **A•** : Radical libre de l'antioxydant (forme oxydée stabilisée)
- **CAT** : Catalase
- **DO** : Densité Optique
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- **ES** : Complexe Enzyme-Substrat
- **HCl** : Acide Chlorhydrique
- **H₂O₂** : Peroxyde d'Hydrogène (Eau oxygénée)
- **IUBMB** : International Union of Biochemistry and Molecular Biology
- **NaCl** : Chlorure de Sodium (Sel)
- **NaOH** : Hydroxyde de Sodium (Soude caustique)
- **O₂** : Oxygène moléculaire (Dioxygène)
- **•O₂-** : Radical anion superoxyde
- **•OH** : Radical hydroxyle
- **P** : Produit de la réaction (ou Phosphore pour les minéraux)
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **R•** : Radical libre (forme réactive)
- **RH** : Radical libre neutralisé / Molécule stable
- **S** : Substrat (ou Soufre pour les minéraux)
- **SOD** : Superoxyde Dismutase
- **UV** : Ultraviolet
- **v/v** : Volume par volume
- **p/v** : Poids par volume
- **°C** : Degré Celsius
- **g** : Gramme

- **mg** : Milligramme
- **μg** : Microgramme
- **mL** : Millilitre
- **μL** : Microlitre
- **M** : Molaire (mol/L)
- **mM** : Millimolaire
- **μM** : Micromolaire
- **nm** : Nanomètre (Longueur d'onde)
- **min** : Minute
- **h** : Heure
- **rpm** : Revolutions per minute (Tours par minute)

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du stress oxydatif (Mougeolle, 2014).	6
Figure 2 : Représentation de la fixation du substrat au site actif d'une molécule enzymatique (Robinson, 2015).	9
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques de <i>Cucurbita pepo</i> (Marshall <i>et al.</i> , 2011).	16
Figure 4 : Morphologie macroscopique externe des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (Teppner, 2004).....	17
Figure 5 : Organisation anatomique longitudinale d'une graine de <i>Cucurbita pepo</i> (Adapté de Decker et Wilson, 1986).	18
Figure 6 : Les graines de <i>Cucurbita pepo</i> (A) et leur poudre obtenue après broyage (B).....	21
Figure 7 : Courbe étalon de l'hémoglobine.	31
Figure 8 : Courbe étalon d'H ₂ O ₂	32
Figure 9 : Evaluation de l'activité catalasique dans la solution des graines <i>Cucurbita pepo</i>	33
Figure 10 : Courbe étalon du DPPH	35
Figure 11: Capacité de piégeage du DPPH par la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (A) et détermination de son IC ₅₀ (B)	36
Figure 12: Capacité du piégeage de DPPH par l'acide ascorbique (A) et détermination de son IC ₅₀ (B).	38
Figure 13 : Courbe étalon de l'amidon	39
Figure 14: Mise en évidence d'activité amylasique dans les graines de <i>Cucurbita pepo</i>	40
Figure 15: Courbe étalon du KH ₂ PO ₄	41
Figure 16 : mise en évidence d'activité phytasique dans les graines de <i>Cucurbita pepo</i>	41
Figure 17 : Influence de la température sur l'activité amylasique et phytasique de la solution de graines de <i>Cucurbita pepo</i>	43
Figure 18: Influence du pH sur l'activité amylasique et phytasique dans la solution de graines de <i>Cucurbita pepo</i>	46
Figure 19 : Influence du NaCl sur l'activité amylasique et phytasique de la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	49
Figure 20 : Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases et des phytases présentes dans la solution des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	51

Figure 21 : Effet du NaOH et HCl sur la stabilité des amylases et des phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*..... **54**

Figure 22 : Effet du NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*. **57**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2015	4
Tableau 2 : Classification des enzymes selon le type de réaction catalysé	9
Tableau 3 : Classification de taxonomique de <i>Cucurbita pepo</i> (Decker, 1988).....	17
Tableau 4 : La gamme étalon pour la préparation de la courbe étalon de l'hémoglobine.....	22
Tableau 5 : La gamme étalon pour la préparation de la courbe étalon de l'H₂O₂.....	23
Tableau 6 : la gamme étalon du DPPH pour la préparation de la courbe étalon.....	24
Tableau 7 : La gamme étalon des solutions de l'amidon	24
Tableau 8 : La gamme étalon de la solution du KH₂PO₄	25
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats des activités biologiques des graines de <i>Cucurbita pepo</i>.....	61

Introduction générale

Chez les plantes, les propriétés biologiques désignent l'ensemble des effets exercés par leurs métabolites, en particulier les métabolites secondaires (Ochatt *et al.*, 2022) tels que les polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes ou saponines, sur des systèmes biologiques (les cellules, les microorganismes, les animaux....), qui se manifestant par des activités antioxydantes, anti inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, cytotoxiques ou encore hypoglycémiantes (Bertelli *et al.*, 2021 ; Panche *et al.*, 2016). Ces propriétés sont essentielles car elles participent à la défense et à l'adaptation des plantes à leurs environnements (Sengul *et al.*, 2025) et elles fournissent à l'industrie des molécules naturelles à forte valeur ajoutée, utilisées, par exemple, comme principes actifs en pharmacie, comme antioxydants et conservateurs dans l'agroalimentaire, et comme agents anti âge et apaisants en cosmétique (Ozyigit *et al.*, 2023 ; Damani et Topi, 2022).

La plante *Cucurbita pepo* présente un intérêt biologique particulier en raison de la diversité de ses composés bioactifs et des nombreuses activités qui leur sont associées, notamment antioxydantes, anti inflammatoires, métaboliques et protectrices à l'égard de différents organes (Mohamed *et al.*, 2017). De plus, des travaux ont montré que ses fruits, ses graines et l'huile qui en est extraite sont riches en polyphénols, caroténoïdes, tocophérols et acides gras insaturés, conférant à l'espèce des propriétés antioxydantes marquées, ainsi que des effets anti-inflammatoires (Fathima *et al.*, 2024), mais aussi d'autres propriétés telles que des propriétés cicatrisantes, antidiabétiques, antimicrobiens et anticancéreux (Ezekiel, 2024).

Les graines de *Cucurbita pepo* apparaissent comme une source végétale particulièrement intéressante en raison de leur richesse nutritionnelle et de leur contenu en composés bioactifs (Rabrenović *et al.*, 2014 ; Nyam *et al.*, 2013). De plus, leur forte teneur en minéraux et en oligoéléments permet de soutenir l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans la défense antioxydante et le métabolisme cellulaire (Schmidt et Husted, 2019 ; Patil *et al.*, 2023).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de caractériser le potentiel biologique des graines de *Cucurbita pepo* en procédant à l'évaluation de leurs propriétés antioxydantes (catalases et piégeage DPPH), ainsi que de leurs propriétés enzymatiques (amylases et phytases), au sein d'un extrait aqueux obtenu à partir de ces graines.

Synthèse bibliographique

1. Les propriétés biologiques

L'étude des propriétés biologiques des substances naturelles suscite aujourd'hui un intérêt grandissant dans la recherche scientifique, répondant au besoin crucial de découvrir de nouvelles molécules avec un effet bénéfique pour la santé humaine et la prévention des maladies (Atanasov *et al.*, 2021). La biodiversité naturelle constitue une source remarquable de molécules bioactives impliquées dans la protection des systèmes cellulaires (Batiha *et al.*, 2020), avec des propriétés biologiques comme par exemple les propriétés antioxydantes, essentielles pour neutraliser les effets néfastes des radicaux libres ou les propriétés anti-inflammatoires, qui interviennent dans la modulation des voies de signalisation cellulaire (Reddy *et al.*, 2023).

D'autres activités biologiques peuvent aussi être importantes telles que les propriétés antimicrobiennes assurées par les agents antimicrobiens inhibent efficacement le développement des agents pathogènes (Vaou *et al.*, 2021) ou bien les propriétés enzymatiques qui jouent un rôle clé dans la régulation des réactions métaboliques et présentent un fort potentiel d'application en biotechnologie et en industrie (Chapman *et al.*, 2018). Ces molécules bioactives proviennent principalement du métabolisme secondaire des organismes vivants, un processus adaptatif essentiel leur permettant de s'adapter aux contraintes environnementales et aux stress biotiques et abiotiques (Pang *et al.*, 2021).

Les plantes produisent notamment des polyphénols et des huiles essentielles reconnus pour leurs activités biologiques (Anand *et al.*, 2019), tandis que les microorganismes, notamment les bactéries du sol et les champignons, synthétisent divers métabolites secondaires et enzymes largement exploités en médecine et en agriculture (Newman et Cragg, 2020).

Enfin, au-delà de leur rôle biologique, ces composés présentent un intérêt majeur sur le plan industriel, notamment dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire, contribuant ainsi au développement de solutions durables répondant aux enjeux de santé et d'environnement (Atanasov *et al.*, 2015).

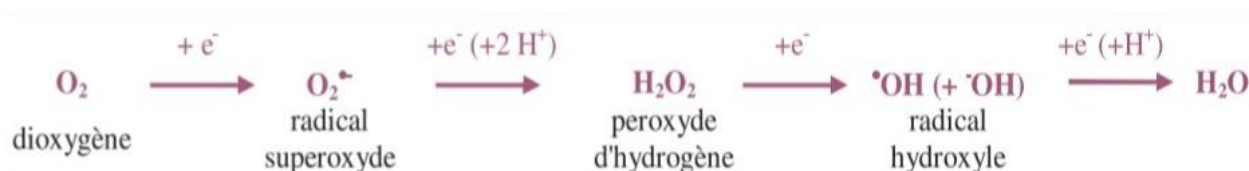
1.1. Les propriétés antioxydantes

1.1.1. Production des espèces réactives d'oxygène et stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des métabolites instables hautement réactifs contenant de l'oxygène, parmi lesquels figurent notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$), elles sont naturellement produites au cours de divers processus métaboliques cellulaires chez différents organismes vivants (Wilcox, 2012 ; Gill et Tuteja, 2010 ; Wada, Cui et Yoshida, 2019).

Comme le montre la réaction ci-dessous, les ERO peuvent être générées lors du processus respiratoire (Murphy, 2009)

La réduction progressive de la molécule du dioxygène (O_2) en molécule d'eau (H_2O) s'effectue selon la réaction suivante (Gardès-Albert *et al.*, 2003) :



Le tableau suivant, regroupe les principales ERO, leurs symboles et leurs réactions chimiques associées.

Tableau 1 : Les espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2015).

Espèces réactives de l'Oxygène	Symbole	Réactions chimiques
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	$HO\bullet$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\bullet + HO^- + Fe^{3+}$ $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + HO\bullet + HO^-$ $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Radical peroxyde	$RO_2\bullet$	$R\bullet + O_2 \rightarrow RO_2\bullet$

Hydroperoxyde	RO ₂ H	RO ₂ • + RH-->RO ₂ H + R•
---------------	-------------------	---

En plus des ERO, les espèces réactives de l'azote (RNS) regroupent un ensemble de molécules dérivées principalement du monoxyde d'azote (NO), telles que le peroxydinitrite (ONOO-), le dioxyde d'azote (NO₂) et les espèces nitrosantes (Hardy *et al.*, 2018). Ces composés jouent un rôle important dans les mécanismes de signalisation et de régulation cellulaire ainsi que dans les réponses au stress chez différents organismes (Molassiotis et Fotopoulos, 2011 ; Kaya et Adamakis, 2025).

Lors d'une exposition à des contraintes environnementales ou physiologiques, le métabolisme cellulaire est perturbé, entraînant une production excessive et une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA), telles que les radicaux hydroxyles (OH-), les anions superoxydes (O₂-), les radicaux peroxydes lipidiques (LOO-) et les radicaux nitrates (NO-) (Mbida *et al.*, 2022 ; Sechi *et al.*, 2017), le monoxyde d'azote (•NO), le dioxyde d'azote (•NO₂) et l'anion peroxydinitrite (•ONOO-) (Pacher *et al.*, 2007).

En conditions physiologiques normales, les systèmes antioxydants interviennent efficacement pour limiter les effets toxiques des espèces réactives et protéger les cellules contre ces dommages oxydatifs (Wichers et Maes, 2004). Ces altérations se traduisent par la peroxydation des lipides membranaires libérant du malondialdéhyde (Ayala *et al.*, 2014), la formation de groupements carbonyles altérant l'activité des protéines (Stadtman et Levine, 2003), ainsi que l'oxydation des bases de l'ADN générant des mutations (Cooke *et al.*, 2003). Cependant, lorsque la production de ces espèces réactives devient excessive et dépasse les capacités de neutralisation de la cellule, un déséquilibre de la balance redox s'installe (Mittler, 2002) (Figure 1). C'est cette accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) qui définit et provoque le stress oxydatif (Jones et Sies, 2020).

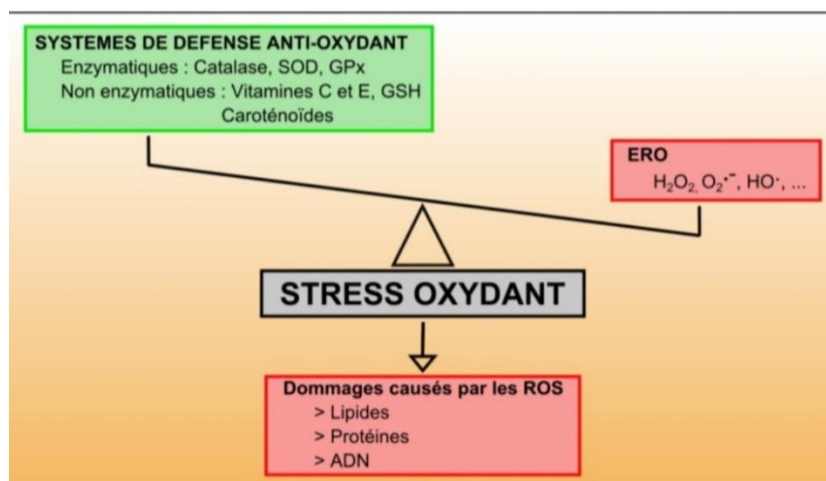


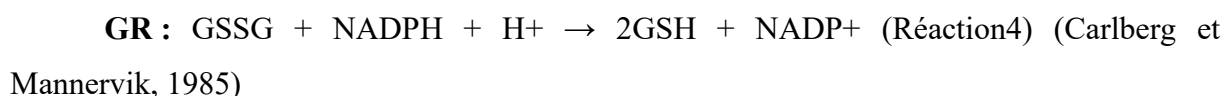
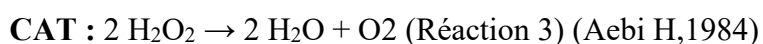
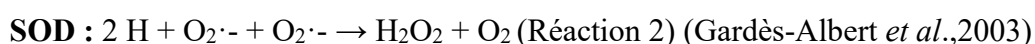
Figure 1 : Représentation schématique du stress oxydatif (Mougeolle, 2014).

1.1.2. Les antioxydants

Le système de défense antioxydant comprend des composants enzymatiques et non enzymatiques qui agissent de manière complémentaire afin de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs (Bouayed et Bohn, 2010 ; Becker, 2016).

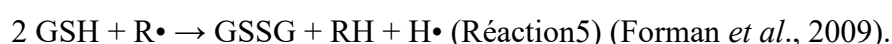
Les antioxydants enzymatiques constituent une première ligne de défense contre le stress oxydatif (Ighodaro et Akinloye, 2018). Parmi les antioxydants enzymatiques figurent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR), qui participent au maintien de l'équilibre redox cellulaire (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Gharib et Ahmed, 2023). Une altération de l'activité de ces enzymes peut entraîner une accumulation des ERO et favoriser le stress oxydatif (Michalek *et al.*, 2020).

Ces catalyseurs biologiques neutralisent les radicaux libres en suivant des mécanismes biochimiques précis, selon les réactions chimiques suivantes (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Aebi, 1984 ; Carlberg et Mannervik, 1985) :

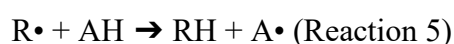


Les antioxydants non enzymatiques regroupent des molécules capables de neutraliser directement les radicaux libres sans activité enzymatique. Les antioxydants non enzymatiques

comprennent des composés endogènes tels que l'albumine, la bilirubine et l'acide urique, ainsi que des antioxydants exogènes comme la vitamine C, les caroténoïdes et certains oligoéléments (Fendri *et al.*, 2006 ; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Ces composés participent également au maintien de l'équilibre redox et à la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs (Sies, 2015). Parmi ces composés, le glutathion (GSH) est considéré comme l'antioxydant non enzymatique endogène le plus abondant et le plus crucial pour le maintien du potentiel redox cellulaire, et il permet de neutraliser directement les radicaux libres ou agit comme co-substrat enzymatique en se transformant en glutathion oxydé (GSSG) selon l'équation suivante (Forman *et al.*, 2009) :



D'une manière générale, un antioxydant (AH) agit en cédant un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre (R•), stabilisant ce dernier et stoppant ainsi la réaction en chaîne selon l'équation suivante (Lobo *et al.*, 2010) :



Ces systèmes de défense peuvent être d'origine endogènes produits directement par l'organisme tels que le glutathion, l'acide urique, la bilirubine ou encore les enzymes antioxydantes comme la catalase et la SOD, et exogènes apportés par l'alimentation à l'image des vitamines C et E, des caroténoïdes et des polyphénols (Bouayed et Bohn, 2010).

1.1.3. Les applications industrielles des antioxydants

En plus de leur importance au niveau des cellules, les antioxydants figurent parmi les composés naturels présentant un grand intérêt (Xu *et al.*, 2025), avec une utilisation qui peut s'étendre à plusieurs secteurs industriels et biotechnologiques, confirmant ainsi leur large éventail d'applications (Paraschiv *et al.*, 2025).

En effet, en raison de leur capacité à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme humain, les antioxydants présentent un intérêt majeur pour les secteurs cosmétique et agroalimentaire (Ma *et al.*, 2021). Dans l'industrie cosmétique, ils peuvent être utilisés pour protéger la peau contre les dommages oxydatifs induits par les rayons UV ou la pollution (Elkabous *et al.*, 2025). De même, dans l'industrie agroalimentaire, ils sont largement utilisés pour protéger les aliments contre la détérioration oxydative et améliorer leur stabilité durant le stockage et la transformation (Gülçin, 2025). Par ailleurs, dans le domaine pharmaceutique, les antioxydants sont employés pour protéger les médicaments et leurs principes actifs contre

l'oxydation, ce qui permet de préserver leur efficacité et d'augmenter leur durée de conservation (Gülçin, 2025).

1.2. Les propriétés enzymatiques

Les enzymes sont un type spécifique de protéines qui agissent comme des catalyseurs biologiques et fonctionnent dans des conditions spécifiques de pH, de température et de pression (Khan *et al.*, 2021). De plus, elles sont nécessaires en très faibles concentrations et accélèrent les réactions sans être consommées au cours de la réaction (Robinson, 2015).

Les enzymes jouent un rôle fondamental dans le contrôle et la réalisation de la plupart des processus vitaux tels que la respiration cellulaire, la réplication de l'ADN ou la digestion des nutriments (Warshel *et al.*, 2006). Ces molécules biologiques, occupent une place essentielle en biochimie en raison de leur implication dans de nombreuses réactions métaboliques notamment la glycolyse, la synthèse des acides gras ou la détoxification cellulaire par des enzymes antioxydantes (Martinez Cuesta S *et al.*, 2015).

Sur le plan structural, les enzymes partagent un ancêtre commun et sont regroupées en familles et en superfamilles selon leurs similitudes de séquences et de structures. La structure fonctionnelle d'une enzyme comprend d'abord l'apoenzyme, qui est la partie protéique seule et inactive (Nelson et Cox, 2017). Pour devenir catalytiquement active, elle nécessite souvent l'association d'un cofacteur, qu'il s'agisse d'un ion métallique (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) ou d'une coenzyme organique (Berg *et al.*, 2015). L'ensemble constitué par l'apoenzyme et son cofacteur forme l'holoenzyme, qui représente la forme active capable de réaliser la catalyse (Fersht, 1999).

Les enzymes possèdent une région spécifique appelée site actif qui permet d'assurer un ancrage supramoléculaire avec leurs substrats correspondants (Paul *et al.*, 2022). En effet, cette zone est responsable de la fixation du substrat et de la catalyse, ce qui explique la spécificité de l'action enzymatique (Nelson et Cox, 2017). Le mécanisme simplifié de cette interaction et de l'ancrage du substrat au sein du site actif est schématisé dans la figure suivante.

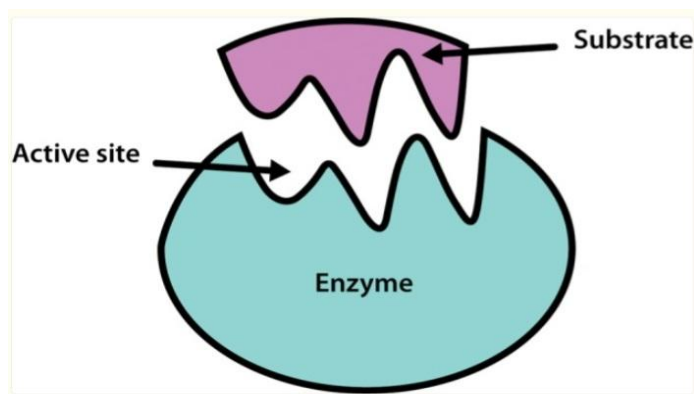


Figure 2 : Représentation de la fixation du substrat au site actif d'une molécule enzymatique (Robinson, 2015).

1.2.1. Mode d'action des enzymes

Le mode d'action des enzymes repose sur leur capacité à abaisser l'énergie d'activation d'une réaction chimique, accélérant ainsi la transformation d'un substrat en produit sans modifier l'équilibre final de la réaction (Nelson et Cox, 2017) (voir réaction). Ce processus se déroule au niveau du site actif, où le substrat se lie de manière spécifique à l'enzyme pour former un complexe transitoire enzyme-substrat [ES] (Berg *et al.*, 2015) : $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$.

1.2.2. Classification et nomenclature des enzymes

Les enzymes sont classées de manière systématique en fonction de la nature chimique des réactions qu'elles catalysent (IUBMB, 1992). L'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) a ainsi mis en place une nomenclature internationale standardisée.

Chaque enzyme, ou groupe d'enzymes catalysant la même réaction, et il lui est attribué un numéro EC (Enzyme Commission) (Tableau 2) composé de 04 parties, chacune fournissant des informations sur la réaction catalysée et les groupements chimiques impliqués (McDonald *et al.*, 2009).

Officiellement, cette classification internationale comprend aujourd'hui 7 grandes classes principales (Almonacid *et al.*, 2010) qui sont récapitulées dans le Tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Classification des enzymes selon le type de réaction catalysé

EC	Nom de classe	Type de réaction catalysée	Exemples	Références

EC 1	Oxydoréductases	Réactions d'oxydoréduction (Transfert d'électrons ou d'H)	Catalase (CAT), Peroxydases	(Mhamdi <i>et al.</i> , 2010 ; BRENDA, 2026)
EC 2	Transférases	Transfer d'un groupement fonctionnel (méthyle, phosphate, etc.) d'une molécule donneuse à une acceptrice.	Kinases, Polymérases	(Webb, 1992; Schomburg <i>et al.</i> , 2002)
EC 3	Hydrolases	Coupure de liaison chimiques par ajout d'eau (hydrolyse)	Amylase, Phytase, Lipase	(Svensson, 1994 ; Singh et Satyanarayana, 2011)
EC 4	Lyases	Coupure de liaisons par d'autres moyens (double liaison) ou addition de groupements.	Décarboxylases Synthases	(Purich, 2010 ; IUBMB, 1992)
EC 5	Isomérases	Réarrangements moléculaires (conversion d'isomères)	Épimérases, Mutases	(Mueller <i>et al.</i> , 2012 ; BRENDA, 2026)
EC 6	Ligases	Jonction de deux molécules avec énergie (ATP)	ADN Ligase, Synthétase	(Berg <i>et al.</i> , 2015 ; Webb, 1992)
EC 7	Translocases	Transfert d'ions ou molécules à travers des membranes	ATP Synthase (complexe V)	(Tipton, 2018 ; IUBMB, 2018)

Les enzymes jouent un rôle fondamental et indispensable au sein des organismes vivants. En tant que catalyseurs biologiques, elles régulent la quasi-totalité des réactions

chimiques du métabolisme cellulaire, qu'il s'agisse de la production d'énergie, de la synthèse des macromolécules ou de la détoxification cellulaire (Nelson et Cox, 2017 ; Voet et Voet, 2011). Sans leur action hautement spécifique, les réactions biochimiques nécessaires à la vie seraient beaucoup trop lentes pour maintenir l'homéostasie et la viabilité cellulaire (Berg *et al.*, 2015).

1.2.3. Les applications industrielles des activités enzymatiques

En plus de leur importance cellulaire, les enzymes sont largement utilisées dans l'industrie en raison de leurs propriétés catalytiques efficaces, de leur spécificité et de leur impact environnemental réduit, ce qui a favorisé leur développement à l'échelle industrielle dans plusieurs secteurs industriels (Chapman *et al.*, 2018) tels que les secteurs d'industrie des textiles, de l'amidon, du papier et la pâte à papier, la boulangerie ainsi que l'alimentation animale (Nierstrasz et Warmoeskerken, 2003). De plus, elles jouent un rôle central dans l'industrie des détergents, grâce aux protéases et à d'autres hydrolases permettant l'élimination efficace de taches spécifiques (Kirk *et al.*, 2002).

L'utilisation des enzymes comme biocatalyseurs permet de réaliser des procédés plus durables et moins énergivores, contribuant ainsi à une industrie plus respectueuse de l'environnement (Wahab, 2025).

D'un point de vue historique, l'exploitation des propriétés enzymatiques remonte à l'Antiquité, notamment à travers des procédés empiriques traditionnels comme la panification, la fabrication du fromage et la fermentation brassicole (Sarrouh *et al.*, 2018). Cependant, c'est l'avènement des biotechnologies modernes et la purification d'enzymes d'origine microbienne, particulièrement les souches thermostables, qui ont véritablement propulsé et diversifié leurs applications à l'échelle industrielle globale (Kirk *et al.*, 2002).

Les hydrolases (EC3) constituent une classe majeure d'enzymes industrielles, dont plus de 75 % sont utilisées commercialement pour la dégradation de nombreuses substances naturelles différentes (Rigoldi *et al.*, 2018). En raison de leur importance, elles sont largement exploitées dans divers domaines biotechnologiques et industriels (Bilal *et al.*, 2018).

Ces enzymes trouvent leur application dans une multitude de domaines stratégiques. Dans l'industrie agroalimentaire, elles sont indispensables pour des procédés comme la clarification des jus de fruits et la panification (Raveendran *et al.*, 2018). Dans le secteur des détergents, l'incorporation de lipases et de protéases reste essentielle pour optimiser l'élimination des taches tenaces (Singh *et al.*, 2016) , enfin, elles jouent un rôle clé dans les

industries du textile pour le bio polissage, du papier pour le blanchiment de la pâte, ainsi que dans la production de biocarburants durables (Rigoldi *et al.*, 2018).

Les hydrolases jouent un rôle crucial dans le métabolisme de nombreux médicaments d'importance clinique, ce qui souligne leur intérêt en pharmacologie et en biotransformation (Jung et Zhu, 2024).

De manière plus spécifique, les hydrolases regroupent des enzymes importantes telles que les phytases et les amylases, largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire et la biotechnologie pour la dégradation des composés complexes (Decker et Fischer, 2008).

Les amylases sont l'une des hydrolases les plus répandues dans la nature, elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,4 de l'amidon en sucres simples (Gupta *et al.*, 2003). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser l'amidon, le glycogène et les glucanes associés en produits plus simples tels que les dextrines et les unités de glucose (SundarrametMurthy, 2014).

De plus, les amylases occupent une place importante dans l'industrie enzymatique mondiale, représentant jusqu'à 25 % du marché et remplaçant progressivement les procédés chimiques dans la dégradation industrielle de l'amidon (Roth *et al.*, 2019).

Les amylases sont utilisées dans la fabrication des détergents pour éliminer les taches à base d'amidon présentes sur les fibres textiles, ce qui améliore l'efficacité du lavage (Nierstrasz et Warmoeskerken, 2003). De plus, elles sont présentes dans une grande proportion des détergents liquides (Gurung *et al.*, 2013).

Outre le secteur des détergents, les amylases trouvent des applications majeures dans d'autres industries stratégiques. Dans l'industrie agroalimentaire, elles sont incontournables en boulangerie pour améliorer le volume du pain et en brasserie pour la liquéfaction de l'amidon (Van Der Maarel *et al.*, 2002). De plus, elles jouent un rôle clé dans l'industrie du papier pour le couchage de la pâte de papier (Gupta *et al.*, 2003), ainsi que dans la production de bioéthanol à partir de biomasse végétale (Souza et Magalhães, 2010).

Concernant les phytases, elles sont des enzymes pro-nutritionnelles capables d'hydrolyser le phytate, rendant ainsi biodisponibles plusieurs nutriments associés tels que le phosphore, le fer et le zinc (Madsen et Brinch-Pedersen, 2019). Elles catalysent l'hydrolyse des monoesters phosphates de l'acide phytique (myo-inositolhexakis phosphate), entraînant progressivement la formation de myo-inositol pentakisphosphate, tétrakisphosphate, trisphosphate, bisphosphate et monophosphate, avec libération de phosphate inorganique.

L'acide phytique représente en effet la principale forme de stockage du phosphore dans les graines végétales (Wyss *et al.*, 1999).

Ces enzymes ont été isolées à partir de différentes sources, notamment les plantes, les animaux et les microorganismes (Vohra et Satyanarayana, 2003 ; Kumar *et al.*, 2010)

Plusieurs types de phytases, présentant des spécificités, des propriétés et des localisations cellulaires variées, interviennent dans l'hydrolyse de l'acide phytique au sein des cellules (Barrientos, Scott, et Murthy, 1994).

Grâce à leurs propriétés enzymatiques, les phytases sont aujourd'hui largement exploitées dans l'industrie de l'alimentation animale afin d'améliorer l'utilisation du phosphore, des minéraux ainsi que d'autres nutriments tels que les protéines, l'amidon et les lipides (Hou *et al.*, 2020). Enfin, l'importance industrielle des phytases s'explique également par leur contribution à des procédés plus écologiques et économes en énergie, ce qui renforce leur intérêt dans un contexte de développement durable (Bilal *et al.*, 2018) et de transition vers des technologies vertes (Aehle, 2007).

2. Les autres propriétés biologiques

Outre les activités biologiques évoquées précédemment, il existe d'autres propriétés fonctionnelles majeures nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire ou à la défense des organismes (Jacob *et al.*, 2011). Parmi celles-ci, les propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires, constituent des axes d'étude fondamentaux en biochimie (Bielek *et al.*, 2021). À cela s'ajoutent les potentiels antidiabétiques, souvent évalués par la capacité d'inhibition d'enzymes clés du métabolisme des glucides, ainsi que les effets cytotoxiques ciblés contre les lignées cellulaires tumorales (Kumar *et al.*, 2022). Ces diverses propriétés fonctionnelles découlent directement de la présence de métabolites spécialisés complexes synthétisés par différentes catégories d'organismes vivants (Wink, 2015).

3. Les différences sources naturelles des propriétés biologiques

Les propriétés biologiques d'intérêt médical et industriel découlent de la grande diversité moléculaire présente dans la nature (Newman et Cragg, 2020). Ces substances actives sont généralement classées selon leur origine naturelle en trois grands groupes : les sources microbiennes, animales et végétales (Dias *et al.*, 2012).

3.1. Les sources microbiennes

Les microorganismes (bactéries, champignons et actinomycètes) constituent une source généreuse de molécules biosynthétiques dotées de propriétés biologiques remarquables (Newman et Cragg, 2020). Au-delà de leur rôle métabolique de base, ils synthétisent des métabolites secondaires possédant des activités antimicrobiennes, antifongiques et antivirales majeures, essentielles pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques (Bérdy, 2012). De plus, de nombreux genres bactériens et fongiques produisent des enzymes d'intérêt industriel et des composés antioxydants capables de piéger les radicaux libres, offrant ainsi des perspectives d'application importantes en biotechnologie et en pharmacologie (Ramakrishnan *et al.*, 2016).

3.2. Les sources animales

Bien que moins explorées que les ressources végétales, les sources d'origine animale sont dotées d'une grande diversité de molécules bioactives aux propriétés biologiques bien définies (Mora *et al.*, 2014). Par exemple, les peptides bioactifs, issus de l'hydrolyse des protéines animales (provenant du lait, des tissus marins ou de sous-produits carnés), démontrent des activités antihypertensives, immunomodulatrices et antioxydantes significatives (Bhat *et al.*, 2015). Par ailleurs, certains organismes marins et insectes sécrètent des substances (comme des peptides antimicrobiens ou des venins purifiés) qui manifestent de puissantes propriétés anti-inflammatoires et cytotoxiques contre des lignées cellulaires cancéreuses, illustrant leur intérêt biomédical (Pal *et al.*, 2014).

3.3. Les sources végétales

Parallèlement aux ressources d'origine animale, le règne végétal représente un réservoir exceptionnel et historiquement privilégié de biomolécules dotées de propriétés biologiques hautement diversifiées (Bourgaud *et al.*, 2001). Les plantes ont la capacité de synthétiser une vaste gamme de métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes et les alcaloïdes, reconnus pour leurs puissantes activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (García-Lafuente *et al.*, 2009 ; Silva *et al.*, 2020).

Ces propriétés biologiques associées peuvent être localisés au niveau des feuilles, des écorces, des racines, des fleurs ou encore de la pulpe des fruits (Murthy *et al.*, 2014 ; Verma & Shukla, 2015). Néanmoins, parmi ces différents organes, les graines suscitent un intérêt grandissant en recherche phytochimique (García-Lafuente *et al.*, 2009).

En tant que structures de réserve indispensables à la survie de la future plantule, les graines accumulent une diversité remarquable de métabolites secondaires, de composés phénoliques et de lipides bioactifs dotés de puissantes activités antioxydantes, antimicrobiennes et cardioprotectrices (Wojdyło *et al.*, 2007 ; Savage, 2021).

Parmi les ressources prometteuses en propriétés biologiques, la plante *Cucurbita pepo*, communément appelée courge ou citrouille, se distingue par la richesse nutritionnelle et thérapeutique de ses graines, largement exploitées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections métaboliques et inflammatoires (Dotto & Chacha, 2020). C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail, qui porte sur l'étude des activités biochimiques des graines de *Cucurbita pepo*. La section suivante est consacrée à la présentation détaillée de cette espèce végétale afin d'en préciser le contexte botanique et biochimique.

4. Présentation de la plante de *Cucurbita pepo* et de ses graines

4.1. Présentation de la plante de *Cucurbita pepo*

La plante *Cucurbita pepo* est l'une des plus anciennes cultures domestiquées. Cette espèce appartient à la famille des Cucurbitaceae et serait originaire d'Amérique centrale et des régions d'Amérique du Sud (Smith, 1997). Sa domestication aurait eu lieu au moins à deux reprises : au Mexique il y a plus de 10 000 ans et aux États-Unis il y a plus de 4 000 ans (Paris, 2016).

Grâce à sa richesse nutritionnelle, à son cycle de croissance court et à son rendement élevé, elle est aujourd'hui largement cultivée dans le monde entier et adaptée aux cultures en association (intercropping) (Xue *et al.*, 2022). Cette plante de taille moyenne est principalement cultivée pour ses fruits et ses graines comestibles et constitue une ressource alimentaire importante dans plusieurs régions du monde, notamment au Nigeria (Adepoju et Adebajo, 2011). En raison de sa valeur nutritionnelle et médicinale, *Cucurbita pepo* représente également une culture d'importance économique mondiale (Acila *et al.*, 2026).

De manière générale, les espèces du genre *Cucurbita*, en particulier *Cucurbita pepo* et *Cucurbita moschata*, sont reconnues pour leurs graines riches en nutriments, huiles et acides gras bénéfiques pour la santé humaine, notamment dans la prévention de l'hyperplasie de la prostate (Kaur *et al.*, 2023).

Sur le plan morphologique, *Cucurbita pepo* possède des tiges généralement anguleuses, rugueuses au toucher et souvent rampantes ou grimpantes grâce à des vrilles (Whitaker et Davis, 1962). Les caractéristiques générales de la plante en croissance, incluant ses fleurs jaunes aux lobes triangulaires et ses feuilles profondément lobées, sont illustrées dans la Figure 3A. Les fleurs, de grande taille, présentent une forme campanulée avec des organes unisexués portés sur la même plante (Lira Saade, 1995). Les aspects macroscopiques des fruits, qui peuvent être allongés ou ronds avec des côtes longitudinales marquées selon les variétés, sont présentés dans les Figures 3B et 3C.

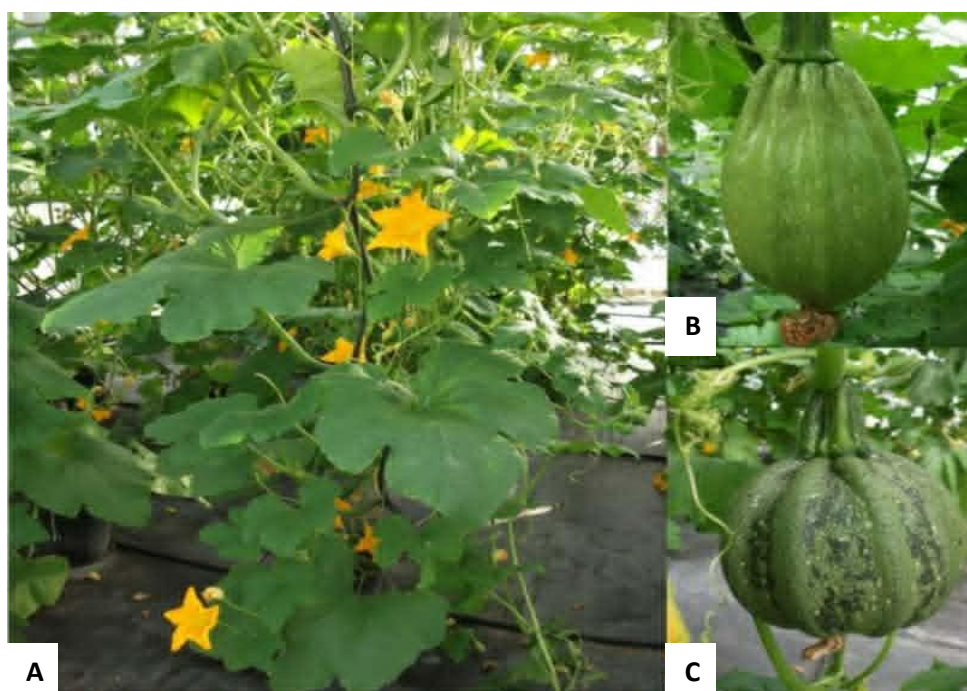


Figure 3 : Caractéristiques morphologiques de *Cucurbita pepo* (Marshall *et al.*, 2011).

(A) Aspect général de la plante en développement montrant les fleurs campanulées et les feuilles lobées, (B) Forme allongée du fruit avec un pédoncule légèrement côtelé, (C) Forme ronde du fruit présentant des côtes longitudinales proéminentes.

Sur le plan systématique, *Cucurbita pepo* L. appartient à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones) (Cronquist, 1981). Elle est rattachée à la famille des Cucurbitaceae, qui regroupe des plantes herbacées principalement rampantes ou grimpantes (Jeffrey, 2005). Au sein du genre *Cucurbita*, cette espèce se distingue par un immense polymorphisme reflété par la diversité de formes et de tailles de ses fruits, incluant les citrouilles et les courgettes

(Andres, 2004). Sa classification taxonomique complète, du règne jusqu'à l'espèce, est résumée dans le Tableau 3 ci-dessous (Decker, 1988).

Tableau 3 : Classification de taxonomique de *Cucurbita pepo* (Decker, 1988).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Cucurbitales
Famille	Cucurbitaceae
Genre	<i>Cucurbita</i>
Espèce	<i>Pepo</i>

4.2. Présentation des graines de la plante de *Cucurbita pepo*

Les graines de la plante de *Cucurbita pepo* sont ovales, aplaties et de couleur blanche à crèmeuse (Gwanama *et al.*, 2007) (Figure 4).



Figure 4 : Morphologie macroscopique externe des graines de *Cucurbita pepo* (Teppner, 2004).

La structure morphologique des graines comprend un embryon constitué d'une radicule-hypocotyle, de deux cotylédons photosynthétiques distincts, d'un endosperme mince,

de restes du nucelle ainsi que d'un tégument composé de cinq couches (Adam *et al.*, 2016) (Figure 5).

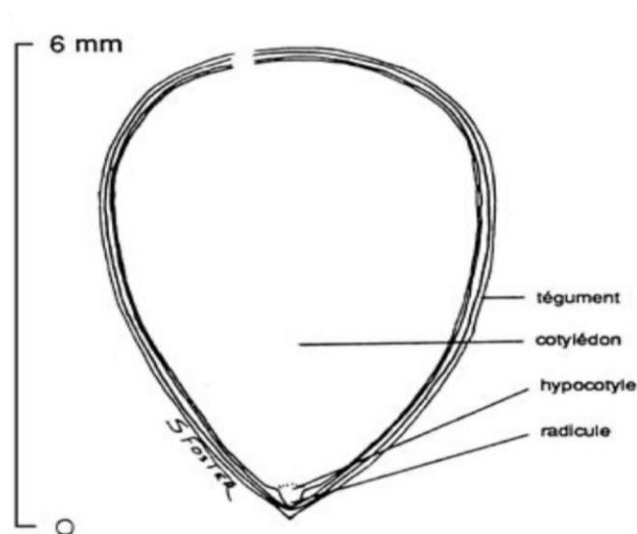


Figure 5 : Organisation anatomique longitudinale d'une graine de *Cucurbita pepo* (Adapté de Decker et Wilson, 1986).

Les graines du genre *Cucurbita* se distinguent par leur richesse en composés nutritionnels (Rezig *et al.*, 2012 ;Eshaghi *et al.*, 2013). Elles contiennent entre 32 et 37 % de protéines et 42 à 50 % d'huiles (Loy, 2000). Les graines renferment également des glucides (6 à 10 %) elles constituent une source importante de potassium, de phosphore, de zinc, de niacine et de thiamine (Loy, 2000 ; Amin *et al.*, 2019).

Les variations observées dans la composition chimique des graines entre les différentes espèces de *Cucurbita* et les cultivars provenant de diverses régions du monde seraient liés aux conditions de culture, à la fertilisation ainsi qu'au moment de la récolte (Srbinoska *et al.*, 2012).

Les graines de *Cucurbita pepo* occupent une place importante en médecine traditionnelle (Patel, 2013). Elles ont notamment été utilisées comme remède nutritionnel dans le traitement des troubles associés à l'hyperplasie bénigne de la prostate (Medjakovic *et al.*, 2016).

Sur le plan pharmacologique, de nombreuses investigations scientifiques ont mis en évidence la diversité des propriétés biologiques de ces semences (Dotto et Chacha, 2020). En effet, les extraits de graines de *Cucurbita pepo* montrent un puissant potentiel antioxydant capable de piéger les radicaux libres, principalement attribué à leur richesse en composés

phénoliques, en tocophérols et en caroténoïdes (Aruah *et al.*, 2020). Aussi, ces graines exercent des activités antimicrobiennes notables contre diverses souches bactériennes et fongiques pathogènes (Syed *et al.*, 2019). Enfin, des effets anti-inflammatoires, protecteurs du système cardiovasculaire et hypolipidémiants ont été documentés, consolidant leur intérêt thérapeutique et biomédical (Bardaa *et al.*, 2016).

Matériel et méthodes

Ce projet de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie de l'Université Belhadj Bouchaïb d'Aïn Témouchent durant le second semestre de l'année universitaire 2025/2026 dans le cadre du diplôme de Master 2 en Biochimie. Ce travail est consacré à la recherche d'activités biologiques (antioxydantes et enzymatique) dans les graines de *Cucurbita pepo*.

1. Matériel biologique

Les graines de *Cucurbita pepo* (Figure 6A) ont été achetées dans un commerce de la ville d'Ain-Temouchent. Elles ont ensuite été broyées afin d'être utilisées sous forme de poudre (Figure 6B).



Figure 6 : Les graines de *Cucurbita pepo* (A) et leur poudre obtenue après broyage (B).

2. Préparation de la solution des graines de *Cucurbita pepo*

Dans le cadre de l'étude des propriétés biologiques des graines de *Cucurbita pepo*, un extrait aqueux a été préparé à partir de la poudre des graines obtenue après broyage. La préparation consiste à dissoudre la poudre dans de l'eau distillée pour obtenir une solution à une concentration de 200 mg/mL, ensuite le mélange est soumis à une agitation continue pendant 1 h 30 à 2 h à température ambiante afin de favoriser l'extraction des composés bioactifs.

Après extraction, les solutions obtenues sont centrifugées à 6000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant récupéré, présentant un aspect légèrement laiteux, a été conservé et utilisé pour l'évaluation des différentes activités biologiques.

3. Dosage des protéines dans la solution des graines par la méthode de Bradford, 1976

La détermination de la teneur en protéines des extraits aqueux des graines de *Cucurbita pepo* a été réalisée selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976). Cette technique repose sur l'interaction du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 avec les résidus d'acides aminés basiques des protéines, entraînant une variation d'absorbance proportionnelle à la concentration protéique (Ku *et al.*, 2013).

Pour la quantification, une courbe d'étalonnage ($DO_{595\text{ nm}} = f [\text{Hémoglobine}]$) a été établie à partir d'une solution mère d'hémoglobine à 1 mg/mL. À partir de cette solution, une gamme de concentrations standards (0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/mL) a été préparée par dilution appropriée (Tableau 4).

Pour chaque concentration, 0,8 mL de solution étalon ont été mélangés à 0,2 mL de réactif de Bradford. Après une incubation de 5 minutes à l'obscurité et à température ambiante, la densité optique a été mesurée à 595 nm afin d'établir la courbe d'étalonnage $DO_{595\text{ nm}} = f (\text{Hémoglobine})$.

Tableau 4 : La gamme étalon pour la préparation de la courbe étalon de l'hémoglobine.

[Hémoglobine] (mg/mL)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Solution mère de l'hémoglobine [1mg /mL] (mL)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Eau distillée (mL)	1	0,95	0,9	0,75	0,5	0

4. Recherche d'activités antioxydantes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

4.1. Recherche d'activités catalasiques dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

a) préparation de la courbe étalon d' H_2O_2

Afin d'évaluer l'activité catalasique des extraits de graines de *Cucurbita pepo*, une courbe d'étalonnage ($DO_{240\text{ nm}} = f [\text{H}_2\text{O}_2]$) a d'abord été établie à partir d'une solution mère de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10 mM. À partir de cette solution, une gamme de

concentrations standards (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM) a été préparée par dilution appropriée (Tableau 5). La DO des différentes solutions a été mesurée à 240 nm afin de tracer la courbe d'étalonnage.

Tableau 5 : La gamme étalon pour la préparation de la courbe étalon de l'H₂O₂.

[H ₂ O ₂] (mM)	0	0,1	0,5	1	5	10
Solution mère de l'H ₂ O ₂ à 10 mM (mL)	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Eau distillée (mL)	1	0,99	0,95	0,9	0,5	0

b) Evaluation des activités catalasiques

L'activité catalasique des extraits aqueux de graines de *Cucurbita pepo* a été déterminée en préparant un mélange réactionnel composé de 1 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 mM, de 0,5 mL de tampon phosphate (0,1 mM ; pH 7) et de 0,5 mL de l'extrait à différentes concentrations (100 mg/mL et 200 mg/mL).

Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 minutes, puis la DO est mesurée à une longueur d'onde de 240 nm.

La catalase est une enzyme antioxydante capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène, une molécule potentiellement toxique pour les cellules. Elle catalyse sa décomposition en eau et en oxygène selon la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

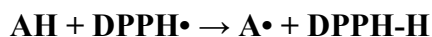
La diminution de la concentration en H₂O₂ signifié la présence d'une activité catalasique dans les extraits étudiés.

4.2. Recherche des capacités de piégeage du DPPH dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

L'activité antioxydante des extraits aqueux de graines de *Cucurbita pepo* a été évaluée par la méthode au 1,1-diphényl-2-trinitrophénylhydrazine (DPPH), initialement proposée par Blois (1958). Cette méthode repose sur la capacité des composés antioxydants à neutraliser et stabiliser le radical libre DPPH•. (Voir réaction ci-dessous).

Le DPPH présente une coloration violette caractéristique en solution ; lorsqu'il réagit avec des composés donneurs d'atomes d'hydrogène, il est réduit en DPPH-H, ce qui entraîne un changement progressif de la couleur de la solution, qui devient jaune pâle (Sirivibulkovit *et al.*, 2018).

La réaction peut être résumée comme suit (Angeli *et al.*, 2023) :



Où AH représente un antioxydant donneur de proton.

a) Préparation de la courbe étalon du DPPH

Afin de quantifier les quantités de DPPH consommées, une courbe d'étalonnage ($\text{DO}_{517 \text{ nm}} = f [\text{DPPH}]$) a été établie à partir d'une solution mère de DPPH à 0,1 mM. Une gamme de concentrations standards (0,0125 ; 0,025 ; 0,05 et 0,1 mM) a été préparée par dilution appropriée, et l'absorbance des différentes solutions a été mesurée à 517 nm.

Tableau 6 : la gamme étalon du DPPH pour la préparation de la courbe étalon.

[DPPH] mM	0	0,0125	0,025	0,05	0,1
Solution mère du DPPH à 0,1 mM (mL)	0	0,125	0,25	0,5	1
Ethanol (mL)	1	0,975	0,75	0,5	0

b) Recherche de l'activité de piégeage du DPPH

Le potentiel antioxydant a été évalué par la méthode du radical DPPH (0,1 mM) selon le protocole de Chaves *et al.* (2020). Le mélange réactionnel, composé de 1 mL de DPPH et 1 mL d'extrait à différentes concentrations (1%, 2.5%, 5%, 7.5 %, 15%), a été incubé durant 5 minutes.

La réduction du radical a été suivie par spectrophotométrie à 517 nm (Herrera-Hernández *et al.*, 2018) par rapport à un blanc dépourvu de DPPH. Pour la comparaison,

l'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant de référence à différentes concentrations (0.0125, 0.025, 0.05, 0.075 et 0.1 mg/mL)

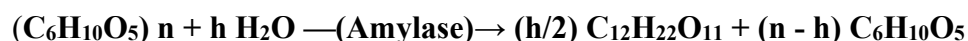
5. Recherche d'activités enzymatiques dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

5.1. Recherche d'activités amylasiques dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

Afin de rechercher l'activité amylasique dans des graines de *Cucurbita pepo*, une méthode basée sur le dosage de la disparition de l'amidon a été effectué.

Lors de la digestion de l'amidon, les amylases reconnaissent comme substrats spécifiques pour rompre les liaisons alpha-1,4 glycosidiques (Tester *et al.*, 2004).

Cette réaction d'hydrolyse enzymatique de l'amidon en présence d'eau conduit à la formation d'unités plus simples, principalement le maltose et le glucose, selon l'équation globale suivante (Gupta *et al.*, 2003 ; Sundarram&Murthy, 2014) :



Amidon

Maltose

Dextrines

a) Préparation de solution de substrat (amidon)

La technique de Caraway Somogyi iode/potassium iodure (IKI) a été employée pour quantifier l'activité des amylases. La préparation de la solution du substrat implique l'ajout de 40mL d'une solution d'amidon à 1% dans 50mL d'eau distillée bouillante. Suite à l'agitation et au refroidissement de cette solution d'amidon à température ambiante, on a incorporé une quantité adéquate pour 100 mL d'eau distillée (Fatema, 2017). Un volume de cette solution est récupéré et dilué dix fois dans de l'eau distillée (Fatema, 2017).

b) Préparation de la courbe d'étalonnage de l'amidon

Pour préparer la courbe d'étalonnage de l'amidon, une série de solutions d'amidon de concentrations allant de 20 à 100 µg/mL a été préparée à partir d'une solution mère d'amidon à 100 µg/mL (tableau 7).

La courbe d'étalonnage a été tracée à partir de l'absorbance correspondant aux différentes concentrations d'amidon ; l'absorbance a été mesurée à 620 nm (Syn et Chen, 1997).

Tableau 7 : La gamme étalon des solutions de l'amidon

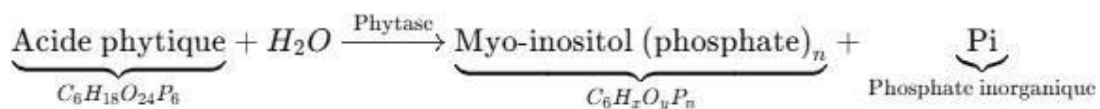
Solutions étalons d'amidon ($\mu\text{g/mL}$)	0	20	40	60	80	100
Solution mère d'amidon ($400\mu\text{g/mL}$)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau distillée	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5

La mise en évidence de l'activité amylasique a été réalisée par la préparation d'un milieu réactionnel contenant 0,1 mL de solution d'amidon, utilisée comme substrat, 0,750 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7) et 0,4 mL de la solution des graines. Le mélange a ensuite été incubé à 30 °C pendant 5 min dans un bain-marie.

Après incubation, 0,75 mL de solution de Lugol a été ajouté afin de révéler l'amidon non hydrolysé. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 1,5 mL de HCl à 10 %. Enfin, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

5.2. Recherche d'activité phytasique dans une solution de graines *Cucurbita pepo*

Pour étudier l'activité phytasique dans les graines de *Cucurbita pepo*, nous avons utilisé une méthode d'analyse quantitative basée sur la libération de phosphate inorganique (Pi). La phytase (enzyme) appartient à la famille des hydrolases et catalyse l'hydrolyse de l'acide phytique (substrat) (inositol hexaphosphate) (Ariza *et al.*, 2013). Cette réaction produit de l'inositol phosphate et du phosphate inorganique (Pi) (apparition du produit) (McKie et McCleary, 2016), comme illustré par la formule réactionnelle suivante



Pour déterminer la concentration de Pi libérée par l'activité phytasique, une courbe standard $DO_{355nm} = f([KH_2PO_4])$ a été établie. On a préparé une gamme de concentrations de 0,2 à 1 mM à partir d'une solution mère de KH_2PO_4 à 1mM :

Tableau 8 : La gamme étalon de la solution du KH_2PO_4

$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ mM	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume (mL) de la solution mère du KH_2PO_4 de 1 mM	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillé (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0

La mise en évidence de l'activité phytasique a été effectuée par la préparation d'un milieu réactionnel renfermant 0,125 mL de tampon d'acétate d'ammonium-acide acétique à 0,1M et pH 5, qui renferme du phytate de sodium à une concentration de 5 mM, ainsi que 0,025mL de la solution extraite des graines de *Cucurbita pepo*.

Par la suite, le mélange réactionnel a été incubé au bain-marie à 30 °C pendant 10 min. Après incubation, les réactifs complémentaires ont été ajoutés successivement dans l'ordre suivant : 0,75 mL d'une solution fraîchement préparée contenant 10 mL d'acétone, 5 mL d'acide sulfurique et 5 mL de molybdate d'ammonium, suivis de 0,1 mL d'acide citrique, puis de 1 mL d'eau distillée (Sajidan *et al.*, 2015).

5.3. Caractérisation des activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

a) Influence de la température sur les activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

Afin d'évaluer l'effet de la température sur les activités amylasiques et phytasiques de la solution des graines de *Cucurbita pepo*, les milieux réactionnels ont été incubés pendant 5 minutes à différentes températures (20, 30, 40 et 50 °C).

À l'issue de l'incubation, les activités enzymatiques ont été déterminées selon le protocole standard précédemment décrit.

b) Influence du pH sur les activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

Afin d'évaluer l'influence du pH sur les activités amylasiques et phytasiques des graines, le tampon phosphate (0,1 M, pH 7) du milieu réactionnel est remplacé par le tampon

acétate d'ammonium - acide acétique à (0,1M et pH 5) et le tampon glycine-NaOH (0,1 M ; pH 9).

Les milieux réactionnels ainsi préparés sont incubés aux températures optimales déterminées dans le test de l'étude de l'influence de la température sur les activités enzymatiques pendant 5 minutes. À l'issue de l'incubation, les activités enzymatiques sont déterminées.

c) Influence du NaCl sur les activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

Pour étudier l'effet du NaCl sur les activités amylasiques et phytasiques, du NaCl a été ajouté au tampon phosphate (0,1 M, pH 7 pour les amylases et pH 5 pour les phytases) à une concentration finale de 0,1 M.

Les milieux réactionnels ainsi préparés sont incubés aux températures optimales déterminées dans le test de l'étude de l'influence de la température sur les activités enzymatiques pendant 5 minutes. À l'issue de l'incubation, les activités enzymatiques sont déterminées selon les protocoles précédemment décrits.

5.4. Effet de différents traitements thermique, pH et NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

a) Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

La stabilité thermique de l'amylase a été évaluée en soumettant l'extrait aqueux issu des graines de *Cucurbita pepo* à un traitement thermique dans un bain-marie à 90 °C pendant 2h.

Ensuite, l'activité résiduelle des 2 enzymes (amylases et phytases) est déterminée selon le protocole précédemment décrit.

b) Effet du traitement du pH sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

L'impact du pH sur la stabilité des amylases et des phytases a été évaluée en pré-incubant les échantillons (sans le substrat) dans du HCl à 1M et du NaOH à 1M.

Ce traitement acido-basique est réalisé pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, l'activité résiduelle de 2 enzymes (amylases et phytases) est déterminée selon le protocole précédemment décrit.

c) Influence de NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

L'effet du NaCl sur la stabilité des amylases (Yadav, 2012) et des phytases (Ou *et al.*, 2011) a été évaluée par une préincubation des échantillons (en absence du substrat) dans le tampon de la réaction, additionné du NaCl à 1M et ceci pendant 2 h à température ambiante. Après traitement au NaCl, l'activité résiduelle des enzymes est mesurée en suivant le protocole standard précédemment utilisé.

Résultats et discussion

1. Le matériel biologique

Pour rechercher des activités biologiques (activités antioxydantes et enzymatiques) dans les graines de *Cucurbita pepo* (Figure 6) achetées du commerce de la ville d'Ain Témouchent, une solution a été préparée à partir de la poudre de ces graines.

2. Dosage des protéines dans une solution de graines de *Cucurbita pepo*

Pour déterminer la teneur en protéines de l'échantillon de solution de graines de *Cucurbita pepo*, une courbe d'étalonnage $DO_{595nm} = f([hémoglobine])$ a été établie (Figure 7).

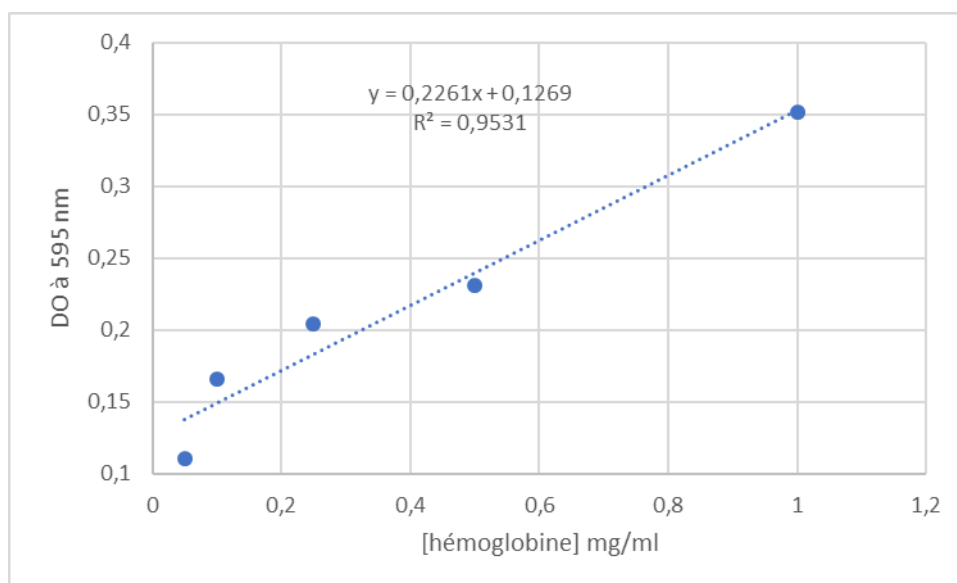


Figure 7 : Courbe étalon de l'hémoglobine.

Le résultat de la concentration protéique dans l'extrait de graines de *Cucurbita pepo* préparé à une concentration initiale de 200mg/mL conformément au protocole décrit dans la section " Matériel et méthodes ", met en évidence une concentration de 1.21 mg/mL de protéines.

3. Recherche d'activités antioxydants dans les graines de *Cucurbita pepo*

3.1. Recherche d'activité catalasique dans les graines de *Cucurbita pepo*

Pour déterminer la quantité d' H_2O_2 dégradée par les catalases dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*, une courbe étalon $DO_{240nm} = f([H_2O_2])$ a été tracée (Figure 8).

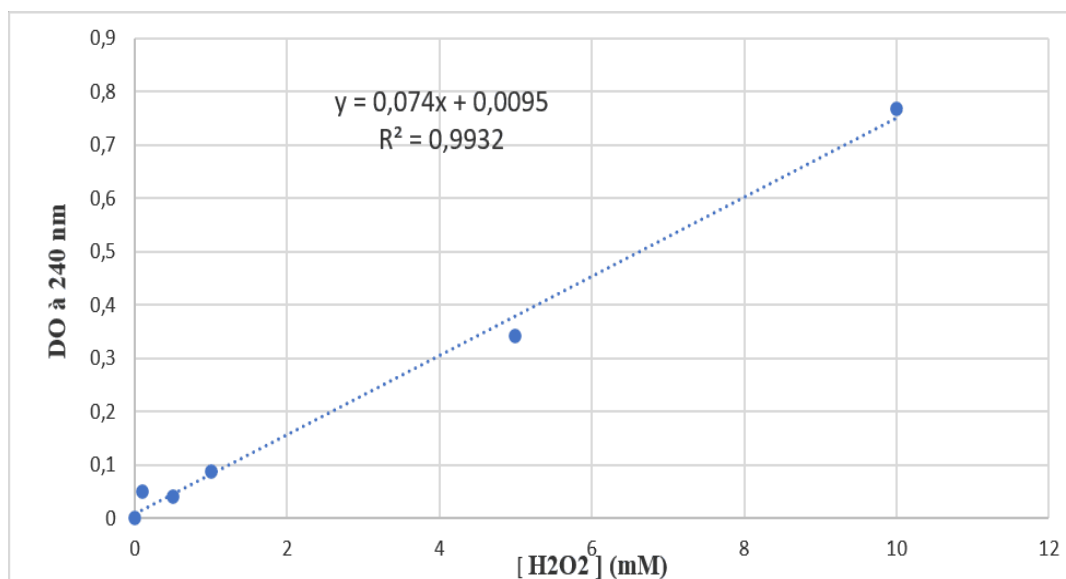


Figure 8 : Courbe étalon d'H₂O₂

Dans notre étude, l'activité catalasique a été déterminée dans les solutions de l'échantillon préparées à deux concentrations différentes (100 mg/ mL et 200 mg/ mL). Cette activité enzymatique a été évaluée en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en fonction de la concentration de l'échantillon étudié. La diminution de la quantité d'H₂O₂ reflète l'activité de la catalase présente dans l'échantillon (Figure 9).

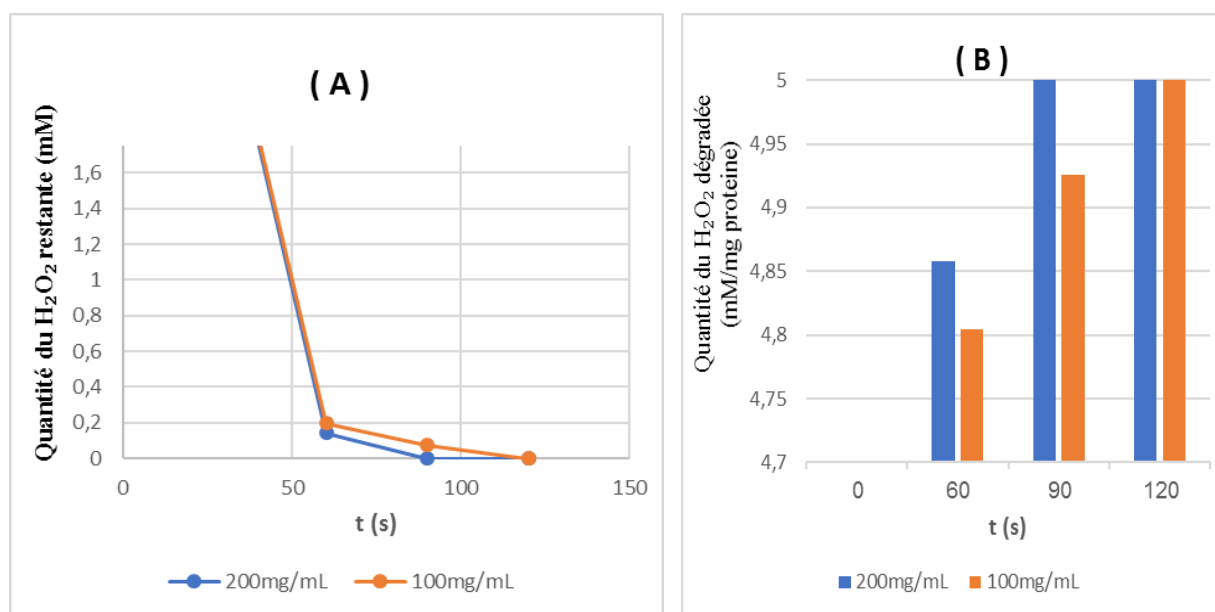


Figure 9 : Evaluation de l'activité catalasique dans la solution des graines *Cucurbita pepo*.

(A) : Quantité de H_2O_2 restante dans les solutions de l'échantillon (100 mg/ mL et 200 mg/ mL).

(B) : Quantité de H_2O_2 dégradée par les solutions de l'échantillon (100 mg/ mL et 200 mg/ mL)

La Figure (9A), montre que la quantité d' H_2O_2 restante diminue en fonction du temps et de la concentration de la solution des graines, ce qui signifie une augmentation de la quantité d' H_2O_2 dégradée (Figure 9B). Ces résultats confirment la présence d'une activité catalasique dans les graines de *Cucurbita pepo*.

Dans notre étude, la diminution de la quantité restante de H_2O_2 (Figure 9A), accompagnée par l'augmentation de la quantité dégradée (Figure 9B).

La diminution de la quantité de l' H_2O_2 traduit une activité antioxydante de l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo*. Cette diminution reflète l'action d'enzymes telles que la catalase (CAT), capables de décomposer l' H_2O_2 en H_2O et en O_2 .

Ces résultats sont comparables à ceux effectués sur d'autres graines, en effet, des études rapportées par Zhang *et al.* (2016), ont montré que les extraits bruts de graines de Glycine max (soja), sont dotés d'une forte capacité de dégradation du H_2O_2 .

Aussi, d'autres études rapportées par Yücebilgiç et Bozdemir (2010), qui ont mis en évidence une activité catalasique significative dans l'extrait de graines de *Linum usitatissimum*. Dans leur étude, la dégradation du H_2O_2 a été clairement associée à l'action d'enzymes antioxydantes, notamment la catalase et la superoxyde dismutase, qui interviennent de manière complémentaire dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène. En effet, la superoxyde dismutase assure la transformation des radicaux superoxydes en H_2O_2 , lequel est ensuite rapidement décomposé par la catalase en eau et en oxygène, évitant ainsi son accumulation et ses effets toxiques sur les structures cellulaires. Ce mécanisme enzymatique en cascade constitue un système de défense essentiel contre le stress oxydatif (Yücebilgiç et Bozdemir, 2010).

De plus, nos résultats (Figure 9), montrent une légère différence a été observée entre les concentrations testées (100 et 200 mg/ml), suggérant un effet de la concentration sur la capacité de dégradation du H_2O_2 .

Par ailleurs, l'activité observée dans notre extrait aqueux pourrait être corrélée à la présence de composés bioactifs tels que les phénols, dont l'accumulation est un facteur clé de la défense antioxydante (Asghar *et al.*, 2021). Cette activité neutralisante confirme que les graines de *Cucurbita* possèdent un potentiel élevé pour réduire les dommages cellulaires liés

à l' H_2O_2 . D'autre part, l'activité antioxydante mise en évidence pourrait également impliquer des molécules osmorégulatrices comme la proline, qui, en synergie avec les enzymes antioxydantes, contribuent à la protection contre le stress oxydatif (Asghar *et al.*, 2021).

Des travaux similaires réalisés spécifiquement sur les graines de *Cucurbita pepo*, où une activité antioxydante élevée a été mise en évidence grâce à leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes (Nawirska-Olszańska *et al.*, ; 2013 Soni *et al.*, 2018). Ces composés sont reconnus pour leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène, notamment l' H_2O_2 , et à limiter les dommages oxydatifs au niveau cellulaire (Prior *et al.*, 2005 ; Apak *et al.*, 2016).

Concernant l'extrait aqueux utilisé dans notre étude, plusieurs études ont montré que ce type d'extraction permet de récupérer efficacement une partie des composés hydrosolubles, notamment certains polyphénols et flavonoïdes (Nawirska-Olszańska *et al.*, 2013), responsables de l'activité antioxydante observée.

Toutefois, l'efficacité de cette réaction peut varier selon les conditions expérimentales, notamment la concentration de l'extrait et la durée d'incubation.

Dans ce contexte, la diminution du H_2O_2 observée dans notre étude suggère que l'extrait de graines de *Cucurbita pepo* agit en réduisant la disponibilité de cette molécule pro-oxydante, ce qui pourrait limiter la formation des ERO et prévenir les altérations cellulaires décrites par Lucchesi *et al.* (2014).

3.2. Recherche des capacités de piégeage du DPPH dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*

a) Préparation du courbe étalon du DPPH

Dans le but de déterminer la quantité de DPPH piégé par l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo*, une courbe étalon $\text{DO}_{517\text{ nm}} = f([\text{DPPH}])$ a été tracée (Figure 10).

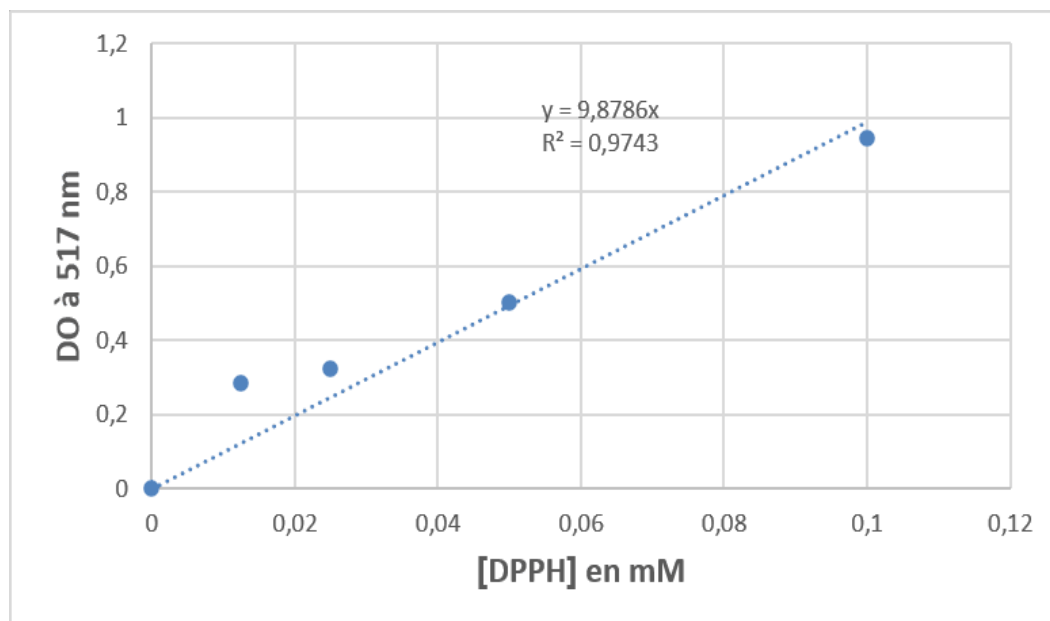


Figure 10 : Courbe étalon du DPPH

b) Recherche de l'activité de piégeage du DPPH

Un autre test de la recherche de l'activité antioxydante a été réalisé et qui se base sur le principe de piégeage du radical libre DPPH par une solution des graines de *Cucurbita pepo*. Ce test permet d'évaluer la dégradation du DPPH en présence d'un extrait aqueux de graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats de ce test (Figure 11A) montrent que la solution de graines de *Cucurbita pepo* est dotée d'une capacité de piégeage du DPPH. En effet, on remarque une diminution de la quantité du DPPH en fonction de la concentration de la solution des graines.

L'IC₅₀ (**I**nhibitory **C**oncentration), qui représente la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % du DPPH (Singh *et al.*, 2016) de l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* été calculé. L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé : plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande (Sharififar *et al.*, 2007).

Aussi l'IC₅₀ de l'acide ascorbique (un antioxydant standard) a été calculé pour comparer ses capacités de piégeage du radical libre DPPH qui sert à évaluer l'efficacité de piégeage des radicaux DPPH (Talbi *et al.*, 2014) avec celui de l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo*.

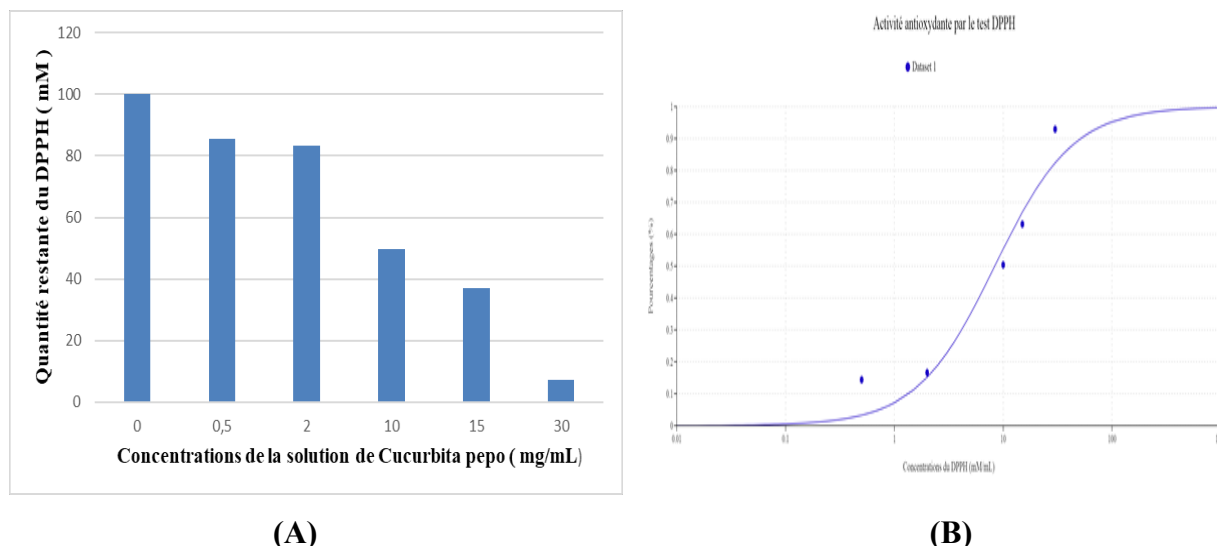


Figure 11: Capacité de piégeage du DPPH par la solution des graines de *Cucurbita pepo* (A) et détermination de son IC50 (B)

Les résultats de ces calculs montrent que l'IC50 de la solution des graines *Cucurbita* préparée est égal à 8.36 mg/mL (Figure 11 B). Nos résultats sont en concordance qualitative avec ceux de Tijjani *et al.* (2022), qui ont également mesuré une activité antioxydante pour un extrait aqueux, mais celui des graines de *Cucurbita maxima*. Cependant, l'IC50 obtenu de cette étude est égal à 29.27 mg/mL, supérieur à celui obtenue dans notre étude, ce qui signifié que l'activité de piégeage mesurée dans notre étude est bien supérieure.

Les travaux d'Erinda *et al.* (2024) ont montré que l'extrait aqueux de *Cucurbita moshata* obtenu par extraction assistée par ultrasons à un IC50 inférieure à 0.05 mg/mL, ce qui indique qu'il est doté d'un effet antioxydant plus fort à celui de notre échantillon.

Bien que des écarts quantitatifs existent, les différentes études confirment que les graines de *Cucurbita pepo* en milieu aqueux possèdent une activité anti radicalaire mesurable au DPPH, cette variabilité s'explique par des facteurs variétaux (différence d'espèce), et méthodologiques (conditions d'extraction).

Par ailleurs, Grasu *et al.* (2025) rapportent des IC50 compris entre 1.02 et 4.19 mg/mL pour un extrait hydro éthanolique dans des graines de *Cucurbita pepo*, ce qui suggère une activité plus forte que celle de nos graines, soulignant l'influence majeure du solvant d'extraction. En effet, plusieurs études ont montré que la nature du solvant d'extraction modifie fortement l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH, en raison de différences d'affinité pour les composés phénoliques, et les autres antioxydants (Pier *et al.*, 2017), en particulier, les mélanges hydroalcooliques (méthanol, éthanol, mélange eau-alcool) extraient

plus efficacement les composés phénoliques et flavonoïdiques des graines, et présentent une capacité de piégeage du DPPH plus élevée que les extraits purement aqueux, ou que certaines fractions lipophiles (Lamija *et al.*, 2023)., tandis que les huiles ou extraits non polaires mettent surtout en évidence l'apport des tocophérols et des caroténoïdes (Dalibor *et al.* 2016).

Les polyphénols responsables du piégeage du DPPH sont en grande partie polaires : ils sont mieux solubilisés par des mélanges eau-alcool que par l'eau seule, ou par des solvants lipidiques (Huda *et al.*, 2023).

Il faut dire que chaque solvant possède une polarité, un pH et parfois une capacité de formation de liaisons hydrogène différents, ce qui favorise l'extraction de certains antioxydants (acides phénoliques, flavonoïdes) et en défavorise d'autres, modifiant ainsi les molécules qui vont réagir avec le DPPH (Haylana *et al.*, 2022).

D'une autre part, l'étude de Hawash *et al.* (2025) basée aussi sur le test au DPPH a montré que la valeur d'IC50 pour l'huile fixe de graines de *Cucurbita pepo* est de 7.97 ± 0.17 µg/mL, cela signifie que cette huile présente une activité antioxydante plus élevée grâce à la présence de composés lipophiles (tocophérols, et les caroténoïdes). En effet, l'activité antioxydante marquée des tocophérols, des caroténoïdes et des composés phénoliques vis-à-vis du radical DPPH s'explique par leurs capacités à lui céder un électron, ou un atome d'hydrogène, ce qui réduit le DPPH en DPPH-H, et conduit à sa stabilisation (Sagar et Singh, 2011).

D'autres résultats, qui sont appuyés par des données comparatives provenant de différentes régions : les huiles de *Cucurbita pepo* issues de Chine, de Turquie, de Malaisie, et du Sudan, avec des valeurs d'IC50 de 123.93mg/mL, 46.53% DPPH inhibé, 142.85µg/mL, 0.1mg/mL respectivement, présentant des capacités antioxydantes variables, et cela suggère que les différences régionales et les protocoles d'extraction, influencent l'efficacité de ces huiles en tant qu'antioxydants (Hawash *et al.*, 2025).

Globalement, ces études sont en accord avec beaucoup de travaux, et cela montre que les graines de *Cucurbita pepo* constituent une source importante de composés phénoliques' et de tocophérols responsables d'une activité antioxydante variable selon le solvant, l'origine géographique, et le protocole d'extraction (Maria *et al.*,2025).

En effet, la présence de composés phénolique dans les graines de *Cucurbita pepo* contribue de manière déterminante à la capacité antioxydante, comme le montrent plusieurs travaux qui mettent en évidence des teneurs élevés en phénols totaux, et une forte activité de piégeage du radical DPPH et d'autres systèmes oxydants (Pier *et al.*,2017), ces composés, associés notamment à des flavonoïdes et des tocophérols, jouent un rôle clé dans les

mécanismes de défense de la plante contre le stress oxydatif, et expliquent le potentiel de ces graines comme source d'antioxydants naturels d'intérêt nutritionnel et pharmaceutique (Maria *et al.*, 2025).

Concernant l'acide ascorbique, il possède une très forte capacité de piégeage du DPPH (Figure 12A) et son IC₅₀ est égal à 0.0052 µg/mL (Figure 12 B),

Cette valeur est très faible et indique que l'acide ascorbique possède une capacité antioxydante plus forte que celle de notre solution, justifiant son utilisation comme référence positive dans ce genre d'essais.

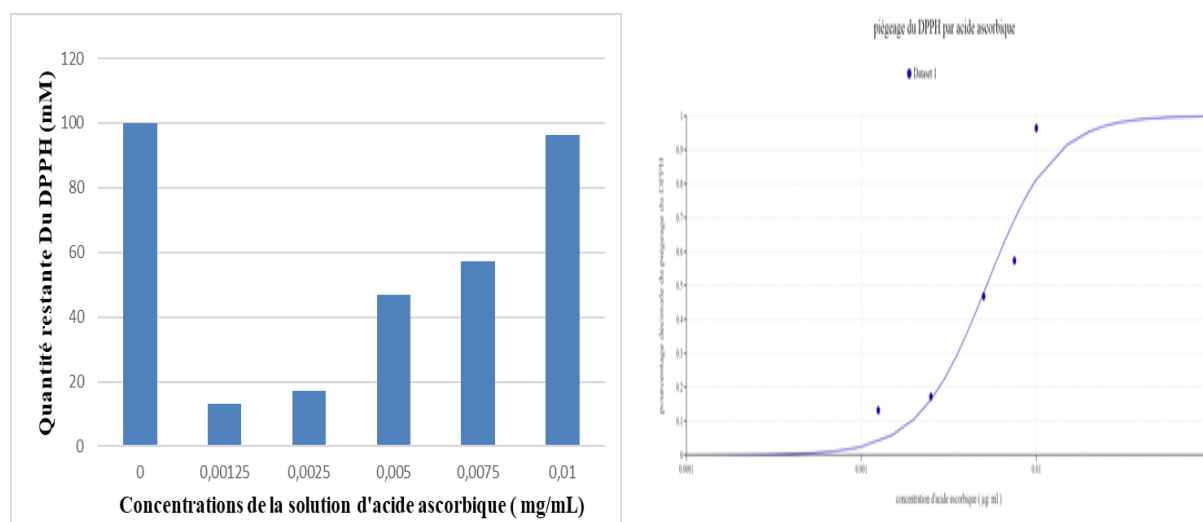


Figure 12: Capacité du piégeage de DPPH par l'acide ascorbique (A) et détermination de son IC₅₀ (B).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* possède un potentiel antioxydant notable, mis en évidence à la fois par sa capacité à piéger le radical DPPH et à réduire la disponibilité du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette diminution du H₂O₂ suggère que l'extrait agit comme un système de défense chimique capable de limiter l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de prévenir les dommages oxydatifs au niveau cellulaire (Salla *et al.*, 2015 ; Broznić *et al.*, 2016)

L'activité observée peut être attribuée à la richesse des graines de *Cucurbita pepo* en composés bioactifs, notamment en composés phénoliques et en tocophérols, connus pour leur aptitude à neutraliser les radicaux libres et à interrompre les réactions d'oxydation en chaîne (Perretti *et al.*, 2017).

Globalement, ces observations confirment que les graines de *Cucurbita pepo* constituent une source végétale intéressante de molécules antioxydantes, dont l'efficacité varie selon le solvant d'extraction, l'origine botanique et les conditions expérimentales

utilisées. Ainsi, l'extrait étudié pourrait être envisagé comme un candidat prometteur pour des applications nutraceutiques (aliments qui offrent des avantages médicaux incluant la prévention et le traitement des maladies), alimentaires ou pharmaceutiques visant à limiter le stress oxydatif (Maria *et al.*, 2025).

4. Recherche des activités enzymatiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

4.1. Recherche des activités amylasiques des graines de *Cucurbita pepo*

a) Préparation de la courbe étalon de l'amidon

Pour déterminer la quantité l'amidon dégradée par l'activité amylasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo*, une courbe étalon $DO_{620nm} = f([amidon])$ a été tracée (figure 13).

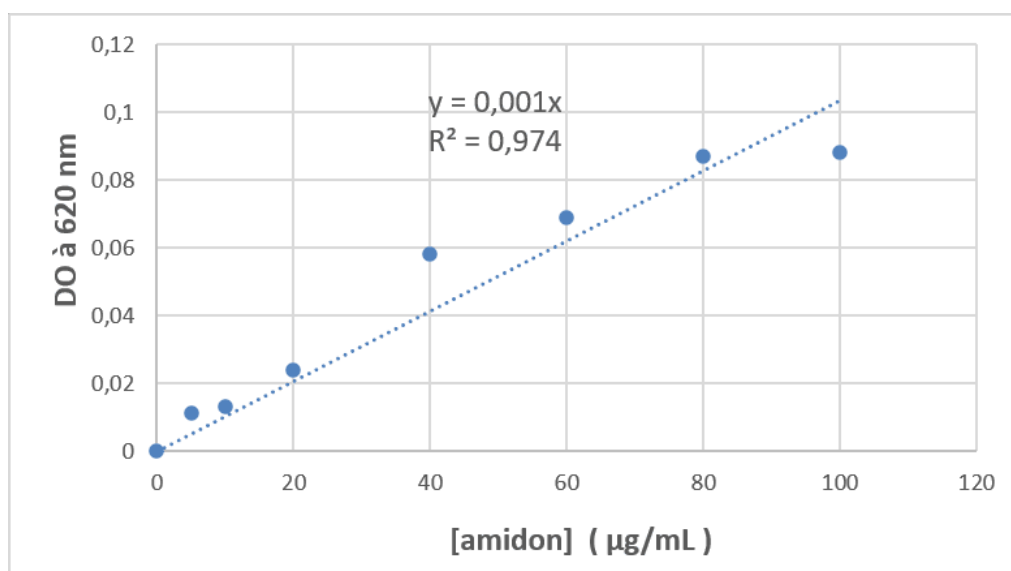


Figure 13 : Courbe étalon de l'amidon

Ensuite, l'activité amylasique a été recherchée dans la l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* selon le protocole cité dans la partie Matériel et Méthodes.

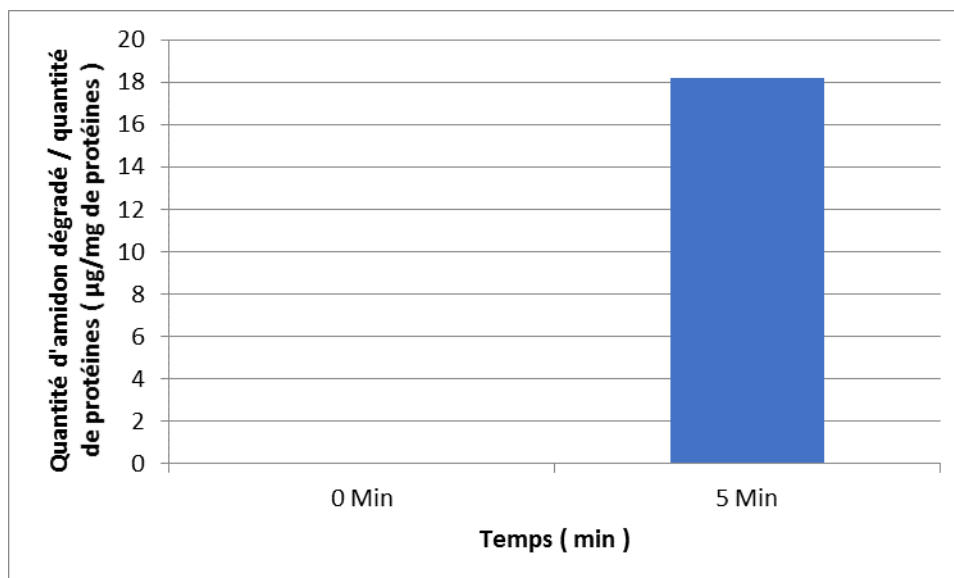


Figure 14: Mise en évidence d'activité amylasique dans les graines de *Cucurbita pepo*

Les résultats montrent une dégradation de l'amidon après 5 min d'incubation (~18,18µg/mg de protéines) (figure 14).

Les résultats obtenus confirment la présence d'une activité notable des enzymes amylasiques, les amylases jouent un rôle essentiel dans la mobilisation des réserves d'amidon pendant la germination des graines de cucurbitacées, des travaux récents sur l' α -amylase purifiée à partir de graines germées de *Cucurbita moschata* ont montré une activité spécifique élevée et une bonne stabilité, ce qui confirme l'importance de cette enzyme dans l'hydrolyse de l'amidon et son intérêt potentiel pour des applications biotechnologiques (Saijai *et al.*, 2025). Les amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon en maltose puis en glucose, le maltose est soit hydrolysé en glucose pour fournir de l'énergie (ATP), soit polymérisé en cellulose pour la formation des parois cellulaires. Cette double utilisation permet à la graine de produire à la fois l'énergie nécessaire à la germination, et les matériaux structuraux pour la croissance de l'embryon (Aoki *et al.*, 2006 ; Maleki *et al.*, 2016)

4.2. Recherche des activités phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

a) Préparation de la courbe étalon du KH_2PO_4

Pour déterminer la quantité de Pi libérée par les phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita*, une courbe étalon $\text{DO}_{355\text{nm}} = f([\text{KH}_2\text{PO}_4])$ a été tracée (figure 15).

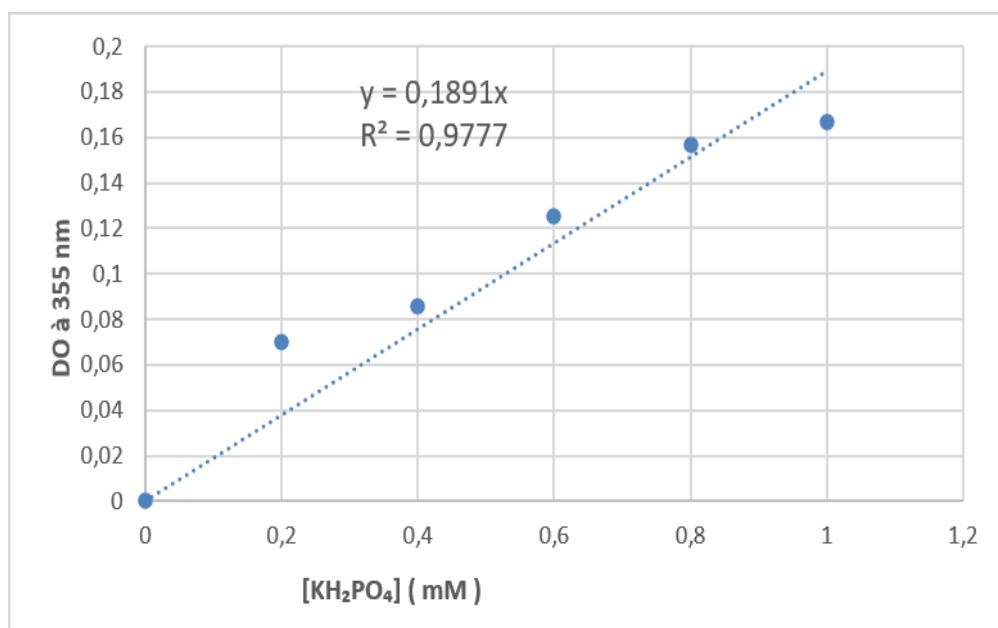


Figure 15: Courbe étalon du KH₂PO₄.

Ensuite, l'activité phytasique a été recherchée dans la solution des graines de *Cucurbita pepo* en suivant le protocole décrit dans la partie matérielle et méthodes.

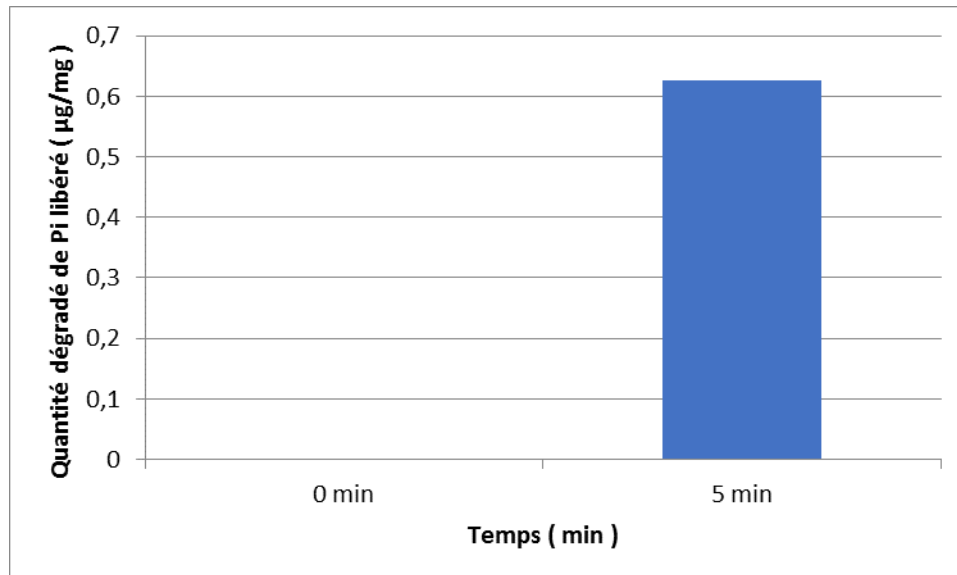


Figure 16 : mise en évidence d'activité phytasique dans les graines de *Cucurbita pepo*

Les résultats montrent une libération du phosphate inorganique (Pi) après 5 min d'incubation (~0.625 µg/mg de protéines) (figure 16), ce qui signifie la présence d'une activité phytasique.

Ce qui confirme que les graines de *Cucurbita pepo* possèdent une activité phytasique naturelle capable de libérer du phosphate inorganique après une courte durée d'incubation. Cette activité pourrait jouer un rôle important dans la mobilisation du phosphore au cours de la germination et améliorer la valeur nutritionnelle des graines (Zimmermann *et al.*, 2003 ; Azeke *et al.*, 2007).

Ce comportement est similaire à celui observé dans les graines de *Vicia faba* (fababeau), *Lens culinaris* (lentille), *Pisum sativum* (pois) et *Glycine max* (soja), où la production de Pi augmente lors de l'hydrolyse du phytate (Greiner *et al.*, 2001 ; Steiner *et al.*, 2007).

De même, Azeke *et al.* (2007) ont observé une augmentation importante de l'activité phytasique lors de la germination de plusieurs graines, indiquant que les enzymes endogènes des graines deviennent actives et hydrolysent les réserves phosphorées sous forme de phytate.

4.3. Caractérisation des activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*.

a) Influence de la température sur les activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

L'influence de la température sur l'activité amylasique et l'activité phytasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo*, a été testée (comme décrit précédemment dans le protocole) à différentes températures 20, 30, 40 et 50°C (Figure 17 A et B).

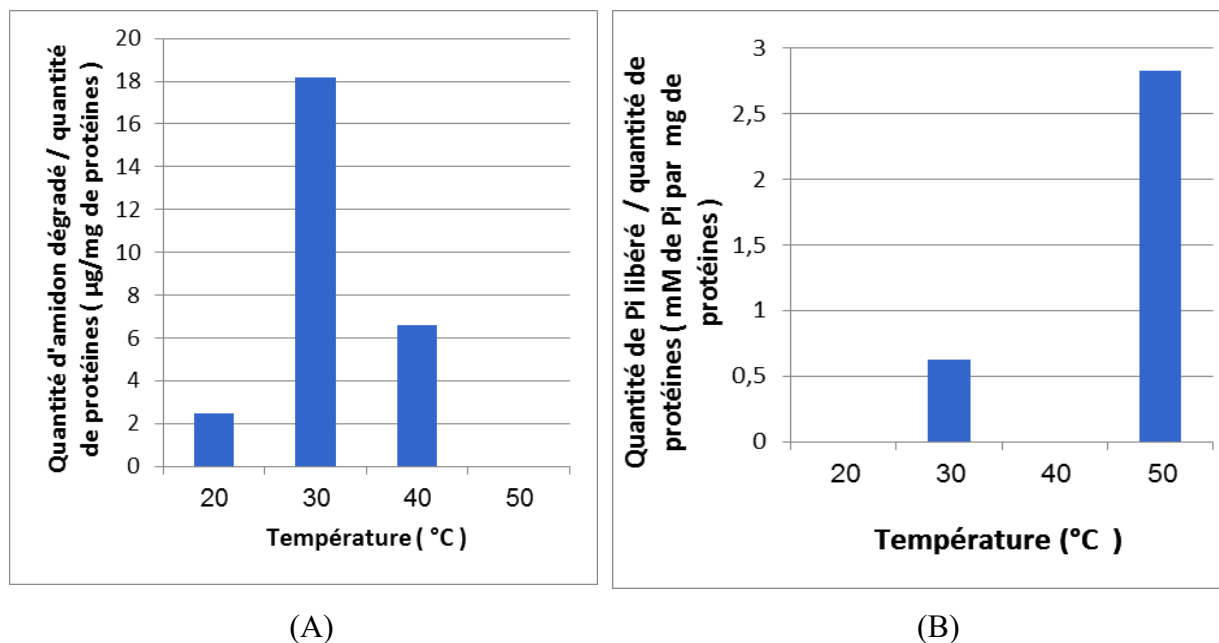


Figure 17 : Influence de la température sur l'activité amylasique et phytasique de la solution de graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : Influence de la température sur l'activité amylasique dans une solution de graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Influence de la température sur l'activité phytasique dans une solution de graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats montrent que les activités amylasique et phytasique sont fortement influencées par la température d'incubation testée, avec des températures optimales distinctes pour chaque enzyme (figure 17).

L'activité amylasique de la solution de *Cucurbita pepo* présente des variations en fonction de la température. Cela signifie que la quantité d'amidon dégradée est influencée par les températures d'incubation testées. L'activité amylasique est meilleure à la température 30°C (température optimale) (18.18 µg d'amidon dégradé/mg de protéines) (figure 17A). Cependant, une absence totale de cette activité est remarquée à 50°C, une faible activité est remarquée à 20 et 40 °C (2.04 et 5.46 µg d'amidon dégradé par mg de protéines, respectivement).

Ces résultats sont en accord avec une étude récente sur l' α -amylase purifiée de graines de germées de *Cucurbita moschata* qui montre que l'enzyme reste active à 30 °C (Saijai *et al.*, 2025). De même, Sari *et al* (2021), ont rapporté que l' α -amylase des graines germées de

Batang Piaman (une variété de riz), et celle des graines germées de soja, présentent une activité optimale autour de 30 °C. Agustini et Herdyastuti (2020) ont également observé une activité amylasique optimale similaire à 30°C dans les graines germées de soja.

Les amylases de graines sont adaptées aux conditions naturelles de germination favorisant la mobilisation des réserves d'amidon nécessaires à l'embryon, qui se produisent généralement entre 20 et 30°C (Ruanthika *et al.*, 2023), cette plage de températures favorise l'expression optimale des gènes codant pour l'amylase et l'activation des processus métaboliques de la graine (Rebecca *et al.*, 2019).

Ainsi à 30°C, l'enzyme maintient un équilibre optimale entre la stabilité structurale (la protéine conserve sa conformation tridimensionnelle active sans dénaturation thermique) et la flexibilité conformationnelle (adaptation du site actif) permettant aux mouvements moléculaires nécessaires à la catalase d'être rapides pour une activité efficace (Riziotis *et al.*, 2022), il a été observé que des températures élevées peuvent altérer les liaisons hydrogène et entraîner la dénaturation, l'activité de l' α -amylase croît avec la température, néanmoins, si la température devient excessive, l'enzyme risque d'être endommagée, , au-delà de 40 °C, la dégradation de la plupart des enzymes végétales se produit rapidement (Sari *et al.*, 2021).

Bien que l'optimum catalytique de l'enzyme purifiée soit souvent plus élevé dans la littérature, le maximum observée à 30°C dans notre extrait aqueux correspond à un optimum apparent du système globale, en effet dans un extrait brut, l'activité de l'amylase dépend non seulement de l'enzyme, mais aussi de l'interaction avec d'autres protéines, des métabolites et des inhibiteurs présents dans la matrice, qui peuvent modifier la température apparente d'optimum d'activité enzymatique (Dorothy et Naofumi, 2002).

Contrairement à plusieurs études sur les amylases de graines, qui rapportent une activité significative à 50°C (ex : chez le millet africain, l' α -amylase conserve environ 64% de son activité après incubation à 50°C, et l'optimum de nombreuses amylases de graines se situe entre 45 et 60°C) (Dorothy *et al.*, 2002), notre étude a révélé une absence de l'activité amylasique à 50°C. Cela est peut-être due à une dénaturation thermique irréversible, car pour une enzyme ayant un optimum à 30°C, la température de 50°C représente un stress thermique important, conduisant à la perte de sa structure tridimensionnelle active (Yadav et Prakash, 2009).

Pour les phytases, les résultats montrent que la production de Pi dépend de la température aussi. Contrairement au profil observé chez les amylases, une absence totale d'activité est enregistrée à 20 °C et 40 °C (0 µg/mg), tandis qu'une activité modérée apparaît

à 30 °C (environ 0,6 µg/mg). La production la plus élevée est obtenue à 50 °C (environ 2,8 µg/mg) ce qui diffère de l'amylase, dont l'optimum se situe à 30°C.

Ces résultats indiquent que l'activité amylasique et la phytasique sont fortement influencées par la température, avec un optimum à 30°C pour les amylases et à 50 °C pour les phytases correspondant à une efficacité catalytique maximale.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lee *et al.* (2007), qui ont observé une activité phytasique optimale autour de 50°C dans des graines germées de *Oryza sativa* (riz). Ces auteurs ont montré que la phytase végétale présente une activité maximale dans une plage de température similaire, ce qui confirme la cohérence des résultats obtenus avec la littérature scientifique.

De même Agostini et Ida (2006), ont montré que la phytase extraite de graines germées de *Helianthus annuus* (tournesol) présente une activité optimale dans une gamme de température similaire (50–55°C). Aussi, ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, qui montrent que les phytases végétales, notamment celles présentes dans des graines comme *Helianthus annuus*, présentent généralement un comportement thermique similaire (Konietzny & Greiner, 2002 ; Haros *et al.*, 2009).

Toutefois, les légères variations observées entre les différentes études peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, notamment la nature de la préparation enzymatique utilisée. Dans notre cas, l'étude repose sur un extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo*, contenant non seulement la phytase mais également divers composés susceptibles d'interagir avec l'enzyme. Ces substances peuvent influencer partiellement l'activité enzymatique et sa stabilité thermique, contrairement aux systèmes enzymatiques plus purifiés utilisés dans certaines études (Haros *et al.*, 2009).

b) Influence du pH sur les activités amylasiques et phytasique des graines de *Cucurbita pepo*

L'étude de l'influence du pH sur l'activité des amylases et des phytases de la solution des graines de *Cucurbita pepo* a été testée, comme décrit précédemment dans le protocole, aux pH 5, 7, 9 (Figure 18).

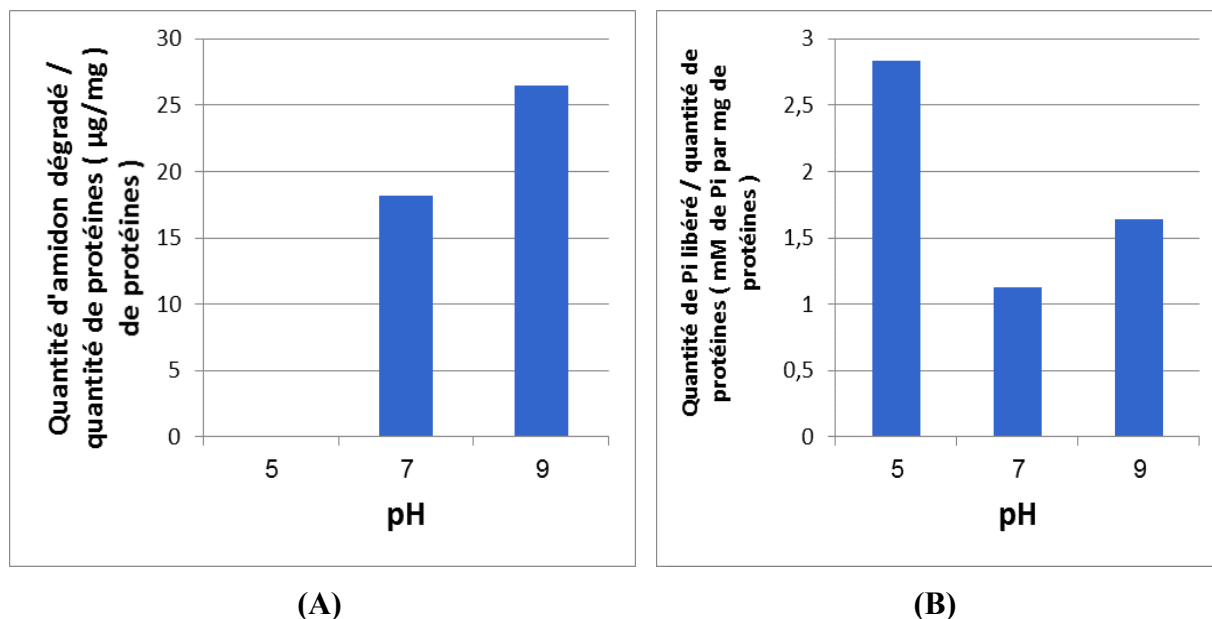


Figure 18: Influence du pH sur l'activité amylasique et phytasique dans la solution de graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : Influence du pH sur l'activité amylasique dans la solution de graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Influence du pH sur l'activité phytasique dans la solution de graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats montrent que l'activité amylasique et la phytasique de l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* varie selon le pH testé (Figure 18).

Pour les amylases, les résultats montrent que le pH optimal est de 9 (26.44 µg d'amidon dégradé/mg de protéines), avec une activité plus faible au pH 7 (18.18 µg d'amidon dégradé / mg de protéines) (figure 18A), cependant on remarque une absence totale de l'activité amylasique au pH 5.

L'effet du pH sur l'activité amylasique de *Cucurbita pepo* révèle une dépendance marquée de l'enzyme vis-à-vis de l'alcalinité du milieu réactionnel, avec un optimum en milieu alcalin.

Il a été montré que l' α -amylase du *Cucurbita moschata* reste bien active à un pH alcalin égale à 9 (Saijai *et al.*, 2025). Ces enzymes alcalines sont intéressantes dans les applications industrielles nécessitant des conditions alcalines (détergents, bioéthanol, textile) (Kainat *et al.*, 2026). Bien que la majorité des α -amylases des graines et des végétaux ont un pH optimal acide à neutre (pH 5 -7), comme par exemple l'activité de l' α -amylase des graines de pois verts est optimale à pH 5, tandis qu'elle est trop faible à pH 9 selon Khalif Salman *et al* (2024), il existe aussi, chez d'autres organismes, des α -amylases alcalines adaptées à des

environnements à pH 8 à 9, notamment chez les insectes phytophages (Valizadeh *et al.*, 2013), et des microorganismes alcaliphiles (Ahmed *et al.*, 2017), cela suggère que les enzymes amylasiques des graines qu'on a étudié pourraient être de ce type.

La composition en acides aminés des α -amylases alcalines se caractérise par une réduction des résidus basiques (lysine, arginine) et une augmentation des résidus acides (aspartate, glutamate), ce qui stabilise la structure protéique de l'enzyme en milieu alcalin (Parashar et Satyanarayana, 2018), ceci peut expliquer le comportement des enzymes amylasiques dans notre échantillon. De plus la flexibilité conformationnelle du site actif permet à l'enzyme de s'adapter aux variations de pH et de conserver son activité catalytique (Erik Nielsen *et al.*, 2001).

Il faut noter également que les graines ainsi que les légumineuses, et les tubercules contiennent des inhibiteurs protéiques d' α -amylases, qui deviennent plus actifs à pH acide, aboutissant à la dénaturation de la structure enzymatique, conduisant à une activité amylasique quasi nulle (Yamane et Oikawa, 2010).

Concernant les phytases, les résultats montrent que la production de Pi est aussi influencée par le pH du milieu, mais avec un profil différent de celui des amylases. La meilleure activité est enregistrée à pH 5 (pH optimal) (environ 2,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines). À pH 9, environ 1,7 μg de Pi est produite par mg de protéines. Cependant, la plus faible activité est observée à pH 7, environ 1,2 μg de Pi par mg de protéines).

L'effet du pH sur l'activité phytasique de *Cucurbita pepo* révèle une dépendance marquée de l'enzyme vis-à-vis de l'acidité du milieu réactionnel. Les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique atteint un maximum à pH 5 (~2,8), tandis qu'elle diminue de manière significative à pH 7 (~1,1) et reste modérée à pH 9 (~1,6), ce qui indique un optimum en milieu légèrement acide, cette spécificité pour l'acidité contraste avec la préférence alcaline des amylases du même extrait, et avec leur activité absente en acidité.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lee *et al.* (2007) dans leur étude sur la phytase issue des grains de riz germés (*Oryza sativa*), où les auteurs ont montré que l'activité enzymatique est maximale en milieu acide, avec un optimum situé autour de pH 5. Ils ont également observé une diminution progressive de l'activité lorsque le pH devient

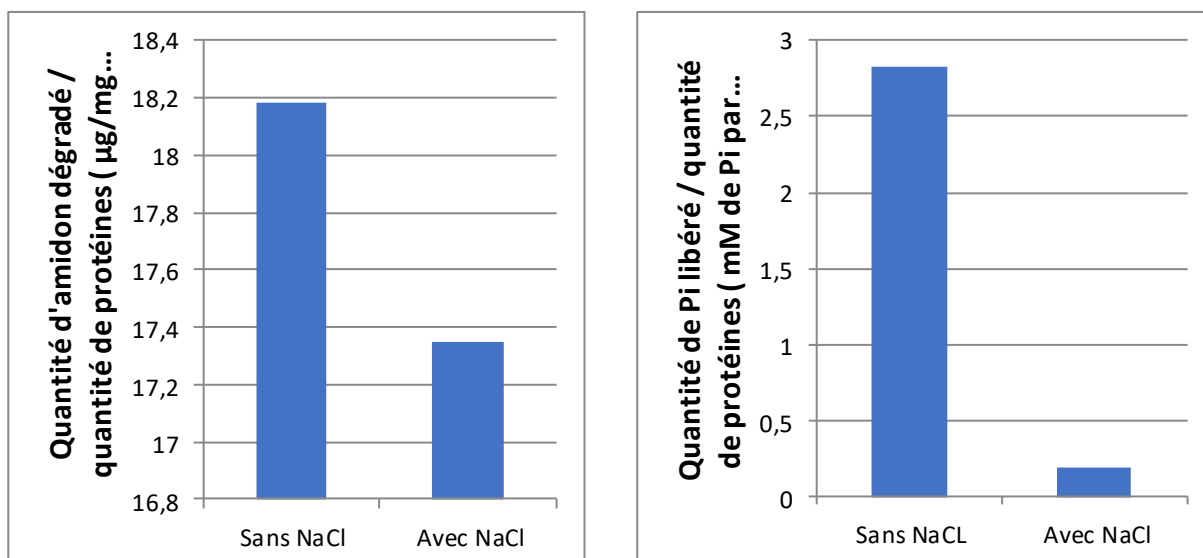
neutre puis alcalin, ce qui confirme que la phytase végétale est fortement sensible aux variations de pH.

Ces résultats sont en accord également avec ceux rapportés par Agostini et Ida (2006), qui ont montré que la phytase extraite de graines germées de tournesol présente également un pH optimal autour de 5–5,5. Les auteurs ont souligné que les phytases d'origine végétale fonctionnent généralement dans une gamme de pH acide à légèrement acide.

La diminution de l'activité observée à pH 7 et pH 9 dans notre étude peut être expliquée par des modifications de l'état d'ionisation des acides aminés du site actif, entraînant une perturbation des interactions enzyme–substrat et une baisse de l'efficacité catalytique. Ainsi, la concordance entre nos résultats et ceux de Lee *et al.* (2007) confirme que les phytases issues de sources végétales présentent généralement une activité optimale en milieu acide. Aussi, Wyss *et al.* (1999) ont confirmé que les phytases sont des enzymes acido-actives dont l'activité est optimale en milieu acide et diminue nettement en dehors de cette gamme de pH, tandis que Kostrewa *et al.* (1999) ont mis en évidence que cette perte d'activité est liée à une perturbation structurale de l'enzyme, notamment au niveau de la conformation du site actif.

c) Influence du NaCl sur les activités amylasiques et phytasiques des graines de *Cucurbita pepo*

L'étude d'influence du NaCl sur les activités enzymatiques de l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* a été évaluée par addition au tampon du NaCl à une concentration finale de 0,1 M, comme décrit précédemment dans le protocole. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :



(A)

(B)

Figure 19 : Influence du NaCl sur l'activité amylasique et phytasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : Influence du NaCl sur l'activité amylasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Influence du NaCl sur l'activité phytasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats montrent que l'activité amylasique ainsi que la phytasique de la solution des graines de *Cucurbita pepo* sont affectées par la présence du NaCl (figure 19), mais avec des intensités très distinctes.

La quantité d'amidon dégradée par les amylases dans l'extrait aqueux préparée est légèrement faible en présence du NaCl (17,35 µg d'amidon dégradé/par mg de protéine) (figure 19A) en comparant avec la quantité dégradée en absence du sel (18,18 µg), soit une conservation d'environ 95% de l'activité optimale (Figure 19A). Ce résultat peut être expliqué par le fait que beaucoup d' α -amylase sont activées par le chlorure car l' α -amylase est une métalo-enzyme d'après Sari *et al*, (2021), le chlorure qui se lie au site actif, augmente l'activité catalytique, et stabilise la conformation active de l'enzyme (Aghajari *et al.*, 2002),

Ce résultat indique que l' α -amylase des graines de *Cucurbita pepo* tolère bien la présence de NaCl, contrairement à ce qui est observé pour certaines graines de céréales, où le milieu salin peut réduire fortement l'activité amylasique, en inhibant par exemple la germination des semences de riz (Liu *et al.*, 2018).

Pour les phytases, les résultats montrent que la présence de NaCl affecte plus fortement la production de Pi, une activité élevée est observée en absence de sel (environ 2,8

µg/mg de protéines), alors qu'en présence du NaCl, la production devient très faible (environ 0,2 µg/mg de protéines) soit une conservation d'environ seulement 07% de l'activité optimale (Figure 19B). Cette sensibilité extrême des phytases au NaCl contraste nettement avec la robustesse des amylases, révélant un comportement fonctionnel différents entre ces deux hydrolases.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de NaCl provoque une forte diminution de la quantité de Pi libéré par rapport au témoin sans NaCl. L'échantillon sans NaCl présente une libération élevée de phosphate inorganique, tandis qu'en présence de NaCl cette valeur devient très faible. Cela indique que le NaCl exerce un effet inhibiteur sur l'activité des phytases des graines de *Cucurbita pepo*.

Ces observations concordent avec les résultats de Abdel-Gawad *et al.* (2013), qui ont montré que plusieurs sels minéraux influencent l'activité phytasique. Ainsi, comme pour les ions inhibiteurs cités dans l'article, le NaCl semble perturber l'activité des phytases en diminuant l'hydrolyse du phytate et donc la libération de Pi. La diminution observée pourrait s'expliquer par une modification de la structure de l'enzyme ou par une perturbation des interactions enzyme-substrat due à l'augmentation de la force ionique du milieu (Abdel-Gawad *et al.*, 2013). Cette perturbation ionique affecte ainsi les phytases bien plus sévèrement que les amylases, confirmant une stratégie d'adaptation distincte de ces deux enzymes aux conditions osmotiques.

4.4. Effet de différent traitements, thermique, pH et NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases des grains de *Cucurbita pepo*

a) Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

L'influence du traitement thermique sur la stabilité des amylases et des phytases présentes dans l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* été testé par préincubation, de cette solution à 90°C pendant 2 h dans un bain-marie (Figure20).

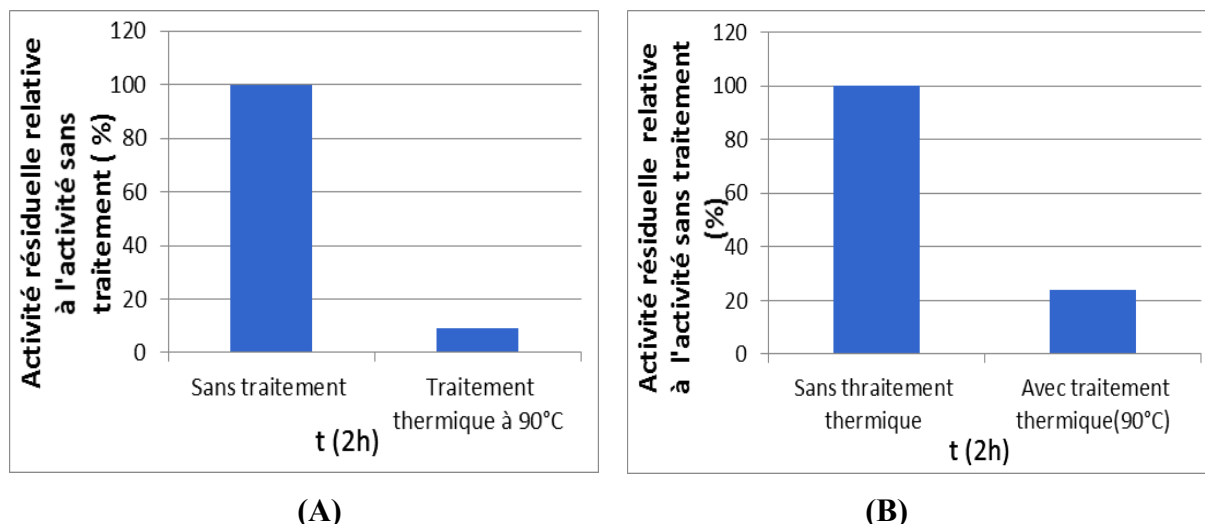


Figure 20 : Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases et des phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : : Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats montrent que les activités amylasique et phytasique diminuent fortement après un traitement thermique de 2 h à 90 °C, mais selon des degrés distincts (figure 20).

Les résultats montrent que l'activité amylasique diminue fortement après un traitement thermique de 2h à 90°C, en effet, après ce traitement, l'activité résiduelle des amylases dans la extrait aqueux préparé a diminué pour arriver à environ 9.09 % (soit une perte de 90.91%) (Figure 20A).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Saijai *et al* (2025) qui ont trouvé que l'activité résiduelle de l'enzyme amylasique des *Cucurbita moschata* germées diminue drastiquement dans des conditions pareilles, après une incubation de 60 min, soit la moitié du temps d'incubation dans notre test.

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus d'une étude, qui a rapporté une activité résiduelle des amylases comprise entre 15 et 18% pour le maïs germé, et entre 20 et 28% pour la patate douce après 30 min à 90°C, suggérant qu'une exposition prolongée de 2h conduirait à une inactivation quasi-totale (Stephano *et al.*, 2018). De plus, une autre étude a révélé que l' α -amylase du malt de teff (*Eragrostis tef*) se désactive presque complètement à 78°C, indiquant une faible stabilité thermique (Mékonnen *et al.*, 2013). L' α -amylase produite

par *Aspergillus oryzae* a subi une inactivation thermique rapide après exposition prolongée à 90°C (Stoforos *et al.*, 2025).

En effet, à 90°C, la structure tridimensionnelle de l'enzyme subit une dénaturation irréversible, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, et les ponts disulfures qui maintiennent la conformation active de l'enzyme se rompent sous l'effet de l'énergie thermique excessive (Saijai *et al.*, 2025), ce qui peut expliquer les résultats qu'on a obtenu.

La thermo sensibilité des amylases de *Cucurbita pepo* (9% d'activité à 90 °C) les exclut des secteurs industriels exigeants, par exemple elles sont inadaptées à la liquéfaction de l'amidon (100–110 °C) en amidonneries aux détergents industriels (70–90 °C) (Souza et Magalhães, 2010) , la production de bioéthanol nécessitant une cuisson intensive (80–95 °C) (Niu *et al.*, 2023), et à la brasserie (65–70 °C) (Schepper *et al.*, 2021). Ces applications requièrent des amylases thermostables comme celles de *Bacillus* ou d'organismes thermophiles par exemple (Souza et Magalhães, 2010). Dans ce cas, une ingénierie enzymatique ou immobilisation serait nécessaire pour améliorer leur thermo stabilité (Kumar *et al.*, 2016).

Malgré cette thermo sensibilité, Ces amylases de *Cucurbita pepo* conservent un intérêt industriel pour les procédés n'exigeant pas une thermo stabilité extrême, par exemple en boulangerie (pétrissage, fermentation), production de jus et de boissons (clarification avec pasteurisation légère préservant la saveur et les nutriments), la lessive à froid (Abdullah *et al.*, 2020), et textile (désencollage) sur tissus fragile (Bhatia *et al.*, 2020).

Les amylases thermosensibles offrent des avantages économiques (réduction de chauffage, prévention de réactions indésirables, l'absence de résidus d'activité enzymatique dans le produit fini, évitant des dégradations ultérieures indésirables (Kuddas *et al.*, 2012).

L'applicabilité d'une enzyme en industrie ne dépend pas exclusivement de sa thermostabilité absolue, mais plutôt de son adéquation aux conditions de procédé requises pour l'application ciblée, pour les procédés qui n'exigent pas une thermostabilité extrême, les amylases végétales mésophiles constituent une source économique et durable, notamment si elles peuvent être produites à faible coût à partir de résidus agricoles, ou valorisées via l'amélioration de leur stabilité par des stratégies comme l'immobilisation enzymatique, l'addition de stabilisants chimiques ou l'ingénierie enzymatique dirigée (Khan *et al.*, 2025 ; Rigoldi *et al.*, 2018 ; Nezhad *et al.*, 2025).

Pour les phytases, une forte baisse est enregistrée, l'activité résiduelle des phytases est d'environ 25 % après traitement thermique de 2h à 90°C, ce qui correspond à une perte

d'environ 75 % de l'activité initiale. Cela signifie que les changements thermiques entraînent une déstabilisation majeure sur l'activité enzymatique, et que la température élevée provoque une dénaturation de l'enzyme, entraînant une perte importante de son activité catalytique (Nelson et Cox, 2017 ; Berg *et al.*, 2015).

Ce comportement est cohérent avec les données de la littérature, qui ont montré que les phytases présentent une thermostabilité limitée. Esmailipour *et al.* (2012) ont montré que les phytases d'origine céréalière (blé, orge et seigle) présentent une stabilité thermique limitée, avec une diminution importante de leur activité enzymatique à des températures élevées, notamment autour de 80°C, confirmant ainsi leur sensibilité à la chaleur.

De façon similaire, Wyss *et al.* (1998), ont montré que l'élévation de la température provoque une diminution marquée de l'activité phytasique chez plusieurs phytases fongiques, notamment celle d'*Aspergillus niger*, qui perdent environ 70 à 80 % de son activité après exposition à des températures élevées.

De plus des travaux ont montré que les phytases d'origine végétale sont généralement moins thermostables que les phytases microbiennes. En effet, Greiner et Konietzny (2006) ont en effet rapporté que les phytases végétales présentent une stabilité thermique limitée, contrairement aux enzymes fongiques largement utilisées en industrie.

Ces résultats confirment donc que le traitement thermique constitue un facteur majeur d'inactivation de la phytase, affectant fortement son intégrité structurale et fonctionnelle, et limitant ainsi son utilisation directe dans des conditions industrielles à haute température sans stabilisation préalable (Wyss *et al.*, 1998 ; Greiner et Konietzny, 2006).

Ces résultats suggèrent que les phytases végétales que nous avons caractérisées seraient plus adaptées à des applications industrielles n'impliquant pas de traitements thermiques sévères. Leur faible thermostabilité limite leur utilisation dans des procédés à haute température, comme la granulation en alimentation animale. En revanche, elles pourraient être valorisées dans l'industrie agroalimentaire, notamment dans des procédés à température modérée tels que la fermentation, la germination, le trempage ou la panification, où elles pourraient contribuer à réduire l'acide phytique et à améliorer la biodisponibilité (Lei & Porres, 2003) des minéraux.

Ainsi, ces phytases semblent davantage adaptées aux procédés de biotechnologie alimentaire douce qu'aux applications industrielles à forte contrainte thermique (Greiner et Konietzny, 2006). La limitation thermique rapproche les phytases de *Cucurbita pepo* du profil des amylases en termes d'inadéquation aux procédés haute température, bien que les phytases conservent une activité résiduelle légèrement supérieure

b) Effet du pH sur la stabilité des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

L'influence du traitement pH sur la stabilité des amylases et les phytases, présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*, a été testée par une pré-incubation des échantillons (en absence du substrat) en présence du NaOH à 1 M et du HCl à 1 M, pendant 2 h à température ambiante (Figure 21).

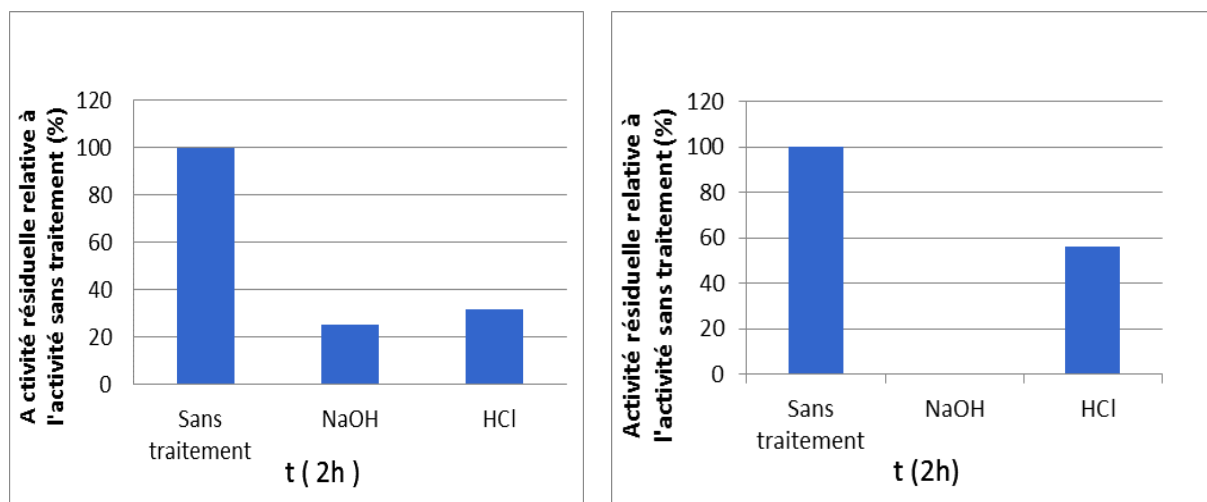


Figure 21 : Effet du NaOH et HCl sur la stabilité des amylases et des phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : Effet du NaOH et HCl sur la stabilité des amylases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Effet du NaOH et HCl sur la stabilité des phytases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats montrent que l'activité amylasique et phytasique sont influencée par les conditions du pH extrême, révélant des profils de stabilité distincts (figure 21)

La stabilité des amylases issues des graines de *Cucurbita pepo* perdent fortement leur activité après 2 h de traitement acide (HCl) ou basique (NaOH) (figure 21A)

Lors du traitement par le NaOH, l'activité résiduelle chute drastiquement à 25 % traduisant une forte sensibilité, qui peut être expliquée par une déstabilisation, et une inactivation enzymatique induite par la longue exposition des amylases au traitement alcalin, ce qui provoque une disruption des liaisons hydrogènes et des interactions ioniques qui maintiennent la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Zhou et Pang, 2018).

Après un traitement par le HCl, l'activité résiduelle de l'enzyme amylasique est également réduite à 31.81%, traduisant aussi une sensibilité aux traitements acides, mais avec une activité un peu élevée par rapport à l'activité enregistrée après le traitement alcalin, car

l'acidité peut induire une dénaturation partielle des protéines, altérant la structure tertiaire et donc le site actif, et accélérant la dégradation (donc l'inactivation) enzymatique (Singh *et al.*, 2015).

Des résultats comparables ont été rapportés pour l' α -amylase de graines de radis (*Raphanus sativus*), où l'enzyme présente une activité optimale dans des conditions modérées de pH, alors que les milieux fortement acides provoquent une inhibition importante de l'activité amylasique résiduelle (Saumya et Om prakash, 2017)

Chez les graines de soja et d'autres légumineuses, plusieurs auteurs ont également montré qu'un traitement acide réduit fortement l'activité enzymatique et les activités inhibitrices associées aux amylases (Lan Shi *et al.*, 2017).

Ces sensibilités pH extrêmes excluent les amylases de *Cucurbita pepo* de nombreux procédés industriels. Par exemple, elles ne peuvent être utilisées dans les nettoyages enzymatiques alcalins exigeant une activité complète en milieu basique, ni dans les traitements chimiques acides intensifs où une perte de 68% d'activité est inacceptable (Greiner & Konietzny, 2006).

Les amylases sensibles aux pH extrêmes (acides ou basiques) offrent un avantage unique : leur inactivation rapide et contrôlée permet d'arrêter précisément la réaction enzymatique (Zinck *et al.*, 2023). Ces enzymes trouvent des applications dans la boulangerie où elles améliorent la fermentation puis s'inactivent lors de la cuisson, la transformation d'amidon où l'ajustement du pH permet un contrôle sans risque de sur pasteurisation, et les jus et boissons où l'inactivation par pH ou température légère préserve saveur et nutriments (Souza et Magalhães, 2010). Contrairement aux amylases thermostables des détergents, ces amylases pH-lábiles sont essentielles quand l'absence totale de résidus enzymatiques est requise (Zinck *et al.*, 2023).

Les amylases végétales sensibles aux traitements acides et basiques extraites des graines de *Cucurbita pepo* présentent néanmoins un intérêt important dans les procédés biotechnologiques et agroalimentaires. Selon l'étude de Posoongnoen *et al.*(2025), malgré leurs sensibilités, les amylases restent intéressantes pour les procédés écologiques fonctionnant dans des conditions douces.

Par ailleurs, Nguyen *et al* (2020) ont étudié l'utilisation des amylases dans l'extraction enzymatique de l'huile des graines de *Cucurbita pepo*. Les auteurs ont montré que l'association d'amylase et de bromélaïne améliore le rendement d'extraction tout en réduisant l'utilisation de solvants chimiques. Cependant, ils soulignent que l'efficacité enzymatique dépend fortement du contrôle du pH, car les enzymes végétales perdent rapidement leur

stabilité dans des conditions extrêmes. Cette propriété confirme l'intérêt des amylases végétales dans les technologies vertes utilisant des conditions de traitement modérées.

Pour les phytases, aucune activité n'est observée après traitement par du NaOH, contrairement aux amylases qui conservent 25% d'activité après ce traitement, révélant une sensibilité alcaline supérieure des phytases. Cette inactivation complète reflète une forte sensibilité de l'enzyme aux conditions alcalines. Selon Greiner et Konietzny (2006), qui ont rapporté que les phytases présentent une faible stabilité en milieu alcalin, où l'augmentation du pH entraîne une perte rapide de l'activité catalytique en raison de la perturbation du site actif.

De plus, Lei et Porres (2003) ont confirmé que les conditions alcalines provoquent une altération de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, entraînant une perte importante voire totale de l'activité catalytique. Ainsi, le résultat obtenu est parfaitement cohérent avec la littérature, qui rapporte une diminution importante jusqu'à une inhibition complète en conditions alcalines,

Le traitement par le HCl, montre une activité résiduelle modérée d'environ 55 %, à l'inverse des amylases qui présentent une activité résiduelle d'environ 32% (68% de perte), les phytases conservent une meilleure stabilité en milieu acide (seulement 45% de perte). Les amylases sont sensibles aux deux extrêmes pH, les phytases sont préférentiellement et partiellement stables en acide et totalement inhibées en alcalin.

Ces résultats indiquent également que les phytases sont plus stables en milieu acide qu'en milieu basique, où elles perdent complètement leur activité enzymatique. Ce résultat indique une stabilité partielle de l'enzyme en milieu acide. D'un point de vue comparatif, les travaux de Konietzny et Greiner (2002) ont montré que les phytases présentent généralement une activité optimale en conditions acides, avec une conservation ou une légère diminution de l'activité selon le niveau d'acidité. De même, Esmaeilipour *et al.* (2012) ont rapporté que les phytases d'origine végétale et céréalière restent relativement stables dans des conditions acides (pH faible). Ainsi, le résultat obtenu (55 %) est en accord avec la littérature, qui montre une activité maintenue ou partiellement conservée en milieu acide plutôt qu'une inhibition complète.

D'après nos résultats, les phytases caractérisées présentent une stabilité modérée en milieu acide mais sont totalement inactivées en milieu alcalin. Donc leur utilisation industrielle dépend directement des conditions de pH du procédé.

Ainsi, ces enzymes peuvent être exploitées dans des industries où le pH est acide ou légèrement acide, notamment l'industrie agroalimentaire, en particulier les procédés de transformation des céréales et légumineuses (fermentation, trempage, germination, panification).

Dans ces conditions, les phytases permettent la dégradation de l'acide phytique et améliorent la biodisponibilité des minéraux (phosphore, fer, zinc), ce qui est cohérent avec leur activité optimale en milieu acide décrite dans la littérature (Konietzny et Greiner, 2002 ; Esmailipour *et al.*, 2012).

En revanche, ces phytases ne sont pas adaptées aux procédés industriels en milieu alcalin, où leur activité est totalement inhibée (traitement NaOH = 0%). Elles ne peuvent donc pas être utilisées dans les industries impliquant des conditions basiques, comme certains procédés de nettoyage enzymatique alcalin, de traitement chimique ou des étapes industrielles à pH élevé, car leur structure est rapidement dénaturée et leur site actif perturbé, entraînant une perte totale d'activité (Greiner et Konietzny, 2006 ; Lei et Porres, 2003).

c) Effet du NaCl sur la stabilité de l'enzyme des amylases et des phytases des graines de *Cucurbita pepo*

L'influence du NaCl sur l'activité des amylases et des phytases présentes dans la solution des graines de *Cucurbita pepo* a été évaluée par pré-incubation de l'échantillon (en absence de substrat) dans le tampon contenant 1 M de NaCl, pendant 2 h à température ambiante (Figure 22).

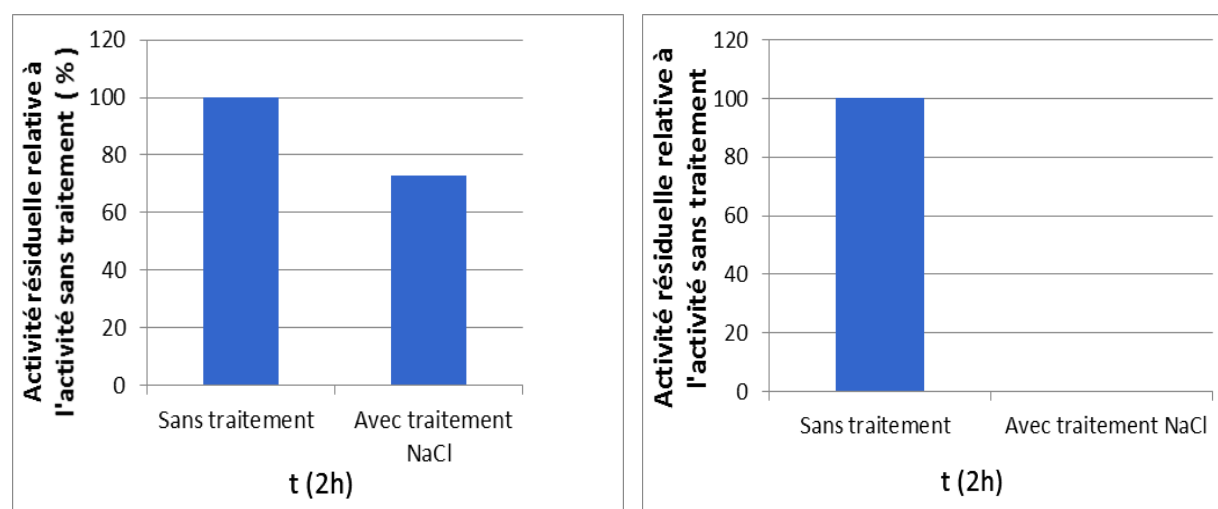


Figure 22 : Effet du NaCl sur la stabilité des amylases et des phytases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(A) : : Effet du NaCl sur la stabilité des amylases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

(B) : Effet du NaCl sur la stabilité des phytases présente dans la solution des graines de *Cucurbita pepo*.

On observe que l'activité amylasique résiduelle est assez importante (environ 72.72 %) (figure 22A), cela montre que le NaCl à cette concentration n'entraîne pas une dénaturation totale, mais une réduction partielle de l'activité, et que cette enzyme témoigne d'une bonne stabilité face à un stress salin modéré.

Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux. En effet, Rai et Solanki (2014) ont caractérisé une α -amylase de *Bacillus amylolique faciens* active entre 0,5 et 4 M de NaCl, Shafiei *et al* (2012) ont isolé une enzyme de *Nesterenkonia* sp. Stable de 1 à 4 M de sel. Plus proche de nos résultats, Jancy Kalpana et Pandian (2014) ont obtenu une activité résiduelle de 72 % pour une α -amylase de *Bacillus subtilis* S8-18 après 24 heures en présence de 28 % de NaCl, et Carvalho *et al* (2008) ont rapporté qu'une amylase de *Bacillus* sp. SMIA-2 conserve 63 % de son activité après 2 heures dans du NaCl 2 M. L'ensemble de ces études converge vers une bonne tolérance des amylases végétales et bactériennes aux conditions de salinité, validant ainsi la concordance de nos résultats avec la littérature.

Ainsi, l' α -amylase de *Cucurbita pepo* conserve une activité élevée à 1 M de NaCl. Ce comportement la rapproche plutôt d'amylases bactériennes halophiles, comme celle d'*Halomonas* sp. KS41843 décrite par Kim *et al* (2025), qui conserve plus de 95 % de son activité en présence de 4 M NaCl.

Malgré l'effet déstabilisant du NaCl sur de nombreuses protéines, certaines α -amylases de graines conservent une activité élevée en milieu salin, cette tolérance est attribuée à une surface fortement chargée et à une structure compacte stabilisée par des interactions ioniques internes, qui limitent la dénaturation en présence de fortes forces ioniques (Jabbour *et al.*, 2012 ; Hoffmann et Solter, 2008).

Sur le plan industriel, une telle amylase dite halophile, stable en présence de 1 M de NaCl, trouve des débouchés potentiels dans plusieurs secteurs, comme par exemple les industries des détergents (incorporation dans les lessives qui contiennent des agents très agressifs (laurylsulfate de sodium) pour dégrader les taches d'amidon sur les vêtements), dans les zones côtières où l'eau de lavage est saumâtre, dans les industries textiles (désencollage des tissus qui se fait dans des bains où l'une des conditions est la salinité extrême : l'amidon est utilisé comme agent d'encollage pour protéger les fils, , l'amylase permet de l'éliminer,

aussi une amylase halophile est très utile si le processus de lavage/traitement en bain est très salin) (Hao *et al.*, 2013), dans l'agroalimentaire (clarification des jus production de sirops, fermentation) (Ninadia et Wingfield, 2020 ; Sahu *et al.*, 2024).

Ces caractéristiques en font un candidat prometteur pour des procédés industriels plus robustes et économiques en énergie, notamment le traitement des eaux usées surtout les eaux salines par dégradation de l'amidon, dans la fabrication de biocarburants par conversion de l'amidon en sucre, dans la production d'éthanol dans des procédés industriels utilisant de l'eau recyclée ou salée, dans l'industrie du Papier et du carton qui utilise des eaux salines (Rai et Solanki, 2014 ; Bassma *et al.*, 2023). Ces amylases peuvent être utilisées en bioénergie (saccharification des amidons de déchets agricoles salins) (Kumar *et al.*, 2024).

Pour les phytases les résultats montrent que la production du Pi est influencée par le traitement avec du NaCl. En effet, aucune activité n'est détectée.

Ces résultats indiquent que contrairement à l'activité amylasiques, l'activité phytasique est totalement inhibée en milieu salin, suggérant un effet inhibiteur marqué du NaCl sur la stabilité de cette enzyme.

L'absence totale d'activité observée après traitement au NaCl montre que les phytases de *Cucurbita pepo* sont fortement sensibles aux conditions de force ionique élevée. En effet, l'augmentation de la concentration en ions Na^+ et Cl^- peut perturber les interactions électrostatiques impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, entraînant une altération de la conformation du site actif et, par conséquent, une perte complète de l'activité enzymatique (Dixon et Webb, 1979 ; Burgess et Deutscher, 2009).

Des études ont montré que la force ionique du milieu joue un rôle déterminant dans la stabilité et l'efficacité catalytique des enzymes. Selle et Ravindran (2007) ont notamment rapporté que les variations des conditions ioniques peuvent modifier les performances des phytases en influençant leur conformation spatiale ainsi que leur interaction avec le substrat, ce qui se traduit par une modulation significative de leur activité enzymatique.

Ainsi, nos résultats confirment que la phytase de *Cucurbita pepo* présente une forte sensibilité aux conditions salines, où une concentration élevée en NaCl peut conduire à une inactivation totale de l'enzyme (Selle et Ravindran, 2007). L'effet du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité phytasique peut être interprété en lien direct avec la nature enzymatique de la phytase, dont l'activité est fortement dépendante des conditions physico-chimiques du milieu, notamment le pH et la force ionique (Khatun *et al.*, 2012).

Les phytases sensibles aux sels peuvent être utilisées principalement dans les industries agroalimentaires où les procédés se déroulent en conditions douces et à faible force ionique. Elles trouvent ainsi leur application dans les industries de fermentation (production de pain *et* aliments fermentés), de transformation des céréales et légumineuses, ainsi que dans les procédés de germination et de maltage. Elles peuvent également être exploitées dans l'industrie des aliments fonctionnels et des compléments alimentaires afin d'améliorer la biodisponibilité des minéraux (Lei & Porres, 2003).

Selon les résultats obtenus dans cette étude, les amylases et les phytases extraites des graines de *Cucurbita pepo* présentent un intérêt biotechnologique réel et un potentiel d'exploitation dans plusieurs secteurs industriels. Les amylases occupent une place essentielle dans les industries de l'amidon, de la fermentation, des détergents, du textile, du papier et de la transformation agroalimentaire tandis que les phytases sont particulièrement recherchées dans l'alimentation animale, l'agroalimentaire et certaines applications liées à l'amélioration de la biodisponibilité du phosphore, (Souza et Magalhães, 2010 ; Joudaki *et al.*, 2023)

La caractérisation enzymatique a mis en évidence des comportements distincts entre les deux activités. Les amylases extraites des graines de *Cucurbita pepo* présentent une activité optimale à pH 9 et à 30 °C, ce qui traduit un profil alcalin compatible avec des procédés de bioconversion conduits en milieu basique. Les phytases, quant à elles, montrent une activité maximale à pH 5 et à 50 °C, indiquant une meilleure efficacité catalytique dans un environnement acide et à température plus élevée.

L'étude de l'effet du milieu salin a également révélé une différence nette entre les deux systèmes enzymatiques. Les amylases ont présenté une activité optimale de 18,18 µg/mg de protéines, alors que les phytases ont montré une activité de 2,8µg/mg de protéines, ce qui suggère une prédominance fonctionnelle des amylases et une meilleure adaptation de ces dernières aux contraintes ioniques. Cette halotolérance relative constitue un atout important pour des applications industrielles exigeant des enzymes actives en conditions sévères, notamment dans l'hydrolyse enzymatique de substrats amylacés, les détergents, le papier, le textile et la saccharification de résidus agro-industriels (Ahmed *et al.*, 2017).

Notre extrait aqueux a révélé une stabilité variable aux différents traitements, les amylases se distinguent par une faible résistance thermique (environ 9 % d'activité), tandis qu'une sensibilité est remarquée au traitement alcalin et acide (25% et 31.81% respectivement), par contre une forte stabilité est observée atteignant les 72.72% pour le

milieu salin. Ces propriétés confèrent à ces enzymes un intérêt particulier pour les procédés industriels nécessitant des biocatalyseurs robustes, capables de conserver leur activité dans des environnements physicochimiques contraignants (Rai et Solanki, 2014 ; Bassma *et al.*, 2023).

À l'inverse, les phytases apparaissent plus stables par rapport aux amylases aux contraintes thermiques (25%) et au milieu acide (55%), cependant, elles ne conservent aucune stabilité en conditions alcalines et salines, ce qui limite leur emploi seulement aux procédés moins agressifs qui pourrait être envisagée dans des procédés opérant en conditions acides contrôlées, notamment pour des applications dans le domaine de l'alimentation animale, où l'amélioration de la biodisponibilité du phosphore qui constitue un objectif majeur, ou dans des formulations nutraceutiques stabilisées à pH acide (Konietzny et Greiner, 2006).

Ainsi, au regard de leurs propriétés biochimiques et de leur stabilité, les amylases extraites des graines de *Cucurbita pepo* apparaissent comme les enzymes les plus prometteuses pour une valorisation industrielle. Leur optimum alcalin, associé à leur bonne tolérance au sel, suggère une utilisation potentielle dans la saccharification des amidons issus de déchets agricoles, dans les procédés de fermentation et dans certaines formulations de détergents, alors que les phytases pourraient être davantage orientées vers l'alimentation animale et l'amélioration de l'accessibilité minérale dans les matrices végétales (Joudaki *et al.*, 2023).

Le tableau suivant, récapitule les résultats obtenus dans cette étude.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats des activités biologiques des graines de *Cucurbita pepo*

Activité antioxydante				
Dégradation de l'H ₂ O ₂			Piégeage du DPPH	
Quantité dégradée de l' H ₂ O ₂ (mM/mg de protéines) en fonction du temps dans deus concentrations (100 et 200 mg/mL)			IC ₅₀ en mg/mL	
Dégradation totale de l' H ₂ O ₂ après 120 min dans les deux concentrations			8,36	
Activité enzymatique				
	Quantité d'amidon dégradée en µg / quantité de Pi libérée en mM par quantité de protéines après 5 min d'incubation	Température optimale (°C)	PH optimale	Quantité d'amidon dégradée en µM / quantité de Pi libérée en mM par quantité de protéines en présence de sels (NaCl)
Amylases	18.18	30	9	17.35
Phytases	0.625	50	5	0.2
Stabilité enzymatique (pourcentage d'activité résiduelle %)				
	à 90 °C	à pH acide (HCl)	à pH alcalin (NaOH)	Au traitement salin (NaCl)
Amylases	9,09	31.81	25	72.72
Phytases	25	55	0	0

Conclusion générale

Afin d'explorer le potentiel biologique des graines de *Cucurbita pepo*, nous avons évalué leurs propriétés antioxydantes (catalasiques et anti-radicalaires) ainsi que leurs propriétés enzymatiques, en particulier les activités amylasiques et phytasiques dans une solution aqueuse des graines de *Cucurbita pepo*.

Les résultats obtenus montrent la présence d'une activité catalasique mise en évidence par la diminution progressive de la quantité d' H_2O_2 en fonction du temps et de la concentration croissante de la solution aqueuse des graines de *Cucurbita pepo*.

L'activité anti-radicalaire a été évaluée par le test de DPPH avec un IC_{50} de 8.36 mg/mL.

Dans notre étude, l'extrait brut enzymatique obtenu à partir des graines de *Cucurbita pepo* présente, après 5 min d'incubation à 30 °C une activité amylasique (18,18 μg d'amidon dégradée/mg de protéines) et une activité phytasiques (0,6 mM de Pi libérée/mg de protéines).

La température optimale est de 30 °C et de 50 °C, et le pH optimal de 9 et de 5, respectivement pour l'activité amylasique et pour l'activité phytasique.

En milieu salin, les 2 activités enzymatiques sont influencées par la présence du sel, les phytases sont plus sévèrement affectée.

Notre extrait a révélé une stabilité variable aux différents traitements, les amylases se distinguent par une faible résistance au traitement thermique (environ 9 % d'activité), tandis qu'une sensibilité est remarquée au traitement alcalin et acide (25% et 31.81% respectivement), par contre une forte stabilité est observée atteignant 72.72% pour le milieu salin. À l'inverse, les phytases apparaissent plus stables par rapport aux amylases aux contraintes thermiques (25%) et au milieu acide (55%). Cependant, elles ne conservent aucune stabilité en conditions alcalines et salines.

Les résultats obtenus confirment ainsi que les graines de *Cucurbita pepo* constituent une source intéressante à la fois d'activités antioxydantes et enzymatiques, susceptibles d'être valorisées dans divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire (amélioration de la digestibilité de l'amidon et des phytates, enrichissement en composés antioxydants), le secteur pharmaceutique et nutraceutique, et la cosmétique (ingrédients antioxydants et protecteurs).

Des perspectives ouvrent la voie à des travaux complémentaires portant sur :

➤ L'extraction des biomolécules par d'autres solvants (extraits méthanoliques, huileux, etc.),

➤ L'exploration d'autres activités biologiques (anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antidiabétiques, antivirales...),

➤ L'isolement et la purification des molécules responsables de ces activités et l'évaluation systématique de leur potentiel d'application à l'échelle industrielle.

➤ Optimisation enzymatique par amélioration de la thermostabilité des amylases par mutagenèse dirigée, ce qui permet d'adapter ces enzymes à des procédés industriels plus exigeants (70–90 °C), ou l'amélioration de la stabilité des phytases pour augmenter leur tolérance au pH basique et à la salinité.

➤ Purification et caractérisation des amylases et phytases permettrait de déterminer leurs constantes cinétiques, séquences peptidiques et structures tridimensionnelles, essentiels pour l'optimisation rationnelle par ingénierie enzymatique.

➤ Recherche de variétés géographiques en étendant l'analyse à d'autres graines de *Cucurbita pepo* provenant d'autres régions, car les diversités climatiques et édaphiques pourraient sélectionner des variétés dont les amylases ainsi que les phytases présentent un meilleur compromis entre la thermostabilité, l'halotolérance, et la stabilité dans les pH extrêmes.

Références bibliographique

- Abdel-Gawad, A. S., El-Sayed, H. S., & Hegazi, N. A. (2013).** Characterization of phytase from some Egyptian legume seeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3), 1490–1499.
- Acila, S., Allioui, N., & Derouiche, S. (2026).** Physiological responses of *Cucurbita pepo* seeds to cadmium and copper stress: Differential impacts on reserve mobilization, metabolic efficiency, and growth. *PLoS ONE*, 21(1), e0341814.
- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., & Berg, G. (2016).** The *Cucurbita pepo* seed microbiome: Genotype-specific composition and implications for breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Adepoju, G. K. A., & Adebajo, A. A. (2011).** Effect of consumption of *Cucurbita pepo* seeds on haematological and biochemical parameters. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(1), 18–22.
- Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aehle, W. (Dir.). (2007).** *Enzymes in industry: Production and applications* (3e éd.). Wiley-VCH.
- Agostini, J. S., & Ida, E. I. (2006).** Effect of germination and fermentation on phytase activity, phytate and total phosphorus content of sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 41(3), 347–352.
- Agostini, J. S., & Ida, E. I. (2006).** Partially characterization and application of phytase extracted from germinated sunflower seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(6), 1041–1047.
- Agustini, R., & Herdyastuti, N. (2020).** The study of amylase reaction kinetics from soybean sprouts (*Glycine max* L.) in hydrolyzing starch. *Advances in Engineering Research*, 196.
- Alaidaroos, M. (2025).** Exploring the diversity and antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different environments: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1568899.
- Al-Turky, H. M., Abo Chameh, G., & Ibrahim, B. (2022).** Effect of defatting and extracting solvent on the antioxidant activities in seed extracts of two species of Syrian pumpkin. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 4813–4821.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019).** A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial agents: Prehistoric to present. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1486.

- Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X.-D., Offler, C. E., Patrick, J. W., & Furbank, R. T. (2006).** Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiology*, 141, 1255–1263.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016).** Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997–1027.
- Aruah, B. C., Alade, K. O., & Ocheme, O. B. (2020).** Evaluation of antioxidant properties and phenolic profile of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 44, e13320.
- Asghar, T., Javed, M., Noman, A., & Ali, Q. (2021).** Role of proline and antioxidant enzymes in plant defense against oxidative stress. *South African Journal of Botany*, 142, 140–148.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., ... Stuppner, H. (2015).** Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 1582–1614.
- Azeke, M. A., Egielewa, S. J., Eigbogbo, M. U., & Ihimire, I. G. (2011).** Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 724–729.
- Bairoch, A. (2000).** The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 304–305
- Bardaa, S., Ben Ali, N., Moalla, D., Mseddi, M., & Sahnoun, Z. (2016).** Oil from *Cucurbita pepo* seeds: Evaluation of its functional properties on wound healing in rats. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1-11.
- Barrientos, L., Scott, J. J., & Murthy, P. P. (1994).** Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*, 106(4), 1489–1495
- Batiha, G. E. S., Beshbishy, A. M., El-Mleeh, A., Abdel-Daim, M. M., & Devkota, H. P. (2020).** Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae). *Biomolecules*, 10(3), 352.
- Becker PM (2016).** Antireduction: an ancient strategy fit for future. *Bioscience Reports*, 36(4), e00367.
- Bérdy, J. (2012).** Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385-395.

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2015).** *Biochemistry*. W. H. Freeman. **Bernfeld, P. (1955).** Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149–158.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M., Hu, H., & Zhang, X. (2018). Bio-based enzymes as sustainable biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 407–414.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.
- Borgia, P. T., & Campbell, L. L. (1978).** α -Amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: Evidence for identical primary structures. *Journal of Bacteriology*, 134(2), 389–393.
- Bouayed J & Bohn T (2010).** Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Broznić, D., Čanadi Jurešić, G., & Milin, Č. (2016).** Involvement of α -, γ - and δ -tocopherol isomers from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil or oil mixtures in the biphasic DPPH disappearance kinetics. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 200–210.
- Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (2009).** *Guide to protein purification* (2nd ed.). Academic Press.
- Busto, E., Gotor-Fernández, V., & Gotor, V. (2014).** Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society Reviews*, 43(13), 4423–4441.
- Cao, B., Qin, J., Pan, B., Qazi, I. H., Ye, J., Fang, Y., & Zhou, G. (2022).** Oxidative stress and oocyte cryopreservation: Recent advances in mitigation strategies involving antioxidants. *Cells*, 11(22), 3573.
- Carlberg I & Mannervik B (1985).** Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484–490.
- Carr, A. C., & Maggini, S. (2017).** Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1211.

- Casas, C. C., Graf, A., Brüggemann, N., Schaschke, C. J., & Jorat, M. E. (2020).** Dolerite fines used as a calcium source for microbially induced calcite precipitation reduce the environmental carbon cost in sandy soil. *Frontiers in Microbiology*, 11, 557119.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018).** Industrial applications of enzymes: Recent trends, challenges, and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1420.
- Chaves, J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. F., Forster-Carneiro, T., & Vázquez-Espinosa, M. (2020).** Antioxidant activity of plant extracts determined by DPPH radical scavenging assay. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 4563–4572.
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015).** Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443-1454.
- Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 6(4), 340–345.
- Damaris, R. N., Lin, Z., Yang, P., & He, D. (2019).** The rice alpha-amylase: Conserved regulator of seed maturation and germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 450.
- Decker, D. S. (1988).** Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 42(4), 4–15.
- Decker, S. R., & Fischer, M. (2008).** Hydrolases in industrial biotechnology: applications and perspectives. In *Applied Biocatalysis in Industrial Chemistry*. Wiley-VCH.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012).** A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- Dixon, M., & Webb, E. C. (1979). *Enzymes* (3rd ed.). Longman.
- Dodinet, E. (2012).** Enjeux méthodologiques pour l'identification des sources végétales des parfums. In *Les huiles parfumées en Méditerranée occidentale et en Gaule, VIIIe siècle av.-VIIIe siècle apr. J.-C.*
- Dotto, J. M., & Chacha, J. S. (2020).** The potential of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds as a functional food ingredient: A review. *Scientific African*, 10, e00575.
- Du ZY, Qu Y, Liu Z & Gaid M (2023).** Editorial: Advances in metabolism and chemodiversity - focus - plant enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1227424.
- Duan J & Kasper DL (2011).** Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, 21(4), 401–409.

Elkabous, K., et al. (2025). Antioxidants in dermatology: Protecting and enhancing skin health. *E3S Web of Conferences*, 632, 01017.

Esmailipour, O., van Krimpen, M. M., Jongbloed, A. W., de Jonge, L. H., & Bikker, P. (2012). Effects of temperature, pH, incubation time and pepsin concentration on the in vitro stability of intrinsic phytase of wheat, barley and rye. *Animal Feed Science and Technology*, 175(3–4), 168–174.

Fatema, T. (2017). Amylase activity assay using starch-iodine method. *Biochemistry Laboratory Manual*.

Fendri, C., Mechri, A., Khiari, G., Othman, A., Kerkeni, A., & Gaha, L. (2006). Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie : revue de la littérature. *L'Encéphale*, 32(2), 244–252.

Fernandes-Martins, M. C., Keller, L. M., Munro-Ehrlich, M., Zimlich, K. R., Mettler, M. K., England, A. M., Clare, R., Surya, K., Shock, E. L., Colman, D. R., & Boyd, E. S. (2021). Ecological dichotomies arise in microbial communities due to mixing of deep hydrothermal waters and atmospheric gas in a circumneutral hot spring. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23), e01598-21.

Ferriol, M., & Picó, B. (2008). Pumpkin and winter squash. In J. Prohens & F. Nuez (Eds.), *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae* (pp. 317-349). Springer.

Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. Freeman.

Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(2), 119–130.

Fierascu, R. C., Fierascu, I., Avramescu, S. M., & Sieniawska, E. (2019). Recovery of natural antioxidants from agro-industrial side streams through advanced extraction techniques. *Molecules*, 24(23), 4212.

Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A & Levy S (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 477(2), 183–195.

Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709.

Fridovich, I. (1975). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44, 147–159.

- Gana, J. A., Kalengamaliro, N. E., Cunningham, S. M., & Volenec, J. J. (1998).** Expression of beta-amylase from alfalfa taproots. *Plant Physiology*, 118(4), 1495–1506.
- García-Mahecha, M., Soto-Valdez, H., Carvajal-Millan, E., Madera-Santana, T. J., Lomeli-Ramírez, M. G., & Colín-Chávez, C. (2023).** Bioactive compounds in extracts from the agro-industrial waste of mango. *Molecules*, 28(1), 458.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'Actualité Chimique*, (269-270), 91-96.
- Gharib, F. A. E. L., & Ahmed, E. Z. (2023).** *Spirulina platensis* improves growth, oil content, and antioxidant activity of rosemary plant under cadmium and lead stress. *Scientific Reports*, 13, 8008.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Gimbi, D. M., & Kitabatake, N. (2002).** Changes in alpha- and beta-amylase activities during seed germination of African finger millet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(6), 481–488.
- Givens, D. I. (2005).** The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(3), 395-402.
- Gong, L., Stift, G., Kofler, R., Pachner, M., & Lelley, T. (2008).** Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(1), 37–48.
- Gourmelon, M., Caprais, M. P., Kay, D., & Stapleton, C. (2010).** Techniques de dépistage des sources de pollution microbiennes : Méthodologies, application et retour d'expériences en France et au Royaume-Uni / Analytical pollution source tracking: methods and experiences feedback about the identification of pollution causes on bathing waters, in France and UK. *TSM Techniques Sciences Méthodes*, 4, 54.
- Grasu, A.-E., Senn, R., Halbsguth, C., Schenk, A., Butterweck, V., Zecchin, G., Mangalagiu, I. I., Ciobanu, C.-I., & Miron, A. (2025).** Pumpkin seeds harbor hidden agonists: Adenosine-mediated A1 receptor activation and antioxidant activity. *Scientia Pharmaceutica*, 93, 48.
- Greiner, R., & Konietzny, U. (2006).** Phytate-degrading enzymes in plant seeds. *Food Chemistry*, 94(2), 307–315.

Greiner, R., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Goyoaga, C. (2001). Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2234–2240.

Guéant, J.-L. (2026). Nutriments et sources alimentaires animales et végétales : quel impact pour la santé ? *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*.

Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreon-Treviño, J. G., Gallegos-López, J. A., & Viader-Salvadó, J. M. (2010). Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5601–5608.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 329121.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.

Hardy M, Zielonka J, Karoui H, Sikora A, Michalski R, Podsiadly R, Lopez M, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B & Ouari O (2018). Detection and Characterization of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems by Monitoring Species-Specific Products. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(15), 1416–1432.

Haros, M., Carlsson, N. G., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A. S., & Andlid, T. (2009). Phytate degradation by *Pichia anomala* phytase and alkaline phosphatase in model systems and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7905–7913.

Hawasha, M., Jaradat, N., Qneibi, M., Faraj, H. S., Rabi, B. M., Shalabi, D. Z., Bdir, S.,
Bdair, M., Idais, T., Issa, L., & Sobuh, S. (2025). Antioxidant activity and neuromodulatory synergies in fixed oils from *Nigella sativa*, *Cucurbita pepo*, and *Sinapis alba* seeds. *Industrial Crops and Products*, 228.

Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry*, 113(2), 313–317.

Hou, X., Shen, Z., Li, N., Kong, X., Sheng, K., Wang, J., & Wang, Y. (2020). A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous *Arthrobotrys oligospora*: characterization

and potential application in phosphorus and mineral release for feed processing. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 84.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line antioxidant enzymes; Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their regulation in cellular system. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.

Jones, D. P., & Sies, H. (2020). The redox code. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(11), 742-747.

Jung, S. M., & Zhu, H. J. (2024). Regulation of human hydrolases and its implications in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drug Metabolism and Disposition*, 52(11), 1139–1151.

Kainat, M., Nugraheni, D., Haryati, T., Huseynova, A., Franco, M., & Irfan, M. (2026). Production optimization and characterization of amylase from *Bacillus subtilis* strain 2i under submerged fermentation. *Journal of Microbiological Methods*, 244, 107450.

Kaur, B., Garcha, K. S., Sandhu, J. S., Sharma, M., & Dhatt, A. S. (2023). Interspecific hybridization for transfer of hull-less seed trait from *Cucurbita pepo* to *C. moschata*. *Scientific Reports*, 13(1), 4627.

Kaya C & Adamakis IS (2025). Redox-Epigenetic Crosstalk in Plant Stress Responses: The Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Modulating Chromatin Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(15), 7167.

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.

Kennely, P. J., & Rodwell, V. W. (s.d.). Enzymes : mécanismes d'action. Dans K. M. Botham, A. Weil, V. W. Rodwell, P. J. Kennelly, & D. A. Bender, Biochimie de Harper. De Boeck Supérieur.

Khan, K. A., Memon, S. A., & Naveed, H. (2021). A hierarchical deep learning-based approach for multi-functional enzyme classification. *Protein Science*, 30(9), 1935–1945

Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, D. Y., & Park, Y. K. (1998). Thermostability of phytase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 691–695.

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial applications of enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.

- Koike, R., Kidera, A., & Ota, M. (2009).** Alteration of oligomeric state and domain architecture is essential for functional transformation between transferase and hydrolase with the same scaffold. *Protein Science*, 18(10), 2060–2066.
- Kolarević, L., Horozić, E., Ademović, Z., & Kozarević, E. C. (2023).** Investigation of polyphenol content and antioxidative activity of *Cucurbita pepo* L. leaf extracts obtained by ultrasonic extraction. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 24(4), 1–8.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2002).** Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology*, 37(7), 791–812.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2006).** Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
- Kostrewa, D., Grüniger-Leitch, F., D’Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D., & van Loon, A. P. G. M. (1999).**
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., de Boeck, G., & Becker, K. (2010).** Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(2), 133–152.
- Lanier Pharma. (2022, September 22).** The intake of exogenous antioxidants is a nutritional tool that can contribute to the maintenance of physical fitness and sports performance.
- Lecomte, J. (2009).** Les cires végétales : sources et applications. *OCL*, 16(4), 245–252. CIRAD, UMR IATE, Montpellier, France.
- Lee, S. H., Kim, Y. S., Park, H. J., & Kim, Y. S. (2007).** Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting. *Journal of Food Science and Technology*, 43(2), 234–238.
- Lei, X. G., & Porres, J. M. (2003).** Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25(21), 1787–1794.
- Leichtweis, M. G., Molina, A. K., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Pires, T. C. S. P., Pavli, O., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira, I. C. F. R., Petropoulos, S. A., Barros, L., & Pereira, C. (2025).** Valorisation of pumpkin by-products: Chemical composition and bioactive properties of pumpkin seeds, peels, and fibrous strands from different local landraces of Greece. *Food Chemistry*, 475, 143306.
- Lira-Saade, R. (1995).** Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae de México. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118–126.

- Loy, J. B. (2000).** Seed development in Cucurbita pepo: An overview with emphasis on hull-less seeded genotypes of pumpkin. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 23, 89–95.
- Lucchesi, A. N., Cassettari, L. L., & Spadella, C. T. (2014).** Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. Journal of Diabetes Research, 2014, 494578.
- Ma, Y., Huang, K., & Wu, Y. (2021).** In vivo/in vitro properties of novel antioxidant peptide from Pinctada fucata. Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(1), 33–42.
- Mabberley's Plant-book, Mabberley, D. J. (2008).** Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Madsen, C. K., & Brinch-Pedersen, H. (2019).** Molecular advances on phytases in barley and wheat. International Journal of Molecular Sciences, 20(10), 2459.
- Maleki, S. S., Mohammadi, K., & Ji, K.-S. (2016).** Characterization of cellulose synthesis in plant cells. The Scientific World Journal, 2016, Article 8641373.
- Martínez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N & Thornton JM (2015).** The classification and evolution of enzyme function. Biophysical Journal, 109(6), 1082–1086.
- Mbida H, Tsala D. E., Aboubakar S., et al. (2022).** Antioxidant activity of aqueous extract of leaves and seeds of Datura metel (Solanaceae) in frog's heart failure model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 5318117.
- McCollum, E. V., & Hart, E. B. (1908).** On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 4(6), 497-500.
- McDonald, A. G., Boyce, S., & Tipton, K. F. (2009).** ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. Nucleic Acids Research, 37(Database issue), D593–D597.
- McKie, V. A., & McCleary, B. V. (2016).** A novel and rapid colorimetric method for measuring phytase activity. Journal of AOAC International, 99(5), 1217–1224.
- Medjakovic, S., Hobiger, S., Ardjomand-Woelkart, K., Bucar, F., & Jungbauer, A. (2016).** Pumpkin seed extract: Cell growth inhibition of hyperplastic and cancer cells, independent of steroid receptors. Fitoterapia, 110, 150-156.
- Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2010).** Plant catalases: functions, isoforms and contacts with cellular processes. Journal of Experimental Botany, 61(12), 3197-3220.
- Michalek, M., Tabiś, A., Cepiel, A., & Noszczyk-Nowak, A. (2020).** Antioxidative enzyme activity and total antioxidant capacity in serum of dogs with degenerative mitral valve disease. Canadian Journal of Veterinary Research, 84(1), 67–73.
- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9), 405-410.

- Molassiotis A & Fotopoulos V (2011).** Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 210–214.
- Mougeolle, A. (2014).** Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques (Thèse de doctorat, Université de Bordeaux). HAL Open Science.
- Murphy, M. P. (2009).** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
- Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014).** Production of secondary metabolites from cell and organ cultures of medicinal plants. *Springer Science & Business Media*, 32(4), 451-460.
- Nawirska-Olszańska, A., Kita, A., Biesiada, A., Sokół-Lętowska, A., & Kucharska, A. Z. (2013).** Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed extracts obtained by different methods. *Food Chemistry*, 141(4), 4194–4203.
- Nehul, J. N. (2025).** Natural products as sources of therapeutic agents and functional biomolecules. *Life Science Review*, 9(2), 40-45.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008).** *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th ed.). W.H. Freeman and Company.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017).** *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020).** Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from January 1981 to September 2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.
- Nielsen, J. E., Borchert, T. V., & Vriend, G. (2001).** The determinants of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*, 14(7), 505–512.
- Nierstrasz, V. A., & Warmoeskerken, M. M. C. G. (2003).** Process engineering and industrial enzyme applications. Dans A. Cavaco-Paulo & G. M. Gübitz (Dir.), *Textile Processing with Enzymes* (pp. 120-157). Woodhead Publishing.
- Nukui, M., Mello, L. V., Littlejohn, J. E., Setlow, B., Setlow, P., Kim, K., Leighton, T., & Jedrzejewski, M. J. (2007).** Structure and molecular mechanism of *Bacillus anthracis* cofactor-independent phosphoglycerate mutase: A crucial enzyme for spores and growing cells of *Bacillus* species. *Biophysical Journal*, 92(3), 977–988.
- Olga V. Lowry et al. Lowry, O. H., et al. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Ou, K., Cheng, Y., Xing, Y., Lin, L., Nout, M. J. R., & Liang, J. (2011).** Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 598–603.

Ou, X., Cheng, A., Huang, Y., Zhang, M., & Wang, J. (2011). Characterization of phytase enzyme and its stability under different conditions. *Process Biochemistry*, 46(9), 1830–1836.

Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6), 463–493.

Palmer, T., & Bonner, P. (2007). *Enzymes: Biochemistry, biotechnology and clinical chemistry* (2nd ed.). Woodhead Publishing.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.

- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Kuzyakov, Y. (2021).** Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: A review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 661202.
- Paraschiv, G., et al. (2025).** Natural antioxidants: Source, extraction and industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 342, 111-125.
- Paraschiv, M., Turcov, D., Zbranca-Toporaș, A., Ciubotaru, B. I., Grădinaru, I., & Galaction, A. I. (2025).** Engineering antioxidants with pharmacological applications: biotechnological perspectives. *Antioxidants (Basel)*, 14(9), 1110
- Paris, H. S. (1989).** Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo*. *Economic Botany*, 43(4), 423–443.
- Paris, H. S. (2016).** Germplasm enhancement of *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd: Cucurbitaceae): Progress and challenges. *Euphytica*, 208(3), 415–438.
- Patel, S. (2013).** Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: more than a functional food candidate. *The Journal of Phytopharmacology*, 2(4), 41-47.
- Paul, P. K., Al Azad, S., Rahman, M. H., Farjana, M., Uddin, M. R., Dey, D., Mahmud, S., Ema, T. I., Biswas, P., Anjum, M., Akhi, O. J., & Ahmed, S. Z. (2022).** Catabolic profiling of selective enzymes in the saccharification of non-food lignocellulose parts of biomass into functional edible sugars and bioenergy: An in silico bioprospecting. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(1), 19–32.
- Peiretti, P. G., Meineri, G., Gai, F., Longato, E., & Amarowicz, R. (2017).** Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Product Research*, 31(18), 2178–2182.
- Perumal Samy, R., & Gopalakrishnakone, P. (2010).** Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 283–294.
- Posoongnoen, S., Thummavongsa, T., Junthip, J., Jandaruang, J., & Preecharram, S. (2025).** Potential application of α -amylase from germinating *Cucurbita moschata* Duchesne seeds in eco-friendly bioethanol production. *Scientific Reports*, 15, 25499.
- Pratiwi, E. N., Soetrisno, Purwanto, B., Dewi, Y. L. R., Pamungkasari, E. P., & Wasita, B. (2024).** Chemical constituents and antioxidant activity of ultrasonication-assisted aqueous extract of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(11), 9215–9218.

- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Purich, D. L. (2010).** *Enzyme kinetics: catalysis & control*. Academic Press.
- Ramakrishnan, S. R., Sundaram, S. K., & Raja, M. (2016). Microbial antioxidants: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(11), 312-322.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., ummar, S. K., George, J. A., Madhavan, A., Al-Asheh, S., & Pandey, A. (2018).** Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30.
- Reddy, N. V., Rao, K. S., & Cheriyan, B. V. (2023).** Anti-inflammatory natural products: A potent prospective in drug discovery. *Phytomedicine Plus*, 3(2), 100412.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018).** Review: Hydrolytic enzymes in the bioremediation of pollutants. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1058-1070.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018).** Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1), 011501.
- Riziotis, I. G., Ribeiro, A. J. M., Borkakoti, N., & Thornton, J. M. (2022).** Conformational variation in enzyme catalysis: A structural study on catalytic residues. *Journal of Molecular Biology*, 434, 167517.
- Robinson, P. K. (2015).** *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41.
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., & Bourdon, E. (2008).** The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*, 582(13), 1783–1787.
- Ros, J., Puig, C., & Ruas, M.-P. (2014).** Les denrées végétales dans le nord de la Catalogne d'après les sources historiques et archéobotaniques (Xe-XVe siècles) : productions et échanges. *Archéologie du Midi Médiéval*, 32, 123-138.
- Roth, C., Moroz, O. V., Turkenburg, J. P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianqi, S., Andersen, C., Davies, G. J., & Wilson, K. S. (2019).** Structural and Functional Characterization of Three Novel Fungal Amylases with Enhanced Stability and pH Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4902.
- Ruwanthika, K. O. G. H., Munasinghe, M. L. A. M. S., & Marapana, R. A. U. J. (2023).** Overview of Cucurbita spp. (pumpkin) and development of value-added products emphasizing its nutritional and chemical composition. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 18(2), 1215–1226.

- Sajidan, Farouk, A. E., & Greiner, R. (2015).** Characterization of phytase enzyme activity from plant sources. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(4), 789–796.
- Salman, S. K., Ktub, A. F., Nayef, A. T., & Hassan, K. F. (2024).** Production of alpha-amylase enzyme from grain sprouting. *European Journal of Medical Genetics and Clinical Biology*, 1(5).
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019).** Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. IntechOpen.
- Sari, A., Anwar, A., & Rozen, N. (2021).** The effect of high temperature on α -amylase enzyme activity in the germination of several rice varieties (*Oryza sativa* L.). *JERAMI Indonesian Journal of Crop Science*, 3(2).
- Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., & Azevedo, V. (2018).** Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2259.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008).** Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(6), 608–619
- Savage, G. P. (2021).** Chemical composition and nutritional value of plant seeds. *Nutrients*, 13(7), 2334-2345.
- Schomburg, I., Chang, A., & Schomburg, D. (2002).** BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 47-49.
- Sechi, S., Fiore, F., Chiavolelli, F., Dimauro, C., Nudda, A., & Cocco, R. (2017).** Oxidative stress and food supplementation with antioxidants in therapy dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 81(3), 206–216.
- Sedlak, T. W., & Snyder, S. H. (2004).** Bilirubin benefits: Cellular protection by a bilirubin–biliverdin redox cycle. *Pediatrics*, 113(6), 1772–1780.
- Selle, P. H., & Ravindran, V. (2007).** Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135(1–2), 1–41.
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., & Khoshnoodi, M. (2007).** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18(7), 800–805.
- Sharma, N. (2014).** Free radicals, antioxidants and disease. Symbiosis School of Biomedical Sciences, Pune, Maharashtra, India
- Sies, H. (2015).** Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183.

- Silva, A. B., & al. (2024).** Phytase and alpha-amylase activity are positively associated with seed vigor in common bean seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 55, Article e20240014.
- Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017).** Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International*, 2017, Article 9173040.
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011).** Microbial phytases in phosphorus acquisition and dephytinization. *3 Biotech*, 1(1), 17-29.
- Singh, G., Passari, A. K., Leo, V. V., Mishra, V. K., Subbarayan, S., Singh, B. P., & Nachimuthu, S. K. (2016).** Evaluation of phenolic content variability along with antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic potential of selected traditional medicinal plants from India. *Frontiers in Plant Science*, 7, 407.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016).** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.
- Sirivibulkovit, N., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018).** A simple paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 795–800.
- Soni, A., Sharma, Y., Bhargava, A., & Singh, B. (2018).** Evaluation of antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in *Cucurbita pepo* seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1825–1833.
- Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.
- Srbinoska, M., Hrabovski, N., Rafajlovska, V., & Sinadinović-Fišer, S. (2012).** Characterization of the seed and seed extracts of the pumpkins *Cucurbita maxima* D. and *Cucurbita pepo* L. from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(1), 65–78.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003).** Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351.
- Steiner, T., Mosenthin, R., Zimmermann, B., Greiner, R., & Roth, S. (2007).** Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 320–334.
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).** α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.

- Svensson, B. (1994).** Protein engineering in the α -amylase family: structure-function relationships. *Plant Molecular Biology*, 26(5), 1421-1439.
- Syed, Q. A., Akram, M., & Shukat, R. (2019).** Nutritional and therapeutic potential of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), 1252-1259.
- Syn, C. K., & Chen, J. P. (1997).** Quantitative analysis of starch using iodine method. *Food Chemistry*, 60(3), 431–435.
- Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et de la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(4), 1111–1117.
- Teppner, H. (2004).** Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae) – Review and new contributions. *Phyton* (Horn, Austria), 44(2), 245-308.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004).** Starch: Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151–165.
- Tijjani, H., Matinja, A. I., Yahya, M. M., Aondofa, E. L., & Sani, A. (2022).** In vitro antioxidant and antidiarrheal activities of aqueous and n-hexane extracts of *Cucurbita maxima* seed in castor oil-induced diarrheal rats. *Natural Resources for Human Health*, 2(2), 246–252.
- Tipton, K. F. (2018).** Enzyme nomenclature and classification: the translocases (EC 7). *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1289-1295.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020).** Oxidative stress: A unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659–670.
- Valizadeh, B., Zibae, A., & Jalali Sendi, J. (2013).** Inhibition of digestive α -amylases from *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) by a proteinaceous extract of *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae). *Journal of Plant Protection Research*, 53(3).
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021).** Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015).** Impact of environmental factors on secondary metabolism of medicinal plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(9), 1-13.
- Vohra, P., & Satyanarayana, T. (2003).** Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 29-60.

- Wada S, Cui S & Yoshida S (2019).** Reactive Oxygen Species (ROS) Generation Is Indispensable for Haustorium Formation of the Root Parasitic Plant *Striga hermonthica*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 328.
- Wahab, W. A. A. (2025).** Review of research progress in immobilization and chemical modification of microbial enzymes and their application. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 167.
- Wang, B., Huang, D., Cao, C., & Gong, Y. (2023). Insect α -Amylases and Their Application in Pest Management. *Molecules*, 28(23), 7888.
- Warshel, A., Sharma, P. K., Kato, M., Xiang, Y., Liu, H., & Olsson, M. H. M. (2006).** Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chemical Reviews*, 106, 3210–3235.
- Webb, E. C. (1992).** Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press.
- Whitaker, T. W., & Davis, G. N. (1962).** Cucurbits: Botany, cultivation, and utilization. Leonard Hill.
- Wichers M. C., & Maes M. (2004).** The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(1), 11–17.
- Wilcox CS (2012).** Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: Unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. *Hypertension*, 59(2), 375–381.
- Wilson, K., & Walker, J. (2010).** Principles and techniques of biochemistry and molecular biology (7th ed.). Cambridge University Press.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M., & van Loon, A. P. (1999).** Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 367–373.
- Xue, Y., Shen, Z., Tao, F., Zhou, J., & Xu, B. (2022).** Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of seed coat development in *Cucurbita pepo* L. *Frontiers in Plant Science*, 13, 772685.
- Yadav, J. K., & Prakash, V. (2009).** Thermal stability of α -amylase in aqueous cosolvent systems. *Journal of Biosciences*, 34(3), 377–387.
- Yan, S., & Wu, G. (2016). Analysis on evolutionary relationship of amylases from archaea, bacteria and eukaryota. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 24.

Yücebilgiç, G., & Bozdemir, Y. (2010). Determination of antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in germinating flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Acta Biologica Hungarica*, 61(4), 430–438.

Zhang, X., Wang, Y., Liu, J., & Zhao, Z. (2016). Antioxidant responses and H₂O₂-scavenging capacity in Glycine max seed extracts under oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 1–8.

Zimmermann, B., Lantzsch, H. J., Langbein, U., & Drochner, W. (2002). Determination of phytase activity in cereal grains by direct incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86(9–10), 347–352.