

UNIVERSITE DE NGAOUNDERE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES SCIENCES AGRO-INDUSTRIELLES



THE UNIVERSITY OF NGAOUNDERE

NATIONAL SCHOOL OF
AGRO- INDUSTRIAL SCIENCES

DEPART EMENT DE GENIE DES PROCEDES ET INGENIERIE

DEPARTMENT OF PROCESS ENGINEERING

UNITE DE FORMATION DOCTORALE GENIE DES PROCEDES

PURIFICATION DE LA DEXTRINASE LIMITE DU CULTIVAR DE SORGHO

SAFRARI (Sorghum bicolor L. Moench)

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat/Ph.D**

Parcours/Spécialité : Génie des Procédés

Par :

NGUEMOGNE Annick Chancelle

Master es Sciences et Technologie

(Option : Génie Alimentaire et Bioprocédés)

Matricule : 09S181EN

Jury :

NDJOUENKEU Robert	Professeur	Université de Ngaoundéré	Président
MBOUGUENG Pierre Désiré	Maitre de Conférences	Université de Ngaoundéré	Examineur
DJOULDE DARMAN Roger	Maitre de Conférences	Université de Maroua	Rapporteur
FOMBANG Edith	Maitre de Conférences	Université de Ngaoundéré	Rapporteur
JIOKAP NONO Yvette	Maitre de Conférences	Université de Ngaoundéré	Rapporteur
NSO Emmanuel JONG	Professeur	Université de Ngaoundéré	Directeur
DESOBGO ZANGUE Steve C.	Maitre de Conférences	Université de Ngaoundéré	Co-Directeur

Année académique 2019/2020

DEDICACE

A

MA FAMILLE

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements vont à l'endroit de :

- ✚ Le Directeur de l'ENSAI, le Professeur NSO Emmanuel JONG, pour la formation reçue à l'ENSAI et pour la mise à disposition d'un cadre propice à la recherche,
- ✚ Mes encadreurs, le Professeur NSO Emmanuel JONG et le Professeur DESOBGO ZANGUE Steve Carly pour leur encadrement scientifique et leur soutien moral, matériel et financier, ainsi que leur dévouement pour la réalisation et l'achèvement de ce précieux césame,
- ✚ Tous les responsables, étudiants doctorants et Docteurs des laboratoires de recherche de l'ENSAI et l'IUT (GETA, TEFI, RESH, LABBAN, LAMBA, LBP, LAPCA, LSAP, LCIB, Génie Chimique) pour leur contribution morale et matérielle,
- ✚ L'ensemble du corps enseignant de l'IUT et de l'ENSAI pour leur implication non seulement dans ma formation universitaire, mais aussi d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail,

Remerciements particuliers à l'endroit de :

- ✚ Les Professeurs KAYEM Joseph, KAPSEU César, TCHATCHUENG Jean-Bosco, NDJOUENKEU Robert et NJINTANG Nicolas pour leur partage scientifique, disponibilité et conseils,
- ✚ Le Docteur AGWANANDE A. Wilson, Mr NZOMENI Gaston, pour leur marque d'intérêt particulier au bon déroulement et à l'achèvement de ce travail, et aussi leurs encouragements,
- ✚ Tous les étudiants en Doctorat et Master-recherche du Génie des Procédés pour leur accompagnement,
- ✚ Mes remerciements inestimables à tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui m'ont accompagnés dans ce long voyage avec un sourire, la sympathie, la convivialité, une prière, bref leur amour tout simplement,
- ✚ Reservant le meilleur pour la fin, mes infinis remerciements à mon Seigneur et Sauveur JESUS-CHRIST... !!

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	xiii
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES PHOTOS	xviii
LISTE DES ANNEXES.....	xviii
RESUME.....	xix
ABSTRACT	xxi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
INTRODUCTION	4
I- LES ENZYMES AMYLOLYTIQUES DANS LES CEREALES	5
I.1- Généralités sur les enzymes	5
I.1.1- Mode d'action des enzymes	6
I.1.2- Classification des enzymes	7
I.1.3- Application des enzymes	8
I.2- L'amidon : substrat des enzymes amylolytiques.....	9
I.3- Procédé de maltage des céréales	11
I.3.1- Le trempage	12

I.3.2- La germination.....	13
I.3.3- Les temps et température de touraillage (séchage).....	14
I.4- Les enzymes amylolytiques dans les malts	15
I.4.1- Les endoamylases	15
I.4.2- Les exoamylases	16
I.4.3- Les enzymes débranchantes.....	17
II- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN ENZYMES AMYLOLYTIQUES DANS LE SORGHO	18
II.1- Le sorgho	19
II.1.1- Botanique	19
II.1.2- Production	20
II.1.3- Composition	21
II.1.3.1- Structure.....	21
II.1.3.2- Composition.....	22
II.1.4- Utilisations du sorgho.....	22
II.2- Optimisation de la production en enzymes amylolytiques au cours du maltage du sorgho.....	23
II.2.1- Optimisation du trempage	24
II.2.2- Optimisation de la germination	27
II.2.3- Optimisation du touraillage	27
III- EXTRACTION ET PURIFICATION ENZYMATIQUE.....	28
III.1- Extraction enzymatique	28

III.1.1- La clarification	29
III.1.1.1- La centrifugation	29
III.1.1.2- La filtration.....	29
III.1.2- Tampons et additifs d'extraction	30
III.2- La Purification enzymatique.....	31
III.2.1- La précipitation différentielle.....	32
III.2.1.1- La précipitation par les sels	32
III.2.1.2- La précipitation par les solvants organiques	34
III.2.2- Les techniques chromatographiques	35
III.2.3- Stabilité des protéines pendant la purification	37
III.3- Détermination de l'activité enzymatique.....	38
III.3.1- Mesure de l'activité enzymatique des amylases	39
III.3.2- Méthodes de dosages des protéines totales solubles.....	40
IV- EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA DEXTRINASE LIMITE A PARTIR DE PLANTES	42
IV.1- Extraction de la dextrinase limite à partir de plantes	42
IV.2- Techniques de purification de la dextrinase limite.....	45
IV.3- Techniques de mesure de l'activité enzymatique de la dextrinase limite	46
V- QUELQUES PARAMETRES CARACTERISTIQUES DES ENZYMES ET PROPRIETES DE LA DEXTRINASE LIMITE	48
V.1- La cinétique enzymatique	48
V.1.1- La concentration en enzyme.....	48

V.1.2- La concentration en substrat	49
V.1.2.1- La constante de Michaelis-Menten (Km).....	49
V.1.2.2- La vitesse maximale (Vmax).....	50
V.2- Les conditions opératoires pour la caractérisation enzymatique	50
V.2.1- Le pH.....	50
V.2.2- La température	52
V.2.3- Force ionique et teneur en eau du milieu	53
V.2.4- Effet des cofacteurs	53
V.3- Caractéristiques de la dextrinase limite	54
V.3.1- Quelques paramètres caractéristiques de la dextrinase limite.....	54
V.3.2- Action de la dextrinase limite sur les polysaccharides	55
VI- APPLICATIONS ET IMPORTANCE DE LA DEXTRINASE LIMITE.....	56
VII- LES PLANS D'EXPERIENCE.....	58
VII.1- Outils et quelques notions préliminaires	58
VII.2- Les plans de criblage.....	61
VII.2.1- Les plans factoriels fractionnaires à deux niveaux 2^{m-s}	61
VII.2.2- Les plans de Plackett-Burman	63
VII.2.3- Les plans de Taguchi	64
VII.3- Plans pour surface de réponses	64
VII.3.1- Les plans composites	65
VII.3.2- Les plans de Doehlert	66
VII.3.3- Les plans de Box-Behnken.....	67

VII.4- Notions de statistiques appliquées aux plans d'expériences	67
VII.4.1.- L'analyse de la variance	67
VII.4.1.1- La moyenne	68
VII.4.1.2- L'écart-type.....	68
VII.4.1.3- Le degré de liberté	68
VII.4.2- Principes de l'analyse de la variance.....	69
VII.4.2.1- Test de Fisher-Snedecor	70
VII.4.2.2- Facteurs et interactions influents	70
VII.4.3- Le coefficient de détermination R^2	71
 CHAPITRE 2: OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN ENZYMES	
AMYLOLYTIQUES AU MALTAGE DU SORGHO: CAS SPECIFIQUE DE LA	
DEXTRINASE LIMITE.....	72
RESUME.....	72
INTRODUCTION	73
I- MATERIEL ET METHODES	75
I.1- Matériel	75
I.1.1- Le sorgho	75
I.1.2- Produits chimiques	75
I.1.3- Equipements	77
I.1.4- Logiciels	78
I.2- Méthodes	78
I.2.1- Méthodologie générale	78

I.2.2- Tests de caractérisation du sorgho non malté	79
I.2.2.1- Teneur en eau des grains	79
I.2.2.2- Capacité germinative	80
I.2.2.3- Energie germinative	80
I.2.2.4- Détermination des teneurs en azote total et protéines brutes	81
I.2.2.5- Le maltage.....	82
I.2.2.5.1- Procédé de maltage au criblage	83
I.2.2.5.2- Optimisation du maltage	86
I.2.2.6- Méthode d'extraction enzymatique et de mesure de l'activité amylolytique totale au criblage.....	86
I.2.2.7- Méthode d'extraction et de mesure de l'activité en dextrinase limite pendant l'optimisation du maltage	88
I.2.2.7.1- L'extraction enzymatique.....	88
I.2.2.7.2- Mesure de l'activité de la dextrinase limite.....	89
I.2.2.8- Validation du modèle mathématique au criblage.....	90
I.2.2.8.1- Le coefficient de détermination R^2	91
I.2.2.8.2- L'Analyse absolue de déviation moyenne (AADM).....	91
I.2.2.8.3- Méthode comparative des facteurs polarisés.....	92
I.2.2.9- Calcul des pourcentages d'influence des facteurs	93
II- RÉSULTATS ET DISCUSSION	93
II.1- Caractérisation des grains de sorgho.....	93
II.2- Criblage des facteurs pour l'optimisation du maltage	95

II.2.1- Le changement d'eau de trempage.....	99
II.2.2- Le temps de germination	100
II.2.3- Les temps et température de touraillage.....	101
II.2.4- La désinfection des grains	101
II.3- Optimisation du maltage	102
CONCLUSION PARTIELLE	107
CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA DEXTRINASE LIMITE	108
RESUME.....	108
INTRODUCTION.....	109
I- MATERIEL ET METHODES	111
I.1- Matériel	111
I.1.1- Matériel biologique.....	111
I.1.2- Produits chimiques	111
I.1.3- Equipements	112
I.1.4- Logiciels	113
I.2- Méthodes	113
I.2.1- Méthodologie générale	113
I.2.2- Procédé de maltage	114
I.2.3- Plan d'expériences pour l'extraction	114
I.2.4- Validation du modèle mathématique	117
I.2.5- Procédé d'extraction proprement dit	117

I.2.6- Méthode de test d'activité de la dextrinase limite	118
I.2.7- Etude des effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl ₂ , le SAB et l'acide ascorbique sur l'extraction et l'activation de la dextrinase limite	118
II- RESULTATS ET DISCUSSION	118
II.1- La modélisation.....	119
II.2- Analyse statistique	121
II.2.1- Effet de la température d'extraction (X ₁).....	122
II.2.2- Effet du ratio masse de malt (g)/volume de tampon (mL) (X ₃)	124
II.2.3- Effet du temps d'extraction (X ₄)	126
II.2.4- Effet de l'interaction pH-temps d'extraction (X ₂ X ₄)	127
II.3- L'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite	129
II.4- Effet de quelques additifs sur l'extraction de la dextrinase limite.....	133
CONCLUSION PARTIELLE	136
CHAPITRE 4 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA DEXTRINASE LIMITE DU MALT DE SORGHO <i>SAFRARI</i>	137
RESUME.....	137
INTRODUCTION	138
I- MATERIEL ET METHODES	140
I.1- Matériel	140
I.1.1- Matériel biologique.....	140
I.1.2- Produits chimiques	140
I.1.3- Equipements	141

I.1.4- Logiciels	143
I.2- Méthodes	143
I.2.1- Méthodologie générale	143
I.2.2- Procédé d'extraction de la dextrinase limite.....	143
I.2.3- Purification de la dextrinase limite	144
I.2.3.1- La précipitation au sulfate d'ammonium	144
I.2.3.2- La dialyse à l'équilibre.....	146
I.2.4- Détermination de l'activité de la dextrinase limite.....	147
I.2.4.1- Test d'activité de la dextrinase limite par la méthode au pullulan naturel .	147
I.2.4.2- Test d'activité de la dextrinase limite par la méthode au kit Megazyme....	147
I.2.5- Dosage des protéines solubles	149
I.2.6- Le tableau de purification	150
I.2.7- Détermination du pH optimum d'activité et de stabilité	152
I.2.8- Détermination de la température optimale d'activité et de stabilité	152
I.2.9- Détermination des propriétés catalytiques Km et Vmax	152
I.2.10- Détermination de l'activité de la dextrinase limite en présence de quelques effecteurs d'activité enzymatique (EDTA, DTT, CaCl ₂ , SAB, acide ascorbique)	154
I.2.12- Application de la dextrinase limite à des brassins de sorgho	154
I.2.12.1- Méthodologie d'obtention des moûts de sorgho : le brassage	155
I.2.12.2- Détermination de la teneur en sucres réducteurs des moûts	155
I.2.12.3- Test de filtrabilité des brassins.....	155
II- RESULTATS ET DISCUSSION	157

II.1- Maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium .	157
II.2- Purification de la dextrinase limite	158
II.3- pH optimum d'activité et de stabilité de la dextrinase limite	161
II.4- Température optimale d'activité et de stabilité de la dextrinase limite	164
II.5- Propriétés catalytiques Km et Vmax.....	169
II.6- Effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl ₂ , le SAB et l'acide ascorbique sur l'activation de la dextrinase limite	171
II.6.1- Cas du test au pullulan naturel	171
II.6.2- Cas du test au kit Megazyme K-Pull G6.....	173
III- IMPACT DE L'AJOUT DE LA DEXTRINASE LIMITE PURIFIEE SUR LA FILTRABILITE ET LA TENEUR EN SUCRES DES BRASSINS DE SORGHO.....	175
CONCLUSION PARTIELLE	178
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181
ANNEXES	207
PUBLICATIONS	Z

LISTE DES ABREVIATIONS

AADM :	Analyse Absolue de Déviation Moyenne
Af₁ :	Facteur d'exactitude
AFNOR :	Association Française de Normalisation
ANOVA :	Analysis Of Variance
AOAC :	Association of Official Analytical Chemist
ATP :	Adénosine triphosphate
Bf :	Facteur de Biais
BRF :	Brewing Industry Research Foundation
ddl :	degré de liberté
DL :	Dextrinase Limite
DNS :	Acide 3,5-Dinitrosalicylique
DO :	Densité Optique
DTT :	Dithiothréitol
EBC :	European Brewery Convention
EC :	Enzyme Commission
EDTA :	Acide Ethylène diamine tétra-acétique
IRAD :	Institut de Recherche Agronomique pour le Développement
ISO :	Organisation Internationale de Normalisation
kDa :	kilodalton
MS :	Matière Sèche
MSR :	Méthodologie des Surfaces de Réponse
PM :	Poids Moléculaire
SAB :	Sérum Albumine Bovine
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Section schématique d'une chaîne d'amylose (Bernfeld, 1951)	10
Figure 1.2: Section schématique de la molécule d'amylopectine (Hii <i>et al.</i> , 2012)	11
Figure 1.3: Structure générale du pullulan (Hii <i>et al.</i> , 2012)	18
Figure 1.4: Section schématique du grain de sorgho (Ogbonna, 2011)	21
Figure 1.5: Techniques de purification de la dextrinase limite	45
Figure 2. 1 : Procédé d'extraction enzymatique au criblage	86
Figure 2. 2 : Extraction de la dextrinase limite pour optimisation du maltage	88
Figure 2. 3 : Activité de la dextrinase limite en fonction du temps de germination	105
Figure 3. 1 : Procédé d'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite.....	117
Figure 3. 2: Evolution de l'activité de la dextrinase limite en fonction de la température d'extraction (ratio : 1/6,5; temps : 12,5 h ; pH 5,0).....	123
Figure 3. 3 : Activité de la dextrinase limite en fonction du ratio m/v d'extraction (température: 27 °C ; pH 5,0 ; temps : 12,5 h).....	125
Figure 3. 4: Activité de la dextrinase limite en fonction du temps d'extraction (température : 27 °C; pH 5,0 ; ratio : 1/6,5).....	127
Figure 3. 5: Courbe de surface de réponse de l'activité en DL en fonction du pH et du temps (ratio : 1/6,5 ; température : 27 °C).....	128
Figure 3. 6 : Courbe d'iso-réponse de l'activité en dextrinase limite en fonction du pH et du temps (ratio : 5/32 ; température : 22,63 °C).....	131
Figure 3. 7 : Effet de certains additifs sur l'extraction de la dextrinase limite.....	134

Figure 4. 1 : Procédé de purification de la dextrinase limite.....	145
Figure 4. 2 : Procédé de brassage (Desobgo <i>et al.</i> , 2011)	156
Figure 4. 3 : Activité de la dextrinase limite (DL) en fonction du pH (test au pullulan)	161
Figure 4. 4 : Activité de la dextrinase limite en fonction du pH (test au Kit)	162
Figure 4. 5 : Stabilité de la dextrinase limite en fonction du pH (40°C/90min)	163
Figure 4. 6 : Activité de la dextrinase limite en fonction de la température (test au pullulan)	165
Figure 4. 7 : Activité de la dextrinase limite (DL) en fonction de la température (test au kit Megazyme).....	167
Figure 4. 8 : Stabilité de la dextrinase limite en fonction de la température.....	168
Figure 4. 9 : Effet de la concentration en amidon sur l'activité en dextrinase limite.....	170
Figure 4. 10 : Représentation de Lineveaver-Burk pour la détermination de Km et Vmax ..	170
Figure 4. 11 : Effet de quelques effecteurs sur l'activité en dextrinase limite (test au pullulan)	172
Figure 4. 12 : Effet de quelques additifs sur l'activité de la dextrinase limite (test au kit K- PullG6)	174
Figure 4. 13 : Volumes cumulatifs de filtrats des brassins en fonction du temps de filtration (DL = dextrinase limite).....	175

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 : Applications industrielles des enzymes amylolytiques (Illanes, 2008a).....	9
Tableau 1. 2: Caractéristiques chimiques du sorgho non malté.....	22
Tableau 1. 3: Additifs d'extraction et de purification (Amersham, 2001; Wiley et Sons, 2004; Ward et Swiatek, 2009).....	31
Tableau 1. 4 : Principales méthodes de séparation pour la purification des protéines (Wiley et Sons, 2000; Dennison, 2002)	36
Tableau 1. 5 : Comparaison des méthodes usuelles de dosage des protéines solubles (GE Healthcare, 2010)	41
Tableau 2. 1: Caractéristiques botaniques et physiques du sorgho <i>Safrari</i>	75
Tableau 2. 2 : Facteurs utilisés pour le criblage au cours du maltage.....	83
Tableau 2. 3: Plan de criblage pour le maltage du sorgho <i>Safrari</i>	84
Tableau 2. 4: Préparation des milieux réactionnels de mesure de l'activité enzymatique au criblage	87
Tableau 2. 5: Critères de validation des modèles.....	92
Tableau 2. 6: Caractéristiques du sorgho <i>Safrari</i> en comparaison avec la norme Analytica-EBC et d'autres auteurs.....	93
Tableau 2. 7: Matrice d'expérimentation de criblage pour le maltage du sorgho <i>Safrari</i>	96
Tableau 2. 8: Validation du modèle "Activité amylolytique totale"	97
Tableau 2. 9: Analyse de la variance pour « activité amylolytique totale » au criblage.....	98
Tableau 2. 10: Facteurs ayant une influence significative sur l'activité enzymatique au cours du maltage	99

Tableau 3. 1: Facteurs d'optimisation de l'extraction et domaines de variation.....	114
Tableau 3. 2: Matrice d'expériences de Doehlert	115
Tableau 3. 3: Matrice d'expérimentation pour l'extraction de la dextrinase limite.....	119
Tableau 3. 4: Paramètres de validation du modèle "Yact"	119
Tableau 3. 5: Analyse de la variance.....	121
Tableau 3. 6: Effets influents	122
Tableau 3. 7: Points optimaux des facteurs pour l'extraction de la dextrinase limite.....	129
Tableau 3. 8: Comparaison d'activités et des conditions de tests d'activité de la dextrinase limite entre les extraits bruts du sorgho et du millet maltés, utilisant le pullulan naturel comme substrat	133
Tableau 4. 1: Quantité de sulfate d'ammonium en grammes à ajouter à 1L d'extrait enzymatique (Scopes, 1987).....	145
Tableau 4. 2: Solutions stocks de SAB pour l'étalonnage des protéines	149
Tableau 4. 3: Préparation des milieux réactionnels à différentes concentrations en amidon.	153
Tableau 4. 4: Activités enzymatiques des précipités au sulfate d'ammonium.....	157
Tableau 4. 5: Purification de la dextrinase limite.....	159
Tableau 4. 6: Activités relatives de la dextrinase limite en fonction du pH	164
Tableau 4. 7: Activités relatives de la dextrinase limite en fonction de la température.....	169
Tableau 4. 8: Test des étendues multiples pour sucres réducteurs par moût.....	176

LISTE DES PHOTOS

Photo 1. 1 : Plant de sorgho (Source : Alves De Oliveira et Monlien, 2000)	20
Photo 2. 1 : Grains de sorgho <i>Safrari</i>	75
Photo 2. 2 : Dispositif de trempage	85
Photo 2. 3 : Dispositif de germination.....	85
Photo 2. 4 : Photos de sorgho en germination ; a) jour zéro, b) jour 1, c) jour 2, d) jour 3, e) jour 4, et f) jour 5.....	95

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Méthode de dosage des protéines totales brutes par la méthode de Devani *et al.* (1989)

Annexe 2 : Tableau des densités optiques en fonction du temps des 16 essais du plan de criblage

Annexe 3 : Courbes des vitesses initiales en enzymes amylolytiques pour criblage du maltage

Annexe 4 : Préparation des solutions standards (gamme étalon) de maltose pour le dosage des sucres réducteurs selon la méthode au DNS de Fischer et Stein (1961).

Annexe 5 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (1951)

RESUME

Il a été question dans cette thèse de purifier la dextrinase limite du sorgho *Safrari*. Cette enzyme étant synthétisée dans cette céréale pendant le maltage, il s'est agit plus précisément dans un premier temps d'effectuer un criblage préalable des facteurs qui influencent la synthèse des enzymes amylolytiques en général pendant le maltage, suivi de la maximisation de la production de la dextrinase limite en particulier avec le temps de germination. Dans un deuxième temps, la méthodologie des surfaces de réponses a servi à l'optimisation des conditions d'extraction de la dextrinase limite à partir du malt obtenu. Et enfin, la purification a consisté en la maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium suivi de la dialyse. L'expérimentation menée à l'issue de ces objectifs a permis d'obtenir une synthèse optimale de la dextrinase limite dans le sorgho *Safrari* au bout de 5 jours de germination à 25 °C, ceci étant précédé d'un trempage continu des grains dans une solution de NaOH à 0,1 % pendant 24 h à 25 °C, avec changement de la solution de trempage après 12 h. Le plan de Doehlert utilisé pour l'optimisation de l'extraction à partir du malt vert (avec ses radicules) précédemment obtenu a conduit à 10 h d'extraction à 23 °C dans un tampon acétate de sodium à 100 mM et pH 5,0, pour un ratio masse/volume de 5/32. Au cours de la purification, l'activité spécifique de la dextrinase limite s'est avérée maximale à un taux de saturation au sulfate d'ammonium de 20 % masse/volume. Une étude comparative des caractéristiques de la dextrinase limite par des tests d'activité au pullulan naturel d'une part, et au kit Megazyme K-PullG6 d'autre part, a montré que la précipitation au sulfate d'ammonium suivie de la dialyse donnerait un extrait en dextrinase limite partiellement purifié, avec un rendement de 75 % et un facteur de purification de 6,5. A cet effet, la méthode de test d'activité de la dextrinase limite au kit Megazyme adaptée à de tels extraits de par sa haute spécificité, a été utilisée pour la caractérisation enzymatique: température optimale d'activité et de stabilité de 50 – 60 °C ; pH optimum d'activité et de stabilité de 5,0 – 5,5 ; la dextrinase limite est une enzyme sulfhydrile

nécessitant la présence de dithiothréitol à 10 mM pour son extraction maximale et aussi, la présence d'agents réducteurs tels le dithiothréitol ou l'acide ascorbique pour une meilleure activité de l'enzyme purifiée. Par ailleurs, suite au même test, il en est ressorti que l'activité de la dextrinase limitée est rehaussée en présence de chlorure de calcium ou de sérum albumine bovine. Ses paramètres cinétiques sur l'amidon ont été de $0,03 \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ pour la vitesse maximale (V_{max}) et de 2,4 mg/mL pour la constante de Michaelis (K_m). Enfin, l'application de l'extrait purifié sur des moûts de sorgho a conduit à l'augmentation des volumes cumulatifs des filtrats desdits moûts en fonction du temps. Les caractéristiques de la dextrinase limitée du malt de sorgho *Safrari* lui permettent ainsi d'être utilisée dans des conditions modérées, et sur une plage relativement large de température et de pH dans les procédés de transformation enzymatique de l'amidon en générale, et dans l'industrie brassicole en particulier.

Mots clés : Dextrinase limitée ; Sorgho ; Optimisation ; Purification.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to purify limit dextrinase from *Safrari* sorghum cultivar. Since this enzyme is synthesized in sorghum during the malting process, this study was specifically aimed at first using a screening experimental design to sort out factors which influence amylolytic enzymes synthesis in general during the malting process, followed by the maximisation of limit dextrinase synthesis and activity with the duration of germination. Secondly, the response surface methodology was used to optimise extraction conditions of limit dextrinase from the obtained malt. And finally, purification consisted at maximising the precipitation of limit dextrinase with ammonium sulfate, followed with dialysis. Experimentation led to the optimal synthesis of limit dextrinase during the malting process after 5 days of germination at 25 °C, preceded with continuous steeping in 0.1 % alkaline (NaOH) solution for 24 h at 25 °C, with the renewal of the steep solution after 12 h. The Doehlert design used for optimising the limit dextrinase extraction process led to the following optimum conditions: extraction for 10 h at 23 °C in sodium acetate buffer (100 mM), pH 5.0 with a ratio of malt mass (g) over buffer volume (mL) of 5/32. During the purification step, maximisation of ammonium sulfate precipitation gave a maximum specific limit dextrinase activity at 20 % m/v saturation. A comparative study of limit dextrinase characteristics using two different assay techniques, one with natural pullulan as substrate and the other with synthetic substrate from the kit Megazyme K-PullG6, came to the conclusion that ammonium sulfate precipitation followed by dialysis led to a partially purified extract of limit dextrinase. The purification yield and the purification fold were 75 % and 6.5 respectively. Therefore, the assay method using the kit Megazyme for limit dextrinase, well adapted to such extract given its high specificity, led to the following characteristics of limit dextrinase: optimum temperature for limit dextrinase activity and stability: 50 – 60 °C; optimum pH of activity and stability: 5.0 – 5.5; limit dextrinase is a sulfhydryl enzyme which needs the presence of a reducing agents for its maximal

extraction. In addition, reducing agents such as ascorbic acid or dithiothreitol enhance the activity of the purified enzyme. The activity of the purified limit dextrinase was also enhanced in the presence of calcium chloride or bovine serum albumin. Its kinetic parameters on starch were $0.03 \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ for the maximum velocity (V_{max}) and 2.4 mg/mL for Michaeli-Menten constant (K_m). Cumulative volumes of sorghum wort filtrates were enhanced in the presence of added purified limit dextrinase. Limit dextrinase characteristics of *Safrari* sorghum cultivar showed that the enzyme can be exploited in moderate conditions on relatively large range of pH and temperature in enzymatic starch conversion processes in general, and the brewing industry in particular.

Key words: Limit dextrinase; Sorghum; Optimisation; Purification.

INTRODUCTION GENERALE

Encore connue sous les appellations de R-enzyme, pullulanase et pullulan 6-glucanohydrolase, la dextrinase limite (EC 3.2.1.41) est une endoenzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons $\alpha(1-6)$ dans l'amylopectine, les dextrines et les oligosaccharides apparentés. Cette enzyme agit en rompant les points de branchements $\alpha(1-6)$ inter-chaines et facilite ainsi l'action des autres enzymes amylolytiques (Sissons, 1991; McCleary, 1992; Morinaga *et al.*, 1997; Beatty *et al.*, 1999; Repellin *et al.*, 2008; Hii *et al.*, 2012). A cet effet, elle est en générale employée dans l'amélioration des processus de liquéfaction et de saccharification de l'amidon, majoritairement dans l'industrie agro-alimentaire (Woods & Swinton, 1995; Synowiecki, 2007; Hii *et al.*, 2012) ; notamment en boulangerie/pâtisserie, en confiserie et siroperie (Synowiecki, 2007; Illanes, 2008a; Khattak *et al.*, 2015) et aussi dans l'industrie brassicole. En brasserie, la dextrinase limite joue un rôle incontestable dans le processus de brassage de la bière de par son action sur la diminution du taux de dextrines non fermentescibles (MacGregor *et al.*, 1999; Stenholm & Home, 1999; McCafferty *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2005). Dans les procédés brassicoles en effet, la dextrinase limite entre autre, est généralement présente dans les céréales utilisées comme matières premières (Taylor & Leach, 1995; Briggs *et al.*, 2004; Khattak *et al.*, 2015) ; en l'occurrence l'orge en zones tempérées et le sorgho en zones tropicales (Anderson, 2000; Briggs *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006). Certains problèmes remarquables cependant, propres aux caractéristiques des grains et du malt de sorgho, limitent son utilisation en brasserie par comparaison au malt d'orge. Parmi les problèmes généralement mis en exergue, figure celui de la présence de dextrines dans les moûts de sorgho (Manners & Yellowlees, 1971; Glennie & Wight, 1986; Dufour *et al.*, 1992); dextrines qui diminuent les rendements de filtration des brassins et de production d'alcool pendant la fermentation (Sissons, 1991; Dufour *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 2004; Edney, 2008).

Des recherches poussées ont permis d'identifier des variétés de sorgho présentant des caractères intéressants au point de vue de leur aptitude à être utilisées pour la fabrication industrielle de la bière. De telles aptitudes se rattachaient surtout à leur pouvoir amylolytique et à leur capacité à conduire à la formation d'un extrait soluble et fermentescible important, supérieur à 83 % dans certaines des meilleures variétés telles qu'identifiées en Ethiopie (Antinori, 1995; Bekele *et al.*, 2012), au Mali (Antinori, 1995), en Afrique du Sud (Adetunji *et al.*, 2013), et au Ghana (Ebbah *et al.*, 2015); tandis que cette valeur varie de 79 % à 81 % pour l'orge (EBC-Analysis-Committee, 1998; Kuntz & Bamforth, 2007). Par ailleurs, certaines variétés de sorgho, bien que n'atteignant pas toujours ces standards, permettaient tout de même d'obtenir des malts de qualité comparable aux malts d'orge en termes d'enzymes amylolytiques ; d'où par exemple la large propension à l'échelle industrielle des bières de sorgho au Nigeria et en Afrique du Sud (Dewar *et al.*, 1997b; Owuama, 1999; Okungbowa *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2006). De telles investigations menées au Cameroun ont conduit à l'identification du cultivar *Safrari* de sorgho (*Sorghum bicolor*) (Nso *et al.*, 2003) dont les travaux de Desobgo *et al.* (2011), ont démontré que ce cultivar pouvait être utilisé pour le brassage de la bière sans ajout d'enzymes industrielles ; l'utilisation d'enzymes industrielles pendant le brassage étant entre autre un palliatif au déficit enzymatique du malt de sorgho (Agu & Palmer, 1998; Goode & Arendt, 2003; Desobgo *et al.*, 2011b). La possibilité de produire de la bière avec le malt de sorgho *Safrari* sans ajout d'enzymes exogènes démontre dans une certaine mesure la potentialité de ce cultivar en enzymes amylolytiques endogènes notamment l' α -amylase et la β -amylase tel que démontré par Nso *et al.* (2003) et Desobgo *et al.* (2011a). Ceci impliquerait un éventuel potentiel en dextrinase limite ; potentiel d'ailleurs mis en exergue par Nguemogne *et al.* (2017). D'où la question de savoir si l'utilisation du sorgho *Safrari* comme source de dextrinase limite synthétisée dans des conditions optimales ne serait-elle pas une issue de solution au problème de dextrans dans les moûts de sorgho? Toutefois, pour un meilleur contrôle des procédés étant donné la variabilité des activités des enzymes endogènes (Bamforth,

1999; Schmedding & Van Gestel, 2002; Synowiecki, 2007; Singh *et al.*, 2010), les enzymes exogènes sont le plus souvent utilisées en complément pour la standardisation et l'optimisation des procédés (Bamforth, 1999; Schmedding & Van Gestel, 2002; Synowiecki, 2007; Singh *et al.*, 2010; Khattak *et al.*, 2015), d'où la nécessité de les purifier. L'objectif de la purification étant la par ailleurs la caractérisation de l'enzyme en question soit pour des applications industrielles (enzymes partiellement purifiées), soit pour des applications médicales ou analytiques (enzymes purifiées à homogénéité) (Scopes, 1995; Dennison, 2002; Schmedding & Van Gestel, 2002; Labrou, 2014; Khattak *et al.*, 2015). L'expansion de l'utilisation des enzymes en industrie en générale, et en procédés alimentaires en particulier, relève de leurs propriétés qui leur donnent d'être des outils idéaux pour la manipulation des matières biologiques (Tucker & Woods, 1995). S'agissant de la dextrinase limite, sa purification à partir du sorgho a fait l'objet à notre connaissance des travaux seuls de Hardie *et al.* en 1976 (utilisant la variété *Kafficorn* en Afrique du Sud). Néanmoins, les techniques de purification des enzymes sont connues et vont des méthodes de précipitation simple (au sulfate d'ammonium) aux techniques chromatographiques sophistiquées. Il sera donc question dans cette thèse d'effectuer la purification de la dextrinase limite à partir du cultivar de sorgho *Safrari*, malté dans des conditions optimales de production de celle-ci. Il s'agira tour à tour spécifiquement d'effectuer à l'aide des plans d'expérience un criblage des facteurs ayant une influence significative sur la production d'enzymes amylolytiques pendant le maltage afin d'optimiser la synthèse de la dextrinase limite, d'optimiser l'extraction de la dextrinase limite et en fin d'y effectuer la purification et la caractérisation.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

La dextrinase limite est une enzyme amylolytique au même titre que l' α -amylase et la β -amylase. Elle a cette particularité d'hydrolyser les liaisons α , 1-6 de l'amidon et des polysaccharides apparentés contrairement aux α - et β -amylases qui hydrolysent uniquement les liaisons α -1,4 (MacGregor *et al.*, 1994a; Woods & Swinton, 1995; Larreta-Garde, 1997; Evans *et al.*, 2004; Edney, 2008), d'où son rôle incontournable dans le processus de conversion complète de l'amidon en sucres simples fermentescibles dans les procédés agro-alimentaires en général, et brassicoles en particulier. Dans ces procédés brassicoles justement, les enzymes amylolytiques sont généralement présentes dans les céréales utilisées comme matières premières pour la production de boissons alcoolisées (Taylor & Leach, 1995; Briggs *et al.*, 2004; Khattak *et al.*, 2015); céréales qui doivent être le plus souvent germées afin de favoriser la synthèse des enzymes absentes et/ou l'activation de celles déjà présentes (Igyor *et al.*, 1998; Bamforth, 1999; Briggs *et al.*, 2004). Il s'agit ici d'enzymes endogènes. Les enzymes endogènes ont des activités très variables en fonction des conditions de germination d'une part, et des conditions de brassage d'autre part (Bamforth, 1999; Schmedding & Van Gestel, 2002; Synowiecki, 2007). Pour une standardisation et un meilleur contrôle des procédés, les enzymes exogènes sont utilisées en complément aux enzymes endogènes; les premiers ayant des caractéristiques bien définies et des conditions opératoires maîtrisées. L'extraction et la purification enzymatique permettent donc de révéler les caractéristiques des enzymes endogènes et de prédire leur comportement dans les procédés biochimiques (Taylor & Leach, 1995; Khattak *et al.*, 2015). Il sera question dans cette revue bibliographique de présenter certainement de manière non exhaustive, les enzymes amylolytiques dans les céréales et leurs rôles en brasserie, leur condition de synthèse au maltage, comment celles-ci sont extraites et purifiées avec une attention particulière sur la dextrinase limite. La planification expérimentale

étant devenue un outil de choix en procédés chimiques et biochimiques (Goupy & Creighton, 2006; Tinsson, 2010), une brève présentation en sera faite.

I- LES ENZYMES AMYLOLYTIQUES DANS LES CEREALES

Les enzymes amylolytiques sont un groupe d'enzymes qui hydrolysent l'amidon. Ces enzymes incluent celles d'importance industrielle telles les amylases et les dextrinases (Wong, 1995; Schmedding & Van Gestel, 2002; Martin & Štefan, 2007) entre autres. Avant de présenter celles qu'on retrouve dans les céréales, il serait important d'évoquer quelques notions de base sur les enzymes en général.

I.1- Généralités sur les enzymes

Pour qu'une réaction chimique ait lieu, les réactifs doivent avoir suffisamment d'énergie pour franchir une barrière énergétique potentielle, appelée énergie d'activation. Tous réactifs possèdent différentes quantités d'énergie, mais seulement une petite proportion de ceux-ci ont suffisamment d'énergie pour franchir l'énergie d'activation de la réaction. Plus faible est l'énergie d'activation, mieux les réactifs sont capables de la franchir avec comme résultat, l'accélération de la vitesse de la réaction ; d'où l'importance des catalyseurs (Kotzia *et al.*, 2012). Les catalyseurs agissent en faisant baisser la quantité d'énergie nécessaire à la formation d'un complexe de réactifs conduisant à la formation rapide des produits (Kotzia *et al.*, 2012).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques (Lewis & Bamforth, 2006). Elles présentent deux avantages majeurs par rapport aux catalyseurs chimiques. Premièrement, leur action se fait dans des conditions modérées de température, de pH, de concentration et de pression. Deuxièmement, elles sont spécifiques, i.e. qu'elles catalysent une seule réaction, ou un seul type de réaction de façon stéréospécifique (Lewis & Bamforth, 2006; Kotzia *et al.*, 2012).

I.1.1- Mode d'action des enzymes

La réaction enzymatique basique peut être représentée comme suit:

Substrat + Enzyme \leftrightarrow Produit(s) + Enzyme.

Les enzymes sont des protéines; et comme toutes les protéines, leur structure va définir leur fonction. Le caractère protéique des enzymes leur permet de se lier temporairement au substrat (O'Rourke, 2002; Lewis & Bamforth, 2006). La liaison entre l'enzyme et le substrat a lieu au niveau des sites actifs de l'enzyme. Cette liaison peut se faire par des interactions ioniques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobiques non polaires et des liaisons covalentes coordonnées via l'intervention d'ions activateurs (Mohan *et al.*, 2013). Au cours de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat, il se produit une modification de la distribution des électrons au niveau des liaisons chimiques du substrat, abaissant ainsi l'énergie d'activation de la réaction et favorisant la formation du produit. Ce produit est libéré du site actif ; ceci permet à l'enzyme de retrouver son intégrité pour une éventuelle autre réaction (Illanes *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2013). Les sites actifs ont une structure tridimensionnelle unique assimilable à une crevasse au sein de la molécule enzymatique. Cette structure tridimensionnelle est maintenue par des liaisons intramoléculaires, notamment les liaisons hydrogènes (N-H et O-H), les liaisons ioniques, les liaisons hydrophobiques et les ponts disulfures -S-S-, où la géographie locale de la structure en torsion et plissée favorise la formation de telles liaisons; et c'est de là que les enzymes tiennent leur spécificité. La conformation de ces sites leur permet donc d'accepter uniquement certaines molécules (enzymes hautement spécifiques) ou certains types de molécules (enzymes à spécificité de groupe) et d'exclure toutes les autres (Lewis & Bamforth, 2006; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013).

I.1.2- Classification des enzymes

La nomenclature actuellement approuvée des enzymes est celle recommandée par la commission EC (*Enzyme Commission*) établie en 1955 par l'Union Internationale de Biochimie et l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée. Ce système de nomenclature est basé sur la spécificité de la réaction chimique catalysée par une enzyme (Rothe, 1994; Kotzia *et al.*, 2012).

Toutes les enzymes reconnues jusqu'à ce jour sont regroupées en six principaux groupes (avec une multitude de sous-groupes spécifiant les réactions de façon plus précise) (Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Schnitzenbaumer, 2013) que sont dans l'ordre:

1. Les oxidoréductases: enzymes qui catalysent les réactions biologiques d'oxydo-réduction;
2. Les transférases: enzymes qui transfèrent un groupement chimique, à l'exemple du transfert d'un groupe méthyle ou glycosyle d'une molécule à une autre molécule;
3. Les hydrolases: enzymes qui catalysent les réactions de clivage hydrolytique des liaisons C-C, C-O, C-N et autres liaisons incluant les liaisons phosphoriques anhydres;
4. Les lyases : enzymes qui clivent les liaisons C-C, C-O, C-N et autres par élimination, laissant des doubles liaisons/anneaux, ou inversement, ajoutent des groupements aux liaisons doubles;
5. Les isomérases: enzymes qui catalysent les changements géométriques ou structuraux au sein d'une molécule;
6. Les ligases: enzymes qui catalysent la liaison de deux molécules entre elles, ceci couplé à l'hydrolyse d'une liaison diphosphate de l'ATP ou un triphosphate similaire.

Le système de classification des enzymes sert également de base pour l'attribution des numéros de code. Les numéros de code sont précédés du préfixe EC (*Enzyme Commission*) et

suivis de quatre chiffres séparés par des points, dont les significations sont les suivantes (Rothe, 1994; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012):

- (a) le premier chiffre indique à quel groupe parmi les six groupes existant appartient l'enzyme;
- (b) le second chiffre indique le sous-groupe et donne plus de précision sur le type de substrat ou la liaison clivée ;
- (c) le troisième chiffre donne le sous sous-groupe et donne plus de précision sur les groupements chimiques impliqués dans la réaction ;
- (d) le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme dans son sous sous-groupe.

Parmi les six familles d'enzymes précédemment évoquées, seules les hydrolases ont des applications technologiques significatives. Les raisons étant entre autres leur robustesse, leur simplicité, la facilité de production et donc de faible coût, leur maléabilité même dans des conditions rudes (Illanes *et al.*, 2008). Comme conséquence directe, la plupart des enzymes commerciales sont des hydrolases; les protéases (46 %) et les enzymes hydrolysant les hydrates de carbone (47 %) étant les plus fréquentes (Taylor & Leach, 1995).

I.1.3- Application des enzymes

Les secteurs traditionnels d'application des enzymes tels, l'alimentaire, la lingerie et le tannage se sont étendus les récentes années à la pharmacie et la chimie fine. Les applications industrielles des enzymes occupent plus de 80 % de leur marché global (Illanes *et al.*, 2008).

Dans ce travail, les enzymes qui hydrolysent l'amidon (enzymes amylolytiques) seront présentées; les micro-organismes (bactéries, champignons, etc.) et les malts de céréales en étant les principales sources (Taylor & Leach, 1995; Bamforth, 1999; Khattak *et al.*, 2015).

Les enzymes amylolytiques sont des hydrolases clivant les liaisons glucosidiques. Ces enzymes incluent les amylases et les enzymes débranchantes (Wong, 1995; Schmedding & Van

Gestel, 2002; Martin & Štefan, 2007). Ces enzymes en outre, sont subdivisées en fonction de leur spécificité pour le type de liaison qu'elles hydrolysent. La plupart de ces liaisons sont les α -1,4 glucosidiques (90 à 100 % en fonction du substrat et de son origine), et le reste les α -1,6 glucosidiques (Bernfeld, 1951). Leurs applications industrielles sont présentées au tableau 1.1.

Tableau 1. 1 : Applications industrielles des enzymes amylolytiques (Illanes *et al.*, 2008)

Enzymes amylolytiques	Source	Applications
α -amylase	Moisissures	Boulangerie, confiserie
α -amylase	Bactéries	Liquéfaction de l'amidon, détergents, désencollage des tissus
Glucoamylase	Moisissures	Sirop de glucose
β -amylase et pullulanase	Plantes, bactéries	Sirop de glucose

Les enzymes sont également des outils fondamentaux pour la recherche et le développement dans divers secteurs de la biotechnologie. Avant d'aller plus en profondeur dans la présentation des enzymes amylolytiques, il serait intéressant de rappeler la structure du substrat, l'amidon.

I.2- L'amidon : substrat des enzymes amylolytiques

L'amidon est la seconde biomasse la plus abondante dans la nature après la cellulose. Il est largement répandu dans les grains (maïs, blé, riz, sorgho, pois, etc.), les fruits (banane verte, plantain, etc.), les racines (patate, manioc, pomme de terre, etc.), et les feuilles (tabac par exemple) comme réserve et source d'énergie (Koehler & Wieser, 2013; Liu *et al.*, 2015).

L'amidon est un hydrate de carbone polymérique composé de carbone, d'hydrogène et d'oxygène dans le ratio 6 :10 :5, de formule $(C_6H_{10}O_5)_n$. Ses molécules sont faites de centaines ou de milliers de molécules de glucose, correspondant aux valeurs de n, qui varient de 50 à plusieurs milliers. Ces unités de glucose sont liées entre elles par le carbone C1 et l'oxygène, liaison qualifiée de glucosidique (Hii *et al.*, 2012). La plupart des amidons sont des mélanges

de deux polymères à haut poids moléculaire : une chaîne linéaire de molécules de glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,4 glucosidiques appelée amylose, et une structure plus complexe de chaînes d'amyloses reliées entre elles par des liaisons α -1,6 glucosidiques appelée amylopectine (Synowiecki, 2007; Hii *et al.*, 2012; Koehler & Wieser, 2013).

La chaîne d'amylose contient quelques centaines à plusieurs milliers de molécule de glucose qui à l'extrémité de la chaîne porte le carbone C1 hydroxyle et est appelée extrémité réductrice (Figure 1.1) (Bernfeld, 1951; Hii *et al.*, 2012; Koehler & Wieser, 2013).

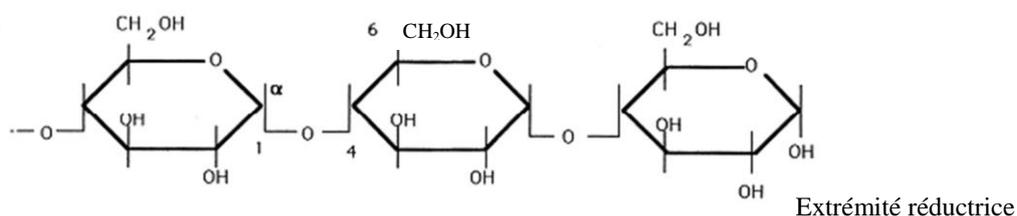


Figure 1.1: Section schématique d'une chaîne d'amylose (Bernfeld, 1951)

L'amylopectine est l'une des plus larges molécules de la nature avec un degré de polymérisation moyen d'environ 2 millions. Son poids moléculaire est d'environ 1000 fois celui de l'amylose. Les ramifications en α -1,6 de la chaîne d'amylopectine lui donnent l'aspect d'une "brousse"; ceux-ci se trouvant après chaque 20 à 30 unités de glucose (Figure1.2) et correspondent à un taux de ramification d'environ 5 % (Bernfeld, 1951; Synowiecki, 2007; Hii *et al.*, 2012).

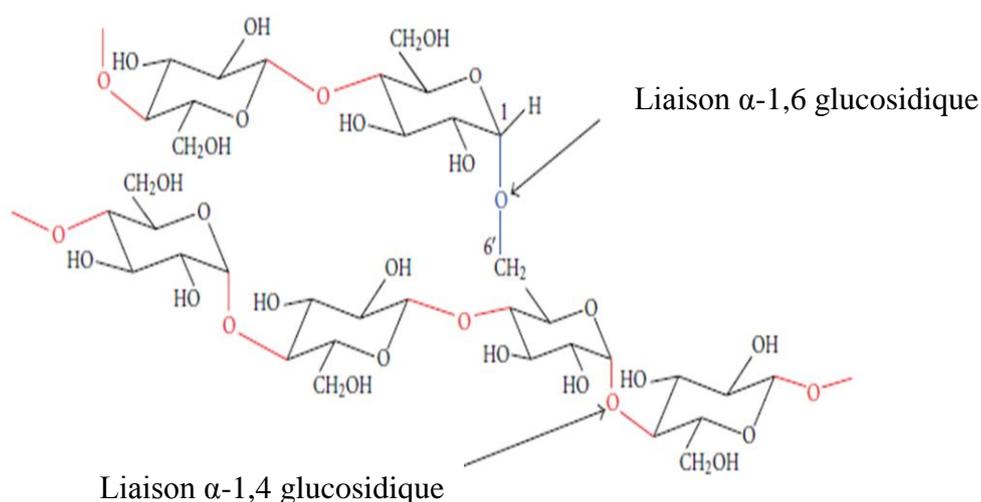


Figure 1.2: Section schématique de la molécule d'amylopectine (Hii *et al.*, 2012)

Les ratios amylose/amylopectine varient considérablement en fonction des amidons et de leur origine. Plusieurs sources contiennent environ 60 à 90 % d'amylopectine, et atteignent les 100 % pour des cultivars cireux de riz, de maïs, de sorgho, d'orge, de pois et de pomme de terre (Hii *et al.*, 2012). Ces variations impliquent des organisations cristallines diverses en fonction des amidons et par conséquent, cela dicte leurs propriétés (Hii *et al.*, 2012; Koehler & Wieser, 2013).

Les malts de céréales, riches en amidon, renferment aussi les enzymes responsables de son hydrolyse, notamment l' α -amylase, la β -amylase, l' α -glucosidase et les enzymes débranchantes (Briggs, 1998; Bamforth, 1999; Hii *et al.*, 2012). Ces enzymes (sauf le cas de la β -amylase) sont synthétisées au cours du maltage (Dewar, 1997; Larreta-Garde, 1997; Briggs, 1998; Anderson, 2000; Lewis & Bamforth, 2006).

I.3- Procédé de maltage des céréales

Le maltage c'est la germination des céréales sous des conditions contrôlées d'air et d'humidité, l'objectif principal étant de promouvoir la synthèse des enzymes hydrolytiques absentes des grains non germés. Le procédé de maltage peut être séparé en trois opérations unitaires que sont le trempage, la germination et le séchage (Briggs, 1998; Gibson, 2001; Briggs

et al., 2004). Le procédé de maltage présenté ici concerne les céréales en général, mais à titre d'illustration, l'orge, céréale la plus utilisée en malterie (Roehr *et al.*, 2001) et le sorgho seront évoqués.

I.3.1- Le trempage

Le trempage est l'immersion des grains dans de l'eau jusqu'à absorption par ceux-ci d'une quantité acceptable d'eau (généralement de 12 % à 40 % au moins) pour initier la germination (Dewar, 1997; Gupta *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2013). L'eau de trempage accomplit essentiellement deux fonctions : (1) le lavage des grains et le retrait des micro-organismes de surface, (2) l'hydratation des grains (Owuama, 1997, 1999; Lewis & Bamforth, 2006). Par ailleurs, pendant le trempage, certaines modifications physiques et biochimiques se produisent au sein des grains notamment le gonflement de ceux-ci d'environ 25 % et leur ramollissement, leur dépigmentation, l'initiation de la synthèse enzymatique (Kunze, 2004) et une dégradation partielle des hydrates de carbone solubles (Owuama, 1997, 1999; Anderson, 2000). Pendant la prise d'eau par les grains, ceux-ci respirent et rejettent du CO₂, d'où la nécessité d'approvisionner le milieu en oxygène pour éviter leur asphyxie (Dewar, 1997; Lewis & Bamforth, 2006). Le taux d'hydratation dépend de la variété, de l'échantillon de grain, de sa dimension, du taux d'azote, de la température. Pendant que la période d'immersion progresse, l'eau de trempage devient décolorée due à la présence des substances dissoutes et des microbes des couches externes du grain et est par conséquent changée au moins une fois. Quand le grain a atteint le taux d'humidité requis, l'eau est éliminée (Anderson, 2000). La fin du trempage peut par ailleurs être marquée par un début d'apparition des radicules.

Spécifiquement, les grains d'orge sont trempés dans de l'eau pendant deux jours à 10 – 16 °C pour obtenir des teneurs en eau de l'ordre de 45 %. Cette eau de trempage est périodiquement retirée pour aérer les grains, et renouvelée (Lyumugabe *et al.*, 2012; Schnitzenbaumer, 2013). Pour ce qui est du sorgho, le procédé de maltage commence également

par le trempage des grains dans de l'eau pendant 10 h à 24 h à température ambiante; mais dans ce cas, il n'y aurait ni aération, ni changement d'eau de trempage (Lyumugabe *et al.*, 2012; Schnitzenbaumer, 2013).

I.3.2- La germination

La germination est l'excroissance de la plumule des grains pour former la radicule (Owuama, 1999). Pendant la germination, les grains humidifiés croissent dans des conditions contrôlées d'air, de température et d'humidité avec synthèse enzymatique et dégradation partielle de l'endosperme (Dewar, 1997; Gupta *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2013). Durant cette étape en effet, il y a activation des métabolismes cellulaires dans les grains humides, suivi de la synthèse, la sécrétion et la répartition des enzymes hydrolytiques dans les compartiments structuraux et de réserve des grains, puis de la dégradation subséquente des macromolécules par les enzymes nouvellement formées et celles déjà présentes. Les produits de dégradation sont utilisés par l'embryon en croissance (Dewar, 1997; Owuama, 1997, 1999; Lewis & Bamforth, 2006; Schmitt *et al.*, 2013). Ce processus génère de la chaleur et des pertes de substances sous forme d'eau et de dioxyde de carbone (Schmitt *et al.*, 2013). De l'eau est donc occasionnellement ajouté afin d'éviter la déshydratation excessive des grains (Lewis & Bamforth, 2006). Etant donné que les céréales sont riches en amidon, les sucres sont les produits prédominants formés pendant la germination, suivis des acides aminés, des fragments de paroi cellulaire et d'autres composés mineurs (Schmitt *et al.*, 2013). La germination dure généralement 3 à 5 jours (Sissons, 1991).

La température est un facteur important de la germination. En effet, à des températures extrêmes (basses et élevées), la germination est empêchée. Il existe généralement des gammes de température pour lesquelles des espèces particulières vont germer, et dans cette gamme, se trouve le plus souvent un optimum (Dewar, 1997). La température optimale pourrait être liée à la durée de germination et/ou au taux d'humidité préalable du grain (Dewar, 1997).

I.3.3- Les temps et température de touraillage (séchage)

Lorsque les modifications physiques et biochimiques désirées pendant la germination sont atteintes, ceci avant la totale dégradation des polysaccharides, le malt « vert » c'est-à-dire humide (d'environ 45 % d'humidité) est séché dans un courant d'air chaud (Dewar, 1997; Gupta *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2013). Le but du séchage est de : (i) arrêter les activités biologiques des grains en germination, (ii) réduire la teneur en eau du malt pour une meilleure stabilité et conservation dans certains cas, (iii) éliminer certains composés indésirés tels le diméthylsulfite ou les polyphénols oxydases, responsables du trouble dans la bière, (iv) favoriser le développement de la couleur et de la flaveur du malt (Sissons, 1991; Dewar, 1997).

Le choix des conditions de séchage dépendra du type de malt à obtenir. Pour la plupart des malts, l'objectif visé consiste à réduire le taux d'humidité à environ 5% pour prolonger les périodes de stockage (Anderson, 2000; Lewis & Bamforth, 2006). Dans les techniques courantes de maltage, le touraillage est effectué à 50 °C pendant 24 h (Owuama, 1999; Anderson, 2000; Lewis & Bamforth, 2006; Ogbonna, 2011).

Pour ce qui est du cas particulier des enzymes, celles-ci étant des protéines, elles sont susceptibles à la dénaturation aux températures élevées de séchage. Seules les enzymes thermorésistantes pourront se retrouver dans la suite des procédés (dans les moûts de brasserie par exemple). Malgré la résistance de très peu d'enzymes à la dénaturation pendant le séchage, les brasseurs évaluent les malts de qualité par leur teneur en enzymes amylolytiques totales (Lewis & Bamforth, 2006).

- ***Le dégermage***

Le dégermage consiste au retrait des radicules des grains de malt après maltage. Pendant le maltage en effet, le cyanure d'hydrogène (toxique) est libéré par l'action de la glucosidase sur la dhurrine, un glucoside cyanogénique. Le cyanure d'hydrogène est principalement logé

dans les radicules (Aisien & Muts, 1987; Briggs *et al.*, 2004; Icard-vernière *et al.*, 2004). Le retrait des radicules réduit donc considérablement ce composé (Anderson, 2000; Icard-vernière *et al.*, 2004).

I.4- Les enzymes amylolytiques dans les malts

Les enzymes amylolytiques dans les malts de céréales sont généralement qualifiées d'amylasses (Hii *et al.*, 2012). A la base, il en existe trois types: les endoamylasses, les exoamylasses, et les enzymes débranchantes ou déramifiantes (Hii *et al.*, 2012).

I.4.1- Les endoamylasses

Les endoamylasses clivent les liaisons glucosidiques présentes à l'intérieur (endo-) des chaînes d'amylose et d'amylopectine; l' α -amylase en est une (Hii *et al.*, 2012; Schnitzenbaumer, 2013).

L' α -amylase (EC 3.2.1.1) est une endoamylase qui hydrolyse rapidement et de façon aléatoire les liaisons α -1,4-glucosidiques de l'amidon et des oligosaccharides apparentés. Les produits résultants de cette hydrolyse sont : le maltose, le glucose et l' α -limite dextrine qui renferme les liaisons α -1,6-glucosidiques de la molécule ramifiée de l'amidon (Roehr *et al.*, 2001; Schmedding & Van Gestel, 2002; Hii *et al.*, 2012; Schnitzenbaumer, 2013). L'action de l' α -amylase sur l'amidon réduit considérablement et rapidement la viscosité du milieu; raison pour laquelle cette enzyme est appelée enzyme liquéfiante (Larreta-Garde, 1997; Roehr *et al.*, 2001; Schmedding & Van Gestel, 2002). Cependant, la quantité de sucres réducteurs libérés par cette enzyme est faible. Une hydrolyse prolongée de l'amidon par l' α -amylase génère davantage d'oligosaccharides contenant les liaisons α -1,6 résiduelles et les liaisons α -1,4 très proches des points de branchement en α -1,6 résistantes à l'hydrolyse (Wong, 1995; Schmedding & Van Gestel, 2002).

Les caractéristiques de cette enzyme varient en fonction de la source (Roehr *et al.*, 2001). Son poids moléculaire est autour de 50 kDa (Sissons, 1991; Wong, 1995) et elle nécessite la présence des ions calcium pour son activité et sa stabilité. Son pH optimum d'activité varie de 5,5 à 7,0. Sa température optimale d'activité varie entre 70 °C et 72 °C (Wong, 1995).

I.4.2- Les exoamylases

Les exoamylases tels la β -amylase et l' α -glucosidase clivent les liaisons α -1,4 de la partie externe des résidus de glucose de l'amylose ou de l'amylopectine à partir des extrémités non réductrices (Hii *et al.*, 2012).

La β -amylase (EC 3.2.1.2) est une exoamylase qui hydrolyse les liaisons α -1,4-glucosidiques des chaînes d'amidon à partir de l'extrémité non réductrice. Les produits finaux de cette hydrolyse sont : le β -maltose et les β -limite dextrines (Roehr *et al.*, 2001; Schmedding & Van Gestel, 2002; Zeeman *et al.*, 2004; Hii *et al.*, 2012). Cette enzyme est présente dans l'endosperme farineux des céréales, elle y existe déjà avant la germination et est très peu synthétisée pendant cette étape (Bernfeld, 1951; Larreta-Garde, 1997).

Le poids moléculaire de la β -amylase est d'environ 50 kDa (Sissons, 1991; Wong, 1995), exception faite de celle des patates douces où c'est de l'ordre de 215 kDa (Wong, 1995). La β -amylase n'aurait pas besoin des ions calcium pour son activité. Son pH optimum d'activité varie de 4,0 à 6,0 (Wong, 1995; Roehr *et al.*, 2001). Sa température optimale d'activité est de l'ordre de 50 °C (Roehr *et al.*, 2001) ; elle est très instable au-delà de 60 °C (Synowiecki, 2007).

L' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) encore appelée maltase, est également une exoamylase qui clive les liaisons α -1,4-glucosidiques des chaînes d'amidon à partir de l'extrémité non réductrice en libérant cette fois-ci du glucose (Larreta-Garde, 1997; Hii *et al.*, 2012). C'est une enzyme très concentrée dans l'embryon et la couche d'aleurone; sa quantité augmente

pendant la germination (Fincher, 1989; Larreta-Garde, 1997). Les substrats d'activité de l' α -glucosidase sont en particulier les disaccharides et les oligosaccharides. Son action entre donc en jeu en phase finale d'hydrolyse de l'amidon (Lévêque *et al.*, 2000). Les α -glucosidases sont typiquement inactives sur des hydrates de carbone à haut poids moléculaire tels l'amidon et le pullulan (Lévêque *et al.*, 2000).

L' α -glucosidase du sorgho a une activité optimale à pH 3,75 (Taylor & Dewar, 1994; Agu & Palmer, 1997b), tandis que celle de l'orge est à pH 4,6 (Agu & Palmer, 1997a).

Il est à noter que les activités des α et β amylases ainsi que de l' α -glucosidase ne sont pas indépendantes entre elles. En effet, l'action de l' α -amylase favorise celle de la β -amylase et de l' α -glucosidase, puisqu'elle crée à partir de l'amidon de nouvelles extrémités non réductrices qui sont reconnues comme substrats par la β -amylase et l' α -glucosidase (Larreta-Garde, 1997). Les produits d'hydrolyse de l' α -glucosidase et la β -amylase étant des sucres, elles sont qualifiées d'enzymes saccharifiantes (Larreta-Garde, 1997).

I.4.3- Les enzymes débranchantes

Les enzymes débranchantes ou déramifiantes à savoir la dextrinase limite (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) sont des enzymes amylolytiques qui hydrolysent les liaisons α -1,6 dans l'amylopectine et/ou le glycogène et les polymères apparentés (Sissons, 1991; McCleary, 1992; Morinaga *et al.*, 1997; Beatty *et al.*, 1999; Repellin *et al.*, 2008; Hii *et al.*, 2012). L'affinité de ces enzymes pour les liaisons α -1,6 les distingue des autres enzymes amylolytiques qui eux présentent plutôt des affinités pour les liaison α -1,4 glucosidiques (Hii *et al.*, 2012). Bien que similaires de par la séquence d'acides aminés et la structure, elles diffèrent dans leur spécificité de substrat (Zeeman *et al.*, 2004; Hii *et al.*, 2012).

La dextrinase limite aussi connue sous les appellations de R-enzyme, pullulanase et pullulan 6-glucanohydrolase, est une α -dextrine 6-glucanohydrolase qui hydrolyse les liaisons α -1,6 de l'amidon et polysaccharides apparentés (Sissons, 1991; McCleary, 1992; Morinaga *et*

al., 1997). L'appellation « pullulanase » vient de la forte activité de cette enzyme sur le pullulan (Woods & Swinton, 1995). Le pullulan est un polysaccharide constitué essentiellement d'unités de maltotrioses reliées entre elles par des liaisons α -1,6. Il est synthétisé par une moisissure, *Aureobasidium pullulans* (Beatty *et al.*, 1999; Repellin *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Hii *et al.*, 2012; Ponnusami & Gunasekar, 2015). Les molécules de glucose dans les chaînes de maltotriose quant à elles sont reliées entre elles par des liaisons α -1,4 (Ponnusami & Gunasekar, 2015). La structure générale du pullulan est présentée à la figure 1.3.

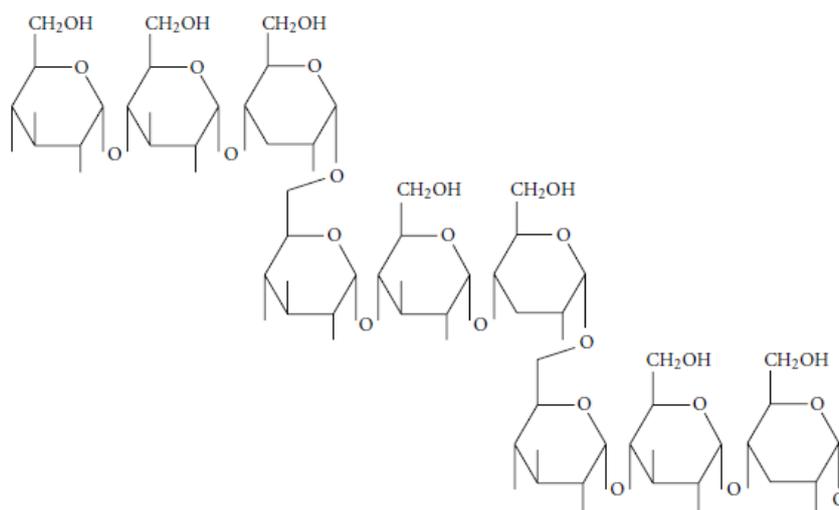


Figure 1.3: Structure générale du pullulan (Hii *et al.*, 2012)

L'action de la dextrinase limite sur le pullulan donne à cet effet du maltotriose en majorité, avec des traces de maltotétraose (Fincher, 1989; Singh *et al.*, 2010).

II- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN ENZYMES AMYLOLYTIQUES DANS LE SORGHO

Le maltage s'effectuant suivant les trois opérations unitaires de trempage, de germination et de séchage, il sera présenté ici de manière non exhaustive les travaux menés dans la bibliographie pour chacune de ces opérations unitaires dans le but d'optimiser la synthèse des enzymes amylolytiques dans le sorgho; sans toutefois omettre de présenter le sorgho au préalable dans sa botanique, production, composition et utilisation.

II.1- Le sorgho

II.1.1- Botanique

Le sorgho est un genre d'environ vingt-huit espèces de graminées (Codex-Alimentarius, 2012) mais une seule espèce de sorgho, bicolore, est cultivée pour la consommation humaine et animale (Antinori, 1995; Codex-Alimentarius, 2012). Le sorgho bicolore est originaire d'Afrique, près du Soudan, de l'Éthiopie, du Tchad et du Cameroun (Codex-Alimentarius, 2012). Il y a cinq variétés primaires de sorgho bicolore à savoir, bicolore, caudatum, durra, guinea et kafir (Antinori, 1995; Léder, 2004; Codex-Alimentarius, 2012), et dix variétés intermédiaires qui sont toutes des combinaisons des variétés de base. Les variétés se distinguent par la forme du grain, les glumes et les panicules (Léder, 2004; Codex-Alimentarius, 2012).

La culture des espèces de sorgho peut être pratiquée dans les sols arides des régions tropicales et subtropicales et peut donc supporter les périodes de sécheresse prolongées (Antinori, 1995; Codex-Alimentarius, 2012). La température optimale pour la croissance du sorgho se situe autour de 30 °C et dans les situations où les températures atteignent 40 °C – 50 °C, les rendements chutent également. Il est de ce fait indéniable que le sorgho est une céréale propre aux zones semi-arides tropicales (Antinori, 1995). Le sorgho ressemble au maïs de par son organisation génomique et la forme de la plante (Schnitzenbaumer, 2013) (photo 1.1). Le sorgho a cependant le mérite écologique d'être doté d'une grande résistance par rapport au maïs (Briggs, 1998). Cette résistance est due aux propriétés suivantes :

- La plante grandit lentement jusqu' à ce que son système racinaire devienne bien élaborer;
- Le sorgho produit deux fois plus de racines secondaires que le maïs;
- L'évapotranspiration du sorgho est environ la moitié de celle du maïs;
- Le sorgho a besoin de 20 % d'eau en dessous de celle dont le maïs a besoin, ceci pour le même rendement.



Photo 1. 1 : Plant de sorgho (Source : Stenhouse & Tippayaruk, 1996)

Le sorgho peut également tolérer une grande variété de sols et peut se développer sur des sols dont le pH varie de 5 à 8,5 et tolère mieux la salinité que le maïs (Purseglove, 1972). En plus d'être largement cultivé en Afrique sub-saharienne, le sorgho est aussi présent en Inde, au Pakistan, en Thaïlande, en Chine du nord et du centre, en Australie, en Amérique du sud et du sud-ouest, au Mexique, en France et en Italie (Antinori, 1995; Owuama, 1997; Schnitzenbaumer, 2013).

II.1.2- Production

Le sorgho occupe le cinquième rang des céréales les plus cultivées et consommées dans le monde après le maïs, le riz, le blé et l'orge (Codex-Alimentarius, 2012; FAOSTAT, 2019). Les dix pays qui ont la plus grande production de sorgho par ordre décroissant sont les Etats-Unis, le Nigeria, l'Inde, le Mexique, le Soudan, l'ex Soudan, la Chine, l'Argentine, l'Éthiopie et l'Australie (FAOSTAT, 2019). Plus de la moitié de la superficie mondiale consacrée au sorgho est en Afrique (60,6%) où il vient au 3ième rang après le maïs et le riz. Au Sahel, il se trouve en tête avec le mil. Ces deux cultures occupent ensemble 50 à 70% des superficies cultivables (Kebe, 2001). Le sorgho présente également une production accrue au Cameroun s'élevant à 1 351 966 tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2019).

II.1.3- Composition

II.1.3.1- Structure

La structure de base des grains est analogue chez le sorgho. Les principaux éléments anatomiques sont le péricarpe, le germe ou embryon, et l'endosperme. Les grains de sorgho sont du type caryopse, où le péricarpe est complètement fusionné avec l'endosperme (Rooney, 1988; Antinori, 1995; Dewar, 1997). La distribution relative des trois principaux éléments varie. La répartition selon le poids est de 6% pour le péricarpe, 84% pour l'endosperme et 10% pour le germe (Antinori, 1995; Dewar, 1997).

Contrairement à l'orge qui a une forme en fuseau, le grain de sorgho est à la base une sphère plate avec des tailles et couleurs variables. Par ailleurs, à la différence du grain d'orge, le grain de sorgho à la récolte ne possède pas de coque et sa structure anatomique est telle que présentée à la figure 1.4.

La couleur des grains varie du blanc, jaune, rouge au brun (Roehr *et al.*, 2001; Schnitzenbaumer, 2013), sans pour autant avoir de différences significatives au niveau de la composition.

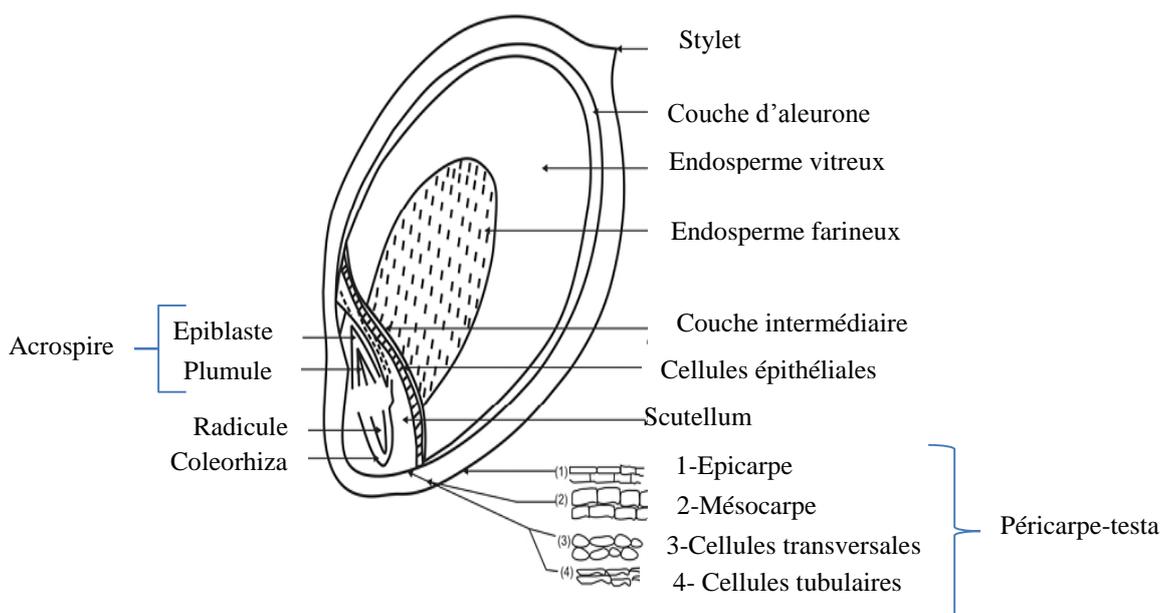


Figure 1.4: Section schématique du grain de sorgho (Ogbonna, 2011)

II.1.3.2- Composition

La composition chimique moyenne du sorgho est présentée au tableau 1.2 (Roehr *et al.*, 2001; Schnitzenbaumer, 2013).

Tableau 1. 2: Caractéristiques chimiques du sorgho non malté

Caractéristique	Teneur (%)
Teneur en eau	9 – 12
Protéines	9,0 – 13,5
Matière grasse	2,8 – 4,8
Amidon	61,0 – 74,8

Le grain entier constitue également un riche dépôt de complexe vitaminique B (niacine, riboflavine et pyridoxine), mais a une teneur faible en cendres (1,67%) (FAO, 1995). Comme pour bien d'autres cultures, le sorgho contient des facteurs antinutritionnels. La germination, le décorticage et/ou le maltage et la fermentation accroissent la valeur nutritionnelle du sorgho en causant des modifications significatives dans la composition chimique et l'élimination des facteurs antinutritionnels (Léder, 2004).

II.1.4- Utilisations du sorgho

Compte tenu de la composition chimique sus-mentionnée, le sorgho est une plante importante, traditionnellement cultivée pour son apport en énergie alimentaire aux humains et aux animaux ainsi que pour la production des boissons alcoolisées et ultérieurement, des biocarburants (Antinori, 1995; Léder, 2004; Codex-Alimentarius, 2012; Schnitzenbaumer, 2013).

Le sorgho présente un potentiel considérable en tant qu'aliment et boisson car la nature sans gluten de cette céréale la rend propre à être consommée par les coeliaques pendant que ses composés phénoliques antioxydants et ses cires hypocholestérolémiantes procurent aux industries une source potentiellement importante de nutraceutiques (Taylor *et al.*, 2006; Schnitzenbaumer, 2013).

Le sorgho est consommé sous différentes formes selon la région, le pays ou la situation dans la société. En général, il est utilisé sous forme de grain entier ou transformé en farine pour la préparation de la bouillie, du couscous, du pain et de boissons alcoolisées (non-vin) (Kebe, 2001). Les gâteaux, les biscuits, les pâtes, un produit de grignotage similaire au riz précuit sont obtenus à partir du sorgho. De la farine de sorgho mélangée à la farine de blé est utilisée pour faire des produits de pâtisserie (Taylor *et al.*, 2006). Les bières du type *lager* et stout à base de sorgho sont brassées commercialement (Codex-Alimentarius, 2012; Schnitzenbaumer, 2013).

Le succès du sorgho est lié également à son utilisation parmi les denrées alimentaires de base des populations sahéliennes (Antinori, 1995; Owuama, 1997; Codex-Alimentarius, 2012) d'une part, et d'autre part grâce aux progrès considérables dans l'utilisation industrielle du sorgho en brasserie, non plus seulement en tant que additif à l'orge, mais aussi comme matière première de base en remplacement de l'orge (Owuama, 1997). Le sorgho malté est par exemple utilisé pour le brassage industriel de la bière au Nigéria, en Afrique de l'Est, en Afrique du Sud, aux Etats Unis (Taylor *et al.*, 2006). L'implication des avancées technologiques dans la maîtrise des procédés de maltage en fonction des objectifs recherchés n'est pas à négliger dans cette avancée. Le développement et la synthèse enzymatique, en particulier les amylases par optimisation des techniques de maltage y ont été d'un grand apport.

II.2- Optimisation de la production en enzymes amylolytiques au cours du maltage du sorgho

Le procédé de maltage des céréales n'est plus à présenter. Les opérations unitaires de trempage, de germination et de séchage qui le constituent seront développées ici dans le seul but de ressortir les conditions optimales de synthèse des enzymes amylolytiques dans le sorgho; enzymes amylolytiques qualifiés autrement de pouvoir diastasique dans le jargon brassicole. En effet, le pouvoir diastasique est l'une des qualités les plus importantes dans les procédés de

maltage et de brassage et s'avère être directement proportionnel à la teneur en sucres réducteurs des extraits de malts (Owuama, 1997, 1999).

II.2.1- Optimisation du trempage

Les conditions de trempage, dans le but d'accroître l'activité en enzymes amylolytiques du sorgho ont été étudiées de manière extensive. L'étape de trempage pendant le maltage du sorgho est critique et les conditions de température, de temps et d'aération doivent être contrôlées afin d'optimiser la qualité du malt qui en résultera (Ezeogu & Okolo, 1994; Dewar *et al.*, 1997b; Owuama, 1999; Anderson, 2000; Claver *et al.*, 2010). La nature de la solution de trempage a également une influence significative (Okolo & Ezeogu, 1996a; Ezeogu & Okolo, 1999; Beta *et al.*, 2000; Okungbowa *et al.*, 2002; Lefyedi & Taylor, 2006; Taylor *et al.*, 2006). La désinfection préalable des grains contribue dans une certaine mesure à rendre leur environnement propice à une meilleure modification (Yellowlees, 1980; Beta *et al.*, 1995; Ezeogu & Okolo, 1995; Ogu *et al.*, 2006; Ogbonna, 2011). Par ailleurs, la qualité du malt dépend étroitement de la teneur en eau des grains après trempage (Dufour *et al.*, 1992; Dewar *et al.*, 1997b; Owuama, 1997).

En effet, des teneurs en eau de l'ordre de 42 % à 48 % après trempage des grains de sorgho sur une durée de 18 h à 22 h à 30 °C seraient optimales pour l'activité amylolytique des malts obtenus (Owuama & Asheno, 1994; Owuama, 1997; Okoli *et al.*, 2010). Par ailleurs, le trempage dans le noir avec des teneurs en eau finales de l'ordre de 35 % à 40 % favoriserait la germination rapide des grains à 22 °C (Owuama, 1997). En outre, des teneurs en eau élevées favoriseraient la répartition des enzymes du scutellum vers les autres parties du grain. Néanmoins, le temps requis pour atteindre la teneur en eau optimale après trempage varie en fonction du cultivar de sorgho utilisé (Dufour *et al.*, 1992; Owuama, 1997). En dehors de la variété, le temps, la température et la durée de trempage influencent la teneur en eau finale

(Owuama, 1997). Aussi, l'humidité des grains augmente avec l'augmentation de la température de trempage de 10 °C à 30 °C, quel que soit la durée (Novellie, 1962).

Par ailleurs, l'aération des grains pendant le trempage serait nécessaire pour l'obtention des malts de bonne qualité enzymatique, particulièrement à des températures élevées et sur de longues durées (Dewar *et al.*, 1997b). L'aération ici a pour but d'approvisionner les grains en oxygène et d'éliminer les sous-produits de la respiration que sont la chaleur et le dioxyde de carbone (Dewar, 1997). Pour ce qui est de la β -amylase en particulier, des périodes de repos à air (aération) lors du trempage contribuent à améliorer son activité (Okungbowa *et al.*, 2002). En effet, l'oxygénation des grains pendant le trempage augmenterait la vitesse des réactions métaboliques des grains (Dewar *et al.*, 1997b). Anderson (2000) précise que le trempage du sorgho avec des périodes de repos à air allant de 1 h à 4 h à 30 °C pendant 48 h conduit à une teneur en eau de 40 – 42 % et de ce fait, une bonne initiation des modifications biochimiques dans le grain.

En ce qui concerne la température de trempage, ce facteur a une influence très significative sur la qualité du malt final. En effet, le pouvoir diastasique des malts augmenterait avec l'augmentation de la température de trempage jusqu'à 30 °C (Dewar *et al.*, 1997b). Et, d'après Igyor *et al.* (1998), des températures allant de 25 °C à 30 °C se sont avérées optimales pour un bon développement enzymatique.

L'augmentation de la durée de trempage quant à elle entrainerait aussi l'amélioration de la qualité du malt final; ceci de 16 h à 40 h (Dewar, 1997). D'après Guiga (2006), la durée de trempage optimale varie de 24 h à 48 h. Malleshi et Desikachar (1986) quant à eux spécifient que la prise en eau des grains pendant le trempage croît avec le temps et atteint la saturation après 24 h, sauf pour le cas du maïs qui requièrerait 30 h. Novellie (1962) cependant rapporte que la durée de trempage a très peu d'effet sur le pouvoir diastasique du malt.

La présence de tannins dans les malts aura pour effet d'inactiver les enzymes pendant le brassage, à moins d'appliquer aux variétés de sorgho riches en tannins des traitements à les réduire ou à les inhiber (Beta *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2006). L'inactivation de ces tannins se fait en modifiant la composition de l'eau de trempage. Dans la pratique, ceci se fait soit par trempage des grains dans une solution diluée de formaldéhyde (Taylor *et al.*, 2013), soit par trempage avec une solution diluée d'hydroxyde de sodium (Lewis & Bamforth, 2006; Taylor *et al.*, 2013). Il faut cependant noter que la solution de soude est préférée à la formaldéhyde car celle-ci est nocive et est banni d'utilisation dans les aliments dans certains pays (Taylor *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été démontré d'une part que la formaldéhyde affecte négativement le potentiel amylolytique de certains malts de sorgho (Nso *et al.*, 2006); et d'autre part que le trempage en milieu alcalin dilué (0,1 % de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH ou NaOH) accroît significativement le pouvoir diastasique des malts de sorgho (Okolo & Ezeogu, 1996b; Ezeogu & Okolo, 1999; Okungbowa *et al.*, 2002) quoique le phénomène soit dépendant des cultivars. Le comportement variable en fonction des cultivars est attribué à la capacité de la solution alcaline à influencer la complexation des tannins/polyphénols avec les protéines, dont les concentrations et la distribution dans les grains varient en fonction des cultivars de sorgho (Owuama, 1999).

En dehors de l'amélioration de la synthèse et de l'activation des enzymes amylolytiques, le trempage en milieu alcalin aurait également les effets suivants :

- L'accroissement de la vitesse de prise d'eau par les grains (Dewar *et al.*, 1997a): le traitement alcalin aurait pour effet de faciliter l'ouverture des parois cellulaires du péricarpe des grains;
- La réduction de la charge microbienne des malts (Lefyedi & Taylor, 2006). En effet, Lefyedi et Taylor (2006) recommandent le trempage des grains de sorgho dans une solution de 0,2 % de NaOH pour diminuer la contamination bactérienne et fongique pendant le maltage.

Pour ce qui est du cas particulier de la réduction de la charge microbienne des malts, cela se fait beaucoup plus par désinfection des grains avec une solution diluée (0,1 % - 2 %) d'hypochlorite de sodium avant et/ou après le trempage (Yellowlees, 1980; Beta *et al.*, 1995; Ezeogu & Okolo, 1995; Agu & Palmer, 1999; Ogbonna, 2011). Une solution diluée de formaldéhyde est également employée à cet effet (Dewar, 1997).

II.2.2- Optimisation de la germination

Les seuls facteurs généralement pris en compte pour l'optimisation de la germination sont la température et le temps. La germination des grains de sorgho à des températures d'environ 25 °C à 30 °C sont recommandées pour le développement optimal des enzymes amylolytiques (Demuyakor & Ohta, 1992; Agu & Palmer, 1996, 1997a, 1998; Dewar, 1997; Igyor *et al.*, 1998; Owuama, 1999; Nso *et al.*, 2003). Lesquelles températures sont attribuées à la nature tropicale du sorgho (Agu & Palmer, 1997a). Ceci pour des durées allant de trois à sept jours. D'après les travaux de Dewar (1997), les températures optimales de 25 °C et de 30 °C ont données des malts de caractéristiques similaires. Il a néanmoins été mentionné que les enzymes α - et β -amylases se développent mieux dans les variétés de sorgho rouge et jaune par rapport aux variétés blanches lorsque celles-ci sont germées à 30 °C (Agu & Palmer, 1997b). Toutefois, l'optimum de temps et de température change en fonction de la variété de sorgho (Novellie, 1962; Demuyakor & Ohta, 1992), et aussi de la teneur en eau après trempage de même que la luminosité dans l'enceinte de germination (Owuama, 1997, 1999).

Il ressort de ce qui précède que la qualité du malt de sorgho dépend des facteurs physiques et biochimiques tels la température et le temps de trempage et de germination, du cultivar de sorgho mais aussi de la température de touraillage.

II.2.3- Optimisation du touraillage

Le maltage des céréales est un procédé de germination contrôlée en faveur de la synthèse optimale des enzymes. Cependant, des températures élevées de touraillage peuvent causer des

pertes drastiques d'activité enzymatique (Sissons, 1991; Dewar, 1997; Uvere *et al.*, 2000; Lewis & Bamforth, 2006). Il est reconnu que le malt vert ou malt non touraillé est riche en enzymes amylolytiques par comparaison au malt touraillé (Pratt *et al.*, 1981).

La température et la durée de touraillage, ainsi que la teneur en eau du malt vert influencent significativement l'activité amylolytique dans les malts de sorgho (Owuama, 1997, 1999). Etant donné la thermolabilité de la dextrinase limite aux températures élevées, le contrôle de l'activité de cette enzyme pendant le touraillage pourrait être un bon indicateur de l'état de séchage pour les malteurs (Sissons, 1991). Ceci laisse entrevoir qu'il serait possible de choisir un barème de séchage de façon à préserver le plus d'activité enzymatique possible; mais certains cultivars sont plus sensibles que d'autres aux hautes températures. La dextrinase limite en particulier aurait une thermostabilité comparable à celle de la β -amylase, mais plus faible que celle de l' α -amylase dans les malts (McCleary, 1992).

III- EXTRACTION ET PURIFICATION ENZYMATIQUE

Le niveau de purification souhaité pour une enzyme dépend de plusieurs facteurs, le plus important étant le degré de pureté requis aussi bien que la source utilisée à cet effet. A titre d'illustration, les enzymes industrielles sont généralement produites sous forme d'extraits relativement bruts. Celles utilisées à des fins thérapeutiques ou diagnostiques par contre, sont astreintes à des purifications rigoureuses (Kotzia *et al.*, 2012).

Toutefois, la purification d'une protéine est un processus qui prend plusieurs étapes: extraction initiale, clarification (centrifugation, filtration), précipitation différentielle, dialyse, chromatographies de divers types, etc (Dennison, 2002).

III.1- Extraction enzymatique

La procédure d'extraction des enzymes varie en fonction de la source et des propriétés physico-chimiques de l'enzyme en question. La première étape consiste à la rupture des cellules

ou des tissus la renfermant pour obtenir un broyat (Sattayasai, 2012). L'extraction proprement dite se fait par homogénéisation du broyat dans un tampon de composition appropriée, compatible avec la stabilité de l'enzyme (pH, force ionique, osmolarité, sels, antioxydants, etc.) à extraire de façon à éviter sa dénaturation (Amersham-Biosciences, 2001; Dennison, 2002). Et, selon Amersham-Biosciences (2001), l'extraction serait meilleure pour des ratios volume de tampon/masse d'échantillon de l'ordre de 10/1.

III.1.1- La clarification

La centrifugation et la filtration sont des méthodes standards de laboratoire pour la clarification des échantillons. Cette étape est d'ailleurs indispensable avant les séparations chromatographiques (GE-Healthcare, 2010).

III.1.1.1- La centrifugation

C'est la méthode de clarification la plus utilisée en laboratoire (GE-Healthcare, 2010). Les échantillons sont soumis à de fortes accélérations qui permettent le fractionnement des constituants en un sédiment (ou "culot") et en un surnageant. La centrifugation après broyage et homogénéisation permet d'éliminer les débris cellulaires (Dennison, 2002; GE-Healthcare, 2010). Le surnageant résiduel contient le matériel cytosolique (Dennison, 2002). La centrifugation est de préférence conduite à froid. Cependant, en fonction de la source et de la procédure d'extraction, il peut y avoir après centrifugation des quantités variables de particules en suspension qui ne peuvent pas sédimenter, d'où la nécessité de filtrer (GE-Healthcare, 2010).

III.1.1.2- La filtration

La filtration sert au retrait des particules de matière. Dans la pratique, les échantillons déjà clarifiés par centrifugation sont filtrés avant application aux colonnes chromatographiques (Amersham-Biosciences, 2001; GE-Healthcare, 2010).

Les protéines sont constituées de classes de macromolécules biologiques extrêmement hétérogènes. Elles sont très souvent instables en dehors de leur environnement natif, qui peut varier considérablement entre les compartiments cellulaires et les fluides extracellulaires. De ce fait, si certaines conditions tampons ne sont pas maintenues, les enzymes extraites ne pourront être actives ou rester en solution (Amersham-Biosciences, 2001).

III.1.2- Tampons et additifs d'extraction

Les tampons sont des solutions d'acides faibles ou de bases faibles qui résistent aux changements de pH suite à l'ajout de faibles quantités d'acides forts ou de bases fortes (Rehm, 2006; Stoll & Blanchard, 2009). Les tampons sont plus efficaces à des valeurs de pH qui s'éloignent d'environ d'une valeur de 1,0 de leur pKa (Lewis & Bamforth, 2006). Les tampons sont donc nécessaires pour maintenir la stabilité des enzymes en termes de pH et de force ionique (Amersham-Biosciences, 2001; Lewis & Bamforth, 2006).

Le choix d'un tampon dépend de plusieurs facteurs. Celui-ci doit être choisi de façon à correspondre avec le pH optimal d'activité de l'enzyme à extraire. Le pH doit être aussi proche que possible du pKa du tampon pour avoir un pouvoir tampon maximal (Rothe, 1994; Rehm, 2006; GE-Healthcare, 2010). La concentration typique des tampons varie de 20 à 100 mM. Néanmoins, le pKa de certains tampons est très dépendant de la température, c'est le cas des tampons Tris et triéthanolamine par exemple, contrairement à l'acétate et au phosphate. Certains tampons interagissent avec les ions métalliques, notamment le tampon phosphate où les phosphates précipitent en présence de certains ions métalliques divalents. Par ailleurs, certains tampons peuvent interférer avec des méthodes de dosage des protéines (Rehm, 2006; GE-Healthcare, 2010).

La structure des protéines inclue souvent des additifs essentiels à leur activité enzymatique et leur stabilité.

En fonction de la protéine d'intérêt, il serait nécessaire d'ajouter dans le tampon d'extraction certains additifs (Laing & Christeller, 2004) afin de : (i) améliorer la stabilité de la protéine ; (ii) maintenir la protéine en solution. Les additifs les plus utilisés, leurs concentrations effectives et leurs objectifs sont présentés dans le tableau 1.3.

Tableau 1. 3: Additifs d'extraction et de purification (Amersham-Biosciences, 2001; Laing & Christeller, 2004; Ward & Swiatek, 2009)

Classe d'additifs	Exemple	Concentration	But
Sels	NaCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄	50-150 mM	Maintient de la force ionique du milieu
Détergents	Déoxycholate, Triton X-100	0,1-1 %	Solubilisation des protéines faiblement solubles
Glycerol		5-10 %	Stabilisation
Glucose ou sucrose		25 mM	Stabilisation des membranes lysosomales, réduction de la libération des protéases
Chélateurs de métaux	EDTA, EGTA	2 - 10 mM	Limitation des oxydations, chélation des ions métalliques
Agents réducteurs	DTT, DTE, 2-Mercaptoethanol, acide ascorbique	1-10 mM, 0,05 %	Limitation des oxydations
Ligands, ions métalliques	Mg ²⁺ , ATP, GTP	1-10 mM	Stabilisation

EDTA: acide éthylène diamine tétra-acétique; **DTT:** dithiothréitol; **ATP:** adénosine triphosphate; **EGTA :**acide ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacétique; **GTP:** Guanosine triphosphate.

Les procédés d'extraction et de purification doivent être conduits à froid (0 – 4 °C) pour une meilleure stabilité, à l'exception de certaines protéines (GE-Healthcare, 2010; Sattayasai, 2012).

III.2- La Purification enzymatique

Plusieurs méthodes existent pour la purification des enzymes incluant la précipitation différentielle par des sels ou des solvants organiques, le fractionnement ou la séparation par des

techniques chromatographiques basées sur la taille des protéines (chromatographie sur gel), la charge (chromatographie d'échange ionique), ou l'affinité pour un composé spécifique (chromatographie d'affinité) (Tucker, 1995; Kotzia *et al.*, 2012). En général, les protocoles les plus efficaces commencent avec des étapes rapides, de faible résolution, qui permettent une grande récupération de la protéine d'intérêt et une visible clarification de l'échantillon (absence de trouble) (Ward & Swiatek, 2009; Labrou, 2014). La précipitation différentielle est largement utilisée ici.

III.2.1- La précipitation différentielle

Elle consiste au fractionnement de l'extrait enzymatique brut en précipitant soit certains contaminants, soit la protéine d'intérêt (Dennison, 2002). Généralement, les volumes considérables des extraits enzymatiques sont concentrés par précipitation différentielle utilisant soit les sels ou les solvants organiques (Englard & Seifter, 1990; Muralikrishna & Nirmala, 2005; Rehm, 2006; Illanes, 2008b).

III.2.1.1- La précipitation par les sels

Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient. La solubilité d'une protéine à de faibles forces ioniques augmente généralement avec la concentration en sel, appelée "salting in" (solubilisation saline). Pour des forces ioniques élevées, la solubilité des protéines diminue, appelée "salting out" (précipitation saline) (Englard & Seifter, 1990; Rosenberg, 2005; Illanes, 2008b).

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité: neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et compétitionner avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sort de

solution et précipite. Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer (Englard & Seifter, 1990).

Un certain nombre de sels ont été utilisés pour solubiliser, précipiter ou pour la précipitation fractionnée des protéines de façon différentielle; notamment le NaCl, le Na₂SO₄ et le (NH₄)₂SO₄. Cependant, le sel le plus utilisé est le (NH₄)₂SO₄ (Englard & Seifter, 1990; Dennison, 2002). Sa préférence aux autres sels est due à ses multiples avantages (Englard & Seifter, 1990) que sont :

- A saturation, sa molarité est suffisamment élevée pour causer la précipitation de la plupart des protéines ;
- Il ne cause pas un réchauffement notable des solutions, d'où la chaleur générée est facilement et rapidement dissipée ;
- Même sa solution saturée (4,04 M à 20 °C) a une densité (1,235 g.cm⁻³) qui n'est pas aussi grande de façon à interférer avec la sédimentation des protéines précipitées lors de la centrifugation ;
- Ses solutions concentrées limitent la croissance microbienne et ;
- Les protéines en solution sont préservées de la dénaturation.

Cette dernière propriété permet aussi de conserver des extraits protéiques purs dans des suspensions concentrées de sulfate d'ammonium.

En général, les protéines de masse moléculaire élevée précipitent à de faibles concentrations en sels de (NH₄)₂SO₄ par comparaison à celles de faible masse moléculaire (Englard & Seifter, 1990). Par conséquent, la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est l'une des méthodes classiques de purification partielle des protéines basée sur

la différence de masse moléculaire de celles-ci. Par ailleurs, dans cette technique, les polysaccharides, les oligonucléotides et les lipides ne sont pas précipités (Englard & Seifter, 1990). En plus de la purification, la protéine d'intérêt est aussi obtenue en un volume plus réduit et donc concentrée (Rosenberg, 2005).

III.2.1.2- La précipitation par les solvants organiques

Les solvants organiques entraînent également la précipitation des protéines en modifiant la solvation de celles-ci vis-à-vis de l'eau. Les solvants organiques les plus utilisés à cet effet sont : le méthanol, l'éthanol, le butanol, et l'acétone. Tous ces solvants sont miscibles avec de l'eau, mais génèrent beaucoup de chaleur en solution. Ils ont également tous tendance à dénaturer les protéines, spécialement à des températures au-delà de 0 °C (Englard & Seifter, 1990). En effet, l'inclusion de ces solvants dans les solutions de protéines présente des perturbations considérables. Tous ces solvants ont à la fois des sites hydrophobes (lipophiles) et polaires. A travers leurs groupements polaires, ils interagissent avec les groupements polaires de l'eau entrant ainsi en compétition avec les protéines. L'augmentation de volume de solvants organiques dans de tels milieux réduit la concentration effective de l'eau, la rendant indisponible pour l'hydratation des protéines. En plus, les groupements hydrophobes de ces solvants peuvent rompre les interactions hydrophobiques intramoléculaires qui stabilisent la structure des protéines et forcer la formation de nouvelles interactions hydrophobiques. Tous ces facteurs diminuent la solubilité des protéines entraînant leur précipitation (Englard & Seifter, 1990). Les précipitations sont généralement conduites à des températures basses (Englard & Seifter, 1990; Muralikrishna & Nirmala, 2005; Rehm, 2006) (0 – 4 °C) pour minimiser l'inactivation des enzymes à de fortes concentrations en sels ou de solvants organiques (Muralikrishna & Nirmala, 2005; Rehm, 2006; Illanes, 2008b).

La purification par les méthodes de précipitation n'est pas assez sélective et des facteurs de purification en deçà de 10 sont généralement obtenus, même dans des conditions optimales.

Toutefois, par ces techniques, les protéines sont concentrées et débarrassées de certains composés néfastes à leur stabilité (Illanes, 2008b; Kotzia *et al.*, 2012).

III.2.2- Les techniques chromatographiques

Elles sont plus spécifiques par rapport aux techniques précédentes (Dennison, 2002; Kotzia *et al.*, 2012). Ici, les enzymes sont séparées en fonction de leurs propriétés physiques (taille, forme, charge, et interactions hydrophobiques), leurs propriétés chimiques (liaisons de covalence) et biologiques (biospécificité) (Labrou, 2014; Khattak *et al.*, 2015). Quelques-unes sont brièvement présentées dans le tableau 1.4, celui-ci regroupant les principales méthodes de séparation pour la purification des protéines. Le plus souvent, il faut éliminer les sels ou produits utilisés dans ces chromatographies ; on utilise alors la dialyse (Dennison, 2002).

La dialyse est une méthode largement utilisée. Elle est simple mais prend du temps parce que la séparation dépend de la vitesse de diffusion. L'échantillon est placé dans un sac de dialyse fait de membrane semi-perméable, en forme tubulaire. Compte tenu des tubes de dialyse commercialement disponibles, seules les petites molécules dont la taille est inférieure à 10 kDa sont extraites de l'échantillon à dialyser pour le milieu extérieur. Ainsi, cette technique est normalement utilisée pour le retrait des sels des solutions protéiques. C'est également une méthode de concentration : les molécules d'eau diffusent de l'intérieur du sac de dialyse pour l'extérieur attirées par un polymère hydrophile tel le polyéthylène glycol (GE-Healthcare, 2010; Sattayasai, 2012).

Tableau 1. 4 : Principales méthodes de séparation pour la purification des protéines (Scopes, 1995; Dennison, 2002)

Propriétés	Méthodes	Echelle	Commentaires
Taille masse	ou Ultracentrifugation	Grande ou petite	Pas assez efficace pour isoler une enzyme ; est généralement utilisée pour le retrait des impuretés
	Chromatographie de filtration sur gel	Généralement petite	Couteuse et lente ; Généralement utilisée en fin de purification
	Dialyse	Généralement petite	Généralement utilisé pour le retrait des sels, des solvants organiques, etc...
	Ultrafiltration	Généralement petite	Concentre les protéines. La centrifugation suivie de la dialyse est utilisée comme alternative
Polarité Charge	Chromatographie d'échange ionique	Grande ou petite	Pureté élevée
	Electrophorèse	Généralement petite	Pureté élevée
Solubilité	Changement de pH	Généralement grande	Les enzymes ne doivent pas être désactivées dans la gamme de pH
	Changement de force ionique	Grande ou petite	Le sulfate d'ammonium est le plus utilisé
	Baisse de la constante diélectrique	Généralement grande	Les enzymes sont souvent dénaturées ; nécessite des températures basses ; Le PEG (polyéthylène glycol) est le plus utilisé
Sites spécifiques de fixation	Chromatographie d'affinité	Généralement petite	Technique fastidieuse

III.2.3- Stabilité des protéines pendant la purification

La plupart des procédés de purification a pour but d'obtenir les protéines sous forme active. Chaque étape de purification constitue un risque de perte d'activité. En effet, la perte d'activité, dans une moindre mesure, ne peut être évitée à chaque étape de purification. La stabilité des protéines doit de ce fait être assurée pendant tout le procédé et même pendant le stockage (GE-Healthcare, 2010).

Plusieurs causes sont responsables de la perte d'activité protéique, à l'exemple de:

- (a) Les problèmes avec la méthode de test d'activité liés par exemple à la présence d'inhibiteurs ;
- (b) La perte des structures tertiaire et quaternaire des protéines ;
- (c) L'agrégation due à la perte de structure ou la baisse de la solubilité;
- (d) La précipitation ;
- (e) La protéolyse ;
- (f) L'adsorption non spécifique des protéines sur les colonnes, les récipients et autres équipements ;
- (g) La perte des sous-unités ;
- (h) La perte de cofacteurs ou de coenzymes ;
- (i) Les modifications chimiques.

Ces causes peuvent être dues à: la présence d'impuretés préjudiciables, le changement des conditions de purification, le retrait des sels ou l'échange de tampon, la dilution des protéines, le changement de conditions physiques telles le gel et le dégel, ou l'augmentation de la température.

Plusieurs protéines sont hautement instables et aussi, certaines peuvent paraître très stables à une étape de purification mais perdre leur stabilité à une autre, ceci même sous des

conditions externes identiques (pH, température, composition du tampon, etc.). Par conséquent, la stabilité (l'activité pour le cas des enzymes) doit être contrôlée à chaque étape (Ward & Swiatek, 2009). Pour éviter les pertes d'activité, un certain nombre de substances peuvent être ajoutées aux extraits à purifier, substances présentées au tableau 1.3.

Connaissant les conditions de stabilité de la protéine d'intérêt et d'autres propriétés, les additifs de purification doivent être utilisés à leur concentration minimale. Ceci pour éviter d'éventuelles interférences avec les méthodes de test d'activité d'une part, et la nécessité à devoir les enlever par des purifications supplémentaires en fin de procédé (Amersham-Biosciences, 2001; Laing & Christeller, 2004; Illanes, 2008b).

III.3- Détermination de l'activité enzymatique

La quantité d'enzyme présente dans une réaction est mesurée par l'activité qu'elle catalyse. Il existe des techniques assez variables disponibles pour les tests d'activité enzymatique. Ces techniques sont basées soit sur la quantification physique ou chimique directe du produit ou du substrat, ou dans certains cas, sur le suivi des changements de propriétés du substrat (Tucker, 1995).

Les méthodes classiques d'étude des enzymes sont conduites en milieu aqueux dilué avec comme composés présents le substrat, l'enzyme, le tampon, des cofacteurs si nécessaire et l'environnement ou les conditions sous lesquelles la réaction a lieu. Chacun est d'un apport capital sur la vitesse et l'étendu des modifications chimiques des réactions enzymatiques. En général, les tests d'activité se font dans des conditions optimales de pH et de force ionique, de concentration en substrat, ceci à des températures définies, et les résultats sont exprimés en mole de substrat catalysé par minute. L'efficacité d'une réaction enzymatique est donc mesurée par l'activité de l'enzyme où une unité enzymatique (U), est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une μ mole de substrat par minute dans des conditions

définies (Taylor & Leach, 1995; Tucker & Woods, 1995; Lewis & Bamforth, 2006; Illanes, 2008a).

III.3.1- Mesure de l'activité enzymatique des amylases

Plusieurs méthodes ont été développées pour le test d'activité des enzymes qui hydrolysent l'amidon. Ces méthodes peuvent être subdivisées en des tests colorimétriques (à l'exemple du test au complexe coloré iode/substrat et du test aux sucres réducteurs), des tests viscométriques (test d'indice de chute de Hagber, test à l'amylographe Brabender), des tests turbidométriques et des tests de gel-diffusion (Hamer, 1995). Ces tests sont exploités grâce au comportement de l'amidon ou autres substrats similaires en présence des amylases.

Indépendamment de la source et de la pureté de la préparation amylassique, l'action des amylases est caractérisée par des changements simultanés des propriétés suivantes du substrat :

- (a) L'augmentation du pouvoir réducteur : l'augmentation du pouvoir réducteur d'une solution d'amylose, d'amylopectine, de glycogène, ou d'amidon est due à la libération dans le milieu des groupements de glucose aldéhydique. Ceux-ci peuvent être mesurés par des techniques de détermination des aldéhydes.
- (b) L'absorption maximale de la lumière de l'iode en complexe avec l'amylose ou l'amylopectine diminue jusqu'à de plus petites valeurs de longueurs d'onde, i.e. la couleur du complexe iode/substrat passe du violet au pourpre puis au brun. Simultanément, l'intensité de l'absorption de la lumière diminue suite à la disparition progressive de la couleur du complexe iode/substrat. Ce phénomène est appelé la dextrinisation de l'amidon.
- (c) La baisse de la viscosité : la chute rapide de la viscosité est également appelée liquéfaction de l'amidon.
- (d) Le changement du pouvoir de rotation optique.

L'observation simultanée de ces phénomènes révèle l'existence de différents types d'amylases et ces propriétés sont utilisées pour la détermination de l'activité enzymatique (Bernfeld, 1951).

Cependant, d'après Osman (2002) et Illanes (2008a), la meilleure façon d'évaluer le rôle de chaque enzyme participant à l'hydrolyse de l'amidon est de suivre : (a) la disparition du substrat, ou (b) l'apparition des produits formés. Toutefois, ceci n'est pas toujours possible en raison de la présence dans certains cas de plusieurs enzymes amylolytiques agissant simultanément aussi bien sur l'amidon que sur les produits intermédiaires, et ayant pour produits les mêmes composés (Osman, 2002). Pour surmonter ce problème, McCleary (1991) a développé des méthodes spécifiques et simples pour le test d'activité de chaque enzyme amylolytique présente dans les malts de céréale. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation des substrats synthétiques. Et, dans la pratique, plusieurs analyses enzymatiques sont effectuées à l'aide de kits enzymatiques pré-conditionnés et sont utilisés tel que recommandé par le fabricant (Miller *et al.*, 2001).

Le dosage des protéines est indispensable pour la détermination de l'activité enzymatique spécifique à une enzyme donnée (Scopes, 1995; GE-Healthcare, 2010).

III.3.2- Méthodes de dosages des protéines totales solubles

La liste des techniques colorimétriques suivantes est utilisée pour le dosage des protéines totales solubles: dosage à l'acide bicinchoninique (méthode BCA); les méthodes de Biuret, de Bradford, de Lowry. Ces techniques sont basées sur la formation d'un chromophore en présence des protéines solubles, et de la mesure de l'absorbance de ce chromophore. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients en termes de précision, de robustesse et de compatibilité avec divers tampons (Scopes, 1995; Dennison, 2002; GE-Healthcare, 2010). Le tableau 1.5 en fait une comparaison.

La mesure des protéines totales solubles à chaque étape de purification en dehors de permettre la détermination de l'activité enzymatique spécifique, est aussi un bon indicateur de pureté (Scopes, 1995; GE-Healthcare, 2010).

Tableau 1. 5 : Comparaison des méthodes usuelles de dosage des protéines solubles (GE-Healthcare, 2010)

Méthode de dosage	Concentration protéique (µg/mL)	Compatible avec			Commentaires
		Détergents	Agents réducteurs	Chélateurs de métaux	
Dosage à l'acide bicinchoninique (méthode BCA) <i>réduction de Cu²⁺, détecte les complexes de Cu²⁺ et d'acide bicinchoninique</i>	20 à 2000	oui	non	non	Détection à 562 nm d'absorbance ; les échantillons doivent être lus dans les 10 minutes. Sensible à la température
Méthode de Bradford <i>Détecte les complexes avec le bleu brillant de Coomassie G-250</i>	1 à 1500	non	oui	oui	Absorbance à 595 nm; les protéines précipitent avec le temps ; interfère avec les tampons de forte concentration; Réactif stable.
Méthode de Lowry <i>réduction de Cu²⁺, détecte les complexes acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique</i>	1 à 1500	non	non	non	Procédure multiétape ; plus précise que la méthode de Bradford ; absorbance à 750 nm ; interfère avec certains hydrates de carbone et certains tampons.

IV- EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA DEXTRINASE LIMITE A PARTIR DE PLANTES

La dextrinase limite a été isolée pour la première fois à partir d'une bactérie : *Klebsiella aerogenes* (jadis appelé *Aerobacter aerogenes*) (Sissons, 1991; Larreta-Garde, 1997; Nethrphan, 2002). Cette enzyme est largement répandue chez les bactéries particulièrement mésophiles telles : *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Streptomyce*.

La dextrinase limite est une enzyme présente également chez certaines plantes, particulièrement les céréales (Manners & Rowe, 1971; Sissons, 1991; Larreta-Garde, 1997; Nethrphan, 2002). Elle est conventionnellement appelée pullulanase lorsqu'elle est d'origine microbienne et dextrinase limite lorsqu'elle est d'origine végétale (Sissons, 1991; Larreta-Garde, 1997; Nethrphan, 2002).

En dehors des micro-organismes, la dextrinase limite a été purifiée et caractérisée à partir de plusieurs sources végétales, en particulier les grains et les feuilles; notamment l'orge (Manners & Yellowlees, 1971; MacGregor *et al.*, 1994b; Kristensen *et al.*, 1998), le sorgho (Hardie *et al.*, 1976), l'avoine (Dunn & Manners, 1975; Yamada, 1981a), la betterave (Masuda *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1992), les épinards (Ludwig *et al.*, 1984; Henker *et al.*, 1998; Renz *et al.*, 1998), les pois (Zhu *et al.*, 1998), le maïs (Beatty *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009), le riz (Yamasaki *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009) et le blé (Nethrphan, 2002; Repellin *et al.*, 2008). Il faut cependant noter que les meilleures activités en dextrinase limite parmi les végétaux seraient obtenues avec les céréales (Manners & Yellowlees, 1973).

IV.1- Extraction de la dextrinase limite à partir de plantes

Les amylases céréalières sont généralement solubles et leur extraction est tout aussi simple. L'extraction des amylases à partir des malts de céréales se fait souvent dans des tampons tels le phosphate de sodium, l'acétate de sodium et le Tris-HCl et aussi avec du chlorure de

calcium et de l'eau. Le pH du tampon doit être au-dessus de 4,5 pour éviter l'inactivation enzymatique à des pH plus bas (Briggs *et al.*, 2004; Muralikrishna & Nirmala, 2005).

En ce qui concerne la dextrinase limite en particulier, elle est présente dans les grains matures mais ne serait pas active (Sissons, 1991). Des études ont montré que la dextrinase limite est synthétisée lentement pendant la germination et de ce fait, la quantité d'enzyme des grains germés dans des conditions standards est faible (Lee & Pyler, 1984; MacGregor *et al.*, 1994b; Møller, 2013). Quoique faible, l'activité de la dextrinase limite augmente avec le temps de germination (Lee & Pyler, 1984; Fincher, 1989; Longstaff & Bryce, 1993; MacGregor *et al.*, 1994a; Kristensen *et al.*, 1998; Nethrphan, 2002; Evans *et al.*, 2010). Cette accroissement d'activité au cours de la germination serait due à l'activation *in vivo* de la dextrinase limite suite à la protéolyse des inhibiteurs endogènes par des thiol-protéases endogènes qui sont synthétisées aussi pendant la germination (Longstaff & Bryce, 1993; Heisner & Bamforth, 2008). Il a été en effet démontré que la faible teneur en dextrinase limite dans les grains serait due au fait que celle-ci soit inhibée par des inhibiteurs endogènes qui lui seraient liés (Sissons, 1991; MacGregor, 2004; Edney, 2008), d'où la difficulté à pouvoir quantifier cette enzyme (Edney, 2008). En effet, plusieurs auteurs ont montré que la dextrinase limite dans les grains en germination existe principalement sous deux formes : une forme liée aux inhibiteurs, insoluble et donc inactive, et une forme libre, soluble et active (McCleary, 1992; Longstaff & Bryce, 1993; MacGregor *et al.*, 1994b; Edney, 2008; Evans *et al.*, 2010). Pour y remédier, l'activité totale en dextrinase limite (incluant l'activité de l'enzyme libre et de celle liée) serait obtenue par extraction soit en présence de cystéines protéases (Longstaff & Bryce, 1993; Briggs, 1998; Heisner & Bamforth, 2008), soit en présence de papaines (Yamada, 1981b; Fincher, 1989), soit en présence d'agents réducteurs (Yamada, 1981a; Fincher, 1989; McCleary, 1992; MacGregor, 2004; Edney, 2008) notamment la thioredoxine (Heisner & Bamforth, 2008), le dithiotréitol (Lee & Pyler, 1984; McCleary, 1992; MacGregor *et al.*, 1994a; Lewis & Bamforth, 2006;

Repellin *et al.*, 2008; Møller, 2013), l'acide ascorbique (Kristensen *et al.*, 1998). Par ailleurs, Heisner et Bamforth (2008) ont démontré que le dithiothréitol en présence de chlorure de calcium pouvait également stimuler la libération de la dextrinase limite. L'ajout de protéines tel que le SAB (sérum albumine bovine) dans les tampons d'extraction rehausserait également l'activité de la dextrinase limite (MacGregor *et al.*, 1994a).

L'activité de la dextrinase limite, qu'elle soit libre ou liée, varie considérablement en fonction de la variété de céréale, du procédé de maltage et du procédé d'extraction (Ross *et al.*, 2003; Edney, 2008; Huang *et al.*, 2016). S'agissant donc du procédé de maltage, la germination anaérobie permettrait de rehausser l'activité en dextrinase limite, c'est-à-dire dans des conditions réductrices qui favoriseraient l'augmentation de l'activité des cystéines protéases (Longstaff & Bryce, 1993; McCafferty *et al.*, 2004), qui à leur tour dégraderaient les inhibiteurs de dextrinase limite. Edney (2008) soutient le contraire en stipulant que la germination anaérobie fait baisser l'activité totale en dextrinase limite. En outre, l'utilisation de l'acide gibbérellique pendant la germination, les températures de touraillage, auront également un impact sur l'activité de la dextrinase limite. Des températures élevées de touraillage réduiraient l'activité totale en dextrinase limite (Sissons, 1991; Edney, 2008).

Dans tout procédé d'extraction cependant, le but est d'obtenir le composé d'intérêt en entier et stable, aussi de manière à ce que les essais soient précis et reproductibles (Sissons, 1991). Il a été démontré pour le cas de la dextrinase limite d'une part que des durées longues d'extraction en présence d'agents réducteurs étaient indiquées dans ce sens (McCleary, 1992; MacGregor *et al.*, 1994a) en raison des inhibitions relevées plus haut. Par ailleurs, l'effectivité de l'inhibition varie avec le pH du milieu, ceci étant plus prononcé à des pH de l'ordre de 5,5 – 6,5, qui incluent les valeurs de pH d'activité optimale de la dextrinase limite. L'inhibition s'est avérée par contre faible aux pH 4,5 et 8 (MacGregor *et al.*, 1994b). McCleary (1992) justement, préconise pour un maximum d'extraction de la dextrinase limite, un temps minimum

de 16 h avec 200 mM de tampon acétate contenant 20 mM de cystéine ou un temps de 5 h avec du tampon acétate contenant 25 mM de dithiothréitol. D'autre part, des durées courtes d'extraction (2,5 h) avec le tampon Phosphate-citrate pH 6,8 à 20 °C sans agents réducteurs auraient permis d'obtenir un maximum d'enzyme (Lee & Pyler, 1984) avec des différences significatives en fonction des variétés d'orge. En général, les pH optimaux d'extraction de la dextrinase limite sont de 5,0 – 5,5 (Briggs, 1998; Synowiecki, 2007), pour des températures optimales allant de 40 °C (McCleary, 1992; MacGregor *et al.*, 1994a; Furegon *et al.*, 1997) à 45 °C (Stenholm & Home, 1999; Yamasaki *et al.*, 2008).

IV.2- Techniques de purification de la dextrinase limite

Les techniques de purification de la dextrinase limite tournent autour de deux schémas principaux présentés à la figure 1.5.

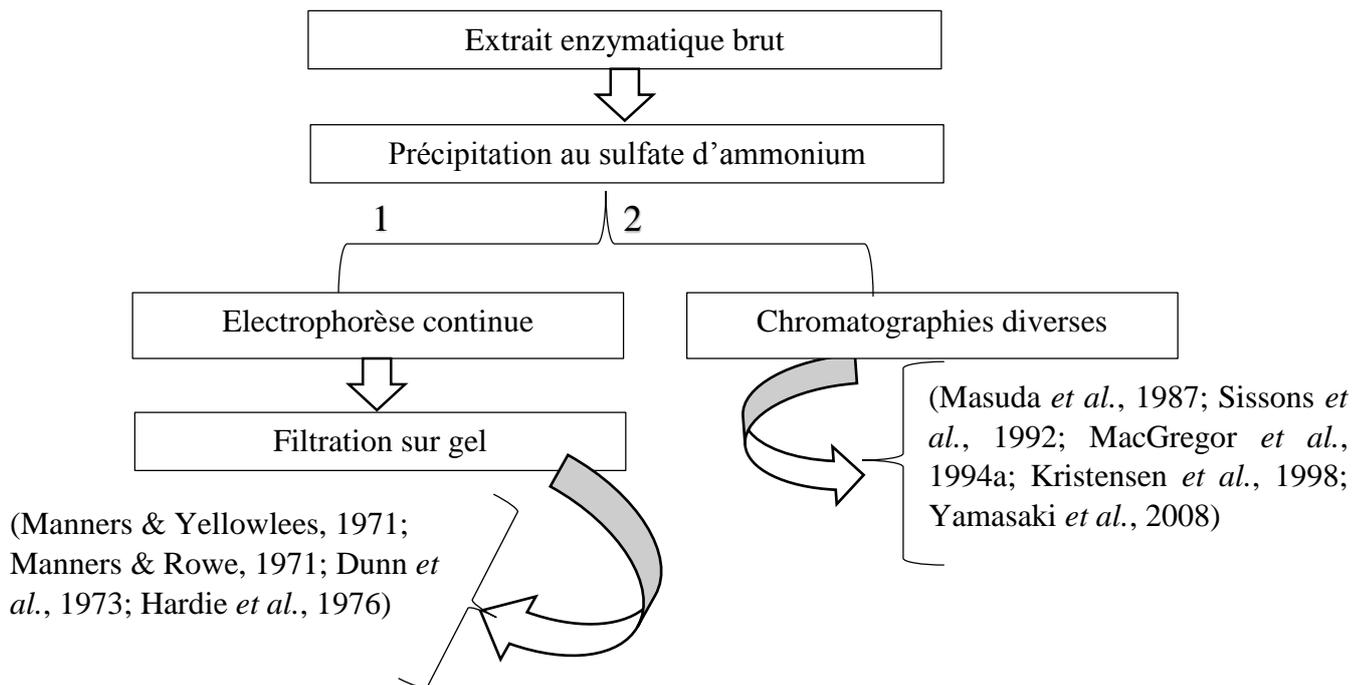


Figure 1.5: Techniques de purification de la dextrinase limite

Schémas allant de la précipitation au sulfate d'ammonium à la filtration sur gel en passant par l'électrophorèse continue d'une part, et d'autre part la précipitation au sulfate d'ammonium est suivie de techniques chromatographiques diverses. Ces techniques de purification à l'exception

de la précipitation au sulfate d'ammonium sont de haute résolution, aboutissant le plus souvent à des extraits purifiés jusqu'à homogénéité (Scopes, 1995; Dennison, 2002).

IV.3- Techniques de mesure de l'activité enzymatique de la dextrinase limite

Les méthodes de test d'activité de la dextrinase limite ont été problématiques durant des années (Sissons, 1991) du fait de plusieurs contraintes qui gênaient l'application d'un substrat spécifique (Osman, 2002). La méthode de test idéale doit être spécifique, sensible et facile à mettre en œuvre (Sissons, 1991). Plusieurs tests ont été développés utilisant comme substrat soit les dextrines, soit le pullulan (McCleary, 1991; Sissons, 1991; Wu *et al.*, 2010) et où les sucres réducteurs formés étaient par la suite dosés soit par la méthode de Nelson (1944), soit par la méthode à l'acide 3,5 dinitrosalicylique (Fischer & Stein, 1961). La méthode viscométrique utilisant le pullulan fut aussi employée (McCleary, 1991). McCleary (1991) mentionne cependant que pour les tests d'activité recourant au dosage des sucres réducteurs, l'extrait enzymatique doit être purifié au moins partiellement afin d'éliminer les sucres réducteurs inhérents à l'extrait. Par ailleurs, la présence éventuelle d'autres enzymes amylolytiques telles que les α - et β -amylases et l' α -glucosidase pourrait interférer dans cette technique en participant à la libération des sucres réducteurs et par ricochet, l'activité de la dextrinase limite serait surestimée (McCleary, 1991; Sissons, 1991; Osman, 2002). Une autre technique de test est la mesure de l'absorbance du complexe coloré iode-amylose. En effet, lorsque la dextrinase limite débranche l'amylopectine ou les dextrines aux branchements en α -1,6, des dextrines linéaires de longueurs variables sont formées et se lient donc à l'iode, augmentant l'intensité de la coloration. Toutefois, cette méthode reste non spécifique si l'extrait renferme en dehors de la dextrinase limite, d'autres enzymes amylolytiques qui hydrolyseront ces dextrines linéaires empêchant ainsi leur complexation avec l'iode et donc l'intensité de la coloration sera réduite (Sissons, 1991).

La découverte du pullulan comme substrat par Manners et Yellowlees (1973) a tout de même révolutionné le dosage de la dextrinase limite. En effet, bien des auteurs relèvent que les enzymes amylolytiques telles l' α -amylase, la β -amylase et l' α -glucosidase n'ont presque pas d'action sur le pullulan et donc le test au pullulan serait spécifique à la dextrinase limite (Yellowlees, 1980; Pratt *et al.*, 1981; Lee & Pyler, 1984; Lévêque *et al.*, 2000; Nethrphan, 2002; Wu *et al.*, 2010). Il faut pourtant noter que l'hydrolyse complète du pullulan par la dextrinase limite donne comme produits le maltotriose majoritairement et dans une moindre mesure le maltotetraose (Fincher, 1989; McCleary, 1991; Wu *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Ces produits pourraient subir l'attaque de l' α -glucosidase pour le maltotriose (McCleary, 1991; Sissons *et al.*, 1992), et de la β -amylase pour le maltotetraose (Zeeman *et al.*, 2004), libérant les sucres réducteurs, ce qui biaiserait l'activité de la dextrinase limite par le test au pullulan en dosant les sucres réducteurs. Schmedding et Van Gestel (2002) par contre, soulèvent le contraire en ce que le maltotriose et le maltotetraose sont résistants à l'attaque de l' α -amylase et la β -amylase.

Pour surmonter ce problème, McCleary (1992) a développé plusieurs méthodes utilisant des substrats synthétiques spécifiques à la dextrinase limite notamment le pullulan modifié, le pullulan rouge, l'« Azurine-Cross-Linked » et les tablettes de « Limit-DextriZyme ». Certaines de ces méthodes ont présenté cependant des limites et cet auteur a recommandé à cet effet comme substrat les tablettes de « Limit-DextriZyme » en raison de leur très haute sensibilité, stabilité et facilité d'usage (McCleary, 1992). Ces substrats sont disponibles sous forme de kits enzymatiques.

A la lumière de ce qui précède il en vient que, que ce soit pour l'extraction ou la purification enzymatique, le test d'activité reste un paramètre clé d'évaluation de l'effectivité du procédé. Pour le cas précis de la dextrinase limite, l'emploi des substrats naturels et

synthétiques spécifiques à cet effet permettront d'être mieux situé tant sur l'effectivité de l'action de l'enzyme que sur les caractéristiques de l'enzyme dans les procédés.

V- QUELQUES PARAMETRES CARACTERISTIQUES DES ENZYMES ET PROPRIETES DE LA DEXTRINASE LIMITE

Pour comprendre le fonctionnement des enzymes pendant les procédés, la connaissance de leur comportement en conditions idéales est premièrement requise. Ceci à son tour nécessite la compréhension de la cinétique enzymatique (Tucker, 1995).

V.1- La cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique est l'étude des enzymes en activité (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006). L'activité enzymatique est influencée par plusieurs paramètres tels : la concentration en enzyme, la concentration en substrat, les conditions opératoires telles le pH, la température, la force ionique et l'humidité du milieu, la présence ou l'absence d'inhibiteurs, d'activateurs ou de cofacteurs. Cette cinétique donne une approche systématique d'analyse et de quantification des effets de ces paramètres sur l'activité enzymatique (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012).

V.1.1- La concentration en enzyme

Il est souvent considéré que les vitesses des réactions enzymatiques sont directement proportionnelles à la concentration en enzyme. Ceci est certes vrai dans la plupart des cas à condition que la concentration en substrat dépasse de loin la concentration en enzyme (Tucker, 1995).

Une autre considération, qui est rarement vérifiée, est que les vitesses des réactions enzymatiques sont linéaires avec le temps. Ces vitesses, sur une durée considérée, ne sont pas linéaires mais suivent une tendance où la vitesse initiale pourrait être linéaire, mais avec le temps, celle-ci commence à décroître (Tucker, 1995). Certaines enzymes ont des vitesses

initiales d'action linéaires juste pour quelques minutes tandis que pour d'autres, cela s'étend sur des heures. Ce qui explique la baisse d'activité avec le temps est le plus souvent l'épuisement du substrat dans le milieu (Tucker, 1995).

V.1.2- La concentration en substrat

La vitesse d'une réaction enzymatique est incontestablement dépendante de la concentration en substrat (Tucker, 1995; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012). Il est prouvé que si la quantité d'enzyme est maintenue constante et la concentration en substrat croit en même temps, la vitesse de la réaction va de même croître jusqu'à atteindre un maximum après quoi un éventuel ajout de substrat ne produira plus le même effet. Ceci est expliqué par le fait de la complexation de toute l'enzyme présente dans le milieu avec le substrat (complexe enzyme-substrat). Graphiquement (vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat), ce maximum est la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction (Mohan *et al.*, 2013).

Il est naturel de mentionner la constante de Michalis-Menten (K_m) lors de l'étude des cinétiques enzymatiques au même titre que la vitesse maximale (V_{max}). K_m est indépendant de la concentration en enzyme contrairement à V_{max} (Tucker, 1995).

V.1.2.1- La constante de Michaelis-Menten (K_m)

C'est la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale. Son unité est donc en mol/L. K_m est un outil fondamental de caractérisation d'une enzyme particulière et de son substrat ; il mesure l'affinité qu'a une enzyme avec son substrat dans des conditions définies de température et de pH. Plus la valeur de K_m est petite, plus l'affinité de l'enzyme avec le substrat est grande (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). K_m varie considérablement d'une enzyme à l'autre, aussi en fonction des substrats pour la même enzyme (Mohan *et al.*, 2013).

V.1.2.2- La vitesse maximale (V_{max})

C'est la plus grande valeur de la vitesse pour laquelle la concentration en substrat est saturante (i.e. en excès) pour l'enzyme (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). V_{max} n'est cependant pas une caractéristique fondamentale pour une enzyme donnée, car sa valeur va dépendre de la quantité d'enzyme présente (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Kotzia *et al.*, 2012).

V.2- Les conditions opératoires pour la caractérisation enzymatique

Les enzymes étant des protéines, elles sont sensibles aux changements de leur environnement d'activité, qui dans des conditions extrêmes conduisent à leur dénaturation (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Mohan *et al.*, 2013). La dénaturation des protéines est un phénomène ou un ensemble de phénomènes qui conduisent à des modifications structurales ; et dans la plupart des cas, ces changements entraînent un déplissement au point d'altérer la fonction biologique des protéines. Dans le cas des enzymes, cela signifie la perte d'activité. Ces changements structuraux sont la conséquence des ruptures des liaisons covalentes et non covalentes d'une part, et de la modification de l'ionisation au niveau des sites actifs d'autre part ; tout ceci étant causé par la modification des conditions d'activité de l'enzyme (Illanes *et al.*, 2008). Les facteurs opératoires majeurs pouvant affecter les activités enzymatiques au cours des procédés sont : la température, le pH, la force ionique et la teneur en eau du milieu réactionnel (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Mohan *et al.*, 2013). Ces paramètres n'affectent pas seulement l'activité de l'enzyme, mais aussi sa stabilité (Illanes *et al.*, 2008).

V.2.1- Le pH

L'activité enzymatique est hautement affectée par le pH. Ceci est dû au fait que la fixation du substrat et la catalyse soient dépendantes de l'ionisation des groupements tant au niveau du site actif de l'enzyme qu'au niveau du substrat. En effet, lorsque le pH varie, l'ionisation des groupements peut être altérée, ce qui influence la vitesse de la réaction. Les enzymes ont un pH

caractéristique auquel la vitesse de la réaction qu'elles catalysent est maximale ; et au-delà ou en deçà, la vitesse chute (Teal & Wymer, 1994; Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). Cependant, dans bon nombre de cas, les enzymes sont actives sur une plage de pH. Tandis que certaines ont une plage resserrée, d'autres en ont une plus large (Lewis & Bamforth, 2006; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). Le contrôle du pH est donc crucial et dans bien des cas, lorsque la plage de pH opératoire des procédés ne coïncide pas avec le pH optimum d'activité des enzymes, ce facteur peut devenir limitant (Tucker, 1995).

Etant donné que les enzymes sont sensibles aux variations de pH, la plupart des réactions sont conduites dans un environnement tampon afin de limiter ces variations (Mohan *et al.*, 2013).

➤ **pH de stabilité enzymatique**

A côté de son caractère limitant sur l'activité catalytique, le pH a aussi un effet prononcé sur la stabilité de l'enzyme. Ainsi, les enzymes n'ont pas seulement une plage de pH d'activité optimale, mais aussi une plage de pH pour laquelle elles restent stables (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006). Ces deux plages ne s'équivalent pas nécessairement; en effet, la plage de pH de stabilité a tendance à être plus élevée que celle d'activité optimale (Tucker, 1995). Le pH optimum, et la plage de pH de stabilité varient largement d'une enzyme à une autre (Tucker, 1995; Miller *et al.*, 2001; Lewis & Bamforth, 2006). La plupart des enzymes brassicoles ont un pH optimum d'activité compris entre 4,5 et 6,0, qui est la plage de pH opératoire de la majorité des procédés brassicoles (Lewis & Bamforth, 2006). Toutefois, l'effet du pH sur la stabilité enzymatique, spécialement l'effet de l'interaction pH et température doit être pris en considération dans les procédés (Tucker, 1995).

V.2.2- La température

La plupart des réactions chimiques sont endothermiques, i.e., elles nécessitent un apport de chaleur pour avoir lieu et, les réactions de catalyse enzymatique n'en sont pas exemptées (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006). Sur une plage de température donnée, les températures élevées accélèrent l'action enzymatique. Cependant, en fonction de l'enzyme, à certaines températures, la vitesse de la réaction enzymatique sera plutôt décélérée due à l'inactivation thermique de l'enzyme. En effet, il y a un équilibre entre la vitesse de la réaction qui augmente avec l'augmentation de la température, et la vitesse de dénaturation de l'enzyme, qui augmente aussi avec l'augmentation de la température. De façon pragmatique, la température optimale d'activité indique donc la température à laquelle l'accroissement de la vitesse de la réaction n'est pas contre significativement par la vitesse de dénaturation de l'enzyme (Teal & Wymer, 1994; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). Ainsi, dans des conditions opératoires précises, la température optimale d'activité peut être définie pour chaque enzyme (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006). Cette température est dépendante du temps et va décroître avec l'augmentation du temps de contact entre l'enzyme et le milieu réactionnel (Illanes *et al.*, 2008).

La température à laquelle la dénaturation devient un facteur important varie d'une enzyme à une autre (Hejnaes *et al.*, 1998). Normalement, elle est négligeable en deçà de 30 °C (Hejnaes *et al.*, 1998) et commence à devenir appréciable au-delà de 40 °C (Hejnaes *et al.*, 1998). Dans la pratique, les tests d'activité enzymatique se font entre 20 °C et 50 °C, dans des tampons aqueux de pH et de composition contrôlés (Miller *et al.*, 2001). De même que la température affecte significativement l'activité enzymatique, il en va de même de sa stabilité (Illanes *et al.*, 2008).

La stabilité thermique d'une enzyme peut être déterminée en exposant dans un premier temps l'enzyme à une plage de températures pendant un temps fixe, puis mesurer l'activité à une température favorable (Teal & Wymer, 1994).

Les températures de stabilité maximale des enzymes se situent entre 10 et 30 °C. Par conséquent, l'inactivation thermique pendant les procédés de purification n'est pas à envisager si les propriétés du tampon sont optimales (Hejnaes *et al.*, 1998). La température de stabilité varie énormément d'une enzyme à une autre (Tucker, 1995).

V.2.3- Force ionique et teneur en eau du milieu

Les enzymes réagissent souvent dans les conditions optimales requises en fonction de la force ionique du milieu. Seulement, contrairement au pH, il y a presque toujours une assez large plage de forces ioniques pour lesquelles les activités enzymatiques restent appréciables. Dès lors, la prise en compte de ce paramètre est rarement une exigence (Tucker, 1995; Illanes *et al.*, 2008). Il a tout de même été prouvé que cela affecte le comportement des enzymes pour des concentrations au-delà de 100 mM (Illanes *et al.*, 2008). La même chose peut être dite de la teneur en eau du milieu réactionnel, qui dans la plupart des cas, est assez élevée due à l'environnement aqueux où est conduit la plupart des procédés enzymatiques (Tucker, 1995).

V.2.4- Effet des cofacteurs

Plusieurs enzymes nécessitent la présence supplémentaire de composés non protéiques, les cofacteurs, pour leur activité (Bernfeld, 1951; Muralikrishna & Nirmala, 2005; Kotzia *et al.*, 2012). Certains de ces cofacteurs sont des ions métalliques tels Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Ca^{2+} et Na^+ . Ces ions métalliques se lient en général de façon réversible aux enzymes et restent inchangés pendant la réaction (Illanes, 2008a).

Pour ce qui est des enzymes amylolytiques, les ions calcium jouent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité structurale des sites catalytiques et/ou de fixation de substrat chez

les α -amylases, amylopullulanases et bien d'autre glycosyl hydrolases (Synowiecki, 2007). En outre, la présence des ions calcium accroirait la stabilité thermique des amylases (Bernfeld, 1951; Muralikrishna & Nirmala, 2005).

L'amélioration de l'activité des amylases en présence des ions calcium est basée sur l'habileté de ceux-ci à interagir avec les charges négatives des résidus d'acides aminés tels que les acides aspartique et glutamique, ce qui aboutit à la stabilisation ainsi qu'au maintien de la conformation de l'enzyme. Les ions calcium aideraient spécialement à maintenir la structure tridimensionnelle des amylases (Muralikrishna & Nirmala, 2005). Certains cofacteurs sont de petites molécules organiques appelées coenzymes (Taylor & Leach, 1995).

Les réactions qui dépendent des cofacteurs sont néanmoins plus difficiles à mettre en œuvre dans l'industrie alimentaire étant donné que ceux-ci nécessitent d'être régénérés, et les cofacteurs en eux-mêmes sont coûteux (Taylor & Leach, 1995). Cependant, beaucoup des matières premières utilisées dans l'industrie alimentaire sont de faible coût ; ainsi, l'utilisation de cofacteurs pourrait se justifier seulement par la haute valeur des produits tels les exhausteurs de flaveur et certains hydrocolloïdes épaississants (Taylor & Leach, 1995).

V.3- Caractéristiques de la dextrinase limite

Il est indispensable de connaître le comportement d'une enzyme afin de mieux exploiter ses potentialités. La dextrinase limite n'est donc pas en reste vu son rôle dans le processus d'hydrolyse des hydrates de carbone ayant des branchements en α -1,6, qui n'est plus à démontrer.

V.3.1- Quelques paramètres caractéristiques de la dextrinase limite

La dextrinase limite a un pH optimum de 5,0-5,5. Elle est thermosensible et donc très instable au-delà de 50 °C – 60 °C (Hardie *et al.*, 1976; Glennie & Wight, 1986; Sissons, 1991; Briggs, 1998; Martin & Štefan, 2007).

Il a été démontré que l'hydrolyse de l'amidon dans les moûts de brasserie aux températures de 63 – 65 °C avec un pH du moût de 5,4 - 5,5 favorisant l'action optimale de la dextrinase limite présente dans le malt, s'oppose à la température optimale de 50 °C obtenue avec la dextrinase limite purifiée (Stenholm & Home, 1999); de ce fait, l'enzyme pure se trouverait être plus thermosensible que celle non purifiée; d'où l'affirmation de Stenholm et Home (1999) selon laquelle la température d'incubation de 40 °C proposée par la méthode standard du kit Megazyme (McCleary, 1992) pour déterminer l'activité de l'enzyme est suboptimale. Néanmoins, les travaux de Walker *et al.* (2001) sur la survie de la dextrinase limite pendant la fermentation pour la production de whisky démontrent effectivement la survie de celle-ci aux températures de brassage (63 – 65 °C).

Pour ce qui est de la taille de la dextrinase limite, c'est une molécule énorme avec des masses moléculaires variantes en fonction de la source et de la méthode utilisée pour sa détermination (Sissons, 1991). D'après Shetty *et al.* (2005), cette masse varie de 80 kDa à 145 kDa. Il est aussi dit de la dextrinase limite d'avoir une taille supérieure aux enzymes α -amylase (54 – 59 kDa) et β -amylase (64 kDa) (Sissons, 1991).

V.3.2- Action de la dextrinase limite sur les polysaccharides

L'action de la dextrinase limite est spécifiquement élevée sur les dextrines limites, mais aussi sur le pullulan (Abdullah & French, 1970; Manners & Yellowlees, 1971; Macgregor, 1987; Kristensen *et al.*, 1999; Nethrphan, 2002; Singh *et al.*, 2010). En général, l'action de la dextrinase limite est meilleure sur de petits oligosaccharides ramifiés, avec au moins une liaison α -1,4-glucosidique de part et d'autre de celle α -1,6-glucosidique (Yellowlees, 1980; Pratt *et al.*, 1981; Woods & Swinton, 1995; Schmedding & Van Gestel, 2002). L'activité baisse lorsque le substrat devient plus complexe. La plus petite activité est obtenue avec l'amylopectine (Manners & Yellowlees, 1971; Dunn & Manners, 1975; Vester-Christensen, 2010; Møller, 2013).

VI- APPLICATIONS ET IMPORTANCE DE LA DEXTRINASE LIMITE

L'amidon est la matière première majeure dans plusieurs procédés industriels allant de l'industrie alimentaire aux industries chimique, pharmaceutique, textile, de détergence et même de biocarburant (Hii *et al.*, 2012; Khattak *et al.*, 2015). Celui-ci est incorporé à des produits alimentaires comme agent épaississant, liant, stabilisateur d'émulsion, gélifiant et même comme substitut de graisses (Synowiecki, 2007). Ces fonctionnalités de l'amidon peuvent davantage s'étendre au travers de modifications enzymatiques de celui-ci pour sa dépolymérisation en oligosaccharides et sucres simples utilisés en majorité dans l'industrie agro-alimentaire (Woods & Swinton, 1995; Synowiecki, 2007).

Le processus de saccharification de l'amidon en industrie est souvent amélioré par ajout d'amyloglucosidase qui hydrolyse efficacement les liaisons α -1,4, mais très lentement les liaisons α -1,6. Cependant, l'amyloglucosidase catalyse la réaction de réversion du glucose en isomaltose, non hydrolysable. Celui-ci constitue donc un sous-produit qui réduit le rendement en glucose et qui est inacceptable dans les sirops de fructose de haute qualité (Slomińska & Mączyński, 1985; Woods & Swinton, 1995; Hii *et al.*, 2012). Par contre, lorsque la dextrinase limite est utilisée en combinaison avec l'amyloglucosidase, le problème dû à la réversion du glucose en isomaltose est réduit.

Par ailleurs, la dextrinase limite est préférée à l'isoamylase du fait que celle-ci est incapable d'hydrolyser les chaînes latérales d'unité de glucose en position 2 et 3 des dextrines limites. Par conséquent, l'action simultanée de la β -amylase et de l'isoamylase ne peut pas quantitativement convertir l'amylopectine en maltose. De plus, la présence éventuelle de maltotriose ou de maltotetraose dans le milieu exerce une inhibition compétitive sur l'action de l'isoamylase (Hii *et al.*, 2012).

Le sirop de maltotriose est de même produit par l'hydrolyse enzymatique du pullulan par la pullulanase. Ce sirop possède d'excellentes propriétés telles un faible point de congélation, une sucrosité légère, est conservateur d'humidité, limite la rétrogradation de l'amidon dans les denrées alimentaires, une faible aptitude au développement de la couleur par comparaison aux sirops de maltose, de glucose ou de saccharose, une bonne stabilité à la chaleur, une faible viscosité, une haute fermentabilité et favorise un goût vitreux. Ces propriétés sont essentielles dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Singh *et al.*, 2010). Le sirop de maltotriose de haute qualité peut être appliqué en industrie alimentaire pour la production de desserts, en pâtisserie et en brasseries, ainsi qu'en industrie pharmaceutique pour le remplacement du glucose dans l'alimentation intraveineuse.

En pâtisserie, la pullulanase ou dextrinase limite peut être ajoutée à la pâte pour assister les amylases α et β dans la conversion de l'amidon en sucres fermentescibles. Ces sucres sont également nécessaires pour améliorer la couleur de la croûte qui est le résultat des réactions de Maillard intensifiées par la présence de glucose dans le milieu (Synowiecki, 2007).

En brasserie, la dextrinase limite joue un rôle incontestable dans le processus de brassage de la bière de par sa contribution unique dans l'hydrolyse des liaisons α , 1-6 des oligosaccharides pendant le maltage et le brassage (MacGregor *et al.*, 1994a, 1999; Stenholm & Home, 1999; Schmedding & Van Gestel, 2002; McCafferty *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2005). Stenholm et Home (1999) ont d'ailleurs démontré que la fermentabilité des moûts de brasserie était fortement et positivement corrélée à l'activité de la dextrinase limite. Aussi, Huang *et al.* (2016) ont démontré que l'activité de la dextrinase limite était positivement corrélée à certains paramètres importants en brasserie tels le pouvoir diastasique, l'index Kolbach (teneur en azote soluble totale dans le moût par rapport au pourcentage d'azote total dans le malt (Okafor, 1995), la teneur en azote soluble.

Une activité élevée en dextrinase limite dans les moûts de brasserie conduisant à une fermentabilité élevée serait due à la disponibilité de plus de substrat issu de l'action

débranchante de celle-ci, pour l'activité subséquente de la β -amylase (Evans *et al.*, 2010), en plus de de l'habilité de la dextrinase limite à produire lentement les sucres fermentescibles (Enevoldsen & Schmidt, 1974; Sissons, 1991). Par ailleurs, la diminution des molécules polysaccharidiques est désirable pour la production de bières à faible pouvoir calorique ou bières légères (Pratt *et al.*, 1981; Sissons, 1991; Evans *et al.*, 2010). Le rôle de la dextrinase limite dans la diminution du taux de dextrines non fermentescibles est particulièrement important dans la production de ce type de bière, soit par ajout de dextrinase limite purifiée (ou partiellement purifiée), soit par ajout de malt riche en dextrinase limite (Pratt *et al.*, 1981; Sissons, 1991).

VII- LES PLANS D'EXPERIENCE

Un plan d'expérience c'est le plan d'organisation des essais expérimentaux dans le but de connaître le comportement du résultat (réponse) à partir de la variation des facteurs choisis (Sabre, 2007). La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (Karam, 2004). Par ailleurs, les plans d'expérience ont l'avantage de permettre des expérimentations contenant un minimum d'expériences permettant de fixer les meilleures conditions expérimentales en vue de l'objectif à atteindre. Ils donnent la possibilité d'étudier un très grand nombre de facteurs. Aussi, des interactions éventuelles entre facteurs peuvent être détectées et la modélisation des résultats est très aisée (Karam, 2004).

VII.1- Outils et quelques notions préliminaires

Facteur : les facteurs sont les grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses (Vivier, 2002).

Les facteurs sont caractérisés par les valeurs suivantes:

- Borne inférieure: limite basse (ou niveau bas) des valeurs que le facteur peut prendre;
- Borne supérieure: limite haute (ou niveau haut) des valeurs que le facteur peut prendre (Vivier, 2002).

Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable.

- Les facteurs contrôlés sont effectivement étudiés au cours d'une expérience.
- Les facteurs non contrôlés sont les facteurs difficilement maîtrisables et sont la source de variations résiduelles, car fréquemment considérés comme aléatoires.

Un facteur qualitatif prend ou on lui attribue des modalités qui sont soit non numériques (couleurs, descriptions, ...), soit numériques et discrètes (appréciations, dosage d'une poudre,...); un facteur quantitatif prend des valeurs continues ou discrètes appelées niveaux (Karam, 2004).

Niveaux : valeurs possibles que l'on attribue à un facteur.

Effet moyen d'un facteur: variation de la réponse observée ou modélisée lorsque le facteur change de modalité (Karam, 2004).

Réponse : une réponse expérimentale ou variable dépendante, est une manifestation mesurable que l'on observe lorsqu'on fait varier les facteurs étudiés ; c'est la grandeur mesurée lors de l'expérimentation.

Erreur : variation non expliquée d'un ensemble d'observations.

Interaction : lorsque l'effet d'un facteur dépend de la valeur prise par un autre facteur cela se traduit par une interaction entre les deux facteurs. On appelle interaction d'ordre m une interaction entre m facteurs.

Plan d'expérimentation : c'est est la traduction d'un plan d'expériences exprimé en fonction des facteurs (ou éventuellement des variables naturelles avant transformation) (Goupy & Creighton, 2006; Dagnelie, 2008).

Domaine d'étude : l'ensemble de tous les points de la surface de réponses délimitée par les niveaux bas et haut de chaque facteur.

Surfaces de réponses : à chaque point du domaine d'étude, correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude, correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée surface de réponses (Goupy & Creighton, 2006).

Courbes iso-réponses: elles constituent une projection de la surface de réponses dans le plan horizontal (Karam, 2004).

Variables codées ou variables centrées réduites: l'utilisation des variables centrées réduites présente l'intérêt de pouvoir généraliser la théorie des plans d'expériences quels que soient les facteurs ou les domaines d'études retenus. Remplacer les variables naturelles par les variables codées va permettre d'avoir pour chaque facteur le même domaine de variation (entre -1 et +1) et de pouvoir ainsi comparer entre eux l'effet des facteurs (Goupy & Creighton, 2006; Kimouche, 2008).

Dans cette thèse, deux types de plans seront abordés : les plans de criblage et les plans d'optimisation.

- Les plans de criblage permettent de déterminer le poids des facteurs sur les réponses d'un système à partir d'un modèle; notamment les plans factoriels fractionnaires, les plans de Taguchi, les plans de Plackett-Burman (Karam, 2004).
- Les plans d'optimisation ou plans à surface de réponses permettent à partir d'un modèle mathématique polynomial, de déterminer les valeurs des facteurs influents

correspondant à une réponse particulière du système; notamment les plans composites centrés, les plans de Doehlert, les plans de Box-Behnken (Karam, 2004).

VII.2- Les plans de criblage

Il s'agit d'un procédé de sélection ou de criblage (acceptation du mot anglo-saxon *screening*) (Vivier, 2002). La technique du screening permet de déterminer, parmi un ensemble initial de facteurs, ceux influents. Cette sélection est basée sur des considérations mathématiques qui sont mises en application grâce au calcul de Box. Il est aussi possible d'utiliser les logiciels de plans d'expériences qui mettent en œuvre ces principes mathématiques. On emploie des modèles mathématiques ne comportant que les facteurs principaux au premier degré ou des modèles avec des interactions d'ordre 2 suivant les objectifs de l'étude (Vivier, 2002; Goupy & Creighton, 2006). De manière équivalente, un facteur est jugé influent (ou déterminant) si son action sur la réponse étudiée est statistiquement supérieure à un certain niveau, fixé par l'expérimentateur. Il s'agit en fait de l'analyse de la variance, présentée plus précisément au paragraphe VII.4. De façon plus large, cette analyse permet de classer les facteurs entre eux, relativement à leur influence propre. La technique du screening donne ainsi la possibilité de ne retenir que les grandeurs dignes d'intérêt (Vivier, 2002).

De par le principe même du screening, l'expérimentateur a tout intérêt à tester l'influence d'un grand nombre de facteurs, même s'il présuppose la présence de grandeurs non influentes. On citera ainsi comme plan de criblage: les plans factoriels fractionnaires, les plans de Taguchi et les plans de Plackett-Burman

VII.2.1- Les plans factoriels fractionnaires à deux niveaux 2^{m-s}

Un plan fractionnaire 2^{m-s} est un plan factoriel permettant d'étudier m facteurs prenant chacun deux niveaux mais avec un nombre d'essais s fois moins que le plan factoriel complet correspondant (Kimouche, 2008). Les plans factoriels fractionnaires ont la propriété de l'orthogonalité (Goupy & Creighton, 2006). Un plan fractionnaire orthogonal est une fraction

judicieusement choisie du plan factoriel complet qui permet de tester un grand nombre de facteurs avec un minimum d'expériences et d'en déduire l'effet moyen de chaque facteur avec une assez bonne précision (Karam, 2004).

L'orthogonalité implique que:

- Les coefficients du modèle associé sont totalement décorrélés entre eux ;
- Les coefficients estimés ont la meilleure précision possible (Vivier, 2002).

Les expériences factorielles fractionnaires peuvent être utilement caractérisées par leur niveau de résolution, qui est déterminé en fonction du mode de construction adopté, et qui permet de savoir quels sont les éléments qui peuvent être estimés. En pratique, les niveaux de résolution les plus importants sont les niveaux III, IV et V (Dagnelie, 2012).

Les expériences de résolution III permettent d'estimer tous les effets principaux, moyennant l'hypothèse que toutes les interactions sont nulles.

Les expériences de résolution IV permettent d'estimer tous les effets principaux, moyennant l'hypothèse que toutes les interactions de trois facteurs ou plus sont nulles.

Enfin, les expériences de résolution V permettent d'estimer tous les effets principaux et toutes les interactions de deux facteurs, moyennant l'hypothèse que toutes les interactions de trois facteurs ou plus sont nulles.

Plus élevée est la résolution d'un plan, plus fine est l'information obtenue, mais aussi, plus grand est le nombre d'essais. L'utilisateur doit faire inévitablement un compromis entre l'information désirée et le coût de l'étude (Kimouche, 2008).

Un plan de résolution III peut apporter rapidement et à moindre frais une première réponse qui permet de sélectionner des facteurs pertinents pour la suite d'une étude (Kimouche, 2008).

Ces plans sont faciles à construire; Comme chaque facteur ne prend que deux niveaux, les essais sont faciles à contrôler et les risques d'erreur sont minimisés; La modélisation mathématique est immédiate; Leur simplicité d'exploitation assure un bon "rendement" par rapport aux résultats obtenus; ces résultats obtenus avec un premier plan peuvent être utilisés en partie ou en totalité soit pour explorer une autre zone du domaine expérimental, soit pour établir un modèle mathématique de degré plus élevé (Box *et al.*, 2005; Kimouche, 2008).

En plus, ils sont beaucoup plus économiques que les plans factoriels complets en nombre d'essais et plus rapides. Il faut encore ajouter un avantage considérable, celui de pouvoir mener les expériences séquentiellement. Cette possibilité permet à l'expérimentateur de réaliser le nombre juste suffisant d'essais pour aboutir à la résolution de son problème. Il faut noter toutefois que ces plans présentent l'inconvénient de ne fournir aucune information quant aux interactions qui peuvent exister entre les facteurs (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008).

VII.2.2- Les plans de Plackett-Burman

Plackett et Burman ont simplifié et systématisé leur construction. Aucune interaction entre facteurs principaux n'est considérée. On peut ainsi les voir comme des plans factoriels fractionnaires de résolution III (Vivier, 2002; Goupy & Creighton, 2006; Kimouche, 2008).

Ces plans sont particulièrement économiques pour détecter les effets principaux ; Si le nombre d'essais est une puissance de 2, le plan est équivalent à un plan factoriel fractionnaire où le nombre de facteurs m est égal au nombre d'expériences moins un (8 essais pour 7 facteurs par exemple) ; Ils sont orthogonaux, permettant ainsi d'estimer les paramètres du modèle avec une précision optimale (Kimouche, 2008). Comme inconvénients, ces plans n'utilisent que 2 niveaux et ne peuvent donc étudier les effets non linéaires ; le nombre d'essais n doit être un multiple de 4 (Kimouche, 2008).

VII.2.3- Les plans de Taguchi

Les plans de Taguchi se situent en marge des schémas factoriels fractionnaires classiques, dont ils sont largement inspirés. Ces plans ont été conçus et appliqués essentiellement en relation avec les problèmes de contrôle ou de maîtrise de la qualité, et sont entourés de diverses considérations qui conduisent à parler souvent d'une approche ou d'une méthode de Taguchi, plutôt que des plans de Taguchi (Dagnelie, 2012).

La méthode de Taguchi vise à combiner un ensemble de techniques pour obtenir des améliorations rapides de la qualité et des coûts de production. Elle a cet inconvénient d'être jugée peu efficace par la plus part des statisticiens intéressés (Kimouche, 2008; Dagnelie, 2012).

La technique du screening constitue donc une étape importante avant toute analyse plus fine ultérieure, pouvant être notamment assurée par la méthodologie des surfaces de réponses.

VII.3- Plans pour surface de réponses

La méthodologie des surfaces de réponses (MSR) constitue le second volet de la méthode des plans d'expériences. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis -à- vis des facteurs d'influence significative. Elle vient ainsi s'appliquer à la suite de l'étude de screening, puisque logiquement, elle n'utilise que les facteurs précédemment jugés influents (Vivier, 2002). Les modélisations de la fonction réponse peuvent également servir de base à la recherche de conditions expérimentales correspondant à un extremum de la réponse étudiée (Vivier, 2002).

- **Plans d'expériences associés aux surfaces de réponses d'ordre 2**

Les plans précédemment présentés n'avaient que deux niveaux d'étude par facteur et les modèles mathématiques utilisés étaient du premier ordre (avec ou sans interactions) par rapport à chaque facteur. Ces plans sont les plus employés car ils permettent le criblage des facteurs et conduisent parfois à des modélisations simples mais suffisantes. Mais, de nombreux

phénomènes présentent une surface de réponses traduisant une courbure. Il est donc utile de procéder à des méthodes de plans permettant d'étudier et de représenter des phénomènes dont les surfaces de réponses sont du second degré (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008). Il sera présenté ici les trois plus importants plans de ce type: les plans composites, les plans de Box-Behnken et les plans de Doehlert.

VII.3.1- Les plans composites

On appelle plan composite le plan constitué d'un plan factoriel 2^m (m étant le nombre de facteurs) et du plan en étoile associé (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

Le plan composite se prête bien au déroulement séquentiel d'une étude, la première séquence étant la réalisation d'un plan factoriel 2^m (ou fractionnaire 2^{m-s}). Si la validité du modèle du 1^{er} ordre n'est pas retenue, c'est-à-dire, la réponse mesurée statistiquement est différente de celle calculée au même point et s'il semble que le centre de l'expérience soit proche de l'optimum, on ajoutera d'autres essais pour établir un modèle du 2^{ème} ordre. Les nouvelles combinaisons des traitements sont représentées par les points d'expériences à une distance α du centre du domaine expérimental et appartiennent aux axes du plan factoriel, dits points en étoile, et par n_0 répétitions au centre du domaine conduisant à n essais égale à la somme: des essais du plan factoriel (ou fractionnaire), notés n_f ; des essais du plan en étoile, notés n_α ; des essais au centre, notés n_0 (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008). Le modèle mathématique est un polynôme du second ordre.

Le plus souvent, le point central $(0, 0, \dots, 0)$ est répété un certain nombre de fois, dans le but notamment de disposer d'une estimation de la variation résiduelle, alors que les autres points expérimentaux ne sont pas l'objet de répétitions. En outre, pour des nombres importants de facteurs, on peut envisager de remplacer la partie factorielle complète des plans composites par des ensembles factoriels fractionnaires. La distance α doit éventuellement être adaptée en conséquence, en vue de maintenir la propriété d'isovariance et/ou d'orthogonalité (Dagnelie,

2012). Sachant que l'orthogonalité garantit une meilleure précision possible sur les coefficients du modèle, et l'isovariance par rotation conduit à des erreurs de prévision identiques à une même distance du centre du domaine.

L'intérêt des plans composites réside dans le fait qu'ils sont faciles à construire en ajoutant des points à un plan factoriel complet (ou fractionnaire). Il suffit alors de réaliser seulement quelques expériences supplémentaires pour pouvoir estimer la surface de réponses du critère étudié. Ils sont cependant moins économiques en nombre d'essais par rapports à d'autres types de plans, mais ce nombre reste raisonnable lorsque le nombre de facteurs étudiés reste faible (entre 2 et 4 facteurs). Mais il faut noter qu'ils présentent cependant l'inconvénient de toujours exiger cinq niveaux différents pour chacun des facteurs ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$), ce qui peut parfois constituer un sérieux handicap (Kimouche, 2008; Dagnelie, 2012).

VII.3.2- Les plans de Doehlert

Un plan de Doehlert est un plan formé de n_0 essais au centre du domaine et de $m^2 + 2m$ (m étant le nombre de facteurs) essais répartis "le plus uniformément possible" sur une sphère de rayon 1 (en grandeurs centrées réduites) (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008). Les caractéristiques principales des plans de Doehlert sont : Les points expérimentaux sont répartis uniformément dans l'espace des facteurs normés; Ils sont extensibles dans n'importe quelle direction; Le nombre de points distincts n d'un plan de Doehlert est $n = m^2 + m + 1$.

Le modèle que l'on retient pour interpréter les résultats et construire la surface de réponse est un polynôme du second degré analogue à celui du plan composite (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008).

Les plans de Doehlert sont de qualité suffisante car ils sont économiques en nombre d'essais; Ils existent pour un nombre quelconque de facteurs et possèdent la facilité de la recherche d'un

optimum ou d'une valeur cible ; Leur seul inconvénient est que toutes les expériences sont regroupées en un seul bloc (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008).

VII.3.3- Les plans de Box-Behnken

Les plans de Box-Behnken sont une fraction d'un plan factoriel complet 3^m qui permettent d'estimer un modèle du second ordre (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008).

Les plans de Box-Behnken possèdent les propriétés suivantes : Ils nécessitent 3 niveaux pour chacun des facteurs; $-b$, 0 et $+b$ pour assurer la condition d'orthogonalité; Ils possèdent la propriété de séquentialité; Les erreurs de prédiction sur les réponses calculées sont plus faibles que les erreurs expérimentales (Goupy & Creighton, 2006, 2013; Kimouche, 2008). Les plans de Box-Behnken répondent au critère d'isovariance par rotation. Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

VII.4- Notions de statistiques appliquées aux plans d'expériences

Un outil d'analyse statistique est l'analyse des variances, qui occupe une place centrale dans l'interprétation des résultats d'expériences (Dagnelie, 2000, 2012).

VII.4.1.- L'analyse de la variance

L'analyse de la variance est appelée « *Analysis of Variance* » dans la littérature anglo-saxonne; son appellation est couramment abrégée en *ANOVA* (Vivier, 2002). Elle évalue la probabilité que les variances des termes à évaluer soient significativement différentes de la variance résiduelle. Ces résultats permettent de déterminer les facteurs et les interactions significatifs (qui ont une influence sur la réponse), ie ceux dont les probabilités sont inférieures à un niveau fixé arbitrairement. Selon ce niveau de signification, ces termes peuvent être rejetés, c'est-à-dire supprimés de l'étude (Dagnelie, 2000, 2012; Vivier, 2002; Kimouche, 2008).

Dans l'optique de l'étude des facteurs et de leurs interactions par l'analyse de la variance, on peut essayer de chiffrer à titre indicatif l'ampleur du problème, en considérant les précisions obtenues dans les estimations de variances, d'écart-types et de moyennes.

VII.4.1.1- La moyenne

Par définition, la moyenne arithmétique d'un ensemble de valeurs est la somme de toutes les valeurs divisées par le nombre de valeurs.

VII.4.1.2- L'écart-type

La définition de l'écart-type est un peu moins simple que celle de la moyenne.

Son calcul s'effectue ainsi qu'il suit : On commence par calculer les écarts à la moyenne, c'est-à-dire la différence entre chaque valeur et la moyenne; notons que la somme de ces écarts à la moyenne est égale à zéro. On démontre d'ailleurs que c'est toujours le cas. On ne peut donc pas prendre la somme des écarts comme mesure de la dispersion. C'est pourquoi on fait disparaître le signe négatif en prenant les carrés des écarts; Ces écarts à la moyenne sont donc élevés au carré et additionnés. On obtient ainsi la somme des carrés des écarts à la moyenne; Cette somme est divisée par le nombre de valeurs moins 1 : Cette quantité porte le nom de variance; Enfin, l'écart-type est obtenu en prenant la racine carrée de la variance (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

VII.4.1.3- Le degré de liberté

La somme des écarts (n) étant toujours égale à 0, le $n - 1$ ème écart s'obtient donc facilement, les autres étant connues. Il n'y a donc que $n - 1$ écarts indépendants. On dit que la série des n écarts à la moyenne possède $n - 1$ degrés de liberté (ou ddl) (Box *et al.*, 2005; Goupy & Creighton, 2006).

VII.4.2- Principes de l'analyse de la variance

L'analyse de la variance consiste à rechercher les sources de variation des réponses. On suppose que les réponses ont été calculées avec le modèle postulé $y_i = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) + e_i$, en utilisant la méthode des moindres carrés c'est-à-dire en minimisant la somme des carrés des écarts. Dans ce cas, les réponses calculées s'écrivent \hat{y}_i et les écarts e prennent des valeurs particulières r_i qui s'appellent les résidus. Les résidus sont donc des valeurs particulières des écarts. On a :

$$\hat{y} = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (1.1)$$

Avec ces nouvelles notations, la relation donnant la réponse peut s'écrire :

$$y_i = \bar{y}_i + r_i \quad (1.2)$$

L'analyse classique de la variance fait intervenir non pas les réponses mais la différence entre les réponses et leur moyenne ($y_i - \bar{y}$) ou $(\hat{y} - \bar{y})$. Cette différence est désignée soit par écarts à la moyenne, soit par réponse corrigée de la moyenne. Dans le cas des réponses calculées, on parle aussi de modèle corrigé de la moyenne.

Dans le cadre de la méthode des moindres carrés, la moyenne des réponses mesurées est égale à la moyenne des réponses calculées avec le modèle postulé. On a donc, y étant la moyenne des réponses :

$$y_i - \bar{y} = \hat{y}_i + r_i \quad (1.3)$$

Lorsqu'on élève les deux membres de cette relation au carré, on obtient :

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum r_i^2 \quad (1.4)$$

C'est la relation de base de l'analyse de la variance. Le membre de gauche est la somme des carrés des écarts à la moyenne des réponses mesurées. Cette somme se décompose en deux

éléments : la somme des carrés des écarts à la moyenne des réponses calculées avec le modèle et la somme des carrés des résidus.

La variance des facteurs s'obtient donc en calculant la somme des carrés des écarts que l'on divise par le nombre de degré de liberté (ddl) associés au facteur f considéré.

VII.4.2.1- Test de Fisher-Snedecor

Le test de Fisher-Snedecor permet de comparer 2 variances, par l'utilisation de la loi statistique de Fisher (loi F). Celle-ci travaille sur le quotient de variance et prend en compte le nombre de degrés de liberté de chacune d'elles. Le test de Fisher-Snedecor (F) va dire si l'équation établit bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse. Pour qu'il existe le moins de résidus (écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées) possible, il faut que ce rapport soit le plus grand possible (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

Le résumé des calculs réalisés est présenté dans un tableau d'analyse de variance. Les résultats de la table d'analyse de variance permettent donc de déterminer la significativité des facteurs et des interactions.

VII.4.2.2- Facteurs et interactions influents

Pour évaluer l'importance d'un coefficient, la théorie des statistiques compare ce coefficient (a) à son écart-type (σ_a) en faisant le rapport a/σ_a . Ce rapport est appelé le t de Student. À partir du t de Student, on peut évaluer la probabilité que le coefficient soit nul ou, autrement dit, sans importance ou peu significatif. Cette probabilité est la *p-value*. La *p-value* est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

Si la *p-value* est proche de 0 (probabilité nulle), le coefficient est influent car il n'est pas nul. Si la *p-value* est proche de 1, le coefficient est proche de 0 et donc négligeable. Si la *p-value*

possède une valeur intermédiaire, le coefficient est peut-être légèrement significatif ou non significatif (Goupy & Creighton, 2006, 2013).

VII.4.3- Le coefficient de détermination R^2

L'analyse de la variance permet de calculer une statistique très utile : le R^2 ou R carré. Cette statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne). Si le modèle permet de retrouver exactement la valeur des réponses mesurées, la somme des carrés des réponses calculées est égale à la somme des carrés des réponses mesurées. Le R^2 est égal à 1. Si le modèle fournit des réponses calculées égales à la moyenne, la somme des carrés des réponses calculées est égale à 0. Le R^2 est égal à 0. On dit que le modèle n'a pas de puissance d'explication. Le R^2 est donc une mesure de la qualité (validité) du modèle (Vivier, 2002).

Quelles que soient les dénominations utilisées pour ces grandeurs, elles impliquent de longs calculs. Heureusement, les ordinateurs réalisent tous ces calculs et fournissent directement les résultats de l'analyse de la variance sous la forme d'un tableau. Le seul élément choisi par l'expérimentateur est le modèle a priori qui sert à obtenir les réponses calculées. Les résultats de l'analyse de la variance seront dépendants du choix du modèle. Les logiciels, et même les tableurs, ont des programmes qui construisent les tableaux d'analyse de la variance (Vivier, 2002).

CHAPITRE 2: OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN ENZYMES AMYLOLYTIQUES AU MALTAGE DU SORGHO: CAS SPECIFIQUE DE LA DEXTRINASE LIMITE

RESUME

Le cultivar *Safrari* de sorgho a été étudié comme source potentielle en enzymes amylolytiques, dont la dextrinase limite en particulier. De ce fait, la méthodologie des plans d'expériences a été utilisée comme outil pour le criblage des facteurs ayant une influence significative sur la synthèse des enzymes amylolytiques pendant le maltage d'une part, avant de procéder à l'optimisation en vue d'une synthèse maximale de dextrinase limite d'autre part. Onze facteurs ont été recensés dans la bibliographie et un plan de criblage factoriel fractionnaire 2^{11-7} a permis de ressortir cinq facteurs influents sur la teneur en enzymes amylolytiques totales, au niveau de confiance de 95 %. Ces facteurs ont été: la désinfection des grains ($P = 0,001$) d'une part, dont l'influence contribuait à la diminution de l'activité enzymatique et d'autre part, les facteurs changement de la solution de trempage ($P = 0,015$), temps de germination ($P = 0,001$), temps de séchage ($P = 0,04$) et température de séchage ($P = 0,04$), dont les influences contribuaient à l'augmentation de l'activité enzymatique. Ensuite, l'optimisation du maltage, où la réponse suivie était cette fois-ci l'activité de la dextrinase limite, a été faite en variant le temps de germination (1 – 6 jours) dans les conditions suivantes : trempage du sorgho en milieu alcalin à 25 °C/24 h avec changement d'eau après 12 h suivi de la germination à 25 °C, sans séchage ni désinfection des grains. Le maximum d'activité en dextrinase limite a été obtenu à 5 jours de germination.

Mots clés: Sorgho; Maltage; Enzymes amylolytiques; Criblage; Dextrinase limite; Optimisation.

INTRODUCTION

La dextrinase limite est une enzyme amylolytique synthétisée dans la plupart des céréales pendant le maltage. Cette opération consiste au trempage, à la germination et au touraillage des grains de céréales dans des conditions d'air, de température et d'humidité contrôlées (Briggs, 1998; Gibson, 2001; Briggs *et al.*, 2004); contrôle qui implique la prise en considération des facteurs qui permettront l'obtention d'un malt de qualité désiré. Ceux-ci varient en fonction de la céréale utilisée et, pour une même céréale, en fonction de la variété (Aniche & Palmer, 1990; Antinori, 1995; Briggs, 1998; Wang *et al.*, 2006; Okoli *et al.*, 2010). Toutefois, ces facteurs seraient connus. Et, ceux pouvant avoir un impact sur la synthèse des enzymes amylolytiques pendant le maltage du sorgho sont : (a) pendant le trempage, les facteurs temps, température, aération et nature de la solution de trempage; (b) pour la germination et le touraillage (séchage), les facteurs temps et température (Ezeogu & Okolo, 1994, 1995; Okolo & Ezeogu, 1996b; Dewar *et al.*, 1997b; Agu & Palmer, 1997b; Igyor *et al.*, 1998; Owuama, 1999; Nso *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2006; Claver *et al.*, 2010; Ijasan *et al.*, 2011). Aussi, les grains peuvent être désinfectés pendant le procédé d'une part (Ezeogu & Okolo, 1994; Beta *et al.*, 1995; Ogbonna, 2011) et d'autre part, les grains germés sont dans certains cas moulus avec les radicules avant utilisation (Morrall *et al.*, 1986). Bien que la liste des facteurs ne soit pas exhaustive, elle représente ceux majeurs. La prise en compte de tous ces facteurs en faveur de la synthèse de la dextrinase limite au cours du procédé de maltage impliquerait entre autres de passer par un plan d'expérience dans le but de cerner l'impact de chacun d'eux avec un minimum d'essais expérimentaux. La finalité étant de retenir ceux dont l'influence serait statistiquement significative en vue de l'optimisation. Toutefois, à la limite de nos connaissances, il n'existe pas de travaux dans ce sens. L'objectif principal de ce chapitre est donc d'optimiser le maltage du cultivar *Safrari* de sorgho pour la synthèse de la dextrinase limite. Spécifiquement, il s'agira

de : Déterminer les facteurs qui influenceraient la synthèse des enzymes amylolytiques pendant le maltage; Optimiser la synthèse de la dextrinase limite pendant le maltage.

L'hypothèse qui sous-tend ces objectifs est la suivante : les conditions de trempage, de germination et de touraillage ont une influence significative sur la synthèse optimale de la dextrinase limite du cultivar *Safrari* de sorgho.

I- MATERIEL ET METHODES

I.1- Matériel

I.1.1- Le sorgho

Le sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench) a été obtenu à l'Institut de Recherche Agronomique pour le Développement (IRAD) de Maroua/Cameroun. Les caractéristiques botaniques et physiques sont présentées dans le tableau 2.1; l'aspect est visible à la photo 2.1.

Tableau 2. 1: Caractéristiques botaniques et physiques du sorgho *Safrari*

Genre	Sorgho
Variété	Bicolor
Race	Durra
Ordre	Poales
Famille	Gramineae
Espèce	<i>Sorghum bicolor</i>
Tribu	Andropogoneae
Classe	Monocotylédone
Cultivar	<i>Safrari</i>
Couleur	Jaune
Pédoncule	Crossé



Photo 2. 1 : Grains de sorgho *Safrari*

I.1.2- Produits chimiques

Ici sont listés les produits chimiques employés dans cette partie de travail avec leur spécification. Ainsi, nous avons :

- De l'eau oxygénée (H_2O_2) (pureté 30 %) (CAS 7722-84-1 – Calbiochem ; Sigma Aldrich, Allemagne), a été utilisée pour la détermination de la capacité germinative du sorgho;
- La soude (NaOH) en paillette (PM = 40,00 g/mol ; pureté $\geq 98\%$; CAS. 1310 – 73 – 2 ; Lot # 5ZBB2360V ; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), a intervenu dans le trempage du sorgho non malté en milieu alcalin ainsi que la préparation du réactif au DNS;

- L'hypochlorite de sodium (NaOCl) (La Croix, 8°chl eq. Fait par Colgate-Palmolive Company, USA) a servi à la désinfection des grains de sorgho avant maltage ;
- L'acide acétique (CH_3COOH) (PM = 60,05 g/mol; pureté = 96 % ; densité = 1,06 kg/L; (Riedel-de Haën, AG D-3016 Seelze 1)) et l'acétate de sodium (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$) (PM = 136,08 g/mol ; NORMAPUR, France), ont servi à la préparation des solutions tampon d'extraction et de détermination de l'activité enzymatique ;
- Le chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (PM = 147,02 g/mol ; pureté = 99 % . Riedel-de-Häen AG), a été utilisé comme additif d'extraction enzymatique pendant l'opération de criblage ;
- L'amidon pure (S9765-100G ; CAS. 9005-84-9 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; Lot # 010M0027V; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), a été utilise comme substrat pour la determination de l'activité amylolytique totale ;
- L'iode (I_2) (Thermo Fisher Scientific, Inc. Geel – Belgique) et l'iodure de potassium (KI) (PM = 166,00 g/mol; pureté = 99,5 %; produit N°: 06624; batch N° 30920, BURGOYNE Reagents, Inde), ont servi à la préparation de la solution iodée rentrant dans la détermination de l'activité amylolytique totale ;
- Le pullulan (P4516-1G de *Aureobasidium pullulans*; Lot #SLBH6388V; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), est le substrat utilisé pour la determination de l'activité en dextrinase limite lors de l'optimisation du maltage;
- Le tartrate double de sodium et de potassium 4-hydrate ($\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (PM = 282,23 g/mol ; pureté = 99 % . BURGOYNE Reagents, Inde), et l'acide 3,5-Dinitrosalicylique ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) (PM = 282,12 g/mol ; pureté = 98 % ; PANREAC QUIMICA SA, Espagne), ont été utilisés pour la prépartition de la solution au DNS intervenant dans le dosage des sucres réducteurs ;

- Le maltose monohydrate ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) (PM = 360,31 g/mol; extra pure. AVIS CHEMICAL; A.B.N.23O710Mfg.Dt; Australie), a été utilisé comme standard pour l'établissement de la gamme étalon pour le dosage des sucres réducteurs ;
- Le formaldéhyde (réactif RECTAPUR de PROLABO (12, rue Pelée 75011 ; Paris), l'acétyl acétone (réactif Sharlab S.L (Gato Perez, 33-P. I. Mas d'En Cisa. 08181 Sentmenat Espagne), l'acide sulfurique (Fisher Scientific (Fair Lawn, New Jersey 07410), le catalyseur Kjeldahl (Riedel-de Haën, AG D-3016 Seelze 1) et le sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) (PM = 132,14; AR, Chine) ont été utilisés pour le dosage des protéines totales brutes.

I.1.3- Equipements

Les équipements ci-après ont été employés :

- Un broyeur manuel (Manual Victoria Grain Mil, Ref. 530025 ; fait par Mecanicos Unido S.A.S, Colombie), utilisé pour le broyage du malt vert ;
- Un broyeur électrique (Culatti typ MFC (Nr 7131757), a servi au broyage du malt touraillé ;
- Une étuve de marque Heraeus (Heraeus-kendro laboratory products, Model: D-63450 type: T6, fabrication n° 20001046, Allemagne), une étuve de marque Memmert (Allemagne), et un incubateur (SHP biochemical incubator), ont été utilisés comme enceintes thermostatées pour les opérations de maltage ;
- Une étuve à séchage convectif de marque Memmert (Allemagne), employée pour le séchage et le touraillage ;
- Un bain-marie de marque Memmert (type F-Nr 760, Allemagne) et un bain-marie de marque HH-S (Digital thermostatic XMTD – 204, Chine), utilisés au besoin lors de l'extraction et pour le test d'activité enzymatique ;
- Un dessiccateur, employé pour refroidir les échantillons sortant du séchoir ou de l'étuve;

- Une balance électronique (Denver instrument, Model: APX-3202, max 3200, d=0,01g)) et une balance électronique (Scientech, model N°. ZSP 250, max 250, d=0,001g), utilisées au besoin pour les différentes pesées ;
- Du papier filtre Whatman No. 1 (Ø 90 mm) de Whatman, GE Healthcare UK Ltd., UK, employé lors du test d'énergie germinative;
- Un pH-mètre: Model: Consort C863, type: multi parameter analyser; Belgique, utilisé pour l'ajustement du pH des solutions tampons ;
- Une centrifugeuse de marque Heraeus (Biofuge Primo R, Heraeus, D-375200, Allemagne), utilisée pour les séparations après extraction enzymatique ;
- Une rampe de minéralisation, ayant servi à la minéralisation des échantillons de sorgho non malté afin de déterminer la teneur en azote total ;
- Une plaque chauffante (model N° HB502, fait par Bibby Sterilin LTD, UK), utilisée pour des chauffages au besoin ;
- Un spectrophotomètre de marque Jenway (model 7310, UK), utilisé pour les dosages colorimétriques ;
- Un frigo de marque BCD-171, a servi à la conservation des échantillons et réactifs.

I.1.4- Logiciels

Le logiciel Statgraphics version XV.II (StatPoint, Inc., 2325 Dulles Corner Boulevard, Suite 500, Herndon, Virginia 20171, USA), a été utilisé pour la planification expérimentale, tandis que le logiciel Sigmaplot version 12.5 (Systat Software, Inc., 501 Canal Blvd, Suite E, Point Richmond, CA 94804–2028, USA) et le tableur Excel ont servi aux tracés des courbes.

I.2- Méthodes

I.2.1- Méthodologie générale

Un test de criblage a été mené au préalable dans le but de retenir parmi une panoplie de facteurs recensés dans la bibliographie, ceux qui présenteraient une influence significative sur

la synthèse en enzymes amylolytiques totales. Une fois le criblage mené, s'en est suivi l'optimisation du maltage en faveur de la synthèse de la dextrinase limite. L'estimation de la synthèse enzymatique a été réalisée au travers des tests d'activité après extraction dans des conditions bien définies. L'analyse des résultats a été faite par des méthodes statistiques.

Il faut noter que dans la pratique, des tests préliminaires de caractérisation des grains de céréales sont conduits afin d'estimer les conditions de conservation (test de teneur en eau) et leur aptitude à une bonne germination (tests d'énergie germinative, de capacité germinative et de sensibilité à l'eau), ainsi que la teneur en protéines.

I.2.2- Tests de caractérisation du sorgho non malté

I.2.2.1- Teneur en eau des grains

Principe : il est basé sur la différence de masse de l'échantillon avant et après séchage. La méthode ISO décrite par EBC-Analysis-Committee (1998) a été utilisée à cet effet.

Procédure : vingt grammes (20 g) de grains de sorgho ont été broyés à l'aide du broyeur manuel (Victoria, Colombie). Puis, 5 g de la farine obtenue ont été prélevés et introduits dans une nacelle et placée à l'étuve (Memmert, Allemagne) à 105°C pendant 24 h. A la sortie de l'étuve, la farine a été placée dans un dessiccateur pendant trente minutes environ pour la laisser refroidir. La différence de masse de la farine avant et après étuvage est considérée comme la masse d'eau que contenaient les grains. Les mesures ont été faites en triplicat.

Expression des résultats : la teneur en eau des grains est calculée de la perte de masse de la farine durant l'étuvage à partir de la relation :

$$H = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Où : H : teneur en eau exprimée en pourcentage masse/masse (% m/m);

m₀ : masse de la farine de sorgho avant étuvage en g ;

m_1 : masse de la farine de sorgho après étuvage en g.

I.2.2.2- Capacité germinative

La capacité germinative permet de déterminer le pourcentage de grains viables dans un échantillon de sorgho. Le test de croissance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) décrit par EBC-Analysis-Committee (1998) a été utilisé.

Principe : les grains sont trempés dans une solution d'eau oxygénée (H_2O_2) et celles n'ayant pas développées des racelles après trois jours sont comptées.

Procédure : trois lots de 200 grains de sorgho sont constitués et immergés chacun dans 200 mL d'eau oxygénée à 7,5 g/L à température ambiante (≈ 25 °C) pendant 48 h. Après ce temps, la solution d'eau oxygénée de trempage est remplacée par une solution fraîche pour 24 h supplémentaires au bout desquelles la solution est versée. Le nombre de grains n'ayant pas germé est compté.

Expression des résultats : la capacité germinative est calculée en utilisant la formule :

$$CG = \frac{200 - n}{2} \quad (2.2)$$

Où CG = capacité germinative ; n = nombre de grains n'ayant pas germé.

Les résultats sont exprimés en pourcentage du plus proche nombre entier.

I.2.2.3- Energie germinative

L'énergie germinative permet la détermination du pourcentage de grains qui seraient capable de germer totalement si l'échantillon est malté normalement. La méthode BRF de EBC-Analysis-Committee (1998) a été utilisée.

Principe : il est basé sur l'aptitude des grains à germer en présence d'une quantité donnée d'eau et à l'obscurité.

Procédure : deux lots de 100 grains de sorgho sont constitués et introduits chacun dans une boîte de pétri dont le fond a été préalablement tapissé d'une couche de papier filtre (Whatman No. 1 ; Ø 90 mm). Les grains sont humidifiés avec 4 mL d'eau distillée pour le premier lot, et avec 8 mL d'eau distillée pour le second lot. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité à température ambiante ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) et les grains ayant germés toutes les 24 h sont comptés pendant trois jours. Le compte cumulatif après 72 h correspond à l'énergie germinative. Les tests ont été faits en triplicat.

La sensibilité à l'eau est déterminée par la différence entre l'énergie germinative à 4 mL et l'énergie germinative à 8 mL.

Expression des résultats :

$$SE = EG(4mL) - EG(8mL) \quad (2.3)$$

Avec : EG = énergie germinative ; SE = sensibilité à l'eau.

Les résultats sont exprimés en pourcentage du plus proche nombre entier.

I.2.2.4- Détermination des teneurs en azote total et protéines brutes

L'azote total est déterminé après minéralisation des échantillons selon la méthode de Kjeldahl (AFNOR, 1984), et dosage selon la technique colorimétrique de Devani *et al.* (1989).

Principe : la minéralisation selon Kjeldahl consiste à détruire toute la substance organique contenue dans la denrée alimentaire par l'acide sulfurique concentré en présence du catalyseur de minéralisation Dumazert (Merck). Le dosage colorimétrique de l'azote selon Devani *et al.*, (1989) utilise la réaction de Hantzsch. C'est une méthode basée sur la réaction de l'ammoniac avec l'acétylacétone et le formaldéhyde en milieu aqueux pour donner un produit jaune: le 3,5-diacétyl 1,4-dihydrolutidine. Ce composé présente un maximum d'absorption à 412 nm et est

dosé par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en azote.

Procédure : pour la minéralisation, 1g d'échantillon (farine de sorgho), 5 mL de H₂SO₄ concentré (Fischer Scientific, New Jersey), une pincée de catalyseur de minéralisation (Riedel-de-Häen) sont introduits successivement dans un matras de minéralisation qui est porté à chaud sur une rampe de minéralisation jusqu'à obtention d'une solution limpide, ceci pendant 6 h. Après refroidissement, le minéralisât est récupéré dans une fiole jaugée et son volume complété à 50 mL avec de l'eau distillée.

Les procédures de dosage des échantillons et de préparation de la courbe d'étalonnage sont présentées en annexe 1 (Tableau 1a).

Expression des résultats : la quantité d'azote dans chaque essai (q) est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (voir figure 1a en annexe 1) d'équation de régression:

$$DO = a.q + b \quad (2.4)$$

La formule 2.5 est utilisée pour exprimer les résultats en g/100 g de MS.

$$Q = \left[\frac{q \times F \times 100}{(MS \times m)} \right] \times 100 \quad (2.5)$$

Avec F: facteur de dilution, m: masse d'échantillon minéralisé, MS: matière sèche de l'échantillon analysé ; MS = m – H (H : teneur en eau exprimée en pourcentage masse/masse).

Le coefficient conventionnel de conversion (6,25) de l'azote en protéines est utilisé pour convertir l'azote en protéines (AOAC, 2005). La teneur en protéines brutes totales est donc 6,25 x Q (g/100g MS).

I.2.2.5- Le maltage

Avant le procédé de maltage, les grains de sorgho sec ont été nettoyés et calibrés par triage pour les débarrasser de toutes impuretés (pailles, coques, cailloux, débris divers) ainsi

que des grains cassés, défectueux et ceux de plus petite taille. Ceux-ci ont été par la suite lavés à de l'eau de robinet puis rincés avec de l'eau distillée.

I.2.2.5.1- Procédé de maltage au criblage

Le procédé de maltage a été fait dans un premier temps en utilisant un plan de criblage. Onze facteurs ont été recensés dans la bibliographie, ce qui a permis de choisir un plan factoriel fractionnaire 2^{11-7} ; avec : 2 : le nombre de niveaux par facteur ; et 2^{11-7} : le nombre d'expériences.

Le tableau 2.2 ci-après regroupe les facteurs recensés dans la bibliographie pour chaque étape du maltage du sorgho ainsi que leur plage de variation.

Tableau 2. 2 : Facteurs utilisés pour le criblage au cours du maltage

Operations	Facteurs	Abbréviation	Plage de variation	
			Bas	Haut
Trempage	Temps	tT	20 h	48 h
	Température	TT	25°C	35°C
	Repos à air	RaA	Non	Oui
	Changement d'eau	CeT	Non	Oui
	Milieu alcalin (0,1% NaOH)	Tal	Non	Oui
Germination	Température	TG	25°C	35°C
	Temps	tG	1 jour	5 jours
Séchage	Température	TS	30°C	55°C
	Temps	tS	16 h	48 h
Pretraitement 1 (avant trempage)	Désinfection des grains (1 % NaOCl/ 20 min)	dG	Non	Oui
Pretraitement 2 (après séchage)	Mouture avec radicules	Mr	Non	Oui

Pour les facteurs qualitatifs tels: la désinfection des grains, le repos à air, le changement d'eau de trempage et le trempage en milieu alcalin, le niveau bas « non » signifie que l'opération n'est pas observée et inversement pour le niveau haut « oui ».

Le plan de criblage est détaillé dans le tableau 2.3, où les niveaux haut et bas de variation de chaque facteur sont 1 et -1 en valeur codée respectivement. Ce plan a été généré à l'aide du logiciel Statgraphics version XV.II.

Tableau 2. 3: Plan de criblage pour le maltage du sorgho *Safrari*

Facteurs/ Expériences	tT h	TT °C	RaA	CeT	Tal	TG °C	tG H	TS °C	tS h	dG	Mr
1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1
10	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1
11	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
12	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
13	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
14	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1
16	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1

Le modèle polynomial associé à ce plan d'expériences est d'ordre 1 sans interaction et se présente sous la forme :

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \dots + \beta_{11} X_{11} \quad (2.6)$$

Avec : Y = activité amylolytique totale ; $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_{11}$ = coefficients de régression ;

$X_1, X_2, X_3, \dots, X_{11}$ = facteurs étudiés

Lors du trempage, le ratio 1/3 a été observé s'agissant de la masse de sorgho (g)/volume d'eau de trempage (mL). En effet, des lots de 150 g de grains de sorgho ont été trempés dans 450 mL de solution de trempage (photo 2.2).

L'opération de repos à air au cours du trempage a été conduite comme suit: les grains trempés ont été après 10 h de trempage, exposés 1 h 40 minutes à l'air libre, hors du bain de trempage lorsque la durée totale de trempage était de 20 d'une part, et 4 h à l'air libre après 24 h de trempage, lorsque la durée totale de trempage était de 48 (Ijasan *et al.*, 2011).

Une fois le trempage terminé, les grains ont été étalés sur des sacs perforés en plastique, puis recouverts et disposés dans le noir à l'étuve pour la germination (photo 2.3).



Photo 2. 2 : Dispositif de trempage



Photo 2. 3 : Dispositif de germination

Pendant la germination, chaque batch de 150 g de sorgho a été arrosé avec de l'eau distillée toutes les 12 h pour éviter leur déshydratation. Après germination et touraillage, l'enlèvement des racelles a été réalisé manuellement en frottant les grains germés contre un

tamis. Le broyage du malt séché a été effectué à l'aide du broyeur électrique Culatti, muni d'un tamis de 1 mm de taille de maille.

I.2.2.5.2- Optimisation du maltage

L'optimisation du maltage a été exécutée en prenant en compte les facteurs significatifs issus du criblage.

I.2.2.6- Méthode d'extraction enzymatique et de mesure de l'activité amylolytique totale au criblage

L'extraction et la mesure de l'activité enzymatique durant le criblage ont été effectuées avec la méthode décrite par (Dicko, 2006). Cette méthode a été modifiée en ce que le tampon acétate pH 5,5 a été utilisé en lieu et place du tampon McIlvaine (tampon phosphate/citrate) pH 6.

Pour l'extraction, 1 g de farine de sorgho malté a été pesé et dispersé dans 20 mL de tampon acétate 50 mM, pH 5,5 contenant du CaCl_2 à 2 mM. L'ensemble a été agité lentement pendant 5 min, puis centrifugé à l'aide de la centrifugeuse Heraeus; le surnageant a été retenu comme extrait enzymatique. Ceci a été conduit pour les 16 essais du plan d'expériences de criblage. Le procédé est résumé à la figure 2.1.

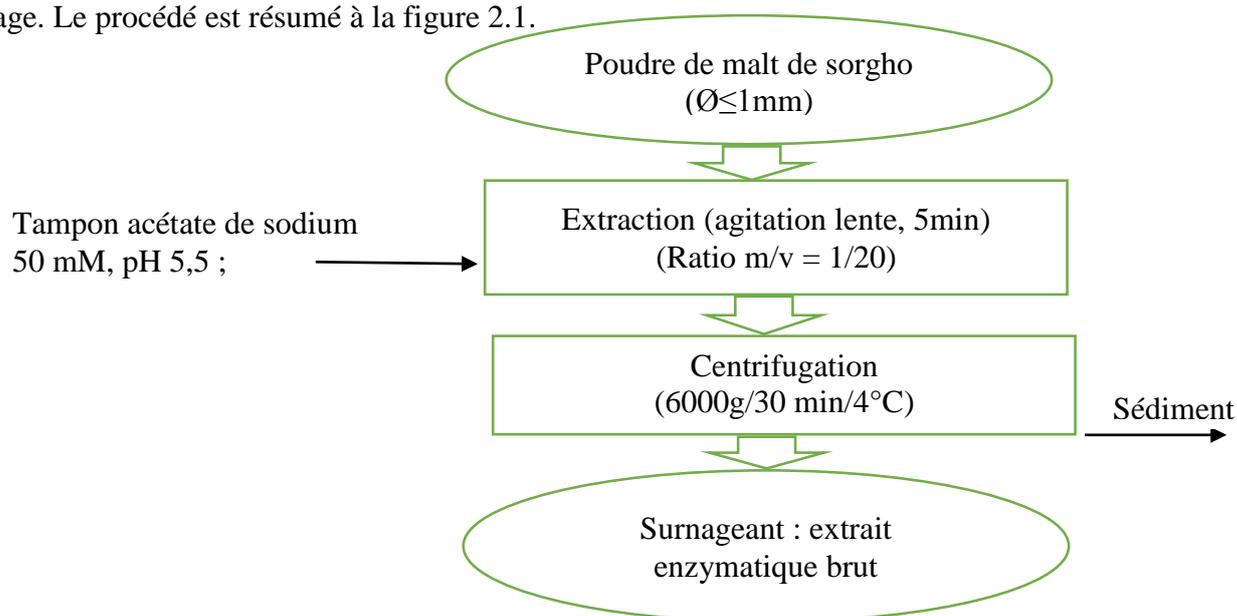


Figure 2. 1 : Procédé d'extraction enzymatique au criblage

Dans le contexte de ce travail, l'activité amylolytique totale est considérée comme étant l'activité due à l'action combinée de tous les enzymes amylolytiques présentes dans le malt sur l'amidon.

L'activité enzymatique au criblage est déterminée par la mesure des vitesses initiales (V_i) de disparition de l'amidon suite à la diminution de la coloration bleue du complexe amidon-iodure avec l'augmentation de l'hydrolyse amylolytique.

Principe : l'iode (I_2) interagit avec l'amidon pour donner une coloration bleue qui absorbe à une longueur d'onde de 580 nm. L'hydrolyse de l'amidon par les amylases donne du glucose, du maltose et des résidus d'oligosaccharides. Cela conduit à la décoloration du milieu réactionnel suite à la diminution de l'amidon et donc une baisse de l'absorbance à 580 nm.

Méthode : la procédure expérimentale est détaillée dans le tableau 2.4 ci-après :

Tableau 2. 4: Préparation des milieux réactionnels de mesure de l'activité enzymatique au criblage

Réactif/tube	T = 0 (blanc)	T (échantillon)
Amidon (1 mg/mL) en mL	0	0,2
Tampon acétate pH 5,5 (mL)	2,5	2,5
Réactif I_2/KI (mL)	0,05	0,05
Extrait enzymatique	200 μ L	200 μ L
Prendre les DO à 580 nm toutes les 10 secondes jusqu'à 03 minutes	t=0 ; t=10 ; t=20 ; t=30; ...t=3min	idem

La solution enzymatique est additionnée juste avant la lecture de la DO; Réactif I_2/KI : 0,2 g de I_2 dissous dans 100 mL de KI à 2 % (w/v).

Expression des résultats : les courbes des densités optiques en fonction du temps ($f(DO) = t$) pour chaque essai sont tracées et les vitesses initiales, qui sont les coefficients directeurs des

droites obtenues en conditions initiales sont déterminées. Ces vitesses initiales correspondent à l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique se définit ici comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'un mg d'amidon par minute dans les conditions décrites au tableau 2.4, et s'exprime en mU (milli-unité d'enzyme).

I.2.2.7- Méthode d'extraction et de mesure de l'activité en dextrinase limite pendant l'optimisation du maltage

I.2.2.7.1- L'extraction enzymatique

L'extraction de la dextrinase limite a été faite avec la méthode décrite par MacGregor *et al.*, (1994a) avec de légères modifications: absence de dithiothréitol pendant l'extraction ; ratio masse de malt/volume de tampon de 1/10 et non 1/20 ; pH de tampon de 4,0 et non 5,5. Le procédé d'extraction est résumé à la figure 2.2.

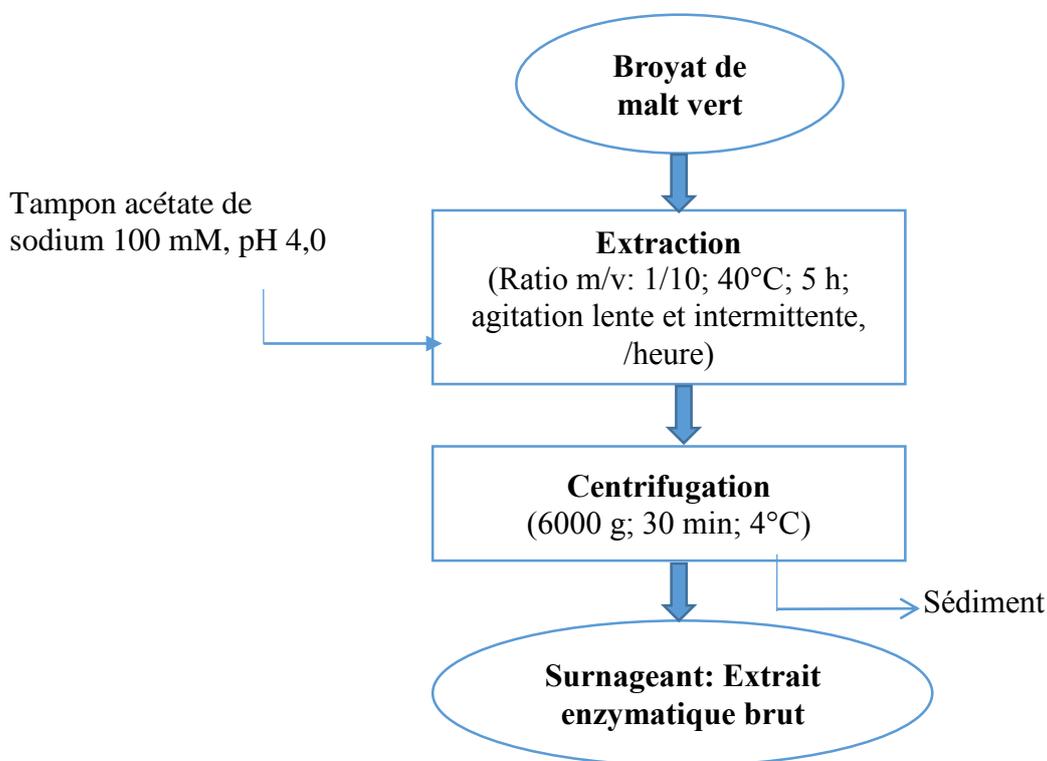


Figure 2. 2 : Extraction de la dextrinase limite pour optimisation du maltage

I.2.2.7.2- Mesure de l'activité de la dextrinase limite

L'activité de la dextrinase limite a été déterminée par dosage des sucres réducteurs issus de la réaction de la dextrinase limite sur le pullulan, avec la méthode au DNS de Fischer et Stein (1961).

Principe : la dextrinase limite contenue dans l'extrait enzymatique brut hydrolyse le pullulan pour donner le maltotriose, qui est un sucre réducteur. Les sucres réducteurs ont la propriété de réduire l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). En effet, en milieu alcalin et à chaud, le DNS réagit avec les sucres réducteurs et passe de sa forme oxydée jaune à sa forme réduite orangée (Acide 3-amino 5-nitrosalicylique) présentant un maximum d'absorption à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs et permet donc de les quantifier. La quantité de sucres réducteurs libérés dans le milieu réactionnel après hydrolyse enzymatique est obtenue par interpolation sur une courbe d'étalonnage au maltose.

Méthode : l'hydrolyse enzymatique a été réalisée comme suit : 0,25 mL d'une solution à 0,5 % de pullulan (Sigma Aldrich, USA) a été ajouté à 0,25 mL d'extrait enzymatique contenant 100 mM de tampon acétate de sodium pH 4,0 (0,75 mL), pour un volume total de 1,5 mL. L'ensemble a été incubé à 37 °C au bain-marie (Memmert, Allemagne et HH-S, Chine) pendant 30 min. La réaction a été stoppée par ajout de 0,25 mL de réactif au DNS (2,5 g d'acide dinitrosalicylique +75 g de tartrate double sodium potassium +50 mL de NaOH 2 N pour un volume final de 250 mL).

Les sucres réducteurs quant à eux ont été mis en évidence en portant le précédent mélange dans un bain bouillant pendant cinq minutes pour le développement de la coloration orangée. L'ensemble a été ensuite refroidit dans un bain de glace et 4 mL d'eau distillée y ont été ajoutées. L'intensité de la coloration est déterminée spectrophotométriquement contre un blanc ne contenant pas le pullulan. Les essais ont été faits en triplicat. La concentration en sucres

réducteurs, exprimée en mg de maltose par mL est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue à partir de solutions de maltose de concentrations connues et dont les milieux ont été préparés pour des volumes finaux identiques aux échantillons à doser (l'étalonnage et le dosage sont décrits en annexe 4 (tableau 1c et 1d respectivement)).

Expression des résultats : la quantité de sucres réducteurs de chaque prise d'essai est déterminée en se reportant sur la courbe d'étalonnage d'équation de régression :

$$DO = aQ + b \quad (2.7)$$

Avec, DO : Densité Optique et Q : quantité de sucres réducteurs (mg/mL); a, b : Constantes à déterminer.

L'activité enzymatique ici est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère une μmol de maltose équivalent du pullulan en une minute à 37 °C et à pH 4,0 et s'exprime en U/mL.

I.2.2.8- Validation du modèle mathématique au criblage

Valider un modèle mathématique revient à tester sa capacité à décrire le phénomène observé. Cette description devrait être le plus proche possible de la réalité. Une analyse statistique est donc nécessaire. Trois méthodes ont servi à la validation du modèle obtenu:

- La détermination du coefficient de détermination R^2 et du coefficient de détermination ajusté Ra^2 à l'aide du logiciel Statgraphics XV.II ;
- Le calcul de l'analyse absolue de déviation moyenne (AADM) à l'aide du tableur Excel ;
- Le calcul des facteurs polarisé (Bf) et d'exactitude (Af) à l'aide du tableur Excel.

I.2.2.8.1- Le coefficient de détermination R²

R² est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigees de la moyenne) à la somme des carrés des réponses expérimentales (corrigees de la moyenne) (Vivier, 2002).

Le R² est donné par l'expression :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (2.8)$$

Avec : \hat{Y}_i : réponse calculée ; Y_i : réponse expérimentale ; \bar{Y} :moyenne

Plus R² sera proche de 1, meilleur sera le modèle. Cependant, si le nombre d'expériences est égal au nombre d'inconnues du système, le coefficient R² sera toujours égal à 1. C'est pour éviter cela que le coefficient de détermination ajusté (Ra²) a été introduit. Le Ra² ajusté est défini comme la différence à 1 du rapport entre le carré moyen des écarts des résidus (écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées) et le carré moyen des écarts expérimentaux. De même que pour R², le meilleur modèle sera obtenu pour Ra² maximum (Karam, 2004).

I.2.2.8.2- L'Analyse absolue de déviation moyenne (AADM)

Baş et Boyaci (2007) ont ressorti que l'AADM entre les valeurs calculées et observées doit être aussi petite que possible (le plus proche de 0) pour définir le vrai comportement du système dans le domaine des données expérimentales. L'AADM a été calculée par la relation suivante :

$$AADM = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\frac{|y_{i,exp} - y_{i,cal}|}{y_{i,exp}} \right) \right]}{p} \quad (2.9)$$

Où : $y_{i,exp}$ = réponses expérimentales; $y_{i,cal}$ = réponses calculées; P = nombre d'expériences

I.2.2.8.3- Méthode comparative des facteurs polarisés

Dans cette méthode, les valeurs théoriques sont comparées aux valeurs observées d'après les équations de Ross (1996):

$$B_f = 10^{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log \left(\frac{y_{théorique}}{y_{observé}} \right)} \quad (2.10)$$

$$A_{f1} = 10^{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \log \left(\frac{y_{théorique}}{y_{observé}} \right) \right|} \quad (2.11)$$

Où : B_f = facteur polarisé ; A_{f1} = facteur polarisé d'exactitude ; $Y_{théorique}$ = réponse théorique ou calculée ; $Y_{observé}$ = réponse observée ou expérimentale ; n = nombre d'expériences.

En effet, le modèle prédictif parfait est obtenu si : $B_f = A_{f1} = 1$.

Le tableau 2.5 regroupe ces différents critères avec les plages acceptables de validation.

Tableau 2. 5: Critères de validation des modèles

Indicateurs de validation	Valeurs standards	Plages acceptables	Références
R^2	1	$\geq 92\%$	(Goupy & Creighton, 2006)
R^2 ajusté	1	$\geq 80\%$	(Joglekar & May, 1987)
AADM	0	[0-0,3]	(Baş & Boyaci, 2007)
B_f	1	[0,75-1,25]	(Dalgaard & Jørgensen, 1998)
A_{f1}	1	[0,75-1,25]	(Dalgaard & Jørgensen, 1998)

Les valeurs acceptables de R^2 , AADM, B_f et A_{f1} signifient que l'équation du modèle décrit le comportement réel du système et qu'elle peut être utilisée pour l'interpolation dans le domaine expérimental.

I.2.2.9- Calcul des pourcentages d'influence des facteurs

Les pourcentages d'influence des facteurs ont été calculés par rapport à la somme en valeur absolue de tous les coefficients du modèle (Desobgo *et al.*, 2011c).

II- RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1- Caractérisation des grains de sorgho

Les résultats de la caractérisation des grains de sorgho afin d'estimer leur viabilité et leur aptitude au maltage sont présentés au tableau 2.6.

Tableau 2. 6: Caractéristiques du sorgho *Safrari* en comparaison avec la norme Analytica-EBC et d'autres auteurs

Propriétés (%)	Sorgho <i>Safrari</i>	Données de la bibliographie			
		Normes (EBC-Analysis-Committee, 1998)	Sorgho <i>Safrari</i> (Nguemogne <i>et al.</i> , 2017)	Sorgho <i>Safrari</i> (Nso <i>et al.</i> , 2003)	Autres sorgho (Ogbonna <i>et al.</i> , 2003)
Energie germinative (4 mL)	98 ± 2	60-99	99	98	96 – 97
Energie germinative (8 mL)	96 ± 2	40-99	97	95	
Sensibilité à l'eau	2		2	3	2 – 3
Capacité germinative	98 ± 0	92-100	98	99	90,5 – 96,5
Dormance	0			1	
Teneur en eau	10,79 ± 0,01	≤13 %	10,8	12,4	8,95 – 10,76
Azote totale	1,65 ± 0,03	1,5 – 2,1		0,54	1,52 – 1,76
Protéines totales	10,32 ± 0,21			9,7	

Il ressort du tableau 2.6 que le sorgho *Safrari* a des caractéristiques qui rentrent dans les normes recommandées pour le brassage avec le malt d'orge (EBC-Analysis-Committee, 1998). Pour ce qui est du cas particulier du sorgho, Dewar (1997) recommande que l'énergie germinative doit être >90% après 72 h de germination, ce qui est en accord avec les résultats obtenus. Le cultivar *Safrari* de sorgho présente donc de très bonnes propriétés germinatives. Propriétés similaires à celles des travaux de Nso *et al.* (2003) et de Nguemogne *et al.* (2017) pour la même variété, et aussi à d'autres variétés de sorgho d'après les travaux de Ogbonna *et al.* (2003) (tableau 2.6). Il faut également noter l'absence de dormance. La dormance est en effet la différence entre la capacité germinative et l'énergie germinative à 4 mL (Briggs, 1998); c'est une caractéristique commune aux grains qui retarde la germination rapide et uniforme de celles-ci, et par conséquent, la qualité du malt est affectée négativement (Briggs, 1998; Woonton *et al.*, 2005).

La teneur en protéines est de $10,32 \pm 0,21$ %. Ceci se rapproche de la valeur de compromis autour de 10 % trouvée par les brasseurs comme indicateur de la convenance d'une céréale pour le maltage (Lewis & Bamforth, 2006). Le sorgho *Safrari* utilisé a donc des aptitudes à une germination rapide et uniforme, qui sous-entend une bonne modification biochimique des grains pendant la germination; modification incluant la synthèse enzymatique. Par conséquent, la germination de cette céréale dans des conditions normales d'aération, de température et d'humidité permettront d'obtenir un malt révélant son potentiel optimal.

La teneur en eau quant à elle est un indicateur qui détermine si l'échantillon peut être conservé sans séchage préalable pour une utilisation ultérieure (Mayer *et al.*, 2014) ; et aussi, elle est importante pour la détermination de la prise d'eau par les grains pendant le trempage lors du maltage. La teneur en eau de *Safrari* ($10,79 \pm 0,01$) (tableau 2.6) obtenue se situe dans les normes prévues pour la conservation des céréales (≤ 13 % d'après EBC-Analysis-Committee 1998).

II.2- Criblage des facteurs pour l'optimisation du maltage

L'expérimentation ici a consisté à implémenter le plan d'expériences de criblage du tableau 2.3. L'évolution de la germination par jour est présentée à la photo 2.4.

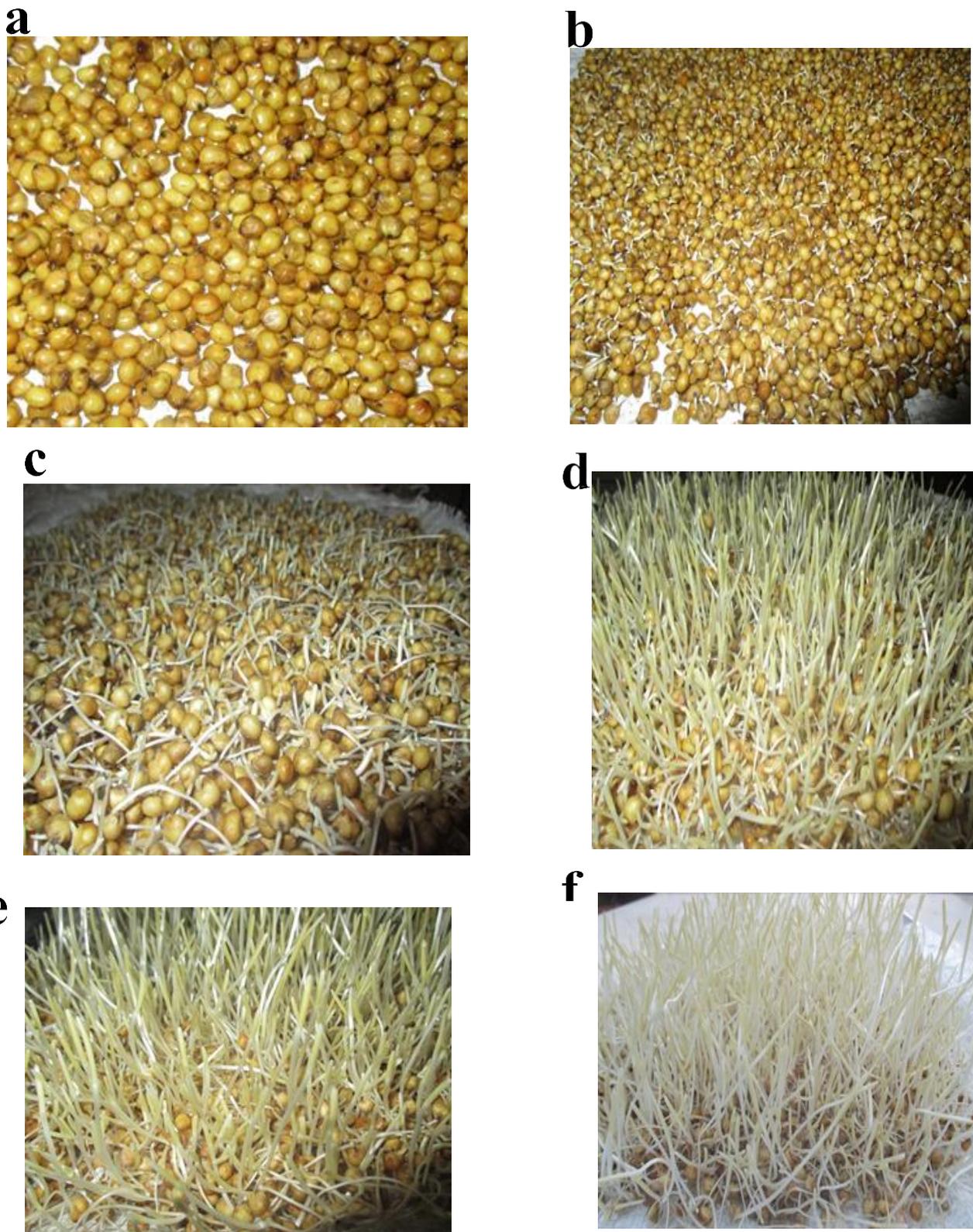


Photo 2. 4 : Photos de sorgho en germination ; a) jour zéro, b) jour 1, c) jour 2, d) jour 3, e) jour 4, et f) jour 5

La germination est marquée par l'apparition des radicelles (photo 2.4 b), et l'élongation de celles-ci au fur et à mesure que la germination progresse (photo 2.4 b à 2.4 f).

La réponse mesurée est l'activité amylolytique totale (Tableau 2.7).

Tableau 2. 7: Matrice d'expérimentation de criblage pour le maltage du sorgho *Safrari*

Facteurs/ Essai	tT h	TT °C	RaA	CeT	Tal	TG °C	tG h	TS °C	tS h	dG	Mr	Activité amylolytique totale (mU)
1	20	35	non	non	oui	35	24	55	16	non	oui	24
2	48	25	non	non	oui	25	120	55	16	non	non	36
3	48	35	oui	oui	oui	35	120	55	48	oui	oui	30
4	48	25	oui	non	non	35	24	55	48	non	oui	24
5	48	35	oui	non	oui	25	24	30	16	oui	oui	12
6	48	25	oui	oui	non	25	120	30	16	non	oui	36
7	20	35	oui	non	non	25	120	55	48	non	non	36
8	20	25	non	non	non	25	24	30	48	oui	oui	12
9	20	25	non	oui	non	35	120	55	16	oui	oui	30
10	20	25	oui	non	oui	35	120	30	16	oui	non	18
11	48	25	non	oui	oui	35	24	30	48	non	non	30
12	20	25	oui	oui	oui	25	24	55	48	oui	non	24
13	48	35	non	oui	non	25	24	55	16	oui	non	18
14	48	35	non	non	non	35	120	30	48	oui	non	24
15	20	35	non	oui	oui	25	120	30	48	non	oui	42
16	20	35	oui	oui	non	35	24	30	16	non	non	18

Avec : tT (X_1): temps de trempage; TT (X_2): température de trempage ; RaA (X_3): repos à air; CeT (X_4): changement d'eau; Tal (X_5): trempage en milieu alcalin; TG (X_6): température de germination; tG (X_7): temps de germination; TS (X_8): température de séchage; tS (X_9): temps de séchage; dG (X_{10}): désinfection des grains; Mr (X_{11}): mouture du malt avec radicelles.

Les valeurs des densités optiques en fonction du temps (tableau 1b en annexe 2) ainsi que les tracés des droites correspondantes ayant permis d'obtenir les différentes vitesses initiales (coefficients directeurs des droites = activité enzymatique), sont présentés en annexe 3.

Cette matrice (Tableau 2.7) a servi à la modélisation en utilisant le logiciel Statgraphics, ceci afin de traduire par une équation mathématique l'activité amylolytique totale en fonction des facteurs retenus pour le maltage. Le modèle obtenu a donc été le suivant:

$$Y_{aT} = 25,875 + 0,375X_1 - 0,375X_2 - 1,125X_3 + 2,625X_4 + 1,125X_5 - 1,125X_6 + 5,625X_7 + 1,875X_8 + 1,875X_9 - 4,875X_{10} + 0,375X_{11} \quad (2.12)$$

Avec Y_{aT} : activité amylolytique totale ; X_1 : temps de trempage; X_2 : température de trempage ; X_3 : repos à air; X_4 : changement d'eau; X_5 : trempage en milieu alcalin; X_6 : température de germination; X_7 : temps de germination; X_8 : température de séchage; X_9 : temps de séchage; X_{10} : désinfection des grains; X_{11} : mouture du malt avec radicules.

Modèle de premier ordre sans interaction ; qui a été validé d'après les données du tableau 2.8.

Tableau 2. 8: Validation du modèle " Y_{aT} "

	Abréviation	Valeur obtenue	Valeur standard	Plages acceptables
Coefficient de détermination	R^2	97,76%	100%	≥ 92 %
Coefficient de détermination ajusté	R^2_a	91,59%	100%	≥ 80 %
Analyse Absolue de Déviation Moyenne	AADM	0,00	0	[0-0,3]
Facteur de Biais	Bf	1,00	1	[0,75-1,25]
Facteur d'exactitude	Af ₁	1,00	1	[0,75-1,25]

Les paramètres de validation du modèle ' Y_{aT} ' rentrent dans les plages standards. Ce modèle donnerait donc une bonne description du phénomène étudié. Afin d'évaluer l'impact de chaque facteur, la table d'ANOVA a été établie (Tableau 2.9). Un facteur sera considéré comme ayant un impact significatif si sa probabilité (P) est inférieure ou égale à la valeur seuil de 0,05 ($P \leq 0,05$).

Tableau 2. 9: Analyse de la variance pour l'activité amylolytique totale (Y_{aT}) au criblage

Facteur	Coefficient	Somme des carrés	ddl	Moyenne quadratique	Rapport F	Probabilité
tT (X_1)	+0,375	6,25E-10	1	6,25E-10	0,33	0,5946
TT (X_2)	-0,375	6,25E-10	1	6,25E-10	0,33	0,5946
RaA (X_3)	-1,125	5,625E-9	1	5,625E-9	3,00	0,1583
CeT (X_4)	+2,625	3,0625E-8	1	3,0625E-8	16,33	0,0156
Tal (X_5)	+1,125	5,625E-9	1	5,625E-9	3,00	0,1583
TG (X_6)	-1,125	5,625E-9	1	5,625E-9	3,00	0,1583
tG (X_7)	+5,625	1,40625E-7	1	1,40625E-7	75,00	0,0010
TS (X_8)	+1,875	1,5625E-8	1	1,5625E-8	8,33	0,0447
tS (X_9)	+1,875	1,5625E-8	1	1,5625E-8	8,33	0,0447
dG (X_{10})	-4,875	1,05625E-7	1	1,05625E-7	56,33	0,0017
Mr (X_{11})	+0,375	6,25E-10	1	6,25E-10	0,33	0,5946
Erreur totale		7,5E-9	4	1,875E-9		
Total (corr.)		3,34375E-7	15			

Avec : *ddl* : degré de liberté; *tT*: temps de trempage; *TT*: température de trempage ; *RaA*: repos à air; *CeT*: changement d'eau; *Tal*: trempage en milieu alcalin; *TG*: température de germination; *tG*: temps de germination; *TS*: température de séchage; *tS*: temps de séchage; *dG*: désinfection des grains; *Mr*: mouture du malt avec radicules.

Il ressort de la table d'ANOVA (tableau 2.9) que cinq facteurs sur les onze étudiés ont des probabilités inférieures à 0,05, ce qui indique qu'ils sont statistiquement significatifs et donc, ont une influence significative sur la réponse qu'est l'activité amylolytique totale. Ces facteurs sont: le changement d'eau de trempage (CeT), la température de germination (TG), le temps (tS) et la température (TS) de séchage, et le facteur désinfection des grains (dG). Afin de mettre à l'évidence le sens de l'influence (positif ou négatif) et le degré d'influence en pourcentage, le tableau 2.10 a été établi.

Il ressort globalement du tableau 2.10 que les conditions de trempage, de germination et de séchage influencent l'activité amylolytique totale, ce qui est d'ailleurs suffisamment reconnu (Ezeogu & Okolo, 1994; Okolo & Ezeogu, 1996a; Dewar *et al.*, 1997b; Agu & Palmer, 1997b;

Igyor *et al.*, 1998; Owuama, 1999; Nso *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2006; Claver *et al.*, 2010; Ijasan *et al.*, 2011).

Tableau 2. 10: Facteurs ayant une influence significative sur l'activité enzymatique au cours du maltage

Facteurs	Abréviation	Signe du coefficient	% d'influence
Changement d'eau de trempage	CeT	+	12,3
Temps de germination	tG	+	26,3
Temps de séchage	tS	+	8,8
Température de séchage	TS	+	8,8
Désinfection des grains	dG	-	22,8

Cependant, pour l'opération unitaire de trempage, seul le facteur changement d'eau est significatif; pour la germination, seul le facteur temps est significatif; et pour le séchage, les facteurs temps et température ont été significatifs et ce, positivement contrairement au facteur désinfection des grains dont l'influence significative est négative. Chacun de ces facteurs ayant présenté un impact significatif va faire l'objet d'une discussion.

II.2.1- Le changement d'eau de trempage

Le changement d'eau de trempage, dont l'influence s'est avérée significative et positive ($P = 0,015$), permettrait d'une part d'accroître la prise d'eau par les grains, et d'autre part, d'éviter l'asphyxie du germe. En effet, lors du trempage, pendant que les grains absorbent de l'eau, il y a également transfert de matières solubles des grains vers la solution de trempage (Anderson, 2000). Ce transfert de matière avec le temps, atteint un équilibre qui ne permet plus ni aux grains d'absorber de l'eau, ni aux composés solubles de diffuser hors des grains : c'est le phénomène d'osmose. Par ailleurs, pendant le trempage, les grains ont également besoin de

respirer afin que l'initiation des modifications biochimiques nécessaires à la germination soit effective. Cette respiration requière la présence d'oxygène qui est présente sous forme dissoute dans l'eau de trempage (Guido & Moreira, 2013). Toutefois, la présence éventuelle des micro-organismes de surface dans cette eau va limiter la quantité d'oxygène disponible pour les grains, ce qui pourrait entraîner l'asphyxie du germe. Le changement d'eau de trempage va donc à la fois initier à nouveau les transferts de matière en favorisant davantage de prise d'eau par les grains, réapprovisionner les grains en oxygène et évacuer les micro-organismes de surface; d'où son importance. Ces résultats s'accordent avec ceux de Okolo et Ezeogu (1996b) selon lesquels un trempage continu en milieu alcalin avec changement d'eau permet d'améliorer les modifications biochimiques dans les grains.

II.2.2- Le temps de germination

Le temps de germination apparaît comme étant le facteur le plus influent avec un pourcentage de 26,3 %. De par le signe positif du coefficient de ce facteur, l'activité amylolytique totale croit avec l'augmentation du temps de germination. Tous les travaux dont nous avons connaissance convergent dans ce sens (Morrall *et al.*, 1986; Taylor & Robbins, 1993; Nzelibe & Nwasike, 1995; Owuama, 1999; Agu, 2005; Okoli *et al.*, 2010; Bekele *et al.*, 2012; Archibong *et al.*, 2015; Abuajah *et al.*, 2016). Au cours de la germination en effet, les enzymes hydrolytiques sont synthétisées sous l'effet de l'hydratation progressive des grains et de la mobilisation consécutive des métabolites cellulaires (Dewar, 1997; Owuama, 1997, 1999; Lewis & Bamforth, 2006; Schmitt *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'hydratation des grains favoriserait la diffusion de l'acide gibbérellique synthétisé par l'embryon aux premiers instants de la germination vers la couche d'aleurone et le scutellum et induirait la synthèse et la sécrétion progressive des enzymes hydrolytiques (Fincher, 1989; Guido & Moreira, 2013), d'où l'augmentation de la teneur en enzymes avec le temps de germination.

II.2.3- Les temps et température de touraillage

Les effets du temps et de la température de touraillage sont statistiquement significatifs (tableau 2.9) et contribuent à augmenter l'activité amylolytique, résultat en accord avec ceux de Okungbowa *et al.* (2002), qui a observé un accroissement de l'activité enzymatique lors du touraillage de certains malts de céréales. Malgré la nature protéique des enzymes qui les prédispose à la dénaturation aux températures élevées, certaines sont tout de même résistantes aux températures de touraillage (Lewis & Bamforth, 2006). Les barèmes de températures appliqués (30 – 55 °C/ 16 – 48 h) dans ce travail ne seraient donc pas préjudiciables à l'intégrité de tout ou certaines enzymes amylolytiques du malt de sorgho *Safrari*. Ogbonna (2011) révèle même que le barème de 50 °C/24 h généralement utilisé en malterie/brasserie ne cause pas de dommage perceptible sur les enzymes du sorgho. Par ailleurs, l'activité de l' α -amylase, enzyme amylolytique majoritaire et la plus thermostable, augmenterait même pendant le touraillage (\approx 80 °C) (Guido & Moreira, 2013). L'influence positive globale du touraillage serait donc corrélée en majorité à l'activité de l' α -amylase. Dans une autre mesure, l'influence positive (Tableau 2.10) des facteurs temps et température de séchage sur la teneur en enzymes amylolytiques pourrait s'expliquer par le fait qu'aux premières heures de séchage, l'eau libre présente dans les malts assurerait la continuité des réactions biochimiques, du moment que la température du milieu reste inférieure à la température d'inactivation des enzymes (Hämäläinen & Reinikainen, 2007).

II.2.4- La désinfection des grains

Le facteur désinfection des grains a une influence significative négative de l'ordre de 22,8 %. Ce résultat rejoint celui de Nso *et al.* (2006), qui ont montrés que le traitement des grains de sorgho (la variété *Safrari* entre autres) avec les désinfectants tel le formaldéhyde réduit le potentiel enzymatique des malts obtenus. En effet, l'hypochlorite de sodium utilisé

comme agent désinfectant dans ce travail aurait eu le même effet. Ce résultat est également en accord avec ceux de Ramakrishna *et al.* (1991) avec l'orge, de Ditommaso et Nurse (2004) avec les grains d'herbes sauvage, et de Tesfaendrias *et al.* (2009) avec le sorgho, qui tous convergent vers le fait que des concentrations élevées en NaOCl affectent négativement la germination soit en réduisant la vitesse de germination (Ditommaso & Nurse, 2004), soit en réduisant le pourcentage de germination (Ramakrishna *et al.*, 1991; Tesfaendrias *et al.*, 2009). Le NaOCl en effet a un fort pouvoir oxydant ; il est instable et se décompose pour donner le dichlore (Cl₂) qui de part son pouvoir oxydant pourrait oxyder les constituants des grains qui ont des carbones réductibles tels les lipides, les hydrates de carbone, les protéines et les enzymes (Abdul-Baki, 1974; Ditommaso & Nurse, 2004). Le NaOCl peut aussi se décomposer pour donner de l'oxygène actif, qui pourrait être impliqué dans l'oxydation des constituants des grains (Ditommaso & Nurse, 2004). Comme l'ont suggéré Ditommaso et Nurse (2004), les espèces de grains qui absorbent facilement de l'eau, absorberaient aussi rapidement le NaOCl, ce qui affecterait l'intégrité de l'embryon et par ricochet, la germination. L'influence négative de l'hypochlorite de sodium sur la germination observée dans cette étude pourrait dans une autre mesure être due à l'effet de la concentration appliquée (1 %). En effet, Tesfaendrias *et al.* (2009) recommandent des concentrations en NaOCl au plus de 0,43 %.

Les facteurs du tableau 2.10 sont donc ceux à retenir pour l'optimisation du maltage.

II.3- Optimisation du maltage

Précédemment, l'activité amylolytique totale a été retenue comme réponse du plan de criblage des facteurs lors du maltage du sorgho. Puisqu'il est question dans ce travail d'aboutir à la purification de la dextrinase limite, l'attention a été portée pour l'optimisation du maltage non plus sur l'activité globale des enzymes amylolytiques, mais plutôt sur celle de la dextrinase limite comme réponse du plan expérimental à mettre en œuvre. Après l'étude de criblage des facteurs qui influencent la synthèse des enzymes amylolytiques pendant le maltage du sorgho,

les résultats ont permis d'obtenir cinq facteurs à retenir pour l'optimisation. Parmi ces facteurs, deux sont qualitatifs (changement d'eau de trempage et désinfection des grains), tandis que trois sont quantitatifs (temps de germination, temps et température de séchage).

Les plans d'expériences indiqués pour des études d'optimisation sont les plans de surfaces de réponses. Plans qui exigent l'emploi des facteurs quantitatifs étant donné qu'ils nécessitent au moins trois niveaux par facteurs (Goupy & Creighton, 2006; Kimouche, 2008). Puisque le plan de criblage propose deux facteurs qualitatifs, facteurs ne pouvant prendre que deux niveaux, ceux-ci sont à fixer pour l'implémentation d'un plan de surface de réponse. Comment donc les fixer en prenant leur influence (non négligeable) en compte ?

✓ Cas du facteur "changement d'eau de trempage"

Puisque ce facteur a une influence significative et positive de l'ordre de 12,3 % (contribue à l'augmentation de l'activité enzymatique), il sera maintenu fixé au niveau haut (niveau où sa contribution serait maximale). En d'autres termes, l'eau de trempage sera changée pendant l'optimisation.

✓ Cas du facteur "désinfection des grains"

Puisque ce facteur a une influence significative et négative de l'ordre de 22,8 % (contribue à faire baisser l'activité enzymatique), il sera maintenu au niveau bas (niveau où sa contribution serait minimale), qui consiste à ne pas désinfecter les grains avec l'hypochlorite de sodium.

A l'issue de ce qui précède, il reste trois facteurs quantitatifs à considérer pour l'optimisation : le temps de germination, et les facteurs temps et température de séchage. Cependant, bien que ces deux derniers facteurs aient un impact positif, leur influence à 8,8 % vaut-elle la peine d'être prise en compte pour l'optimisation du maltage? Pour y répondre, il faut se rappeler que la réponse mesurée au criblage était l'activité amylolytique totale

impliquant principalement les activités de l' α -amylase, de la β -amylase et de la dextrinase limite. Pour l'optimisation du maltage, la réponse à considérer est l'activité seule de la dextrinase limite. Or, la bibliographie révèle que la thermolabilité de la dextrinase limite est plus élevée que celle des autres enzymes amylolytiques (Hardie *et al.*, 1976; Glennie & Wight, 1986; Sissons, 1991; Briggs, 1998; Martin & Štefan, 2007), quoique comparable à celle de la β -amylase (McCleary, 1992; Lewis & Bamforth, 2006). Le malt vert a par ailleurs été utilisé pour la purification de la dextrinase limite (MacGregor *et al.*, 1994a; Kristensen *et al.*, 1998). Sur ces faits, étant intéressé par l'activité en dextrinase limite, le malt vert a été retenu ici. Il reste au final un seul facteur pour l'optimisation du maltage : le temps de germination, qui a d'ailleurs été le plus influent à hauteur de 26,3 %. Par conséquent, l'optimisation a été menée en variant juste le temps de germination et en fixant les autres facteurs de maltage, afin de déterminer le temps nécessaire pour la synthèse maximale de la dextrinase limite. Sur la base des résultats du plan de criblage et des considérations bibliographiques, les valeurs fixées suivantes ont été retenues:

- Température de trempage : 25 °C conforme à celle de Dewar (1997) ;
- Temps de trempage : 24 h, conforme à celle de la bibliographie (Malleshi & Desikachar, 1986; Dewar, 1997; Guiga, 2006) ;
- Température de germination : 25 °C, conforme à la bibliographie (Morrall *et al.*, 1986; Taylor & Robbins, 1993; Igyor *et al.*, 1998; Hassani *et al.*, 2014) ;
- Trempage en milieu alcalin avec changement d'eau.

Le trempage en milieu alcalin est choisi par rapport à ce qui est signalé dans la bibliographie comme probable effet bénéfique tant dans l'accroissement de l'activité en enzymes amylolytiques des malts (Okolo & Ezeogu, 1996a; Ezeogu & Okolo, 1999; Okungbowa *et al.*, 2002) que dans la réduction de la charge microbienne (Lefyedi & Taylor,

2006) (puisque'il n'est plus appliqué de désinfectant ici) ; bien que dans le cas de l'activité amylolytique totale son impact positif ne soit pas statistiquement significatif ($P > 0,05$).

Pour des besoins d'étude comparative, la mouture du malt vert avec et sans radicules a été prise en compte.

Les mesures de l'activité de la dextrinase limite en fonction du temps de germination pour les malts avec radicules d'une part, et sans radicules d'autre part, ont permis de tracer les courbes de la figure 2.3.

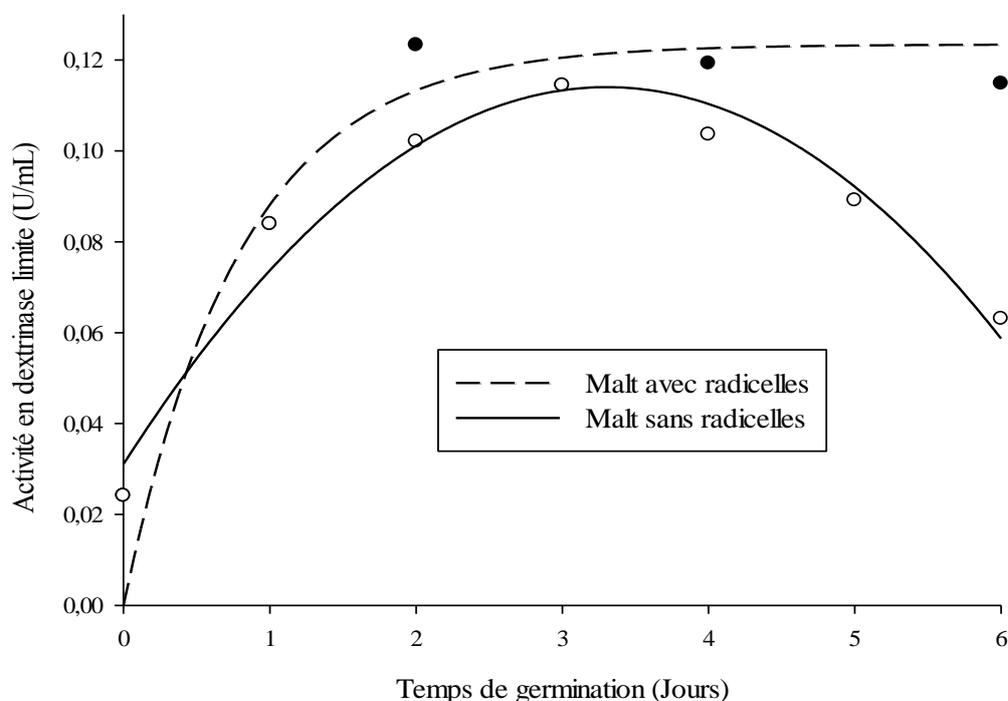


Figure 2. 3 : Activité de la dextrinase limite en fonction du temps de germination

Le criblage mené précédemment a montré que l'activité amylolytique totale croissait avec l'augmentation du temps de germination. Pour le cas spécifique de la dextrinase limite, cela se vérifie à nouveau (figure 2.3). Ceci est similaire aux travaux de Manners et Yellowlees (1973), Lee et Pylar (1984), Sissons (1991), Longstaff et Bryce (1993), MacGregor *et al.* (1994a), Kristensen *et al.* (1998), Heisner et Bamforth (2008), Evans *et al.* (2010) avec l'orge;

de Nirmala *et al.* (2000) avec le millet; de Nethrphan (2002) avec le blé. Cependant, cette croissance n'est pas continue; elle atteint un maximum, puis décroît.

L'augmentation de l'activité de la dextrinase limite avec le temps de germination serait due soit à la synthèse de celle-ci avec le temps (Sissons, 1991; MacGregor *et al.*, 1994a), soit à l'activation *in vivo* de la dextrinase limite suite à la protéolyse des inhibiteurs endogènes par des thiols-protéases endogènes qui sont synthétisés aussi pendant la germination (Longstaff & Bryce, 1993; Heisner & Bamforth, 2008).

Toutefois, le malt avec radicules présente une meilleure activité en dextrinase limite par comparaison au malt sans radicules. Après 72 h (3 jours) de germination en effet, l'activité de la dextrinase limite du malt débarrassé des radicules est à son maximum, tandis que celle du malt avec radicules continue de croître pour atteindre son maximum au 5^{ème} jour de germination. La baisse d'activité enzymatique dans le malt sans radicules après le 3^{ème} jour pourrait s'expliquer par le fait que lors de la germination des grains, il y a migration et répartition des composés synthétisés (les enzymes entre autre) dans les différentes parties de la plante en croissance (Briggs, 1998; Schmitt *et al.*, 2013), y compris les radicules. La suppression de celles-ci entraînerait dès lors une baisse d'activité enzymatique.

Les optima de synthèse des enzymes amylolytiques dans les malts de sorgho dans la bibliographie se situent entre 4 jours (Igyor *et al.*, 1998; Bekele *et al.*, 2012) et 5 jours (Morrall *et al.*, 1986; Aisien & Muts, 1987; Ezeogu & Okolo, 1999; Zarnkow *et al.*, 2007; Okoli *et al.*, 2010; Abuajah *et al.*, 2016).

Sur la base des résultats obtenus, une germination de 5 jours et l'utilisation du malt vert avec ses radicules sont recommandées pour le cultivar *Safrari* de sorgho afin d'obtenir un maximum de dextrinase limite. Pour des applications où les radicules peuvent constituer une gêne, une germination de 3 jours est recommandée. Toutefois, que ce soit 3 jours ou 5 jours,

ceci rentre également dans la plage de temps de germination pour le brassage des bières de sorgho qui est de 3 – 7 jours (Owuama, 1997, 1999).

CONCLUSION PARTIELLE

Cette partie de travail avait pour but d'optimiser la synthèse de la dextrinase limite au cours du maltage du cultivar *Safrari* de sorgho. La méthodologie des plans d'expériences utilisée pour le criblage préalable des facteurs qui influenceraient la synthèse des enzymes amylolytiques totales, dont la dextrinase limite en fait partie, a permis d'identifier cinq facteurs statistiquement influents que sont : la désinfection des grains, dont l'influence négative contribuait à faire baisser l'activité enzymatique, contrairement aux facteurs changement de la solution de trempage, temps de germination, temps et température de séchage, dont les influences étaient positives. Il en ressort que les opérations unitaires du procédé de maltage que sont le trempage, la germination et le touraillage ont toutes une influence significative sur la synthèse en enzymes amylolytiques. Par la suite, l'optimisation en vue de la maximisation de l'activité en dextrinase limite a révélé que l'activité de la dextrinase limite du malt vert avec radicules est meilleure que celle du même malt sans radicules avec un maximum à 5 jours de germination. Cependant, dans les procédés où l'emploi direct des malts comme source d'enzymes n'est pas approprié, il se trouve indispensable d'extraire ces enzymes, ce qui fera l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA DEXTRINASE LIMITE

RESUME

La méthodologie des surfaces de réponses, par le biais d'un plan de Doehlert à 4 facteurs, a été utilisée pour optimiser les paramètres d'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Les facteurs étudiés ont été la température, le pH, le ratio masse de malt/volume de tampon (m/v) et le temps. Après expérimentation, le modèle généré reliant l'activité de la dextrinase limite aux précédents facteurs a été validé avec un R^2 et un R^2 ajusté respectivement de 96,92 % et 92,30 %. L'analyse de variance a montré que trois effets simples (température, ratio et temps), une interaction (pH/temps d'extraction) et tous les effets quadratiques présentent une influence significative ($P < 0,05$) sur l'activité de la dextrinase limite pendant l'extraction. Tous les effets significatifs à l'exception de l'interaction pH/temps ont contribué à baisser l'activité de la dextrinase limite pendant l'extraction. L'optimisation a conduit aux valeurs optimales d'extraction suivantes : 23 °C, 10 h, 5,0 et 5/32 qui sont respectivement la température, le temps, le pH et le ratio masse de malt/volume de tampon; ceci pour une activité en dextrinase limite optimale de 140 mU/mL.

Mots clés : Dextrinase limite ; Extraction ; Optimisation

INTRODUCTION

L'extraction enzymatique à partir de sources végétales a pour but soit de déterminer l'activité dans un extrait brut, soit de purifier des quantités relativement grandes d'enzymes (Piggott, 2002). Le potentiel en enzymes amylolytiques des malts de céréales n'est plus à démontrer. Ce potentiel est exploitable par optimisation d'une part des conditions de synthèse de celles-ci, et d'autre part des conditions d'extraction. L'extraction de la dextrinase limite à partir des malts de céréales a fait l'objet de plusieurs travaux ayant abouti dans la plupart des cas à sa purification, notamment dans l'orge (Manners & Yellowlees, 1971; MacGregor *et al.*, 1994a; Kristensen *et al.*, 1998), le sorgho (Hardie *et al.*, 1976), l'avoine (Dunn & Manners, 1975; Yamada, 1981a), le maïs (Beatty *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009), le riz (Yamasaki *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009) et le blé (Nethrphan, 2002; Repellin *et al.*, 2008). De tous ces travaux, il n'en existerait pas qui fasse état d'une optimisation du procédé d'extraction à l'aide des plans d'expériences. Cette méthode constituerait pourtant un outil de choix dans les procédés d'optimisation. L'optimisation par plans d'expériences en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses a fait ses preuves dans divers secteurs notamment en brasseries (Desobgo *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2010; Desobgo *et al.*, 2011a, c, b; d), en malterie (Zarnkow *et al.*, 2007; Claver *et al.*, 2010; Usansa *et al.*, 2011; Adefila *et al.*, 2012) et en enzymologie (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2007; Anuradha & Valli, 2010; Karmakar & Ray, 2011), pour ne citer que ceux-là. En effet, l'utilisation de la méthodologie de surface de réponses pour résoudre les problèmes d'optimisation serait plus efficace et satisfaisante que les autres méthodes mathématiques ou classiques d'un facteur à la fois, dans la mesure où plusieurs variables sont étudiées simultanément avec un nombre minimum d'expériences, permettant de gagner en temps et en coût de procédé (Karmakar & Ray, 2011). D'où l'intérêt d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses pour l'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Les facteurs majeurs généralement considérés dans les procédés d'extraction

enzymatique sont : la température, le pH, la teneur en eau et la force ionique du milieu. Ceux-ci sont choisis de manière à préserver l'activité et la stabilité de l'enzyme à extraire (Amersham-Biosciences, 2001; Dennison, 2002). Il s'agira donc dans cette partie de travail d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses pour déterminer les conditions optimales de temps, de pH, de température et de ratio masse de malt/volume de tampon qui induiraient une activité maximale de la dextrinase limite. Ceci selon l'hypothèse : Les conditions de température, de temps, de pH et de ratio masse de malt/volume de tampon optimales à l'extraction de la dextrinase limite du sorgho *Safrari* sont comparables à celles d'autres céréales.

I- MATERIEL ET METHODES

I.1- Matériel

I.1.1- Matériel biologique

Comme matériel biologique, il a utilisé ici le malt vert de sorgho *Safrari* germé dans les conditions optimales définies dans le chapitre précédent (24 h de trempage en milieu alcalin à 25 °C avec changement d'eau et 120 h de germination à 25 °C).

I.1.2- Produits chimiques

Comme produits chimiques employés dans cette partie de travail, l'on a :

- L'acide acétique (CH_3COOH) (PM = 60,05 g/mol; pureté = 96 % ; densité = 1,06 kg/L; (Riedel-de Haën, AG D-3016 Seelze 1)), l'acétate de sodium (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$) (PM = 136,08 g/mol; NORMAPUR, France), l'acide phosphorique (H_3PO_4) (PM = 98 g/mol; d = 1,7; pureté = 85 %) et la soude (NaOH) (en paillette (PM = 40,00 g/mol ; pureté \geq 98% ; CAS. 1310–73–2 ; Lot # 5ZBB2360V ; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA)), qui ont servi à la préparation des solutions tampons acétate et phosphate d'extraction et de détermination de l'activité enzymatique ;
- Le chlorure de calcium ($(\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O})$) : PM = 147,02 g/mol ; pureté = 99 %. Riedel-de-Haën AG), le sérum albumine bovine (SAB), l'acide éthylène diamine tétra-acétique ((EDTA) : PM = 292,25 g/mol), le dithiothréitol ($(\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2)$): D0632-1G; pureté \geq 99 % ; lot # 100M0300V; CAS: 3483-12-3; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA) et l'acide ascorbique (PM = 176,13 g/mol; pureté = 99 %; produit de LABTECH CHEMICAL), utilisés comme additifs d'extraction de la dextrinase limite ;
- Le pullulan (P4516-1G de *Aureobasidium pullulans*; Lot #SLBH6388V; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), est le substrat utilisé pour la détermination de l'activité de la dextrinase limite.

- Le réactif au DNS (2,5 g d'acide dinitrosalicylique +75 g de tartrate double sodium potassium +50 mL de NaOH 2 N pour un volume final de 250 mL), a servi au dosage des sucres réducteurs.

I.1.3- Equipements

La liste des équipements ici utilisés est la suivante :

- Un broyeur manuel (Manual Victoria Grain Mil, Ref. 530025 ; fait par MECANICOS UNIDO S.A.S, Colombie), utilisé pour le broyage du malt vert ;
- Un bain-marie de marque Memmert (type F-Nr 760, Allemagne), un bain-marie de marque HH-S (Digital thermostatic XMTD – 204, Chine) et un incubateur (SHP biochemical incubator), employés comme bain ou enceinte thermostatée au besoin lors de l'extraction et pour le test d'activité enzymatique ;
- Une étuve de marque Memmert (Allemagne) et un incubateur (SHP biochemical incubator), qui ont servis pour les opérations de maltage ;
- Une balance électronique (Denver instrument, Model: APX-3202, max 3200, d=0,01g) et une balance électronique (SCIENTECH, model N°. ZSP 250, max 250, d=0,001g), utilisées au besoin pour les différentes pesées ;
- Un pH-mètre: Model: Consort C863, type: multi parameter analyser; Belgique, employé pour l'ajustement du pH des solutions tampons ;
- Une centrifugeuse de marque Heraeus (Biofuge Primo R, Heraeus, D-375200, Allemagne), utilisée pour les séparations par centrifugation après extraction enzymatique;
- Une plaque chauffante (model N° HB502, fait par BIBBY STERILIN LTD, UK), utilisée pour des chauffages au besoin ;
- Un spectrophotomètre de marque JENWAY (model 7310, UK), a servi pour les dosages colorimétriques ;
- Un frigo de marque BCD-171, utilisé pour la conservation des échantillons et réactifs.

I.1.4- Logiciels

Le logiciel Statgraphics version XV.II (StatPoint, Inc., 2325 Dulles Corner Boulevard, Suite 500, Herndon, Virginia 20171, USA), a été utilisé pour la planification expérimentale et les analyses statistiques ; tandis que le logiciel sigmaplot version 12.5 (Systat Software, Inc., 501 Canal Blvd, Suite E, Point Richmond, CA 94804–2028, USA) et le tableur Excel ont servi aux tracés des courbes.

I.2- Méthodes

I.2.1- Méthodologie générale

L'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite a été menée avec le malt de sorgho *Safrari*, malté dans des conditions optimales. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour déterminer les contributions relatives des facteurs sur l'activité de la dextrinase limite. Le plan d'expériences employé à cet effet a été celui de Doehlert. Ce plan a été choisi parmi plusieurs autres mentionnés dans la partie bibliographie en raison du fait que les facteurs influents ainsi que leur domaine de variation sont connus d'une part; et d'autre part, le nombre d'expériences bien que réduit par rapport à certains autres plans de surfaces de réponses, est suffisant pour une bonne exploration des domaines d'étude et une interprétation claire des résultats avec une précision maximale. Par ailleurs, les expériences étant regroupées en un seul bloc, ceci a contribué à réduire le plus possible les erreurs dues aux facteurs non contrôlés.

Quatre facteurs ont été optimisés à savoir : le temps et la température d'extraction, le pH de la solution tampon d'extraction et le ratio masse de malt/volume de tampon. L'activité de la dextrinase limite a été la réponse suivie. Elle a été déterminée après action de l'extrait enzymatique sur du pullulan, utilisé comme substrat. Après optimisation, l'extraction dans les conditions optimales obtenues a été également menée en présence de certains additifs qui favoriseraient ou pas davantage l'extraction et l'activation de la dextrinase limite, à savoir le

dithiothréitol, l'acide ascorbique, le chlorure de calcium, le sérum albumine bovine et l'acide éthylène diamine tétraacétique.

I.2.2- Procédé de maltage

Le maltage a été conduit dans les conditions optimales obtenues au chapitre II. Spécifiquement, des lots de 150 g de grains de sorgho ont été trempés dans 450 mL de solution de NaOH (Sigma Aldrich, USA) à 0,1 % pour un temps de 24 h avec changement de la solution de trempage après 12 h. Une fois le trempage terminé, les grains ont été étalés sur des sacs perforés en plastique, puis recouverts et disposés dans le noir à l'étuve pour la germination sur une durée de cinq jours. Le trempage et la germination ont été menés à la température de 25 °C. Le malt vert obtenu a été broyé avec ses radicules à l'aide du broyeur manuel (Victoria, Colombie).

I.2.3- Plan d'expériences pour l'extraction

Un plan de Doehlert à quatre facteurs a été utilisé. Les facteurs choisis et leur domaine de variation sont regroupés dans le tableau 3.1. Le choix des facteurs et des bornes de chacun a été fait à partir de leur variabilité dans la bibliographie et de leur importance dans le procédé d'extraction d'enzymes.

Tableau 3. 1: Facteurs d'optimisation de l'extraction et domaines de variation

Facteur	Nom	Abréviation	Unité	Domaine de variation réel	Domaine de variation codé	Réponse : Activité en dextrinase limite
1	Température	T	°C	[4 – 50]	[-1 ; +1]	
2	Potentiel d'hydrogène	pH		[3,5 – 6,5]	[-0,866 ; +0,866]	
3	Ratio m/v		g/mL	[1/10 – 1/3]	[-0,816 ; +0,816]	
4	Temps d'extraction	t	heures	[1 – 24]	[-0,791 ; +0,791]	

Ce plan requiert un nombre d'expériences N :

$$N = k^2 + k + N_0 \quad (3.1)$$

Avec k, le nombre de facteurs et N₀ le nombre de répétitions au centre. Ayant quatre facteurs, il a été choisi une matrice de Doehlert qui générerait :

$N = 4^2 + 4 = 20$ expériences ; avec N₀ = 4 ce qui a fait au total 24 expériences consignées dans le tableau 3.2, où les facteurs sont en valeurs codées et en valeurs réelles.

Tableau 3. 2: Matrice d'expériences de Doehlert

N°essai	Matrice d'expériences (valeurs codées)				Matrice d'expériences (valeurs réelles)			
	X1	X2	X3	X4	X1'	X2'	X3'	X4'
1	1	0	0	0	50	5	6,5	12,5
2	-1	0	0	0	4	5	6,5	12,5
3	0,5	0,866	0	0	38,5	6,5	6,5	12,5
4	-0,5	-0,866	0	0	15,5	3,5	6,5	12,5
5	0,5	-0,866	0	0	38,5	3,5	6,5	12,5
6	-0,5	0,866	0	0	15,5	6,5	6,5	12,5
7	0,5	0,289	0,816	0	38,5	5,5	10,0	12,5
8	-0,5	-0,289	-0,816	0	15,5	4,50	3,0	12,5
9	0,5	-0,289	-0,816	0	38,5	4,50	3,0	12,5
10	0	0,577	-0,816	0	27	6,00	3,0	12,5
11	-0,5	0,289	0,816	0	15,5	5,50	10,0	12,5
12	0	-0,577	0,816	0	27	4,00	10,0	12,5
13	0,5	0,289	0,204	0,791	38,5	5,50	7,4	24
14	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	15,5	4,50	5,6	1
15	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	38,5	4,50	5,6	1
16	0	0,577	-0,204	-0,791	27	6,00	5,6	1
17	0	0	0,612	-0,791	27	5	9,1	1
18	-0,5	0,289	0,204	0,791	15,5	5,50	7,4	24
19	0	-0,577	0,204	0,791	27	4,00	7,4	24
20	0	0	-0,612	0,791	27	5	3,9	24
21	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
22	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
23	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5
24	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5

Avec X1=X1' = Température ; X2=X2' = pH ; X3=X3' = Ratio m/v ; X4=X4' = Temps

Pour une meilleure manipulation des chiffres, les données du ratio ont été utilisées dans le plan non sous forme de fraction [1/10 – 1/3], mais plutôt de chiffres entiers [3 – 10]. Et donc expérimentalement, les valeurs du ratio du tableau 3.2 ont été inversées (par exemple, 6,5 en valeur réelle dans le tableau 3.2 correspond expérimentalement à 1/6,5).

Les opérations de transformation utilisées pour passer des valeurs codées aux valeurs réelles ont été celles de Mathieu et Phan-tan-luu (1997) données par :

$$x_j = \frac{U_j - U_j^0}{\Delta U_j} \quad (3.2)$$

$$\Delta U_j = \left| \frac{U_j^{\min} - U_j^0}{x_j^{\min}} \right| = \left| \frac{U_j^{\max} - U_j^0}{x_j^{\max}} \right| \quad (3.3)$$

$$U_j^0 = \frac{U_j^{\max} + U_j^{\min}}{2} \quad (3.4)$$

De l'équation 3.2, on déduit l'expression de U_j qui est la variable réelle d'intérêt.

$$U_j = x_j \times \Delta U_j + U_j^0 \quad (3.5)$$

Avec : x_j = valeur de la variable codée ; U_j = valeur de la variable réelle ; U_j^0 = valeur de la variable réelle au centre du domaine ; U_j^{\min} = valeur de la variable réelle à la borne inférieure du domaine ; U_j^{\max} = valeur de la variable réelle à la borne supérieure du domaine ; ΔU_j = pas de variation.

Le plan d'expériences généré a conduit à l'obtention d'une équation (modèle) de second degré reliant les facteurs à la réponse grâce au logiciel Statgraphics XV.II. Ce modèle se présente sous sa forme quadratique telle :

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.6)$$

Où : y = réponse mesurée ; x = facteurs ; β_0 = constante ; k = nombre de facteurs ; β_j = coefficients des effets linéaires ; β_{jj} = coefficients des effets quadratiques ; β_{ij} = coefficients

des interactions. Il est à noter que ce sont les valeurs moyennes des réponses des essais (en triplicat) qui ont servies à l'établissement du modèle

I.2.4- Validation du modèle mathématique

Trois méthodes ont servi à la validation du modèle obtenu: La détermination du coefficient de détermination R^2 et du coefficient de détermination ajusté Ra^2 à l'aide du logiciel Statgraphics XV.II ; Le calcul de l'analyse absolue de déviation moyenne (AADM) à l'aide du tableur Excel ; Le calcul des facteurs polarisé (B_f) et d'exactitude (A_{f1}) à l'aide du tableur Excel.

Les valeurs acceptables de R^2 , de AADM, de B_f et de A_{f1} signifient que l'équation du modèle décrirait le comportement réel du système et qu'elle peut être utilisée pour l'interpolation dans le domaine expérimental.

I.2.5- Procédé d'extraction proprement dit

Les conditions d'extraction ont fait l'objet d'une planification expérimentale, étant donné la recherche d'un optimum pour chaque facteur étudié. Ce procédé ainsi que les conditions d'extraction sont résumés à la figure 3.1.

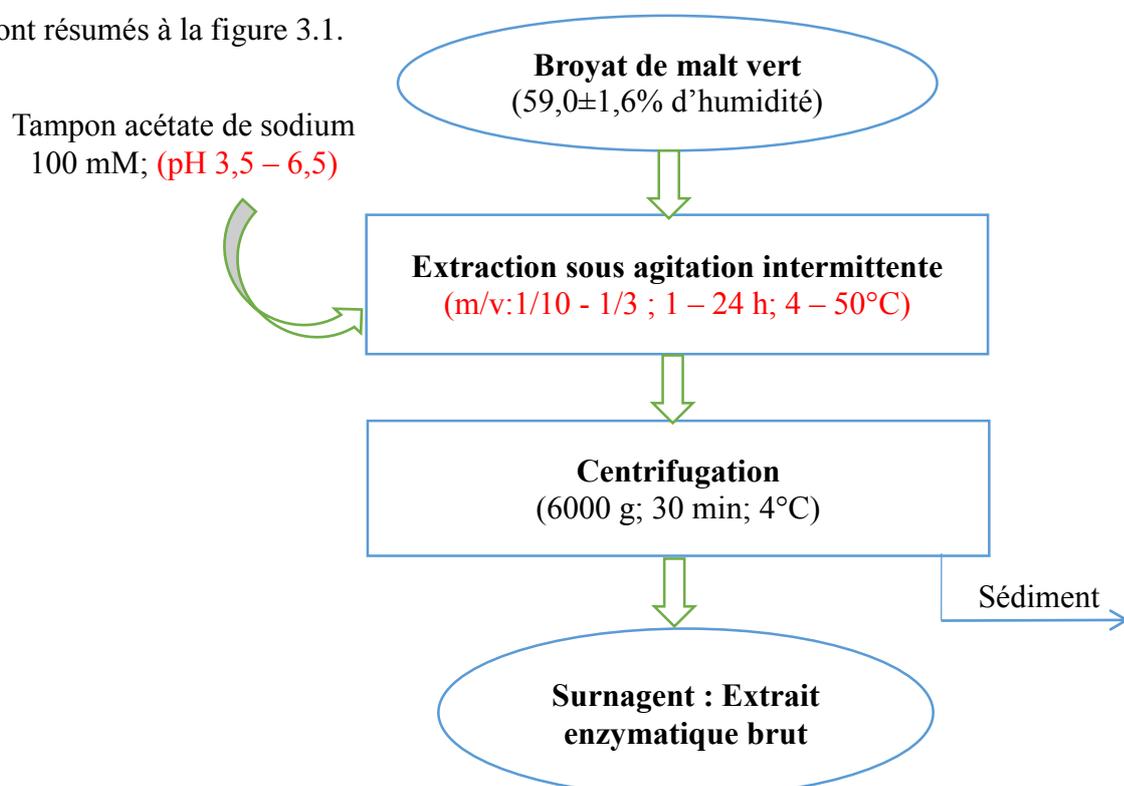


Figure 3. 1 : Procédé d'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite

Le tampon acétate a été utilisé dans la plage de pH allant de 3,5 à 5,5 ; tandis le tampon phosphate a été utilisé pour la préparation des tampons à pH 3,0 ; 6,0 et 6,5.

I.2.6- Méthode de test d'activité de la dextrinase limite

L'activité de la dextrinase limite a été déterminée par dosage des sucres réducteurs issus de l'action de la dextrinase limite sur le pullulan, avec la méthode au DNS de Fischer et Stein (1961) telle que décrite au chapitre 2. Les essais ont été faits en triplicat.

L'activité enzymatique ici est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère une μmol de maltose équivalent du pullulan en une minute à 37 °C et s'exprime en U/mL.

I.2.7- Etude des effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl_2 , le SAB et l'acide ascorbique sur l'extraction et l'activation de la dextrinase limite

Comme mentionné dans la partie bibliographique, certains composés peuvent aider à l'extraction et l'activation enzymatique ainsi qu'à la caractérisation de l'enzyme. Dans ce travail, cinq composés ont été étudiés notamment :

- Des antioxydants: le dithiothréitol (DTT) à 1 mM et l'acide ascorbique à 5 mM ;
- Un inhibiteur de métaux: l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 1 mM ;
- Un cofacteur: les ions Ca^{2+} dans le chlorure de calcium (CaCl_2) à 5 mM ;
- Un agent stabilisateur: le sérum albumine bovine (SAB) à 10 mg/mL.

Il faut noter que les concentrations de ces composés ont été choisies en fonction des doses minimales et optimales recommandées et présentées dans la partie bibliographique (Chapitre I).

II- RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats ont été obtenus par implémentation des 24 essais du plan d'expériences de Doehlert (tableau 3.2), avec comme réponse suivie l'activité enzymatique de la dextrinase limite. La matrice d'expérimentation correspondante est présentée au tableau 3.3.

II.1- La modélisation

Les résultats du tableau 3.3 ont servi à l'établissement du modèle mathématique (Yact) traduisant l'activité de la dextrinase limite en fonction de la température, du pH, du ratio m/v et du temps d'extraction.

Tableau 3. 3: Matrice d'expérimentation pour l'extraction de la dextrinase limite

Expériences	Matrice d'expériences (valeurs codées)				Matrice d'expériences (valeurs réelles)				Réponse (Activité en dextrinase limite (mU/mL))
	X1	X2	X3	X4	X1'	X2'	X3'	X4'	
1	1	0	0	0	50	5	6,5	12,5	10,8±0,0
2	-1	0	0	0	4	5	6,5	12,5	94,2±6,0
3	0,5	0,866	0	0	38,5	6,5	6,5	12,5	5,8 ±0,5
4	-0,5	-0,866	0	0	15,5	3,5	6,5	12,5	12,4±0,0
5	0,5	-0,866	0	0	38,5	3,5	6,5	12,5	1,9±0,0
6	-0,5	0,866	0	0	15,5	6,5	6,5	12,5	35,1±0,0
7	0,5	0,289	0,816	0	38,5	5,5	10,0	12,5	1,2±0,0
8	-0,5	-0,289	-0,816	0	15,5	4,50	3,0	12,5	64,1±4,4
9	0,5	-0,289	-0,816	0	38,5	4,50	3,0	12,5	42,8±0,0
10	0	0,577	-0,816	0	27	6,00	3,0	12,5	29,5±1,4
11	-0,5	0,289	0,816	0	15,5	5,50	10,0	12,5	58,7±0,0
12	0	-0,577	0,816	0	27	4,00	10,0	12,5	8,1±0,0
13	0,5	0,289	0,204	0,791	38,5	5,50	7,4	24	22,0±0,0
14	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	15,5	4,50	5,6	1	99,2±14,2
15	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	38,5	4,50	5,6	1	80,3±0,0
16	0	0,577	-0,204	-0,791	27	6,00	5,6	1	13,5±0,0
17	0	0	0,612	-0,791	27	5	9,1	1	74,9±0,0
18	-0,5	0,289	0,204	0,791	15,5	5,50	7,4	24	35,9±0,0
19	0	-0,577	0,204	0,791	27	4,00	7,4	24	0,4±0,0
20	0	0	-0,612	0,791	27	5	3,9	24	56,0±0,0
21	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	127,4±0,0
22	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	134,3±0,0
23	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	143,2±0,0
24	0	0	0	0	27	5	6,5	12,5	134,7±0,0

Le modèle obtenu s'écrit comme suit :

$$Y_{act} = 0,135 - 0,031X_1 - 0,001X_2 - 0,014X_3 - 0,024X_4 - 0,085X_1^2 - 0,011X_1X_2 - 0,020X_1X_3 + 0,012X_1X_4 - 0,133X_2^2 + 0,015X_2X_3 + 0,055X_2X_4 - 0,098X_3^2 - 0,031X_3X_4 - 0,076X_4^2 \quad (3.7)$$

Avec X_1 : Température ; X_2 : pH ; X_3 : Ratio m/v ; X_4 : Temps

Modèle polynomial d'ordre 2 avec interactions, qui a été validé d'après les données du tableau 3.4.

Tableau 3. 4: Paramètres de validation du modèle "Yact"

	Abréviation	Valeur obtenue	Plages acceptables
Coefficient de détermination	R^2	96,92%	≥ 92 % (Goupy & Creighton, 2006)
Coefficient de détermination ajusté	R^2a	92,30%	≥ 80 % (Joglekar & May, 1987)
Analyse Absolue de Déviation Moyenne	AADM	0,04	[0-0,3] (Baş & Boyaci, 2007)
Facteur de Biais	Bf	1,02	[0,75-1,25] (Dalgaard & Jørgensen, 1998)
Facteur d'exactitude	Afi	1,03	[0,75-1,25] (Dalgaard & Jørgensen, 1998)

Les paramètres de validation du modèle 'Yact' rentrant dans les plages standards, ce modèle est valide et reflèterait le comportement réel de l'activité de la dextrinase limite en fonction des facteurs dans leur plage d'étude. A cet effet, une simulation mathématique pourrait donc être entreprise en vue de comprendre le comportement de chaque facteur par rapport à la réponse. Par ailleurs, pour une meilleure évaluation et interprétation de l'influence des facteurs et des interactions entre facteurs sur la réponse, une analyse statistique a été effectuée.

II.2- Analyse statistique

Les éléments d'analyse statistique sont la table d'ANOVA (tableau 3.5), qui a renseigné sur les probabilités d'influence des facteurs et de leur interaction au niveau de confiance de 95 % d'une part, et les graphes traduisant les effets de chaque facteur pris individuellement d'autre part (le graphe de l'effet de chaque facteur étant obtenu en maintenant les autres facteurs au centre du domaine d'étude en valeurs codées).

Tableau 3. 5: Analyse de la variance

Source	Coefficients	Somme des carrés	ddl	Moyenne quadratique	Rapport F	Probabilité
X ₁ :Température	-0,03	0,00471325	1	0,00471325	26,80	0,0006
X ₂ :pH	-0,001	0,000006331	1	0,000006331	0,04	0,8537
X ₃ :Ratio	-0,014	0,000935196	1	0,000935196	5,32	0,0465
X ₄ :temps	-0,024	0,00294938	1	0,00294938	16,77	0,0027
X ₁ X ₁	-0,085	0,00952569	1	0,00952569	54,17	0,0000
X ₁ X ₂	-0,011	0,0000931129	1	0,0000931129	0,53	0,4853
X ₁ X ₃	-0,020	0,000246747	1	0,000246747	1,40	0,2665
X ₁ X ₄	0,012	0,0000865582	1	0,0000865582	0,49	0,5007
X ₂ X ₂	-0,133	0,0237315	1	0,0237315	134,96	0,0000
X ₂ X ₃	0,015	0,000131867	1	0,000131867	0,75	0,4090
X ₂ X ₄	0,055	0,00167828	1	0,00167828	9,54	0,0129
X ₃ X ₃	-0,098	0,0143274	1	0,0143274	81,48	0,0000
X ₃ X ₄	-0,031	0,000523437	1	0,000523437	2,98	0,1186
X ₄ X ₄	-0,076	0,00970069	1	0,00970069	55,17	0,0000
Erreur totale		0,00158257	9	0,000175841		
Total (corr.)		0,0513865	23			

D'après les valeurs des probabilités de la table d'ANOVA, 08 effets (en gras) ont des probabilités inférieures à 0,05 ; ce qui signifie qu'ils sont statistiquement significatifs au niveau de confiance de 95 %. Ces effets sont : la température, le ratio et le temps d'extraction, les effets

quadratiques des quatre facteurs étudiés (temps, température, pH et ratio) et l'interaction pH-temps d'extraction. A partir de l'équation du modèle et de la table d'ANOVA, le tableau 3.6 est établi, ceci pour apprécier le sens de l'influence de chaque effet ayant présenté un impact significatif (positif ou négatif), ainsi que la contribution de chacun (calculé par rapport à la somme en valeur absolue de tous les coefficients du modèle).

Tableau 3. 6: Effets influents

Effet	X ₁ :Température	X ₃ :Ratio	X ₄ :temps	X ₁ X ₁	X ₂ X ₂	X ₂ X ₄	X ₃ X ₃	X ₄ X ₄
Probabilité	0,0006	0,0465	0,0027	0,0000	0,0000	0,0129	0,0000	0,0000
Contribution (%)	5,1	2,3	4,0	14,0	22,0	9,0	16,2	12,5

L'on peut déduire des tableaux 3.5 et 3.6 que tous les facteurs qui ont une influence significative (à l'exception de l'interaction pH-temps d'extraction) le sont dans le sens négatif (signe des coefficients), ce qui signifie que leur augmentation (effets simples X₁, X₃, X₄) ou leur excès (effets quadratiques X₁X₁, X₂X₂, X₃X₃, X₄X₄) concoure à inhiber l'extraction et/ou l'activation de la dextrinase limite; tandis que l'interaction pH-temps d'extraction (X₂X₄) a l'effet inverse. Examinons chacun de ces facteurs de plus près.

II.2.1- Effet de la température d'extraction (X₁)

Il est présenté à la figure 3.2 l'effet de la température d'extraction sur l'activité de la dextrinase limite. D'après cette figure, on observe d'une part une augmentation non significative d'activité de la dextrinase limite avec l'augmentation de la température d'extraction puis d'autre part, une diminution significative d'activité suite à l'augmentation continue de la température. En effet, l'on part d'une activité de 0,081 U/mL à 4 °C pour atteindre la valeur maximale de 0,137 U/mL à 22,4 °C ; suivi d'une diminution d'activité jusqu'à 0,019 U/mL à 50 °C.

L'accroissement d'activité avec l'augmentation de la température serait dû à l'augmentation de la quantité de dextrinase limite extraite avec l'élévation de température. En effet, l'élévation de la température accroît l'énergie cinétique des molécules (Hejnaes *et al.*, 1998) et par ricochet, la vitesse des échanges entre le solvant (solution tampon) et le soluté (malt). Plus il y a échange, plus la dextrinase limite serait extraite avec pour conséquence directe l'augmentation de sites actifs disponibles pour la fixation du substrat, d'où l'accroissement d'activité enzymatique.

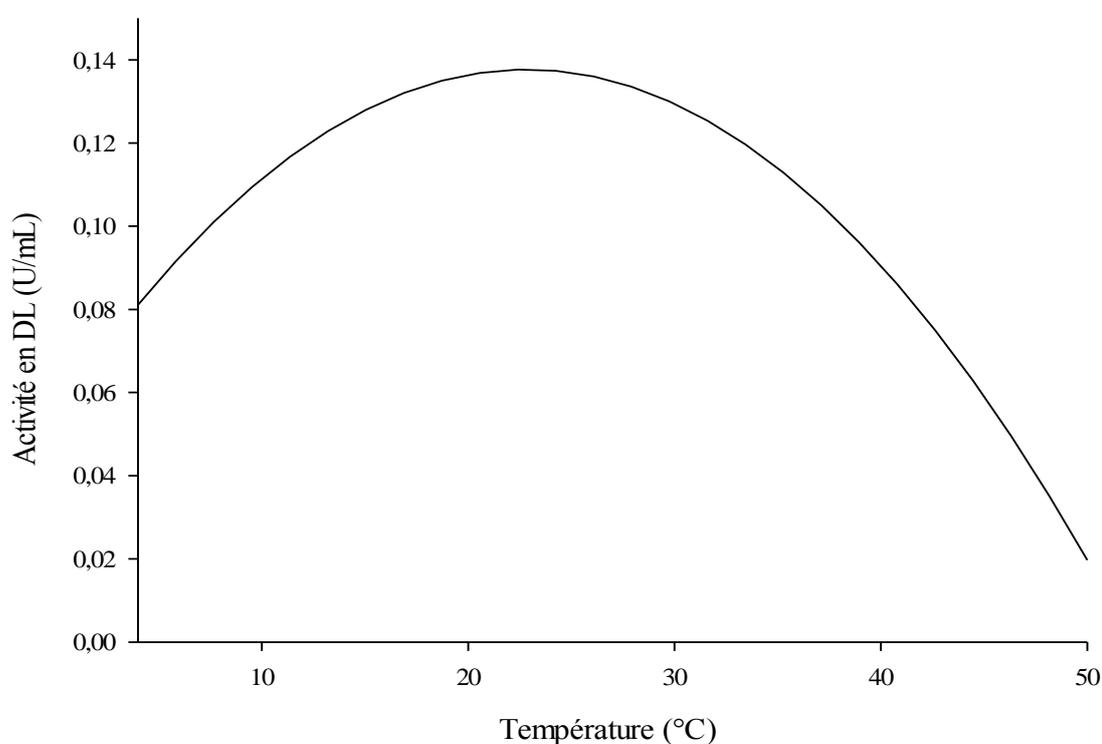


Figure 3. 2: Evolution de l'activité de la dextrinase limite en fonction de la température d'extraction (ratio : 1/6,5; temps : 12,5 h ; pH 5,0)

Par contre, la chute d'activité observée par la suite serait due à la dénaturation progressive de l'enzyme extraite à ces températures. En effet, bien que la vitesse des échanges soit améliorée avec l'accroissement de la température, l'augmentation des vibrations moléculaires générée conduirait à la rupture des liaisons de faible énergie telles les liaisons ioniques, les liaisons

hydrogènes, et même des liaisons covalentes tels les ponts dissulfures ; celles-ci rentrant dans la préservation de la structure tertiaire des enzymes (donc de leur activité) et même de leur stabilité (Hejnaes *et al.*, 1998; Illanes, 2008a; Kotzia *et al.*, 2012). De ce fait, même si l'enzyme est extraite aux fortes températures, elle serait dénaturée et donc non fonctionnelle. Ce résultat est similaire à ceux de Rajagopal *et al.* (2009), qui ont montrés que l'augmentation de la température d'incubation décroît la production d'enzymes ; et rejoint également les travaux de Hejnaes *et al.* (1998) qui ont montrés que pendant que la température augmente, la vitesse des réactions enzymatiques croît également, mais en même temps, il y a une inactivation progressive de l'enzyme, qui est de plus en plus prononcée au fur et à mesure que la température augmente.

II.2.2- Effet du ratio masse de malt (g)/volume de tampon (mL) (X₃)

La figure 3.3 présente la variation de l'activité de la dextrinase limite en fonction du ratio m/v (rapport masse de malt/volume de solution tampon). Il faut relever que ce sont les inverses des chiffres entiers en abscisse qui ont été employés comme ratio; par exemple, la valeur 6 en abscisse correspond au ratio 1/6 dans la pratique. Par conséquent, le ratio de la gauche vers la droite diminue.

Il en ressort que l'activité de la dextrinase limite augmente de façon non significative avec la diminution du ratio jusqu'à un seuil au-delà duquel la diminution continue du ratio entraîne également une diminution cette fois-ci significative de l'activité enzymatique pendant l'extraction. En effet, l'on part d'une activité de 0,080 U/mL au ratio 1/3 pour atteindre la valeur maximale de 0,135 U/mL au ratio 1/6 ; suivi d'une diminution d'activité jusqu'à 0,058 U/mL au ratio 1/10. De ce fait, malgré l'importance du rapport solide/liquide dans les procédés d'extraction, des rapports extrêmes sont défavorables pour le cas particulier des extractions enzymatiques.

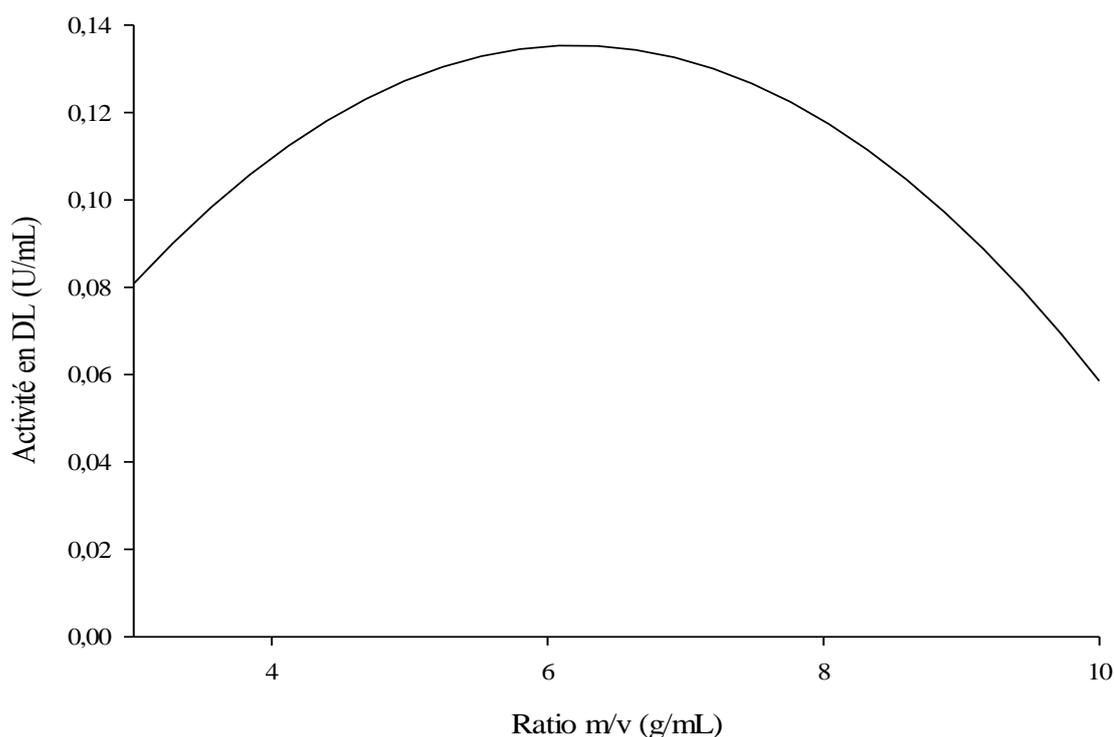


Figure 3. 3 : Activité de la dextrinase limite en fonction du ratio m/v d'extraction (température: 27 °C ; pH 5,0 ; temps : 12,5 h)

En effet, les ratios élevés limitent la vitesse de transfert de matière (Tucker, 1995). Par ailleurs, il y a également saturation du milieu en soluté, avec une augmentation de la quantité de matière en suspension, ce qui rend difficile la solubilisation des protéines avec pour conséquence l'aggrégation de celles-ci et donc l'absence d'activité (Hejnaes *et al.*, 1998; GE-Healthcare, 2010).

De très faibles ratios par contre ont un effet destabilisateur sur l'enzyme (Tucker, 1995). Par ailleurs, un excès de solvant diminue la concentration enzymatique dans le milieu; et ceci limite à son tour la probabilité de rencontre de l'enzyme avec le substrat (Hejnaes *et al.*, 1998). Dans une autre mesure, une extrême dilution de l'enzyme dans le milieu réactionnel peut conduire à une perte d'activité due soit à l'instabilité de l'enzyme suite à une faible concentration en protéines, soit à la dissociation de ses sous-unités, ce qui la rend inactive

(Fiechter, 1983; Scopes, 1987; Tipton, 2002; GE-Healthcare, 2010). Une autre conséquence de l'effet de dilution c'est la dissociation des cofacteurs, indispensables à l'activité de l'enzyme (Tipton, 2002). Ces résultats sont similaires à ceux de (Amid *et al.*, 2014), sur l'extraction de l'amylase des épiluchures du dragonnier (*Hylocereus polyrhizus*), et sont également compatibles avec le principe de transfert de matière où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2002).

II.2.3- Effet du temps d'extraction (X₄)

Il ressort des tableaux 3.6 et 3.7 que le temps d'extraction et son effet quadratique ont un impact significatif et négatif. Par conséquent, de longues durées d'extraction ne seraient pas favorables au maintien de l'activité de la dextrinase limite extraite. En effet, de longues durées d'extraction peuvent causer la perte d'activité en raison soit de la technique d'extraction qui peut être dénaturante pour les enzymes avec le temps (agitation, chauffage, oxydation en présence d'oxygène), soit à la libération progressive des protéases dans le milieu (Scopes, 1987). Cependant, à la figure 3.4, l'on peut observer qu'il existe une plage pour laquelle l'augmentation du temps d'extraction accroît de façon non significative l'activité de la dextrinase limite. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'augmentation du temps accroît la durée de contact entre le malt et le tampon, ce qui favoriserait davantage l'extraction. Cependant, cette plage reste très minime par rapport à celle où il y a baisse d'activité avec le temps ; d'où l'effet global négatif dû au temps d'extraction. En effet, l'on part d'une activité de 0,106 U/mL après 1h d'extraction, pour atteindre la valeur maximale de 0,136 U/mL après 10 h d'extraction ; suivi d'une diminution d'activité jusqu'à 0,068 U/mL après 24 h d'extraction.

Des résultats similaires ont été obtenus par Mehrnoush *et al.* (2014), sur l'extraction de l'amylase des épiluchures du dragonnier (*Hylocereus polyrhizus*).

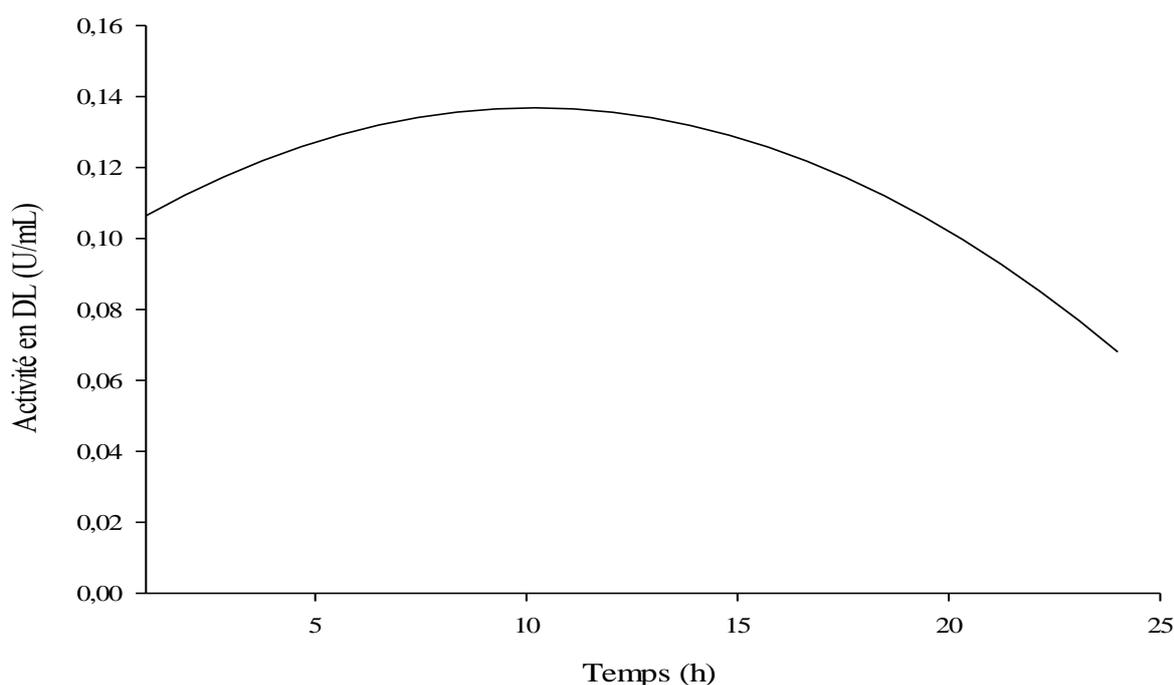


Figure 3. 4: Activité de la dextrinase limite en fonction du temps d'extraction (température : 27 °C; pH 5,0 ; ratio : 1/6,5)

II.2.4- Effet de l'interaction pH-temps d'extraction (X_2X_4)

Bien que le pH n'ait pas un impact significatif ($P > 0,05$) sur l'activité de la dextrinase limite pendant l'extraction, son impact devient significatif en prenant en compte le temps d'extraction, ceci de façon positive ($P_{X_2X_4} < 0,05$). Ce qui signifie que l'accroissement simultané de ces deux facteurs accroît l'activité de la dextrinase limite au cours de l'extraction. Afin de mieux visualiser l'effet de cette interaction, la courbe de surface de réponses (figure 3.5) a été utilisée à cet effet. Il ressort de la figure 3.5 que l'augmentation simultanée, de même que la diminution simultanée de ces deux facteurs (jusqu'à 4,9 pour le pH, et jusqu'à 10,2 h pour le temps) contribuent à augmenter l'activité en dextrinase limite.

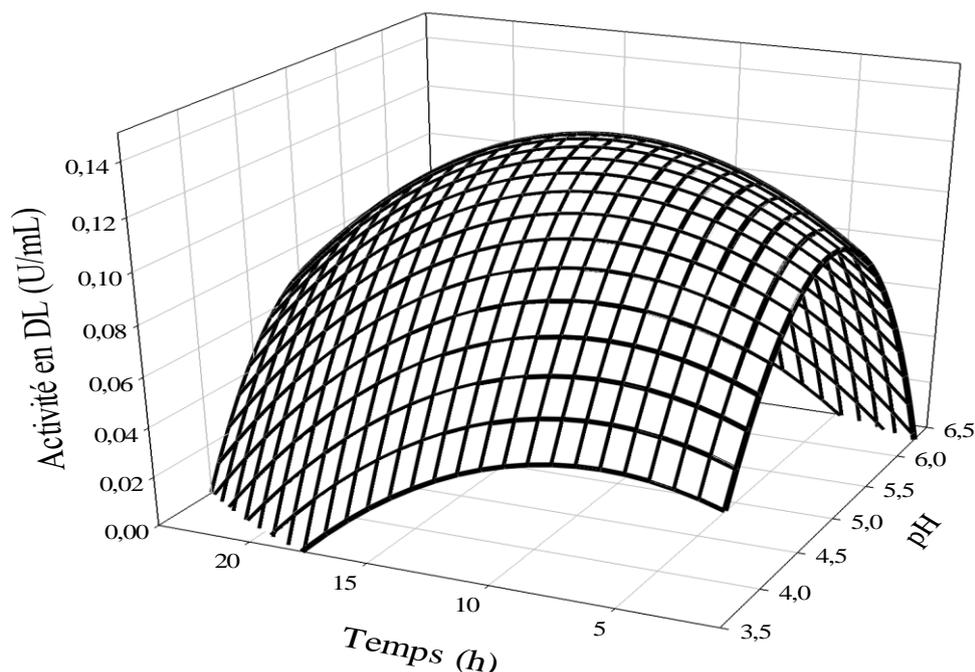


Figure 3. 5: Courbe de surface de réponse de l'activité en DL en fonction du pH et du temps (ratio : 1/6,5 ; température : 27 °C)

Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que le temps peut être un facteur favorable à l'extraction de la dextrinase limite si les conditions de pH, entre autre, propices à l'extraction et à la stabilisation de l'enzyme sont réunies d'une part, et d'autre part, le temps peut être à la défaveur du maintien de l'activité et de la stabilité de l'enzyme si les conditions de pH entre autre sont dénaturantes et/ou déstabilisantes pour l'enzyme. Les enzymes en effet sont des molécules amphotères renfermant des groupements acides et basiques chargés. Ces charges varient en fonction du pH environnant (Hejnaes *et al.*, 1998; Illanes *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2013). Les variations de charge avec le pH affectent l'activité de l'enzyme, sa stabilité structurelle et même sa solubilité. Par ailleurs, des pH extrêmes pour l'enzyme causeront avec le temps des dénaturations irréversibles (Hejnaes *et al.*, 1998; Illanes *et al.*, 2008).

Des essais d'explications étant donné sur le comportement des facteurs qui ont présentés une influence statistiquement significative sur l'extraction de la dextrinase limite, il s'est agit

par la suite de trouver les valeurs optimales exactes de ces facteurs où la dextrinase limite serait le mieux extraite de façon active.

II.3- L'optimisation de l'extraction de la dextrinase limite

Le logiciel Statgraphics version XV.II, a permis de faire ressortir les conditions d'extraction optimales de la dextrinase limite pour chaque facteur étudié tel que présentées au tableau 3.7. L'on observe dans ce tableau que les conditions optimales de température, de pH, de ratio masse de malt/volume de tampon et de temps pour l'extraction non dénaturante et maximale de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* sont respectivement de 23 °C, pH 5, ratio 5/32 pour un temps de 10 h. Ceci conduit à une activité enzymatique maximale théorique de 0,140 U/mL.

Tableau 3. 7: Points optimaux des facteurs pour l'extraction de la dextrinase limite

Facteur	Niveau bas	Niveau haut	Optimum en valeurs codées	Optimum en valeurs réelles
Température (°C)	-1,0	1,0	-0,189868	22,63 ≈ 23
pH	-0,866	0,866	-0,0352808	4,93 ≈ 5
Ratio m/v (g/mL)	-0,816	0,816	0,0242621	1/6,4 = 5/32
Temps d'extraction (Heure)	-0,791	0,791	-0,182701	9,84 ≈ 10

Activité de la dextrinase limite (U/mL)	
Optimum théorique	Optimum expérimental
0,140	0,106 ± 0,001

La vérification de l'activité optimale théorique en dextrinase limite qui est de 0,140 U/mL a donné la valeur expérimentale de 0,106 ± 0,001 U/mL. Près de 76 % d'activité sont retrouvées expérimentalement. Cette différence avec l'activité optimale théorique serait due aux approximations faites sur les valeurs optimales théoriques des facteurs (tableau 3.7). En effet,

l'appareillage employé ne permettait pas de manipuler les valeurs théoriques optimales exactes et prédites des facteurs lors de la vérification expérimentale.

L'optimum de température de 23 °C obtenu ici se rapproche de 24 °C utilisée pour l'extraction de la dextrinase limite dans le sorgho de variété *Kafficorn*, par Hardie *et al.* (1976) d'une part, et de l'orge par Kristensen *et al.* (1998) et Heisner et Bamforth (2008) d'autre part. Par ailleurs, cette température optimale de 23 °C n'est pas tout aussi éloignée des températures ambiantes qui se trouvent généralement autour de 24 °C. Par conséquent, l'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* pourrait être menée à température ambiante (voir même entre 20 et 30 °C d'après la figure 3.2) sans la nécessité d'apporter de l'énergie sous forme de chaleur, ou d'en enlever pour générer le froid (sauf en conditions climatiques extrêmes), ce qui réduit le coût du procédé.

L'optimum de pH d'extraction s'est situé à 5,0, valeur optimale qui s'accorde aux résultats de Hardie *et al.* (1976) avec la dextrinase limite du sorgho *Kafficorn* d'une part, et d'autre part, avec la dextrinase limite de l'orge d'après les travaux de Longstaff et Bryce (1993) et de Kristensen *et al.* (1998). Cet optimum s'allie également à celui recommandé par McCleary (1992) pour l'extraction de la dextrinase limite dans les malts de céréales. Cependant, à l'exception de Hardie *et al.* (1976), les auteurs précédemment cités ont mené l'extraction en présence d'agents réducteurs et ont utilisé des substrats synthétiques (kits enzymatiques) pour le test d'activité. Leur optimum de pH est donc conforme à l'assertion de McCafferty *et al.* (2004) (ayant aussi fait l'usage de substrat synthétique) selon laquelle le pH optimum d'activité de la dextrinase limite en présence d'agents réducteurs est de 5,0 - 5,5. Toutefois, l'optimum obtenu ici en conditions naturelles (avec le pullulan naturel comme substrat) intègre les plages de pH de brassage de bières en brasserie, comprises entre 5,0 et 5,6 (Sissons *et al.*, 1992; Macgregor, 1996; Briggs, 1998). Aussi, l'utilisation de substrat naturel va en droite ligne des conditions d'exploitation potentielle du malt de sorgho *Safrari* tant comme matière première

brassicole, que comme source d'enzymes dans les procédés de transformation de l'amidon dont les plages de pH sont de 4,5 – 5,5 (Synowiecki, 2007).

Le ratio optimal de 5/32 se rapproche de la valeur de 1/5 utilisée par Heisner et Bamforth (2008) avec l'orge. L'extraction optimale de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* requièrerait donc une dilution modérée. Ce ratio est également comparable à ceux employés pour le brassage des bières de sorgho compris entre 1/5 (Desobgo *et al.*, 2011a; b; c) et 1/6 (Igyor *et al.*, 2001; Nso *et al.*, 2003).

Toutefois, pour des applications technologiques, il serait plus intéressant d'avoir des plages de valeurs de facteurs permettant d'obtenir une activité enzymatique relativement acceptable ; d'où l'importance de la courbe d'iso-réponses en fonction de l'interaction entre le pH et le temps (seule interaction significative ici), mais cette fois-ci aux optima de ratio et de température respectivement de 5/32 et 22,63 °C (Figure 3.6).

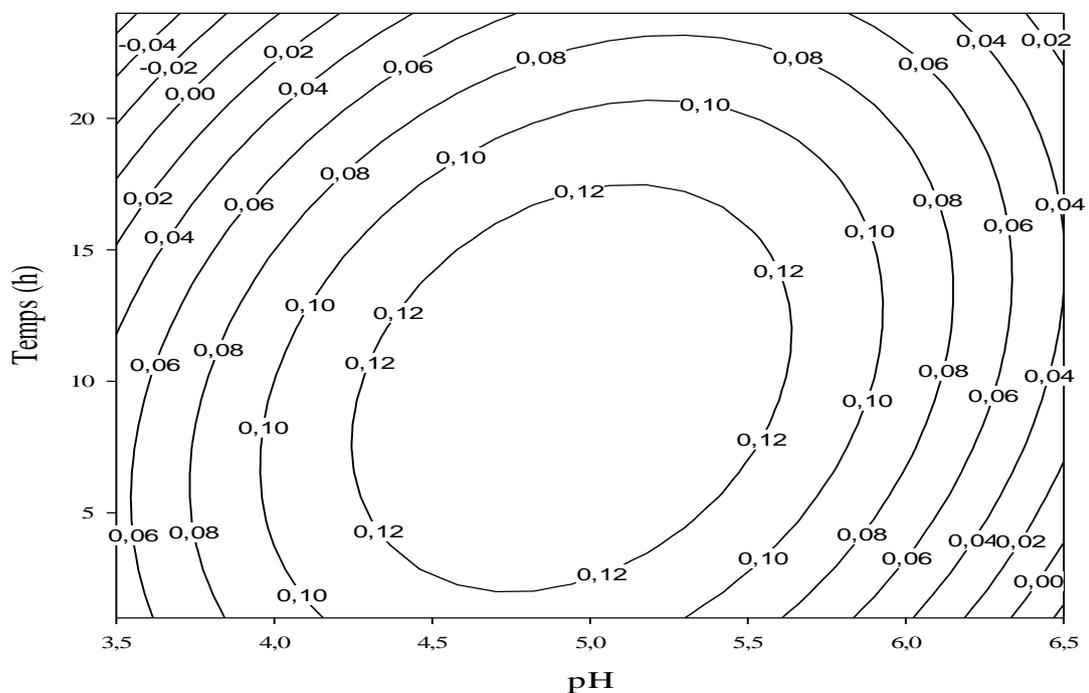


Figure 3. 6 : Courbe d'iso-réponse de l'activité en dextrinase limite en fonction du pH et du temps (ratio : 5/32 ; température : 22,63 °C)

Il en ressort que pour avoir une activité en dextrinase limite supérieure ou égale à 0,10 U/mL, le temps d'extraction est compris entre 3 h et 20 h, tandis que le pH se situe entre 4,0 et 5,8 ; ceci pour le ratio m/v optimum de 5/32 et la température optimale de 22,63 °C. Il faut tout de même relever que le modèle mathématique liant l'activité de la dextrinase limite aux facteurs d'extraction étant valide, celui-ci reste malléable dans les plages de variation des facteurs en vue d'éventuelles adaptations technologiques pratiques.

Il faut relever qu'avec l'existence de diverses méthodes de test d'activité des enzymes amylolytiques, les problèmes d'expression de l'activité enzymatique sont courants, ce qui rend les comparaisons entre différents extraits enzymatiques à quelques exceptions près, impossibles (Hamer, 1995). Par ailleurs, étant donné que les activités des amylases dépendent significativement de la nature du substrat et de la façon avec laquelle le test d'activité est mené, les activités respectives d'auteurs différents ne pourront être comparées que si exactement les mêmes substrats sont utilisés dans les mêmes conditions (Bernfeld, 1951). C'est dans ce sens que cette partie de travail a pu être comparée aux travaux de Nirmala *et al.* (2000), dont les conditions de test d'activité se rapprochent du notre (Tableau 3.8). La différence notable entre le présent travail et celui de Nirmala *et al.* (2000) se situe au niveau du sucre réducteur standard utilisé pour le test d'activité d'une part, et d'autre part au niveau de la durée du test. Toutefois, l'activité de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait d'environ 10 fois celui du millet malté. Ceci pourrait expliquer le fait que bien que le millet soit également une céréale très répandue en zone tropicale, son faible potentiel enzymatique ne lui permettrait pas d'être exploité en industrie brassicole comme c'est le cas avec le sorgho.

Tableau 3. 8: Comparaison d'activités et des conditions de tests d'activité de la dextrinase limite entre les extraits bruts du sorgho et du millet maltés, utilisant le pullulan naturel comme substrat

Céréale	Substrat	Méthode de dosage des sucres réducteurs	Conditions de test d'activité	Définition de l'activité de la dextrinase limite	Valeur de l'activité en dextrinase limite	Auteur
Sorgho <i>Safrari</i> malté	Pullulan naturel	Méthode au DNS de Fischer et Stein (1961)	Acétate de sodium pH 5,0 ; 37 °C ; 30 min	Quantité d'enzyme qui libère 1 µmol de maltose équivalent du pullulan par minute à 37 °C, pH 5,0	0,42 U	Présent travail
Millet malté	Pullulan naturel	Méthode au DNS de Miller (1959)	Acétate de sodium pH 4,6 ; 35 °C ; 2 h	Quantité d'enzyme qui libère 1 µmol de maltotriose par minute à 35 °C, pH 4,6	≈ 0,04 U	(Nirmala <i>et al.</i> , 2000)

II.4- Effet de quelques additifs sur l'extraction de la dextrinase limite

Comme présenté dans la partie bibliographie, certains composés peuvent soit favoriser l'extraction complète de la dextrinase limite, soit inhiber l'enzyme au cours du processus d'extraction. Quelques-uns d'entre eux ont été étudié à savoir l'acide ascorbique et le dithiothréitol (DTT) comme agents antioxydants, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) comme inhibiteur de métalloenzymes, le chlorure de calcium comme cofacteur, et le sérum albumine bovine comme stabilisateur. La figure 3.7 en donne les résultats, par comparaison à l'extrait sans additifs (contrôle).

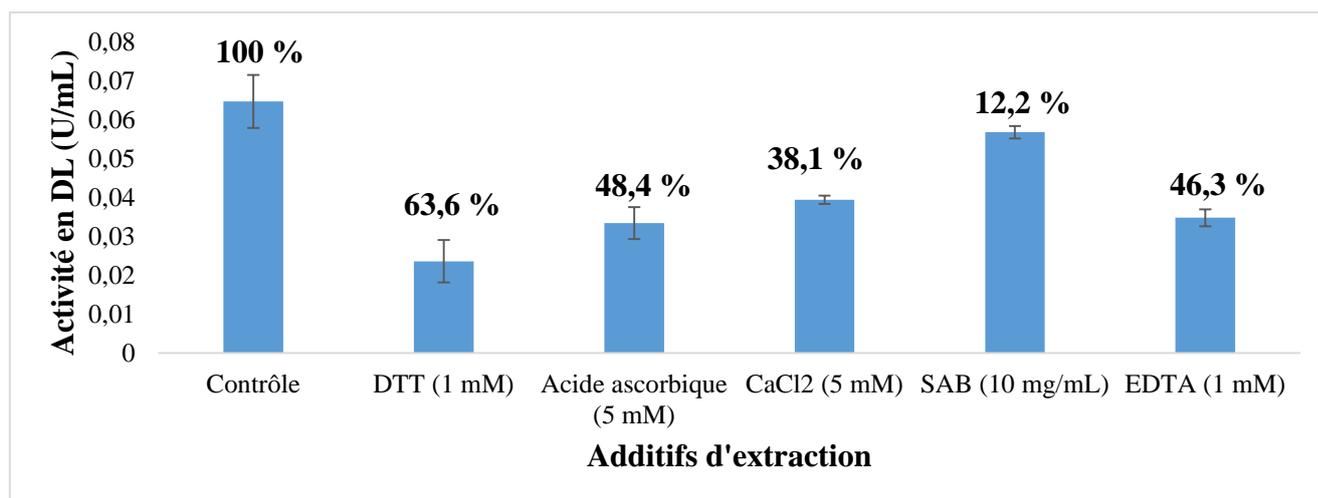


Figure 3. 7 : Effet de certains additifs sur l'extraction de la dextrinase limite

L'on peut remarquer ici (Figure 3.7) qu'aucun additif ne permettrait d'améliorer l'extraction de la dextrinase limite; au contraire, une baisse est notoire et varie de 12 % à 63 %.

D'après ces résultats, tout porte à croire que, que ce soit des antioxydants ou stabilisateur ou cofacteur ou chélateur de métaux, tous seraient inhibiteurs pour l'extraction de la dextrinase limite.

En effet, les agents réducteurs (antioxydants) aident à maintenir les protéines à l'état réduit en empêchant l'oxydation des groupements sulfhydriles chez les enzymes qui en possèdent (Amersham-Biosciences, 2001; Laing & Christeller, 2004). Il semblerait que, soit la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* n'en possède pas, soit celle-ci ne serait pas en partie liée à des inhibiteurs par des ponts disulfures où un environnement réducteur permettrait la libération de la dextrinase limite par rupture de ces ponts (Yamada, 1981b; Longstaff & Bryce, 1993) et donc son activation. Par conséquent, la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* ne serait pas une enzyme sulfhydrile. La baisse d'activité en dextrinase limite observée pourrait s'expliquer par le fait de l'inhibition par rupture des ponts dissulfures des cys-protéines (qui seraient synthétisées pendant la germination) par des composés sulfhydriles (agents réducteurs utilisés ici) en présence d'oxygène (Scopes, 1987). D'après Longstaff et Bryce (1993), les cys-protéines permettraient l'activation de la dextrinase limite par des modifications

protéolytiques. Aussi, un éventuel effet inhibiteur dû à la technique de test d'activité enzymatique (utilisation du pullulan naturel comme substrat et dosage des sucres réducteurs formés par la méthode au DNS) employée dans ces conditions n'est pas à exclure.

La baisse d'activité en présence d'EDTA voudrait signifier que la dextrinase limite nécessiterait pour son activation pendant l'extraction, la présence d'ions métalliques divalents. Cependant, les ions calcium ne seraient pas indiqués en raison de la baisse d'activité observée également en leur présence. Par ailleurs, Rothe (1994) a mentionné qu'il est parfois nécessaire de baisser la concentration en calcium en deçà de 10^{-7} mol.L⁻¹ dans la mesure où des concentrations au-delà peuvent faire varier l'activité de certaines enzymes; cela serait le cas ici (concentration de CaCl₂ de 5 mM) où la variation aurait consisté en la diminution d'activité pendant l'extraction de la dextrinase limite. Kristensen *et al.* (1998) ont également observé une baisse d'activité de la dextrinase limite de 15 % pendant l'extraction avec l'orge maltée en présence d'EDTA.

Il est reconnu pour ce qui est du SAB d'avoir un effet stabilisateur pour certaines enzymes; mais cela ne fut pas le cas ici où il y a eu plutôt baisse d'activité de l'ordre de 12 % pendant l'extraction. Heisner et Bamforth (2008) ont également observé une baisse d'activité de la dextrinase limite en présence de SAB avec l'orge, d'environ 25 %.

CONCLUSION PARTIELLE

Il a été question dans cette partie de travail d'utiliser la MSR pour optimiser les paramètres d'extraction de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Il en est ressorti que les conditions optimales d'extraction (23 °C ; 10 h ; pH 5,0 ; ratio masse de malt/volume de tampon de 5/32) ont été comparables à celles de bien des auteurs avec d'autres céréales et même le sorgho. La comparaison faite avec le millet a montré que le potentiel en dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait de loin supérieur à celui-ci. Par ailleurs, avec la MSR, l'on a également pu montrer que l'on pouvait avoir pour les facteurs étudiés, des plages de variation permettant d'atteindre un optimum d'activité. Le secteur brassicole a été tout particulièrement prisé pour l'exploitation de ces différentes plages, ce qui a démontré encore l'intérêt d'utilisation du sorgho dans ce secteur d'activité. Aussi, la non-nécessité à utiliser des additifs d'extraction limite les coûts de procédé. Néanmoins, une caractérisation complète de la dextrinase limite nécessite qu'elle soit débarrassée d'impuretés pouvant gêner la connaissance de son comportement en temps réel lorsqu'on celle-ci devra être appliquée seule dans les procédés nécessitant son action spécifique et unique. D'où l'intérêt de purifier la dextrinase limite, objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 4 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA DEXTRINASE LIMITE DU MALT DE SORGHO SAFRARI

RESUME

La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* a été purifiée par maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium suivie de la dialyse. Cette purification a conduit à un extrait partiellement purifié dont le rendement était de 75 % pour un facteur de purification de 6,5. Les caractéristiques de la dextrinase limite ainsi purifiée sont les suivantes : pH optimum d'activité et de stabilité de 5,0 – 5,5 ; température optimale d'activité et de stabilité de 50 – 60 °C. Les paramètres cinétiques sont de 0,03 mg⁻¹.mL⁻¹.sec⁻¹ et de 2,4 mg.mL⁻¹ respectivement pour V_{max} et K_m. La dextrinase limite est une enzyme sulfhydrile et son activité est améliorée en présence d'acide ascorbique; mais aussi en présence de sérum albumine bovine ou de chlorure de calcium. La filtration des brassins de sorgho est améliorée en présence de dextrinase limite exogène.

Mots clés : Dextrinase limite ; Purification ; Activité enzymatique.

INTRODUCTION

La purification des enzymes amylolytiques endogènes au malt de sorgho a concernée pour la plupart des travaux l' α - et la β -amylase (Beleia & Marston, 1981; Mundy, 1982; El Nour & Yagoub, 2010), mais pour ce qui est de la dextrinase limite, seuls les travaux de Hardie *et al.* (1976) ont porté sur de telles investigations en Afrique du Sud. Ceux-ci ont eu en effet à purifier la dextrinase limite de la variété de sorgho *Kaffircorn*. Toutefois, les techniques de purification des enzymes sont connues et pour ce qui est du cas particulier de la dextrinase limite à partir des céréales, ces techniques vont des méthodes de précipitation simple (au sulfate d'ammonium) aux techniques chromatographiques sophistiquées. Celles-ci tournent essentiellement autour de deux schémas principaux : la précipitation au sulfate d'ammonium suivie de l'électrophorèse continue puis de la gel-filtration (Manners & Yellowlees, 1971; Manners & Rowe, 1971; Dunn *et al.*, 1973; Hardie *et al.*, 1976) d'une part, et d'autre part la précipitation au sulfate d'ammonium suivie des techniques chromatographiques diverses (Masuda *et al.*, 1987; McCleary, 1991; Sissons *et al.*, 1992). Ces techniques de purification à l'exception de la précipitation au sulfate d'ammonium sont de haute résolution, aboutissant le plus souvent à des extraits purifiés jusqu'à homogénéité. Or, les enzymes utilisées à l'échelle industrielle sont généralement purifiées par des techniques de faible résolution à l'instar de la précipitation au sulfate d'ammonium, n'aboutissant pas nécessairement à des extraits totalement purifiés (Taylor & Leach, 1995; Bamforth, 1999; Khattak *et al.*, 2015). Le but de cette partie de travail est donc de purifier la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* par précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse. Plus précisément, il s'agira de :

- Maximiser la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium, suivi de la dialyse pour la purification ;
- Caractériser la dextrinase limite ainsi purifiée ;
- Evaluer l'action de la dextrinase limite purifiée sur la filtrabilité des brassins de sorgho.

Ceci selon les hypothèses :

- La précipitation au sulfate d'ammonium suivi de la dialyse permettent d'obtenir un extrait en dextrinase limite partiellement purifié ;
- Les caractéristiques de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* sont comparables à celles d'autres céréales ;
- La dextrinase limite permet d'améliorer la filtrabilité des brassins de sorgho.

I- MATERIEL ET METHODES

I.1- Matériel

I.1.1- Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué d'extrait enzymatique brut du malt vert de sorgho *Safrari* malté et extrait dans les conditions optimales précédemment définies.

I.1.2- Produits chimiques

Comme produits chimiques employés dans cette partie de travail, l'on a :

- L'acide acétique (CH_3COOH) (PM = 60,05 g/mol; pureté = 96 % ; densité = 1,06 kg/L; (Riedel-de Haën, AG D-3016 Seelze 1)) l'acétate de sodium (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$) (PM = 136,08 g/mol ; NORMAPUR, France), et la soude (NaOH) (en paillette (PM = 40,00 g/mol ; pureté $\geq 98\%$; CAS. 1310 – 73 – 2 ; Lot # 5ZBB2360V ; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA)), qui ont servis à la préparation des solutions tampon acétate et phosphate d'extraction et d'étude de l'effet du pH sur l'activité de la dextrinase limite ;
- Le chlorure de calcium (CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$) : PM = 147,02 g/mol ; pureté = 99 %. Riedel-de-Haën AG), le sérum albumine bovine (SAB), l'acide éthylène diamine tétra-acétique ((EDTA) : PM = 292,25 g/mol)) et l'acide ascorbique (PM = 176,13 g/mol; pureté = 99 %; produit de LABTECH CHEMICAL), ont été utilisés comme effecteurs d'activité de l'enzyme purifiée ;
- Le pullulan (P4516-1G de *Aureobasidium pullulans*; Lot #SLBH6388V; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), et le kit enzymatique Megazyme K-PullG6 (Megazyme Bray Business Park, Bray; Co. Wicklow, A98 YV29, Irlande (353,1) 286 1220), utilisés comme substrats pour la détermination de l'activité de la dextrinase limite ;

- Le réactif au DNS (2,5 g d'acide dinitrosalicylique +75 g de tartrate double sodium potassium +50 mL de NaOH 2 N pour un volume final de 250 mL) utilisé pour le dosage des sucres réducteurs.
- Le sodium dodécyle sulfate ((SDS) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) : PM = 288,38 g/mol ; RECTAPUR PROLABO 12, rue perlée F 75 011 Paris, France), le Folin – Ciocalteu (DC PANREAC QUIMICA SAU, Barcelone, Espagne), le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$): produit de MAISONS – ALFORT), le tartrate double de sodium et de potassium 4-hydrate ($(\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$): PM = 282,23 g/mol ; pureté = 99 %. BURGOYNE Reagents, Inde), et le carbonate de sodium (Na_2CO_3): PM = 105,99 ; BDH Analar Chemicals Ltd. Poole Angleterre), utilisés pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (1951) ;
- Le Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$): PM = 121,14 g/mol ; pureté = 99,5 %; PROLABO, utilisé dans la méthode de détermination de l'activité de la dextrinase limite au kit Megazyme.
- L'amidon pure (S9765-100G ; CAS. 9005-84-9 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; Lot # 010M0027V; Sigma Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), utilisé comme substrat pour la la détermination de K_m et V_{max} ;
- L'iode (I_2) (Thermo Fisher Scientific, Inc. Geel – Belgique) et l'iodure de potassium (KI) (PM = 166,00 g/mol; pureté = 99,5 %; produit N°: 06624; batch N° 30920. BURGOYNE Reagents, Inde), utilisés pour la préparation du réactif iodé employé dans la détermination de K_m et V_{max} avec l'amidon comme substrat ;
- Le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$): PM = 132,14; AR, Chine., utilisé comme sel pour la purification par précipitation.

I.1.3- Equipements

La liste des équipements ici utilisés est la suivante :

- Un bain-marie de marque Memmert (type F-Nr 760, Allemagne) et un bain-marie de marque HH-S (Digital thermostatic XMTD – 204, Chine) utilisés comme bains ou enceintes thermostatées au besoin lors de la purification et pour le test d'activité enzymatique ;
- Un incubateur (SHP biochemical incubator), utilisé comme enceinte thermostatée à 4 °C pour la précipitation au sulfate d'ammonium et le procédé de dialyse, et à 25 °C pour le maltage du sorgho employé dans l'application de la dextrinase limite ;
- Une balance électronique (SCIENSTECH, model N°. ZSP 250, max 250, d=0,001g), utilisée au besoin pour les différentes pesées ;
- Un pH-mètre: Model: Consort C863, type: multi parameter analyser; Belgique, utilisé pour l'ajustement du pH des solutions tampons ;
- Une centrifugeuse de marque Heraeus (Biofuge Primo R, Heraeus, D-375200, Allemagne), utilisée pour les séparations après extraction enzymatique, précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse;
- Une plaque chauffante (model N° HB502, fait par BIBBY STERILIN LTD, UK), utilisée pour des chauffages au besoin ;
- Un spectrophotomètre de marque JENWAY (model 7310, UK), utilisé pour les dosages colorimétriques ;
- Un frigo de marque BCD-171, utilisé pour la conservation des échantillons et réactifs ;
- Une membrane cellulosique tubulaire de dialyse, de seuil de coupure de 11311 daltons et de 33 mm de largeur. Sigma Aldrich D 9652 ; batch # 3110 ;
- Un broyeur manuel: Manual Victoria Grain Mil, Ref. 530025 ; fait par MECANICOS UNIDO S.A.S, Colombie, utilisé pour le broyage du malt employé pour la préparation des brassins de sorgho ;
- Un tamis de 1 mm de taille de maille, utilisé pour le tamisage des malts de sorgho employés pour l'application de la dextrinase limite;

- Une étuve à séchage convectif de marque Memmert, fabriquée en Allemagne, utilisée ici pour le séchage des malts de sorgho employés dans l'application de la dextrinase limite ;
- Du papier filtre Whatman No. 1 (Ø 90 mm) de Whatman, GE Healthcare UK Ltd., UK, utilisé pour la filtration des brassins de dorgho.

I.1.4- Logiciels

Le logiciel sigmaplot version 12.5 (Systat Software, Inc., 501 Canal Blvd, Suite E, Point Richmond, CA 94804–2028, USA) et le tableur Excel ont servi aux tracés des courbes.

I.2- Méthodes

I.2.1- Méthodologie générale

Le procédé de purification a été conduit par maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium, suivi de la dialyse. Une fois l'enzyme purifiée, s'en est suivi la caractérisation enzymatique notamment, la détermination de la température et du pH optimum d'activité et de stabilité, la détermination des propriétés catalytiques K_m et V_{max} , et l'évaluation de l'activité de la dextrinase limite en présence de certains effecteurs. Relevons que deux méthodes de test d'activité en dextrinase limite ont été employées ici pour des mesures de comparaison : le test au pullulan naturel et le test au kit Megazyme K-PullG6 (utilisant un substrat synthétique spécifique à la dextrinase limite). Enfin, l'ajout de la dextrinase limite purifiée à des brassins de sorgho à différentes concentrations a permis de jauger de l'applicabilité et de l'efficacité de celle-ci en tant qu'enzyme exogène en complément dans les procédés brassicoles en particulier.

I.2.2- Procédé d'extraction de la dextrinase limite

L'extraction a été menée dans les conditions optimales définies au chapitre 3. En effet, 100 g de broyat de malt vert ont été pesés et mélangés à 640 mL de tampon acétate (100 mM, pH 5,0), pré-équilibré à 23 °C au bain-marie (HH-S, Chine). L'ensemble a été homogénéisé et

laisser au repos à 23 °C pour extraction pendant 10 h avec agitation lente pendant cinq secondes toutes les heures. Après extraction, l'ensemble a été centrifugé à 6000 g pendant 30 minutes à 4 °C à l'aide de la centrifugeuse Heraeus (Biofuge Primo R, Allemagne) ; puis le surnageant a été récupéré et a constitué l'extrait enzymatique brut. L'utilisation du kit enzymatique K-PullG6 exigeant la présence de dithiothréitol pendant l'extraction, celle-ci a été menée comme précédemment décrite à la seule différence que le tampon acétate de sodium utilisée pour l'extraction contenait 10 mM de DTT (Sigma Aldrich, USA), et non 25 mM tel que préconisée par la méthode du kit Megazyme. En effet, des essais préliminaires ont montré l'absence de différence statistiquement significative d'activité en dextrinase limite des extraits bruts extraits avec des concentrations en DTT de 10 mM et de 25 mM.

I.2.3- Purification de la dextrinase limite

La purification de la dextrinase limite partant de l'extrait enzymatique brut a suivi le procédé détaillé à la figure 4.1, avec comme opérations unitaires principales la précipitation au sulfate d'ammonium et la dialyse.

I.2.3.1- La précipitation au sulfate d'ammonium

La maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium a été faite en variant les pourcentages de saturation de l'extrait enzymatique brut de 20 % à 90 % m/v. L'on a au tableau 4.1 les quantités en gramme de sulfate d'ammonium à ajouter à 1 L de solution pour obtenir le pourcentage désiré d'après Scopes (1987).

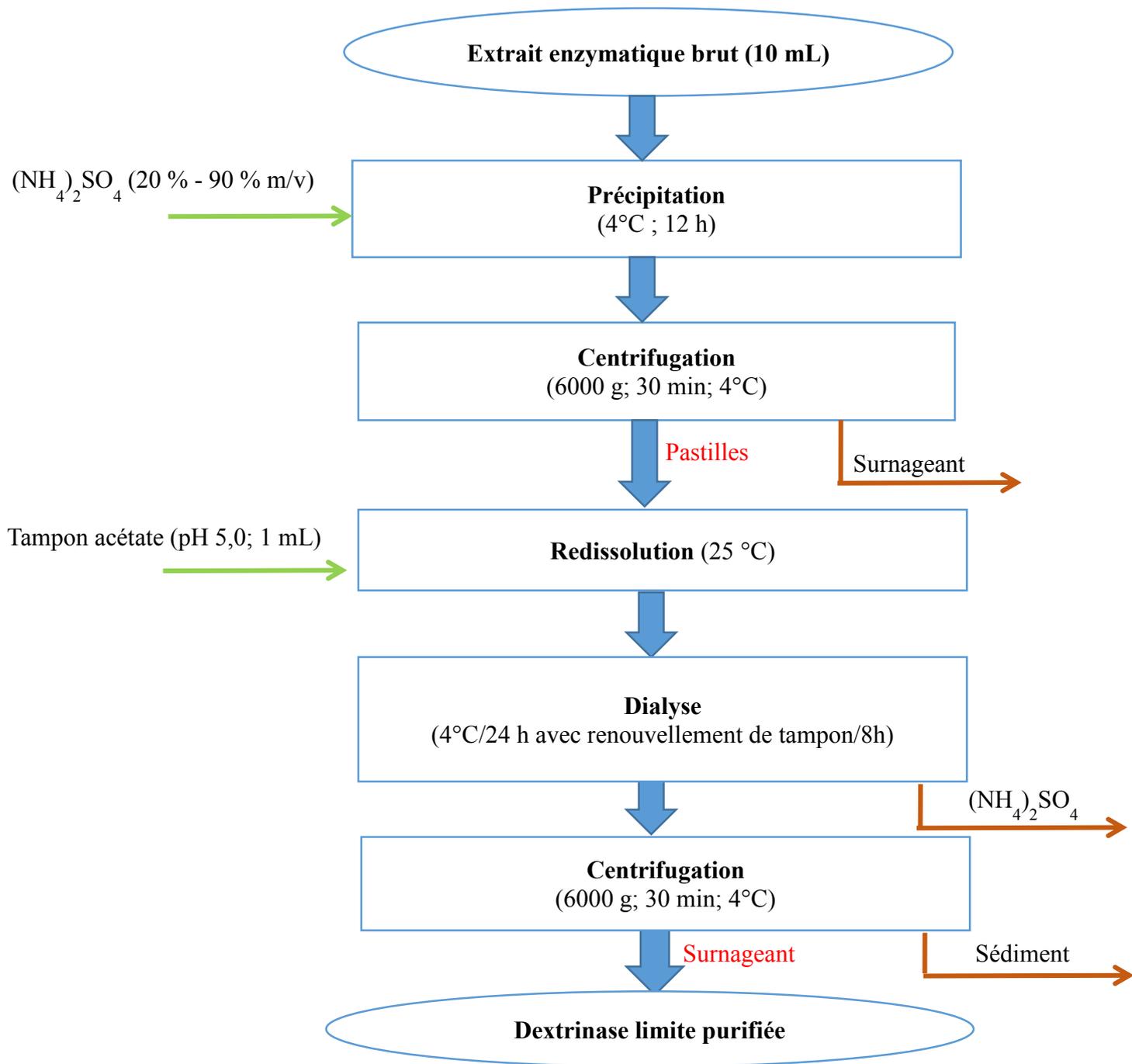


Figure 4. 1 : Procédé de purification de la dextrinase limite

Tableau 4. 1: Quantité de sulfate d'ammonium en grammes à ajouter à 1L d'extrait enzymatique (Scopes, 1987)

De S ₁ (0 %)								
à S ₂ (%)	20	30	40	50	60	70	80	90
Masse de sulfate d'ammonium (g)	113	176	242	314	390	472	561	657

S : solution ; dix mL d'extrait enzymatique ont été utilisés à chaque essai et le précipité après centrifugation a été solubilisé en utilisant 1 mL de solution tampon.

Le sulfate d'ammonium (AR, Chine) a été ajouté lentement dans l'extrait enzymatique pré-équilibré à 4 °C dans un incubateur (SHP biochemical incubator), en agitant pour éviter de fortes concentrations zonales qui pourraient causer la précipitation des protéines non désirées.

I.2.3.2- La dialyse à l'équilibre

La dialyse est une technique de purification qui permet de séparer les composés en fonction de leur taille. Elle utilise des membranes perméables aux molécules et aux ions et imperméables aux macromolécules et de ce fait, est généralement utilisée pour le retrait des sels, des solvants organiques, etc. (Scopes, 1987, 1995; Dennison, 2002).

Principe : la technique de séparation est basée sur la diffusion sélective des composés à travers une membrane semi perméable (Scopes, 1987; Sattayasai, 2012).

Méthode : l'échantillon à dialyser (60 mL) est introduit dans le sac de dialyse (seuil de coupure de 11311 daltons et de 33 mm de largeur ; Sigma Aldrich) ; ceci est placé dans un récipient contenant une grande quantité (1 L) de solution tampon acétate de sodium (100 mM, pH 5,0). Les ions et les molécules de petite taille (< 11311 daltons) (sels, solvant organiques, sucres, acides aminés) vont diffuser de l'intérieur du sac de dialyse vers l'extérieur; les macromolécules telles que les protéines seront conservées à l'intérieur de la membrane. La séparation a été menée pendant 24 h à 4 °C dans un incubateur (SHP biochemical incubator), avec changement de la solution tampon de dialyse toutes les huit heures afin d'accélérer le processus de diffusion.

I.2.4- Détermination de l'activité de la dextrinase limite

La détermination de l'activité de la dextrinase limite a été faite par deux méthodes : la méthode au pullulan naturel tel que décrite au chapitre 3 d'une part, et la méthode au kit enzymatique de Megazyme décrivant le dosage de la dextrinase limite dans les malts de céréales (Megazyme, 2016).

I.2.4.1- Test d'activité de la dextrinase limite par la méthode au pullulan naturel

Voir chapitre 2, paragraphe I.2.2.7.

I.2.4.2- Test d'activité de la dextrinase limite par la méthode au kit Megazyme

D'après Megazyme, le substrat (synthétique) du kit, le K-PullG6 est hautement spécifique pour le test d'activité de la dextrinase limite et n'est attaqué par aucune autre enzyme amylolytique, notamment l' α -amylase, la β -amylase, l' α -glucosidase et enfin, l'amyloglucosidase.

Principe : le réactif K-PullG6 est composé du substrat 4,6-O-benzylidène-4-nitrophenyl-6³- α -D-maltotriosyl-maltotriose (BPNPG3G), couplé avec les enzymes ancillaires α -glucosidase et β -glucosidase. Au cours de l'hydrolyse de ce substrat au niveau des liaisons α -1,6 par la dextrinase limite, il y a libération du 4-nitrophenyl- β -maltotriose, qui est immédiatement à son tour hydrolysé en glucose et en 4-nitrophenol par les actions concertées de l' α -glucosidase et la β -glucosidase présentes dans le milieu. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution alcaline diluée (tampon Tris-HCl, pH 9,0) qui permet le développement des ions phénolates. L'absorbance de la réaction est lue à 400 nm et les valeurs obtenues sont directement corrélées à l'activité de la dextrinase limite.

Méthode : le substrat K-PullG6 (0,10 mL) est introduit dans des tubes à essai et ceux-ci sont pré-incubés à 40 °C pendant 5 minutes. L'extrait de dextrinase limite est également pré-incubé

à 40 °C pendant 5 minutes. A chaque tube contenant le substrat K-PullG6 (0,10 mL), 0,1 mL d'extrait de dextrinase limite pré-incubé est ajouté tout au fond. L'ensemble est incubé à 40 °C pendant exactement 30 minutes. Les 30 minutes achevées, 1,5 mL de tampon Tris (2 % m/v) pH 9,0 est ajouté à chaque tube et agité vigoureusement. Les absorbances des solutions et du blanc (préparé par ajout de tampon Tris dans 0,1 mL de substrat K-PullG6, après quoi est ajouté l'extrait enzymatique) sont lues contre de l'eau distillée.

Expression des résultats : une unité enzymatique est définie ici comme étant la quantité d'enzyme qui en présence d'un excès d' α -glucosidase et de β -glucosidase thermostables, est nécessaire pour libérer une micromole de 4-nitrophenol du substrat BPNPG3G en une minute dans les conditions définies par le test).

L'activité A_{DL} de la dextrinase limite (en U/g de malt) est:

$$A_{DL} = \frac{\Delta A_{400}}{Temps} \times \frac{VTte}{Vpe} \times \frac{1}{\epsilon_{mM}} \times \frac{Vext}{Mm} \times D \quad (4.1)$$

Avec :

ΔA_{400} = absorbance de la réaction – absorbance du blanc

Temps d'incubation = 30 minutes

VTte (Volume total dans le tube à essai) = 1,7 mL

Vpe (Volume de la prise d'essai) = 0,1mL

ϵ_{mM} du *p*-nitrophenol (à 400 nm) dans 2 % de tampon Tris = 18,1

Mm = masse de malt

Volume d'extraction (V_{ext}) = volume de tampon utilisé pour l'extraction

D = facteur de dilution de l'extrait enzymatique de départ.

I.2.5- Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles permet ici d'exprimer la pureté de l'extrait enzymatique à chaque étape de purification de par son intervention dans le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme. L'activité enzymatique spécifique est généralement exprimée en unité d'enzyme par masse de protéines totales (U/mg). La détermination des teneurs en protéines solubles a été faite avec la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Principe : la liaison peptidique des protéines réagit avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) en milieu alcalin pour produire l'ion cuivreux (Cu^+). Ce dernier réduit le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange de tungstate de sodium, de molybdate et de phosphate). Le résultat de la réaction est le développement d'une coloration bleue foncée qui dépend en partie de la teneur en tyrosine et tryptophane de la protéine. La cystéine, la cystine et l'histidine participent également à la réaction (Dennison, 2002; Noble & Bailey, 2009). L'intensité de la coloration bleue est quantifiée par une absorbance à 660 nm.

Procédure : la teneur en protéines des échantillons a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions de concentration connue de sérum albumine bovine (SAB) (figure 3a en annexe 6). Les résultats sont exprimés en mg de protéine par mL. Le tableau 4.2 présente la procédure de préparation des solutions stocks de SAB à différentes concentrations; solutions dont les valeurs de concentrations ont été par la suite utilisées pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Tableau 4. 2: Solutions stocks de SAB pour l'étalonnage des protéines

SAB (4 mg/mL)	0	25	62,5	125	250	625	1250	2500
en μL								
Eau (mL)	5	4,98	4,94	4,88	4,75	4,38	3,75	2,5
Concentration en protéines ($\mu\text{g/mL}$)	0	20	50	100	200	500	1000	2000

Pour les dosages proprement dits, à 1 mL de chaque solution stock d'une part et d'échantillon à doser d'autre part contenus dans des tubes à essai, 1 mL de solution alcaline de cuivre est ajouté, les tubes sont agités et laissés au repos pendant 10 minutes. Ensuite, 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (DC Panreac Quimica, Espagne) est ajouté à chaque tube, l'ensemble est agité et incubé dans le noir pendant 30 minutes. Après incubation, les contenus des tubes sont à nouveau homogénéisés avant la lecture des absorbances à 660 nm au spectrophotomètre. Les essais ont été faits en triplicat.

La solution de Folin-Ciocalteu a été préparée en diluant 10 mL de Folin-Ciocalteu dans 50 mL d'eau distillée.

La solution alcaline de sulfate de cuivre a été obtenue en mélangeant une part de solution de sulfate de cuivre (Maisons-Alfort) à une part de solution de SDS (Rectapur Prolabo, France) à 5 %, et à deux parts de solution de NaOH (Sigma Aldrich, USA) à 3,2 %.

La solution de sulfate de cuivre a été préparée en mélangeant lentement deux solutions A et B.

Solution A : 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 100 mg de tartrate double de sodium et de potassium dissouts dans 25 mL d'eau distillée.

Solution B : 5 g de Na_2CO_3 (BHD Analar Chemicals, Angleterre) dissouts dans 25 mL d'eau distillée.

I.2.6- Le tableau de purification

Le tableau de purification sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification (GE-Healthcare, 2010). Plusieurs termes le constituent :

Le facteur de purification, qui est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique par rapport à la première étape, durant chacune des autres étapes de la procédure.

Normalement, cette valeur croit au fur et à mesure que l'on passe d'une étape de purification à une autre; la purification ayant pour but d'obtenir une protéine de plus en plus pure avec une préparation enzymatique dont l'activité spécifique est de plus en plus élevée.

Le rendement de purification, qui est la proportion en %, de la quantité d'enzyme purifiée par rapport à la quantité de protéine initiale. Le rendement diminue à chaque étape puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matière à chacune.

Pour construire un tel tableau, on dose à chaque étape de purification la quantité de protéines totales et l'activité de l'enzyme en question. Les valeurs du volume (mL), de l'activité enzymatique totale (U/mL) et de la concentration protéique (mg/mL) sont mesurées expérimentalement et sont utilisées pour le calcul des autres termes du tableau. Les calculs sont effectués comme suit:

$$AET = A \times V \quad (4.2)$$

$$AE_{sp} = \frac{A}{T_{prot}} \quad (4.3)$$

$$Rdt = \left(\frac{AET_i}{AET_0} \right) \times 100 \quad (4.4)$$

$$Fp = \frac{AE_{sp_i}}{AE_{sp_0}} \quad (4.5)$$

Avec : **AET** : Activité enzymatique totale (U) ; **A** : Activité (U/mL) ; **V** : volume (mL) ;

AEsp : Activité enzymatique spécifique (U/mg) ; **Tprot** : Teneur en protéines (mg/mL) ;

Rdt : Rendement de purification (%) ; **AET_i** : Activité enzymatique totale après l'étape i de purification (i = 1, 2,n) ; **AET₀** : Activité enzymatique totale initiale ; **Fp** : Facteur de purification ; **AEsp_i** : Activité enzymatique spécifique après l'étape i de purification (i = 1, 2,n) ; **AEsp₀** : Activité enzymatique spécifique initiale

I.2.7- Détermination du pH optimum d'activité et de stabilité

Pour la détermination du pH optimum d'activité et de stabilité de la dextrinase limite, les solutions enzymatiques ont été incubées à des pH variant de 3,0 à 6,5 en utilisant le tampon acétate de sodium à 100 mM (pour les pH de 3,5 – 5,5), et le tampon phosphate à 100 mM (pour les pH 3,0 ; 6,0 ; 6,5). Les tests d'activité au kit et au pullulan ont été conduits. Le test d'activité au pullulan a été conduit comme décrit au chapitre 2. Le test au kit a également été conduit comme décrit précédemment, à la seule différence ici que 1 mL de tampon au pH correspondant au test a été ajouté dans le milieu avant réaction enzymatique. Pour déterminer le pH de stabilité de la dextrinase limite, les extraits enzymatiques (0,1 mL) ajoutés de 1 mL de tampon acétate au pH correspondant ont été incubés sur une durée de 90 minutes à 40 °C. Après quoi le substrat du kit (0,1 mL) y a été ajouté pour le test d'activité.

I.2.8- Détermination de la température optimale d'activité et de stabilité

L'effet de la température sur l'activité de la dextrinase limite a été étudié en faisant varier la température d'activité enzymatique de 20 °C à 70 °C. Les tests d'activité au pullulan et au kit ont été menés en incubant les milieux réactionnels aux températures d'étude. Le tampon acétate lorsque cela était nécessaire (test au pullulan) était à 100 mM pH 5,0.

La stabilité thermique de la dextrinase limite a été évaluée en incubant l'extrait enzymatique (0,1 mL) aux températures de 50 à 65 °C pendant 90 minutes, barèmes température/temps généralement employés pour le brassage des moûts en brasserie (Dewar, 1997). Les 90 minutes d'incubation achevées, les extraits ont été refroidis à 40 °C pour le test d'activité avec la méthode du kit Megazyme K-PullG6.

I.2.9- Détermination des propriétés catalytiques K_m et V_{max}

Les constantes cinétiques K_m et V_{max} ont été déterminées par linéarisation de l'équation de Michaélis-Menten en utilisant la représentation graphique de Lineweaver-Burk ; ceci selon

le protocole décrit par Dicko (2006). Cette détermination passe par l'étude de la vitesse d'hydrolyse de l'amidon par la dextrinase limite en fonction de la concentration en substrat (amidon).

Principe de détermination de la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'amidon par la dextrinase limite : l'iode (I_2) interagit avec l'amidon pour donner une coloration bleue qui absorbe à une longueur d'onde de 580 nm. L'hydrolyse de l'amidon par la dextrinase limite donne les dextrans linéaires et des résidus d'oligosaccharides. Cela conduit à la décoloration du milieu réactionnel suite à la diminution de l'amidon et donc une baisse de l'absorbance à 580 nm. La préparation des milieux réactionnels est présentée au tableau 4.3.

Expression des résultats : les courbes des densités optiques en fonction du temps ($f(DO) = t$) pour chaque essai sont tracées et les vitesses initiales, qui sont les coefficients directeurs des droites obtenues en conditions initiales sont déterminées.

Tableau 4. 3: Préparation des milieux réactionnels à différentes concentrations en amidon

N° de tube	Blanc T=0	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5	T=6
Amidon (1 mg/mL) en mL)	0	0,02	0,04	0,8	0,12	0,16	0,20
Tampon acétate pH 5,0 (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Réactif I_2/KI (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Extrait	200	200	200	200	200	200	200
Enzymatique (μL)							
Prendre les	t=0	idem	idem	idem	idem	idem	idem
DO à 580 nm	t=10						
toutes les 10 secondes	----						
	t= 3 min						

t = temps ; la solution enzymatique est additionnée juste avant la lecture de la DO

Les amylases sont des enzymes obéissant à la loi cinétique de Michaélis-Menten donnée par l'équation :

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + Km} \quad (4.6)$$

Où :

V_i = vitesse initiale de la réaction enzymatique

V_{\max} = vitesse maximale de l'enzyme

K_m = constante de Michaélis, correspondant à la concentration en substrat à laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximale.

La linéarisation de l'équation de Michaélis-Menten permet d'obtenir l'équation en double inverse de Lineweaver-Burk suivante :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{Km}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.7)$$

Le tracé $1/V_i = f(1/[s])$ donne une droite de pente K_m/V_{\max} et d'ordonnée à l'origine $1/V_{\max}$.

I.2.10- Détermination de l'activité de la dextrinase limite en présence de quelques effecteurs d'activité enzymatique (EDTA, DTT, CaCl₂, SAB, acide ascorbique)

Cette étude a été menée par ajout de solutions tampons (0,75 mL pour le test au pullulan et 1 mL pour le test au kit) contenant chacune l'additif à évaluer (DTT à 1 mM, ou acide ascorbique à 5 mM, ou CaCl₂ à 5 mM, ou EDTA à 1 mM, ou SAB à 10 mg/mL) dans des tubes à essai contenant l'extrait enzymatique (0,1 mL pour le test au kit et 0,25 mL pour le test au pullulan), avant l'ajout du substrat (K-PullG6 ou pullulan selon le test) dans le milieu. Les tests au pullulan et au kit ont été conduits tels que précédemment décrit (paragraphe I.2.4).

I.2.12- Application de la dextrinase limite à des brassins de sorgho

L'extrait enzymatique purifié a été appliqué comme source exogène de dextrinase limite à différentes concentrations à des brassins de sorgho. La filtrabilité de ces brassins et les teneurs en sucres réducteurs des moûts qui en sont issus ont été déterminées.

I.2.12.1- Méthodologie d'obtention des moûts de sorgho : le brassage

Le sorgho utilisé pour le brassage était de même variété et caractéristiques telles que présentées au chapitre 2. Ce sorgho a été malté dans les conditions optimales définies au chapitre 2 (conditions définissant l'activité maximale en dextrinase limite avec retrait des radicules). Le malt obtenu a été touraillé à 50 °C pendant 24 h, broyé et tamisé ($\varnothing \leq 1$ mm). Quant au brassage, le procédé a été celui décrit par Desobgo *et al.* (2011c) (brassage par décoction) et est présenté à la figure 4.2. Quatre brassins ont été ainsi préparés : Le premier (brassin témoin), a été à l'étape de refroidissement, refroidit à 65 °C (température optimale d'action des amylases, l' α -amylase en particulier) sans ajout de la dextrinase limite purifiée ; Les second, troisième et quatrième brassins (brassins tests) l'ont été à 40 °C (température optimale de stabilité de la dextrinase limite) avant ajout des différents surnageants mélangés avec 1 mL, 2,5 mL et 3 mL de dextrinase limite purifiée, respectivement.

I.2.12.2- Détermination de la teneur en sucres réducteurs des moûts

La teneur en sucres réducteurs a été déterminée par la méthode de Fischer and Stein, (1961) décrite au chapitre 2.

I.2.12.3- Test de filtrabilité des brassins

La filtration des brassins a été faite avec du papier filtre Whatman No. 1 (\varnothing 90 mm). Cette filtrabilité a été déterminée en relevant les volumes cumulatifs de filtrats toutes les cinq minutes sur une durée de 1 h. Les courbes donnant les volumes cumulatifs de filtrat en fonction du temps ont par la suite été tracées et ont servi à observer les vitesses de filtration desdits brassins.

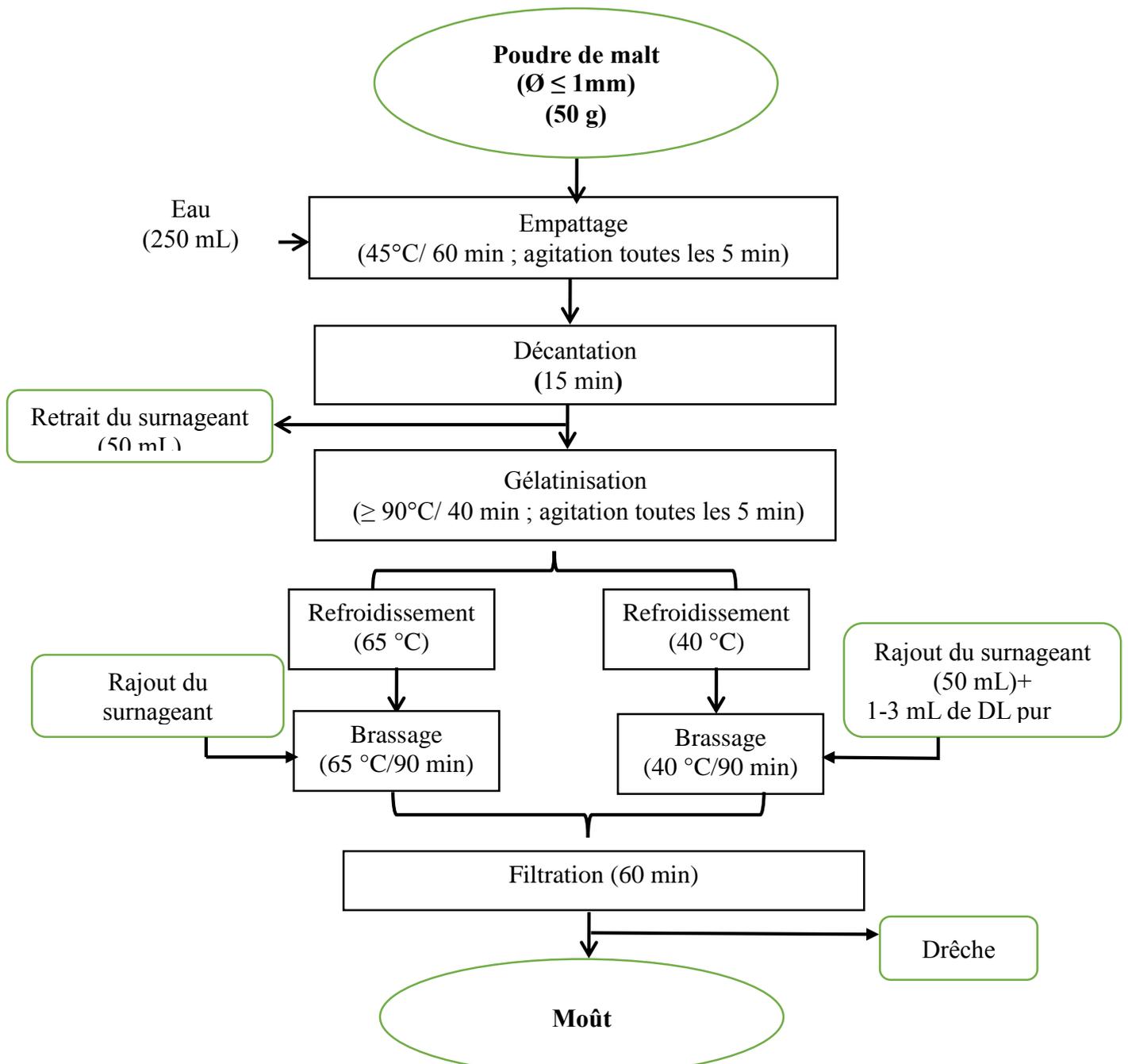


Figure 4. 2 : Procédé de brassage (Desobgo *et al.*, 2011c)

II- RESULTATS ET DISCUSSION

II.1- Maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium

Les résultats de la précipitation au sulfate d'ammonium sont consignés dans le tableau 4.4 ci-après.

Tableau 4. 4: Activités enzymatiques des précipités au sulfate d'ammonium

% m/v de saturation en sulfate d'ammonium	Activité totale (U/mL)	[Protéines] (mg/mL)	Activité spécifique (mU/mg)
0 – 20	0,002	0,082	23,5
0 – 30	0,001	1,418	0,5
0 – 40	0,002	2,282	0,8
0 – 50	0,000	nd	nd
0 – 60	0,000	nd	nd
0 – 70	0,003	1,079	2,5
0 – 80	0,002	1,864	1,0
0 – 90	0,005	2,686	1,9

nd : non déterminé car activité enzymatique totale non détectée.

Le maximum d'activité en dextrinase limite a été obtenu à 20 % m/v de saturation au sulfate d'ammonium (Tableau 4.4). Cette valeur se rapproche de 30 % utilisée par Yellowlees (1980) avec la dextrinase limite des pois non germés, mais reste inférieure aux valeurs obtenues par Dunn *et al.* (1973) et Hardie *et al.* (1976) qui étaient de 30 – 50 % avec le sorgho malté. Il faut noter que ces auteurs n'ont pas eu à faire un balayage (en pourcentage de sulfate d'ammonium à ajouter) sur une large plage comme dans le présent travail afin de déterminer un optimum, en dehors de Hardie *et al.* (1976) qui eux ont d'abord fait une première précipitation à 30 % de saturation, puis de 30 % à 50 %, avant de retenir cette dernière plage. Manners et Yellowlees (1973) par contre, après avoir fait varier le pourcentage en sulfate d'ammonium de

0 à 100 % m/v, ont obtenu un maximum d'activité en dextrinase limite dans la plage 41 – 50 % avec le sorgho malté de variété *Kafficorn*. Bien que cette étude soit similaire à la nôtre, les résultats restent différents. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que la concentration en sulfate d'ammonium nécessaire pour la précipitation varie d'une protéine à une autre; et aussi, en fonction de la source, une même protéine peut avoir des tailles et des solubilités variables (Bernfeld, 1951; Sissons, 1991; Labrou, 2014). Par ailleurs, la concentration de 20 % de saturation en sulfate d'ammonium pourrait permettre de postuler que la dextrinase limite du sorgho *Safrari* aurait une masse moléculaire beaucoup plus élevée que celle des précédents auteurs, étant donné que plus la masse moléculaire d'une protéine est élevée, moins de sulfate d'ammonium sera utilisé pour sa précipitation (Fiechter, 1983)

II.2- Purification de la dextrinase limite

Il est présenté ici une table de purification (tableau 4.4) qui prend en compte les deux méthodes de détermination de l'activité de la dextrinase limite. Celles-ci étant le test au pullulan naturel d'une part, et le test au kit enzymatique Megazyme (K-PullG6) d'autre part.

Tableau 4. 5: Purification de la dextrinase limite

	Activité totale (mU)		Protéines (mg)		Activité spécifique (mU/mg)		Rendement (%)		Facteur de purification	
	Test au kit	Test au pullulan	Test au kit	Test au pullulan	Test au kit	Test au pullulan	Test au kit	Test au pullulan	Test au kit	Test au pullulan
Extrait brut	20,9	97,6	3314,285	3303,714	4	18	100,00	100,00	1,0	1,0
20% SAM	41,5	7,1	154,285	3,157	16	77	198,80	0,50	4,0	4,2
Dialyse	15,7	9,5	35,526	2,742	26	134	75,24	0,73	6,5	7,4

SAM : sulfate d'ammonium

Les observations ci-après peuvent être faites de cette table de purification :

- Pour le test au kit, l'activité enzymatique totale augmente après la première étape de purification (précipitation au SAM), puis diminue après la dialyse ; tandis que l'effet inverse est observé pour ce qui est du test au pullulan naturel. Ces observations se repercutent sur les rendements de purification ;
- Quelque soit le test d'activité appliqué, l'activité enzymatique spécifique augmente après chaque étape de purification ;
- Quelque soit le test d'activité appliqué, le facteur de purification augmente après chaque étape de purification.

Normalement, l'activité enzymatique totale après chaque étape de purification devrait diminuer en raison des pertes de matières, inévitables (Illanes, 2008b). Cependant, dans le tableau 4.4, cette activité totale évolue en dents de scie. La hausse d'activité dans les cas où cela est observée serait due aux pertes de matières impliquant des inhibiteurs qui gêneraient l'activation de l'enzyme à purifier ; pertes d'inhibiteurs qui seraient considérables par comparaison à une éventuelle perte d'enzyme. Ces observations se reflètent sur les rendements de purification. La même tendance a été obtenue par Emenike *et al.*, (2015) avec l' α -amylase des grains germés de l'arbre à pain.

Pour ce qui est de l'activité enzymatique spécifique, les conditions idéales d'augmentation de celle-ci après chaque étape de purification sont observées ici ; ce qui atteste de l'effectivité de la purification. Ces observations se reflètent sur le facteur de purification. Toutefois, l'activité enzymatique spécifique finale (après dialyse) avec le test au pullulan est d'environ 05 fois supérieure à celle obtenue avec le kit enzymatique. Ceci peut s'expliquer par le fait de la haute spécificité du test au kit pour des extraits enzymatiques purifiés ou non, contrairement au test au pullulan qui n'est spécifique que pour des extraits purs en dextrinase limite. En effet, l'hydrolyse complète du pullulan par la dextrinase limite donne comme produits le maltotriose majoritairement et dans une moindre mesure le maltotetraose (Fincher, 1989; McCleary, 1991; Wu *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Ces produits pourraient subir l'attaque de l' α -glucosidase pour le maltotriose (McCleary, 1991; Sissons *et al.*, 1992), et de la β -amylase pour le maltotetraose (Zeeman *et al.*, 2004), libérant les sucres réducteurs, ce qui biaiserait l'activité de la dextrinase limite par le test au pullulan en dosant les sucres réducteurs. N'ayant pas utilisé ici des techniques de purification de haute résolution telles les techniques chromatographiques, l'on serait donc en présence d'un extrait en dextrinase limite partiellement purifié, d'où la surestimation de l'activité observée avec le test au pullulan naturel. En plus, la

haute spécificité du test au kit enzymatique se reflète même dans la valeur du rendement finale, qui est d'environ 100 fois supérieur à celui du test au pullulan.

II.3- pH optimum d'activité et de stabilité de la dextrinase limite

La variation d'activité de la dextrinase limite en fonction du pH dans le cas du test au pullulan est présentée à la figure 4.3.

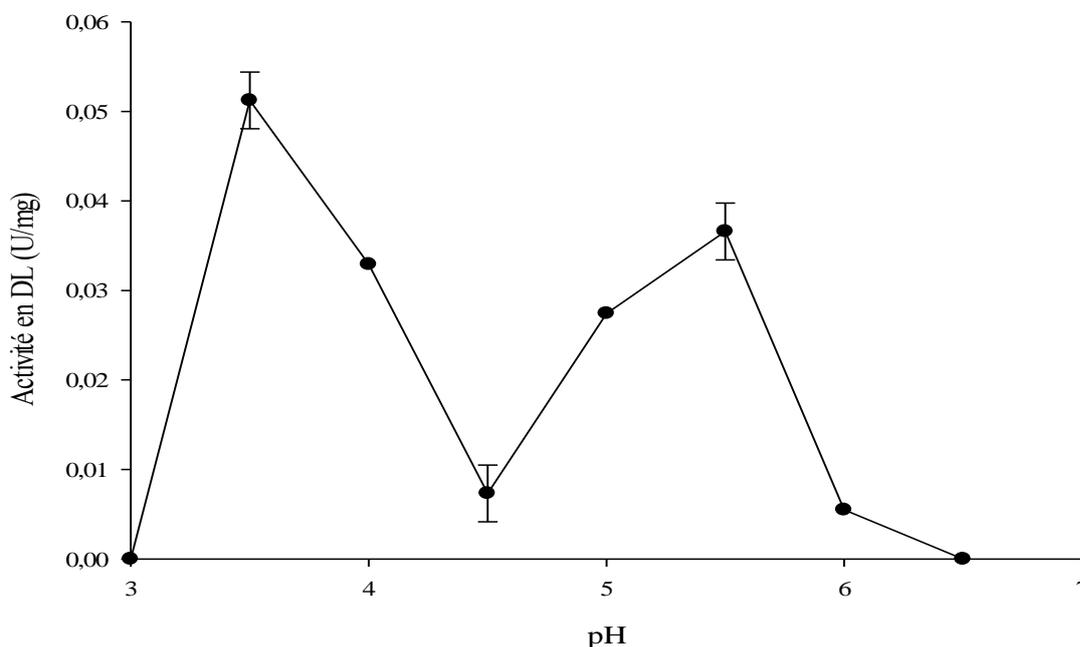


Figure 4. 3 : Activité de la dextrinase limite (DL) en fonction du pH (test au pullulan)

L'on peut observer 2 pics d'activité : à pH 3,5 et à pH 5,5, le maximum se situant à 3,5. La présence de ces 02 pics suggérerait que l'extrait enzymatique présenterait une activité enzymatique liée à la possible présence d'autres enzymes amylolytiques. La plus probable serait l' α -glucosidase dont le pH optimum d'activité dans les malts de sorgho d'après Taylor & Dewar (1994), Agu & Palmer (1997a) est de 3,75. Comme précisé précédemment, celle-ci aurait hydrolysée le maltotriose, produit d'hydrolyse de la dextrinase limite sur le pullulan, et donc influencer les résultats de ce test au pullulan. La même tendance a été obtenu par Emenike *et al.* (2015) avec l' α -amylase des grains germés de l'arbre à pain. Cette observation a conduit au test d'activité de la dextrinase limite aux pics de pH 3,5 et 5,0 – 5,5, plage de pH optimum

d'activité de la dextrinase limite des céréales (Sissons *et al.*, 1992; MacGregor *et al.*, 1994a; Briggs, 1998) avec le kit enzymatique afin de déterminer le pH optimal correspondant à celui de l'activité de la dextrinase limite (figure 4.4).

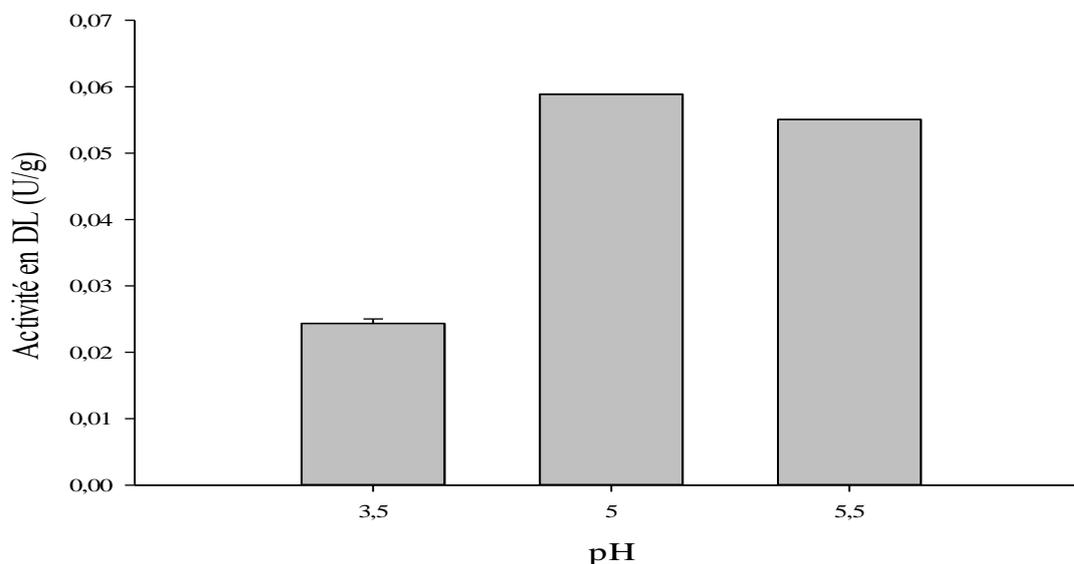


Figure 4. 4 : Activité de la dextrinase limite en fonction du pH (test au Kit)

De la figure 4.4, on constate une meilleure activité enzymatique située dans la plage 5,0 - 5,5. Etant donné que le substrat utilisé est spécifique à cette enzyme, une conclusion peut donc être tirée faisant état de ce que la plage de pH d'activité de 5,0 – 5,5 est celle correspondant à la dextrinase limite.

La plage de pH optimum de 5,0 – 5,5 obtenue avec la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* dénote de la préférence de cette enzyme pour des pH légèrement acides. Ce comportement est similaire à celui des amylases céréalières en général dont la plage de pH optimale d'activité est de 4,0 – 5,5 (Taylor & Dewar, 1994; Osman *et al.*, 2002), et rentre aussi dans la plage de pH optimum de la dextrinase limite des céréales située entre 5,0 et 5,5 (Sissons *et al.*, 1992; MacGregor *et al.*, 1994a; Briggs, 1998). Par ailleurs, cet optimum est similaire à ceux obtenus par Manners et Rowe (1971) (pH optimal de 5,0), de Stenholm et Home (1999) et de MacGregor *et al.* (1994a) (pH optimal de 5,5) avec la dextrinase limite de l'orge d'une

part, et d'autre part à ceux de Hardie *et al.* (1976) et de Glennie et Wight (1986) avec la dextrinase limite du malt de sorgho (pH optimal de 5,0 – 5,4).

Il se déduit également de la figure 4.4 que l'extrait partiellement purifiée obtenu à la suite de ce travail peut être utilisé sur une plage de pH allant de 3,5 à 5,5. Cette large plage de pH d'activité est avantageux pour des applications dans l'industrie alimentaire, notamment en brasserie où les plages de pH de brassage des moûts vont de 5,0 à 5,6 (Sissons *et al.*, 1992; Briggs, 1998; MacGregor *et al.*, 1999) et aussi, dans les procédés de fermentation des bières où le pH peut chuter jusqu'à 4,0 (Pratt *et al.*, 1981; McCleary, 1991; Sissons, 1991; Evans *et al.*, 2010), et les procédés brassicoles à base de fruits où les pH acides sont préférés (Tucker, 1995). Cependant, la durée d'application de ces pH pourrait être favorable ou préjudiciable à l'exploitation du potentiel enzymatique de cet extrait. De ce fait, la stabilité enzymatique, dont de la dextrinase limite en fonction du pH a été étudié avec le test au kit enzymatique sur la plage de pH de 3,5 à 5,5 avec le tampon acétate à 100 mM sur une durée de 90 min (temps généralement mis pour le brassage des moûts en brasserie), à 40 °C (température optimale d'activité recommandée par le manuel du kit enzymatique Megazyme). Les résultats sont visibles à la figure 4.5 ci-après.

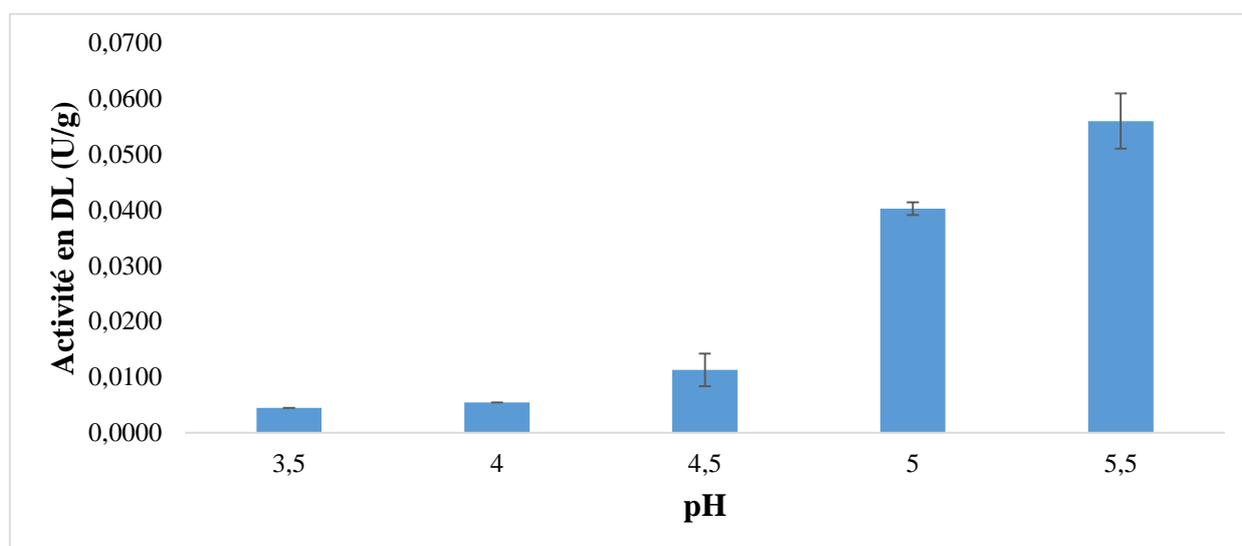


Figure 4. 5 : Stabilité de la dextrinase limite en fonction du pH (40°C/90min)

La variation du pH de 3,5 à 5,5 révèle que la dextrinase limite est plus active et stable à pH 5,5. Seulement 5 % d'activité sont perdues par rapport au contrôle (Tableau 4.6) (le contrôle correspondant à l'activité de la dextrinase limite à pH 5,0 dans les conditions du kit d'après la figure 4.4). En deçà du pH 5,0, la chute d'activité est rapide et atteint son minimum au pH 3,5. Ce déclin d'activité peut s'expliquer soit par la formation de formes ioniques inadaptées de l'enzyme ou du substrat, soit par l'inactivation de l'enzyme ou la combinaison de ces phénomènes (Hejnaes *et al.*, 1998; Illanes *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013).

Tableau 4. 6: Activités relatives de la dextrinase limite en fonction du pH

pH	Activité relative en dextriase limite (%)
Contrôle	100
5,5	95
5,0	68,5
4,5	19,2
4,0	9,2
3,5	7,7

Toutefois, la plage de pH comprise entre 5,0 et 5,5 reste une fois de plus celle permettant l'exploitation optimale pas seulement de la dextrinase limite, mais aussi de tout le potentiel amylolytique de l'extrait enzymatique ainsi partiellement purifié; ceci pour des durées exploitables en industrie, particulièrement dans l'industrie brassicole où la plupart des enzymes qui y sont utilisées sont stables dans la plage de pH de 4,5 – 6,0 (Briggs, 1998).

II.4- Température optimale d'activité et de stabilité de la dextrinase limite

La détermination de l'activité de la dextrinase limite en fonction de la température est présentée à la figure 4.6. D'après le test au pullulan, l'activité enzymatique évolue en dents de

scie entre 20 °C et 30 °C et reste faible (< 0,04 U/mg). L'augmentation d'activité devient très rapide au-delà de 30 °C pour atteindre le pic d'activité ($\approx 0,12$ U/mg) à 40 °C. Au-delà de 40 °C, l'on observe une chute abrupte de 40 °C à 45 °C (0,02 U/mg), puis faible de 45 °C à 50 °C (0,005 U/mg). L'on peut donc faire le constat qu'autour de 40 °C, une variation de 5 °C est suffisante pour que la baisse d'activité soit significative de l'ordre de 55 % et 80 % de perte d'activité à 35 °C et à 45 °C respectivement.

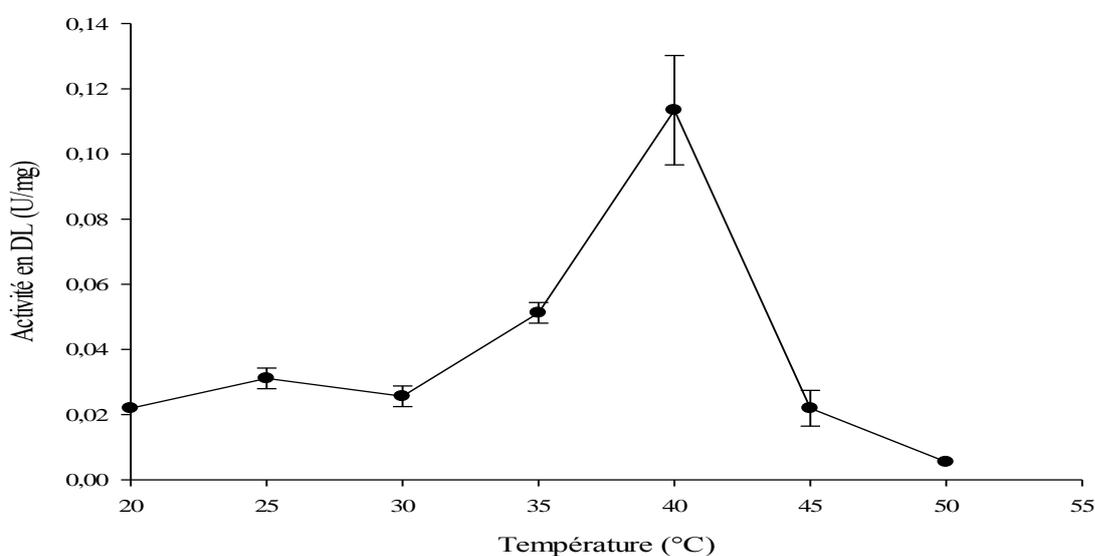


Figure 4. 6 : Activité de la dextrinase limite en fonction de la température (test au pullulan)

En effet, les vitesses des réactions catalysées par les enzymes croissent avec l'augmentation de la température jusqu'à l'atteinte d'un maximum dit température optimale (Taylor & Leach, 1995; Hejnaes *et al.*, 1998; Lewis & Bamforth, 2006; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013). L'élévation de la température accroît l'énergie cinétique des réactifs (enzyme + substrat) ; plus ceux-ci se déplacent rapidement, plus il y a collision entre eux et donc réaction enzymatique, ceci jusqu'à la température optimale. Au-delà de cette température, la vitesse chute généralement drastiquement. Ceci se produit en raison du fait que l'augmentation de l'énergie des molécules due à l'élévation de température cause aussi (dans des conditions extrêmes) la rupture des liaisons qui maintiennent les enzymes dans leur

forme optimale d'activité et progressivement, l'enzyme se trouve dénaturée (Hejnaes *et al.*, 1998; Illanes, 2008a; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013).

La température optimale de 40 °C obtenue ici a également été celle des auteurs tels Manners et Rowe (1971), MacGregor *et al.* (1994a) avec l'orge, ainsi que Furegon *et al.* (1997) avec le riz. Ayant déjà montré précédemment l'éventuelle contamination de l'extrait en dextrinase limite par d'autres enzymes amylolytiques, cet optimum de 40 °C ne saurait donc être attribué à la dextrinase limite seule, mais plutôt à l'action combinée de la dextrinase limite (sur le pullulan) et de l' α -glucosidase (sur le maltotriose après action de la dextrinase limite sur le pullulan). Par ailleurs, une revue effectuée par Schnitzenbaumer (2013) révèle que la température optimale d'activité de l' α -glucosidase se situe entre 35 °C et 40 °C. Pour donc éliminer les effets de contamination due à d'autres enzymes amylolytiques, la même étude a été faite avec le kit enzymatique spécifique à la dextrinase limite (figure 4.7).

D'après la figure 4.7, l'activité de la dextrinase limite croît avec l'augmentation de la température pour atteindre le maximum ($\approx 0,14$ U/mL) entre 50 °C et 60 °C ; puis décroît légèrement au-delà de 60 °C pour atteindre environ 0,12 U/mL à 70 °C.

L'allure de cloche obtenue dans ce cas traduit le fait que lorsque la température augmente, la vitesse de la réaction augmente également jusqu'à une plage seuil à la suite de laquelle la baisse d'activité traduit la dénaturation progressive de l'enzyme aux températures de plus en plus élevées (Tucker, 1995; Lewis & Bamforth, 2006; Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013).

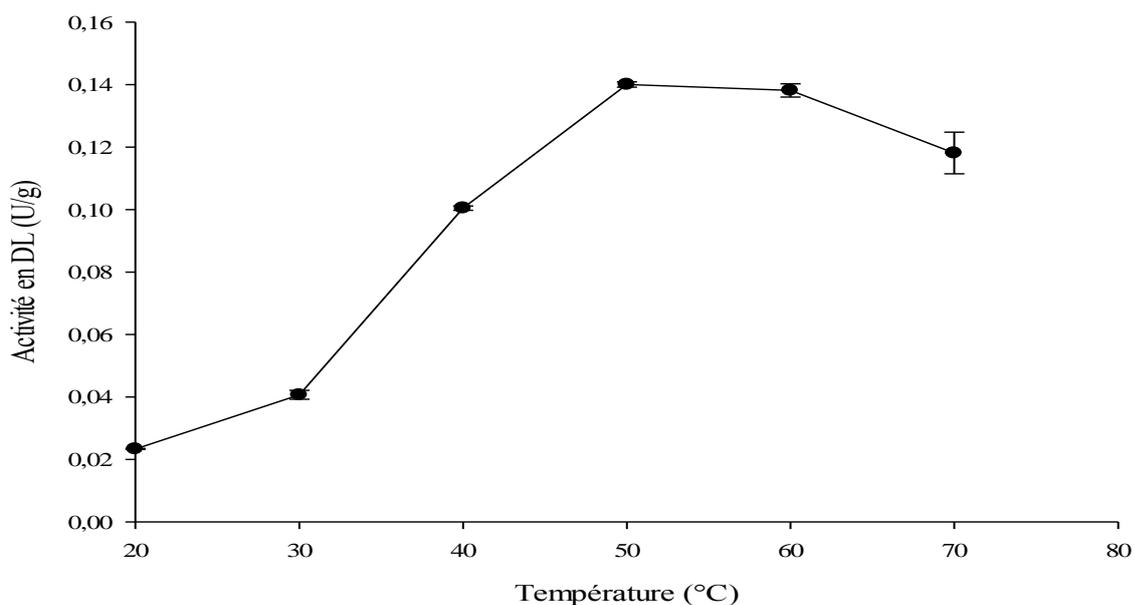


Figure 4. 7 : Activité de la dextrinase limite (DL) en fonction de la température (test au kit Megazyme)

Ces résultats sont similaires à ceux de Stenholm et Home (1999) qui ont obtenus l'optimum de 50 °C avec l'orge, et à ceux de Yamasaki *et al.* (2008), qui ont obtenus la valeur optimale de 55 °C avec le riz. Il faut préciser que Yamasaki *et al.* (2008) ont eu à utiliser le pullulan naturel pour le test d'activité sur un extrait en dextrinase limite purifié jusqu'à homogénéité. Par ailleurs, Stenholm et Home (1999) ont montré que l'hydrolyse de l'amidon dans les moûts de brasserie aux températures de 63-65 °C avec un pH du moût de 5,4-5,5 favorisait l'action optimale de la dextrinase limite, ceci avec l'orge; conditions de pH et de température également obtenues ici avec la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*. Par ailleurs, près de 85 % d'activités sont présentes à 70 °C (figure 4.7). La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait donc une enzyme thermorésistante. Ceci met à nouveau en exergue le potentiel qu'a le sorgho à être exploité dans l'industrie brassicole.

Ne pouvant parler de thermorésistance sans indiquer la durée de résistance de l'enzyme, la prise en compte du temps fait allusion à la thermostabilité. En effet, la stabilité thermique de

la dextrinase limite a été évaluée à des températures généralement utilisées en brasserie pour le brassage de la bière (50 – 65 °C), températures où l'activité en dextrinase limite s'exprime le mieux (Figure 4.7), ceci sur une durée de 90 minutes. Après incubation des extraits enzymatiques à 50 – 65 °C pendant 90 min, les tests d'activité (avec le kit) révèlent les résultats de la figure 4.8. Le contrôle ici c'est l'activité de la dextrinase limite à 50 °C dans les conditions utilisées pour déterminer la température optimale (réaction enzyme/substrat à 50 °C/30 min).

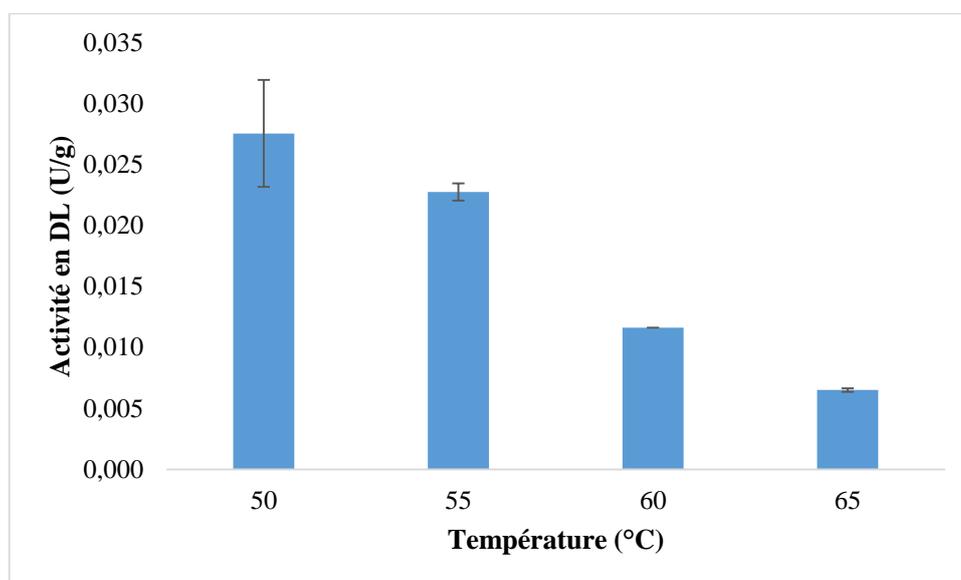


Figure 4. 8 : Stabilité de la dextrinase limite en fonction de la température

Dans ces conditions, la dextrinase limite est plus stable aux températures ≤ 55 °C. Toutefois, l'exposition de la dextrinase limite dans ces conditions entraîne près de 80 % de perte d'activité entre 50 °C et 55 °C par rapport au contrôle (tableau 4.7). Ce résultat est similaire à celui de Stenholm et Home (1999) qui ont obtenus une perte d'activité en dextrinase limite de 70 % après 1 h d'incubation à 55 °C. Au-delà de 55 °C, la perte d'activité continue jusqu'à atteindre les 95 % à 65 °C. En comparaison au résultat de Stenholm et Home (1999) où la perte d'activité était complète après 20 minutes d'incubation à 60 °C avec l'orge, il pourrait s'en déduire que la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* a une thermostabilité bien meilleure que celle de l'orge car après 90 minutes d'incubation à 60 °C, l'activité quoique faible est toujours existante.

Tableau 4. 7: Activités relatives de la dextrinase limite en fonction de la température

Barème température /temps	Activité relative en dextrinase limite (%)
Contrôle (50°C/30 min)	100
50°C/90 min	20
55°C/90 min	16,5
60°C/90 min	8,6
65°C/90 min	5

De ce fait, bien que la dextrinase limite soit active aux températures de brassage des moûts en brasserie (50 – 65 °C), cette activité n'est pas totalement conservée sur toute la durée du procédé. Néanmoins, la stabilité de la dextrinase limite à sa température optimale d'activité (50 – 60 °C) dans les conditions du test enzymatique sur une durée de 30 minutes est comparable à celle de la pullulanase (65 – 70 °C/30 min) (Nakamura *et al.*, 1989). Par conséquent, la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* peut être utilisée comme enzyme industrielle au même titre que les pullulanases qui sont préférées pour de telles applications, car dites être plus thermostables que les enzymes végétales (Pandey *et al.*, 2000).

II.5- Propriétés catalytiques Km et Vmax

La dextrinase limite a obéit à la cinétique de Michaelis-Menten avec l'amidon (seul substrat testé ici) (figure 4.9); avec V_i la vitesse initiale et [Amidon] la concentration en amidon.

A cet effet, la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) ont été calculées à l'aide de la représentation graphique de Lineveaver-Burk (figure 4.10).

Ces valeurs sont de $2,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ et de $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}\text{sec}^{-1}$ respectivement pour K_m et V_{max} . La valeur de K_m ici obtenue se rapproche de celle de la dextrinase limite du riz avec l'amidon qui était de $1,538 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Yamasaki *et al.*, 2008), mais est de loin inférieure à celle obtenue par Singh *et al.* (2010) avec la pullulanase de *Aureobasidium pullulans* qui était de $11,1 \text{ mg.mL}^{-1}$.

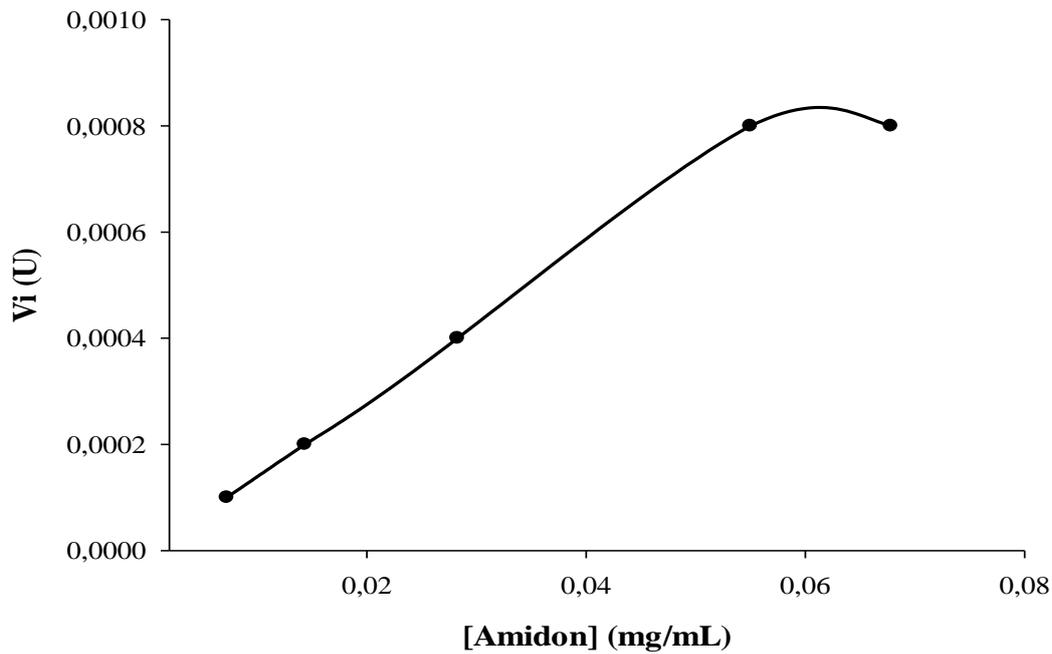


Figure 4. 9 : Effet de la concentration en amidon sur l'activité en dextrinase limite

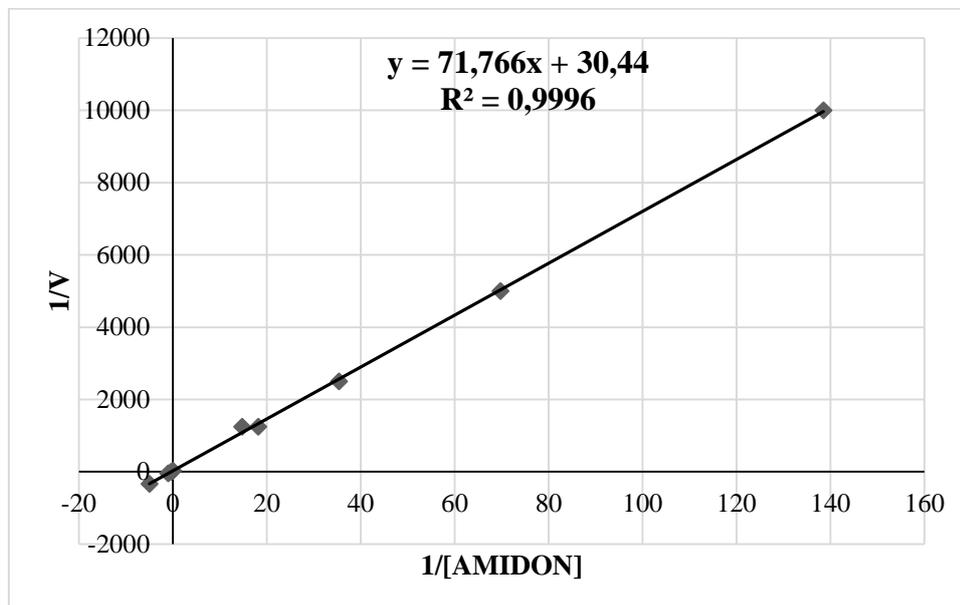


Figure 4. 10 : Représentation de Lineveaver-Burk ($1/V = f(1/[Amidon])$) pour la détermination de K_m et V_{max}

D'après ce qui précède, l'on peut constater que les valeurs de K_m du sorgho *Safrari* et du riz sont d'environ 5 fois inférieures à celle de la pullulanase microbienne. Ceci laisse penser que

la dextrinase limite des céréales aurait plus d'affinité pour l'amidon que la pullulanase microbienne. Par ailleurs, le pouvoir catalytique de la pullulanase serait également plus faible que celui de la dextrinase limite du sorgho *Safrari* sur l'amidon, les valeurs de V_{max} étant de $0,20 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la pullulanase (Singh *et al.*, 2010), et de $1,8 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$) avec la dextrinase limite du sorgho *Safrari*.

II.6- Effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl_2 , le SAB et l'acide ascorbique sur l'activation de la dextrinase limite

Certains glycosyl hydrolases sont activés soit en présence de cofacteurs tels le chlorure de calcium, les vitamines (vitamines du group B, acide ascorbique), soit en présence d'agents réducteurs (DTT, acide ascorbique) soit en présence d'un excès de protéines dans le milieu comme stabilisants (SAB), ou inhibés en présence de chélateurs de métaux (EDTA) pour les métalloenzymes. D'où l'importance de l'étude de ces composés sur l'activité de la dextrinase limite purifiée pour une meilleure caractérisation de l'enzyme.

L'extrait enzymatique obtenu après purification a donc été sujet à l'action de certains effecteurs, notamment les composés réducteurs (DTT, acide ascorbique), chélateur de métaux (EDTA) et stabilisateurs (SAB, CaCl_2) afin d'évaluer la nécessité ou pas d'ajout de ceux-ci pour une meilleure activation de la dextrinase limite, et aussi pour sa caractérisation. Les tests d'activité ont été conduits au pullulan naturel et au kit Megazyme K-PullG6.

II.6.1- Cas du test au pullulan naturel

L'activité de la dextrinase limite dans ce cas est améliorée uniquement en présence d'agents réducteurs, (figure 4.11). Ceci de l'ordre de 80 % avec le DTT et de 400 % avec l'acide ascorbique. Tandis qu'elle baisse avec le SAB et le CaCl_2 respectivement de l'ordre de 46 % et 65 %, pour s'annuler presque à 92 % avec l'EDTA. Or, pendant l'extraction, il y avait plutôt inhibition en présence de ces composés pour le même test d'activité (figure 3.7). Le

comportement de l'enzyme pendant l'extraction serait donc différent de celui purifié. Ceci voudrait signifier que quoique la dextrinase limite n'aie pas besoin d'agents réducteurs pour son extraction (d'après le test au pullulan), ceux-ci sont plutôt indispensables pour l'activation de l'enzyme purifiée, la préférence ici étant pour l'acide ascorbique.

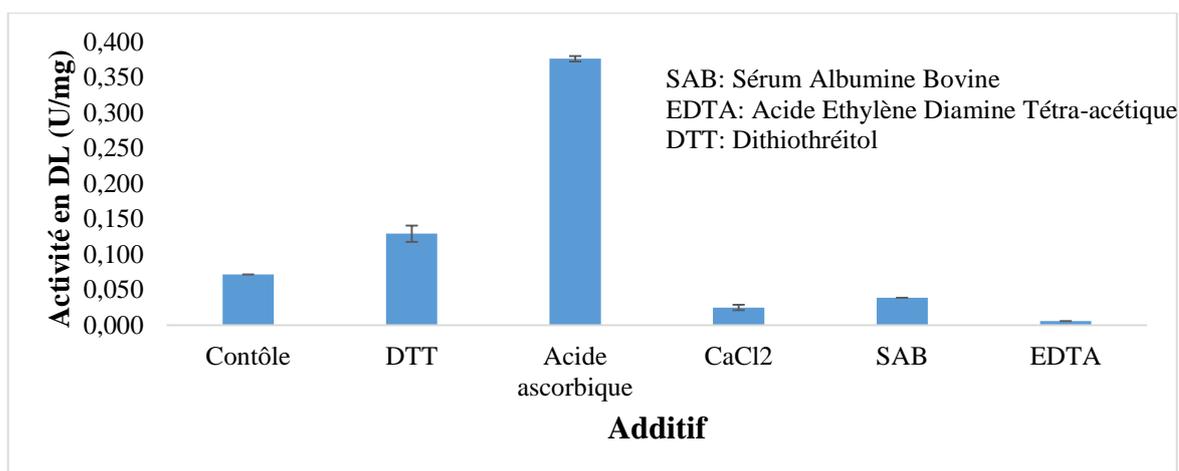


Figure 4. 11 : Effet de quelques effecteurs sur l'activité en dextrinase limite (test au pullulan)

L'accroissement d'activité de la dextrinase limite purifiée en présence d'agents réducteurs à l'instar du DTT a également été observé par Morinaga *et al.* (1997) et Yamasaki *et al.* (2008); les tests d'activité dans ces travaux étant aussi faits au pullulan naturel. Les autres composés à savoir le SAB, le CaCl₂, l'EDTA sont plutôt inhibiteurs ici; l'inhibition étant presque complète en présence d'EDTA. L'inhibition en présence d'EDTA ou de CaCl₂ voudrait signifier que la dextrinase limite aurait besoin pour son activation, de la présence d'ions métallique qui ne seraient pas les ions calcium. Par ailleurs, la chute d'activité en présence d'ions calcium serait due à une concentration en ions calcium inhibitrice pour la dextrinase limite. L'inhibition en présence de CaCl₂ a également été observée par Morinaga *et al.* (1997) quoique seulement de 7 % tandis que nous en sommes à 65 %. La différence de pourcentage d'inhibition avec le CaCl₂ entre ce travail et celui de Morinaga *et al.* (1997) serait due à la différence de concentration en CaCl₂ qui était respectivement de 5 mM et de 1 mM. L'inhibition

en présence d'EDTA a également été observée par Hardie *et al.* (1976) à 16 % pour une concentration de 10 mM, tandis qu'ici, elle est de 93 % à 1 mM. Manners & Yellowlees (1971) n'ont observés aucun effet dû à l'EDTA. Pour ce qui est de l'effet du SAB, nous ne connaissons pas de travaux similaires, et à la limite de nos connaissances, nous n'avons pas d'explications à apporter à son effet inhibiteur dans les conditions du test d'activité au pullulan.

Se rappelant du fait que l'extrait en dextrinase limite obtenu ici est un extrait partiellement purifié, et du fait de la non spécificité du test au pullulan pour de tels extraits, le comportement de la dextrinase limite ici observé ne serait qu'apparent. Le test au kit K-PullG6, spécifique à la dextrinase limite, sans interférence possible d'autres amylases, a permis de lever toute ambiguïté.

II.6.2- Cas du test au kit Megazyme K-Pull G6

Avec le test au kit Megazyme, l'on observe un accroissement d'activité de la dextrinase limite quel que soit l'effecteur (réducteur, chélateur de métaux, stabilisateur) (figure 4.12); ce qui ne fut pas le cas avec le test au pullulan. Toutefois, l'effet d'activation et/ou de stabilisation dû aux agents réducteurs se confirme ici. En effet, la méthode du kit Megazyme voudrait que la dextrinase limite soit extraite en présence de DTT.

A cet effet, des essais préliminaires ont montré une meilleure activité de la dextrinase limite du malt lorsqu'extraite en présence de DTT et testé au kit Megazyme. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme extraite dans ces conditions et purifiée est davantage améliorée en présence d'acide ascorbique qui est également un agent réducteur.

La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait donc une enzyme sulfhydrile et requièrerait un environnement réduit pour son extraction, son activation et même sa stabilisation.

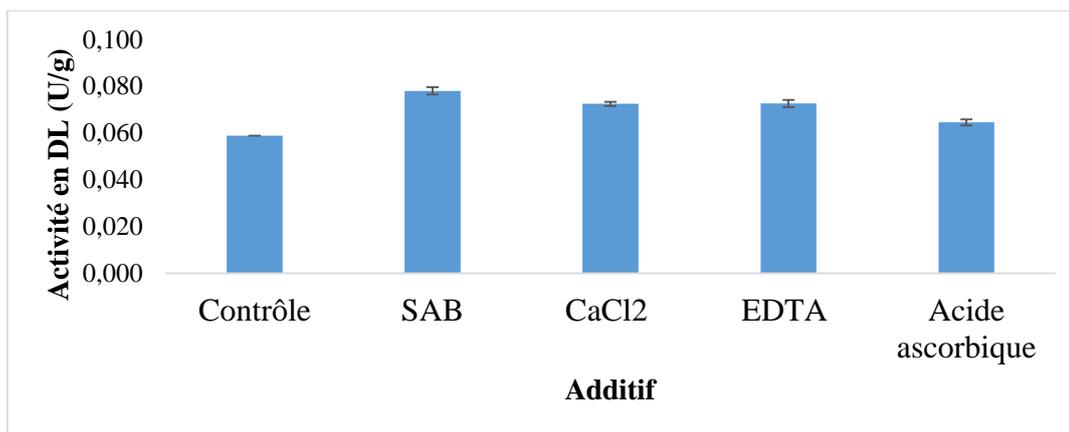


Figure 4. 12 : Effet de quelques effecteurs sur l'activité de la dextrinase limite (test au kit K-PullG6)

L'accroissement d'activité de la dextrinase limite observée ici en présence d'agents réducteurs à l'instar du DTT est en accord avec les travaux de Sissons (1991), MacGregor *et al.* (1994a), Kristensen *et al.* (1998) (travaux dont les tests d'activité en dextrinase limite ont été effectués également avec des kits spécifiques). Notons que le pic d'activité enzymatique est obtenu ici en présence de SAB; ceci est similaire aux travaux de MacGregor *et al.* (1994a). En outre, l'activité de la dextrinase limitée bien qu'améliorée, est la même en présence d'EDTA qu'en présence de CaCl₂. Ceci voudrait signifier que la dextrinase limite et des inhibiteurs éventuels présents dans le milieu seraient des métalloprotéines, mais la concentration en EDTA ne serait pas assez pour complexer les ions calcium de manière à inhiber la dextrinase limite d'une part, et d'autre part, cette concentration serait assez pour complexer les ions métalliques nécessaires à l'action des inhibiteurs.

Tout au long de ce travail, l'activité de la dextrinase limite a été évaluée en présence uniquement de substrat, de tampon et dans une certaine mesure, de certains effecteurs. Cependant, dans les procédés, la composition des milieux réactionnels est plus complexe et inclue une diversité d'enzymes et autres composés solubles ou non et de ce fait, le comportement des enzymes peut être différent des conditions de test d'activité. L'une des raisons de la purification enzymatique étant leur utilisation comme enzymes exogènes dans les

procédés, il s'est trouvé judicieux d'évaluer l'apport de la dextrinase limite purifiée dans de telles conditions, notamment en brasseries.

III- IMPACT DE L'AJOUT DE LA DEXTRINASE LIMITE PURIFIEE SUR LA FILTRABILITE ET LA TENEUR EN SUCRES DES BRASSINS DE SORGHO

Les moûts en brasserie sont obtenus par extraction en milieu aqueux et à chaud des composés solubles du malt, suivi de la filtration. Pendant le brassage, il y a entre autre, hydrolyse de l'amidon en sucres simples fermentescibles (MacGregor *et al.*, 1994a, 1999; Stenholm & Home, 1999; Schmedding & Van Gestel, 2002; McCafferty *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2005). C'est donc ici qu'intervient la dextrinase limite sur les dextrans ramifiés issues de l'action de l' α -amylase et de la β -amylase sur l'amidon, pour les rendre linéaires et hydrolysables à nouveau par les précédentes enzymes. Pendant le brassage, l'extrait en dextrinase limite purifié a été ajouté à différentes proportions dans les brassins. La vitesse de filtration des moûts et leur teneur en sucres réducteurs ont été évaluées.

Les courbes donnant la vitesse de filtration des brassins sont présentées à la figure 4.13.

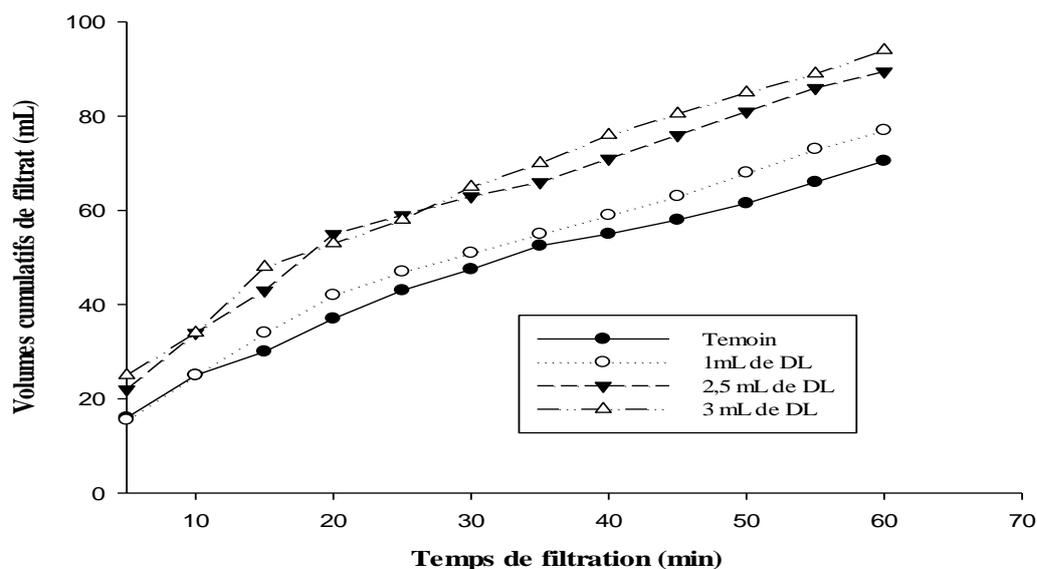


Figure 4. 13 : Volumes cumulatifs de filtrats des brassins en fonction du temps de filtration (DL = dextrinase limite)

Le constat peut être fait de ce que la vitesse de filtration croit avec l'augmentation de la quantité d'extrait en dextrinase limite (Figure 4.13). Mais pour ce qui est de la teneur en sucres réducteurs les comportements entre le témoin et les moûts ajoutés de dextrinase limite sont différents (Tableau 4.8).

Tableau 4. 8: Test des étendues multiples pour sucres réducteurs par moût

Moût	Teneur en sucres réducteurs (g/L)
Témoin	3,90±0,03 ^a
1 mL de DL	4,18±0,03 ^b
2,5 mL de DL	4,34±0,30 ^b
3 mL de DL	4,33±0,32 ^b

Les moyennes ± écart type de chaque modalité ayant la même lettre en indice ne sont pas significativement différentes au seuil de 95 %.

Il résulte en effet une différence statistiquement significative de la teneur en sucres réducteurs entre le moût témoin et ceux ajoutés d'extrait de dextrinase limite (Tableau 4.8). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait de la présence à la fois de la dextrinase limite et d'autres enzymes saccharifiantes endogènes au brassin témoin, ayant atteint leur maximum d'activité. Par ailleurs, le substrat de la dextrinase limite dans ces conditions n'est plus le pullulan (qui aurait généré le maltotriose qui est un sucre réducteur), mais plutôt les dextrines ramifiées dont l'hydrolyse donne les dextrines linéaires (Fincher, 1989; Macgregor, 1996), (d'où son action liquéfiant ici). L'absence de différence statistiquement significative en sucres réducteurs pour les moûts ajoutés de dextrinase limite partiellement purifiée témoigne de l'action majoritaire de cette enzyme (exogène) dans la fluidification desdits brassins. Comme conséquence directe, l'on a une meilleure filtrabilité de ces moûts par rapport au brassin témoin (Figure 4.13). Par ailleurs, les dextrines linéaires obtenues après activité de la dextrinase limite sont des substrats à l'action d'autres enzymes amylolytiques éventuellement présentes dans l'extrait en dextrinase limite partiellement purifié (α -amylase, β -amylase et α -glucosidase); enzymes dont l'action saccharifiante entraînerait nécessairement l'augmentation de la teneur en

sucres réducteurs. Mais il n'en est rien pour les moûts ajoutés de dextrinase limite partiellement purifiée (Tableau 4.8) ; ce qui justifierait ici l'action majoritaire de cette enzyme dans la liquéfaction du milieu. Ceci met à nouveau à l'évidence que l'optimisation partant du maltage jusqu'à la purification, en passant par l'extraction aurait permis d'obtenir un extrait enrichi en dextrinase limite et appauvri en d'autres enzymes amylolytiques.

La dextrinase limite en général, et l'extrait en dextrinase limite ici obtenu en particulier, pourraient donc contribuer à pallier aux problèmes de filtration des moûts de brasserie à base de sorgho relevés par (Agu et Palmer (1998), Owuama (1999), Igyor *et al.* (2001), Nso *et al.* (2003), Taylor *et al.* (2006).

CONCLUSION PARTIELLE

Il était question dans cette partie de travail de purifier la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari*, purification faite par maximisation de la précipitation au sulfate d'ammonium suivie de la dialyse. L'effectivité du processus de purification s'est vérifié par des tests d'activité de la dextrinase limite en utilisant d'une part la méthode de Fischer et Stein (1961) pour doser les sucres réducteurs formés issus du le pullulan naturel comme substrat, et d'autre part la méthode de Megazyme au substrat artificielle K-PullG6. La disparité observée dans les caractéristiques de la dextrinase limite en fonction du test d'activité appliqué a permis de conclure que le procédé de purification ici appliqué a conduit à un extrait en dextrinase limite partiellement purifié pouvant renfermer des traces éventuelles d'autres enzymes amylolytiques. Comme corollaire à cela, la méthode de test d'activité de la dextrinase limite basée sur la mesure du pouvoir réducteur n'était pas adaptée en raison de la possible augmentation de ce pouvoir par l'action de l' α -glucosidase (éventuellement) sur le maltotriose (pour donner d'autres sucres réducteurs), produit de l'hydrolyse du pullulan par la dextrinase limite. Les caractéristiques spécifiques à la dextrinase limite retenues ici ont donc été celles obtenues avec le kit enzymatique K-PullG6. Ces caractéristiques sont : un pH optimal d'activité et de stabilité de 5,0 – 5,5 ; une température optimale de 50 – 60 °C. Activité enzymatique rehaussée en présence d'agents réducteurs (dithiothréitol, acide ascorbique), de sérum albumine bovine et aussi de chlorure de calcium. Par ailleurs, l'application de l'extrait en dextrinase limite à des brassins de sorgho a permis d'améliorer leur filtrabilité, classifiant la dextrinase limite comme enzyme liquéfiant. Ce pouvoir liquéfiant a été également évalué sur l'amidon afin de déterminer les paramètres cinétiques de la dextrinase limite. Paramètres qui furent de 0,03 mg/mL/sec et de 2,4 mg/mL pour K_m et V_{max} respectivement. De plus, les caractéristiques de la dextrinase limite testées au kit Megazyme étaient comparables à celles de la bibliographie.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'approche de purification des enzymes doit tenir en compte les raisons pour lesquelles cela est conduit, étant donné que les méthodes varient en fonction des applications. Il était question dans cette thèse de purifier la dextrinase limite du cultivar *Safrari* de sorgho afin d'évaluer le potentiel tant en terme d'activité enzymatique, qu'en applicabilité dans les procédés industriels de conversion de l'amidon en sucres simples, particulièrement le secteur brassicole, si les caractéristiques (pH et température d'activité et de stabilité entre autre) s'y prêtaient. A cet effet, des méthodes de purification de faible résolution (ne conduisant pas nécessairement à des extraits purs) y ont été appliquées. La dextrinase limite étant synthétisée dans le sorgho pendant le maltage, une étude exploratoire à l'aide d'un plan de criblage a permis de conclure que le facteur le plus important à prendre en considération pour la synthèse optimale des enzymes amylolytiques (dont fait partie la dextrinase limite) est le temps de germination. Temps de germination qui fut de 5 jours pour la synthèse maximale de la dextrinase limite, ceci à 25 °C. La méthodologie des surfaces de réponses utilisée pour l'optimisation des paramètres d'extraction de la dextrinase limite a permis d'obtenir les conditions optimales suivantes : extraction à 23 °C pendant 10 h avec un tampon acétate de sodium à 100 mM de pH 5,0 pour un ratio masse de malt/volume de tampon de 5/32. La précipitation au sulfate d'ammonium suivie de la dialyse ont conduit à un extrait en dextrinase limite partiellement purifié, avec un rendement et un facteur de purification respectivement de 75 % et 6,5. Extrait en dextrinase limite pouvant être utilisé dans les procédés alimentaires à des températures allant de 40 °C à 70 °C sur une plage de pH de 5,0 – 5,5. En outre, les effecteurs tels l'acide ascorbique, le chlorure de calcium et le sérum albumine bovine ont contribué à accroître l'activité de la dextrinase limite purifiée. Par ailleurs, la dextrinase limite a participé à la liquéfaction de l'amidon dans les moûts de brasserie de par son action sur les dextrans, et a contribué ainsi à améliorer leur filtrabilité. Loin de prétendre avoir abordé ce travail dans tous ses aspects, il

serait judicieux pour le compléter de faire la cinétique d'inactivation thermique de la dextrinase limite et d'effectuer la purification complète de celle-ci avec des techniques de haute résolution, ceci pour sa caractérisation complète.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Baki, A. A. 1974. Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfectant in 14C incorporation studies. *J. Plant Physiol.* 53, 768–771.
- Abdullah, M., & French, D. 1970. Substrate specificity of pullulanase. *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 483–493.
- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., Onwuka, N. U., Umoren, P. E., & Ojukwu, M. 2016. Effect of varietal differences and germination period on some malting and brewing potentials of new improved sorghum varieties (SAMSORG17, SAMSORG14, and. *Int. Food Res. J.* 23, 1600–1608.
- Adefila, O. A., Bakare, M. K., & Adewale, I. O. 2012. Characterization of an α -amylase from sorghum (*Sorghum bicolor*) obtained under optimized conditions. *J. Inst. Brew.* 118, 63–69 <https://doi.org/10.1002/jib.11>.
- Adetunji, A. I., Khoza, S., De Kock, H. L., & Taylor, J. R. N. 2013. Influence of sorghum grain type on wort physico-chemical and sensory quality in a whole-grain and commercial enzyme mashing process. *J. Inst. Brew.* 119, 156–163 <https://doi.org/10.1002/jib.76>.
- AFNOR. 1984. Produits agricoles alimentaires: directives générales pour le dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl.in *Recueil de normes françaises*. Paris, France.
- Agu, R. 2005. Some relationships between enzyme development, extract recovery, and sugar profile in malted sorghum. *MBAA Tech. Q.* 42, 120–124.
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. 1996. Enzymic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. *J. Inst. Brew.* 102, 415–418 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00924.x>.
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. 1997a. α -Glucosidase activity of sorghum and barley malts. *J. Inst. Brew.* 103, 25–29 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00933.x>.

- Agu, R. C., & Palmer, G. H. 1997b. The effect of temperature on the modification of sorghum and barley during malting. *Process Biochem.* 32, 501–507 [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00002-2).
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. 1998. A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Bioresour. Technol.* 66, 253–261 [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00047-9).
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. 1999. Development of micro-organisms during the malting of sorghum. *J. Inst. Brew.* 105, 101–106 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00012.x>.
- Aisien, A. O., & Muts, G. C. J. 1987. Micro-scale malting and brewing studies of some sorghum varieties. *J. Inst. Brew.* 93, 328–331 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1987.tb04513.x>.
- Amersham-Biosciences. 2001. *Protein Purification Handbook* (AP Biotech, Ed.). AC. Amersham Pharmacia Biotech.
- Amid, M., Abd-Manap, Y., & Zohdi, N. 2014. Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. *Sci. world J.* 2014, 1–12 <https://doi.org/10.1155/2014/640949>.
- Anderson, R. G. 2000. Current practice in malting, brewing and distilling. Pages 183–215 in *Cereal Biotechnology*. Morris, P.C., Bryce, J.H., eds. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.
- Aniche, G. N., & Palmer, G. H. 1990. Development of amylolytic activities in sorghum and barley malt. *J. Inst. Brew.* 96, 377–379 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1990.tb01043.x>.
- Antinori, U. 1995. La valorisation industrielle et commerciale des matières premières agricoles d'origine locale: l'expérience de l'ONUDI en Afrique : le cas du sorgho. Pages 19–27 in *Transformation et Utilisation Industrielle du Sorgho et Cereales Assimilées en Afrique*.

- Menyonga, J.M., Bezuneh, T., Nwasike, C.C., Sedogo, P.M., Tenkouano, A., eds. OUA/CSTR – SAFGRAD, Ouagadougou, Burkina Faso.
- Anuradha, J. S., & Valli, N. C. 2010. A new combinational statistical approach for cellulase optimization in *Aspergillus nidulans*. *Indian J. Sci. Technol.* 3, 871–878 <https://doi.org/10.17485/ijst/2010/v3i8/29900>.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis (W Horwitz & GW Latimer-Jr, Eds.). 18th ed. AOAC International.
- Archibong, E. J., Ironidi, C. R., Ezemba, C. C., Awah, N. S., & Ozuah, C. L. 2015. improved sorghum cultivars (SSV98001, SSV98002 and SK5912) and their applications in the mashing studies of a Nigerian local white sorghum variety. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 2, 20–28.
- Bamforth, C. W. 1999. Endogenous and exogenous enzymes in malting and brewing. Pages 149–156 in 2nd European Symposium on Enzymes in Grain Processing ESEPG-2. Simoinen, T., Tenkanen, M., eds. VTT Biotechnology, Finland.
- Baş, D., & Boyaci, I. H. 2007. Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78, 836–845 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>.
- Beatty, M. K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A. M., & James, M. G. 1999. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiol.* 119, 255–266 <https://doi.org/10.1104/pp.119.1.255>.
- Bekele, A., Bultosa, G., & Belete, K. 2012. The effect of germination time on malt quality of six sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties grown at Melkassa, Ethiopia. *J. Inst. Brew.* 118, 76–81 <https://doi.org/10.1002/jib.19>.
- Beleia, A., & Marston, E. 1981. Pearl millet amylases I. Properties of partially purified alpha-amylase. *Cereal Chem.* 58, 433–437.

- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. Pages 379–428 in *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. Nord, F.F., ed.
- Beta, T., Rooney, L. W., Marovatsanga, L. T., & Taylor, J. R. N. 2000. Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. *J. Cereal Sci.* 31, 295–302 <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0310>.
- Beta, T., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. 1995. Malting characteristics of sorghum cultivars. *Cereal Chem.* 72, 533–538.
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. 2005. *Statistics for experimenters : design, innovation, and discovery* (DJ Balding, P Bloomfield, NAC Cressie, NI Fisher, & JS Hunter, Eds.). 2nd ed. Hoboken : Wiley-Interscience, New Jersey.
- Briggs, D. E. 1998. *Malts and malting*. 1st ed. Blackie Academic, London.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. 2004. *Brewing: Science and Practice*. 1st ed. Elsevier Ltd.
- Claver, I. P., Zhang, H., Li, Q., Zhou, H., & Zhu, K. 2010. Optimized Conditions of Steeping and Germination and Their Effect on Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Composition. *Pakistan J. Nutr.* 9, 686–695 <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.686.695>.
- Codex-Alimentarius. 2012. Document de discussion sur les champignons et les mycotoxines dans le sorgho. Pages 128–136 in *Rapport de la sixième session du comité du Codex sur les contaminants dans les aliments*. FAO/OMS, Maastricht, Pays- Bas.
- Dagnelie, P. 2000. La planification des expériences : choix des traitements et dispositif expérimental. *J. la société française Stat.* 141, 5–29.
- Dagnelie, P. 2008. Expérimentation agronomique et expérimentation industrielle. *J. des Ingénieurs* 110, 26–30.
- Dagnelie, P. 2012. *Principes d'expérimentation - Planification des expériences et analyse de leur résultats*. Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux.

- Dalgaard, P., & Jørgensen, L. V. 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 105–115 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00019-1).
- Demuyakor, B., & Ohta, Y. 1992. Malt characteristics of sorghum vulgare varieties from Ghana. *J. Sci. Food Agric.* 59, 457–462 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590405>.
- Dennison, C. 2002. *A Guide to Protein Isolation* (R Kaptein, Ed.). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. 2011a. The response surface methodology as a reliable tool for evaluating the need of commercial mashing enzymes for alleviating the levels of reducing sugars. *J. Brew. Distill.* 2, 29–44.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. 2011b. Modeling the action of technical mashing enzymes on extracts and free-amino nitrogen yields of the Madjeru sorghum cultivar. *J. Brew. Distill.* 2, 29–44.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. 2011c. Optimisation of the Action of Commercial Mashing Enzymes on Wort Extracts and Free Amino Nitrogen of the Safrari Sorghum Cultivar. *Tech. Q.* 48, 77–86 <https://doi.org/10.1094/tq-48-3-0829-01>.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. 2011d. Use of the response surface methodology for optimizing the action of mashing enzymes on wort reducing sugars of the Madjeru sorghum cultivar. *African J. Food Sci.* 5, 91–99.
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., Tenin, D., & Kayem, G. J. 2010. Modelling and optimizing of mashing enzymes - Effect on yield of filtrate of unmalted sorghum by use of response surface methodology. *J. Inst. Brew.* 116, 62–69 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00399.x>.
- Devani, M., Shishoo, C., Shah, S., & Suhagia, B. 1989. Spectrophotometric method for

- microdetermination of nitrogen in Kjeldahl digest. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 953–956.
- Dewar, J. 1997. Endogenous and exogenous factors involved in sorghum germination with reference to malting.
- Dewar, J., Orovan, E., & Taylor, J. R. N. 1997a. Effect of alkaline steeping on water uptake and malt quality in sorghum. *J. Inst. Brew.* 103, 283–285 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00957.x>.
- Dewar, J., Taylor, J. R. N., & Berjak, P. 1997b. Effect of germination conditions, with optimised steeping, on sorghum malt quality - With particular reference to free amino nitrogen. *J. Inst. Brew.* 103, 171–175 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00946.x>.
- Dicko, M. H. 2006. Travaux pratiques de biochimie structurale et d'enzymologie. Bepress, Wageningen.
- Ditommaso, A., & Nurse, R. E. 2004. Impact of sodium hypochlorite concentration and exposure period on germination and radicle elongation of three annual weed species. *Seed Sci. Technol.* 32, 377–391 <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.2.10>.
- Dufour, J. P., Mélotte, L., & Srebrnik, S. 1992. Sorghum Malts for the Production of a Lager Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 50, 110–119 <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-50-0110>.
- Dunn, G., Hardie, D. G., & Manners, D. J. 1973. Observations on the action of limit dextrinases on amylopectin like polysaccharides. *Biochem. J.* 133, 413–416 <https://doi.org/10.1042/bj1330413>.
- Dunn, G., & Manners, D. J. 1975. The limit dextrinases from ungerminated oats (*Avena sativa* L.) and ungerminated rice (*Oryza sativa* L.). *Carbohydr. Res.* 39, 283–293 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86138-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86138-8).
- Ebbah, L., Laryea, D., Barimah, J., & Djameh, C. 2015. Effect of steeping temperature on the

- quality of malt and Pito (an indigenous Ghanaian drink). *J. Inst. Brew.* 121, 518–523
<https://doi.org/10.1002/jib.265>.
- EBC-Analysis-Committee. 1998. *Analytica-EBC*. Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag, Nurnberg.
- Edney, M. J. 2008. Variability of limit-dextrinase activity. Pages 453–460 in *Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium*. Ceccarelli, S., Grandó, S., eds. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Alexandria, Egypt.
- Emenike, O. B., Chibuzo, C. F., & Sabinus, O. O. E. 2015. Characterization of Partially Purified α -amylase from Germinating African Breadfruit (*Treculia africana*) Seeds. *Int. J. Primatol. Med. Sci.* 5, 15–21 <https://doi.org/10.5829/idosi.ijpms.2015.5.1.1111>.
- Enevoldsen, B. S., & Schmidt, F. 1974. Dextrins in Brewing: Studies on the Singly- Branched and Multiply- Branched Dextrins in Brewing. *J. Inst. Brew.* 80, 520–533
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb03643.x>.
- Englard, S., & Seifert, S. 1990. Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 182, 285–300
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82024-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82024-V).
- Evans, D. E., Collins, H., Eglinton, J., & Wilhelmson, A. 2005. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict malt fermentability. Pages 185–198 in *Journal of the American Society of Brewing Chemists*.
- Evans, D. E., Li, C., & Eglinton, J. K. 2010. The properties and genetics of barley malt starch degrading enzymes. Pages 143–189 in *Advanced Topics in Science and Technology in China*. Zhang, G., Li, C., eds. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin.
- Evans, E., Van Wegen, B., Ma, Y., & Eglinton, J. 2004. The Impact of the Thermostability of α -Amylase, β -Amylase, and Limit Dextrinase on Potential Wort Fermentability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 210–218 <https://doi.org/10.1094/asbcj-61-0210>.

- Ezeogu, L. I., & Okolo, B. N. 1994. Effects of final warm water steep and air rest cycles on malt properties of three improved Nigerian sorghum cultivars. *J. Inst. Brew.* 100, 335–338
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00832.x>.
- Ezeogu, L. I., & Okolo, B. N. 1995. Effects of air rest periods on malting sorghum response to final warm water steep. *J. Inst. Brew.* 101, 39–45 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1995.tb00848.x>.
- Ezeogu, L., & Okolo, B. N. 1999. Relationship between some sorghum malt quality characteristics and nature of alkaline steep liquor. *J. Inst. Brew.* 105, 49–54
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00005.x>.
- FAO. 1995. Sorghum and millets in human nutrition (D Lubin, Ed.). FAO Food and Nutrition Series, Rome.
- FAOSTAT. 2019. Crops data.
- Fiechter, A. 1983. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Heidelberg : Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Fincher, G. B. 1989. Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 305–346
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001513>.
- Fischer, E., & Stein, E. A. 1961. DNS Colorimetric Determination of Available Carbohydrates in Foods. *Biochem. Prep.*, 30–37.
- Furegon, L., Peruffo, A. D. B., & Curioni, A. 1997. Immobilization of rice limit dextranase on γ -alumina beads and its possible use in starch processing. *Process Biochem.* 32, 113–120
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00054-4).
- GE-Healthcare. 2010. *Strategies for Protein Purification Handbook*. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.
- Gibson, G. 2001. Malting. Pages 173–203 in *Cereals processing technology*. Owens, G., ed.

Woodhead Publishing Limited, Cornwall, England.

Glennie, C. W., & Wight, A. W. 1986. Dextrins in sorghum beer. *J. Inst. Brew.* 92, 384–386
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04428.x>.

Goode, D. L., & Arendt, E. K. 2003. Pilot Scale Production of a Lager Beer from a Grist Containing 50% Unmalted Sorghum. *J. Inst. Brew.* 109, 208–217
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00161.x>.

Goupy, J., & Creighton, L. 2006. Introduction aux plans d'expériences. 3rd ed. Usine Nouvelle, Dunod, Paris.

Goupy, J., & Creighton, L. 2013. Introduction aux plans d'expériences-5e éd.: Toutes les techniques nécessaires à la conduite d'une étude.

Guido, L., & Moreira, M. 2013. Malting. Pages 51–70 in *Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products*. Guine, R. de P.F., Correia, P.M. dos R., eds. 1st ed. CRC Press, Boca Raton.

Guiga, W. 2006. Identification des inhibiteurs de la germination de l'orgeet mise au point d'un procédé de traitement des eaux detrempe en malterie en vue leur recyclage.

Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. 2010. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 318–328 <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>.

Hämäläinen, J. J., & Reinikainen, P. 2007. A simulation model for malt enzyme activities in Kilning. *J. Inst. Brew.* 113, 159–167 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00273.x>.

Hamer, R. J. 1995. Enzymes in the baking industry. Pages 190–222 in *Enzymes in Food Processing*. Woods, G.A., Tucker, L.F.J., eds. Springer US, Boston, MA.

Hardie, D. G., Manners, D. J., & Yellowlees, D. 1976. The limit dextrinase from malted sorghum (*sorghum vulgare*). *Carbohydr. Res.* 50, 75–85 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84084-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84084-7).

- Hassani, A., Zarnkow, M., & Becker, T. 2014. Influence of malting conditions on sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) as a raw material for fermented beverages. *Food Sci. Technol. Int.* 20, 453–63 <https://doi.org/10.1177/1082013213490710>.
- Heisner, C. B., & Bamforth, C. W. 2008. Thioredoxin in barley: Could it have a role in releasing limit dextrinase in brewery mashes? *J. Inst. Brew.* 114, 122–126 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00316.x>.
- Hejnaes, K., Matthiesen, F., & Skriver, L. 1998. Protein Stability in Downstream Processing. Pages 31–65 in *Bioseparation and Bioprocessing Vol II: processing, quality and characterization, economics, safety and hygiene*. Subramanian, G., ed. WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Henker, A., Schindler, I., Renz, A., & Beck, E. 1998. Protein heterogeneity of spinach pullulanase results from the coexistence of interconvertible isomeric forms of the monomeric enzyme. *Biochem. J.* 331, 929–935 <https://doi.org/10.1042/bj3310929>.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., & Ariff, A. Bin. 2012. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Res.* 2012, 1–14 <https://doi.org/10.1155/2012/921362>.
- Huang, Y., Cai, S., & Zhang, G. 2016. The relationship of limit dextrinase, limit dextrinase inhibitor and malt quality parameters in barley and their genetic analysis. *J. Cereal Sci.* 70, 140–145 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.05.027>.
- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. 2002. *Unit operations in food engineering*. 1st ed. CRC Press, Boca Raton.
- Icard-vernière, C., Christian, P., Traoré, A. S., & Trèche, S. 2004. Variation de l'activité α -amylasique et des teneurs en certains nutriments et facteurs anti-nutritionnels au cours de la préparation de farines de céréales germées par les dolotières de Ouagadougou. Pages 525–538 in *Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles en Afrique de*

- l'Ouest : le rôle des technologies alimentaires et des nutritionnistes : actes du 2ème atelier international. Traoré, A.S., Trèche, S., Brouwer, I.D., eds. Paris : Presses Universitaires de Ouagadougou ; IRD.
- Igyor, M. A., Ogbonna, A. C., & Palmer, G. H. 1998. Effect of malting temperature and time on enzyme development and sorghum wort properties. *J. Inst. Brew.* 104, 101–104 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1998.tb00982.x>.
- Igyor, M. A., Ogbonna, A. C., & Palmer, G. H. 2001. Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour. *Process Biochem.*
- Ijasan, B., Goodfellow, V., Bryce, J. H., Bringhurst, T. A., Brosnan, J. M., Jack, F. R., & Agu, R. C. 2011. Quality assessment of a sorghum variety malted commercially under tropical conditions and controlled tropical temperatures in the laboratory. *J. Inst. Brew.* 117, 206–211 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00462.x>.
- Illanes, A. 2008a. *Enzyme biocatalysis: Principles and applications* (A Illanes, Ed.). Springer Netherlands.
- Illanes, A. 2008b. Enzyme production. Pages 57–106 in *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Illanes, A., ed. Springer, Dordrecht.
- Illanes, A., Altamirano, C., & Wilson, L. 2008. Homogeneous enzyme kinetics. Pages 107–153 in *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Netherlands.
- Joglekar, A. M., & May, A. T. 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World* 32, 857–868.
- Karam, S. 2004. Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. <http://www.theses.fr>.
- Karmakar, M., & Ray, R. R. 2011. Optimization of production conditions of extra cellular β -glucosidase in submerged fermentation of waterhyacinth using response surface methodology by *Rhizopus oryzae* MTCC 9642. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2, 299–

308.

- Kebe, B. 2001. Le rôle du sorgho de décrue dans la sécurité alimentaire au Sahel. Pages 23–29 in *La culture du sorgho de décrue en Afrique de l’Ouest et du Centre*. Comas, J., MacPherson, H.G., eds. Agence Espagnole de Coopération Internationale (AECI)/ FAO.
- Khattak, W. A., Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., & Park, J. K. 2015. Endogenous hydrolyzing enzymes: Isolation, characterization, and applications in biological processes. Pages 535–579 in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Ramawat, K., Mérillon, J.M., eds. Springer International Publishing.
- Kimouche, K. 2008. Etude de quelques plans d’expériences associées aux surfaces de réponse.
- Koehler, P., & Wieser, H. 2013. Chemistry of cereal grains. Pages 11–45 in *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Gobbetti, M., Gänzle, M., eds. Springer, Boston, MA.
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. 2012. Biocatalysis, Enzyme Engineering and Biotechnology. Pages 125–166 in *Food Biochemistry and Food Processing*. Simpson, B.K., Nollet, L.M.L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y.H., eds. John Wiley & Sons, Inc.
- Kristensen, M., Lok, F., Planchot, V., Svendsen, I., Leah, R., & Svensson, B. 1999. Isolation and characterization of the gene encoding the starch debranching enzyme limit dextrinase from germinating barley. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1431, 538–546 [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00077-1).
- Kristensen, M., Planchot, V., Abe, J. I., & Svensson, B. 1998. Large-scale purification and characterization of barley limit dextrinase, a member of the α -amylase structural family. *Cereal Chem.* 75, 473–479 <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.4.473>.
- Kuntz, R. J., & Bamforth, C. W. 2007. Time course for the development of enzymes in barley. *J. Inst. Brew.* 113, 196–205 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00276.x>.
- Kunze, W. 2004. *Technology Brewing and Malting*. 3rd ed. VLB, Berlin, Germany.

- Labrou, N. E. 2014. Protein purification: An overview. Pages 3–10 in *Methods in molecular biology: Protein downstream processing: design, development and application of high and low resolution methods*. Labrou, N.E., ed. Humana Press Inc.
- Laing, W., & Christeller, J. 2004. Extraction of Proteins from Plant Tissues. Pages 4.7.1–4.7.7 in *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc.
- Larreta-Garde, V. 1997. *Enzymes en agroalimentaire*. Tec&Doc-Lavoisier.
- Léder, I. 2004. Sorghum and millets. Pages 66–83 in *Cultivated Plants, Primarily as Food Sources*. 1st ed. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- Lee, W. J., & Pyle, R. E. 1984. Barley Malt Limit Dextrinase: Varietal, Environmental, and Malting Effects. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 42, 11–17 <https://doi.org/10.1094/asbcj-42-0011>.
- Lefyedi, M. L., & Taylor, J. R. N. 2006. Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. *J. Inst. Brew.* 112, 108–116 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00240.x>.
- Lévêque, E., Janeček, Š., Haye, B., & Belarbi, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 3–14 [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00142-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00142-8).
- Lewis, M., & Bamforth, C. W. 2006. *Essays in brewing science*. Springer, New York.
- Li, B., Servaites, J. C., & Geiger, D. R. 1992. Characterization and subcellular localization of debranching enzyme and endoamylase from leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 98, 1277–1284 <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1277>.
- Li, Q. F., Zhang, G. Y., Dong, Z. W., Yu, H. X., Gu, M. H., Sun, S. S. M., & Liu, Q. Q. 2009. Characterization of expression of the OsPUL gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 351–358 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.001>.

- Liu, G., Hong, Y., Gu, Z., Li, Z., & Cheng, L. 2015. Pullulanase hydrolysis behaviors and hydrogel properties of debranched starches from different sources. *Food Hydrocoll.* 45, 351–360 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.006>.
- Longstaff, M. A., & Bryce, J. H. 1993. Development of limit dextrinase in germinated barley (*Hordeum vulgare* L.): Evidence of proteolytic activation. *Plant Physiol.* 101, 881–889 <https://doi.org/10.1104/pp.101.3.881>.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ludwig, I., Ziegler, P., & Beck, E. 1984. Purification and Properties of Spinach Leaf Debranching Enzyme. *Plant Physiol.* 74, 856–861 <https://doi.org/10.1104/pp.74.4.856>.
- Lyumugabe, F., Gros, J., Nzungize, J., Bajyana, E., & Thonart, P. 2012. Characteristics of African traditional beers brewed with sorghum malt: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16, 509–530.
- Macgregor, A. W. 1987. α -amylase, limit dextrinase, and α glucosidase enzymes in Barley and malt. *Crit. Rev. Biotechnol.* 5, 117–128 <https://doi.org/10.3109/07388558709086972>.
- Macgregor, A. W. 1996. Malting and brewing science: Challenges and opportunities. *J. Inst. Brew.* 102, 97–102 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00900.x>.
- MacGregor, E. A. 2004. The proteinaceous inhibitor of limit dextrinase in barley and malt. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1696, 165–170 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.09.018>.
- MacGregor, A. W., Bazin, S. L., Macri, L. J., & Babb, J. C. 1999. Modelling the contribution of alpha-amylase, beta-amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *J. Cereal Sci.* 29, 161–169 <https://doi.org/10.1006/jcers.1998.0233>.
- MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., & Bazin, S. L. 1994a. Limit dextrinase from malted barley : extraction, purification, and characterization. *Cereal Chem.* 71, 610–617.

- MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., & Bazin, S. L. 1994b. Purification and Characterisation of Limit Dextrinase Inhibitors from Barley. *J. Cereal Sci.* 20, 33–41
<https://doi.org/10.1006/jcrs.1994.1042>.
- Malleshi, N. G., & Desikachar, H. S. R. 1986. Studies on comparative malting characteristics of some tropical cereals and millets. *J. Inst. Brew.* 92, 174–176
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04393.x>.
- Manners, D. J., & Rowe, K. L. 1971. Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes Part xxv. The debranching enzyme system in germinated barley. *J. Inst. Brew.* 77, 358–365
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1971.tb03385.x>.
- Manners, D. J., & Yellowlees, D. 1971. Studies on Carbohydrate Metabolising Enzymes. Part XXVI. The Limit Dextrinase from Germinated Barley. *Starch - Stärke* 23, 228–234
<https://doi.org/10.1002/star.19710230704>.
- Manners, D. J., & Yellowlees, D. 1973. Studies on debranching enzymes. Part I: The limit dextrinase activity of extracts of certain higher plants and commercial malts. *J. Inst. Brew.* 79, 377–385
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03553.x>.
- Martin, M., & Štefan, J. 2007. Amylolytic enzymes: Types, structures and specificities. Pages 3–18 in *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Masuda, H., Takahashi, T., & Sugawara, S. 1987. Purification and Properties of Starch Hydrolyzing Enzymes in Mature Roots of Sugar Beets. *Plant Physiol.* 84, 361–365
<https://doi.org/10.1104/pp.84.2.361>.
- Mathieu, D., & Phan-tan-luu, R. 1997. Approach of response surface methodology. Pages 211–277 in *Surface of experiments*. Driesbeke, J., Fine, J., Saporta, G., eds. Technip editions, Paris, France.
- Mayer, H., Marconi, O., Regnicoli, G. F., Perretti, G., & Fantozzi, P. 2014. Production of a

- saccharifying rice malt for brewing using different rice varieties and malting parameters. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5369–5377 <https://doi.org/10.1021/jf501462a>.
- McCafferty, C. A., Jenkinson, H. R., Brosnan, J. M., & Bryce, J. H. 2004. Limit dextrinase - Does its malt activity relate to its activity during brewing? *J. Inst. Brew.* 110, 284–296 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00623.x>.
- McCleary, B. V. 1991. Measurement of polysaccharide degrading enzymes using chromogenic and colorimetric substrates. Pages 277–301 in *New diagnostics in crop sciences*. Skerritt, J.H., Appels, R., eds. CAB International, Australia.
- McCleary, B. V. 1992. Measurement of the content of limit-dextrinase in cereal flours. *Carbohydr. Res.* 227, 257–268.
- Megazyme. 2016. Assay procedure (PullG6 Method) for the measurement of microbial pullulanase and malt limit-dextrinase. Ireland.
- Mehnouch, A., Abd-Manap, Y., & Zohdi, N. 2014. Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. *Sci. world J.* 2014, 1–12 <https://doi.org/10.1155/2014/640949>.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428 <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Miller, J. N., Niesser, R., & Knopp, D. 2001. Enzymes and immunoassays. Pages 147–172 in *Handbook of analytical techniques*. Günzler, H., Williams, A., eds. 2nd ed. WILEY-VCH Verlag GmbH, Germany.
- Mohan, C., Long, K. D., & Mutneja, M. 2013. *An Introduction to Inhibitors and Their Biological Applications*. 1st ed. EMD Millipore Corporation, Billerica MA, Darmstadt, Germany.
- Møller, M. S. 2013. Structure, function and protein engineering in starch debranching enzyme

- systems. Barley limit dextrinase and its endogenous inhibitor.
- Morinaga, K., Honda, E., Morohashi, Y., & Matsushima, H. 1997. Pullulanase in mung bean cotyledons. Purification, some properties and developmental pattern during and following germination. *Physiol. Plant.* 101, 519–525 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01032.x>.
- Morrall, P., Boyd, H. K., Taylor, J. R. N., & Walt, W. H. Van Der. 1986. Effect of germination time, temperature and moisture on malting of sorghum (*Sorghum bicolor*). *J. Inst. Brew.* 92, 439–445 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04437.x>.
- Mundy, J. 1982. Isolation and characterization of two immunologically distinct forms of α -amylase and a β -amylase from seeds of germinated sorghum bicolor (L.) moench. *Carlsberg Res. Commun.* 47, 263–274 <https://doi.org/10.1007/BF02907787>.
- Muralikrishna, G., & Nirmala, M. 2005. Cereal α -amylases - An overview. *Carbohydr. Polym.* 60, 163–173 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.002>.
- Nakamura, N., Sashihara, N., Nagayama, H., & Horikoshi, K. 1989. Characterization of Pullulanase and α - Amylase Activities of a *Thermus* sp. AMD33. *Starch - Stärke* 41, 112–117 <https://doi.org/10.1002/star.19890410310>.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 03, 375–380.
- Nethrphan, S. 2002. Study of starch debranching enzymes in developing wheat kernels.
- Nguemogne, A. C., Desobgo, Z. S. C., & Nso, E. J. 2017. Comparative study of limit dextrinase potential of three sorghum cultivars (Safrari, Madjeru, and S.35). *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 75, 255–261 <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3015-01>.
- Nirmala, M., Subba Rao, M. V. S. S. T., & Muralikrishna, G. 2000. Carbohydrates and their degrading enzymes from native and malted finger millet (*Ragi*, *Eleusine coracana*, Indaf-15). *Food Chem.* 69, 175–180 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00250-2).

- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. 2009. Quantitation of Protein. Pages 73–95 in *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. Burgess, R.R., Deutscher, M.P., eds. 2nd ed. Academic Press Inc.
- El Nour, M. E. M., & Yagoub, S. O. 2010. Partial purification and characterization of α and β -amylases isolated from sorghum bicolor cv. (feterita) malt. *J. Appl. Sci.* 10, 1314–1319 <https://doi.org/10.3923/jas.2010.1314.1319>.
- Novellie, L. 1962. Kaffircorn malting and brewing studies. XI.—Effect of malting conditions on the diastatic power of kaffircorn malt. *J. Sci. Food Agric.* 13, 115–120 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130210>.
- Nso, E. J., Ajebesone, P. E., Mbofung, C. M., & Palmer, G. H. 2003. Properties of Three Sorghum Cultivars Used for the Production of Bili-Bili Beverage in Northern Cameroon. *J. Inst. Brew.* 109, 245–250 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00165.x>.
- Nso, E. J., Nanadum, M., & Palmer, G. H. 2006. effects of formaldehyde on enzyme development in sorghum malts. *Tech. Q. MBAA Commun.* 43, 227–232.
- Nzelibe, H. C., & Nwasike, C. C. 1995. The brewing potential of ‘acha’ (*Digitaria exius*) malt compared with pearl millet (*Pennisetum typhoides*) malts and sorghum (*Sorghum bicolor*) malts. *J. Inst. Brew.* 101, 345–350 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1995.tb00871.x>.
- O’Rourke, T. 2002. The function of enzymes in brewing. *Brew. Int.* 2, 14–18.
- Ogbonna, A. C. 2011. Current developments in malting and brewing trials with sorghum in Nigeria: A review. *J. Inst. Brew.* 117, 394–400 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00485.x>.
- Ogbonna, A. C., Obi, S. K. C., & Okolo, B. N. 2003. Protein modification in malting sorghum. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 495–503 <https://doi.org/10.1023/A:1025189713390>.
- Ogu, E. O., Odibo, F. J. C., Agu, R. C., & Palmer, G. H. 2006. Quality assessment of different sorghum varieties for their brewing potential. *J. Inst. Brew.* 112, 117–121

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00241.x>.

Okafor, N. 1995. Improving and extending the utilization of sorghum and other tropical cereals with particular reference to brewing. Pages 77–85 in *Transformation et Utilisation Industrielle du Sorgho et Céréales Assimilées en Afrique*. Menyonga, J.M., Bezuneh, T., Nwasike, C.C., Sedogo, P.M., Tenkouano, A., eds. OUA/CSTR – SAFGRAD, Ouagadougou, Burkina Faso.

Okoli, E. V., Okolo, B. N., Moneke, A. N., & Ire, F. S. 2010. Effects of Cultivar and Germination Time on Amylolytic Potential, Extract Yield and Wort Fermenting Properties of Malting Sorghum. *Asian J. Biotechnol.* 2, 14–26
<https://doi.org/10.3923/ajbkr.2010.14.26>.

Okolo, B. N., & Ezeogu, L. I. 1996a. Promoting sorghum reserve protein mobilisation by steeping in alkaline liquor. *J. Inst. Brew.* 102, 277–284 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00913.x>.

Okolo, B. N., & Ezeogu, L. I. 1996b. Enhancement of amylolytic potential of sorghum malts by alkaline steep treatment. *J. Inst. Brew.* 102, 79–85 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00897.x>.

Okungbowa, J., Obeta, J. A. N., & Ezeogu, L. I. 2002. Sorghum β -amylase production: Relationship with grain cultivar, steep regime, steep liquor composition and kilning temperature. *J. Inst. Brew.* 108, 362–370 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00562.x>.

Osman, A. M. 2002. The advantages of using natural substrate-based methods in assessing the roles and synergistic and competitive interactions of barley malt starch-degrading enzymes. *J. Inst. Brew.* 108, 204–214 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00542.x>.

Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., & de Jersey, J. 2002.

- Characterisation and Assessment of the Role of Barley Malt Endoproteases During Malting and Mashing¹. *J. Inst. Brew.* 108, 62–67 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00125.x>.
- Owuama, C. I. 1997. Sorghum: A cereal with lager beer brewing potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 253–260 <https://doi.org/10.1023/A:1018566503879>.
- Owuama, C. I. 1999. Brewing beer with sorghum. *J. Inst. Brew.* 105, 23–34 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00002.x>.
- Owuama, C. I., & Asheno, I. 1994. Studies on malting conditions for sorghum. *Food Chem.* 49, 257–260 [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90169-4).
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135 <https://doi.org/10.1042/ba19990073>.
- Piggott, R. 2002. Commercial enzyme production and genetic modification of source organisms. Pages 229–244 in *Enzymes in food technology*. Whitehurst, R.J., Law, B.A., eds. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Ponnusami, V., & Gunasekar, V. 2015. Production of pullulan by microbial fermentation. Pages 581–596 in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Ramawat, K., Mérillon, J.M., eds. Springer, Cham, Switzerland.
- Pratt, G. W., Chapple, T. W., & Fahy, M. J. 1981. Preparation of malt high in alpha-1,6-hydrolase. *Geothermics* 14, 595–599 [https://doi.org/10.1016/0375-6505\(85\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0375-6505(85)90011-2).
- Purseglove, J. W. 1972. *Tropical Crops. Monocotyledons (revised and updated)* (JW Purseglove, Ed.). 1st ed. Longman, London.
- Rajagopal, V., Ramakrishnan, P., & Indhumathi, J. 2009. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World J. Chem.* 4, 89–91.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., & Smith, J. E. 1991. Effect of surface sterilization, fumigation and

- gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 47–54 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90135-C](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90135-C).
- Rehm, H. 2006. *Protein biochemistry and proteomics*. 1st ed. Elsevier/Academic Press, USA.
- Renz, A., Schikora, S., Schmid, R., Kossmann, J., & Beck, E. 1998. cDNA sequence and heterologous expression of monomeric spinach pullulanase: Multiple isomeric forms arise from the same polypeptide. *Biochem. J.* 331, 937–945 <https://doi.org/10.1042/bj3310937>.
- Repellin, A., Båga, M., & Chibbar, R. N. 2008. In vitro pullulanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) limit-dextrinase type starch debranching enzyme is modulated by redox conditions. *J. Cereal Sci.* 47, 302–309 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.04.015>.
- Rodríguez-Nogales, J. M., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. 2007. Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. *Food Chem.* 101, 634–642 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.055>.
- Roehr, M., Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., Pieper, H. J., & Senn, T. 2001. *The biotechnology of ethanol. Classical and future applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
- Rooney, L. W. 1988. The Utilization of Sorghum : A World Review. *CEIBA* 29, 191–203.
- Rosenberg, I. M. 2005. *Protein analysis and purification: Benchtop techniques: Second edition*. 2nd ed. Birkhauser Boston.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501–508 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>.
- Ross, H. A., Sungurtas, J., Ducreux, L., Swanston, J. S., Davies, H. V., & McDougall, G. J. 2003. Limit dextrinase in barley cultivars of differing malting quality: Activity, inhibitors and limit dextrin profiles. *J. Cereal Sci.* 38, 325–334 [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00048-1).
- Rothe, G. M. 1994. *Electrophoresis of Enzymes : Laboratory Methods*. 1st ed. Springer Berlin

Heidelberg.

Sabre, R. 2007. Plans d'expériences Méthode de Taguchi. Tech. l'ingénieur Génie Ind. Aliment. base docum.

Sattayasai, N. 2012. Protein Purification. Pages 3–18 in Protein Purification. Ekinci, D., ed. Intech, Croatia.

Schmedding, D. J. M., & Van Gestel, M. J. M. C. 2002. Enzymes in brewing. Pages 57–75 in Enzymes in Food Technology. Whitehurst, R.J., Law, B.A., eds. CRC Press, Sheffield.

Schmitt, M. R., Skadsen, R. W., & Budde, A. D. 2013. Protein mobilization and malting-specific proteinase expression during barley germination. *J. Cereal Sci.* 58, 324–332 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.007>.

Schnitzenbaumer, B. 2013. Fundamental studies on the application of enzymes when brewing with unmalted oats and sorghum.

Scopes, R. K. 1987. Protein Purification. 2nd ed. Springer-Verlag New York, New York.

Scopes, R. K. 1995. Overview of Protein Purification and Characterization. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 0, 1.1.1-1.1.6 <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0101s00>.

Shetty, K., Pometto, A., Paliyath, G., & Levin, R. E. 2005. Food Biotechnology (A Pometto, K Shetty, G Paliyath, & RE Levin, Eds.). 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. 2010. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. *Carbohydr. Polym.* 80, 401–407 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.040>.

Sissons, M. J. 1991. Studies of barley limit dextrinase. Glen Osmond, South Australia.

Sissons, M. J., Lance, R. C. M., & Sparrow, D. H. B. 1992. Studies on limit dextrinase in barley I. Purification of malt limit dextrinase and production of monospecific antibodies. *J. Cereal Sci.* 16, 107–116 [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80143-4](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80143-4).

Ślomińska, L., & Mącznyński, M. 1985. Studies on the Application of Pullulanase in Starch

- Saccharification Process. Starch - Stärke 37, 386–390
<https://doi.org/10.1002/star.19850371107>.
- Stenholm, K., & Home, S. 1999. A new approach to limit dextrinase and its role in mashing. *J. Inst. Brew.* 105, 205–210 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00020.x>.
- Stenhouse, J. W., & Tippayaruk, J. L. 1996. Sorghum bicolor (L.) Moench. Pages 130–136 in *Plant Resources of South-East Asia No 10. Cereals*. Grubben, G.J.H., Partohardjono, S., eds. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.
- Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. 2009. Buffers: Principles and Practice. Pages 43–56 in *Methods in Enzymology*. Burgess, R.R., Deutscher, M.P., eds. 2nd ed. Elsevier Inc.
- Synowiecki, J. 2007. The use of starch processing enzymes in the food industry. Pages 19–34 in *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Polaina, J., MacCabe, A.P., eds. Springer Netherlands.
- Taylor, J. R. N., & Dewar, J. 1994. Role of alpha-glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mashes. *J. Inst. Brew.* 100, 417–419
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00840.x>.
- Taylor, J. R. N., Dlamini, B. C., & Kruger, J. 2013. 125th anniversary review: The science of the tropical cereals sorghum, maize and rice in relation to lager beer brewing. *J. Inst. Brew.* 119, 1–14 <https://doi.org/10.1002/jib.68>.
- Taylor, A. I., & Leach, R. M. 1995. Enzymes in the food industry. Pages 26–40 in *Enzymes in Food Processing*. Tucker, G.A., Woods, L.F.J., eds. 2nd ed. Springer Science+Business Media, Dordrecht.
- Taylor, J. R. N., & Robbins, D. J. 1993. Factors influencing beta-amylase activity in sorghum malt. *J. Inst. Brew.* 99, 413–416 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01181.x>.
- Taylor, J. R. N., Schober, T. J., & Bean, S. R. 2006. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *J. Cereal Sci.* 44, 252–271 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.009>.

- Teal, A. R., & Wymer, P. E. O. 1994. Enzymes and their Role in Biotechnology (Biochemistry Across the School Curriculum - Guidance Notes for Advanced Biology no. 3). Biochemical Society, London.
- Tesfaendrias, M. T., McLaren, N. W., & Swart, W. J. 2009. The effect of grain mould fungi on sorghum malt quality and its management during malting. *South African J. Plant Soil* 26, 45–47 <https://doi.org/10.1080/02571862.2009.10639931>.
- Tinsson, W. 2010. Plans d'expérience : constructions et analyses statistiques (G Allaire & J Garnier, Eds.). 1st ed. Springer Berlin Heidelberg, New York.
- Tipton, F. K. 2002. Principles of enzyme assay and kinetic studies. Pages 1–47 in *Enzyme Assays: A Practical Approach*. Eisenthal, R., Danson, M.J., eds. 2nd ed. Oxford University Press.
- Tucker, G. A. 1995. Fundamentals of enzyme activity. Pages 1–25 in *Enzymes in Food Processing*. Woods, G.A., Tucker, L.F.J., eds. Springer US, Boston.
- Tucker, G. A., & Woods, L. F. J. 1995. *Enzymes in Food Processing* (GA Tucker & LFJ Woods, Eds.). 2nd ed. Springer US, Boston, MA.
- Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., Wanapu, C., Arendt, E. K., Kreis, S., Boonkerd, N., Teamroong, N., & Zarnkow, M. 2011. Optimization of malting conditions for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* l. Indica). *J. Inst. Brew.* 117, 39–46 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00441.x>.
- Uvere, P. O., Adenuga, O. D., & Mordi, C. 2000. The effect of germination and kilning on the cyanogenic potential, amylase and alcohol levels of sorghum malts used for burukutu production. *J. Sci. Food Agric.* 80, 352–358 [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<352::AID-JSFA434>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<352::AID-JSFA434>3.0.CO;2-I).
- Vester-Christensen, M. B. 2010. Production, purification and structural characterisation of recombinant barley limit dextrinase and characterisation of its interaction with the

endogenous limit dextrinase inhibitor.

Vivier, S. 2002. Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis.

Walker, J. W., Bringham, T. A., Broadhead, A. L., Brosnan, J. M., & Pearson, S. Y. 2001. The survival of limit dextrinase during fermentation in the production of scotch whisky. *J. Inst. Brew.* 107, 99–106 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2001.tb00082.x>.

Wang, X. dong, Yang, J., & Zhang, G. ping. 2006. Genotypic and environmental variation in barley limit dextrinase activity and its relation to malt quality. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 7, 386–392 <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0386>.

Ward, W., & Swiatek, G. 2009. Protein Purification. Pages 85–105 in *Current Analytical Chemistry*. Bentham Science Publishers.

Wong, D. W. S. 1995. *Food enzymes : structure and mechanism*. 1st ed. Springer US.

Woods, L. F. J., & Swinton, S. J. 1995. Enzymes in the starch and sugar industries. Pages 250–267 in *Enzymes in Food Processing*. Tucker, G.A., Woods, L.F.J., eds. Springer US, Glasgow.

Woonton, B. W., Jacobsen, J. V., Sherkat, F., & Stuart, I. M. 2005. Changes in germination and malting quality during storage of barley. *J. Inst. Brew.* 111, 33–41 <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00646.x>.

Wu, C., Colleoni, C., Myers, A. M., & James, M. G. 2002. Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 21–32 [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00412-5).

Wu, S. J., Kim, J. M., Zhou, C., Jin, Z. Y., & Tong, Q. Y. 2010. Estimation of pullulan by hydrolysis with pullulanase. *Biotechnol. Lett.* 32, 1143–1145 <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0272-2>.

Yamada, J. 1981a. Purification of Oat Debranching Enzyme and Occurrence of Inactive

- Debranching Enzyme in Cereals. *Agric. Biol. Chem.* 45, 1013–1015
<https://doi.org/10.1271/bbb1961.45.1013>.
- Yamada, J. 1981b. Inactive debranching-enzyme in rice seeds, and its activation. *Carbohydr. Res.* 90, 153–157 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85624-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85624-4).
- Yamasaki, Y., Nakashima, S., & Konno, H. 2008. Pullulanase from rice endosperm. *Acta Biochim. Pol.* 55, 507–510.
- Yellowlees, D. 1980. Purification and characterisation of limit dextrinase from *Pisum sativum* L. *Carbohydr. Res.* 83, 109–118 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85370-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85370-7).
- Zarnkow, M., Keßler, M., Burberg, F., Back, W., Arendt, E. K., & Kreis, S. 2007. The use of response surface methodology to optimise malting conditions of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) as a raw material for gluten-free foods. *J. Inst. Brew.* 113, 280–292
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00288.x>.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., & Smith, A. M. 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytol.* 163, 247–261 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01101.x>.
- Zhu, Z. P., Hylton, C. M., Rössner, U., & Smith, A. M. 1998. Characterization of starch-debranching enzymes in pea embryos. *Plant Physiol.* 118, 581–590
<https://doi.org/10.1104/pp.118.2.581>.

ANNEXES

ANNEXES

B

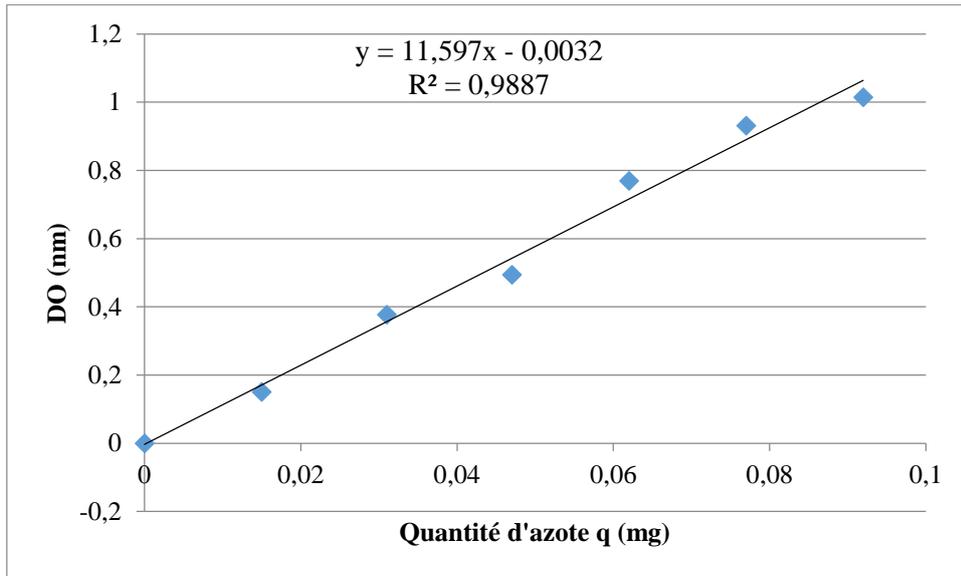


Figure 1a: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines totales brutes selon la méthode de Devani *et al.* (1989).

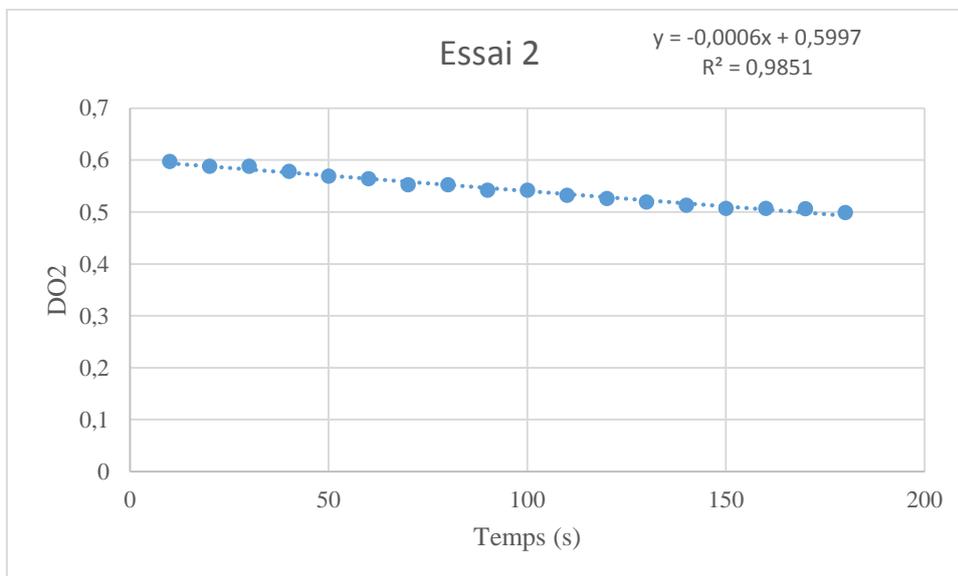
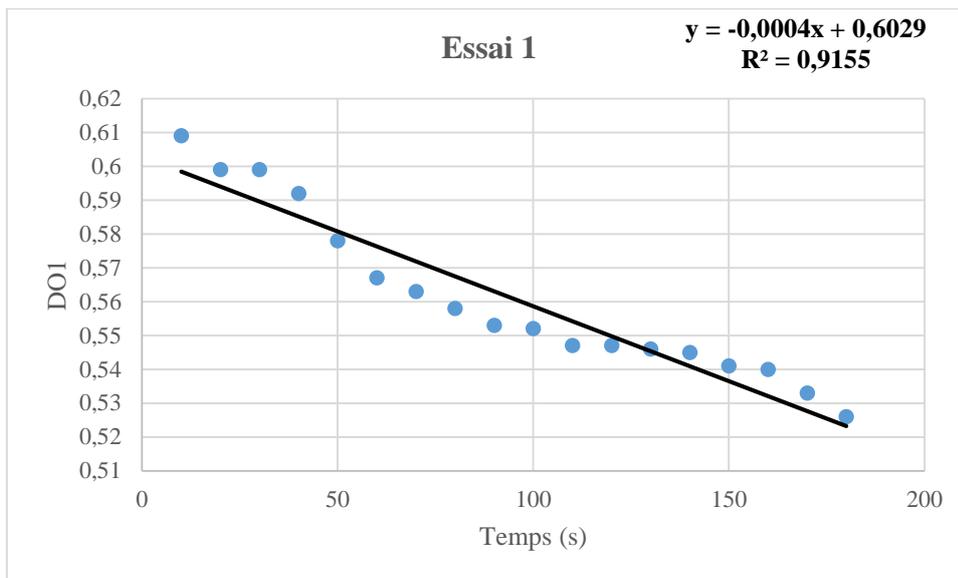
ANNEXE 2 : Tableau des densités optiques en fonction du temps des 16 essais du plan de criblage

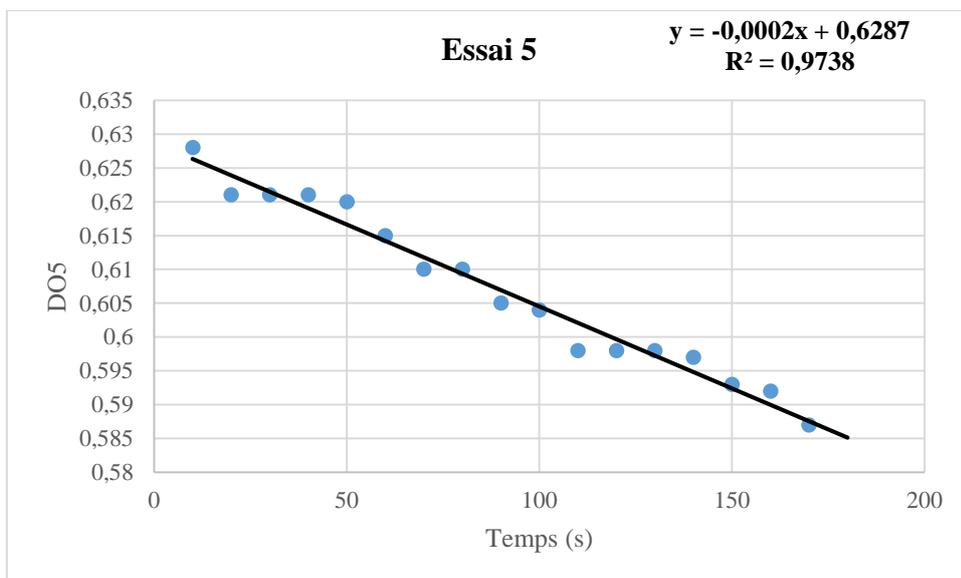
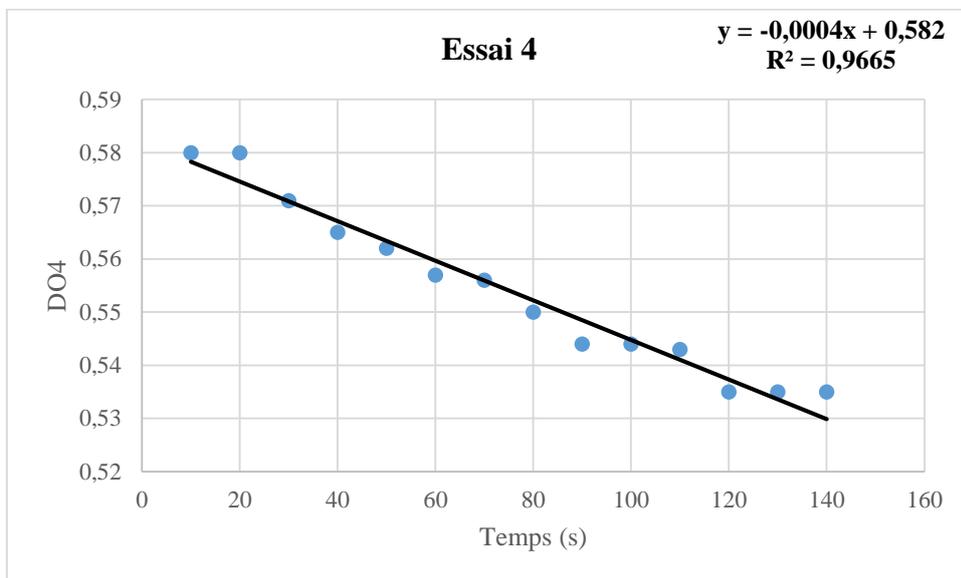
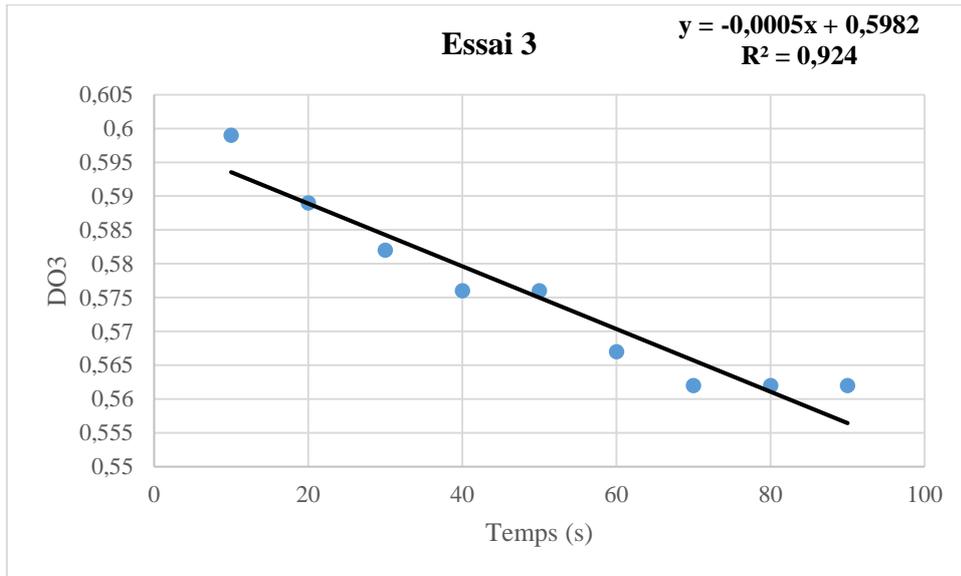
Tableau 1b : Densités optiques en fonction du temps des 16 essais du plan de criblage

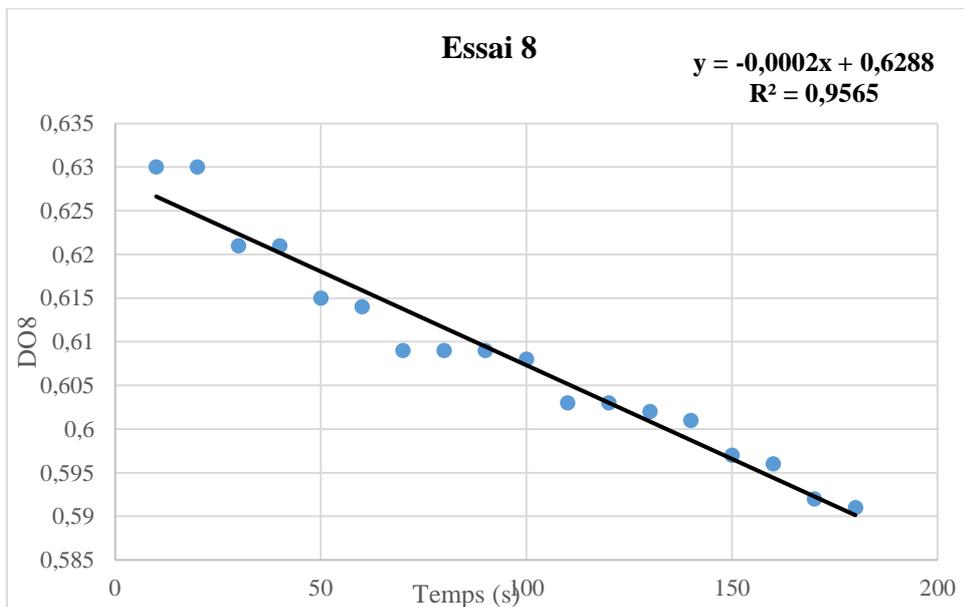
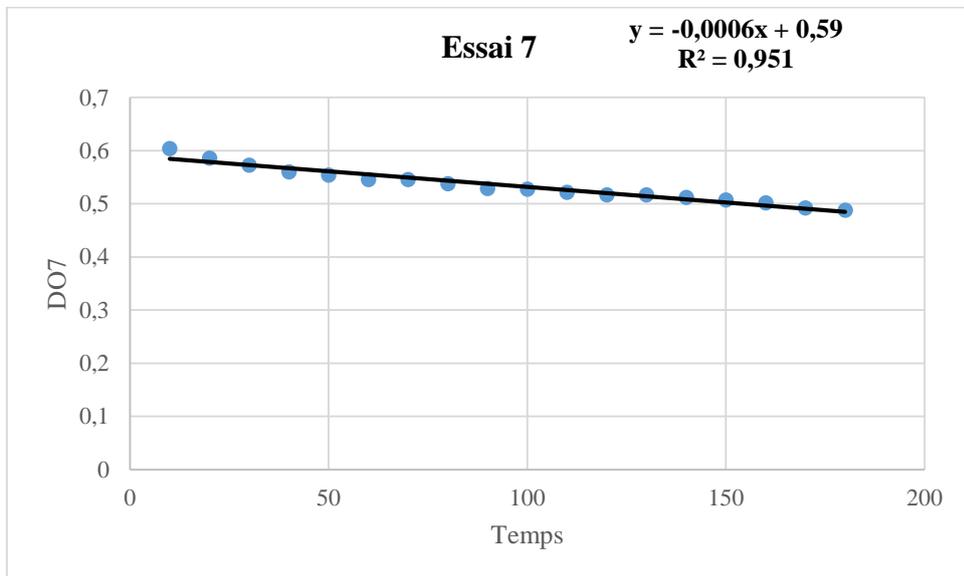
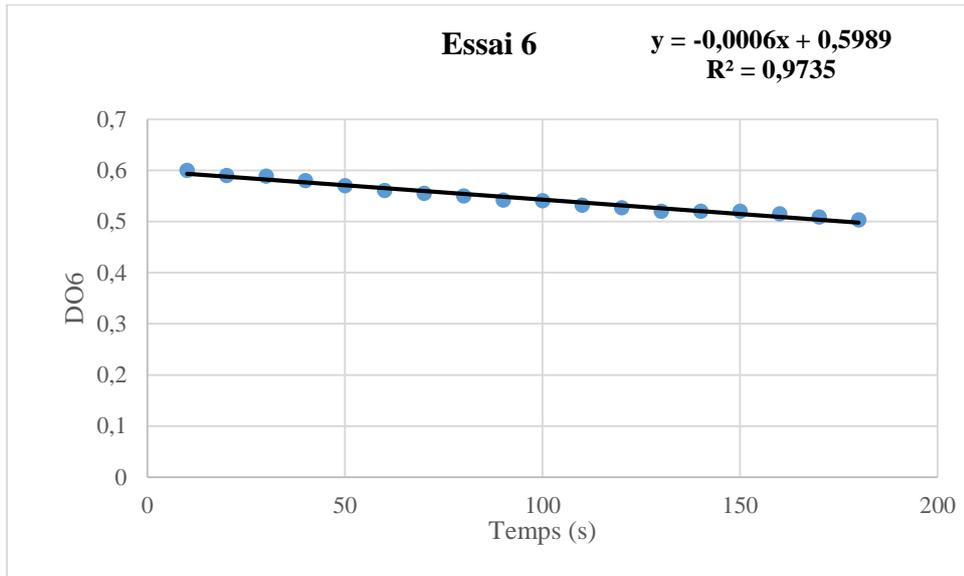
Essais/ Temps (s)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
10	0,609	0,597	0,599	0,58	0,628	0,6	0,604	0,63	0,604	0,625	0,618	0,637	0,638	0,64	0,563	0,636
20	0,599	0,588	0,589	0,58	0,621	0,59	0,586	0,63	0,592	0,625	0,61	0,637	0,638	0,624	0,553	0,636
30	0,599	0,588	0,582	0,571	0,621	0,589	0,573	0,621	0,591	0,618	0,606	0,63	0,637	0,619	0,545	0,624
40	0,592	0,578	0,576	0,565	0,621	0,58	0,56	0,621	0,575	0,613	0,595	0,629	0,628	0,618	0,537	0,624
50	0,578	0,569	0,576	0,562	0,62	0,57	0,554	0,615	0,575	0,613	0,595	0,618	0,623	0,609	0,525	0,624
60	0,567	0,564	0,567	0,557	0,615	0,561	0,546	0,614	0,575	0,613	0,588	0,618	0,623	0,608	0,516	0,617
70	0,563	0,552	0,562	0,556	0,61	0,555	0,546	0,609	0,563	0,612	0,583	0,612	0,622	0,6	0,515	0,616
80	0,558	0,552	0,562	0,55	0,61	0,55	0,538	0,609	0,559	0,604	0,577	0,606	0,615	0,6	0,505	0,609
90	0,553	0,542	0,562	0,544	0,605	0,542	0,529	0,609	0,558	0,604	0,571	0,605	0,615	0,6	0,497	0,604
100	0,552	0,542		0,544	0,604	0,541	0,528	0,608	0,55	0,603	0,571	0,601	0,609	0,6	0,49	0,599
110	0,547	0,532		0,543	0,598	0,532	0,522	0,603	0,549	0,597	0,566	0,595	0,604	0,589	0,489	0,599
120	0,547	0,526		0,535	0,598	0,527	0,517	0,603	0,539	0,596	0,559	0,594	0,604	0,589	0,48	0,593
130	0,546	0,519		0,535	0,598	0,52	0,517	0,602	0,53	0,591	0,558	0,585	0,603	0,58	0,47	0,593
140	0,545	0,513		0,535	0,597	0,52	0,512	0,601	0,521	0,591		0,585	0,596	0,575	0,462	0,592
150	0,541	0,507			0,593	0,52	0,507	0,597	0,52	0,585		0,581	0,596		0,462	0,592
160	0,54	0,507			0,592	0,515	0,502	0,596	0,519	0,58		0,58	0,595		0,457	0,587
170	0,533	0,506			0,587	0,509	0,492	0,592	0,514	0,575		0,575	0,589		0,453	0,586
180	0,526	0,499				0,503	0,488	0,591	0,513	0,574		0,575	0,589		0,448	0,586

ANNEXE 3 : Courbes des vitesses initiales en enzymes amylolytiques pour criblage du maltage

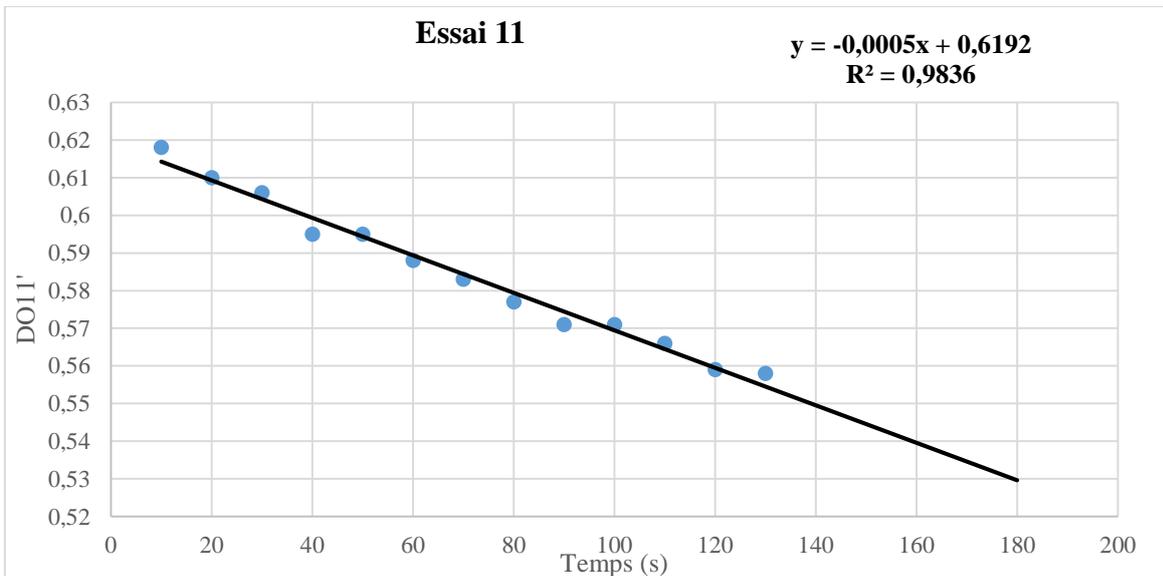
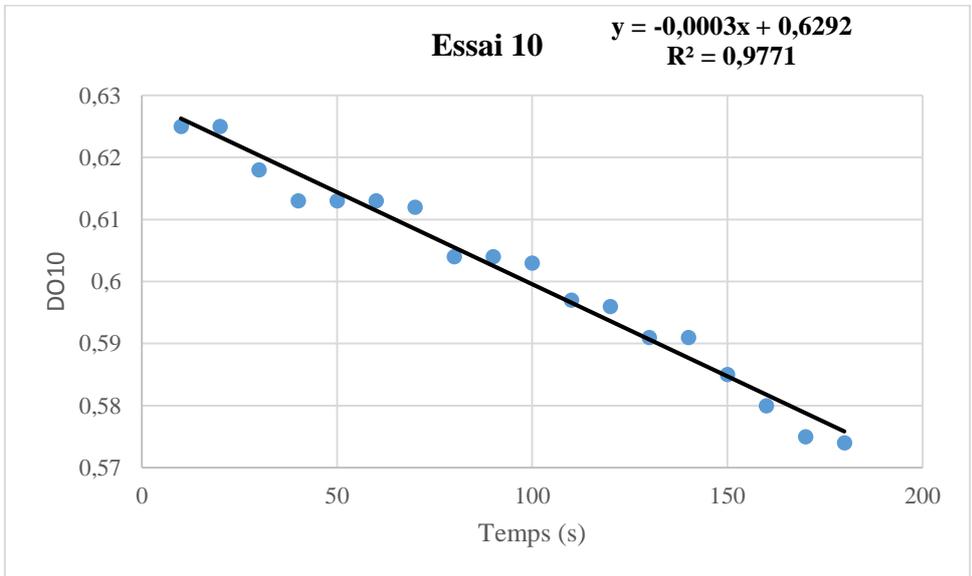
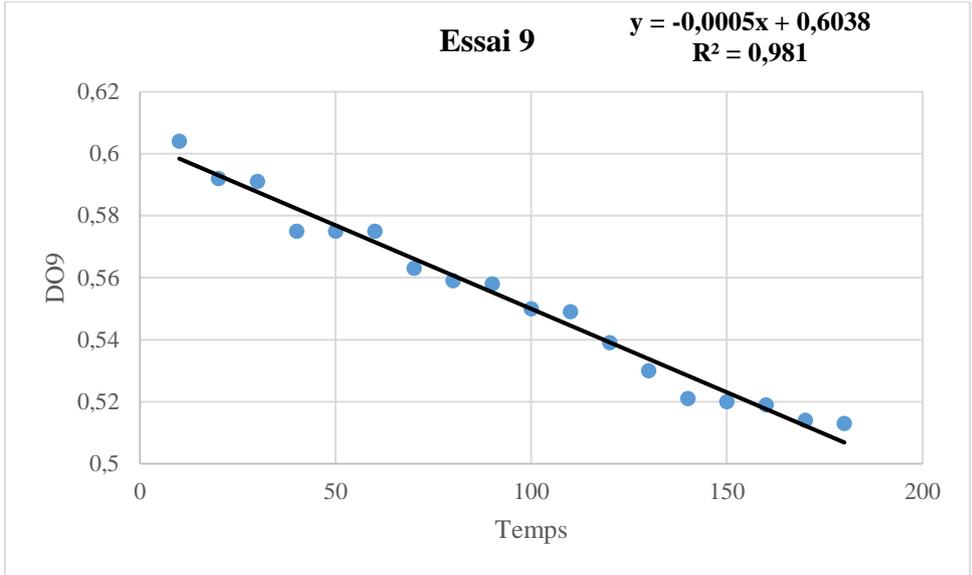
Les valeurs des vitesses initiales qui sont les coefficients directeurs des équations de droite sont exprimées sur les différentes figures par seconde. La multiplication de ces valeurs par 60 donne les vitesses en fonction du temps en minutes.



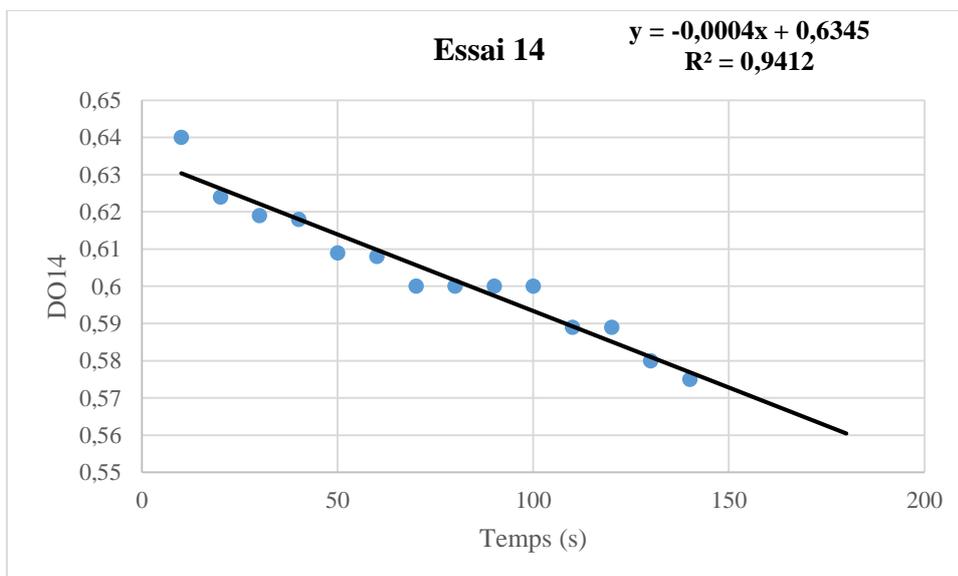
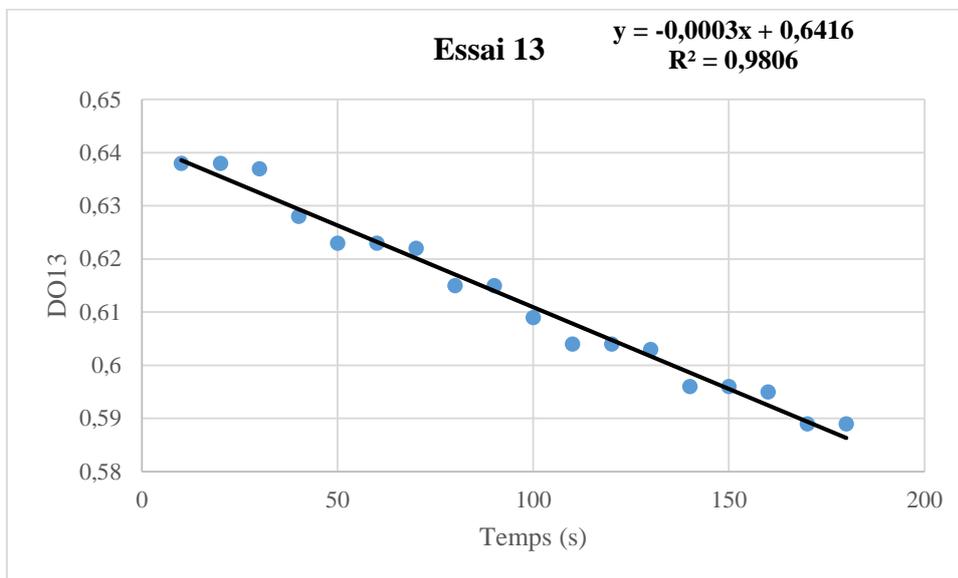
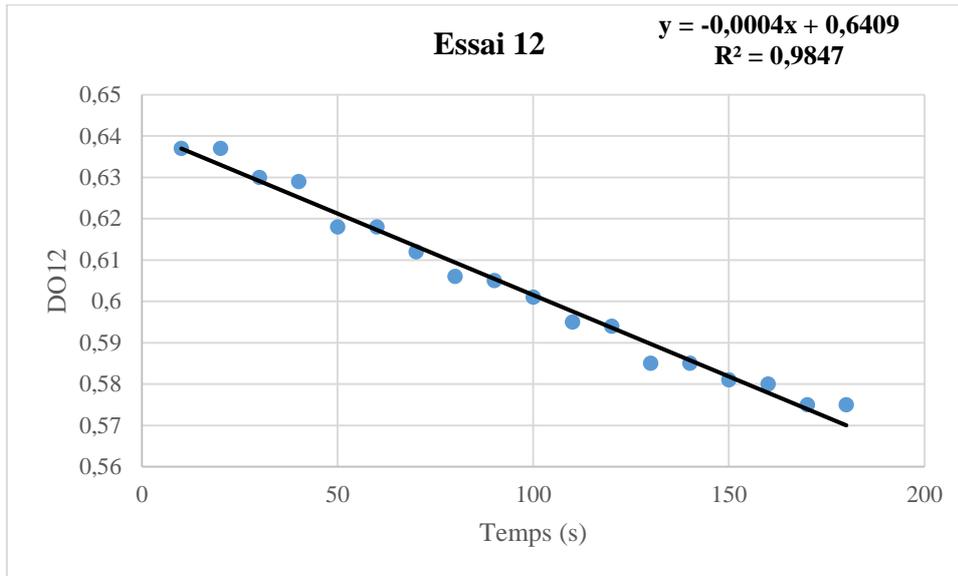


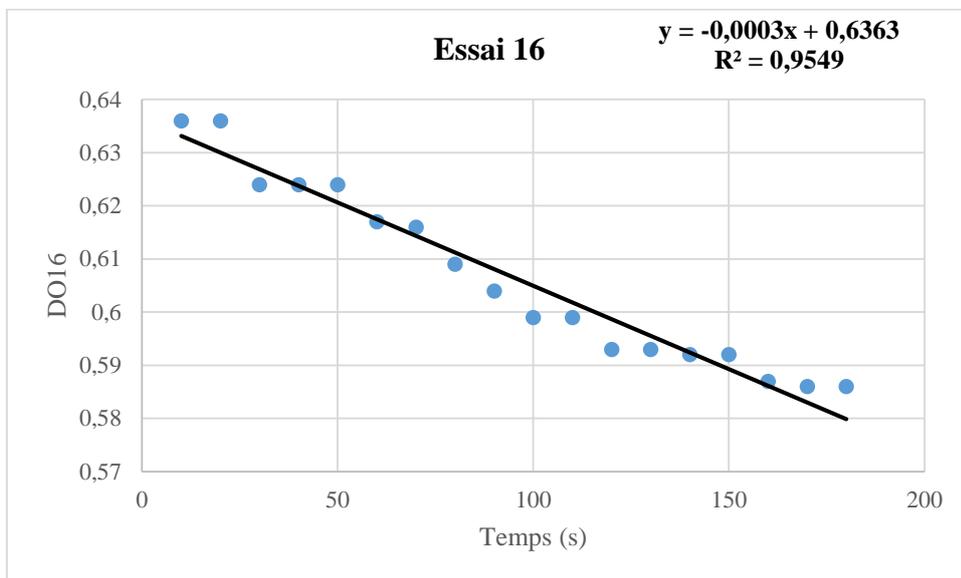
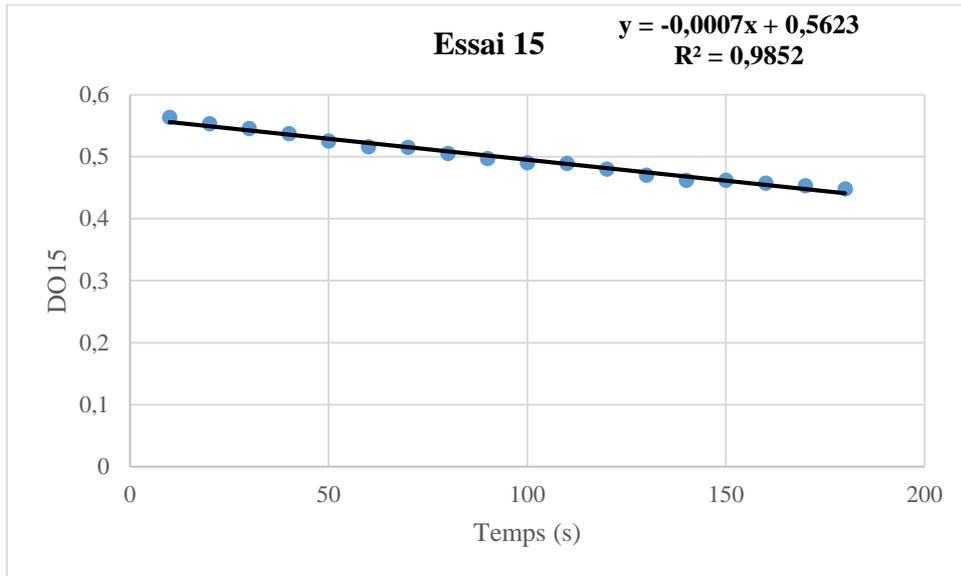


G



H





ANNEXE 4 : Préparation des solutions standards (gamme étalon) de maltose pour le dosage des sucres réducteurs selon la méthode au DNS de Fischer et Stein (1961).

- Une solution standard S_1 de maltose de concentration 2 mg / mL a été préparée.
- Les solutions standard respectives $S_2 = 0,25$ mg/mL; $S_3 = 0,5$ mg/ml; $S_4 = 1$ mg/mL; $S_5 = 1,5$ mg/mL ont été préparées en diluant la solution S_1 .

Mode opératoire

A l'aide des solutions étalon S_1, S_2, S_3, S_4, S_5 du maltose, la gamme d'étalonnage est préparée (Tableau 1c) et le dosage des échantillons est effectué comme indiquée dans le Tableau 2.6.

Tableau 1c : Etalonnage des sucres réducteurs par la méthode au DNS

N° de tubes	1	2 S_1	3 S_2	4 S_3	5 S_4	6 S_5
Standard maltose (mL)	0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Solution à doser (mL)	/	/	/	/	/	/
Eau distillé (mL)	1,25	1	1	1	1	1
DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Incuber les tubes dans un bain marie bouillant pendant 5 min, refroidir immédiatement dans l'eau glacée						
Eau distillée (mL)	4	4	4	4	4	4
Lire les DO à 540 nm						

Tableau 1d : Dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS

N° de tubes	Blanc	Echantillon		
		Essai 1	Essai 2	Essai 3
Extrait enzymatique (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25
Tampon (mL)	0,75	0,75	0,75	0,75
Pullulan (mL)	/	0,25	0,25	0,25
Faire réagir à 37 °C pendant 30 min				
DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25
Incuber les tubes dans un bain marie bouillant pendant 5 min, refroidir immédiatement dans l'eau glacée				
Eau distillée (mL)	4	4	4	4
Lire les DO à 540 nm				

ANNEXE 5 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (1951)

- ❖ Etalonnage pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (1951)

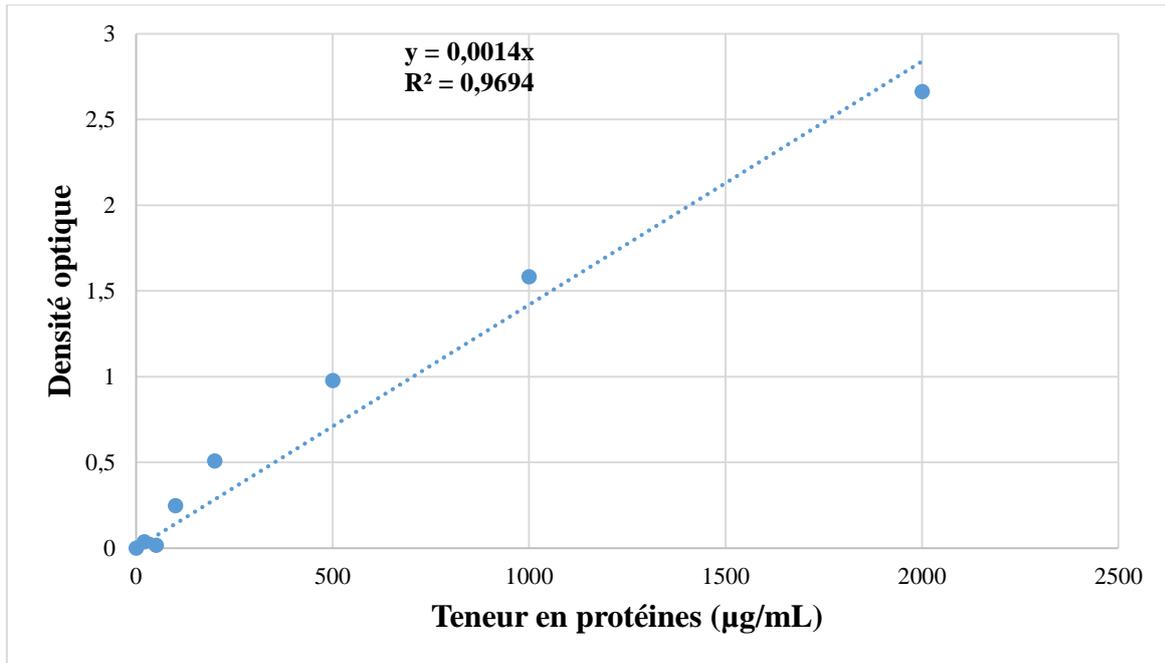


Figure 3a: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (1951)

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS