

**COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE**

**ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE**

**UNIVERSITE DE LIEGE − GEMBLOUX AGRO-BIOTECH**

**Contribution à l'étude des amylases du sorgho et leurs utilisations dans la transformation des produits amylacés**

**Khady BA**

Dissertation originale présentée en vue de l’obtention du grade

de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Prof. Philippe Thonart

Dr. Jacqueline Destain

**2013**

**Ba Khady (2013) Contribution à l'étude des amylases du sorgho et leurs utilisations dans la transformation des produits amylacés (Thèse de doctorat). Université de Liège − Gembloux Agro-Bio Tech, 162 p., 19 tabl., 24 fig.**

**Résumé -** Les amylases sont des enzymes largement utilisées dans le secteur industriel. Elles occupent d'ailleurs une place primordiale dans le marché mondial des enzymes. Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont intéressés à la production d’amylases à partir d’une source végétale peu coûteuse et disponible, le sorgho et aux possibilités de les utiliser dans la transformation des produits amylacés. Dans la première partie de l’étude, après avoir caractérisé et malté sept variétés de sorgho blanc sélectionné à l’ISRA de Bambey (Sénégal), la meilleure variété, la F-2-20 (sans tanins, faible teneur en composés phénoliques et bonnes activités amylasiques) a été retenue pour la suite de l’étude. Dans la deuxième partie des travaux, les paramètres physico-chimiques tels que le pH optimum, la température optimale et la thermostabilité des amylases (α et β) du malt ont été caractérisés. Les deux amylases ont le même pH optimal 5,5 et la température optimale est de 65 °C pour l’α-amylase et 55 °C pour la β‑amylase. Par ailleurs, le gène de la β-amylase a été aussi étudié. Les résultats de la troisième partie des travaux ont montré la capacité des amylases du malt de sorgho à être utilisées dans des processus d’hydrolyse d’amidon (maïs et blé) et farines (blé et manioc). L’ajout d’ions calcium n’améliore pas significativement les rendements d’hydrolyse. Enfin, suite aux résultats obtenus, l’hydrolyse a été réalisée à plus grande échelle afin de produire des dextrines de différents DE. Les dextrines ont été analysées chimiquement et physicochimiquement pour déterminer leur composition en oligosaccharides et leurs propriétés physiques en vue de leur application dans les secteurs agroalimentaires.

**Ba Khady (2013) Contribution to the study of sorghum amylases and uses thereof in starch processing (PhD Thesis). University of Liege − Gembloux Agro-Bio Tech, 162 p., 19 tabl., 24 fig.**

**Summary -** Amylases are enzymes widely used in industry. Moreover, they hold a primordial place in the world market for enzymes. Works presented in this manuscript were interested in the production of amylases from a plant source available and cheap, sorghum and possibilities to use them in the starch processing. In the first part of the study, after having characterized and malted seven white sorghum varieties selected in ISRA of Bambey (Senegal), the best variety, F-2-20 (without tannins, low phenolic content and good amylases activities) was selected for further study. In the second part of the work, physicochemical parameters such as pH and temperature optimum and thermostability of amylases (α and β) from the malt were characterized. Both amylases have the same pH optimum 5.5 and the optimum temperature is 65 °C for α-amylase to 55 °C for β-amylase. Also, sorghum β-amylase gene was studied. Results of the third part of works have shown the ability of sorghum malt amylases to be used in hydrolysis process of starch (corn and wheat) and flour (wheat and cassava). Addition of calcium ions did not significantly improve hydrolysis yields. Following the results obtained, hydrolysis was performed on a larger scale to produce various DE of dextrins. Dextrins were analyzed chemically and physicochemically to determine their oligosaccharide compositions and physical properties for their application in food industry.

**Copyright.** Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

Dédicace

*à mon époux, à mes enfants Alassane et Abby‑Kheifate, à mes parents et à toute ma famille*

Remerciements

Une autre page se tourne wouf!!!, mais celles qu'il me reste à écrire ne sont pas les plus faciles. Pendant ces années, on se demande comment remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail et ces quelques lignes ne suffiront pas pour exprimer toute ma reconnaissance.

Je m'excuse d'avance pour tout oubli.

Cette thèse s'est déroulée à l'unité de Bio-industries du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). J'adresse un grand merci et mon plus profond respect au Professeur PhilippeTHONART pour m'avoir accueillie au sein de cette unité. Merci pour sa confiance, ses remarques et discussions ayant maintenu et développé la motivation qu'il fallait pour qu’aboutisse ce travail.

Mille fois merci àJacqueline DESTAIN co-promoteur de cette thèse. Merci pour son encadrement, sa disponibilité, son dévouement, sa bonne humeur, ses conseils de tous les jours, et pour m’avoir formée dans la rédaction d’articles (je me souviendrai toujours de mon premier article plus rouge que bleu).

Je tiens à remercier également tout particulièrement Emmanuel TINEresponsable du labo MAGI de l'Ecole Supérieure Polytechnique de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Je tiens à remercier vivement les autres membres du jury et du comité de thèse : Bernard WATHELET et Ababacar Sadikh NDOYEpour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, Marianne SINDIC et Georges LOGNAY pour avoir suivi ce travail depuis le début.

Ce travail de doctorat a été réalisé grâce à une bourse de Wallonie-Bruxelles International (WBI) que je souhaite remercier pour son soutien financier.

Merci aux dévouées secrétaires du CWBI, Marina et Marguerite et une mention particulière à Marina (pour avoir si bien pris soin de moi et de ma famille durant ces années, tu resteras ma maman-belge).

Je remercie très sincèrement tout le personnel du CWBI (assistants et techniciens) pour leurs conseils, leur aide et pour tous les moments formidables passés ensemble.

J'adresse un grand merci à Robin DUBOIS-DAUPHIN, mon formateur en biologie moléculaire. Avec ta gentillesse et ta disponibilité, j'ai pu profiter de ton savoir, étendre mes compétences et me former dans ce domaine.

Je remercie également Mario AGUEDO et Catherine CHEMOTTI pour les analyses en HPLC.

Merci au Professeur Christophe BLECKER pour les analyses réalisées dans son unité et à Sabine DANTHINE pour les analyses aux RX.

Merci aux thésards du CWBI, Alison (ça va me manquer de ne plus t'entendre râler à un refus d'article), le sage Michel, pour tes blagues que j'adore, Roland, Jean-Noël, Jean-Claude, Charles, Hélène.

Merci à Bineta DIOUF, ma sœur, mon amie, la deuxième maman de mes enfants. Tout au long de ces années, tu as su m'écouter, me réconforter, me rassurer, m'épauler dans l'éducation des enfants (désolée de t'avoir traumatisé à la maternité), bref d'avoir été là.

Merci à Nafissatou NACOULIMAet sa famille, je me souviendrai de ces années, riches de bons souvenirs (surtout les poulets bicyclettes de Ouagadougou).

Je remercie également: Alabi Taofic (le roi autoproclamé du Djolof, toutes nos discussions et toutes nos taquineries), Lazare (mon frère ivoirien), Marie-Michèle (pour toutes les petites discussions que nous avons partagé), la famille Coulibaly, la famille Yapo (qui m'a appris certaines expressions ivoiriennes), Christine Moreira (qui m'a fait découvrir certains coins de la Belgique), les Familles: Houessou, Diagne, Sagna, Boissy pour les rencontres occasionnelles qui nous replongeaient dans l'ambiance sénégalaise. Un grand merci à la famille Fall d'avoir accepté de garder ma fille.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien incessant et affectueux et **Badara,** mon époux en particulier pour sa patience durant ces années passées loin de ses enfants et de sa femme et pour son amour.

**TABLES DES MATIERES**

[Introduction générale 1](#_Toc352233956)

[Références 6](#_Toc352233957)

[Objectifs de la thèse 7](#_Toc352233958)

[**Chapitre I** 9](#_Toc352233959)

[**Publication I**:](#_Toc352233960) [Les enzymes amylolytiques et leur application dans la transformation des produits amylacés : le cas du malt de sorgho 11](#_Toc352233961)

[Résumé 12](#_Toc352233962)

[Abstract 13](#_Toc352233963)

[1. Introduction 14](#_Toc352233964)

[2. La production d’amylases 15](#_Toc352233965)

[2.1. La fermentation 15](#_Toc352233966)

[2.2. L’ingénierie des amylases : expression des gènes et structure des protéines 17](#_Toc352233967)

[2.3. Le maltage de céréales 18](#_Toc352233968)

[3. Propriétés des enzymes amylolytiques 18](#_Toc352233969)

[4. Les enzymes amylolytiques végétales 20](#_Toc352233970)

[4.1. Les amylases du malt de sorgho 21](#_Toc352233971)

[4.1.1. Le sorgho 21](#_Toc352233972)

[4.1.2. Le maltage du sorgho et les problèmes au cours du maltage 22](#_Toc352233973)

[4.1.3. Les caractéristiques des amylases du malt de sorgho 23](#_Toc352233974)

[5. Les techniques de purification des amylases 24](#_Toc352233975)

[6. Applications possibles des amylases du malt de sorgho 24](#_Toc352233976)

[7. Conclusion 25](#_Toc352233977)

[Références 26](#_Toc352233978)

[**Chapitre II** 33](#_Toc352233979)

**PUBLICATION II**: [Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt 35](#_Toc352233981)

[Résumé 36](#_Toc352233982)

[Abstract 37](#_Toc352233983)

[1. Introduction 38](#_Toc352233984)

[2. Matériel et méthodes 40](#_Toc352233985)

[2. 1. Variétés de sorgho 40](#_Toc352233986)

[2. 2. Test de blanchiment (Chlorox) 40](#_Toc352233987)

[2. 3. Détermination des phénols totaux 42](#_Toc352233988)

[2. 4. Détermination des tanins condensés 42](#_Toc352233989)

[2. 5. Détermination de l’activité antioxydante 43](#_Toc352233990)

[2. 5. 1. Activité antioxydante mesurée par le radical DPPH 43](#_Toc352233991)

[2. 5. 2. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS 43](#_Toc352233992)

[2. 6. Maltage des différentes variétés 43](#_Toc352233993)

[2.7. Analyses statistiques 44](#_Toc352233994)

[3. Résultats et discussion 44](#_Toc352233995)

[3. 1. Caractéristiques des variétés de sorgho étudiées 44](#_Toc352233996)

[3. 2. Test de blanchiment 44](#_Toc352233997)

[3. 3. Phénols totaux 46](#_Toc352233998)

[3. 4. Tanins condensés 46](#_Toc352233999)

[3. 5. Activité antioxydante 47](#_Toc352234000)

[3. 6. Analyse des malts de sorgho 48](#_Toc352234001)

[4. Conclusion 51](#_Toc352234002)

[Remerciements 52](#_Toc352234003)

[5. Bibliographie 53](#_Toc352234004)

[**Chapitre III** 58](#_Toc352234005)

[**Publication III**:](#_Toc352234007) [Crude amylase characterization and cDNA analysis of β-amylase from sorghum malt (cv F-2-20) 60](#_Toc352234008)

[Abstract 61](#_Toc352234009)

[1. Introduction 62](#_Toc352234010)

[2. Materials and methods 63](#_Toc352234011)

[2.1. Materials 63](#_Toc352234012)

[2.3. Analysis of enzymes 63](#_Toc352234013)

[2.3.1. α-amylase activity 63](#_Toc352234014)

[2.3.2. β-amylase activity 64](#_Toc352234015)

[2.4. Characterization of the crude enzymes 64](#_Toc352234016)

[2.4.1. Effect of pH on the α and β-amylase activity 64](#_Toc352234017)

[2.4.2. Effect of temperature on the α and β-amylase activity 64](#_Toc352234018)

[2.4.3. Thermal stability of enzyme 65](#_Toc352234019)

[2.5. β-amylase gene determination 65](#_Toc352234020)

[2.5.1. RNA preparation 65](#_Toc352234021)

[2.5.2. RT-PCR analysis 65](#_Toc352234022)

[2.5.3. RACE-PCR 66](#_Toc352234023)

[3. Results and Discussion 67](#_Toc352234024)

[3.1. Enzyme (α and β-amylase) activities 67](#_Toc352234025)

[3.2. Effects of pH and temperature on α and β-amylases activities 67](#_Toc352234026)

[3.3. The β-amylase sequence 70](#_Toc352234027)

[4. Conclusion 74](#_Toc352234028)

[References 75](#_Toc352234029)

[**Chapitre IV** 78](#_Toc352234030)

**Publication iv:** [Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt for dextrins production 80](#_Toc352234031)

[Abstract 81](#_Toc352234032)

[1. Introduction 82](#_Toc352234033)

[2. Materials and methods 83](#_Toc352234034)

[2.1. Materials 83](#_Toc352234035)

[2.2. Amylases production and assay 83](#_Toc352234036)

[2.3. Chemical composition of starches and flours 83](#_Toc352234037)

[2.4. Enzyme hydrolysis 83](#_Toc352234038)

[2.5. Soluble solids 84](#_Toc352234039)

[2.6. Determination of dextrose equivalent 84](#_Toc352234040)

[2.7. Chromatography 84](#_Toc352234041)

[3. Results and discussion 85](#_Toc352234042)

[3.1. Compositions of the starches and flours 85](#_Toc352234043)

[3.2. Effect of sorghum malt concentration and CaCl2 concentration on hydrolysis 86](#_Toc352234044)

[3.3. Characterization of the hydrolyzed products 93](#_Toc352234045)

[3.3.1 Molecular weight distribution 93](#_Toc352234046)

[3.3.2. Oligosaccharides composition 99](#_Toc352234047)

[4. Conclusion 101](#_Toc352234048)

[References 102](#_Toc352234049)

[**Chapitre V** 105](#_Toc352234050)

**PubLication v**: [Physicochemical characterization of dextrins prepared with amylases from sorghum malt 107](#_Toc352234051)

[Abstract 108](#_Toc352234052)

[1. Introduction 109](#_Toc352234053)

[2. Materials and methods 110](#_Toc352234054)

[2.1. Materials 110](#_Toc352234055)

[2.2. Methods 110](#_Toc352234056)

[2.3. Chromatography analysis 111](#_Toc352234057)

[2.4. General properties 111](#_Toc352234058)

[2.5. X-Ray Diffractometry 111](#_Toc352234059)

[2.6. Viscosity 111](#_Toc352234060)

[2.7. Differential scanning calorimetry (DSC) 112](#_Toc352234061)

[2.9. Statistical analysis 112](#_Toc352234062)

[3. Results and Discussion. 112](#_Toc352234063)

[3.1. Oligosaccharide compositions 112](#_Toc352234064)

[3.2. General properties 113](#_Toc352234065)

[3.3. X-Ray Diffractometry 114](#_Toc352234066)

[3.4. Viscosity 116](#_Toc352234067)

[3.5. DSC analysis 116](#_Toc352234068)

[3.5. TGA analysis 118](#_Toc352234069)

[4. Conclusion 121](#_Toc352234070)

[References 122](#_Toc352234071)

[**Chapitre VI**: discussion générale 125](#_Toc352234072)

[1. La comparaison de différentes variétés de sorgho 127](#_Toc352234073)

[1.1. Analyse des variétés 127](#_Toc352234074)

[1.2. Le maltage 129](#_Toc352234075)

[2. Caractérisation des amylases du malt de sorgho (cv. F-2-20) et analyse génétique de la β-amylase 130](#_Toc352234076)

[3. Hydrolyse d'amidons avec les amylases du malt de sorgho 133](#_Toc352234077)

[4. Caractéristiques des maltodextrines 136](#_Toc352234078)

[Références bibliographiques 139](#_Toc352234079)

[**Chapitre VII**: conclusions générales et perspectives 143](#_Toc352234080)

[Conclusions générales 144](#_Toc352234081)

[Exploitation des résultats de l’hydrolyse 145](#_Toc352234082)

[Perspectives 147](#_Toc352234083)

[Liste des publications 148](#_Toc352234084)

Liste des abréviations

**DE**: Dextrose équivalent

**GH**: Glycosides hydrolases

**IUBMB**: International Union of Biochemistry and Molecular Biology

**DON**: Déoxynivalénol

**EDTA**: Ethylene diamine tetraacetic acid

**EGTA**: Ethylene glycol tetraacetic acid

**ISRA**: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles

**ABTS**: Acide 2,2-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline -6-sulfonique

**DPPH**: 1,1-diphenyle-2-picrylhydrazyle

**FAO**: Food Agricultural Organization of the United Nations

**FAOSTAT**: Food and agriculture Organisation Statistical database

**ICRISAT**: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics

**ET**: Equivalent Trolox

**EAG**: Equivalent acide gallique

**RNA:** Ribonucleic acid

**RNAm**: messenger RNA

**cDNA:** complementary Deoxyribonucleic acid

**ORF**: Open reading frame

**BSA**: Bovine serum albumin

**PCR**: Polymerase chain reaction

**RT-PCR**: Reverse transcription polymerase chain reaction

**BLAST**: [Basic Local Alignment Search Tool](http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=blast&source=web&cd=1&sqi=2&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fblast.ncbi.nlm.nih.gov%2F&ei=46UaUeK9K-7M0AW_qoHIDw&usg=AFQjCNHyeo3TFURGPM0pJHz1xExP2lKC9w&bvm=bv.42261806,d.d2k)

**RACE-PCR**: Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction

**HPSEC**: High Pressure Size Exclusion Chromatography

**HPAEC-PAD**: High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection

**SM**: Sorghum malt

**KNU**: Kilo Novo Units

**DP**: Degree of polymerization

**RT**: Retention time

**Mw**: Molecular weight

**Tg**: Transition vitreuse

**Tm**: melting temperature

**TGA**: Thermogravimetric analysis

**DSC**: Differential scanning calorimetry

**DC**: Dextrin from corn

**DW**: Dextrin from wheat

**DWF**: Dextrin from wheat flour

**DCF**: Dextrin from cassava flour

**DT**: Dissolution time

**ITA**: Institut de technologie alimentaire

# Introduction générale

De plus en plus, les pays en développement à l’instar du Sénégal, essaient de valoriser leur production agricole pour faire face à la crise actuelle. Au Sénégal, le développement du secteur agro-alimentaire est devenu un des objectifs prioritaires. La valorisation du produit agricole doit nécessairement passer par la transformation et/ou la séparation de ses constituants. Dans le processus de transformation de la matière première, des enzymes sont souvent employées. L’utilisation de ces enzymes a principalement comme objectif de faciliter le procédé, d’améliorer la conservation et/ou les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles, de corriger des déficiences naturelles ou de permettre la valorisation de certains sous-produits. Ces derniers temps, l'utilisation d'enzymes dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, les industries du textile et autres a considérablement augmenté. Dans le secteur agro-industriel, l'emploi d'enzymes conduit à une optimisation des processus, une réduction des coûts énergétiques liés aux processus, une amélioration de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments, au développement de nouveaux produits et de nouvelles applications pour un certain nombre de productions agricoles (Minussi, Pastore et Duran, 2002). La transformation des produits amylacés par des enzymes amylolytiques sert de base à plusieurs processus industriels comme la production de dextrines, de maltose, de glucose, la fabrication de boissons alcoolisées, des détergents, des biocapteurs, des kits de diagnostic et à la gestion des polluants de l’environnement.

Les enzymes amylolytiques sont des glycosides hydrolases catalysant l’hydrolyse de l’amidon. Elles occupent d’ailleurs une place importante sur le marché mondial des enzymes où elles représentent environ 30 % (Singhania *et al*., 2009). Les produits de bas poids moléculaire, issus de l’hydrolyse de l’amidon sont largement utilisés dans les industries alimentaires, du papier et du textile (Konsula et Liakopoulou-Kyriakides 2004). Les enzymes amylolytiques ou amylases sont obtenues généralement à partir de malt (céréales germées) ou de microorganismes. Les amylases industrielles sont le plus souvent d’origine fongique parce qu’elles sont particulièrement actives et résistantes à la chaleur. Mais pour les pays en développement, ces amylases microbiennes sont coûteuses. L’intérêt est donc énorme pour ces pays d’exploiter des amylases plus accessibles comme les céréales maltées et ayant des propriétés appropriées aux applications industrielles visées

Les malts sont utilisés dans de nombreux domaines : brasserie, boulangerie, dans la fabrication de boissons non alcoolisées, formulation d’aliments de sevrage etc. Les céréales maltées les plus étudiées sont l’orge, le maïs et le sorgho. Le sorgho est une céréale cultivée dans les zones semi-arides et tropicales du monde à cause de son bon rendement et de sa bonne adaptation aux environnements hostiles (Dicko, 2005). Dans les pays en développement, l'intérêt technologique porté sur le sorgho est dû à sa capacité à générer un système complexe d’enzymes associées à l’hydrolyse de l’amidon. Ce qui est un élément important pour son utilisation en brasserie et à la préparation des aliments de sevrage (bouillies) à faible viscosité (Dillon, 1989 ; Larreta-Garde, 1997 et Traoré *et al.*, 2004). Plusieurs travaux ont été faits sur le maltage du sorgho afin d’optimiser la production d’amylases. Certaines variétés de sorgho donnent une bonne activité amylasique principalement les α-amylases avec des propriétés comparables à celles produites par certains microorganismes, ce qui les rend intéressantes pour les industries agro-alimentaires.

Les travaux de recherches présentés dans ce document s’inscrivent dans le cadre de la valorisation des produits agricoles sénégalais. Ils visent la mise en œuvre de la production de dextrines à partir d’amidon en utilisant les amylases du malt de sorgho. Le procédé devrait être exploité au Sénégal à l’avenir.

Ce manuscrit s’articule autour de sept chapitres.

Le premier chapitre, à caractère bibliographique, s'organise en deux volets. Le premier résume les principales caractéristiques des amylases et leurs modes de production. Le second volet concerne plus particulièrement le sorgho et les amylases qu’il produit au cours du maltage. Ce chapitre à fait l’objet d’une publication intitulée : ***Les enzymes amylolytiques et leur application dans la transformation des produits amylacés : le cas du malt de sorgho***soumise dans la revue *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.

Dans le deuxième chapitre, trois enzymes (α-amylase, β-amylase et pullulanase) considérées comme les plus importantes dans l’hydrolyse de l’amidon sont comparées dans sept variétés de sorgho blanc maltées et cultivées au Sénégal. Chaque variété de sorgho est aussi analysée au niveau des composés phénoliques, des tanins et de l’activité antioxydante. Ce chapitre a été publié dans la revue *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* sous le titre :***Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt****.* 2010, **14** (1), 131-139.

Pour qu’une enzyme puisse répondre aux exigences industrielles, il est nécessaire de connaître ses propriétés. Le troisième chapitre fait la caractérisation biochimique des amylases (α et β-amylase) et la caractérisation génétique de la β-amylase. Cette dernière approche présente tout son intérêt car il est important de souligner que nos travaux montrent une déficience en β-amylase par rapport l’α-amylase dans le malt de sorgho. L’isolement du gène codant l’expression des amylases du sorgho devrait constituer une étape préliminaire à l’amélioration génétique du sorgho comme source d’amylases. Ce chapitre a constitué un article en cours de soumission.

Le quatrième chapitre concerne l’hydrolyse de différentes sortes d’amidon (amidon de maïs, de blé, farine de blé et farine de manioc) avec le malt de sorgho. Les dextrines obtenues de différents dextroses équivalents (DE) sont analysées d’un point de vue composition chimique. Cette partie des travaux va être publiée dans *European Food Research and Technology* et a pour titre : ***Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt amylases for dextrins production***. 2013, DOI: 10.1007/s00217-013-1937-6

Le cinquième chapitre porte sur la caractérisation physicochimique des dextrines. En raison de la vaste gamme d'applications de dextrines, le DE seul est insuffisant pour prédire les performances des produits dans diverses applications. Les résultats de ces travaux vont être publiés dans *Starch/Stârk* et la publication a pour titre : ***Physicochemical characterization of dextrins prepared by amylases from sorghum malt***

Le sixième chapitre présente la discussion générale de tous les résultats obtenus

La conclusion et les perspectives constituent le dernier chapitre de ce document.

# Références

Dicko M. H. 2005. Endogenous phenolics and starch modifying enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. PhD Thesis: Wageningen University, the Netherlands. ISBN: 90-8504-195-3.

Dillon J.C., 1989. Les produits céréaliers dans l’alimentation de sevrage du jeune enfant en Afrique. Céréales en régions chaudes. AUPELF-UREF, éds John Libbey Eurotext, Paris, 299-307.

Larreta-Garde V. 1997. Enzymes en agroalimentaire. Technique & Documentation, Paris. p 5.

Konsoula Z. & Liakopoulou-Kyriakides M. 2007. Co-production of alpha- amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour. Technol*., **98**, 150-157.

Minussi R. C., Pastore G. M. & Duran N. 2002. Potential application of laccase in food Industry. *Trends Food Sci. Tech.*, **13**, 205-216.

Singhania R. R., Patel K., Soccol C.L. & Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.,* **44**, 13-18.

Traoré T., Mouquet C. Icard-Vernière C., Traoré A.S. & Trèche S. 2004. Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α-amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chem.*, **88**, 105–114.

# Objectifs de la thèse

Ce travail s'inscrit dans la production et l'utilisation des amylases du malt de sorgho dans le secteur agroalimentaire principalement dans la transformation des produits amylacés. Notre travail présente les objectifs suivants:

* Comparer différentes variétés de sorgho blanc produites au Sénégal pour leur aptitude à produire du malt.
* Déterminer l'activité des enzymes amylolytiques des différentes variétés.
* Caractériser la variété la plus performante pour la production d’amylases.
* Identifier le gène de la β-amylase du sorgho.
* Déterminer les conditions de production de dextrines avec les amylases du malt de sorgho.
* Caractériser physicochimiquement les dextrines produites.

# Chapitre I

*Les enzymes amylolytiques et leur application dans la transformation des produits amylacés : le cas du malt de sorgho*

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique des connaissances sur les enzymes amylolytiques et est divisé en plusieurs sous-chapitres.

Le premier décrit les amylases de façon générale en parlant des différentes classes qui les composent, de leurs domaines d’utilisation et des produits obtenus sous leurs actions. Leur place dans le marché mondial des enzymes est aussi décrite, en soulignant leur importance.

Le second sous-chapitre s’intéresse aux différentes sources d’amylases et leurs modes de production. Car les enzymes amylolytiques se rencontrent dans le règne animal, le règne végétal et le règne microbien. Dans le règne végétal, les amylases provenant des céréales sont les plus étudiées. Elles existent dans les grains et les graines sous forme latente et sont activées en général durant la germination où l’activité croît en fonction des conditions du maltage.

Le troisième sous-chapitre présente les propriétés des amylases animales, végétales et microbiennes. Les industries employant les amylases sont de plus en plus à la recherche d’amylases ayant des propriétés technologiques intéressantes principalement en ce qui concerne la stabilité à haute température.

Le quatrième sous-chapitre fait référence aux amylases végétales et en particulier les amylases du sorgho. Les conditions de production (maltage) ainsi que les problèmes rencontrés au cours du maltage du sorgho (moisissures) y sont décrits.

Enfin le dernier sous-chapitre décrit les potentialités d’utilisation des amylases du malt de sorgho.

# Publication I:

# Les enzymes amylolytiques et leur application dans la transformation des produits amylacés : le cas du malt de sorgho

Khady Ba (1,2)\*, Jean-Claude Bwanganga (1,3), Emmanuel Tine (2), François Béra (3), Jacqueline Destain (1), Philippe Thonart (1)

(1)Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech GxABT. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Unité de Bio-Industries. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique)

(2) Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar (ESP). Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industriel (LMAGI). BP.5085, Dakar Fann (Sénégal).

(3) Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech. Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

# Résumé

La production d’enzymes amylolytiques a connu un développement considérable dû à leur utilisation dans les industries de transformation de l’amidon en remplacement de l’hydrolyse acide pour la production de maltodextrines, d’oligosaccharides et de glucose. Ces enzymes sont utilisées dans différents domaines comme l’agroalimentaire, le secteur pharmaceutique, l’industrie du textile et du papier etc. Les amylases sont produites par de nombreux organismes : les plantes, les animaux et les microorganismes. Les amylases utilisées dans les industries sont souvent d’origine bactérienne ou fongique. Mais ces amylases sont coûteuses pour les industries des pays en développement. Cependant, certaines céréales maltées comme le sorgho qui poussent bien dans la plupart de ces pays peuvent être d’importantes sources d’amylases et être exploitées dans les industries de transformation de l’amidon.

***Mots clés* :** amylases, amidon, malt, sorgho

# 

# Abstract

Amylolytic enzymes production has grown considerably due to their use in industrial processing of starch to replace acid hydrolysis for the production of maltodextrins, oligosaccharides or glucose. They are used in different areas such as food, pharmaceutical, textile and paper etc... Amylases are produced by many organisms: plants, animals and microorganisms. Amylases used in industries are often produced by bacteria or fungi. But these amylases are expensive for industries in developing countries. However, some malted cereals such as sorghum that grow well in most of these countries can be important sources of amylases and be exploited in the starch processing industries.

***Keywords:*** amylases, starch, malt, sorghum

# 1. Introduction

Les enzymes intervenant dans l’hydrolyse de l’amidon sont appelées enzymes amylolytiques ou amylases. Leur histoire a commencé en 1811, lorsque Kirchhof a découvert pour la première fois une enzyme dégradant l'amidon. L’amidon est le constituant polysaccharidique majeur des produits agricoles (maïs, blé, pomme de terre, riz, sorgho, manioc…) que la plante utilise comme substance de réserve stockée dans la graine ou le tubercule. Il contribue grandement à la propriété et la texture de nombreux aliments et est largement utilisé comme stabilisateur d’émulsion, agent gélifiant ou épaississant, agent de rétention d'eau, substitut de matière grasse (Pei-Ling *et al*., 2010 ; Sine, 2010 ; Jaspreet-Singha *et al*., 2007). Mais l’amidon se prête à des modifications chimiques ou enzymatiques permettant de lui donner des fonctionnalités les plus diverses. Le succès commercial des amylases (30% des enzymes commerciales) est dû à l'industrie de l'amidon qui est l'une des plus grandes utilisatrices d'enzymes amylolytiques (Singhania *et al.,* 2009 ; Rajagopalan et Krishnan, 2008). Les amylases appartiennent à la grande famille des hydrolases (qui représente 75% des enzymes produites) et plus précisément le groupe des glycosides hydrolases (GH). Selon Michelin *et al*., 2010, Gupta *et al*., 2003 et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB), les GH peuvent être classées en trois grands groupes :

1. Les endoamylases qui hydrolysent les liaisons α-1,4 de l’amylose et l’amylopectine (les deux constituants de l’amidon) libérant ainsi des oligosaccharides et des dextrines. Dans ce groupe, nous retrouvons principalement l’α-amylase (EC 3.2.1.1)
2. Les exoamylases, elles regroupent la β-amylase (EC 3.2.1.2), l’α-glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase ou l’amyloglucosidase (EC 3.2.1.3). Leur action libère des sucres de faibles poids moléculaires comme le glucose, le maltose et des oligosaccharides.
3. Les enzymes de débranchement, elles hydrolysent les liaisons α-1,6 de l’amylopectine. La pullulanase (EC 3.2.1.41) et l’isoamylase (EC 3.2.1.68) appartiennent à ce groupe.

Généralement, ces trois groupes travaillent en synergie. L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse de l'amidon, car elle augmente la vitesse de réaction globale et diminue la rétro-inhibition des produits (Castro *et al*., 2011).

Les amylases les plus importantes pour les applications industrielles et biologiques sont : l’α-amylase, la glucosidase, la pullulanase et la β-amylase (Michelin *et al*., 2010).

# 2. La production d’amylases

Les amylases sont produites par une grande variété d’organismes vivants, allant des microorganismes aux plantes et aux animaux. L’histoire de la production industrielle d'enzymes remonte à l'époque où le Dr Jokichi Takamine a commencé la production d’une préparation d'enzymes digestives par culture d’*Aspergillus oryzae* dans du son de blé en 1894 (Aiyer, 2005). A l’échelle industrielle, les amylases sont produites à partir de cultures microbiennes (milieu liquide et solide) ou par maltage des céréales.

## 2.1. La fermentation

La production d’enzymes microbiennes se fait soit par fermentation liquide ou par fermentation solide. Ces méthodes de production ont beaucoup été étudiées. Traditionnellement, la production se faisait par fermentation liquide en raison de la facilité de contrôle de différents paramètres (pH, température, aération et transfert d'oxygène et d'humidité). Mais elle est exigeante, couteuse et pas bien adaptée pour les organismes fongiques. Les innovations biotechnologiques dans le domaine des enzymes et des technologies de fermentation, ont ouvert de nombreuses voies pour l’application de la fermentation solide. Celle-ci détient un énorme potentiel pour la production d'enzymes et elle est d'un intérêt particulier dans les procédés où le produit brut fermenté peut être utilisé directement comme source d'enzymes (Singhania *et al*., 2009). En plus des avantages liés à ce type de production (faible cout, productivité supérieure, besoins en énergie réduits et absence de contrôle rigoureux) (Ellaiah *et al*., 2002 ; Chimata *et al*., 2010), des résidus agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats pour la production d'enzymes dans la fermentation solide. Le tableau 1montre la production d’amylases chez quelques microorganismes par fermentation.

Tableau 1: Production d'enzymes amylolytiques par certains microorganismes. Amylolytic enzymes production by some microorganism

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Microorganismes** | **Substrats** | **Types de fermentation** | **Activités détectées** | **Références** |
| *Bacillus sp* PS-7 | Son de blé  Son de riz  Son de maïs | Solide (37°C, 48h)  Solide (37°C, 48h)  Solide (37°C, 48h) | 220400U/g (α-amylase)  145000 U/g (α-amylase)  97600 U/g (α-amylase) | Sodhi et al., 2005 |
| *Bacillus subtilis* RSKK96 | Farine de maïs | Liquide (37°C, 72 h) | 445 U/mg (α-amylase) | Akcan et al., 2011 |
| *Aspergillus oryzae* | Son de blé | Solide (30°C, 72h) | 1986 U/g (glucoamylase) | Zambare, 2010 |
| *Aspergillus niger* | Résidu de banane plantain | Solide (29°C, 144h) | 33 EU (β-amylase) | Adeniran et al., 2010 |
| *Thermomyces lanuginosus* ATCC 58160 | Son de blé | Solide (50°C, 120h) | 250 U/g (α-amylase) | Kunamneni  et al., 2005 |
| *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) | Son de blé | Solide (35°C, 96h) | 300 U/g (α-amylase) | Sindhu et al., 2009 |
| *Bacillus subtilis* CM3 | Résidus de manionc | Solide (50°C, 144h) | 6200 U/g (α-amylase) | Swain et Ray 2007 |
| *Chrysosporium asperatum* | Amidon de pomme de terre | Liquide (30°C, 72h) | 97 IU/ml/min  (α-amylase) | Sanghvi et al*.,* 2011 |

## 2.2. L’ingénierie des amylases : expression des gènes et structure des protéines

Les demandes d'amylases avec différentes propriétés physiologiques et biochimiques par les industries nécessitent la recherche et le développement d'enzymes aux propriétés originales. L’ingénierie des enzymes est connue pour être une technique prometteuse pour atteindre ce but. Elle permet d’une part d’intégrer les propriétés recherchées et d’autre part d’avoir une hyperproduction (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Les enzymes amylolytiques industrielles sont souvent d’origine fongique ou bactérienne. Beaucoup de gènes qui codent ces enzymes ont été exprimés dans des organismes hôtes comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* (Marin-Navarro et Polaina, 2011 ; Kim *et al.*, 2010). Généralement, l'approche utilisée implique une co-expression de plusieurs gènes codant pour différentes enzymes. D’ailleurs, Kim *et al*., 2010 ont réussi à transformer une souche industrielle de S. cerevisiae en intégrant dans le génome par recombinaison homologue, des gènes codant pour l’α-amylase, la glucoamylase et une enzyme débranchante. Leurs résultats peuvent conduire à l'élaboration de diverses souches industrielles pour la transformation de produits, notamment la production d'éthanol à partir d'amidon en une seule étape.

Aujourd’hui, la technique préférée de l’ingénierie des protéines pour améliorer la performance des enzymes est l’évolution dirigée. L'évolution dirigée utilise les techniques expérimentales qui se basent sur le processus d’adaptation évolutionnaire. Après avoir créé une banque de variants du gène codant pour la protéine d’intérêt, on réalise un criblage sur base de la fonction enzymatique recherchée. Cette méthode stochastique s’oppose à la mutagenèse dirigée qui elle s’appuie sur la structure tridimensionnelle des protéines pour réaliser des transformations bien ciblées. Mais l'évolution dirigée et la mutagenèse dirigée sont maintenant de plus en plus combinées. Ainsi les recherches sur les glucoamylases hyperthermophiles de bactéries et d’archébactéries ont conduit à de nouvelles versions de glucoamylases d’*Aspergillus*, utilisées dans l’hydrolyse de l’amidon à des températures proches de 100 °C (Marin‑Navarro et Polaina, 2011).

## 2.3. Le maltage de céréales

**Lire phonétiquement**

### Dictionnaire - [Afficher le dictionnaire](http://www.google.be/dictionary?source=translation&hl=fr&q=?-Amylase%20can%20be%20produced%20by%20different%20species%20of%20microorganisms,%20but%20for%20commercial%20applications%20?-amylase%20is%20mainly%20derived%20from%20the%20genus%20Bacillus.%20?-Amylases%20produced%20%20from%20Bacillus%20licheniformis,%20Bacillus%20stearothermophilus,%20and%20Bacillus%20amyloliquefaciens%20find%20potential%20application%20in%20a%20number%20of%20industrial%20processes%20such%20as%20in%20food,%20fermentation,%20textiles%20and%20paper%20industries%20%2846,%2061%29.%20Thermostability%20is%20a%20desired%20characteristic%20of%20most%20of%20the%20industrial%20enzymes.%20Thermostable%20enzymes%20isolated%20from%20thermophilic%20organisms%20have%20found%20a%20number%20of%20commercial%20applications%20because%20of%20their%20stability.%20As%20enzymatic%20liquefaction%20and%20saccharification%20of%20starch%20are%20performed%20at%20high%20temperatures%20%28100%E2%80%93110oC%29,%20thermostable%20amylolytic%20enzymes%20have%20been%20currently%20investigated%20to%20improve%20industrial%20processes%20of%20starch%20degradation%20and%20are%20of%20great%20interest%20for%20the%20production%20of%20valuable%20products%20like%20glucose,%20crystalline%20dextrose,%20dextrose%20syrup,%20maltose%20and%20maltodextrins%20%286,%2026,%2079%29.%20Bacillus%20subtilis,%20Bacillus%20stearothermophilus,%20Bacillus%20%20licheniformis,%20and%20Bacillus%20amyloliquefaciens%20are%20known%20to%20be%20%20good%20producers%20of%20thermostable%20?-amylase,%20and%20these%20have%20%20been%20widely%20used%20for%20commercial%20production%20of%20the%20enzyme%20for%20%20various%20applications%20%2864%29.%20Thermostable%20?-amylases%20have%20been%20%20reported%20from%20several%20bacterial%20strains%20and%20have%20been%20produced%20%20using%20SmF%20as%20well%20as%20SSF%20%2883%29.%20However,%20the%20use%20of%20SSF%20has%20%20been%20found%20to%20be%20more%20advantageous%20than%20SmF%20and%20allows%20a%20%20cheaper%20production%20of%20enzymes%20%2876%29.%20The%20production%20of%20?-%20%20amylase%20by%20SSF%20is%25)

**Écouter**

**Lire phonétiquement**

**Dictionnaire -** [**Afficher le dictionnaire**](http://www.google.be/dictionary?source=translation&hl=fr&q=There%20are%20several%20enzymes%20that%20are%20able%20to%20degrade%20starch,%20%20foremost:%20a-%20and%20b-amylases,%20pullulanase,%20glucoamylase.%20a-Amylases%20%281,4-a-D-glucan-glucanohydrolases,%20EC%203.2.1.1%29%20are%20the%20only%20enzymes%20of%20choice,%20because%20they%20catalyze%20the%20random%20hydrolysis%20of%20the%20internal%20a-1,4-%20glucosidic%20linkages%20in%20starch%20amylose%20and%20amylopectin%20to%20yield%20water-soluble%20dextrins%20%28Janecek,%201997%29.%20Commercially,%20there%20are%20several%20types%20of%20amylases%20available,%20from%20various%20natural%20and%20recombinant%20sources,%20that%20are%20active%20over%20a%20wide%20range%20of%20temperatures%20and%20pH%E2%80%99s.%20It%20can%20be%20estimated%20that%20some%2090%25%20of%20all%20liquid%20laundry%20%20detergents%20contain%20a-amylases%20and%20the%20supplementation%20of%20%20amylases%20in%20automatic%20dishwashing%20detergents%20is%20also%20%20growing.%20Performance%20of%20amylase-containing%20detergents%20are%20%20evaluated%20by%20standard%20tests%20and%20procedures%20laid%20out%20by%20several%20reference%20laboratories%20and%20organizations%20all%20over%20the%20world.%20Of%20all%20known%20and%20available%20microbial%20a-amylases,%20the%20natural%20B.%20licheniformis%20enzyme%20is%20the%20most%20suitable%20for%20detergent%20applications%20because%20of%20its%20intrinsic%20thermostability%20and%20resistance%20to%20proteolytic%20digestion%20%28Aehle,%201997%29.%20Indeed,%20%20there%20are%20various%20commercial%20versions%20of%20the%20same%20basic%20amylase.%20The%20enzyme%20has%20a%20mol%20wt%20of%2058,000%20and%20a%20broad%20pH%20%20optimum%20of%20activity%20between%206%20and%209,%20with%20a%20temperature%20optimum%20around%2095%C2%B0C.%20Its%20tertiary%20structure%20has%20been%20reported%20%28Machius%20et%20al.,%201995;%20Aehle,%201997;%20Bott%20and%20Shaw,%201998%29%20and%20is%20composed%20of%20three%20domains%20%28A,%20B%20and%20C,%20see%20Fig.%201%29,%20in%20which%20the%20N-terminal%20domain%20A%20%28residues)

Certaines céréales comme l’orge présentent naturellement des enzymes amylolytiques, tandis que dans d’autres, elles sont induites au cours d’une transformation (maltage des grains). Le maltage consiste à faire germer et sécher les graines dans des conditions propices (chaleur et humidité) pour obtenir le malt. Ce procédé technologique comporte trois étapes principales : le trempage, la germination et le séchage des graines. C’est un processus biologique complexe, impliquant toute une série de réactions biochimiques et physiologiques qui induisent : des transformations morphologiques (développement de l’embryon, des radicelles), le développement des enzymes hydrolytiques (α-amylase, β‑amylase, α-glucosidase, pullulanase, etc.) et des modifications de l’endosperme (protéolyse, dégradation des parois cellulaires, etc.) (Bamforth, 1993 ; Dziedzoave *et al*., 2010). Les enzymes sont fortement exprimées au cours de la germination sous l'influence des hormones de croissance telles que l'acide gibbérellique. En effet, cette hormone stimule la synthèse d’ARNm spécifiques des amylases et augmente l’efficacité de la traduction (Muralikrishna et Nirmala, 2005).

# 3. Propriétés des enzymes amylolytiques

Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés des enzymes amylolytiques. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité. Pour l’industrie de transformation de l’amidon, il est souhaitable que les α-amylases soient actives à des températures élevées de gélatinisation (100-110 °C) et de liquéfaction (80-90 °C). Ces dernières années, beaucoup de recherches ont été faites sur la production d'amylases par les microorganismes thermophiles (Gomes *et al*., 2007). Ainsi des amylases fonctionnant à des températures élevées ont été découvertes (Tableau 2). Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les α-amylases thermostables en occupent une bonne part (Prakash et Jaiswal, 2010).

**Tableau 2** : Les propriétés de certaines enzymes amylolytiques de différentes origines- Properties of some amylolytic enzymes from different sources

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Enzymes** | **Organismes** | **Propriétés de l’enzyme** | | **Références** |
|  |  | **pH**  **optimum** | **Température**  **optimale** |  |
| α-amylases | *Bacillus subtilis*  *Bacillus lichenformis*  *Pyrococcus furiosus*  Orge maltée  Sorgho malté | 7  -  -  4.7-5.4  5.5-6 | 135 °C  100 °C  140 °C  50-55 °C  65 °C | Konsoula et Liakopoulou-kyriakides, 2007  Prakash et Jaiswal 2010  Gomes et al., 2007  Muralikrishna et Nirmala, 2005  Nour et Yagoub 2010 |
| Pullulanase | *Bacillus flavocaldarius* | - | 75-85 °C | Gomes et al., 2007 |
| Isoamylase | *Rhizopus oryzae* | 5 | 55 °C | Ghosh et Ray, 2010 |
| β-amylase | *Thermotoga maritima*  Sorgho malté  *Bacillus sp* | -  5.5-6  7.5 | 90 °C  55 °C  50 °C | Gomes et al., 2007  Nour et Yagoub, 2010  Young et al., 2001 |
| Glucoamylase | *Clostridium thermosulfuricum*  *Clostridium thermosaccarolyticum*  *Paecilomyces variotii* | -  -  5 | 70 °C  70 °C  55 °C | Gomes et al., 2007  Michelin et al., 2008 |

# 4. Les enzymes amylolytiques végétales

Chez certaines plantes, les amylases sont présentes à l’état naturel comme dans le cas des racines de «Munkoyo» (espèces : *Eminia* et *Rynchosia*), des feuilles vertes de *Boscia senegalensis*, des bulbes frais de *Gladiolus klattianus* et des tubercules de *Curculigo pilosa* et de *Pachyrhizus erosus* (Noman *et al*., 2006 ; Dicko *et al*., 2005). Par contre, les céréales sont maltées pour bien exprimer leurs enzymes amylolytiques. L’activité amylasique notée chez certains malts et plantes est décrite dans le tableau 3 suivant.

**Tableau 3 :** Les activités d’amylases végétales. The activities of plant amylases

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Sources** | **Types d’enzymes** | **Activités détectées** | **Références** |
| *Oryza sativa* | α-amylase | 190 U/g | Veluppillai et al., 2009 |
| *Pachyrhizus erosus* | α-amylase | 825 µkat | Noman et al., 2006 |
| *Glycine max* | α-amylase | 54 U/g | Kumari et al., 2010 |
| *Gladiolus klattianus* | β-amylase | 440 U/g | Dicko et al., 2005 |
| *Boscia senegalensis* | β-amylase | 158 U/g | Dicko et al., 2005 |
| *Sorghum bicolo*r | β-amylase | 80 U/g | Dziedzoave et al., 2010 |
| *Sorghum bicolor*  (var. F-2-20) | α-amylase  β-amylase  Pullulanase | 313 U/g  63 U/g  1254 U/kg | Ba et al., 2010 |
| *Avena nuda* | β-amylase | 229 mg/g.min | Tian et al.,2010 |
| *Hordeum vulgare* | α-amylase  β-amylase | 620 UD  312 UE | Garda-Buffon et al., 2010 |
| *Triticum aestivum* | α-amylase | 2331U/g | Saleh et al*.,* 2009 |
| *Ipomea batatas* | β-amylase | 602 U/g | Dziedzoave et al., 2010 |

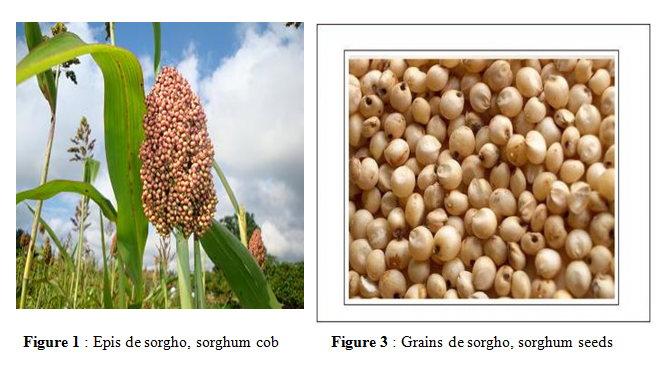
Kat = quantité d’enzyme qui catalyse la transformation d’une mole de substrat par seconde. Amount of enzyme which catalyzes the conversion of one mole of substrate per second.

UD = α-amylase exprimée en activité dextrinisante. α-amylase expressed as the unit of dextrinizant activity

## 4.1. Les amylases du malt de sorgho

### 4.1.1. Le sorgho

Cette grande graminée, Sorghum bicolor de son nom scientifique, existe depuis des millénaires et est originaire d’Afrique sub-saharienne. Elle présente l'énorme avantage de supporter la chaleur et la sécheresse mais aussi les sols salins, calcaires ou même gorgés d'eau. C’est une plante (Figure 1) particulièrement robuste et contrairement à la plupart des autres céréales, elle nécessite peu d’irrigation, elle consomme par exemple deux fois moins d’eau que le maïs. La graine de sorgho (Figure 2) est riche en glucides (amidon), elle contient également des lipides et des protéines ainsi que des fibres, des minéraux (potassium et phosphore....) et des vitamines (sauf la vitamine A). Sa teneur variable en tanins nuit un peu à sa digestibilité. Le sorgho est utilisé pour faire de la farine servant à l'alimentation animale ou humaine mais aussi en brasserie.



**Figure 1** : Epis de sorgho-sorghum cob **Figure 2** : Grains de sorgho- sorghum seeds

### 

### 4.1.2. Le maltage du sorgho et les problèmes au cours du maltage

Les recherches agronomiques récentes sur le sorgho portent principalement sur l’amélioration des qualités de la céréale pour la malterie et la brasserie (Okoli et al. 2010). Plusieurs procédures de maltage du sorgho sont décrites dans la littérature. Dans certains pays d’Afrique et d’Asie, le sorgho est malté de façon traditionnelle pour faire de la bière (Ghana, Burkina Faso, Nigéria, Afrique du Sud etc.), mais aussi pour l’incorporer dans différents produits alimentaires surtout les aliments de sevrage, afin d’améliorer leur valeur nutritionnelle.

Le problème majeur rencontré au cours du maltage des céréales comme le sorgho est la prolifération de moisissures et la production de mycotoxines à cause des conditions de température et d’humidité. Agu et Palmer (1997) ont montré que pour avoir une bonne activité enzymatique dans le malt de sorgho, il faut le faire germer entre 25 et 30 °C, température idéale pour le développement des microorganismes. La production de mycotoxines (les aflatoxines, le déoxynivalénol (DON), les fumonisines, le zéaralénone etc.) se fait durant la croissance des moisissures pendant le trempage et la germination (Wolf-Hall, 2007). Lefyedi *et al*., 2005 ont étudié la contamination du malt de sorgho par des moisissures et mis en évidence les espèces dominantes suivantes : *Mucor sp* ; *Rhizopus oryzae* ; *Fusarium moniliforme*; *Phoma sorghina*; *Aspergillus flavus* et *Alternaria alterna*. Les travaux de micromaltage d’orge, réalisés par Schwarz *et al*. en 1995, ont montré que le nombre important de grains infectés par *Fusarium* au cours du procédé,est dû à une dissémination des spores et des fragments mycéliens lors de la trempe. Cette étape permet néanmoins une réduction de la charge fongique globale et une diminution du taux de DON (environ 89 %) dans les eaux de trempe. Cependant, au cours de la germination, les spores qui n’ont pas été totalement éliminées germent et la charge fusarienne ainsi que le niveau de DON augmentent (18 à 114 % du niveau de DON de l’orge). Ces taux restent inchangés pendant le séchage puisque le DON est connu pour être stable jusqu’à 170 °C et à des pH acide et neutre (Wolf et Bullerman, 1998). Plusieurs moyens de lutte contre le développement des contaminants lors du maltage sont préconisés (Lefyedi *et al*., 2007 ; Lefyedi et Taylor, 2006). Ainsi des traitements par des agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniaque, soude), des agents réducteurs, des agents chlorés etc., sont utilisés. Des starters microbiens à base de *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* et *Saccharomyces* sp ajoutés lors du trempage constituent une alternative au traitement alcalin (Lefyedi et Taylor, 2007).

### 4.1.3. Les caractéristiques des amylases du malt de sorgho

Les études se sont principalement focalisées sur la production d'un malt qui a un bilan enzymatique satisfaisant (Dziedzoave *et al*., 2010 ; Veluppillai *et al*., 2009). Les travaux faits sur le sorgho par Dufour *et al*. (1992) ; Palmer *et al*. (1989) et d’autres chercheurs, mettent l'accent sur les activités diastasiques du malt plutôt que sur les enzymes individuelles. Généralement, le malt de sorgho présente de bonnes activités amylasiques et les α-amylases y sont majoritaires. Certaines variétés étudiées ont même montré des teneurs en α-amylase supérieures ou égales à celles d’autres malts (orge, millet, maïs et riz) (Ba *et al*., 2010 ; Dziedzoave *et al*., 2010 ; Letsididi *et al*., 2008 ; Aniche et Palmer, 1990). Contrairement à l’orge, le sorgho non malté n’a pas de β-amylase et sa déficience n’est presque pas corrigée par le maltage. D’ailleurs, c’est l’une des raisons pour lesquelles le malt de sorgho a du mal à être adopté par les brasseurs européens. D’autres activités amylasiques (pullulanases, α-glucosidases, β-glucanases etc.) sont observées dans le malt de sorgho et à des valeurs non négligeables (Ba *et al*., 2010 ; Dziedzoave *et al*., 2010 ; Letsididi *et al*., 2008). Egwin et Oloyede (2006) et Nour et Yagoub (2010) ont mesuré une activité maximale à pH 5 et à 70 °C pour l’α-amylase de malt de sorgho et à pH 5,5 et 50 °C pour la β-amylase. Kumar *et al*. (2009) ont montré une bonne stabilité de l’α-amylase de sorgho aux pH compris entre 4,8 et 8. Adewale et Oladejo (2009) ont mis en évidence des isoformes d’α-amylases de sorgho qui sont stables environ 30 minutes à 80 °C et qui, à 100 °C ont des activités résiduelles. A -20 °C, les amylases du malt de sorgho (α et β) conservent bien leur activité pendant 56 jours (Nour et Yagoub., 2010). Comme toutes amylases de céréales, l’α-amylase du malt de sorgho est activée et stabilisée par les ions Ca2+. Il est connu que l’α-amylase est une métalloenzyme, elle se lie aux ions Ca2+ qui jouent un rôle crucial pour le maintien et la stabilisation de la structure de l’enzyme (Kumari *et al*., 2010). Les cations Ba2+ etNa2+ sont aussi décrits comme activateurs des amylases de malt, tandis que Al3+, Fe2+, Pb2+ et Hg2+ sont des inhibiteurs (Muralikrishna et Nirmala, 2005). Les amylases de céréales sont aussi généralement inhibées par de l’EDTA, EGTA, etc. Kumar *et al*. (2009) ont montré que l’activité de l’α-amylase du malt de sorgho pouvait être inhibée de manière réversible par le chlorhydrate de guanidine et l'urée dans certaines conditions (concentration et pH).

# 5. Les techniques de purification des amylases

Les extraits d’amylases de malt sont généralement concentrés par précipitation fractionnée (à basse température) soit au sulfate d’ammonium, soit aux solvants organiques (éthanol ou acétone) avant purification. Il existe plusieurs méthodes de purification des amylases de céréales (Muralikrishna et Nirmala, 2005 ; Brena *et al*., 1996) mais les plus utilisées sont la chromatographie d’affinité et la chromatographie échangeuse d’ions. Adewale et Oladejo (2009) ont purifié l’α-amylase de malt de sorgho sur une matrice échangeuse de cations, le carboxyméthyl-trisacryl, avec une augmentation de l’activité spécifique de 4,5 fois et séparé les isoformes sur autre matrice échangeuse d’anions la DEAE-Sephacel. Une autre matrice employée couramment dans la chromatographie échangeuse d’ions pour les amylases de céréales est la DEAE‑cellulose. Quant à la β-amylase de sorgho, elle a été purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium et filtration sur gel Sephadex G-200, avec un rendement de 54% et une augmentation de l'activité spécifique de 5 fois (Breab *et al*., 1999). D’autres α‑amylases de malt de maïs, d’avoine, de riz et de sorgho ont été aussi isolées par précipitation au glycogène et par chromatographie d'interaction hydrophobe sur Octyl‑Sepharose.

# 6. Applications possibles des amylases du malt de sorgho

Le spectre d'application des amylases s'étend dans de nombreux domaines : l’amidonnerie, l'industrie du papier et du textile, la fermentation, les brasseries et les industries de distillation mais aussi en analyse et en chimie clinique. Les amylases sont aussi de plus en plus trouvées dans des formulations détergentes. L'utilisation commerciale des amylases ne nécessite généralement pas de purification de l'enzyme, sauf pour leur application dans les secteurs pharmaceutique et clinique (Souza *et al.,* 2010). Les amylases de malt de sorgho peuvent être testées pour leur efficacité dans certaines industries et ainsi concurrencer les amylases microbiennes. Comme pour le malt d’orge, le malt de sorgho peut être utilisé dans l’agroalimentaire. Par exemple en boulangerie, les amylases du malt de sorgho peuvent être ajoutées à la pâte pour augmenter le taux de fermentation et réduire la viscosité améliorant ainsi la qualité du produit. Les isoformes d’α-amylase décrites chez le sorgho et dont certaines présentent des caractéristiques intéressantes (activité et thermostabilité) (Adewale et Oladejo, 2009 ; Adewale *et al*., 2006 ; Egwin et Oloyede, 2006 ; Kumar *et al*., 2005) peuvent être appliquées dans l'industrie brassicole pour la clarification de la bière ou des jus de fruits.

Le malt de sorgho peut être utilisé dans la production de bioéthanol. En effet,   
une technologie non conventionnelle de production de bioéthanol, nommée hydrolyse à froid, a été bien étudiée et son application à grande échelle a été démontrée ces dernières années (Castro, Castilho et Freire, 2011). Dans ce processus, l'amidon brut est soumis à une étape d'hydrolyse en présence d’amylases à une température inférieure à celle de la gélatinisation de l’amidon pendant quelques heures. Cette méthode présente l’avantage de consommer moins d’énergie que la méthode conventionnelle, mais utilise plus d’enzymes. L’utilisation de malt pourrait réduire cet apport extérieur d’amylases. D’autre part, Ba *et al*. (2010) et Letsididi *et al*. (2008) ont montré que certaines variétés de sorgho maltées, ont des activités amylasiques efficaces pour la liquéfaction et la saccharification de l’amidon, ce qui développerait des potentialités d’application dans ce domaine.

# 7. Conclusion

Aujourd’hui, les enzymes amylolytiques font partie des enzymes les plus largement utilisées. Elles sont impliquées dans plusieurs procédés et leur demande ne cesse d’augmenter. Dans les processus de transformation de l’amidon, les industries emploient souvent des amylases d’origine microbienne. Mais, des amylases d’origine végétale pourraient être utilisées dans des applications biotechnologiques. A l’exemple de la β‑amylase de *Curculigo pilosa*et de *Gladiolus klattianus* (Dicko *et al*., 2005), dont l’activité est comparable à celle d’origine microbienne et qui serait adéquate pour la production de sirop de maltose. En outre, les activités amylasiques notées dans des racines de « Munkoyo », des feuilles de *Boscia senegalensis,* des malts d’orge de blé, de maïs et de sorgho (Ba *et al*., 2010 ; Dziedzoave *et al.,* 2010 ; Letsididi *et al*., 2008 ; Dicko *et al*., 2005 ; Aniche et Palmer, 1990) sont efficaces pour la production d’oligosaccharides, de sirops de glucose, de maltose et d’éthanol. Avec un faible coût de production, elles constituent une bonne alternative pour les industries des pays en développement. L'utilisation de la technologie de recombinaison génétique pourrait permettre une amélioration de la production d’amylases végétales de même que l’introduction de l’ingénierie des protéines et de l’évolution dirigée.

# Références

Adeniran H. A., Abiose S. H. &Ogunsua A. O., 2010. Production of fungal β-amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues. *Food Bioprocess Technol*., **3**, 693-698.

Adewale.I. O. & Oladejo A. 2009. Properties of the isoforms of α-amylase from kilned and unkilned malted sorghum (*Sorghum bicolor*). *Carbohyd. Polym.*, **77**, 105‑109.

Adewale I. O., Agumanu E. E. & Otih-Okoronkwo, F. I., 2006. Comparative studies on α‑amylases from malted maize (*Zea mays*), millet (*Eleusine coracana*), and sorghum *(Sorghum bicolour*). *Carbohyd. Polym.*, **66**, 71-74.

Agu R.C., Palmer G.H., 1997. Effect of mashing procedure on some sorghum varieties germinated at different temperatures*. Process Biochem.*, **32**, 147-158.

Aiyer P.V., 2005. Amylases and their applications. *Afri. J. Biotechnol.* **4**, 1525-1529.

Akcan N., Uyar F. & Güven A., 2011. Alpha amylase production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in submergerd cultivation. *Kafkas Univ. Vet. Fak Derg*., **17** (suppl A), S17-S22.

Aniche G. N. & Palmer G. H., 1990. Development of Amylotic activities in sorghum and barley malt. *J. Inst. Brew.*, **96**, 377-379.

Ba K. et al., 2010. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*., **14**, 131-139.

Bamforth C. & Barclay A. 1993. Malting technology and the uses of malt. *In: MacGregor A. and Bhatty R*. (eds.) Barley: Chemistry and Technology. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, Inc. pp. 297-354.

Brena B., Pazos C., Franco-Fraguas L. & Batista- Viera F., 1996. Chromatographic methods for amylases. *J. Chromatogr.* *B*, **684**, 217-237.

Castro A. M.; Castilho L. R. & Freire D. M. G., 2011. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanaol by conventional and non‑conventional processes. *Biomass Conv. Bioref*., **1**, 245-255.

Chimata M.K.; Sasidhar P. &Suresh C., 2010. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol*., **9**, 5162-5169.

Dicko M. H., Hilhorst R. & Traore A. S., 2005. Indigenous west African plants as novel sources of polysaccharide degrading enzymes: application in the reduction of the viscosity of cereal porridges. *Afr. J. Biotechnol.*, **4**, 1095-1104.

Dziedzoave N.T., Graffham A. J., Westby A. & Komlaga G., 2010. Comparative assessment of amylolytic and cellulolytic enzymes activity of malts prepared from tropical cereals. *Food Control.*, **21**, 1349-1353.

Egwin E .E. & Oloyede O. B., 2006. Comparison of α-amylase activity in sprouting Nigeria cereal. *Biokemistri* ( Publication of the Nigeria Society for Experimental Biology), **18**, 15‑20.

Ellaiah P. et al., 2002. Optimization of process, parameters for glucoamylase production under solid-state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* sp. *Process Biochem*., **38**, 615‑620.

Garda-Buffon J. ; Baraj E. & Badiale-Furlong E., 2010. Effect of deoxynivalenol and T‑2 toxin in malt amylase activity. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **53**, 505-511.

Ghosh B. & Ray R. R., 2010. Saccharification of raw native starches by extracellular isoamylase of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology*, **9**, 224-228.

Gomes E., Guez M. A. U., Martin N. & Silva R. 2007. Thermostables enzymes: sources, production and industrial applications. *Quim. Nova*, **30**, 136-145.

Gupta R. et al., 2003. Microbial α-amylases : a biotechnological perspective. *Process Biochem*, **38**, 1599-1616.

Jaspreet-Singha J., Kaurb L. & McCarthy O. J., 2007. Factors influencing the physico‑chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food Hydrocolloid*, **21**, 1-22.

Kim et al., 2010. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α-amylase and debranching enzymes. *Biotechnol. Lett*., **32**, 713-719.

Konsoula Z. & Liakopoulou-Kyriakides M. 2007. Co-production of alpha- amylase and beta-galactosidaseby *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour. Technol*., **98**, 150-157.

Kumar R. S. S., Singh S. A. & Rao A. G. A., 2009. Conformational stability of α-amylase from malted sorghum (*Sorghum bicolour*): Reversible unfolding by denaturants. *Biochimie*, **91**, 548-557.

Kumar R. S. S., Singh S. A. & Rao A. G. A., 2005. Thermal stability of α-amylase from malted jowar (*Sorghum bicolor*). *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6883-6888.

Kumari et al., 2010. α-amylase from germinating soybean (Glycine max) seeds‑purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, **71**, 1657-1666.

Kunamneni A., Permaul K. & Singh S., 2005. Amylase production in solid state fermentation by thermophilic fungus *Thermomyces langinosus*. *J. Biosci. Bioeng*., **100**, 168-171.

Lefyedi M. L. & Taylor J. R. N., 2007. Control of the growth of coliforms and moulds in sorghum malting by bacterial and yeast cultures. *J. Inst. Brew.,* **113**, 123-129.

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.

Lefyedi M. L., Marais G. J., Dutton M. F. & Taylor J. R. N., 2005. The microbial contamination, toxicity and quality of turned and unturned outdoor floor malted sorghum. *J. Inst. Brew.*, **111**, 190-196.

Letsididi R., Bulawayo B., Kebakile M. & Ezeogu L. I. 2008. Evaluation of indigenous Botswana sorghum cultivars with respect to their diastatic power, α-amylase, β‑amylase, and limit dextrinase potentials for malting. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 29- 36.

Marin-Navarro J. &Polaina J. 2011. Glucoamylases : structural and biotechnological aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **89**, 1267-1273.

Michelin M. et al., 2010. Purification and characterization of a thermostable α-amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii. Carbohyd. Res.,* **345**, 2348-2353**.**

Michelin M. et al., 2008. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 17-25*.*

Muralikrishna G. & Nirmala M., 2005. Cereal α-amylase- an overview. *Carbohyd. Polym*., **60**, 163-173.

Noman A. S. M., Hoque M. A., Sen P. K. & Karim M. R. 2006. Purification and some properties of α-amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber. *Food Chem*. **99**, 444-449.

Nour M. E. M. El & Yagoub S. O., 2010. Partial purification and characterization of α and β-amylase isolated from *Sorghum bicolor* cv. (Feterita) malt. *J. Appl. Sci.,* **10**, 1314-1319.

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.

Prakash O. & Jaiswal N. 2010. α-amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **160**, 2401-2414.

Pei-Ling L., Xiao-SongH. & Qun S., 2010. Effect of high hydrostatic pressure on starches: A review. *Starch*/ *Stärke*, **62**, 615-628.

Rajagopalan G. & Krishnan C., 2008. Alpha amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.,* **99**, 3044-3050.

Saleh A. M., Abdulrahman L. A. M. & Taha A. K. 2009. Partial Purification and Characterization of Five α-amylases from a Wheat Local Variety (Balady) During Germination. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **3**, 1740-1748.

Sanghvi G. V., Rina D.K. & Kishore S.R., 2011. Isolation , optimization and partiel purification of alpha amylase from Chrysosporium asperatum by submerged fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 470-476.

Schwarz P.B., Casper H.H. & Beattie S. 1995. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **53**, 121-127.

Sindhu R., Suprabha G. N. & Shashidhar S., 2009. Optimization of parameters for the production of α-amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960). *Afri. J. Microbiol. Res.*, **3**, 498-503.

Sine J.P. (2010). Applications agroalimentaires et industrielles In: Enzymologie et applications. Ellipses Edition, p.289-295.

Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R., & Pandey A., 2009. Recent advances in solid‑state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **44**, 13-18.

Sivaramakrishnan S. et al., 2006. α-amylases from microbial source. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 173-184.

Sodhi H. K., Sharma K., Gupta J. K. & Soni S. K., 2005. Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus sp*. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.*, **40**, 525-534.

Souza P. M. ; Oliveira P. & Magalhães, 2010. Application of microbial α-amylase in industry – a review. *Braz. J. Microbiol.*, **41**, 850-861.

Swain M. R. & Ray R. C., 2007. Alpha-amylase production by *Bacillus subtilus* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residue. *J. Basic Microbiol*., **47**, 417-425.

Tian B. et al., 2010. Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chem.*, **119**, 1195-1200.

Veluppillai S. et al., 2009. Biochemical changes associated with germinating rice grains and germination improvement. *Rice Science*, **16**, 240-242.

Wolf-Hall C. E, 2007. Mold and mycotoxin problem encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.*, **119**, 89-94.

Wolf-Hall C. E. & Bullerman L. B., 1998. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *J. Food Prot*. **61**, 365-367.

Yong M. et al., 2001. Rapid and simple purification of a novel β-amylase from *Bacillus sp*. *Biotechnol. Lett.,* **23**, 1435-1438.

Zambare V., 2010. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. *Int. J. Life Sci*., **4**, 16-25.

# Chapitre II

# *Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt*

La partie synthèse bibliographique montre que les amylases sont produites par fermentation chez les microorganismes et par maltage chez les céréales. La littérature sur le maltage du sorgho démontre qu'il existe des variétés de sorgho qui fournissent de bonnes activités amylasiques. En rappel, les amylases ont un vaste domaine d'applications. Elles sont utilisées en amidonnerie, en industries brassicoles, en pharmacie, dans les industries du textile et du papier, mais aussi dans la production de biocarburant. Hormis la production de bière et la conception d'aliments pour enfants, le malt de sorgho est très peu exploité dans les industries.

Ce travail consiste à explorer des variétés de sorgho cultivées au Sénégal afin de voir leurs potentialités de production d’amylases.

Le chapitre II présente les résultats de cette étude. La première partie du chapitre décrit les caractéristiques de sept variétés de sorgho blanc. Les composés phénoliques et les tanins condensés sont dosés étant donné qu'ils ont une influence sur les activités enzymatiques du sorgho. La deuxième partie est consacrée au maltage des variétés afin de déterminer leurs potentialités de production d'amylases. Les résultats présentent les niveaux d’activités de trois enzymes amylolytiques (α-amylase, β-amylase et pullulanase). Les analyses réalisées ont mis en exergue chez la variété F-2-20, l'absence de tanins condensés, une faible teneur en composés phénoliques et de grandes activités amylasiques. Cette variété a donc été retenue pour la suite de l’étude.

Publication II:

# Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt

Khady Ba (1,2)\*, Emmanuel Tine (2), Jacqueline Destain (1), Ndiaga Cissé (3), Philippe Thonart (1)

(1) Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux – FUSAGx. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Unité de Bio-Industries. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

(2) Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar (ESP). Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industriel (LMAGI). BP.5085, Dakar Fann (Sénégal).

(3) Centre National de Recherches Agricoles. BP. 53, Bambey (Sénégal). E-mail : ncisse@refer.sn

# Résumé

L’étude a concerné sept variétés de sorgho blanc sélectionnées à l’ISRA de Bambey et consommées dans de nombreuses régions du Sénégal. Certains caractères et composés biochimiques des grains (présence de testa pigmenté, phénols totaux, tanins condensés et activité antioxydante) ont été déterminés dans toutes les variétés. Un maltage de 3 jours a été effectué ; les enzymes amylolytiques : les α-amylases, les β-amylases et les dextrinases limites essentielles pour un malt de bonne qualité ont été dosées. Ces enzymes ont été mesurées spécifiquement avec des kits Megazyme : Amylazyme (α‑amylases), Betamyl (β-amylases) et Limit-Dextrizyme (dextrinases limites). Deux variétés, CE 180-3 et CE 145-66, se sont révélées être des sorghos à tanins. Elles ont les teneurs les plus élevées en phénols totaux et les activités antioxydantes les plus importantes (ABTS et DPPH). Les résultats des analyses enzymatiques et l’indice de Kolbach montrent que la variété F-2-20 présente les meilleures potentialités de maltage.

***Mots clés* :** sorgho ; testa ; phénols totaux ; tanins condensés ; activité antioxydante ; maltage ; enzymes amylolytiques

# Abstract

The study involved seven cultivars of white sorghum selected to ISRA Bambey and consumed in many regions of Senegal. Several characters and biochemical compounds of the grains (presence of pigmented testa, total phenols, condensed tannins and antioxidant activity) were determined in all cultivars. A 3 days malting was also carried out and amylolytic enzymes such as α-amylase, the β-amylase and limit-dextrinase which are essential for a malt of good quality were proportioned. These enzymes are measured specifically with kits of Megazyme: Amylazyme (α-amylase), Betamyl (β-amylase) and Limit-Dextrizyme (limit-dextrinase). Two cultivars, CE 180-33 and CE 145-66 proved to be tannin sorghums, have the highest levels in total phenols and antioxidant activities of the most important (ABTS and DPPH). The results of enzymatic analysis and the index of Kolbach indicated the F-2-20 like cultivar presenting the best potentialities for malt production.

***Keywords***: sorghum; testa; total phenols; condensed tannins; antioxidant activity; malting; amylolytic enzymes

# 1. Introduction

Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), connu aussi sous le nom de grand mil, herbe de Guinée, est une poacée dont la culture est une des plus anciennes dans le monde. Il pousse dans des terrains secs, des sols détrempés ou à forte salinité et tolère bien la chaleur ; ces qualités lui confèrent un avantage considérable par rapport à d’autres cultures céréalières dans les régions de la zone tropicale et semi-aride (Asiedu, 1991). Il est cultivé sur 42 millions d’hectares dans le monde. En 2005, la production mondiale totale de sorgho était estimée à près de 57 millions de tonnes, le plaçant ainsi au cinquième rang des productions céréalières après le riz, le maïs, le blé et l’orge (FAOSTAT, 2006). C'est une culture africaine par excellence, car on y consacre la plus grande part de la superficie cultivée. Mais les plus gros producteurs sont les Etats-Unis d'Amérique (près de 17 % de la production mondiale), grâce à des rendements évidemment bien plus élevés, suivis par l’Inde, le Nigéria, la Chine, le Mexique, le Soudan et l’Argentine (ICRISAT, 2006). Les grains de sorgho jouent un rôle important, voire primordial dans l'alimentation des habitants des régions semi-arides d’Afrique et d’Asie, car ils constituent leurs principales sources d’énergie, de protéines, de vitamines et de minéraux surtout pour les plus pauvres. Par contre dans les pays industrialisés, il est utilisé sous forme de grains ou de fourrage dans l'alimentation des animaux et pour la production de bioéthanol. La demande en sorgho augmente de plus en plus dans de nombreux pays en développement et particulièrement en Afrique de l’Ouest (surtout au Nigeria, Ghana et Burkina Faso). Cela est lié d’une part à la croissance démographique et d’autre part à la politique de ces pays qui visent à développer l’exploitation industrielle du sorgho (brasserie) en remplacement au malt d’orge. Dufour et Mélotte (1992) ont démontré la possibilité de produire du malt de sorgho d’une qualité similaire au malt d’orge si les variétés sont sélectionnées. D’ailleurs, ils furent les premiers chercheurs à tenter et à réussir la production de bière 100 % sorgho.

L’Afrique détient plus de la moitié (55 %) de la production mondiale de sorgho (Taylor et Belton, 2002 ; Taylor, 2003). Actuellement avec l’amélioration en sélection, le nombre de variétés de sorgho identifiées se chiffre à plus de 7000 (Dicko et al., 2006). Ces variétés diffèrent par les caractéristiques des grains comme le poids, la présence ou l’absence de testa, la couleur de l’endosperme, la teneur en composés phénoliques. La présence d'un testa, enveloppe de la graine, de couleur brune, est un indice de dépréciation. Dans certains génotypes de sorgho, le testa est parfois partiel, pas bien visible ou même absent tandis que dans d’autres il est fortement pigmenté (Evers et Millar, 2002). Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes et tanins) sont les métabolites secondaires les plus largement représentés et omniprésents dans le règne végétal. Parmi les céréales, le sorgho est le plus riche et peut en contenir jusqu’à 6% (Beta et al., 1999 ; Awika et Rooney, 2004 et Dicko et al., 2005) quoiqu’il ait été démontré que seules les variétés présentant un testa pigmenté contenaient des tanins (Rooney, 2003 et Dykes et Rooney, 2006 ) .

Ces derniers, présents sous la forme de tanins hydrolysables et de tanins condensés (parmi lesquels des proanthocyanidines), présentent des intérêts considérables en agronomie. Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense de la plante vis à vis des champignons et des prédateurs comme les insectes et les oiseaux. Il est maintenant reconnu que les composés phénoliques interviennent aussi dans la santé humaine : lutte contre l’athérosclérose, action anticancérigène, source majeure d’antioxydants naturels permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire (Hagerman et al*.,* 1998 ; Kumar et al., 2006 ). Les tanins condensés du sorgho peuvent être utilisés comme additifs antioxydants dans les aliments gras (Sikwese et Duodu, 2007). Cependant, les tanins présentent l’inconvénient de se lier aux protéines, aux hydrates de carbone et aux éléments minéraux du grain réduisant ainsi leur valeur nutritionnelle (Nguz, 1997). Ils peuvent également inhiber les enzymes digestives comme l’α-amylase ou la trypsine. Selon Uvere et al. (2000) et Taylor, (2003), ils sont également inhibiteurs des amylases du malt. Beta et al*.* (2000) ont constaté une réduction des tanins dans les grains par un trempage dans une solution alcaline avant leur maltage.

La crise mondiale actuelle des denrées alimentaires oblige certains pays en développement à valoriser leurs produits agricoles. Dans ce cadre, le sorgho présente différentes potentialités :

- une substitution au blé pour les personnes allergiques au gluten,

- sa transformation en malt peut également trouver application dans les industries de la bière en remplacement du malt d’orge si les activités amylasiques (en particulier α‑amylases ; β-amylases et dextrinases limites) sont suffisantes et dans la préparation des aliments de sevrage (bouillies) à faible viscosité (Dillon, 1989 ; Larreta-Garde, 1997 ; Traoré et al*.*, 2004).

Le présent travail s’intéresse à l’évaluation de la teneur en composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de sept variétés de sorgho blanc sélectionnées à l’ISRA de Bambey mais aussi à leurs potentialités de maltage.

# 2. Matériel et méthodes

## 2. 1. Variétés de sorgho

Les sept variétés de sorgho blanc : F-2-20 ; CE 180-33 ; CE 145-66 ; CE 151-262 ;

CE 196-7-2-1 ; 93B1057 et 93B1062 (dont les principales caractéristiques botaniques sont présentées dans le **Tableau 1**), sont issues de la récolte 2007 à l’Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) du Centre National de Recherches Agricoles de Bambey.

## 2. 2. Test de blanchiment (Chlorox)

La présence ou l’absence de testa pigmenté dans les variétés de sorgho est déterminée par le Bleach test de Waniska et al. (1992). Il est effectué de la manière suivante : 15 g de grains sont versés dans une solution d’hypochlorite de sodium NaOCl (70 ml) contenant 7,5 g de KOH. Le tout est mis dans un bain à 60 °C, sous agitation pendant 7 min et ensuite rincé à l’eau. Les grains de couleur jaune claire ou blanche ne présentent pas de testa pigmenté par opposition à ceux de couleur noire.

**Tableau 2.** Caractéristiques botaniques des variétés de sorgho étudiées – Botanical characteristics of sorghum cultivars

|  |  |
| --- | --- |
| **Variétés** | **Caractéristiques** |
| F-2-20 | Lignée sélectionnée sous le n°7820-210 du croisement (MN1056 × 68-20) ×7410-196-1 par l’ISRA Bambey en 1983.  Type botanique : caudatum, hauteur de la plante 200-250 cm.  Maturité des grains à 110 jours.  Variété cultivée à l’est, au sud, et au centre du Saloum. |
| CE 180-33 | Lignée issue du croisement 74-55 (lignée du Sénégal) ×Naga white (écotype du Ghana) obtenue en 1983 par l’ISRA Bambey.  Type botanique : caudatum, hauteur de la plante 180-200 cm.  Maturité des grains à 90 jours.  Variété cultivée à Thiès, Diourbel, Louga. |
| CE 145-66 | Lignée sélectionnée au Sénégal sous le n° 145-66-V-A1-A2 et tirée du croisement 68 × 19 × Naga white.  Type botanique: caudatum, hauteur de la plante 170 cm.  Maturité des grains à 100 jours.  Variété cultivée au centre du Sénégal : Kaolack, Fatick, Diourbel. |
| CE 196-7-2-1 | Lignée sélectionnée à partir du croisement CE 90 × Meloland (USA) par l’ISRA Bambey en 1983.  Type botanique : caudatum, hauteur de la plante 200-210 cm.  Maturité des grains à 95-100 jours.  Variété cultivée à Thiès. |
| CE151-262 | Lignée issue du croisement de CE 90 × 73-71(IS 12610) obtenue en 1980 à l’ISRA Bambey.  Type botanique : caudatum, hauteur de la plante 120 -150 cm.  Maturité des grains à 90 jours.  Variété cultivée à Matam, St Louis, Diourbel. |
| 93B1062 | Variété sélectionnée par l’ISRA Bambey en 1993 par croisement entre CE 145-66 et CE 196-7-2-1 dans un programme de backcross et de rétrocroisement. Cette variété est obtenue après 4 backcross.  Maturité des grains à 105 jours.  Variété cultivée à Diourbel, Thiès. |
| 93B1057 | Variété sélectionnée par l’ISRA Bambey en 1993, par croisement entre CE 145-66 et CE 196-7-2-1 dans un programme de backcross et de rétrocroisement. Cette variété est obtenue après 2 backcross.  Maturité des grains à 80 jours.  Variété cultivée à Thiès, Louga, Diourbel. |

## 2. 3. Détermination des phénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al.*,* 1999), simple et sensible, est utilisée pour doser les phénols totaux. L’extraction est faite avec du méthanol acidifié (1 % v/v) d’HCl à 37 % dans du méthanol). Les graines sont moulues et tamisées avec un tamis de 0,5 mm diamètre. La farine obtenue (0,5 g) est traitée avec 7,5 mL de méthanol acide à 25 °C pendant 20 min (Dicko et al., 2002) dans des tubes de centrifugation, homogénéisés toutes les 5 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 1700 g durant 10 min à 25 °C pour recueillir le surnageant. L’opération est répétée une deuxième fois et les 2 surnageants sont additionnés pour le dosage. Dans 100 µL d’extrait on ajoute 250 µL de réactif de Folin (Sigma-Aldrich, Germany) dilué (50 % v/v). Après 5 min d’incubation à 25 °C, 250 µL de carbonate de sodium à 20 % (p/v) sont ajoutés dans les tubes et le tout est porté à 2000 µL avec de l’eau distillée. L’absorbance est lue à 760 nm après 60 min. Les blancos sont préparés pour chaque variété en remplaçant le réactif de Folin par de l’eau distillée. L’acide gallique (Sigma‑Aldrich, Germany) est utilisé comme standard et les résultats sont exprimés en mg d’équivalent acide gallique par 100 mg de matière sèche. Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode Folin, elle n’est cependant pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l’acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton et al., 1999).

## 2. 4. Détermination des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (Price et al., 1978). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d’acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n’implique que la première unité du polymère. L’extraction est faite de la manière suivante : 5 mL de méthanol (Price et al., 1978) sont ajoutés dans chaque tube contenant 0,5 g de farine de sorgho, le mélange est homogénéisé toutes les 5 min pendant 20 min, puis centrifugé (1700 g, 10 min à 25 °C) pour recueillir le surnageant. L’opération est effectuée deux fois et les 2 surnageants sont additionnés pour le dosage. Les extraits et les réactifs de vanilline (mélange à volume égal de 8 % d’HCl à 37 % dans du méthanol et 4 % de vanilline (Sigma-Aldrich, Germany) dans du méthanol) sont maintenus à 30 °C avant le dosage. 200 µL d’extrait sont ajoutés à 1000 µL de réactif de vanilline pour le dosage des tanins condensés. Les blancos sont préparés en remplaçant le réactif par le mélange méthanol-acide, les tubes sont maintenus à 30 °C pendant 20 min ; l’absorbance est lue à 500 nm. La catéchine est utilisée comme standard et les résultats sont exprimés en mg d’équivalent catéchine par 100 mg de matière sèche de farine.

## 2. 5. Détermination de l’activité antioxydante

L’activité antioxydante est mesurée par deux méthodes : DPPH =1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle (Sigma-Aldrich, Germany) et ABTS = acide 2,2’-azino-bis 3‑éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (Sigma-Aldrich, Germany). Pour ce faire, 10 mL d’une solution hydroacétonique (80 % : 80 mL d’acétone et 20 mL d’eau) sont versés dans des tubes contenant 0,5 g de farine de chaque variété. Le mélange est homogénéisé au vortex toutes les 10 min pendant 2 heures et centrifugé à 1700 g durant 10 min. Le surnageant est récupéré pour les dosages. Le Trolox ou acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétramethylchroman carboxylique (Sigma-Aldrich, Germany) est utilisé comme standard.

### 2. 5. 1. Activité antioxydante mesurée par le radical DPPH

Cette activité est déterminée selon la méthode d’Awika et al. (2003). Le radical DPPHest dissous dansdu méthanol à une concentration de 6.10-5 mol/L et gardé à -20 °C à l’abri de la lumière avant utilisation. A chaque extrait (0,1 mL) sont ajoutés 2,9 mL de solution de DPPH et l’absorbance est mesurée après 8 h à 517 nm. Le résultat est exprimé en micromoles d’équivalent Trolox par gramme de matière sèche.

### 2. 5. 2. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS

Le radical cation ABTSest généré en mélangeant à volume égal une solution 3 mM de persulfate de potassium K2S2O8 et une solution stock d’ABTS à 8 mM, le tout est conservé à l’abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation (Awika et al., 2003). La solution obtenue est diluée avec du tampon phosphate (0,2 M, pH 7,4) contenant 150 mM de NaCl pour obtenir une absorbance de 1,5 à 734 nm. 2,9 mL de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 0,1 mL d’extrait et la lecture est faite à 734 nm après 30 min pour chaque série d’analyses. Le Trolox est utilisé comme standard et le résultat final est exprimé en micromoles d’équivalent Trolox par gramme de matière sèche.

## 2. 6. Maltage des différentes variétés

Les grains de sorgho sont désinfectés d’abord avec une solution d’hypochlorite de sodium (eau de javel) à 2 % (v/v) pendant 10 min avant et après trempage pour éviter le développement de moisissures au cours de la germination. Ils sont ensuite trempés dans de l’eau distillée (200 mL d’eau pour 100 g de grains). Le trempage dure 16 h et s’effectue en milieu alcalin Ca(OH) 2 à 0,1 % (p/v). La germination se déroule dans une chambre à 30 °C ± 2 °C pendant 72 h et est suivie d’un séchage de 48 h à 40 °C. Le malt ainsi obtenu est dégermé, transformé en farine pour analyse. Les activités amylasiques sont mesurées à l’aide de kits spécifiques : AMYLAZYME (Azurine-crosslinked amylose = AZCL-Amylose, Megazyme International Ireland Ltd, Irlande) pour les α-amylases, BETAMYL (Megazyme International Ireland Ltd, Irlande) pour les ß- amylases et LIMIT-DEXTRIZYME (Megazyme International Ireland Ltd, Irlande) pour les dextrinases limites. Les résultats sont exprimés en Unité Ceralpha correspondant à la quantité d’enzymes nécessaire pour libérer une micromole de p-nitrophénol par minute et par gramme de matière sèche à 40 °C pour les α et β-amylases. Pour les dextrinases limites, une unité d’activité est définie comme la quantité d’enzymes nécessaire pour libérer une micromole de glucose à partir de pullulane par minute et par kilogramme de matière sèche à 40 °C.

## 2.7. Analyses statistiques

Chaque expérience a été répétée trois fois. Les données obtenues ont été traitées par analyse de la variance et les moyennes significativement différentes ont été séparées en utilisant le système SAS (version 9.1.3. for Windows) au seuil de probabilité 5 %.

# 3. Résultats et discussion

## 3. 1. Caractéristiques des variétés de sorgho étudiées

Les caractéristiques botaniques des différentes variétés étudiées sont présentées dans le **Tableau 1**. La teneur en protéines (N x 6,25), en amidon et le poids de 1000 grains (**Tableau 2**) se situent dans des valeurs normales par rapport à celles publiées par la FAO en 1995 (protéines : 7 à 15 % ; amidon : 60 à 75 % ; poids de 1000 grains : 25 à 30 g).

## 3. 2. Test de blanchiment

Le test de blanchiment permettant de visualiser le testa des grains après dissolution du péricarpe, montre que seuls les grains des variétés CE 180-33 et CE 145-66 (**Tableau 3**) contiennent un testa pigmenté. Rappelons que selon Rooney, (2003) et Dykes et Rooney, (2006) un testa pigmenté indique la présence de tanins condensés.

**Tableau 2**. Caractéristiques des grains des variétés de sorgho étudiées - Grain characteristics of sorghum cultivars

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Variétés** | **Type Botanique** | **Couleur des grains** | **Testa** | **Couleur de l’endosperme** | **Poids** (g) **de 1000 grains** | **Amidon** (% de matière fraîche) | **Protéines** (% de matière fraîche) | **Humidité** (%) |
| F-2-20 | Caudatum | Ivoire | - | Blanc | 22,3 a 1 | 59,1 a | 11, 0 b | 9,5 b |
| CE 180-33 | Caudatum | Blanc | + | Blanc | 23,1 a | 60,6 a | 8.1 a | 9,0 b |
| CE 145-66 | Caudatum | Blanc | + | Blanc | 20,2 a | 58,4 a | 9,7 ab | 8,5 b |
| CE 151-262 | Caudatum | Ivoire | - | Blanc | 25,1 ab | 60,4 a | 11,5 b | 7,4 ab |
| CE 196-7-2-1 | Caudatum | Brunâtre | - | Blanc | 21,2 a | 68,1 b | 11,3 b | 7,9 ab |
| 93B1057 | Caudatum | Ivoire | - | Blanc | 26,7 b | 59,7 a | 12,0 b | 9,0 b |
| 93B1062 | Caudatum | Ivoire | - | Blanc | 21,9 a | 63,9 b | 12,8 b | 6,4 a |

+ = grain avec testa pigmenté – grain with pigmented testa

− = grain sans testa pigmenté – grain without pigmented testa

1. moyennes dans chaque colonne, suivies par une lettre différente sont significativement différentes (P< 005) − means within each column followed by a different letter are significantly different (P< 0,05)

## 3. 3. Phénols totaux

Les composés phénoliques sont constitués de trois grandes catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Beta, 2003 ; Dykes et Rooney, 2006 ; Dicko et al., 2006 ). Les teneurs en phénols totaux mesurés à l’aide du réactif de Folin-Ciocalteu varient de 0,22 à 0,57 mg EAG/100 mg (**Tableau 3**); les variétés CE 108-33 et CE 145-66 étant les plus riches. Une différence significative (*P< 0,05*) est notée entre les moyennes des sept variétés, et la comparaison multiple des moyennes montre que ces deux variétés sont les mêmes et diffèrent des cinq autres variétés. Certaines variétés de sorgho blanc parmi les 50 étudiées par Dicko et al. (2002), ont des teneurs en polyphénols semblables à celles obtenues dans notre étude. Nos résultats sont aussi comparables à ceux de Zhao et al. (2008) avec 14 variétés d’orge.

## 3. 4. Tanins condensés

Le dosage par la vanilline HCl n’a révélé la présence de tanins condensés que dans les deux variétés présentant un testa pigmenté (**Tableau 3**). Ces résultats confirment bien les hypothèses d’Earp et al. (2004) et Dykes et Rooney, (2006). Les valeurs obtenues sont respectivement 0,12 % et 0,19 % pour CE 180-33 et CE 145-66. Ces deux variétés peuvent être classées dans la catégorie des sorghos de type II (Dykes et Rooney, 2006). Trois types de sorgho existent : les sorghos de type I dont la teneur en tanins est inférieure à 0, 02 %, le type II compris entre 0,02 - 0,19 % et le type III situé entre 0,4 - 3,5 %. Les sorghos riches en tanins sont une source d’antioxydants, substances intéressantes pour la santé humaine. Leur désavantage se situe au niveau des interactions tanins-protéines, particulièrement pour les sorghos des groupes II et III. Ces interactions affectent la digestibilité des protéines et des carbohydrates, mais inhibent aussi les enzymes comme les amylases du malt. Il faut reconnaître qu’actuellement beaucoup d’aliments traditionnels comme les porridges et les boissons alcoolisées sont faits à partir de sorgho à tanins (Awika et Rooney, 2004).

**Tableau 3.** Teneur en composés phénoliques dans les différentes variétés de sorgho - Phenolic compounds in sorghum cultivars

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Variétés** | **Testa** | **Phénols totaux** A | **Tanins condensés** B |
| F-2-20 | – | 0,22 ± 0,01 a1 | 0 |
| CE 180-33 | + | 0,57 ± 0,01 b | 0,12 ± 0,05 a |
| CE 145-66 | + | 0,56 ± 0,03 b | 0,19 ± 0,03 a |
| CE 151-262 | – | 0,27 ± 0,03 a | 0 |
| CE 196-7-2-1 | – | 0,22 ± 0,02 a | 0 |
| 93B1057 | – | 0,24 ± 0,02 a | 0 |
| 93B1062 | – | 0,24 ± 0,01 a | 0 |

A= Phénols totaux exprimés en mg de EAG/100 mg de matière sèche (méthode de Folin-Ciocalteu) – total phenols expressed in mg GAE/100 mg of dry matter (Folin- Ciocalteu Method)

B= Tanins condensés exprimés en mg de EC/100 mg de matière sèche (Vanilline-HCl) – condensed tannins expressed in mg CE/100 mg of dry matter (Vanillin-HCl Method)

1 moyennes dans chaque colonne, suivies par une lettre différente sont significativement différentes (P< 005) − means within each column followed by a different letter are significantly different (P< 0,05)

## 3. 5. Activité antioxydante

L’activité antioxydante est mesurée par deux méthodes, la première utilisant le radical DPPH généralement utilisé pour déterminer l’activité antioxydante dans les céréales, la seconde utilisant le radical ABTS souvent utilisé pour les composés simples et d’autres mélanges complexes (Yu et Zhou, 2004 ; Zhou et al., 2004). L’activité varie entre 16,3 et 21,7 µmol ET/g pour la méthode DPPH et 62,2 et 76,4 µmol ET/g pour la méthode ABTS (**Tableau 4**). Les variétés CE 180-33 et CE 145-66 ont l’activité antioxydante la plus élevée par les deux méthodes de dosage (seules variétés à posséder des tanins condensés et présentant les valeurs les plus élevées en phénols totaux). Les valeurs trouvées par le radical ABTS sont plus importantes que celles trouvées par le radical DPPH. Zhao et al. (2008) ont obtenu des résultats similaires en mesurant l’activité antioxydante des extraits de malt de 14 variétés d’orge par ces deux radicaux, de même que Dlamini et al. (2007) avec cinq variétés de sorgho étudiées. Cette différence de valeurs s’explique partiellement par l’interférence probable exercée par les anthocyanes des pellicules du sorgho qui présentent un pic d’absorption dans le visible au niveau de 475-485 nm alors que l’absorbance pour la méthode au DPPH se mesure à 515 nm, ce qui justifierait la faible activité mise en évidence par cette méthode. Notons enfin que le radical ABTS est également moins sensible aux pH acides que le radical DPPH.

**Tableau 4** : Activité antioxydante mesurée par les radicaux ABTS et DPPH dans les différentes variétés de sorgho**-** Antioxidant activity measured by radicals ABTS and DPPH in various sorghum cultivars

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Activité antioxydante (µmol de TE /g de matière sèche)** | |
| **Variétés** | **ABTS** | **DPPH** |
| F-2-20 | 62,2 ± 4,1 a 1 | 16,6 ± 0,3 a |
| CE 180-33 | 74,2 ± 3,0 b | 21,6 ± 0,5 b |
| CE 145-66 | 76,4 ± 4,5 b | 21,2 ± 0,5 b |
| CE 151-262 | 64,5 ± 3,8 a | 16,3 ± 0,6 a |
| CE 196-7-2-1 | 66,4 ± 3,9 a | 16,8 ± 0,1 a |
| 93B1057 | 67,2 ± 1,7 a | 17,5 ± 0,1 a |
| 93B1062 | 64,2 ± 3,5 a | 16,9 ± 0,1 a |

1 moyennes dans chaque colonne, suivies par une lettre différente sont significativement différentes (P< 0,05) − means within each column followed by a different letter are significantly different (P< 0,05)

## 3. 6. Analyse des malts de sorgho

Les malts résultent d’une étape de germination de 72 h suivie d’un séchage de 48 h à 40 °C pour abaisser l’humidité de manière suffisante afin d’assurer une bonne conservation. Les activités des amylases : α-amylase, β-amylase et dextrinase limite, ainsi que les pertes de matières ou freintes et l’indice de Kolbach ont été déterminés pour chaque variété de sorgho maltée (**Tableau 5).**

Les pertes de matières observées pendant la germination varient selon les variétés, elles se situent entre 7,2 et 26,4 %. Ces pertes (freintes) sont élevées par rapport au malt d’orge (12 % en 8 jours). Cependant, il faut noter que les conditions du maltage sont différentes chez l’orge et le sorgho. En effet, la température de germination adéquate pour un malt de sorgho de bonne qualité se situe entre 25 et 30 °C contre 15 à 17 °C pour l’orge (Agu et Palmer, 1997). Cette température de germination induit un développement rapide des radicelles et des germes.

Les mesures de l’activité α-amylase réalisées avec le kit Amylazyme montrent des valeurs d’activité comprises entre 61 et 312 U/g. L’activité la plus importante est notée avec la variété F-2-20 (312,7 U/g) et la plus faible avec 93B1057 (60,9 U/g). Au regard des valeurs trouvées dans la littérature pour le malt de sorgho (Agu et Palmer, 1997 ; Letsididi et al., 2008), quatre parmi les sept variétés étudiées : F-2-20 ; CE 180-33 ; CE 151-262 et 93B1062 présentent une très bonne activité α-amylase. Leurs activités sont comparables et même supérieures à celles de certaines variétés d’orge étudiées par Kraemer et al., (2001). Les valeurs importantes des activités α-amylase sont probablement dues au développement plus long des radicelles, connu pour augmenter les niveaux de gibbérellines qui stimulent la production des amylases.

Les activités β-amylase ou enzymes «saccharifiantes» dans les sept variétés de sorgho malté mesurées par la méthode BETAMYL (Megazyme), varient entre 17 et 62 U/g. La variété F‑2‑20 avec 62,7 U/g présente, parmi les variétés étudiées, l’activité la plus élevée suivie par CE 151-262 et CE 180-33 qui ont des activités presque semblables (32,5 à 30 U/g). Ensuite viennent dans l’ordre décroissant les variétés : 93B1062 ; CE 145-66 ; CE 196-7-2-1 et 93B1057. Les activités β-amylase obtenues sont semblables à celles trouvées par Taylor et Robbins (1993) en utilisant la même méthode (BETAMYL). Par contre, certaines variétés de sorgho étudiées par Agu et Palmer, (1997, 1998) et Letsididi et al., (2008) ont des activités β‑amylase plus importantes que celles obtenues dans notre étude (valeurs comprises entre 80 et 168 U/g). Ces variations peuvent être dues aux différences dans les méthodes de maltage et aux variétés étudiées.

Cependant plusieurs hypothèses sont émises sur la faible activité β-amylase dans le malt de sorgho. Uriyo et Eigel (1999) l’ont attribué à une interaction avec les polyphénols lors de l’extraction, alors que Dufour et Mélotte (1992) ont montré que l’activité β-amylase reste faible même dans les variétés à faible teneur en polyphénols. D’autres prétendent qu’il y aurait des inhibiteurs autres que les polyphénols, une solubilisation partielle de l’enzyme ou un rendement faible pendant le maltage.

Comparativement au malt d’orge dont la valeur standard de l’activité β-amylase est de 550 U/g, celle du malt de sorgho est de loin inférieure. Cette faible activité β-amylase (enzyme essentielle à la réussite du processus de brassage) est l’une des raisons qui posent problème pour l’adoption du sorgho dans les brasseries européennes.

La dextrinase limite est déterminée par la méthode de McCleary (1992) en utilisant du pullulane contenu dans les comprimés du Limit-Dextrizyme (Megazyme) comme substrat. L’analyse des sept variétés maltées a montré une activité dextrinase limite non négligeable. Avec 1253,8 U/kg, la F-2-20 produit plus de dextrinases limites, suivie par CE 151-262 ; 93B1057 et CE 196-7-2-1. CE 145-66 affiche la plus faible activité dextrinase limite. Hormis la variété CE 145-66, l’activité dextrinase limite mesurée dans les autres variétés de cette étude est de loin supérieure à celle mesurée dans 11 variétés de sorgho du Botswana par Letsididi et al. (2008) ainsi qu’à celle de certaines variétés d’orge étudiées par Wang et al. (2006).

L’indice de Kolbach (ratio entre protéines solubles et protéines totales d’un malt) est déterminé dans les différents malts. En général il est compris entre 35 et 45 %. Les valeurs obtenues avec les variétés F-2-20 et CE 180-33, respectivement 42,1 et 41,9 % montrent une très bonne désagrégation.

**Tableau 5.** Activités enzymatiques des différents malts de sorgho **–** Enzymes activities of sorghum malts

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Variétés** | **α-amylase (U/g)** | **β-amylase (U/g)** | **Dextrinase limite (U/kg)** | **Indice de Kolbach (%)** | **Freintes (%)** |
| F-2-20 | 312,6± 11,7 f 1 | 62,7 ± 4,4 d | 1253,8 ± 19,5 g | 42,1 b | 8, 4 ± 2,8 ab |
| CE 180-33 | 163,9± 16,2 e | 30,5 ± 2,0 c | 288,1 ± 14,4 c | 41,9 b | 16,3 ± 6,8 c |
| CE 145-66 | 92,6 ± 11,7 b | 20,5 ± 2,9 b | 173,8 ± 16,4 a | 38,9 a | 11,7± 2,3 ab |
| CE 151-262 | 143,7± 32,2 d | 32,5 ± 11,1 c | 648,1 ± 28,8 f | 37,6 a | 26,4 ± 3,5 d |
| CE 196-7-2-1 | 93,4 ± 23,9 b | 19,3 ± 5,9 b | 473,7 ± 12,8 d | 36,4 a | 16,9 ± 5,1 c |
| 93B1057 | 60,9 ± 11,2 a | 16,9 ± 8,9 a | 483,9 ± 9,6 e | 34,8 a | 15,5 ± 5,7 c |
| 93B1062 | 131,7± 2,9 c | 22,3 ± 3,5 b | 243,8 ± 4,9 b | 35,5 a | 7,2 ± 3,9 a |

1 moyennes dans chaque colonne, suivies par une lettre différente sont significativement différentes (P< 0,05) − means within each column followed by a different letter are significantly different (P< 0,05)

# 4. Conclusion

L’étude avait comme objectif de déterminer la teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho blanc sénégalais et d’étudier leurs potentialités de maltage en dosant l’activité de trois importantes enzymes : α-amylase ; β-amylase et dextrinase limite ainsi que l’indice de Kolbach. Parmi les sept variétés utilisées, seules deux CE 180-33 et CE 145-66 sont des sorghos à tanins (proanthocyanidines) et présentent les teneurs les plus élevées en composés phénoliques. Par ailleurs, l’activité antioxydante a montré des valeurs significatives par rapport à l’orge dans toutes les variétés étudiées. Ce qui est intéressant pour leur utilisation en brasserie, en effet leur bonne activité antioxydante permettrait de stabiliser la bière.

L’étude comparative des activités amylolytiques dans les différents malts nous a conduits à faire des observations intéressantes. La F-2-20 présente une bonne activité α-amylase, dextrinase limite et une bonne désagrégation. Avec son équipement enzymatique, elle pourrait être employée comme adjuvant ou comme matière première en brasserie. Mais des améliorations sont nécessaires pour élever la teneur en β-amylase dans le malt de sorgho. En effet, cela devrait être possible soit par l’optimisation des conditions de maltage, soit par le biais de la génétique afin de sélectionner des variétés ayant une proportion suffisante de β‑amylase, supérieure à 400 U/g.

# Remerciements

Nous remercions Wallonie-Bruxelles International (WBI) ex Commissariat Général aux Relations Internationales de la Communauté Française de Belgique (CGRI) pour son soutien financier et le Centre National de Recherches Agricoles de Bambey (Sénégal) pour avoir mis à notre disposition les différentes variétés de sorgho étudiées. Nous remercions également le Dr Guy Derdelinckx du Centre for Food and Microbial Technology-Department M2S de l’université catholique de Louvain, d’avoir accepté de juger ce travail.

# 5. Bibliographie

Agu R. C. & Palmer G. H., 1997. The effect of temperature on the modification of sorghum and barley during malting. *Process Biochem.*, **32**, 501-507.

Agu R. C. & Palmer G. H., 1998. A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Bioresour. Technol.*, **66**, 253-261.

Asiedu J. J. 1991. La transformation des produits agricoles en zone tropicale : Approche technologique. Collection Economie et Développement, Paris : Karthala.

Awika J M. et al., 2003. Screening method to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6657-6662.

Awika J M. & Rooney L W. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, **65**, 1199-1221.

Beta T., 2003. Anti-nutrients or anti-oxidants in cereal grains: An evaluation of the composition and functionality of phenolic compounds with special reference to sorghum and barley. <http://www.afripro.org.uk/papers/Paper11Beta.pdf>. (11/05/ 2007).

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.

Dicko M H. et al., 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3780-3788.

Dicko M H. Gruppen H., Traoré A. S., van Berkel W. J. H. & Voragen A. G. J. 2005. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2581-2588.

Dicko M H., Gruppen H., Voragen A. G. J. & van Berkel W. J. H 2006. Biochemical characterization of major sorghum grain peroxidase*. The FEBS Journal*, **273**, 2293-2307.

Dillon J.C., 1989. Les produits céréaliers dans l’alimentation de sevrage du jeune enfant en Afrique. Céréales en régions chaudes. AUPELF-UREF, éds John Libbey Eurotext, Paris, 299-307.

Dlamini N R., Taylor J R N. & Rooney L W., 2007. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based food. *Food Chem.*, **105**, 1412-1419.

Dufour J P. & Mélotte L., 1992. Sorghum malt for the production of a lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **50**, 110-119.

Dykes L. & Rooney L W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.*, **44**, 236-351.

Evers T. & Millar S., 2002. Cereal grain structure and development: Some implications for quality. *J. Cereal Sci.*, **36**, 261-284.

FAO , 1995. Food and Agriculture Organisation of United Nation. Sorgho et le mil dans la nutrition humaine. Rome, 198

FAOSTAT, 2006. Food and Agricultural Organization of the United Nation <http://www.fao.org/> (11/02/2008).

Hagerman A. E. et al., 1998. High molecular weight plant phenolics (tanins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.,* **46**, 1887-1892.

ICRISAT, 2006. International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics. Crops : Sorghum. http//test1.icrisat.org/sorghum/sorghum.htm#5 (29/01/2007).

Kumar G S., Nayaka H., Dharmesh S. M. & Salimath P. V. 2006. Free and bound phenolic antioxidant in amla (*Emblic offinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *J. Food Compos. Anal.*, **19**, 446-452.

Kraemer J .E. G., Mundstock E. C. & Molina S. C., 2001. Development Expression of Amylases during Barley malting. *J. Cereal Sci.*, **33**, 279-288.

Larreta-Garde V. 1997. Enzymes en agroalimentaire. Technique & Documentation, Paris. p 5.

Letsididi R., Bulawayo B., Kebakile M. & Ezeogu L. I. 2008. Evaluation of indigenous Botswana sorghum cultivars with respect to their diastatic power, α-amylase, β-amylase, and limit dextrinase potentials for malting. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 29- 36.

McCleary B. V., 1992. Measurement of the content of limit dextrinase in cereal flours. *Carbohydr. Res.*, **227**, 257-268.

Nguz K. 1997. *Etude nutritionnelle et biochimique sur les tanins condensés du sorgho (Sorghum bicolor (L.) Moench)*. Thèse de doctorat: Université de Gent (Belgique).

Price M. L., Van Scoyoc S. & Butler L. G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1214-1218.

Rooney L W., 2003. Overview: Sorghum and Millet food research failures and successes. Pretoria South Africa: Belton P.S. and Taylor J.R.N. <http://www.afripro.org.uk/papers/Paper09Rooney.pdf>. (26/10/2006).

Sikwese F. E. & Duodu K. G., 2007. Antioxidant efect of crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chem.*, **104**, 324-331.

Singleton V L., Orthofer R. & Lamuela-Raventos R M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.,* **299,** 152-178.

Taylor J. R. N., 2003. Overview: importance of sorghum production in Africa. Pretoria, South Africa : Belton P. S. and Taylor J. R. N.

[http://www.afripro.org.uk/papers/Paper01Taylor.pdf](http://www.afripro.org.uk./papers/Paper01Taylor.pdf). (26/10/2006).

Taylor J.R.N. & Belton P.S., 2002. Sorghum. In Belton P.S. & Taylor R.N. (Eds*), Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilisation Potential*. Springer, Berlin, 25-79.

Traoré T., Mouquet C. Icard-Vernière C., Traoré A.S. & Trèche S. 2004. Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α-amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chem.*, **88**, 105–114.

Uriyo M. & Eigel W E. 1999. Duration of kilning treatment on α-amylase, β-amylase and endo-(1, 3) (1, 4)-β-D- glucanase activity of malted Sorghum ( *Sorghum bicolor*). *Process Biochem.*, **35**, 433 - 436.

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** (3), 352-358.

Wang X., Yang J. & Zhang G., 2006. Genotypic and environmental variation in barley limit dextrinase activity and its relation to malt quality. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B*, **7**, 386‑392.

Waniska R D., Hugo L F. & Rooney L W., 1992. Practical methods to determine presence of tannins in sorghum. *J. Appl. Poult. Res.*, **1**, 122-128.

Yu L. & Zhou K., 2004. Antioxidant properties of bran extracts from ‘Platte’ wheat grown at different location. *Food Chem.*, **90**, 311-316.

Zhao H. et al., 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, **107**, 296-304.

Zhou K., Laux J. J. & Yu L., 2004. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions of their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1118-1123.

# Chapitre III

# *Crude amylase characterization and cDNA analysis of β‑amylase from sorghum malt (cv F-2-20)*

Pour répondre aux conditions optimales d'utilisation d'une enzyme, il est nécessaire de déterminer au préalable ses propriétés. L'analyse des malts terminée, l'étude s'est orientée vers la détermination des propriétés de deux amylases (α et β-amylase) et l’étude génétique de la β-amylase.

Ce chapitre III présente dans un premier temps les résultats de la caractérisation biochimique des α et β-amylases du malt de sorgho de la variété F-2-20. Deux principaux facteurs à savoir le pH et la température ont été mis en évidence. Les deux enzymes ont présenté une activité optimale au même pH 5,5. L’activité optimale de l’α-amylase est notée à 65 °C tandis que celle de la β-amylase est à 55 °C.

La deuxième partie du chapitre III aborde les résultats sur la recherche du gène de la β‑amylase. A partir de l’ARN total extrait des graines de sorgho germées, des analyses RT‑PCR ont été réalisées. Le séquençage de l'ADN complémentaire a permis d'identifier le gène de la β-amylase du sorgho qui a été enregistré dans la base de données de Genbank (GU017481). Des similitudes et des différences de la séquence des acides aminés de la β‑amylase du sorgho traduite à partir de la séquence des nucléotides avec des séquences déjà référenciées ont été établies.

# Publication III:

# Crude amylase characterization and cDNA analysis of β-amylase from sorghum malt (cv F-2-20)

Khady Ba1, 2\*, Robin Dubois-Dauphin1, Emmanuel Tine2, Jacqueline Destain1, Philippe Thonart1

1 University of Liege - Gembloux Agro-Bio Tech, department of Bio-Industry, Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgium.

2 University Cheikh Anta Diop of Dakar, High School Polytechnic of Dakar, Laboratory of Applied Microbiology and Industrial Engineering, BP 5085 Dakar Fann, Senegal.

# Abstract

The amylolytic enzymes (α and β-amylases) from sorghum malt (cv. F-2-20) were characterized in the crude extract. Both enzymes exhibited high activity at pH 5.5. The optimal temperature for α and β-amylases activities were 65 °C and 55 °C, respectively. The thermal stability study of enzymes showed that α-amylase was relatively stable at 65 °C during 1 h this appears to be suitable as biocatalyst for practical use in liquefaction of starch at moderate temperature. Rapid amplification of 5' of cDNA ends and 3' RACE amplification showed that the full-length β-amylase (GU017481) has 1660 bp long and contains an open reading frame (ORF). The cDNA sequence encodes a polypeptide of 474 amino acid residues with a calculated molecular weight of 54.5 kDa. Comparison of the β-amylase sequence from sorghum with known sequences of the enzyme revealed high homology with maize β‑amylase, barley ubiquitous β-amylase and rice β-amylase. Nevertheless few amino acids located in consensus region of the enzymes were substituted.

**Key words:** Sorghum, α-amylase, β-amylase, PCR

# 1. Introduction

Amylases are enzymes employed in the starch industries in which they represent an important part of industrial enzymes. They are widely distributed in plants, animals and microbes.

α-amylases (EC 3.2.1.2) are endoamylases that hydrolyze α-1,4 glucosidic links of starch polymer resulting decrease in viscosity and molecular weight [1,2]. Hydrolysis of starch by α‑amylases produces glucose, maltose, maltotriose, oligossaccharides and α-limit dextrins containing α-1, 6 links [3]. They are extensively used for starch hydrolysis in the liquefaction process. They are also used in brewing industry to improve flour in baking process and to produce modified starch for paper industry [4].

β-amylases (EC 3.2.1.2.) are exoamylases that cleave α-1,4 glucosidic links of the non reducing ends of the starch components and release β-maltose and β-limit dextrins. These are mainly used in brewing and the biofuel production among others. They are present in higher plants, especially abundant in germinated seeds (malt) of cereals (barley, rye, wheat, sorghum, rice and maize). Although malt with adequate β-amylase activity is particularly of interest in brewing . β-Amylases are also found in certain bacteria including *Bacillus* *polymyxa, Bacillus circulans* and *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* [5,6,7]. β-amylases enzymes have been characterized mainly using enzymes purified from various source, most notably from barley (*Hordeum vulgare* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), rye (*Secale cereal* L.), maize (*Zea mays* L.), soybeans (*Glycine max* L.) sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), thale cress (*Arabidopsis thaliana* L.) and microorganism [8,9,10,11,12]. The highest β-amylases activity have been observed in barley, while they are in small amounts see even absent in sorghum, which is a constraint for its use in brewery [13]. Two β-amylase gene have been identified in barley, *Bmy1* (endosperm-specific) and *Bmy2* (ubiquitous) [14,15,13]. β-amylase polymorphism is observed in some cereals (barley, rye wheat) but not in sorghum. Contrary to Triticeae, sorghum β-amylases do not accumulate in the grain wall but appear during germination and correspond to the ubiquitous [9].

In the present study, we report the biochemical characterization of α and β-amylases from germinating sorghum grains. β-amylase cDNA obtained from the sorghum endosperm is analyzed and bioinformatics approach has been applied for the comparative analysis of amino acid sequences in proteins belonging to same amylase family.

# 2. Materials and methods

## 2.1. Materials

White sorghum (*Sorghum bicolor* cv. (F-2-20)) seeds were obtained from the Senegalese Institute Agricultural Research (ISRA) of the national Center Agricultural Research of Bambey. All the chemicals used were analytical grade.

2.2. Malting of sorghum

Sorghum seeds were surface-sterilized with a solution of sodium hypochlorite   
2 % (v/v) for 10 min before and after steeping to prevent mold growth during  
germination. They were then steeped in distilled water (200 ml water per 100 g of seeds).  
Steeping lasted 16 h and was performed under alkaline Ca(OH)2 at 0.1 % (w/v). Seeds were germinated under controlled condition according to the protocol described by Ba et al. [16]. The resulting malt was left to dry then homogenized using blender until a fine powder was obtained. The malt powder was kept in glass bottles and used for the extraction of amylases.

## 2.3. Analysis of enzymes

### 2.3.1. α-amylase activity

Activity of α-amylase was determined using AMYLAZYME T-AMZ200 (Azurin-crosslinked amylose (AZCL-Amylose) kit from Megazyme, Ireland. Crude extract was obtained by homogenizing 1.0 g of sorghum malt flour in 20 mL sodium maleate buffer (100 mM, pH 6 containing calcium chloride (5 mM) and sodium azide (0.02 % w/v)). The solution was mixed by inversion and allowed to extract over 15 min. This extract was centrifuged at 4 °C at 1,000 *g*, for 10 min using refrigerated centrifuge (Beckman Instruments, USA). The supernatant was used as crude α-amylase. An aliquot (1.0 mL) of suitably diluted crude enzyme extract was pre-incubated for 5 min in a water bathat 40 °C. An Amylazyme tablet was added to each tube (without stirring**)** and tubes were incubated for 10 min at 40 °C. Trizma base solution (10 mL, 2 % w/v at pH 9.5) was added after the 10 min to stop the reaction. Tubes were vortexed vigorously and left at room temperature during 5 min. The tubes were stirred and the contents were filteredthrough Whatman No. 1 filter paper and the absorbance of the filtrate was measured at 590 nm using a spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Unicam USA) against blank without enzymes extract. Absorbance can be directly correlated to the enzyme activity which was expressed in units Ceralpha corresponding to the amount of enzyme required to liberate one micromole of p-nitrophenol per minute per gram of dry weight at 40 °C.

### 2.3.2. β-amylase activity

BETAMYL-METHOD kit (Megazyme, Ireland) was used for determinate β-amylase activity. 0.5 g of sorghum malt was extracted in 5 mL Trizma base buffer (50 mM, pH 8 containing EDTA (1 mM) and cysteine (100 mM)), allowed the enzyme to extract over a 1 h at room temperature with frequent vigorous stirring on a vortex. Supernatant was collected by centrifugation (1000 g, 10 min, at 4 °C) and used as crude β-amylase. Betamyl substrate (0.2 ml) and diluted crude extract in maleic acid buffer (100 mM, pH 6.2, containing EDTA 1 mM, BSA 1 mg/ml and sodium azide 0.02 %) were pre-incubated for 5 min separately in a water bathat 40°C. 0.2 ml of enzyme preparation was added in Betamyl substrate and tubes were incubated for 10 min at 40 °C. Reaction was stopped by adding 3 mL of Trizma base solution (1 % w/v), tubes were stirred and absorbance measured at 410 nm against distilled water. β-amylase activity was appropriately calculated from the absorbance values and expressed in units Ceralpha corresponding to the amount of enzyme required to liberate one micromole of p-nitrophenol per minute per gram of dry weight at 40 °C.

## 2.4. Characterization of the crude enzymes

### 2.4.1. Effect of pH on the α and β-amylase activity

Effects of pH on α and β-amylases activity in crude extracts were tested at pH values ranging from 4.0 to 9.0 using the following buffers: acetate 50mM with 5mM of CaCl2 ( pH 4.0-5.5), phosphate 50mM with 5mM of CaCl2 (pH 6.0-7.5) and Tris-HCl 50mM with 5mM of CaCl2  (pH 8.0-9.0) for α-amylase. CaCl2 was substituted by EDTA and BSA in each buffer to analyze β-amylase activity. Analyses were done in triplicate and the activities at optimal pH were defined as 100 %.

### 2.4.2. Effect of temperature on the α and β-amylase activity

The optimum temperature of α and β-amylases was determined at different temperatures ranging from to 30 to 90 °C. The activities were assayed using for α and β-amylase AMYLAZYME and BETAMYL kits respectively from Megazyme, Ireland. Extracts for α and β-amylases were incubated in their respective substrates at different temperatures. Analyses were performed in triplicate and the activities at optimal temperature were defined as 100 %.

### 2.4.3. Thermal stability of enzyme

The thermal stability of the enzymes was determined with AMYLAZYME and BETAMYL kits (Megazyme, Ireland). Extracts were incubated in first at temperatures ranging between 30 and 90 °C for up to 60 min then they had cooled in an ice bath before measuring the residual activity. Analyses were conducted in triplicate and the residual activity was determined considering the original activity as 100%.

## 2.5. β-amylase gene determination

For analysis of β-amylase gene, seeds were sterilized and germinated in Petri dishes containing Murashige and Skoog agar medium for 3 days at 30 °C. Seeds were degermed, frozen in liquid nitrogen, and stored at - 80 °C until use.

### 2.5.1. RNA preparation

The frozen germinated seeds were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total RNA was extracted using an RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase to eliminate genomic DNA contamination. The reaction mixture was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated with 100 % ethanol and after ethanol evaporation dissolved in RNase-free water. Total RNA was quantified by absorbance at 260 nm using a UV spectrophotometer.

### 2.5.2. RT-PCR analysis

Expression analysis by RT-PCR was realized to reverse transcribed a total RNA into first strand cDNA using the protocol Revertaid Fisrt™ Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Belgium) following the manufacturer’s instruction in a total volume of 20 µL and used as a template for PCR. 3.5 µg sample of DNase treated total RNA was used for first-strand cDNA synthesis, the reaction was performed using Oligo (dT) 18 and M-MuLV reverse transcriptase containing in the Kit.

Specific primers for the amplification of transcripts for β-amylase gene (Table 1) were designed based on an alignment of the β-amylase peptide sequences of *Arabidopsis thaliana* (NM113297), *Triticum aestivum* (X98504), *Zea mays* (AF068119; NM001112026; Z11772) , *Hordeum vulgare* (EF175473).

The cDNA sequences generated were amplified by PCR using Tag DNA polymerase (Fermentas, Belgium) with the gene specific primer pairs (listed in Table 1.), dNTPs, Tag polymerase, and buffer with Mg2+ concentration according to the manufacturer's instructions in a MyCycler™ thermal cycler system from Bio-Rad (Belgium). Amplification was performed under the following cycling conditions: 95 °C for 4 min (1 cycle), 95 °C for 1 min, 56 °C for 30 s, 72 °C for 2 min (35 cycles) with a final extension of 72 °C for 4 min (1 cycle).

PCR products yielded a strong single band were fractionated on 1 % agarose gel, and sequencing was conducted using BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Belgium). All sequencing primers were listed in Table 1. Reaction products were sequenced by Progenus (Belgium).

### 2.5.3. RACE-PCR

Based on the sequencing results, RACE-PCR technique was conducted to get complete sequence of the β-amylase from cDNA transcript. The first step was to obtain double-stranded cDNA from mRNA with SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Netherlands) according to the manufacturer’s instructions. Two nucleotide sequences were designed and synthesized (Table 1.) for 5’ and 3’ RACE-PCR and reactions were performed with Advantage® 2 PCR Kit and Advantage®-GC 2 PCR Kit (Clontech, Netherlands). RACE PCR products were resolved on an agarose gel and the appropriate band was then excised, purified and sequenced.

**2.5.4. Sequence analysis**

The sequences PCR fragments obtained were assembled and open reading frame (ORF) nucleotide sequences were translated into protein sequences using Vector NTI suite 11 (Informax, Inc 2008). Comparison to the other knows sequences available in public databases were performed by using Basic Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.gov>).

**Nucleotide sequence accession number**

The nucleotide data of sorghum β-amylase have been deposited in the GenBank database under the accession number GU017481.

**Table 1**. Specific primers used in this study

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Primer | Primer sequence | Description | T°m (°C) |
| BmyS-F | 5’-AACTGCCGTCCAGTGTA-3’ | Full length cDNA and sequencing | 54 |
| BmyS-R | 5’-AGCACGATGCCTTGTGAG-3’ | Full length cDNA and sequencing | 56 |
| BmyL-F | 5’-TCAACATCCCAATCCCACA-3’ | Full length cDNA and sequencing | 56 |
| BmyL-R | 5’-GGGAATGGCTCCAGTTTT-3’ | Full length cDNA and sequencing | 54 |
| Bmy537-R | 5’-CCATGTTCTCCCTGAAGC-3’ | Full length cDNA and sequencing | 56 |
| Bmy1755-R | 5’-ACCCACAAAGCCACAATTTT-3’ | Full length cDNA and sequencing | 56 |
| Bmy1401-F | 5’-GATGGTACGATATCCAAAA-3’ | 5’ RACE-PCR | 54 |
| Bmy70-F | 5’-ACTATGTCCAGGTCTACGT-3’ | 3’ RACE-PCR | 56 |

# 3. Results and Discussion

## 3.1. Enzyme (α and β-amylase) activities

As described previously by Ba et al [16] sorghum malt cv F-2-20 exhibited a large amount (312 U/g of dry weight) of α-amylase. However β-amylase activity was 5 times lower than α‑amylase activity (62 U/g of dry weight). Several articles has been studied the sorghum amylases activities.

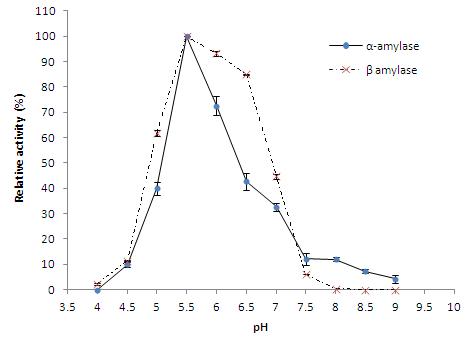
## 3.2. Effects of pH and temperature on α and β-amylases activities

Amylases activities are strongly influenced by the parameters pH (Fig. 1) and temperature (Fig. 2). The optimum pH for amylases activities was determined with pH range from pH 4.0 to pH 9.0. Maximum activity was detected with pH 5.5 as shown in Fig. 1 for α and β‑amylases. The α-amylase activity was highly decreased above pH 6.0. However, β‑amylase activity kept more than 80 % of the activity in pH range between 5.5 and 6.5. These values were comparable to those reported for cereal amylases [17,18,19,20].

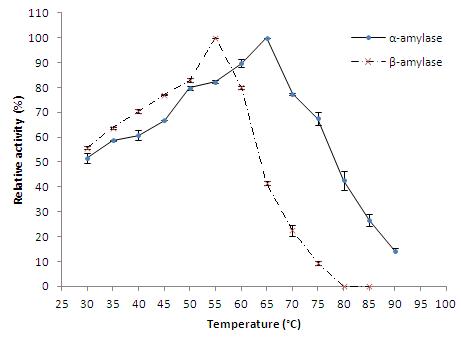
Enzymatic reaction is stimulated by an increase in temperature, and each enzyme has an optimum temperature at which the activity is maximum. In the present study, the effect of temperature on α and β-amylasesactivities was measured over a temperature range of 30-90 °C (Fig. 2). The optimum temperature for α and β-amylases activities was found to be at 65 and 55 °C respectively. Above 65 and 55 °C there was a decline in the activity of both amylases. However, at 75 °C, relative activity was about 65 % of the maximum value of α‑amylase activity. Nour and Yagoub [17] and Egwin and Oloyede [19] reported a maximum activity for α-amylase from sorghum malt at 70 °C while Kumar Singh and Rao [21] obtained an optimum activity at 60 °C. Curvelo-Santana et al. [22] characterised α and β-amylases from maize malt and optimum temperatures found were at 90 and 50 °C respectively. Literature reported that in general, the optimum temperature of cereal β-amylases ranges between 40 and 60 °C. Figure 3 showed the thermal inactivation of the amylases at pH 5.5 measured after 1 h at different temperatures. Results showed that α-amylase activity retained more than 85 % and 50 % activity for 1 hour when heated at 65 and 70 °C respectively and at 75 °C, the thermal inactivation was faster. This thermal stability is interesting for use of this enzyme in industrial processes. However, β‑amylase kept more than 60 % of the activity at 60 °C and lost activity at 65 °C. These results were similar to those found by Kumar et al. [18,21] on the thermal stability of α‑amylases from sorghum malt. They had observed that at 70 °C, half of the activity was lost; however, their incubation time (15 min) was different from that used in this study.

Enzymes activities are strongly influenced by the parameters pH and temperature. In this study the optimal pH was observed to be 5.5 as shown in Fig. 1 for α and β-amylases. Above pH 5.5, there was a continuous decrease in the α-amylase activity. However, β-amylase activity kept more than 80 % of the activity in pH range between 5.5 and 6.5. These values were comparable to those reported for cereal amylases [17,18,19,20].

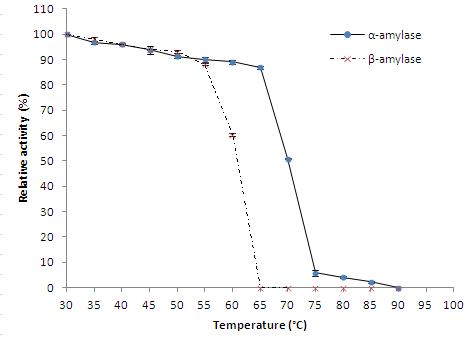
Enzymatic reaction is stimulated by an increase in temperature, and each enzyme has an optimum temperature at which the activity is maximal. In the present study, α and β-amylasesactivities were found to be highest at 65 °C and 55 °C respectively (Fig. 2). Above 65 and 55 °C there was a decline in the activity of both amylases. Nour and Yagoub [17] and Egwin and Oloyede [19] reported a maximum activity for α-amylase from sorghum malt at 70 °C while Kumar Singh and Rao [21] obtained a optimum activity at 60 °C. Curvelo-Santana et al. [22] characterised α and β-amylases from maize malt and optimum temperatures found were at 90 and 50 °C respectively. Literature reported that in general, the optimum temperature of cereal β-amylases ranges between 40 and 60 °C. Figure 3 showed the thermostability of the enzymes measured after 1 h at different temperatures. Results showed that α-amylase retained more than 90 % of the activity after 1 hour at 65 °C and decreased markedly after 75 °C. This thermal stability is interesting for use of this enzyme in industrial processes. However, β‑amylase kept more than 60 % of the activity at 60 °C and was denatured at 65 °C. These results were similar to those found by Kumar et al. [18,21] on the thermostability of α‑amylases from sorghum malt. They had observed that at 70 °C, half of the activity was lost; however, their incubation time (15 min) was different from that used in this study.



**Figure 1**. The effect of different pH on the activity of α and β-amylases from crude extract sorghum malt. Data are given as means ± S.D. (*n*=3). The activity was measured at 40 °C and expressed as a percentage of the maximum value obtained.



**Figure 2**. The effect of different temperatures on α and β-amylases activities of crude extract sorghum malt. Data are given as means ± S.D. (*n*=3). The activity was determined at various temperatures at pH 5.5 and the best temperature for activity was expressed as a percentage of the maximum value obtained.



**Figure 3**. Thermostability of α and β-amylases of crude extract sorghum malt. Data are given as means ± S.D. (*n*=3). The stability of enzymes was determined after incubating extracts 1 h at different temperatures and the activity was expressed as a percentage of the maximum value obtained.

## 3.3. The β-amylase sequence

The full length β-amylase sequence with the translation product of the ORF from sorghum was shown in figure 4. The nucleotide sequence of 1660 nucleotides contains an open reading frame (ORF), which started at nucleotide 21 (ATG) and ended at nucleotide 1444 (TAA). A comparison of the nucleotide sequence with those of other knows β-amylase gene revealed degrees of homology: 92 % with *Zea mays* 86 % with *Oryza sativa* and 85 % with *Hordeum vulgare*.

The amino acid sequence derived from nucleotide sequence gave a product of 474 amino acids. Wang et al. [11] reported a sequence of 488 amino acids for maize (*Zea mays*) β‑amylase while Clark, Hayes and Henson (2004 no published) obtained a sequence of 505 amino acids for tissue-ubiquitous β-amylase 2 (bmy2) of barley (*Hordeum vulgare subsp. Vulgare*). The comparison of the amino acid sequence with other known β-amylase protein sequence available in the Genbank database showed a high degree of homology. As other members of the Gramineae family (rice and maize), which contain the ubiquitous β-amylase, there are no C-terminal glycine repeats in sorghum β-amylase, while these are present in endosperm-specific β-amylase of barley [11,23].

The sequence contained the conserved regions which were important and involved in the β‑amylase activity. However, the amino acid sequence of sorghum β-amylase had difference compared to those of maize, barley and rice for some amino acids and even in the conserved regions of the enzyme (Figure 5). Role of some amino acids in β-amylase activity of soybean was studied by Kang et al. [24] and Totsuka and Fukazawa [25]. They reported that Glu186 and Glu380 which are strictly conserved among β-amylases involved in the active site of the enzyme in soybean. These amino acids were located in our sequence but around this region, Val101 was substituted by Gly for sorghum β-amylase. Kang et al. [24] described that the amino acids Val100 and val101 are located in soybean β-amylase in the middle of the flexible loop which plays an important role in both the binding of the substrate and the release of the maltose. They also reported that Thr342 residue (strictly conserved in all β-amylase and located at the active site pocket) is important because it stabilize the negatively charged deprotonated form of Glu186 before the release of the product. In the case of β-amylase from sorghum, this residue was noted at the position 343 (Figure 5). However, on the basis of the comparison of amino acids sequences from barley and maize, it could be shown that almost all amino acids residues noted in the conserved regions of the enzyme were presented in sorghum β-amylase.

1 M L P L D I I T V D N T F E K E D E T R A Q L

1 TACTATGTCCAGGTCTACGTCATGCTCCCGCTGGATATCATCACTGTCGACAACACGTTCGAGAAGGAGGACGAGACGAGGGCGCAACTC

31 K K L T A A G V D G V M I D V W W G L V E G K E P G V Y D W

91 AAGAAGCTGACGGCGGCCGGCGTCGATGGTGTCATGATCGACGTCTGGTGGGGGCTGGTGGAGGGGAAGGAGCCGGGGGTCTACGACTGG

61 S A Y K Q V F K L V Q E A G L K L Q A I M S C H Q C G G N V

181 AGCGCCTACAAGCAAGTCTTCAAGCTGGTGCAGGAGGCCGGGCTCAAGCTGCAAGCCATCATGTCGTGCCACCAGTGCGGTGGCAACGTC

91 G D V G N I P I P Q W V R D V G E D N P D I F Y T N R E G V

271 GGCGACGTCGGCAACATCCCGATCCCACAGTGGGTGCGGGACGTCGGCGAGGACAATCCCGACATCTTCTACACCAACCGGGAAGGGGTG

121 R N I E Y L T L G V D D Q P L F H G R T A I Q L Y A D Y M K

361 AGGAACATCGAGTATCTCACTCTTGGAGTAGACGACCAGCCTCTCTTCCATGGAAGAACTGCCATTCAGCTGTATGCTGATTACATGAAG

151 S F R E N M A D F L D A G V I V D I E V G L G P A G E M R Y

451 AGCTTCAGAGAGAACATGGCAGATTTCTTGGATGCTGGTGTCATTGTGGACATTGAGGTGGGACTTGGCCCTGCTGGTGAGATGAGGTAC

181 P S Y P Q S Q G W V Y P G I G E F I C Y D K Y L K A D F K A

541 CCCTCATATCCCCAAAGTCAGGGATGGGTGTACCCAGGCATTGGAGAATTCATATGCTATGATAAGTACCTGAAAGCAGACTTCAAAGCA

211 A A T A A G H P E W D L P D D A G E Y N D T P E K T Q F F A

631 GCAGCAACAGCGGCTGGGCATCCTGAGTGGGATTTGCCTGATGATGCTGGGGAGTACAATGACACTCCTGAGAAGACCCAGTTCTTTGCG

241 D N G T Y Q T D K G K X F L T W Y S N K L I K H G D K I L D

721 GATAATGGAACATACCAGACCGACAAGGGGAAGTTNTTCCTCACATGGTACTCCAACAAACTGATCAAGCACGGTGATAAGATCTTGGAT

271 E A N K V F L G C T V Q L A I K V S G I H W W Y T V P N H A

811 GAAGCAAACAAGGTCTTCCTGGGATGCACGGTACAGCTGGCAATCAAAGTCTCTGGCATACACTGGTGGTACACGGTTCCAAACCATGCA

301 A E L T A G Y Y N L D D R D G Y R T I A H M L T R H P A S M

901 GCTGAGCTCACTGCCGGATACTACAACTTAGATGACAGAGATGGCTACAGAACCATAGCACACATGCTAACAAGGCATCCTGCAAGCATG

331 N F T C A E M R D N E Q S S E A K S A P E E L V Q Q V L S A

991 AACTTCACTTGTGCTGAGATGAGGGACAATGAGCAGAGTTCAGAGGCGAAAAGTGCACCTGAGGAACTGGTTCAACAGGTGCTGAGTGCC

361 G W R E G L N L A C E N A L S R Y D A T A Y N T I L R N A R

1081 GGATGGAGAGAGGGCCTAAATCTGGCATGTGAAAATGCACTCAGTCGATATGATGCAACAGCTTACAACACCATCCTCAGGAATGCAAGA

391 P Q G I N R N G A P E H K L Y G F T Y L R V S D E L F Q G E

1171 CCCCAAGGCATCAACAGGAATGGCGCTCCAGAACACAAGTTGTATGGATTCACCTACCTCCGAGTATCTGATGAACTGTTCCAGGGAGAG

421 N Y T T F K T F V R R M H A N L D Y N P K V D P V A P L K R

1261 AACTACACCACTTTCAAAACTTTTGTCAGGAGAATGCATGCTAACCTGGATTATAACCCAAAGGTTGACCCAGTTGCACCATTGAAAAGA

451 S K P E I P I E E I L A V A Q P R W E P F P F E K N T D L P

1351 TCAAAGCCAGAGATACCAATTGAAGAAATCCTAGCAGTAGCACAGCCAAGATGGGAGCCATTTCCCTTCGAGAAGAACACAGACCTACCA

481 V -

1441 GTTTAAACACTCCAACGATGCAAGCTACAGGAAGGATCACAAGCCACTTCAAAATCAAGATAAACATGAAGTAAGCCTATTGTCGGGCAG

1531 TAGGCTAGTAACTAAATAAAATGCTCTGTGGAGCATATTATGGTCACGTATTGCACCAATAATCTTGTGCTGTTAAACATGAGGCTTGAT

1621 GATTTTCTGATGAAGTGTAATACCCTCGGCCTTCCTGTTG

**Figure 4.** Nucleotide sequence cDNA and deduced amino acid sequence of sorghum β-amylase.

1 50 100

ba\_AAX37357 MAGNMLANYV QVYVMLPLDV VSVDNKFEKG DEIRAQLKKL TEAGVDGVMI DVWWGLVEGK GPKAYDWSAY KQVFDLVHEA RLKLQAIMSF HQCGGNVGDV

Zmays\_NP\_001105496 MAGNALANYV QVYVMLPLDV ITVDNTFEKE DETRAQLKKL TEAGADGVMI DVWWGLVEGK EPGVYDWSAY RQVFKLVQEA GLKLQAIMSC HQCGGNVGDV

GU017481 MLPLDI ITVDNTFEKE DETRAQLKKL TAAGVDGVMI DVWWGLVEGK EPGVYDWSAY KQVFKLVQEA GLKLQAIMSC HQCGGNVGDV

\* \*\* \* \* \* \* \*\*\* \*\* \*\*

101 150 200

ba\_AAX37357 VNIPIPQWVR DVGATDPDIF YTNRRGTRNI EYLTLG..VD DQPLFHGRTA VQMYH.DYMA SFRENMKKFL DAGTIVDIEV GLGPAGEMRY PSYPQSQGWV

Zmays\_NP\_001105496 VNIPIPQWVR DVGKSNPDIF YTNRSGLTNI EYLTLG..VD DQPLFHGRTA IQLYA.DYMK SFRENMADFL DAGVVVDIEV GLGPAGEMRY PSYPQSQGWV

GU017481 GNIPIPQWVR DVGEDNPDIF YTNREGVRNI EYLTLG..VD DQPLFHGRTA IQLYA.DYMK SFRENMADFL DAGVIVDIEV GLGPAGEMRY PSYPQSQGWV

\* \*\* \* \* \* \* \* \* \*\* \*\*

201 250 300

Bb \_AAX37357 FPGIGEFICY DKYLEADFKA AAAKAGHPEW ELPDDAGEYN DTPEKTQFFK ENGTYLTEKG KFFLSWYSNK LIKHGDKILD EANKVFLGCR VQLAIKISGI

Zmays\_NP\_001105496 FPGVGEFICY DKYLQADFKA AAEEAGHPEW DLLDDAGTYN DTPEKTQFFA DNGTYQTDKG KFFLTWYSNK LIKHGDKILD EANKVFLGCK VQLAIKVSGI

GU017481 YPGIGEFICY DKYLKADFKA AATAAGHPEW DLPDDAGEYN DTPEKTQFFA DNGTYQTDKG KXFLTWYSNK LIKHGDKILD EANKVFLGCT VQLAIKVSGI

\* \*  \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

301 350 400

ba\_AAX37357 HWWYRVPNHA AELTAGYYNL DDRDGYRTIA RMLTRHHASM NFTCAEMRDS EQSEEAKSAP EELVQQVLSA GWREGLHVAC ENA**L**SRYDAT AYNTILRNAR

Zmays\_NP\_001105496 HWWYNVPNHA AELTAGYYNL DDRDGYRTIA HMLTRHRASM NFTCAEMRDS EQSSEAKSAP EELVQQVLSA GWREGLNLAC ENA**L**NRYDAT AYNTILRNAR

GU017481 HWWYTVPNHA AELTAGYYNL DDRDGYRTIA HMLTRHPASM NFTCAEMRDN EQSSEAKSAP EELVQQVLSA GWREGLNLAC ENA**L**SRYDAT AYNTILRNAR

\* \* \*  \* \*\* \*

401 450 500

**ba\_AAX37357** PKGINENGPP EHKLFGFTYL RLSNELLEGQ NYATFQTFVE KMHANLAHNP SVDPVAPLER SKPEMPIELI LKAAQPKLEP FPFDKNTDLP VKDHTDVVDE

Zmays\_NP\_001105496 PQGINKNGPP EHKLHGFTYL RVSDELFQEQ NYTTFKTFVR RMHANLDYNP NVDPVAPLER SKAEIPIEEI LEVAQPKLEP FPFDKDTDLP V.........

GU017481 PQGINRNGAP EHKLYGFTYL RVSDELFQGE NYTTFKTFVR RMHANLDYNP KVDPVAPLKR SKPEIPIEEI LAVAQPRWEP FPFEKNTDLP V.........

\* \* \* \*  \* \*\*\*\* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \*\* \*\* \* \*

501

ba\_AAX37357 ALLAPVAV

Zmays\_NP\_001105496 ........

GU017481 ........

**Figure 5.** Alignment deduced amino acid sequence of sorghum β-amylase with *Hordeum vulgare* (Genbank accession number: AAX37357), *Zea mays* (Genbank accession number NP\_001105496).The highly conserved regions of the enzyme were shaded gray and asterisks represented the difference in amino acids

# 4. Conclusion

The study in this paper showed some characteristics of sorghum amylases (α and β-amylases). Both enzymes observed the same optimum pH from the crude extract. The enzymes activity increased progressively from 25 to 65 °C and 25 to 55 °C for α and β-amylases respectively. α-amylase retained more than 80 % of its activity even at 70 °C for 1 h indicating thermostability of the enzyme while β-amylase lost 50 % of its activity at 60 °C for 1 h. β‑amylase is important to the malting and brewing industry unfortunately its activity is low in sorghum malt in contrast in barley malt. cDNA amplified from mRNA isolated from germinating sorghum seeds showed high homology with ubiquitous β-amylase of barley and maize β-amylase. An amino acid sequence alignment of sorghum β-amylase with that of above mentioned clearly showed that the amino acids residues predicted to associate with the conserved regions and the catalytic site are present in sorghum β-amylase. Future works will include cloning the cDNA encoding sorghum β-amylase, expression and association analysis.

**Acknowledgments**

The authors wish to express their sincere thanks to Wallonia-Brussels International for facilitating this research by providing financial support.

# References

[1] Aiyer PV. Amylases and their applications. Afr. J. Biotechnol. 2005; 4: 1525-1529.

[2] Dicko MH, Hilhorst R, Traore AS. Indigenous west African plants as novel sources of polysaccharide degrading enzymes: application in the reduction of the viscosity of cereal porridges. Afr.J. Biotechnol*.* 2005; 4: 1095-1104.

[3] Sine JP. Applications agroalimentaires et industrielles In: Enzymologie et applications. Ellipses Edition, 2010 ; p.289-295.

[4] Chi MC, Chen YH, Wu TJ, Lo HF, Lin LL. Engineering of a truncated α-amylase of *Bacillus sp*. Starin TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. J. Biosc. Bioeng. 2010; 109: 531-538.

[5] Nanmori T, Nagai M, Shimizu Y, Shinke R, Mikami B. Cloning of the β-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 623-627.

[6] Van Damme EJ, Hu J, Barre H, Hause B, Baggerman G, Rouge P, Peumans WJ. Purification, characterization , immunolocalization and structural analysis of the abundant cytoplasmic β-amylase from *Calystegia sepium* (hedge bindweed) rhizomes. Eur. J. Biochem. 2001, 268:6263-6273.

[7] Ozcan BD and Ozcan N. Cloning and expression of thermostable β-amylase gene of *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* in Escherichia coli and *Bacillus subtilis* BR151. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2010; 16:1011-1016.

[8] Yoshigi N, Okada Y, Sahara H, Koshino S. PCR cloning and sequencing of the β-amylase cDNA from barley. J. Biomol. 1994; 115: 47-51.

[9] Daussant J. Polymorphisme et diversité probable des systèmes isoenzymatiques de la β‑amylase chez les céréales: implications en malterie-brasserie. Cerevisia and Biotechnology 1994; 19:18-21.

[10]. Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, Francisco M, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith AM. β-amylase4, a non catalytic protein required for starch breakdown, act upstream of three active β-amylase in Arabidopsis chloroplasts. Plant Cell. 2008; 20:1040-1058.

[11] Wang SM, Lue WL, Wu SY, Huang HW, Chen J. Characterization of a maize β‑amylase cDNA clone and its expression during seed germination. Plant Physiol. 1997; 113: 403-409.

[12] Sadowski J, Rorat T, Cooke R, Delseny M. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding ubiquitous β-amylase in rye (*Secale cereale* L.). Plant Physiol. 1993; 102: 315-316.

[13] Vinje MA, Willis DK, Duke SH, Henson CA. Differential expression of two β-amylase genes (*Bmy1* and *Bmy2*) in developing and mature barley grain. Planta 2011; 233: 1001-1010.

[14] Kreis M, Williamson B, Buxton B, Pywell J, Hejgaard J, Swendsen I. Primary structure and differential expression of β-amylase in normal and mutant barleys. Eur. J. Biochem. 1987; 169: 517-525.

[15] Jung W, Skadsen RW, Peterson DM. Characterization of a novel barley β-amylase gene expressed only during early grain development. Seed Sci. Res. 2001; 11: 325-333.

[16] Ba K, Tine E, Cissé N, Destain J, Thonart P. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2010;214**:** 131-139.

[17] Nour MEME, Yagoub SO. Partial purification and characterization of α and β-amylase from *Sorghum bicolor* cv. (Feterita) malt. J. Appl. Sci. 2010; 10: 1314-1319.

[18] Kumar RSS, Vishwanath KS, Singh SA, Rao AGA. Entrapment of α-amylases in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. Process Biochem., 2006; 41: 2282-2288.

[19] Egwin EE, Oloyede O B. Comparison of α-amylase activity in sprouting Nigeria cereal. Biokemistri ( Publication of the Nigeria Society for Experimental Biology), 2006; 18: 15-20.

[20] Nirmala M, Muralikrishna G. Three a-amylases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15)-purification and partial characterization. Phytochemistry 2003; 62: 21-30.

[21] Kumar RSS, Singh SA, Rao AGA. Thermal stability of α-amylase from malted jowar (*Sorghum bicolor*). J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 6883-6888.

[22] Curvelo-Santana JC, Ferreira GB, Biazus JPM, Souza RR, Tambourgi EB. Biochemistry characterization of α- and β-amylases from *Zea mays* malt and statistical analysis approch of the degradation of manioc starch. J. Food Process Eng. 2008; 31: 694-710.

[23] Rorat T, Sadowski J, Grellet F, Daussant J, Delseny M. Characterization of cDNA clones for rye endosperm-specific β-amylase and analysis of β-amylase deficiency in rye mutant lines. Theor. Appl. Genet. 1991; 83: 257-263.

[24] Kang YN, Adachi M, Utsumi S, Mikami B. The Roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean β-amylase. J. Mol. Biol. 2004; 339: 1129-1140.

[25] Totsuka A, Fukazawa C. Functional analysis of Glu380 and Leu383 of soybean β‑amylase, a proposed action mechanism. Eur. J. Biochem. 1996; 240: 655-659.

# Chapitre IV

*Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt amylases for dextrins production*

Dans le chapitre précédent (Chapitre III), les conditions optimales de fonctionnement des α et β-amylases du malt de sorgho ont été déterminées.

Les travaux décrits dans ce chapitre (Chapitre IV) se sont orientés dans l’application des amylases du malt de sorgho sur des amidons (amidon de maïs et amidon de blé) et des farines (farine de blé et farine de manioc). L’objectif recherché est d’arriver à produire des maltodextrines avec ces amylases. Des tests d’hydrolyse en fioles ont été réalisés sur une période de 6 heures à pH 5,5 et à la température de 65 °C avec différentes concentrations de malt de sorgho. Par ailleurs, l’influence du calcium sur le rendement de l’hydrolyse a été établie.

Les dextroses équivalents (DE) des hydrolysats obtenus ont été établis en se basant sur les quantités de glucose formées en cours d’hydrolyse. Des analyses chimiques ont été faites sur les hydrolysats pour déterminer et quantifier les différents oligosaccharides formés.

Publication IV:

# Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt for dextrins production

Khady Ba1, 3\*, Mario Aguedo2, Emmanuel Tine3, Michel Paquot2, Jacqueline Destain1, Philippe Thonart1

1 University of Liege - Gembloux Agro-Bio Tech, department of Bio-Industry, Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgium.

2 University of Liege - Gembloux Agro-Bio Tech, department of Industrial Biological Chemistry Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux Belgium

3 University Cheikh Anta Diop of Dakar, High School Polytechnic of Dakar, Laboratory of Applied Microbiology and Industrial Engineering, BP 5085 Dakar Fann, Senegal.

# Abstract

Corn and wheat starches as well as wheat and cassava flours were hydrolyzed using sorghum malt at 65°C for 6 hours. Sorghum malt was prepared by malting white sorghum for 3 days at 30°C and amylases activities were determined. The dextrose equivalent (DE) was investigated under 3 sorghum malt and calcium chloride concentrations. Wheat flour presented the highest DE values and cassava flour had the highest hydrolysis yield. Different dextrins were produced in a pilot plant and were analyzed by HPSEC and HPAEC-PAD for their molecular weight distribution and oligosaccharides composition respectively. The results indicated that oligosaccharides with broad molecular weight distribution were present in the dextrins produced and that the proportion of maltose was very high.

**Keywords**: Sorghum malt; hydrolysis; dextrose equivalent; dextrins; molecular weight; oligosaccharides

# 1. Introduction

Starch is composed of two polysaccharides: amylose, composed of linear chains of glucose linked by α-1,4 bonds, and amylopectin (α-1,6 bonds) which is the major macromolecular component and responsible for the architecture of the starch granules [1]. The physical properties of starch are influenced by the molecular structures of both amylose and amylopectin [2]. Starches from various botanical origins differ in amylose and amylopectin content, chain length distribution and molecular weight. Starch hydrolysis products are widely used in food industry for their functional properties; moreover practical applications have been found in pharmaceutics, cosmetics, detergents, textiles, paper and paints [3]. Starch hydrolysates with dextrose equivalent (DE) below 20 are referred to as maltodextrins, while those with DE above 20 are referred to as maltose syrup or glucose syrups [4]. Starch hydrolysates with the same DE can have different properties and molecular compositions depending on the starch and how it is digested [5].

The hydrolysis of starch can be done enzymatically or through acid-mediated processes. Amylases are digestive enzymes which hydrolyze glycosidic bonds of starch to glucose, maltose, maltotriose and dextrin. There are various amylases with different properties. α‑Amylase (E.C. 3.2.1.1) catalyzes the cleavage of internal α-1,4 bonds of starch, releasing oligosaccharides as main products. Β-Amylase (E.C. 3.2.1.2) releases low molar mass sugars, i.e. glucose and maltose. Pullulanase (E.C. 3.2.1.41) is a debranching amylase which catalyzes the hydrolysis of α-1,6 bonds present in amylopectin. Other amylases are also important in starch hydrolysis, such as α-glucosidase (E.C. 3.2.1.20) and glucoamylase (E.C. 3.2.1.3). Amylases act synergistically in the hydrolysis of starch [6]. Amylases can be produced by a wide variety of organisms, bacteria, fungi, animals and plants. Starch hydrolysis products can be produced industrially with the use of enzymes from microorganisms; however, malted cereals can also be sources of amylases. To our knowledge the hydrolysis of starch has not yet been done with sorghum malt (SM) amylases.

Ayernor et al. [7] have produced glucose syrup from cassava flour by combining rice malt and amyloglucosidase from *Aspergillus niger.* The depolymerisation of starch was performed in two steps (liquefaction and saccharification). During the liquefaction process, α-amylases convert starch into dextrins and small amounts of oligosaccharides. Some sorghum varieties exhibit good amylase activities especially α-amylase activity [8,9] . The hydrolytic process and the use of efficient low-cost amylolytic enzymes are important factors to be considered for the production of dextrins. The objectives of the present work were to study the possibility of producing dextrins by using SM on starches and flours and to characterize the oligosaccharides obtained.

# 2. Materials and methods

## 2.1. Materials

Corn (*Zea mays*) starch was obtained from Roquette Frères (Lestream, France); wheat (*Triticum aestivum*) starch was provided by THT s.a. (Gembloux, Belgium); wheat flour was kindly donated by Belourthe (Hamoir, Belgium) and cassava (*Mannihot esculenta*) flour was purchased from the Senegalese market. All chemicals used were analytical grade.

## 2.2. Amylases production and assay

Amylases were produced by malting sorghum seeds in our laboratory [10].The activity of three amylases was measured in the malt. Amylases activities were determined using specific kits: AMYLAZYME (Azurin-crosslinked amylose = AZCL-Amylose) (Megazyme, Ireland) was used for α-amylase (312.6 U/g), BETAMYL (Megazyme, Ireland) for β-amylase (62.7 U/g) and LIMIT-DEXTRIZYME (Megazyme, Ireland) for pullulanase (1.3 U/g). The activities of α- and β-amylases were expressed in units Ceralpha corresponding to the amount of enzyme required to liberate one micromole of p-nitrophenol per minute per gram of dry matter at 40 °C. For pullulanase, a unit of activity is defined as the amount of enzyme required to liberate one micromole of glucose from pullulan per minute per gram of dry matter at 40 °C.

## 2.3. Chemical composition of starches and flours

Moisture and ash contents were determined by AOAC Methods 934.01 and 942.05, respectively [11]. Starch content in flours was estimated by Ewers’ polarimetric method using hydrochloric acid [12]. The total nitrogen (TN) content of starch was determined by the Kjeldahl method and the protein contents were calculated by TN × 6.25.

## 2.4. Enzyme hydrolysis

Solutions with 30 % of corn starch, wheat starch and wheat flour and a solution at 10 % of cassava flour were hydrolysed using different concentrations of SM. The hydrolyses were done in a thermoregulated bath with stirring at 65 °C and pH 5.5 ; chloride calcium was added in amounts of 60, 80 and 100 ppm as α-amylase activator. The pH was adjusted with lactic acid or potassium hydroxide. The hydrolysis was carried out for 6 hours. The yields of released sugar were measured as reducing sugars by Miller’s method [13]. Every 30 min, one fraction was removed from the water bath, centrifuged during 20 min at 10000 rpm and analysed.

## 2.5. Soluble solids

The yield of hydrolysis was determined by soluble solids determination (°BRIX) with an ATAGO® refractometer (Tokyo, Japan).

## 2.6. Determination of dextrose equivalent

The dextrose equivalent (DE) during hydrolysis was determined by the ratio of reducing sugar in the final product and the total soluble solids.

Based on the results obtained in the thermoregulated bath, the process was accomplished on a pilot plant scale and three different DE values were produced and analyzed for each substrate.

## 2.7. Chromatography

High Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC) was performed with a Waters 2690 Alliance chromatograph coupled to a Waters 2410 RI detector. The column used was a TSK GPWxl (300 × 7.8 mm I.D.) (Tosoh, Tokyo, Japan). The column temperature was maintained at 30 °C and the RI detector was held at 40 °C. The mobile phase was an aqueous solution of 50 mmol/L sodium nitrate (NaNO3) and 0.05 % sodium azide (NaN3). The flow rate was 0.7 mL/min and the injection volume was 100 µL. Dextran standards of 1,270, 5,220, 11,600, 23,800 and 48,600 Da (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were used. Samples solutions were diluted in distilled water to 2 mg/mL and filtered through 0.45 µm syringe filters prior to injection. The curves were processed and the peaks were integrated using Millennium®32 software (Waters)

High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) was performed with a Dionex ICS-3000 (Sunnyvale, CA, USA) equipped with an ED 3000 pulsed amperometric detector. The column used was a CarboPac PA 100 ICF-3000 model (250 × 4 mm I.D.) (Sunnyvale, CA, USA) equipped with a guard column CarboPac PA 100 (40 × 4 mm I.D.). The mobile phases consisted of 100 mmol/L sodium hydroxide (eluent A), 100 mmol/L sodium hydroxide containing 600 mmol/L sodium acetate (eluent B) and 500 mmol/L sodium hydroxide (eluent C). The elution program was run at 35 °C as follows: 100 % eluent A during 10 min, then a progressive gradient during 50 min to reach 25 % eluent B/75 % eluent A, then a 10 min gradient until 50 % A/50 % B, then 100 % eluent C during 8 min and finally 100 % A during 12 min. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 25 µL. Sugars with degree of polymerization (DP) from 1 to 5 (glucose DP1; maltose DP2; isomaltose DP2; maltotriose DP3; maltotetraose DP4 and maltopentaose DP5) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were used to identify the chromatographic peaks. A standard solution containing all the compounds at 2 mg/mL was prepared in distilled water and this solution was then diluted from 100 to 10 ppm. 100 ppm solutions of dextrin samples were prepared and analyzed.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Compositions of the starches and flours

The chemical composition of the starches and flours are presented in Table 1. The moisture contents of corn starch (13.8 %), wheat starch (12.5 %), wheat flour (11.5 %) and cassava flour (10.4 %) were in line with published values [14,15,16,17,18]. Corn and wheat starches had similar protein contents (0.05 %) and low ash contents. Cassava flour contained noticeably higher amounts of starch (81.4 %) and ash (1.3 %) than wheat flour, however the protein content was higher in wheat flour. These values were comparable to those reported by Naguleswaran et al. [19]in wheat, Charoenkul et al. [20] in cassava, Charles et al*.* [21] in wheat and cassava and Aryee et al.[22] in 31 varieties of cassava.

**Table 1.** Composition of starches (corn and wheat) and flours (wheat and cassava) (% d.b)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Substrates** | **Moisture** | **Starch** | **Protein** | **Ash** |
| Corn starch | 13.79 ± 0.04 | ND | 0.05 ± 0.014 | 0.05 ± 0.003 |
| Wheat starch | 12.45 ± 0.03 | ND | 0.05 ± 0.007 | 0.15 ± 0.036 |
| Wheat flour | 11.49 ± 0.01 | 74.65 ± 0.42 | 3.14 ± 0.092 | 0.64 ± 0.033 |
| Cassava flour | 10.35 ± 0.05 | 81.36 ± 0.10 | 0.96 ± 0.021 | 1.33 ± 0.017 |

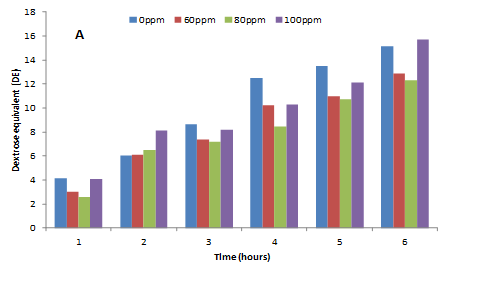
Values are percentage of mean ± standard deviation in dry weight basis

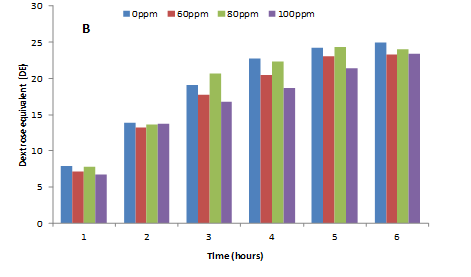
ND: not determined

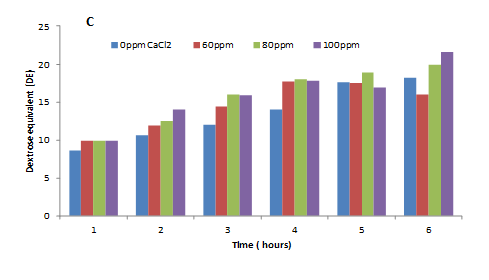
## 3.2. Effect of sorghum malt concentration and CaCl2 concentration on hydrolysis

Corn and wheat starches, as well as wheat and cassava flours were hydrolyzed by sorghum amylases at 65 °C for 6 h and the degree of hydrolysis was followed by measuring the DE. The effect of SM and CaCl2 concentrations on the reactions is presented in Fig. 1 to 4. Corn and wheat starches (30 % w/v) were hydrolyzed with 0.17 %, 0.25 % and 0.33 % (w/w) SM and 0, 60, 80 and 100 ppm of CaCl2. As it can be seen in Fig. 1,after one hour of hydrolysis, corn starch without Ca2+ produced DE of 4.2, 7.9 and 8.6 at 0.17, 0.25 and 0.33 % SM respectively and a progressive increase in DE was observed with time (Fig. 1). At the end of the hydrolysis, maximum DE of 15.1, 25.0, and 18.2 were obtained. These values can be compared to those obtained by Sadeghi et al. [23] by hydrolyzing corn starch with α-amylase Termamyl 2-x® (180-240 KNU/g): after 5 h of hydrolysis at 65 °C with enzyme concentrations of 0.2, 0.25 and 0.3 ml per kg of starch, DE varies from 10.9 to 16.15 and 26.7 respectively. The addition of Ca2+ at concentrations of 0.17 and 0.25 % SM did not give DE values higher than those obtained without Ca2+ except for 0.33 % SM concentration, for which the DE values were higher. After one hour of hydrolysis of wheat starch (Fig. 2), DE values were 2.7, 3.7 and 7.6 with the three increasing concentrations of SM respectively. Thereafter, DE increased to 17.3, 12.2 and 20.2 at 6 h reaction time. However, at 0.25 % malt concentration, wheat starch gave low DE values compared to those obtained at 0.17 and 0.33 % SM. The effect of Ca2+ on the reaction was not significant. At a concentration of 30 % (w/v), wheat flour was hydrolyzed with 0.03, 0.05 and 0.07 % (w/w) of SM. The products obtained after one hour of reaction had DE values of 10.6, 17.3 and 17.9 respectively for the three concentrations of SM and without Ca2+ (Fig. 3). When Ca2+ was added at 60, 80 and 100 ppm, DE values of the products increased and the highest values were obtained with 80 ppm of Ca2+. At 0.05 and 0.07 % of SM, wheat flour yielded after three hours syrup with DE values higher than 20 (Fig. 3b and 3c). For reasons of viscosity, cassava flour was hydrolyzed only at a concentration of 15 % with three concentrations of SM (0.13, 0.23 and 0.33 % (w/w)). This hydrolysis yielded DE values of 4.8, 9.4 and 6.2 after one hour of reaction (Fig. 4). DE values increased progressively with reaction time and reached 15.0, 14.9 and 20.1 respectively at 0.13, 0.23 and 0.33 % of malt and without Ca2+. High DE values were also obtained in the presence of Ca2+. Ayernor et al. [7] reported that cassava flour has advantages compared to other flours such as a complete and easier hydrolysis. They found that cassava flour (10 % w/v) hydrolyzed with rice malt extract gives sugar syrup within 2 h (with DE equal to 43.6). According to Chen et al. [24]most cassava granules are in truncated form and that truncatures are weak points in the granule structure that lead to increased susceptibility to enzymatic attack.

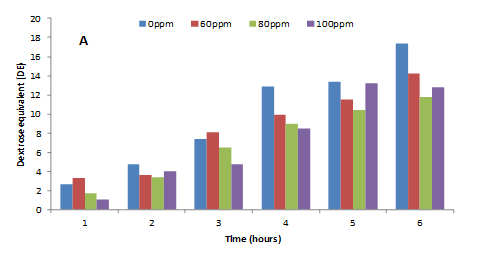
Different calcium concentrations were added to determine the impact of calcium ions on amylase activity. The role of calcium in maintaining catalytic activity and structural of α‑amylase is not new and in majority of cases they are largely influenced by variation of calcium level. However, there are certain α-amylases which catalyze the reaction independent of calcium ion concentration [25]. In this study a lower impact of calcium on the process was observed.

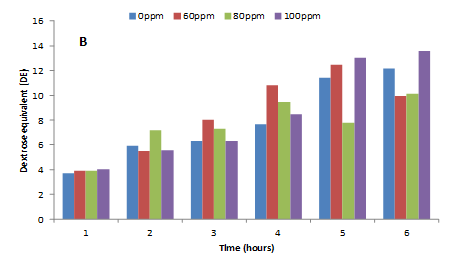
****

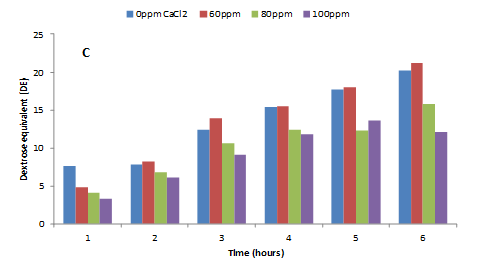
****

****

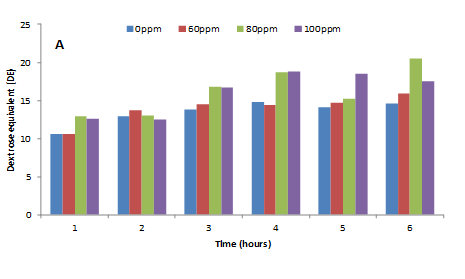
**Figure 1.** Dextrose equivalent (DE) of corn starch hydrolyzed with SM, in presence of 0, 60, 80 and 100 ppm CaCl2 and malt concentrations of 0.17 % (A), 0.25 % (B) and 0.33 % (C).

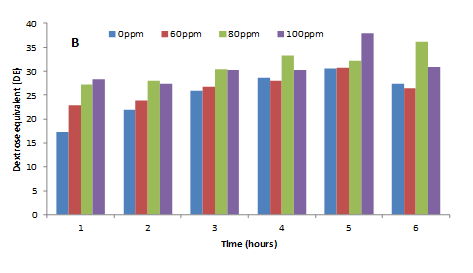
****

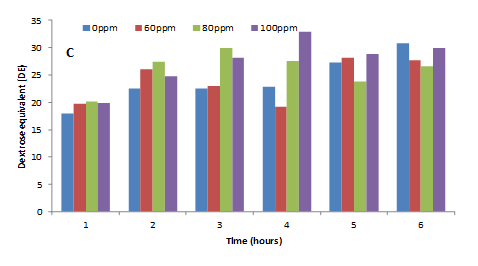
****

****

**Figure 2.** Dextrose equivalent (DE) of wheat starch hydrolyzed with SM, in presence of 0, 60, 80 and 100 ppm CaCl2 and malt concentrations of 0.17 % (A), 0.25 % (B) and 0.33 % (C).

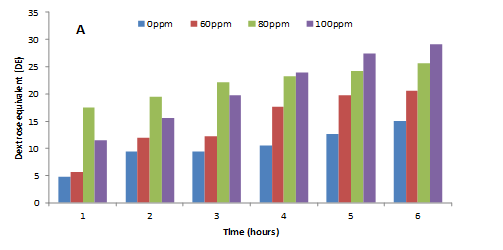
****

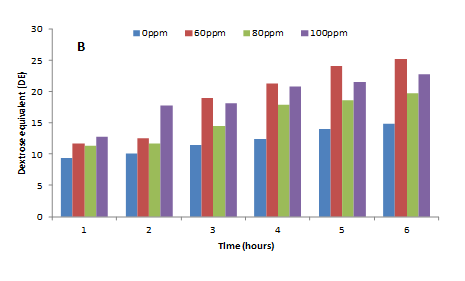
****

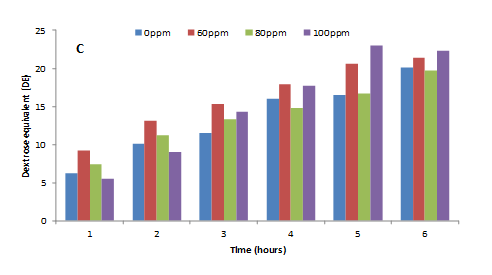
****

**Figure 3.** Dextrose equivalent (DE) of wheat flour hydrolyzed with SM, in presence of 0, 60, 80 and 100 ppm CaCl2 and malt concentrations of 0.03 % (A), 0.05 % (B) and 0.07 % (C).

**C**

****

****

****

**Figure 4.** Dextrose equivalent (DE) of cassava flour hydrolyzed with SM, in presence of 0, 60, 80 and 100 ppm CaCl2 and malt concentrations of 0.13 % (A), 0.23 % (B) and 0.33 % (C).

The hydrolysis yield can be expressed by DE and by soluble solids determination [26,27]. Table 2 shows the hydrolysis yield by measurement of the soluble solids suspension by refractometry. During hydrolysis, cassava flour gave the highest yields with 69.3 % after one hour and 76 % at the end of the reaction; whereas the lowest yields were obtained with corn starch. Moore et al. [27] reported final yields of 76.3 % for cassava starch and 74.8 % for corn starch after 120 min of hydrolysis with α-amylase Termamyl-120L®. They explained the higher yield obtained with cassava starch by its high swelling power.

**Table 2.** Hydrolysis yieldsin presence of three different malt contents at different hydrolysis times.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Substrates** | **Malt contents** | **Hydrolysis time (hours)** | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  | **Hydrolysis yields (%)** | | | | |  |
| Corn starch (30 % w/v) | 0.17 % | 40.66 | 44.00 | 46.00 | 46.00 | 48.66 | 50.66 |
| 0.25 % | 54.66 | 56.66 | 58.00 | 60.00 | 61.66 | 64.00 |
| 0.33 % | 46.66 | 50.66 | 56.66 | 58.00 | 60.00 | 59.33 |
| Wheat starch (30 % w/v) | 0.17 % | 55.33 | 61.33 | 60,66 | 62.66 | 64.00 | 66.00 |
| 0.25 % | 61.33 | 65.33 | 66.00 | 66.66 | 68.00 | 68.66 |
| 0.33 % | 60.00 | 65.33 | 66.00 | 66.66 | 68.00 | 65.33 |
| Wheat flour (30 % w/v) | 0.03 % | 50.66 | 56.00 | 54.00 | 54.66 | 53.33 | 54.66 |
| 0.05 % | 59.33 | 62.00 | 63.00 | 63.33 | 65.33 | 66.66 |
| 0.07 % | 57.33 | 60.00 | 60.66 | 62.66 | 65.33 | 66.00 |
| Cassava flour (15 % w/v) | 0.13% | 69.33 | 73.33 | 74.66 | 74.66 | 76.00 | 76.00 |
| 0.23 % | 65.33 | 66.66 | 66.66 | 73.33 | 76.00 | 72.00 |
| 0.33 % | 66.66 | 68.00 | 72.00 | 73.33 | 73.33 | 76.00 |

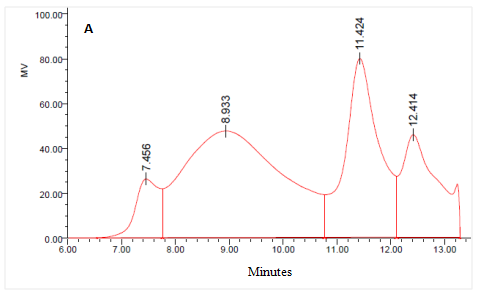
## 3.3. Characterization of the hydrolyzed products

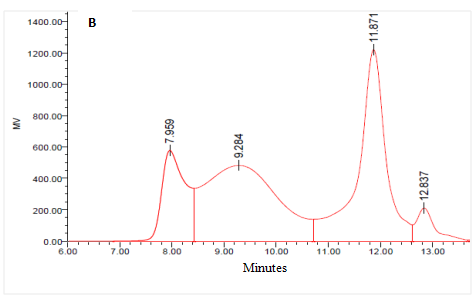
## 3.3.1 Molecular weight distribution

Molecular weight distributions of dextrins were determined by HPSEC/RI detection in order to determine the impact of sorghum amylases on the tested substrates. The profiles of the hydrolyzed products are displayed in Fig. 5 to 8: HPSEC separates compounds according to size with larger polymers eluting first. The elution profiles were divided into four fractions (F1 to F4) and the proportion of each one was determined (Table 3). In Fraction 1 (F1), DP ranged from 704 to 1433 for corn dextrins, from 694 to 1380 for wheat dextrins, from 694 to 1412 for wheat flour dextrins, and from 724 to 1476 for cassava dextrins. F2 had DP values lower than in F1, ranging from 108 to 245 for corn dextrins, from 120 to 203 for wheat dextrins, from 91 to 342 for wheat flour dextrins and from 114 to 330 for cassava dextrins. DP values in F3 were almost the same in samples and ranged from 7 to 12 for corn dextrins, from 7 to 13 for wheat dextrins and cassava dextrins, except for wheat flour in which they were slightly higher 7 to 17. However, in F4, DP values were the same and be around 3. The proportions of each fraction in the samples changed according to DE value and type of substrate. The amount of high molecular weight compounds decreased with the hydrolysis in all dextrins and the mean DP decreased with increasing DE. The profiles observed here differ from those observed by Sun et al. [3], who found that dextrins produced by enzymatic hydrolysis of corn starch by two α-amylases (the common neutral α-amylase and a thermostable α-amylase) showed two fractions.

Table 3. Retention time, area and calculated molecular weight for the four peaks determined in the different dextrins by HPSEC/RI analysis. F = Number of peak; Area = peak surface; Mw = peak average molecular weight calculated from the dextran standards curves; DP = degree of polymerization (DP = Mw/162)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Fraction |  | **Corn dextrins** | | | **Wheat dextrins** | | | **Wheat flour dextrins** | | | **Cassava flour dextrins** | | |
| DE | 8 | 14 | 26 | 15 | 18 | 29 | 26 | 31 | 45 | 10 | 15 | 28 |
| F1 | RT (min) | 7.46 | 7.96 | 8.05 | 7.49 | 7.99 | 8.06 | 7.47 | 7.93 | 7.87 | 7.43 | 8.03 | 7.37 |
| Area (%) | 6.41 | 15.81 | 1.05 | 3.90 | 6.61 | 2.62 | 5.31 | 1.22 | 1.14 | 12.50 | 4.74 | 0.27 |
| Mw (Da) | 232152 | 127311 | 114199 | 223713 | 122244 | 112574 | 228848 | 131483 | 112574 | 239188 | 117380 | 202008 |
| DP | 1433.04 | 785.87 | 704.94 | 1380.95 | 754.60 | 694.91 | 1412.65 | 811.63 | 694.91 | 1476.47 | 724.57 | 1246.97 |
| F2 | RT (min) | 8.93 | 9.28 | 9.48 | 9.09 | 9.43 | 9.53 | 8.66 | 9.76 | 9.79 | 8.68 | 9.57 | 10.03 |
| Area (%) | 48.72 | 40.74 | 42.87 | 53.93 | 45.52 | 44.72 | 38.89 | 29.40 | 29.64 | 50.72 | 50.03 | 37.73 |
| Mw (Da) | 39779 | 26157 | 17573 | 32938 | 21971 | 19497 | 55443 | 14814 | 19497 | 53556 | 18566 | 33091 |
| DP | 245.55 | 161.46 | 108.48 | 203.32 | 135.63 | 120.36 | 342.24 | 91.45 | 120.36 | 330.59 | 114.61 | 204.27 |
| F3 | RT (min) | 11.42 | 11.87 | 11.86 | 11.38 | 11.85 | 11.88 | 11.15 | 11.48 | 11.49 | 11.39 | 11.85 | 11.91 |
| Area (%) | 27.94 | 38.91 | 44.58 | 27.56 | 39.06 | 36.74 | 4.15 | 5.27 | 5.34 | 24.73 | 31.67 | 34.29 |
| Mw (Da) | 2030 | 1190 | 1170 | 2139 | 1225 | 1172 | 2813 | 1901 | 1172 | 2106 | 1223 | 1147 |
| DP | 12.53 | 7,35 | 7.32 | 13.21 | 7.56 | 7.24 | 17.36 | 11.74 | 7.24 | 13.01 | 7.55 | 7.08 |
| F4 | RT (min) | 12.41 | 12.83 | 12.84 | 12.45 | 12.84 | 12.84 | 12.43 | 12.84 | 12.84 | 12.42 | 12.86 | 12.84 |
| Area (%) | 16.92 | 4.55 | 11.49 | 14.61 | 7.50 | 15.91 | 51.64 | 64.11 | 63.87 | 12.05 | 13.56 | 27.71 |
| Mw (Da) | 622 | 375 | 375 | 595 | 375 | 375 | 614 | 372 | 375 | 620 | 364 | 373 |
| DP | 3.84 | 2.32 | 2.32 | 3.68 | 2.32 | 2.32 | 3.79 | 2.30 | 2.32 | 3.83 | 2.25 | 2.31 |

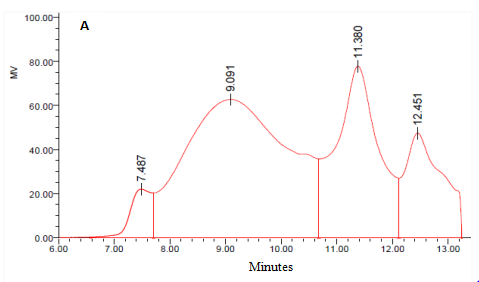


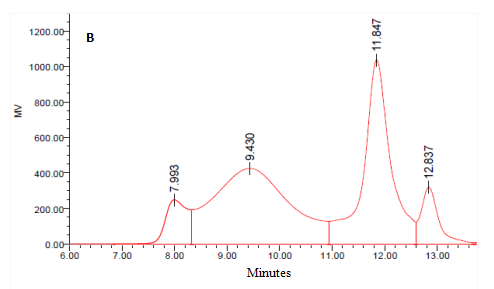


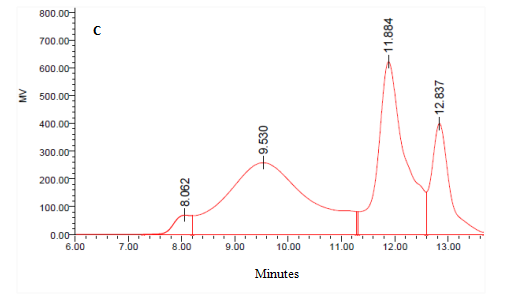


**Figure 5.** Molecular weight distribution of corn dextrins: DE8 (A), DE15 (B) and DE26 (C).

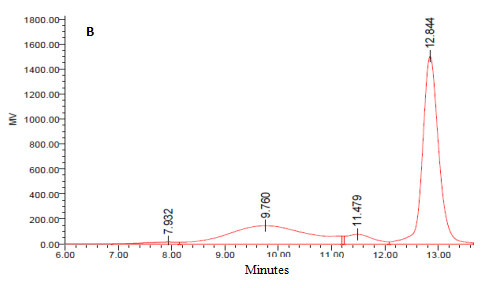
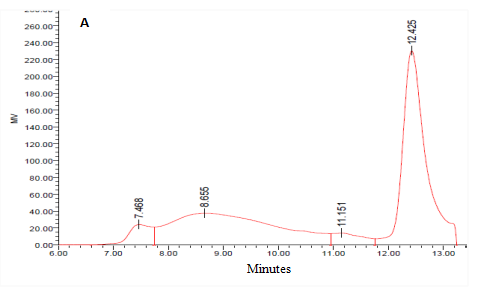
Minutes

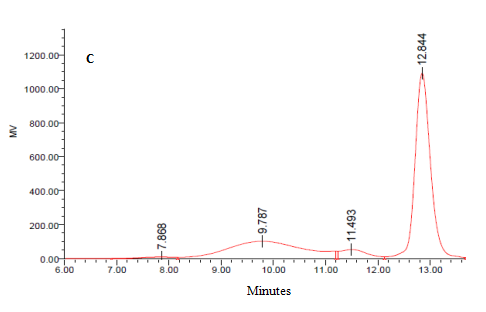
****

****

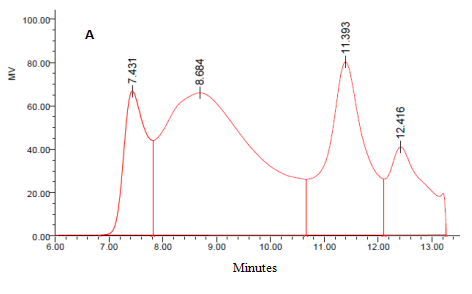
****

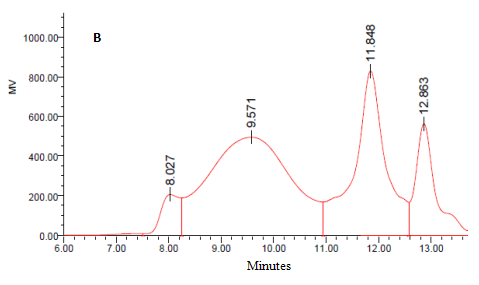
**Figure 6.** Molecular weight distribution of wheat dextrins: DE15 (A), DE18 (B) and DE29 (C).

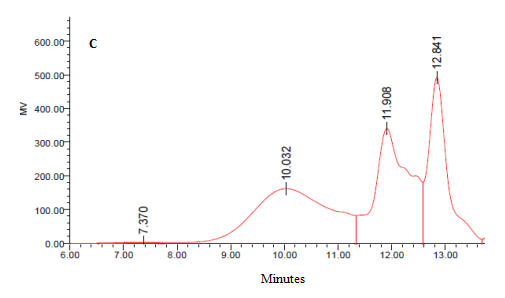
****

****

**Figure 7**. Molecular weight distribution of wheat flour dextrins: DE26 (A), DE31 (B) and DE45 (C).

****

****

****

**Figure 8.** Molecular weight distribution of cassava flour dextrins: DE10 (A), DE15 (B) and DE28 (C).

### 3.3.2. Oligosaccharides composition

The composition in oligosaccharides of the dextrins produced was characterized by HPAEC‑PAD. Table 4 shows the amounts of oligosaccharides in dextrins produced from the different substrates. In the dextrins from corn and wheat starches, the content of maltose was higher than that of glucose and isomaltose and the content of maltopentaose was higher than that of maltotetraose. Wheat flour hydrolyzed with the lowest concentration of SM exhibited dextrins with the highest DE values and composed mainly of maltose. This can be explained by the presence of amylases in wheat flour which in combination with amylases of SM resulted in rapid hydrolysis of the gelatinized starch. Cassava flour (15 % w/v in solution) was hydrolyzed with the same SM concentration that corn and wheat starches. The dextrins produced contained more maltose, maltotetraose and maltopentaose than glucose and isomaltose (Table 4). It is well known that cereal malts are rich in enzymes involved in starch hydrolysis [7]. The largest proportion of maltose in all samples may result from the action of α-amylase, β-amylase and pullulanase. Pullulanase is capable of hydrolyzing α-1🡪6 glycoside bonds, releasing small linear chains from branched starch and the synergetic action of pullulanase and other amylases can effectively produce small saccharides [28]. The isomaltose detected in the samples can result from the reaction of reversion. Indeed, when the concentration of glucose in the medium is more than 30 to 35 %, glucoamylase catalyses the reverse reaction to form primarily maltose and isomaltose [29]. Maltotriose was not detected in any of the dextrin samples. The same phenomenon was described by Khatoon et al. [16] analyzing maltodextrins obtained by corn starch hydrolysis with a thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformis*. However, they detected maltotriose in dextrins from cassava starch and not maltotetraose. Wang and Wang [30] found maltotriose in corn, potato and rice maltodextrins. Sun et al. [3] reported also a larger proportion of maltotriose and maltotetraose in corn dextrins. In this study we assumed that maltotriose could be cleaved into maltose and glucose by sorghum malt amylases such as α-amylase or glucoamylase. However this assumption should be investigated.

**Table 4.** Oligosaccharides identified and quantified in dextrins (% dry basis). DP1 to DP5 were quantified by standard curves and DP >5 were 100-∑DP1-5

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Corn dextrins** | | | **Wheat dextrins** | | | **Wheat flour dextrins** | | | **Cassava flour dextrins** | | |
| DE | 8 | 14 | 26 | 15 | 18 | 29 | 26 | 31 | 45 | 10 | 15 | 28 |
| Glucose (DP1) | 1.20 | 2.05 | 3.13 | 0.99 | 1.61 | 2.50 | 0.37 | 1.01 | 1.46 | 1.45 | 3.53 | 5.92 |
| Maltose (DP2) | 3.51 | 11.85 | 19.26 | 11.60 | 17.43 | 21.54 | 29.03 | 59.74 | 83.85 | 7.20 | 22.05 | 47.77 |
| Isomaltose (DP2) | 0.83 | 1.58 | 2.08 | 1.64 | 2.13 | 2.52 | 2.06 | 6.31 | 9.36 | 2.20 | 5.54 | 6.28 |
| Maltotetrose (DP4 | 1.83 | 4.82 | 6.30 | 2.22 | 5.28 | 6.53 | 0.34 | 1.41 | 2.57 | 1.40 | 5.32 | 14.20 |
| Maltopentaose (DP5) | 3.24 | 7.10 | 9.61 | 4.58 | 8.98 | 9.44 | 0.23 | 0.37 | 0.81 | 2.60 | 7.51 | 17.38 |
| DP > 5 | 89.39 | 72.65 | 59.62 | 78.97 | 64.59 | 57.47 | 67.97 | 31.16 | 1.95 | 85.32 | 56.05 | 8.55 |

# 4. Conclusion

Amylases of malted sorghum were able to hydrolyze starches and flours at variable degrees with relatively high rates. Dextrins with low and high DE could be obtained depending on the concentration of SM used and the addition of calcium had no significant impact on the efficiency of hydrolysis. The highest DE values were observed in dextrins from wheat flour. Oligosaccharides with broad molecular weight distributions were present in dextrins. Glucose, maltose, isomaltose, maltotetrose and maltopentaose were detected, with a high proportion of maltose and an absence of maltotriose in all dextrins. Such dextrins should be suitable to be used for instance as fillers in production of spray dried foods, freeze-control agents or anti‑caking agents. However their physicochemical properties will be further studied.

**Acknowledgements**

This work was supported by Wallonia-Brussels International. The authors would like to express their thanks to Catherine Chemotti for her technical assistance on HPLC.

# References

1. Vásquez M, Delgado R, Castro AJ (2009) Modeling of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*) using response surface methodology. Starch/Stärke61:601-609

2. Lin, AHM, ChangYH, Chou WB, Lu TJ (2011) Interference prevention in size-exclusion chromatographic analysis of debranched starch glucans by aqueous system. J. Agri. Food Chem. 59:5890-5898

3. Sun J, Zhao R, Zeng J, Li G, Li X (2010) Characterization of dextrins with different dextrose equivalents. Molecules 15:5162-5173

4. White DR, Hudson P, Adamson JT (2003) Dextrins characterization by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection and size-exclusion chromatography-multi-angle light scattering-refractive index detection. J. Chromatogr. A 997:79-85

5. Marchal LM, Beeftink HH, Tramper J (1999) Towards a rational design of commercial maltodextrins. Trends Food Sci. Technol. 10:345-355

6. Castro AM, Castilho LR, Freire DMG (2011) An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non conventional processes. Biomass Conv.Bioref*.* 1:245-255

7. Ayernor GS, Hammond TK, Graffham A (2002) The combination of rice malt and amyloglucosidase for the production of sugar syrup from cassava flour. Afri. J. Sci. Technol. 3:11-18

8. Traoré T, Mouquet C, Icard-Vernière C, Traoré AS, Trêche S (2004) Change in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α-amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). Food Chem. 88:105-114

9. Dicko MH, Gruppen H, Zouzouho OC, Traoré AS, van Berkel WJH, Voragen AGJ (2006) Effects of germination on the activities of amylases and phenolic enzymes in sorghum varieties grouped according to food end-use properties. J. Sci. Food Agri. 86:953-963

10. Ba K, Tine E, Cissé N, Destain J, Thonart P (2010) Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.214:131-139

11. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990) Official methods of the association of official analytical chemists. 15th edition Washington DC, USA.

12. Ewers E (1965) Determination of starch by extraction and dispersion with hydrochloric acid. International Organization for Standardization, ISO/TC 93/WGL.

13. Miller GL (1959) Use of dinitrosalycilic acid reagent for the determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428

14. Chiang SH, Chen CS, Chang CY (2006) Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. Food Chem. 97:666-673

15. Maache-Rezzoug Z, Zarguili I, Loisel C, Queveau D, BuléonA (2008) Structural modifications and thermal transitions of standard maize starch after DIC hydrothermal treatment. Carbohyd. Polym. 74:802-812

16. Khatoon S, Sreerama YN, Raghavendra D, Bhattacharya S, Bhat KK (2009). Properties of enzymes modified corn, rice and tapioca starches. Food Res. Int. 42:1426-1433

17. Saeleaw M, Schleining G (2010) Effect of blending cassava starch; rice, waxy rice and wheat flour on physic-chemical properties of flour mixtures and mechanical and sound emission properties of cassava crackers*.* J. Food Eng*.*100:12-24

18. Zhou X, Baik BK, Wang R, Lim ST (2010) Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. J. Cereal Sci. 51:57-65

19. Naguleswaran S, Li J, Vasanthan T, Bressler D, HooverR (2012) Amylolysis of large and small granules of native triticale, wheat and corn starches using a mixture of α‑amylase and glucoamylase. Carbohyd. Polym. 88:864-874

20. Charoenkul N, Uttapap D, Pathipanawat W, Takeda Y (2011) Physicochemical characteristics of starches and flours from cassava varieties having different cooked root textures.Food Sci. Technol.-LEB. 44:1774-1781.

21. Charles AL, Huang TC, Lai PY, Chen CC, Lee PP, Chang YH (2007) Study of wheat flour-cassava starch composite mix and the function of cassava mucilage in Chinese noodles. Food Hydrocolloid. 21:368-378

22. Aryee FNA, Oduro I, Ellis WO, Afuakwa JJ (2006) The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. Food Control. 17:916–922

23. Sadeghi A, Shahidi F, Mortazavi SA, Mahalati MN (2008) Evaluation of different parameters effect on maltodextrin production by α-amylase Termamyl 2-x. [World Appl. Sci. J.](http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fidosi.org%2Fwasj%2Fwasj.htm&ei=JPpaUJuvNYbTtAbss4DABQ&usg=AFQjCNGyubkEuGmXCqOgDJzwzYlx0By_-w&sig2=CBjEEWw-M3kNmrHtCU8hUg) 3:34-39

24. Chen Y, Huang S, Tang Z, Chen X, ZhangZ (2011) Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α-amylase and glucoamylase. Carbohyd. Polym.85:272-275

25. Yadav JK (2012) A differential behavior of α-amylase, in terms of catalytic activity and thermal stability, in response to higher concentration CaCl2. Int. J. Biol. Macromol. 51:146-152

26. Slomiska L, Wisniewska D, Grzeskowiak A (2003) Liquefaction of starch by thermostable α-amylase. ACTA Technologia Alimentaria, 2:17-26

27. Moore GRP, Canto LR, Amante ER (2005) Cassava and corn starch in maltodextrin production. Quim. Nova28:596-600

28. Ma Y, Cai C, Wang J, Sun DW (2006) Enzymatic hydrolysis of corn starch producing fat mimetics. J. Food Eng.73:297-303

29. Sine JP (2010) Applications agroalimentaires et industrielles In: Enzymologie et applications. Ellipses Edition, p.289-295

30. Wang YJ, Wang L (2000) Structure and properties of commercial maltodextrins from corm, potato and rice starches. Starch/ Stärke 52:296-304

# Chapitre V

*Physicochemical characterization of dextrins prepared by amylases from sorghum malt*

Après avoir été caractérisés chimiquement, les hydrolysats ont été séchés par atomisation afin d’obtenir des poudres plus facilement utilisées pour la détermination des propriétés physico-chimiques des maltodextrines.

Certaines propriétés des maltodextrines de différents DE ont été recherchées à savoir : la structure des poudres, la viscosité des solutions, la température de transition vitreuse ainsi que le comportement des produits à hautes températures.

L’impact des amylases du malt de sorgho sur la structure de départ des substrats utilisés (amidons et farines) a été étudié aux rayons X. Les résultats montrent une structure des maltodextrines différente de la structure des amidons.

Les taux de cisaillement appliqués sur les solutions de maltodextrines ont permis de mettre en évidence leurs propriétés rhéologiques.

L’étude directe de la température de transition vitreuse sur les poudres n’ayant pas pu se réaliser, les analyses se sont faites sur des solutions et par conséquent la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum Tg’ a été recherchée. Des liens ont été établis entre la température de transition vitreuse et le dextrose équivalent des maltodextrines.

Enfin le chapitre se termine par l’étude de la dégradation thermique des maltodextrines.

Publication V:

# Physicochemical characterization of dextrins prepared with amylases from sorghum malt

Khady Ba1,3\*, Christophe Blecker2, Sabine Danthine2, Emmanuel Tine3, Jacqueline Destain1, Philippe Thonart1.

1 University of Liege - Gembloux Agro-Bio Tech, Department of Bio-Industry, Passage des Deportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

2 University of Liege - Gembloux Agro-Bio Tech, Department of Food science and formulation, Passage des Deportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

3 University Cheikh Anta Diop of Dakar, High School Polytechnic of Dakar, Laboratory of Applied Microbiology and Industrial Engineering, BP 5085 Dakar Fann, Senegal.

# Abstract

Dextrins are partially hydrolyzed starch products which are used in a wide range of applications. Hydrolysis can be performed by acid or enzymatic reaction. However the properties of dextrins are influenced by the type of reaction and the source of starch. The aim of the present study was to determine physicochemical properties of dextrins obtained from hydrolysis of starches (corn and wheat) and flours (wheat and cassava) by using sorghum malt amylases. Hydrolysis of starches and flours was performed at 65 °C, the hydrolysates were centrifuged and spray-dried for analysis. Physicochemical and structure of the powders were investigated. Results showed that the proportion of DP2 (maltose and isomaltose) was higher in dextrins and more in dextrins from wheat flour. Low water activity and low dissolution time were found in all dextrins. X-ray diffraction patterns revealed that the crystalline structure partially disappeared in some of them. At 30 % concentration, we noted a Newtonian behaviour for the dextrins. The freeze-concentrated glass transition temperature (Tg’) and the peak melting temperature (Tm’) determined by differential scanning calorimetry (DSC) showed lowest values for dextrins from wheat. Thermogravimetric analysis (TGA) revealed that the dextrins were quite stable until 200 °C.

**Keyword:** Dextrins; Starches; Sorghum amylases; Viscosity; XRD; DSC; TGA.

# 1. Introduction

Dextrins are starch hydrolysis products obtained by acid or enzymatic hydrolysis [1]. They are defined by a dextrose equivalent (DE), which is a measure of the total number of reducing sugars they contain relative to glucose (DE = 100). Starch hydrolysates with DE values lower than 20 are referred to as maltodextrins. DE value is an important indicator used to control the characteristics of dextrin products [2]. Maltodextrins are complex mixtures of high and low molecular weight materials and the nature of starch hydrolysis has an important influence on the composition and properties of the final product [3]. Maltodextrins are non-sweet, cold water soluble and have water-holding characteristic [4]. Maltodextrins can be used as carrier or bulk agents, texture providers, spray-drying aids for the production of flavours enhancers, fat replacers, film formers, freeze-control agents to prevent crystallization, or to supply nutritional value [5,6]. Maltodextrins with the same DE can have different properties and molecular compositions depending on the starch and how it is digested [6]. Commercial maltodextrins are generally prepared from corn, potato and rice starches but other starch sources as cassava are explored. Today, enzymatic hydrolysis has almost completely replaced chemical hydrolysis in the starch industry [7].

Amylases used in starch hydrolysis can be produced by a wide variety of organisms, bacteria, fungi, animals and plants. Starch hydrolysis products are industrially produced using amylases from microorganisms for their high thermostability as amylases from *Bacillus*. However, amylases from some malted cereals exhibit interesting properties and can be used in starch industry. Indeed, Ayernor et al. [8] produced sugar syrup from cassava flour by combining the rice malt and amyloglucosidase.

Sorghum is a cereal which such as barley, maize, millet, and rice produces an enzymatic complex after malting and some sorghum cultivars exhibit high amylase activities and have potentialities of use in industry. Produce maltodextrins using amylases cheaper than microbial amylases can help the developing countries. Previously, Ba et al. [9] studied the production of dextrins by hydrolyzing starches (corn and wheat) and flours (wheat and cassava) with sorghum malt amylases. In the present study, the physicochemical properties of dextrins produced in well controlled laboratory conditions are characterized by rheometry, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and X-ray diffractometry (XRD).

# 2. Materials and methods

## 2.1. Materials

Corn (*Zea mays*) starch was supplied by Roquette Frères (Lestream, France); wheat (*Triticum aestivum*) starch was provided by THT s.a. (Gembloux, Belgium); wheat flour was kindly donated by Belourthe (Hamoir, Belgium) and cassava (*Mannihot esculenta*) flour was purchased from the Senegalese market. Amylases were produced by malting in our laboratory sorghum seeds (cv F-2-20) selected in ISRA of Bambey (Senegal) [10].

## 2.2. Methods

Dextrins were obtained by hydrolyzing starches and flours using sorghum malt. The hydrolysis was conducted, at a laboratory scale, under stirring at pH 5.5 and at 65 °C with sorghum malt cv F-2-20 (containing α-amylase activity: 312.6 U/g; β-amylase: 62.7 U/g and limit dextrinase: 1253.8 U/kg) at concentrations 0.25 % (w/w) for corn and wheat starches, 0.03 % for wheat flour and 0.23 % for cassava flour. The hydrolysates were sampled after different incubation times, centrifuged during 20 min at 10000 rpm and supernatants were recovered and their dextrose equivalent (DE) values were evaluated. For the determination of DE, the reducing sugars producing were measured by DNS Miller’s method [11] and DE was calculated by the ratio of reducing sugar in the final product and the total soluble solids determined by °BRIX with an ATAGO® refractometer (Tokyo, Japan).

Different DE values were obtained for each hydrolysis and samples were named accordingly: dextrins from corn starch were named DC (DC8; DC14 and DC26), from wheat starch DW (DW15; DW18 and DW29), from wheat flour DWF (DWF26; DWF31 and DWF45) and from cassava flour DCF (DCF10; DCF15 and DCF28).

Supernatants were fed into a spray dryer (Mobile Minor Spray Dryer, GEA Niro, Soeborg, Denmark) by a peristaltic pump and a rotary atomizer. The inlet temperature was set at 180 °C and the outlet temperature was kept at 80 °C by adjusting the feed flow of the peristaltic pump. The air pressure for atomization was maintained at 2.5 bars. Finally, powders were collected from the cyclone and samples were taken for further analysis.

## 2.3. Chromatography analysis

The composition in oligosaccharides of the dextrins produced was characterized by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) performed with a Dionex ICS-3000 (Sunnyvale, CA, USA) equipped with an ED 3000 pulsed amperometric detector according the method of Ba *et al*. [9]. Sugars with degree of polymerization (DP) from 1 to 5 (glucose DP1; maltose DP2; isomaltose DP2; maltotriose DP3; maltotetraose DP4 and maltopentaose DP5) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were used to identify the products obtained. Results were expressed as the percentage of product, calculated from the concentration of oligosaccharides analyzed.

## 2.4. General properties

The moisture content was determined by drying samples at 105 °C until constant weight was reached. The water activity was measured by using Fast-Lab according to manufacturer’s instructions (GBX, France). The determination of the dissolution time (DT) was performed as described by Omobuwajo *et al*. [12].

## 2.5. X-Ray Diffractometry

The physical state of native and enzyme hydrolysed starches was determined by powder X-ray diffraction using a D8 Advance diffractometer (Bruker, Germany) (λ Cu=1.54178 Å, 40kV, 30mA) equipped with a Lynxeye (Bruker, Germany) detector, and a TTK450 low-temperature Chamber (Anton Paar, Graz, Austria). All samples analyzed were conditioned 24 hours at room temperature at 100% relative humidity (RH). Diffraction patterns were recorded in the reflection mode in the range of 2-35° (2θ) (Step size: 0.02°; time per step: 0.3sec).

## 2.6. Viscosity

Viscosity measurements of freshly prepared dextrin solutions (30 %) were carried out at constant temperature (30 °C) on a Bohlin CVO (Malvern) rheometer, equipped with cone and plate (CP 4 °/40 mm). A shear rate gradient from 2-1000 δ-1 was exerted during 3 min after the sample was introduced between the cone and plate. All the measurements were conducted in duplicate.

## 2.7. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analyses were conducted using a DSC 2920 (TA Instruments) equipped with a cooling system. For each sample, a 30 % dextrin solution was used to determine the maximum freeze‑concentrated glass transition temperature (Tg’) and the melting peak temperature (Tm’). Using a micropipette, the solution was put in an aluminium pan which was then hermetically sealed. An empty pan was used as the reference. Each sample was heated from 25 to 120 °C at the rate of 10 °C/min, cooled down to -50 °C and then heated to 50 °C at 5 °C/min. The samples weights were between 5 and 11 mg and measurements were done in duplicate.

**2.8. Thermogravimetric analysis (TGA)**

Thermogravimetric analysis (TGA/DSC 1 Stare System Mettler-Toledo, Switzerland) was carried out to determine the thermal stability of samples under nitrogen flows of 35 and 100 ml/min. The samples were heated from 25 to 500 °C with a heating rate of 10 °C/min.

## 2.9. Statistical analysis

All tests were performed at least in duplicate. Analysis of variance (ANOVA) at significance level of 5 % (*P*< 0.05) was applied to data obtained using statistical Minitab Software (Minitab 15, 2011). Tukey’s test of multiple comparisons was applied when statistical differences were found.

# 3. Results and Discussion.

## 3.1. Oligosaccharide compositions

Table 1 shows the amounts of oligosaccharides in dextrins produced from the different substrates. The proportion of DP2 is higher than that the proportion DP1 in dextrins from corn and wheat starches (DC and DW) and DP5 is higher than that DP4. Dextrins from wheat flour (DWF) which exhibit the highest DE values are mainly composed of DP2. In dextrins produced with cassava flour (DCF), the percentage of DP2 is higher than DP4, DP5 and DP1. Cereal malts are known as being very rich in enzymes involved in starch hydrolysis [8]. The largest proportion of DP2 in all samples may result from the action of α-amylase, β-amylase and pullulanase.

**Table 1.** Oligosaccharides composition in dextrins (% dry basis). DP1 to DP5 were quantified by standard curves following Ba et al. [9] and DP >5 were 100-∑G1-5

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **DC** | | | **DW** | | | **DWF** | | | **DCF** | | |
| DE | 8 | 14 | 26 | 15 | 18 | 29 | 26 | 31 | 45 | 10 | 15 | 28 |
| DP1 | 1.20 | 2.05 | 3.13 | 0.99 | 1.61 | 2.50 | 0.37 | 1.01 | 1.46 | 1.45 | 3.53 | 5.92 |
| DP2 | 4.34 | 13.43 | 21.34 | 13.24 | 19.56 | 24.06 | 31.09 | 66.05 | 93.21 | 9.4 | 27.59 | 54.05 |
| DP4 | 1.83 | 4.82 | 6.30 | 2.22 | 5.28 | 6.53 | 0.34 | 1.41 | 2.57 | 1.40 | 5.32 | 14.20 |
| DP5 | 3.24 | 7.10 | 9.61 | 4.58 | 8.98 | 9.44 | 0.23 | 0.37 | 0.81 | 2.60 | 7.51 | 17.38 |
| DP > 5 | 89.39 | 72.65 | 59.62 | 78.97 | 64.59 | 57.47 | 67.97 | 31.16 | 1.95 | 85.32 | 56.05 | 8.55 |

DP1= Glucose; DP2= Maltose + Isomaltose; DP4= maltotetraose; DP5= maltopentaose

## 3.2. General properties

General properties of dextrins are shown in Table 2. They all have low moisture and low water activity. Moisture content of dextrins should be sufficiently low to avoid caking or even microorganism proliferation and assure stability during storage. In contact with water, dextrins are easily dissolved. However, for the dextrins which contain the highest proportions of long chain DP>5 as DC8, DC14 and DCF10 (Tab.1) a long time is necessary to completely dissolve 143, 110 and 100 s respectively. Furthermore, we observed for these dextrins lumps at the initial stage of dissolution. As described by Wang and Wang [4], it is possible that the low molecular weight saccharides, which are more hygroscopic, dissolved first and formed a film around the longer polymers, thus delaying dissolution. Dextrins with a higher DE value have a shorter dissolution time. Chen and Ozkan [13] reported that with small particles the formation of a wet viscous layer prevents any further liquid penetration. They reported also that properties of agglomerated particles of starch are strongly influenced by their composition in saccharides but also in proteins and fats. Dissolved in water, DC and DW samples form clear solutions, but the DC8 solution is translucent, probably due to the content of high molecular weight saccharides (low DE). DWF and DCF samples exhibit cloudy solutions.

.

**Table 2.** General properties of dextrins.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Dextrins** | **DE value** | **Water Activity (Aw)\*** | **Moisture (%)\*** | **Dissolution Time (s)\*** |
| DC | 8 | 0.20 ± 0.03c | 3.10 ± 0.02c | 143 ± 3h |
| 14 | 0.29 ± 0.06c | 3.90 ± 0.46bc | 110 ± 8gj |
| 26 | 0.27 ± 0.03c | 3.35 ± 0.07c | 34 ± 4bi |
| DW | 15 | 0.12 ± 0.02ac | 3.20 ± 0.06c | 87 ± 6ef |
| 18 | 0.22 ± 0.10c | 2.76 ± 0.41a | 56 ± 4c |
| 29 | 0.28 ± 0.04c | 2.27± 0.49a | 38 ± 5b |
| DWF | 26 | 0.15 ± 0.03ac | 3.30 ± 0.32c | 40 ± 3b |
| 31 | 0.34 ± 0.02b | 2.65 ± 0.09a | 26 ± 2a |
| 45 | 0.25 ± 0.01c | 2.37 ± 0.19a | 23 ± 1a |
| DCF | 10 | 0.16 ± 0.01ac | 3.30 ± 0.45c | 100 ± 4g |
| 15 | 0.34 ± 0.01b | 3.31 ± 0.20c | 74 ± 7f |
| 28 | 0.37 ± 0.05b | 3.44 ± 0.04c | 43 ± 8bd |

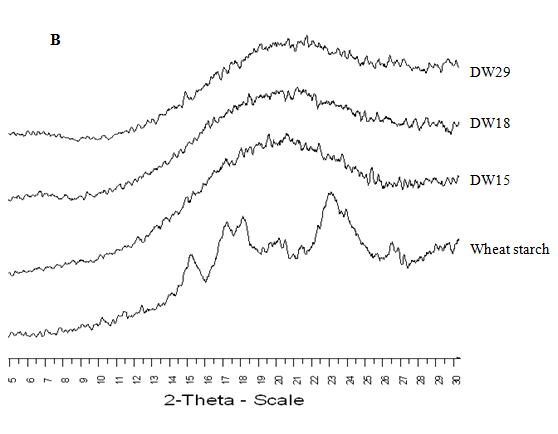
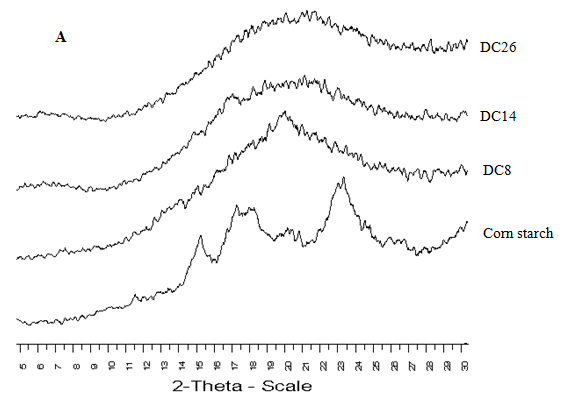
Values are expressed as mean ± standard deviation;

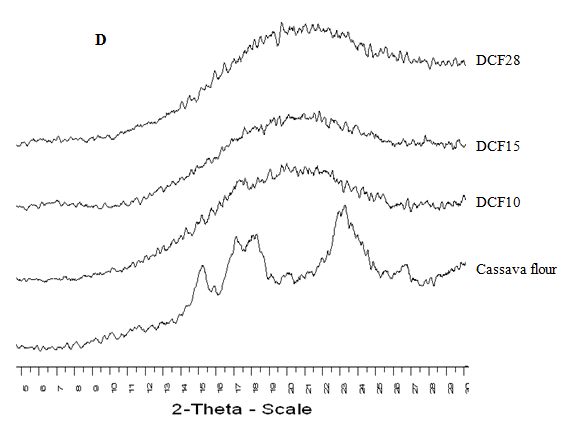
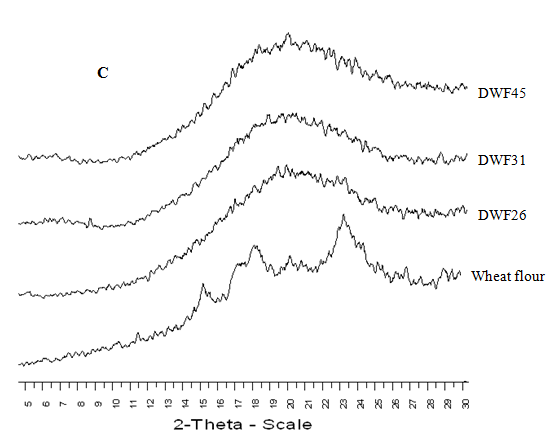
\*Values followed by different letters in the same column are significantly different at *P*<0.05 by Tukey’s test.

## 3.3. X-Ray Diffractometry

The X-ray diffraction patterns of starches and dextrins are shown in figure 1. As is well known, cereal starches show the characteristic A-type pattern with peaks centred at 15, 17, 18 and 23° (2θ) [14,15,16,17]. After hydrolysis by sorghum amylases, the intensity of the characteristic diffraction peaks of the cereal dextrins is progressively reduced with the increase of DE values. All cereal dextrins led to non-crystalline samples except DC8 (Fig.1. A) which has low residual crystallinity with a peak around 20 ° (2θ). These phenomena have also been observed by Sun *et al*. [2] while hydrolyzing corn starch with two α-amylases.

Cassava flour (Fig.1. D) displays characteristics A-type X-ray patterns although it is not a cereal [18,19,20]. Unlike Chen *et al*. [18]who reported an increasing crystalline peak in cassava hydrolysates, the crystalline peaks of cassava dextrins in this study are markedly reduced. Only in the case of DCF10 a low residual diffraction peak is noted. The more the DE increases, the more the crystalline peaks decrease until they nearly all disappear. The results suggest that amorphous and crystalline regions of the granules are both hydrolyzed during enzymatic hydrolysis but Uthumporn *et al*. [21] described that enzymatic hydrolysis primarily occurs in the amorphous region of starch.





**Figure 1.** X-ray diffraction patterns of dextrins: (A) corn starch and hydrolysates, (B) corn wheat and hydrolysates, (C) wheat flour and hydrolysates, and (D) cassava flour and hydrolysates.

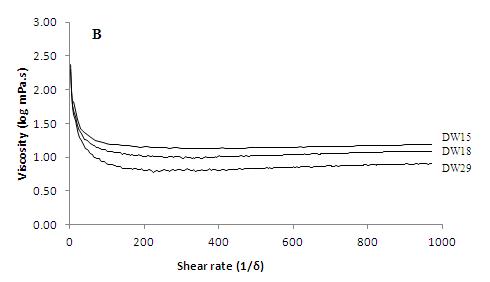
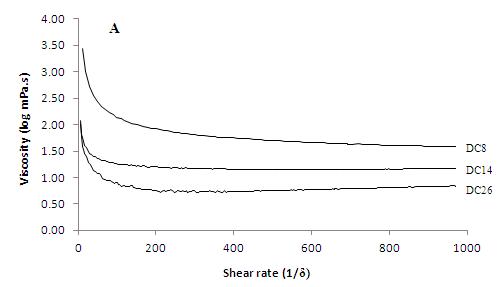
**B**

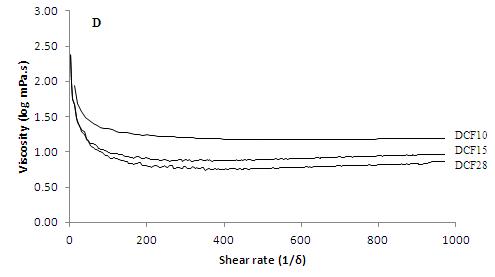
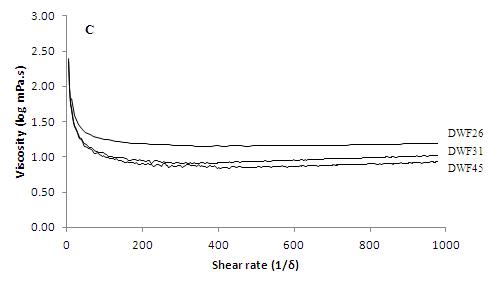
## 3.4. Viscosity

The viscosities of dextrins solutions (30 % w/w) measured at 30 °C are shown in Figure 2. When the applied shear rate gradient is weak, from 2 to 300 δ-1, viscosity behaviour of dextrins is shear thinning. After these values, all shear rate flow curves are Newtonian, i.e. the viscosity is constant. According to Palma-Rodriguez *et al*. [22], under shear, the large swollen granules of starch brake down readily, decreasing the viscosity. The highest viscosities are noted for DC8 (133 mPa.s at 100 δ-1) and DCF10 (21 mPa.s at 100 δ-1). However, the higher the DE value of dextrins, the lower is their viscosity. The high viscosity of DC8 and DCF10 is probably due to a higher proportion of long linear chains and a broader molecular mass distribution (Tab.1). In general, the viscosity of polymers is in relationship with the degree of polymerisation [23]. Dextrins from wheat flour have the highest DE values, so they have more short molecular chains and, under shear, granules are less resistant to breakdown.

## 3.5. DSC analysis

The freeze-concentrated glass transition temperature Tg’ and the melting peak Tm’ of dextrins solutions are listed in Table 3. The glass transition is specific to each material and is affected by three major factors: molecular weight, composition and plasticizer material [24]. Generally, we observe that Tg’ and Tm’ decrease with the increasing DE. According to Wang and Wang [4], low molecular weight saccharides in dextrins with low DE decrease the Tm’ more than would high molecular weight saccharides. Dextrins from wheat flour containing a higher amount of short chain saccharides have the lowest Tg’ (DWF26: -24 °C; DWF31: -25 °C and DWF45: -26 °C). Tg’ measurements suggest that some dextrins as DW15, DC8 and DC14 which have the highest values ​​provide a more stable system for frozen food applications.





**Figure 2.** Viscosity of different dextrins: (A) dextrins from corn starch, (B) dextrins from wheat starch, (C) dextrins from wheat flour, and (D) dextrins from cassava flour.

**Table 3.** Glass transition temperature Tg’ and temperature of peak melting in freeze- concentrated solution.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Solution Composition (w/w)** | **Tg’\*** | **Tm’\*** |
| 30 % DC8 | -11.12 ± 0.05a | -0.57 ± 0.01a |
| 30 % DC14 | -12.40 ± 0.22a | -1.43 ± 0.08b |
| 30 % DC26 | -14.50 ± 0.70a | -1.46 ± 0.08b |
| 30 %DW15 | -10.25 ± 1.20a | -0.65 ± 0.21a |
| 30 % DW18 | -13.16 ± 2.63a | -1.59 ± 0.30b |
| 30 % DW29 | -15.63 ± 1.06a | -1.78 ± 0.01b |
| 30 % DWF26 | -24.35 ± 0.44c | -3.23 ± 0.25c |
| 30 % DWF31 | -25.20 ± 1.05c | -2.20 ± 0.35c |
| 30 % DWF45 | -25.70 ± 1.57c | -2.63 ± 0.16c |
| 30 % DCF10 | -13.62 ± 1.39a | -1.13 ± 0.07b |
| 30 % DCF15 | -17.07 ± 2.50abc | -1.69 ± 0.09b |
| 30 % DCF28 | -21.18 ± 1.10c | -2.26 ± 0.20c |

Values are expressed as mean ± standard deviation

\*Values followed by different letters in the same column are significantly different at *P*<0.05 by Tukey’s test.

## 3.5. TGA analysis

To evaluate the physicochemical changes caused in dextrins by the effect of temperature, powders were subjected to a thermogravimetric analysis (TGA). Figure 3presents the thermal behaviour of corn starch and dextrins. Until 50 °C, no activity was detected, but after this temperature a weight loss is measured until 100 °C. This observed deflection corresponds to the evaporation of free water. The weight loss in DC8 is more pronounced than in DC14, DC26 and corn starch. Moreover, DC14 and DC26 show a similar pattern. The derivative of the thermogravimetric analysis graph (data not shown) indicates a first peak which represents the evaporation of free water and two peaks of degradation at 220 and 300 °C for DC8. A slight shoulder for DC14 and DC26 located at 220 °C appears in the curve and the main peak of degradation being observed at 320 °C. The two peaks of degradation could be explained by the composition in oligosaccharides of the dextrins, the first peak might correspond to the degradation of low molecular weight saccharides (DP<5) and the second to large molecular weights (DP>5). The thermograms obtained for wheat starch and dextrins (Fig. 4) show a similar pattern for dextrins. The weight loss, by evaporation of water contained in the samples, is more pronounced for the starch as for the dextrins. This can be explained by the drying method used for the dextrins (atomization with a hot air flow at 180 °C). Their thermal degradation starts at a lower temperature, a shoulder appears around 220 °C before the main peak of degradation at 320 °C. For dextrins from wheat flour (Fig. 5**)**, the thermograms indicate a weight loss slightly higher for DWF45. The dTGA curves (no showed) also show two peaks of degradation around 220 and 310 °C. All dextrins from cassava (Fig. 6**)** exhibit a similar thermal behaviour. For these dextrins, the largest weight loss is observed after 220 °C which is a higher temperature as for cassava flour.



**Figure 3**. TGA curves of Corn starch: DC8, DC14, and DC26



**Figure 4**. TGA curves of Wheat starch: DW15, DW18, and DW29



**Figure 5**. TGA curves of Wheat flour: DWF26, DWF31, and DWF45



**Figure 6.** TGA curves of Cassava flour: DCF10, DCF15, and DCF28

# 4. Conclusion

The physicochemical properties of dextrins produced by hydrolyzing starch with amylases from sorghum malt were investigated. The dissolution times of dextrins are relatively low. X-ray diffraction shows that the A-type pattern of cereal starches and cassava flour is modified after enzymatic hydrolysis. When applying shear rate, dextrins are first shear thinning, then their behaviour becomes Newtonian. Moreover, viscosity decreases with the increase of DE. The remarkable result is the good thermal stability of all dextrins. These results suggest that the dextrins produced in this study can be used depending on DE value in emulsion food products such as ice cream, in oral drug delivery or as filler in the production of spray dried foods.

**Acknowledgements**

We thank the Wallonia-Brussels International for financial support. Also we would like to express our thanks to Doran Lynn, Filocco Sandrino and Freschi Jérôme for their technical assistance on DSC, TGA and Viscosity analysis.

# References

[1] White, D. R., Hudson, P., Adamson, J. T., Dextrins characterization by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection and size-exclusion chromatography-multi-angle light scattering-refractive index detection. *J. Chromatogr. A*,2003, *997*, 79-85.

[2] Sun, J., Zhao, R., Zeng, J., Li, G., Li, X., Characterization of dextrins with different dextrose equivalents. *Molecules*, 2010, *15*, 5162-5173.

[3] Loret, C., Meunier, V., Frith, W. J., Frye, P. J., Rheological characterisation of the gelation behavior of maltodextrin aqueous solutions. *Carbohyd. Polym.***,** 2004,*57*153‑163.

[4] Wang, Y. J., Wang, L., Structure and properties of commercial maltodextrins from corm, potato and rice starches. *Starch/ Stärke*, 2000, *52*, 296-304.

[5] Takeiti, C. Y., Kieckbusch, T. G., Collares-Queiroz, F. P., Optimization of the jet stream instantizing process of commercial maltodextrins powders. *J. Food Eng.*, 2008, *86*, 444-452.

[6] Marchal, L. M., Beeftink, H. H.,Tramper, J., Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Food Sci. Tech.*, 1999, *10*, 345-355.

[7] Pandey, A, Nigam, P. Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., Advances in microbial amylases*. Biotechnol. Appl. Biochem*. 2000, *31*, 135-152.

[8] Ayernor, G. S., Hammond T. K., Graffham A., The combination of rice malt and amyloglucosidase for the production of sugar syrup from cassava flour. *Afri. J. Sci. Technol.* 2002, *3*, 11-18.

[9] Ba, K., Aguedo, M., Tine, E., Paquot, M., Destain, J., Thonart P., Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt amylases for dextrins production*. Eur. Food Res. Technol*., 2013, DOI: 10.1007/100217-013-1937-6.

[10] Ba, K. Tine, E., Cissé, N. Destain, J., Thonart, P., Étude comparative des composésphénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.,* 2010, *214***,** 131-139.

[11] Miller, G. L., Use of dinitrosalycilic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem*., 1959, *31*, 426-428

[12] Omobuwajo, T. O., Busari, O. T., Osemwegie, A. A., Thermal agglomeration of chocolate drink powder. *J. Food Eng.*, 2000, *46*, 73-81.

[13] Chen, X. D., Ozkan, N., Stickiness, functionality and microstructure of food powders. *Dry. Technol.*, 2007, *25*, 959-969.

[14] Miao, M., Jiang, B., Zhang, T., Jin, Z., Mu,W., Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. *Food Chem.*, 2011, *126*,506-513.

[15] Jiang, Q., Gao, W., Xia, L., Jingze, Z., Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed *Zea mays* L., *Fritilla ria ussuriensis* Maxim. and *Diosrea opposita* Thunb. Starches. *Food hydrocolloid*, 2011, *25*, 251-528.

[16] Xia, L., Wenyuan, G., Juan, W., Qianqian, J., Luqi, H., Comparison of the morphological, crystalline, and thermal properties of different crystalline types of starches after acid hydrolysis. *Starch/ Stärke*, 2010, *62*, 686-696.

[17] Cheetham, N. W. H.,Tao, L., Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohyd. polym.*, 1998, *36*, 277-284.

[18] Chen, Y., Huang, S., Tang, Z., Chen, X., & Zhang, Z., Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α-amylase and glucoamylase. *Carbohyd. Polym.*, 2011, *85*, 272-275.

[19] Hoover, R., Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohyd. Polym.*, 2001, *45*, 253-267.

[20] Franco, C. M. L., Cabral, R. A. F., Tavares, D. Q., Structural and Physicochemical Characteristics of Lintnerized Native and Sour Cassava Starches. *Starch/Stärke*, 2002, *54*, 469-475.

[21] Uthumporn, U., Zaidul, I. S. M., & Karim, A. A., Hydrolysis of granule starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of Amylolytic enzymes. *Food Bioprod. Process.*, 2010, *88*, 47-54.

[22] Palma-Rodriguez, H. M. Agama-Acevedo, E. Mendez-Montealvo, G. Gonzalez-Soto, R. A. Vernon-Carter, E. J. & Bello-Pérez, L. A., Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch/ Stärke*, 2012, *64*, 115-125.

[23] Dokic, P., Jakovljevic, J.,Dokic-Baucal, Lj., 1998, Molecular characteristic of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloid Surface A*, 1998, *141*, 435-440.

[24] Wang, Y. J., & Jane, J., Correlation between glass transition temperature and starch retrogradation in the presence of sugar and maltodextrins. *Cereal Chem.*, 1994,*71*, 527-531.

# Chapitre VI

*Discussion générale*

Le sorgho est la cinquième céréale produite dans le monde. Plus de 80 % des récoltes enregistrées en 2009 par la FAO ont été produites en Afrique et en Asie (FAO 2011). L’importante production de sorgho dans les pays développés comme les Etats Unis d’Amérique, résulte du fait qu’il est utilisé en tant que fourrage (vert ou sec) mais aussi pour la fabrication d’énergie renouvelable (Dahlberg et al., 2011). L’intérêt pour la production de sorgho est réapparu dans certaines zones comme l’Europe parce qu’il est plus performant que les autres céréales sous divers stress environnementaux, ne nécessite pas d’apport en eau ou en engrais pendant la croissance et est généralement plus économique à produire (Pontieri et al., 2011). Avec une population mondiale croissante et une diminution de l’approvisionnement en eau, le sorgho représente une culture importante pour le futur. Son avenir prometteur dans les pays du nord réside dans la substitution du blé pour les personnes atteintes de la maladie cœliaque (personnes allergiques au gluten) mais aussi pour remplacer le maïs dans la production d’énergie renouvelable (Ciacci et al., 2007). Dans les régions tropicales semi-arides d’Afrique, d’Asie et d’Amérique latine, le sorgho constitue la nourriture de base (Dykes et Rooney, 2006). Traditionnellement, dans de nombreux pays africains et asiatiques, le sorgho est utilisé pour faire des bouillies, des pains fermentés et non fermentés, du couscous. Des boissons alcoolisées et non alcoolisées sont faites à partir du malt de sorgho. Certains pays d’Afrique comme le Nigéria et l’Afrique du Sud ont adopté une politique de limitation des importations de malt d’orge par leurs industries brassicoles, incitant les brasseurs à utiliser le malt de sorgho. C’est ainsi que plusieurs recherches ont été faites sur la sélection de variétés de sorgho remplissant les caractéristiques nécessaires en brasserie. Contrairement au Burkina Faso où le sorgho est la première céréale cultivée, au Sénégal il occupe la deuxième place après le mil et se retrouve dans toutes les régions du pays. Les principales régions de production sont par ordre d’importance la Haute-Casamance, le Sénégal-Oriental, la région de Kaolack et la région de Thiès. La faible productivité des variétés, les difficultés liées aux techniques culturales, les attaques de moisissures et les problèmes liés à la sécheresse, ont amené l'ISRA à entreprendre des travaux sur l'amélioration des cultures céréalières. Ces travaux ont permis aujourd'hui de disposer de variétés de sorgho à hauts potentiels de rendement et adaptées aux différentes zones écologiques.

De manière générale, le sorgho ainsi que son malt sont utilisés principalement au Sénégal dans le secteur alimentaire : préparation de couscous, préparation de « arraw » : c'est‑à-dire d’agglomérats de farine pour faire de la bouillie, préparation de pain etc.

L'objectif majeur du gouvernement sénégalais est de développer le secteur agro-industriel et conjointement à cette action des pouvoirs publics, des partenaires au développement comme la banque mondiale, l'USAID (Agence des Etats-Unis pour le développement international) ont accru leurs soutiens financiers pour promouvoir la construction et le développement des chaines de valeurs autour des produits agricoles. L’objectif général de cette thèse se situait dans le cadre de la valorisation des produits agricoles au Sénégal. Il visait plus particulièrement à trouver une source d’enzymes amylolytiques locale pour transformer les produits amylacés et l’utiliser dans le secteur agro-industriel.

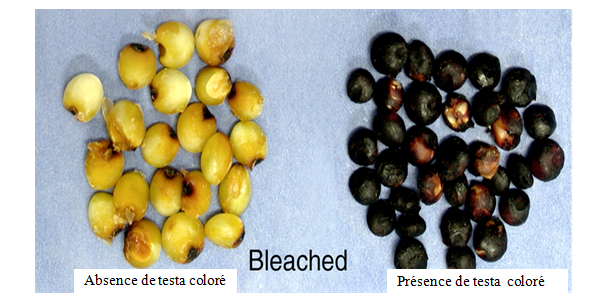
Les amylases sont, parmi les enzymes, les plus utilisées et sont maintenant d’une grande importance dans les applications biotechnologiques industrielles en remplacement de l’hydrolyse acide de l’amidon. Bien qu’elles puissent être issues de plusieurs sources, comme les animaux, les plantes et les microorganismes, les enzymes d’origine végétale pourraient répondre à certaines demandes industrielles. Dans cette thèse, nous avons choisi comme source d’enzymes, le sorgho qui par germination (maltage) produit des amylases.

L'originalité de notre thèse est non seulement d'avoir caractérisé ces enzymes mais surtout d'avoir démontré qu'elles étaient utilisables pour fabriquer des maltodextrines d'intérêt à partir de matières premières amylacées différentes. Le caractère original se situe aussi au niveau de la mise au point de procédés facilement extrapolables au Sénégal, que ce soit au niveau du maltage du sorgho cultivé dans le pays, de l'hydrolyse de l'amidon avec le malt et même du séchage des maltodextrines.

# 1. La comparaison de différentes variétés de sorgho

## 1.1. Analyse des variétés

Sept variétés de sorgho blanc (F-2-20, CE 180-33, CE 145-66, CE 151-262, CE 196-7-2-1, 93B1057 et 93B1062) ont été caractérisées et comparées. Ces variétés proviennent de l'ISRA de Bambey. La caractérisation a porté sur la présence d’un testa, la teneur en phénols totaux et en tanins condensés et enfin l’activité antioxydante. Un testa coloré est corrélé à la présence de tanins condensés dans les grains de sorgho (figure 1). Il est connu que les tanins condensés donnent un goût astringent aux produits. Dicko et al. (2006) et Dykes et al. (2006) ont montré que les composés phénoliques du sorgho comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins. Certains composés phénoliques sont très importants d’un point de vue nutritionnel mais aussi agronomique car ils permettent la préservation des grains contre les prédateurs. Cependant, d’autres composés comme les tanins condensés ont des effets antinutritionnels puissent qu’ils se lient aux protéines et inhibent certaines enzymes hydrolytiques (Dicko, 2005). Dans cette étude, le réactif de Folin a été choisi pour déterminer la teneur en composés phénoliques dans les échantillons afin d’être en mesure de faire une comparaison avec d’autres études scientifiques qui ont utilisé la même méthode. Seulement, deux variétés (CE 180-33 et CE 145-66) se sont révélées contenir des tanins condensés et détenir les plus hautes teneurs en composés phénoliques. Les teneurs trouvées dans nos variétés sont comparables à celles décrites par Dicko et al. (2002) mais sont aussi comparables à celles des variétés d’orge étudiées par Zhao et al. (2008).



**Figure 1**. Test de Blanchiment de Waniska et al. (1992) pour déceler la présence de tanins.

En dehors de leur rôle dans les plantes, les composés phénoliques ont un effet bénéfique sur la santé humaine à cause de leurs activités pharmacologiques telles que les piégeurs de radicaux (Cook et Samman, 1996, Yao et al., 2004). L'intérêt récent pour ces substances a été encouragé par leurs avantages potentiels sur la santé résultant de leurs activités antioxydantes. Les variétés de sorgho rouge renferment plus de composés phénoliques que les variétés de sorgho blanc et par conséquent, elles ont plus d’activité antioxydante (Dicko et al., 2005). Dans cette thèse l’activité antioxydante a été mesurée de deux façons différentes utilisant les radicaux DPPH et ABTS. Le choix porté sur ces deux méthodes résulte du fait qu’elles fournissent des résultats fiables et font partie des méthodes les plus connues et les plus largement utilisées. Le radical DPPH est généralement utilisé dans l'analyse de l’activité antioxydante dans les céréales et l’autre, le radical ABTS est utilisé dans l'analyse de composés simples et de composés complexes (antioxydants lipophiles et hydrophiles) (Yu et al., 2004, Zhou et al., 2004 et Re et al., 1999). Les résultats sont en corrélation avec les teneurs en phénols totaux comme ceux reportés par Dlamini et al. (2007) et Zhao et al. (2008). Le rôle chélateur et l’interaction notée avec les systèmes enzymatiques sont les principaux mécanismes attribués aux activités antioxydantes des composés phénoliques quoique la diversité des effets cliniques ait été déterminée comme des activités anticancéreuses et anti VIH, la prévention des maladies coronariennes etc. (Yao et al., 2004).

## 1.2. Le maltage

Les conditions du micromaltage réalisées au laboratoire dans cette étude (chapitre II**)** peuvent être facilement transposées au Sénégal. En effet, la température de germination (30 °C) est en moyenne la température ambiante du pays, ce qui constitue un gain énergétique. Contrairement aux méthodes traditionnelles utilisées pour le maltage, des techniques industrielles adaptées au sorgho pourraient être développées. Dans cette optique, une germination en atmosphère confinée permettrait le développement des enzymes et une réduction des pertes par la respiration des grains. Cependant, le problème majeur qui pourrait se poser est le développement des moisissures. La température de germination idéale pour un bon développement des amylases du sorgho (30 °C) est aussi propice à la prolifération des moisissures. Fort heureusement, des méthodes chimiques et biologiques existent pour combattre ce phénomène (Bwanganga et al., 2012). Dans cette thèse, parmi les sept variétés étudiées, seule la F-2-20 (Figure 2) n'a pas été contaminée. L'analyse des activités des enzymes amylolytiques (α-amylase, β-amylase et pullulanase ou dextrinase limite) dans les malts présentée dans le chapitre II, a montré aussi qu'elle était la meilleure variété productrice d'amylases.



**Figure 2**. Germination des graines de la variété F-2-20

Les activités obtenues avec le malt de la F-2-20: 312 U/g pour l'α-amylase, 62 U/g pour la β‑amylase et 1253 U/kg pour la pullulanase sont intéressantes. La comparaison de nos résultats avec ceux présentés par Nour et Yagoub (2010), Okoli et al. (2010) et Letsididi et al. (2008) sur des variétés de sorgho très performantes, nous permettent de confirmer le caractère hyperproducteur d'amylases de la F-2-20, surtout en α-amylase. Rappelons que l'objectif de cette étude est de produire des maltodextrines par liquéfaction de l'amidon gélatinisé à l’aide d’α-amylases. Un autre caractère intéressant pour cette variété résulte des faibles pertes (8 %) enregistrées au cours du maltage par rapport aux autres variétés étudiées. Toutes ces caractéristiques constituent des atouts majeurs pour l'emploi du malt de cette variété dans le domaine alimentaire surtout dans la transformation des produits amylacés comme l'hydrolyse d'amidon, d'où la nécessité d'étudier leurs caractéristiques biochimiques.

# 2. Caractérisation des amylases du malt de sorgho (cv. F-2-20) et analyse génétique de la β-amylase

Les résultats décrits dans le chapitre II sur la caractérisation des malts ont permis de choisir la variété F-2-20 pour la suite de l'étude. Les principaux facteurs qui ont orienté ce choix sont: les meilleures activités amylasiques, l'absence de tanins et la faible teneur en phénols totaux. Dès lors, une détermination de certaines caractéristiques des amylases comme leur comportement au pH et à la température s'avère nécessaire pour leur utilisation dans les procédés technologiques. Deux amylases, les α et β-amylases ont été étudiées. Les résultats (chapitre III) ont montré que les deux enzymes ont des activités optimales au même pH : 5,5. D'autre part, l'évaluation du comportement des enzymes à la température a montré que l'α‑amylase a un optimum à 65 °C tandis que la β-amylase est plus active à 55 °C. L'étude de la stabilité à la température a révélé que les deux enzymes incubées pendant 1h sont stables dans une gamme de températures allant de 25 à 50 °C. En plus, elles conservent 90 % de leurs activités lorsqu'elles sont incubées pendant une heure à leurs températures optimales respectives (65 et 55 °C). Par contre au delà de ces températures, la dénaturation des protéines commence jusqu'à devenir complète à 65 °C pour la β-amylase et 75 °C pour l'α-amylase. Le tableau 1 compare les propriétés des α et β-amylases de malt de sorgho résultant de différentes études.

Les résultats obtenus avec l'α-amylase de la F-2-20 (pH optimum et température optimale) sont comparables avec ceux reportés par Nour et Yagoub (2010) et Egwin et Oloyede (2006). L'étude de la thermostabilité des enzymes (chapitre III) a aussi montré que l'α-amylase est très stable à 65 °C. Rappelons que la thermostabilité est une propriété très recherchée industriellement.

**Tableau 1**. Comparaison des propriétés α et β-amylases de malt de sorgho

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **pH optimum** | | **Température optimale** | | **Température de dénaturation** | |
|  | α-amylase | β-amylase | α-amylase | β-amylase | α-amylase | β-amylase |
| Dans cette étude | 5,5 | 5,5 | 65 °C | 55 °C | 75 °C (60 min d’incubation) | 65 °C (60 min d’incubation) |
| Nour et Yagoub (2010) | 5,0 | 5,5 | 70 °C | 50 °C | 90 °C (10 min d’incubation) | 80 °C (10 min d’incubation |
| Egwin et Oloyede (2006) | 5,8 | ND | 70 °C | ND | ND | ND |
| Kumar et al. (2005) | 4,5-5,0 | ND | 60 °C | ND | 85 °C (15 min d‘incubation) | ND |

ND : non déterminer

Suite à la caractérisation biochimique des α et β-amylases du malt de sorgho, les travaux se sont orientés vers l'étude génétique de la β-amylase du sorgho (variété F-2-20). Cette enzyme a été bien étudiée sur le plan génétique chez des espèces végétales comme l'orge (*Hordeum vulgare*), le seigle (*Secale cereale*), le blé (*Triticum aestivum*), l’arabette (*Arabidopsis thaliana*), le riz (*Oryza sativa*), le maïs (*Zea mays*) et chez certains microorganismes : *Bacillus ssp*, *Clostridium thermosulfurogenes*. Son évolution au cours du développement et de la germination chez les céréales a aussi fait l’objet de nombreuses recherches (Daussant, 1994). Chez les céréales principalement dans la tribu des Triticales (orge, blé, seigle), la β-amylase existe sous deux formes : la β-amylase de l’endosperme (majoritaire) et la β-amylase ubiquitaire. Comme décrit par Daussant (1994), la β-amylase de l’endosperme est caractérisée par trois particularités physiologiques et physicochimiques : son accumulation dans l’albumen au cours de la maturation du grain, un polymorphisme marqué à plusieurs niveaux (au niveau du grain : forme libre ou liée, au niveau de la masse moléculaire et au niveau du polymorphisme électrophorétique) et enfin des modifications post traductionnelles au cours de la germination. Contrairement à celle de l’orge, la β-amylase du sorgho ne s’accumule pas dans le grain mûr, apparaît synthétisée au cours de la germination et son polymorphisme est très peu prononcé voire inexistant. Le gène de la β-amylase de la variété de sorgho F-2-20 a été recherché dans cette étude afin de comparer sa structure protéique à celle déjà établie chez d’autres céréales. Partant de l’ARNm, le gène de la β‑amylase a été recherché par RT-PCR "Reverse Transcription PCR". Des paires d’amorces pour les réactions PCR ont été conçues à partir des séquences publiées de l’enzyme dans Genbank et dans la littérature. Les produits obtenus suite aux réactions PCR et RACE-PCR ont été séquencés. Les séquences ont été ensuite traduites en acides aminés et avec le logiciel Vector NTI., le poids moléculaire théorique de notre séquence a été estimé à 54508 Da, valeur qui se situe bien dans l’intervalle 40000 et 60000 Da donné dans la littérature pour le poids moléculaire de la β-amylase. L’alignement de la séquence d’acides aminés de la β-amylase du sorgho (numéro d’accès GU017481) avec celles de la β-amylase ubiquitaire de céréales a révélé 92 % de similarité entre la séquence du sorgho et celle du maïs (numéro d’accès NP 001105496.1) ; 85 % de similarité avec la β-amylase ubiquitaire de l’orge (numéro d’accès AA37357.1) et 84 % de similarité avec la séquence de la β-amylase du riz (numéro d’accession AAA33898.1). Pujadas et al. (1996) ont montré une importante homologie des acides aminés de la β-amylase chez les plantes y compris une conservation de plusieurs caractéristiques structurelles notamment la conservation de huit régions différentes. La séquence d’acides aminés trouvée dans cette étude renferme ces huit régions conservées mais, il y a quelques différences au niveau de certains acides aminés situés dans les zones impliquées dans l’activité de l’enzyme.

L'étude génétique s’est arrêtée au séquençage du gène de la β-amylase du sorgho. Mais, il serait très intéressant d'aller plus loin dans cette voie, étudier par exemple son expression dans des vecteurs. A ce jour, de nombreux travaux sont faits sur le clonage et l'expression de la β-amylase soit de plantes (orge, blé, maïs etc.) soit de microorganismes (*Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes*, *Bacillus cereus*) (Nanmori et al., 1993; Özcan et Özcan, 2010; Yoshigi et al., 1994; Wang et al., 1997) mais pas sur le sorgho. En se basant sur les mécanismes moléculaires qui commandent la transcription et la traduction des protéines arrivera-t-on peut être à remédier à la faible expression de cette enzyme dans le sorgho ?

# 3. Hydrolyse d'amidons avec les amylases du malt de sorgho

La production d'oligosaccharides et de maltodextrines a été réalisée en utilisant comme source d'amylases, la meilleure variété de sorgho: la F-2-20. Les résultats des tests d'hydrolyse des amidons (maïs et blé) et des farines (blé et manioc) obtenus au chapitre IV traduisent les potentialités d'utilisation des amylases du malt de sorgho. Les essais ont d'abord été effectués en fioles avec différentes concentrations de malt. Les paramètres du procédé d'hydrolyse ont été définis en se basant sur les propriétés de l'α-amylase déterminées dans le chapitre III (pH 5,5 et à 65 °C). L’hydrolyse s'est déroulée suivant deux procédés durant 6 heures. Le premier procédé utilisait seulement le malt de sorgho dans l'hydrolyse. Le second procédé associait le malt et différentes concentrations de calcium. Le dextrose équivalent (DE) établi sur base de la concentration en glucose a été évalué par prélèvement réalisé au cours des 6 heures d’hydrolyse. Les résultats montrent que globalement le DE s'élève au cours de l'hydrolyse et ce avec l'augmentation de la concentration de malt. Les valeurs notées pour le DE en début et à la fin des réactions d'hydrolyse sont plus élevées avec l'amidon de maïs qu'avec l'amidon de blé. Des DE semblables à ceux obtenus avec l'amidon de maïs, ont été reportés par Sadeghi et al. (2008) qui ont utilisé une α-amylase Thermamyl 2-×® (180-240 KNU/g). Les DE les plus importants enregistrés dans l'hydrolyse de la farine de blé, pourraient s'expliquer par la présence d'amylases endogènes augmentant la vitesse d'hydrolyse. Avec la farine de manioc, l'hydrolyse a été effectuée sur des solutions à 15 % au lieu de 30 % pour les amidons (maïs et blé) et la farine de blé. Les DE obtenus sont dans les mêmes ordres de grandeur que ceux du maïs et du blé. Ayernor et al. (2002) ont trouvé que la farine de manioc est plus facile à hydrolyser que les autres farines. En hydrolysant de la farine de manioc avec du malt de riz, ils ont obtenu en 2 heures de réaction un dextrose équivalent de 44 %.

Le rôle joué par le calcium dans le maintien de l'activité catalytique et structurale des α-amylases est bien connu. Dans certains cas, une simple variation de concentration de calcium peut avoir des influences. Mais, il y a certaines α-amylases qui catalysent la réaction indépendamment de la teneur en calcium (Yadav, 2012). Dans cette étude, l'ajout de calcium n'apporte pas une nette amélioration des rendements d'hydrolyse. Les résultats ne montrent pratiquement pas de hausse de rendement pour l'amidon de maïs et l'amidon de blé.

Les meilleurs rendements obtenus avec l'hydrolyse de la farine de manioc (76 %) appuient bien les idées d’Ayernor et al. (2002) et de Moore et al. (2005), selon qui les granules de l’amidon du manioc sont plus sensibles à l’attaque des amylases. En utilisant l'α‑amylase de Thermamyl-120L® dans l'hydrolyse de l'amidon de manioc, Moore et al. (2005) ont rapporté des rendements similaires à ceux de cette étude.

A travers les résultats des tests d’hydrolyse en fioles, l’aptitude du malt de sorgho à produire des maltodextrines (des hydrolysats avec un DE inférieur à 20) et des sirops de glucose (DE supérieur à 20) a été démontrée. Le DE désiré peut être obtenu soit en utilisant une concentration faible en malt de sorgho sur une durée d’hydrolyse plus longue soit sur un temps court mais en augmentant la concentration de malt.

Le procédé d'hydrolyse de l'amidon de manioc est résumé dans la figure 3 ci-après. Le substrat est mélangé avec de l'eau, le mélange est ajusté à pH 5,5 avant d'être transvasé dans le réacteur. La solution portée à 95 °C permet une gélatinisation complète de l'amidon de manioc. Après refroidissement à 65 °C, la concentration adéquate de malt de sorgho est ajoutée. La température de 65°C sous laquelle se déroule l'hydrolyse est idéale pour l'activité de l'α-amylase en vue de favoriser la liquéfaction de l'amidon. L'hydrolyse est suivie dans le réacteur, de cette façon on arrête la réaction au DE désiré en dénaturant les amylases. Le surnageant recueilli après centrifugation (10000 g, 20 minutes à 4 °C) de l'hydrolysat est ensuite séché par atomisation pour être analysé et utilisé.

Solution d'amidon de manioc à 15 % (p/v) mélangée hors du réacteur

(volume 1,5 L)

Ajustement du pH de la solution (5,5) avec de l'acide acétique

Gélatinisation de l'amidon dans le réacteur et sous agitation à 95 °C suivi de refroidissement à 65 °C

Addition du malt de sorgho (0,13-0,23 % (p/p))

Hydrolyse à 65 °C sous agitation

Contrôle du DE et inactivation (thermique) des amylases à 90 °C

Centrifugation de l'hydrolysat

Séchage du surnageant par atomisation

**Figure 3.** Schéma descriptif du processus d'hydrolyse de l'amidon de manioc pour la production de maltodextrines.

L’hydrolyse a été ensuite transposée à plus grande échelle (bioréacteur de 2 L) afin de produire des maltodextrines avec différents DE et de déterminer leur composition chimique. Pour chacun des substrats étudiés, trois DE ont été réalisés et analysés afin d'établir la composition en oligosaccharides (chapitre IV). Des produits de faible poids moléculaire (glucose, maltose, isomaltose, maltotétraose et maltopentaose) et de gros poids moléculaire ont été décelés. Les résultats de quantification des sucres simples au Dionex montrent que le maltose, le maltopentaose et le maltotétraose sont majoritaires. Cependant, nous avons noté la présence de l'isomaltose et une absence de maltotriose dans les produits. L'absence de maltotriose pourrait s'expliquer par sa scission en glucose et en maltose d'où le pourcentage élevé de ce dernier. Ce constat a aussi été rapporté par Khartoon et al. (2009) dans l'analyse de leurs maltodextrines produites en hydrolysant de l'amidon de maïs avec l'α-amylase thermostable de *Bacillus liqueniformis*. Tandis que Sun et al. (2010) et Wang et Wang, (2000) ont détecté une large proportion de maltotriose dans leurs échantillons.

Cette étude a montré qu'il est bien possible d'utiliser le malt de sorgho de la variété F2-20 comme source d'enzymes pour produire des maltodextrines. Bien que les résultats soient encourageants, il serait possible d'optimiser le procédé. En effet une amélioration du processus consisterait à obtenir des DE désirés en un temps d'hydrolyse très court.

# 4. Caractéristiques des maltodextrines

Les maltodextrines sont largement utilisées dans les industries agro-alimentaires. A cause de leur pouvoir sucrant très faible (DE < 20), elles ont des fonctionnalités diverses. Elles sont employées comme support de séchage par atomisation. En pâtisserie et confiserie, elles aident à empêcher la cristallisation des sucres. Elles peuvent être utilisées dans les boissons en poudre, sauces salées et sucrées, glaces et desserts. Leurs utilisations dépendent de leurs propriétés. Celles-ci ont été analysées par différentes méthodes : diffraction aux rayons X, mesure de la viscosité et de la transition vitreuse et variation de la masse en fonction de la température.

Les résultats de l’analyse des produits aux rayons X (Chapitre V) montrent une disparition de la structure cristalline de départ des amidons. Des pics résiduels de la cristallinité ont cependant été observés dans les maltodextrines de faible DE du maïs et du manioc. Ces modifications de la structure cristalline montrent que les amylases agissent, aussi bien dans les régions amorphes que dans les régions cristallines. Ces observations corroborent les résultats reportés dans la littérature par Sun et al. (2010).

Les courbes du taux de cisaillement en fonction de la vitesse traduisent le comportement rhéologique des maltodextrines. Les résultats obtenus en appliquant un gradient de cisaillement sur les solutions de maltodextrines (30 %) ont montré, au début, un effet rhéofluidifiant des solutions pour ensuite devenir Newtonien. Comme la viscosité d’un polymère est en relation avec son degré de polymérisation, les maltodextrines ayant les DE les plus faibles c'est-à-dire renfermant les poids moléculaires les plus élevés sont plus visqueuses. Néanmoins les viscosités restent très faibles, ce qui est important pour leur utilisation comme matière de charge.

La transition vitreuse est un facteur important pour prédire le comportement en cours de conditionnement des polymères amorphes ou en partie amorphe (Ronkart et al. 2009). C’est une propriété physique importante qui traduit la stabilité des produits en poudre. Dans cette étude, la température de transition vitreuse des produits a été déterminée par refroidissement des solutions suite aux difficultés rencontrées dans l’analyse directe des poudres. Les résultats montrent que plus le degré de polymérisation est élevé (DE faible), plus la température de transition vitreuse augmente. Ces températures restent cependant faibles et suggèrent que certaines maltodextrines offriraient un système plus stable pour les applications alimentaires.

Dans les industries alimentaires et non alimentaires, les maltodextrines sont souvent soumises à des traitements à haute température et ces traitements peuvent modifier ou altérer leurs propriétés fonctionnelles. Pour avoir une vue d’ensemble du comportement de nos maltodextrines produites en fonction de la température, des analyses thermogravimétriques ont été effectuées. Les maltodextrines sont stables jusqu’à 50 °C, au-delà de cette température commence la diminution de masse des produits. Dans un premier temps, apparaît une faible perte de masse correspondant à l’évaporation des molécules d’eau contenues dans les produits aux environs de 100 °C. Ensuite on assiste à la dégradation des oligosaccharides de faible poids moléculaire à 220 °C et de plus gros poids moléculaire vers 300 °C. Ces résultats nous amènent à dire que les maltodextrines peuvent être choisies en fonction des températures auxquelles on veut les soumettre.

Le tableau 2 suivant compare les taux d'humidité et les temps de dissolution de certaines maltodextrines commerciales ayant les mêmes DE que celles produites dans cette étude. Les taux varient de 2,1 % (C4 maltodextrine de maniocDE 30) à 5,7 % (B3 maltodextrines maïs DE 10) et ceux des maltodextrines de cette étude sont même moins élevés sauf pour les DE supérieurs à 15. Le taux d'humidité des produits reflète les conditions de séchage principalement la température de sortie d'air.

Le temps de dissolution est une caractéristique instantanée différente des propriétés physico-chimiques. Il correspond au temps nécessaire pour l'immersion d'une poudre et la destruction des agrégats dans un liquide sous agitation. En comparant les maltodextrines de même DE, on constate dans certains cas des différences significatives sur les temps de dissolution. DC1 (maltodexrine de maïs DE 8)a mis 2 fois plus de temps que Maltrin M100 (maltodextrine de maïs DE 8) pour se dissoudre. Le temps de dissolution de la maltodextrine B3 (maltodextrine de manioc DE 10) est nettement supérieur à celui de Paselli MD10 (maltodextrine de pomme de terre DE 10) et de DCF1 (maltodextrine de manioc DE 10). Pour les maltodextrines ayant un DE de 15, Rice Trin 10 met plus de temps (3 minutes) pour se disperser, suivie par A3 (maltodextrine de maïs DE 10). Les mêmes performances sont observées pour DCF2 (maltodextrine de manioc) et DW1 (maltodextrine de blé) avec une réduction du temps par un facteur de trois. Avec des DE très proches, C4 (maltodextrine de manioc DE 30) présente un temps de dissolution supérieur à celui de DCF3 (maltodextrine de manioc DE 29) et celui de DW3 (maltodextrine de blé DE 28).

La solubilité d'une poudre dépend principalement de ces constituants chimiques comme les sucres et les matières grasses (Shittu et Lawal, 2007). Mais, elle peut être aussi influencée par les caractéristiques morphologiques (la taille et la forme des particules) qui sont déterminées par les conditions du procédé de séchage.

**Tableau 2**. Comparaison des maltodextrines produites dans cette étude avec des maltodextrines commerciales étudiées par Wang et Wang (2000) et Takeiti, Kieckbusch et Collares-Queiroz (2010).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produit** | **Source** | **DE (%)** | **Humidité (%)** | **Temps de dissolution (s)** |
| Maltrin M100\* | maïs | 8 | 5,6 | 73 |
| DC1\*\*\* | maïs | 8 | 3,1 | 143 |
| Paselli MD10\* | pomme de terre | 10 | 4,1 | 83 |
| DCF1\*\*\* | manioc | 10 | 3,3 | 100 |
| B3\*\* | maïs | 10 | 5,7 | 178 |
| DCF2\*\*\* | manioc | 15 | 3,3 | 74 |
| DW1\*\*\* | Blé | 15 | 3,2 | 87 |
| A3\*\* | maïs | 15 | 3,4 | 113 |
| Rice Trin 10\* | riz | 15 | 5,3 | 220 |
| DCF3\*\*\* | manioc | 28 | 3,4 | 43 |
| DW3\*\*\* | blé | 29 | 2,3 | 38 |
| C4\*\* | manioc | 30 | 2,1 | 98 |

\* Maltodextrines commerciales étudiées par Wang et Wang (2000).

\*\* Maltodextrines commerciales étudiées par Takeiti, Kieckbusch et Collares-Queiroz (2010).

\*\*\* Maltodextrines produites dans cette étude.

# Références bibliographiques

Ayernor G. S., Hammond T. K. & Graffham A., 2002. The combination of rice malt and amyloglucosidase for the production of sugar syrup from cassava flour. *Afri. J. Sci. Technol*. **3**, 11-18.

Bwanganga T. J-C., Béra F. & Thonart P., 2012. Optimizing red sorghum malt quality when Bacillus subtilis is used during steeping to control mould growth. *J. I. Brewing*, **118**, 295-304.

Ciacci C. et al., 2007. Celiac disease: In vitro and in vivo safety and palatability of wheat free sorghum food products. *Clin. Nutr.*, **26**, 799-805.

Cook N.C. & Samman S., 1996. Review: Flavonoids-chemistry,metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.,* **7**, 66-76.

Dahlberg J., Berenji J., Sikora V. & Latkovic D., 2011. Assessing sorghum (Sorghum Bicolor (L) Moench) germplasm for new traits: Food, fuel and unique uses. *Maydica*, **56**, 85-92.

Daussant J., 1994. Polymorphisme et diversité probable des systèmes isoenzymatiques de la β‑amylase chez les céréales : implications en malterie-brasserie. *Cerevisia and Biotechnology*, **19**, 18-21.

Dicko M. H., Gruppen H., Voragen A. G. J. & van Berkel W. J. H., 2006. Biochemical characterization of major sorghum grain peroxidase*. The FEBS Journal*, **273**, 2293-2307.

Dicko M. H., Hilhorst R. & Traore A. S., 2005. Indigenous west African plants as novel sources of polysaccharide degrading enzymes: application in the reduction of the viscosity of cereal porridges. *Afr. J. Biotechnol.*, **4**, 1095-1104.

Dicko M. H. et al., 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3780-3788.

Dlamini N R., Taylor J R N. & Rooney L W., 2007. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based food. *Food Chem.*, **105**, 1412-1419.

Dykes L. & Rooney L. W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.*, **44**, 236-351.

Egwin E. E. & Oloyede O. B., 2006. Comparison of α-amylase activity in sprouting Nigeria cereal. *Biokemistri*, **41**, 2282-2288.

Food and Agricultural Organisation of the United Nations, 2011. FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (14/12/2011).

Khatoon S., Sreerama Y. N., Raghavendra D., Bhattacharya, S., & Bhat, K. K., 2009. Properties of enzymes modified corn, rice and tapioca starches. *Food Res. Int.*, **42**, 1426-1433.

Kumar R. S. S., Singh S. A. & Rao A. G. A., 2005. Thermal stability of α-amylase from jowar (*Sorghum bicolor*). *J. Agri. Food Chem*., **53**, 6883-6888.

Letsididi R., Bulawayo B., Kebakile M. & Ezeogu L. I., 2008. Evaluation of indigenous Botswana sorghum cultivars with respect to their diastatic power, α-amylase, β‑amylase, and limit dextrinase potentials for malting. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 29-36.

Moore G. R. P., Canto L. R., & Amante E. R., 2005. Cassava and corn starch in maltodextrin production. *Quim. Nova,* **28**, 596-600.

Nanmori T., Nagai M., Shimizu Y., Shinke R. & Mikami B., 1993. Cloning of the β-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 623-627.

Nour M. E. M. EL & Yagoub S.O., 2010. Partial purification and characterization of α and β‑amylases isolated from Sorghum bicolor cv. (Feteria) malt. *J. Appl. Sci*., **10**, 1314‑1319.

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.

Ozcan B. D. & Ozcan N., 2010. Cloning and expression of thermostable β-amylase gene of *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* BR151. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*., **16**, 1011-1016.

Pontieri P. et al., 2011. Chemical composition and fatty acid content of white food sorghum grown in different environment. *Maydica*, **56**, 1-7.

Price M. L., Van Scoyoc S. & Butler L. G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1214-1218.

Pujadas G., Ramirex F.M., Valero R. & Palau J. 1996. Evolution of β-amylase: Patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. *Proteins*, **25**, 456-472.

Re R. et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. [*Free Radic. Biol. Med*](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed).*,* **26**, 1231-1237.

Ronkart S. N., Blecker C. S., Deroanne C. & Paquot M., 2009. Phénomène de la transition vitreuse appliquée aux glucides alimentaires amorphes à l’état de poudre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.,* **13**, 177-186.

Sadeghi A., Shahidi F., Mortazavi S. A. & Mahalati, M. N., 2008. Evaluation of different parameters effect on maltodextrin production by α-amylase Termamyl 2-x. [*World Appl. Sci. J.*](http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fidosi.org%2Fwasj%2Fwasj.htm&ei=JPpaUJuvNYbTtAbss4DABQ&usg=AFQjCNGyubkEuGmXCqOgDJzwzYlx0By_-w&sig2=CBjEEWw-M3kNmrHtCU8hUg) **3**, 34-39.

Shittu T. A. & Lawal M. O., 2007. Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chem.,* **100**, 91-98.

Sun J., Zhao R., Zeng J., Li G. & Li, X. 2010. Characterization of dextrins with different dextrose equivalents. *Molecules*, **15**, 5162-5173.

Sun Z. & Henson C. A. 1991. A quantitative assessment of the importance of barley seed α‑amylase, β-amylase, debranching enzyme, and α-glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.,* **284**, 298-305.

Takeiti C. Y., Kieckbusch T. G. & Collares-Queiroz F. P., 2008. Optimization of the jet stream instantizing process of commercial maltodextrins powders. *J. Food Eng*., **86**, 444-452.

Wang Y. J. & Wang L. 2000. Structure and properties of commercial maltodextrins from corm, potato and rice starches. *Starch/ Stärke*, **52**, 296-304.

Wang S. M., Lue W. L., Wu S. Y. Huang H. W. & Chen J., 1997. Characterization of a maize β‑amylase cDNA clone and its expression duing seed germination. *Plant Physiol*., **113**, 403-409.

Yadav J. K. 2012. A differential behavior of α-amylase, in terms of catalytic activity and thermal stability, in response to higher concentration CaCl2. *Int. J. Biol. Macromol.*, **51**, 146-152.

Yao L. H. et al., 2004. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **59**, 113-122.

Yoshigi N., Okada Y., Sahara H. & Koshino S., 1994. PCR cloning and sequencing of the β‑amylase cDNA from barley. *J. Biomol.* **115**, 47-51.

Yu L. & Zhou K., 2004. Antioxidant properties of bran extracts from ‘Platte’ wheat grown at different location. *Food Chem.*, **90**, 311-316.

Zhao H. et al., 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, **107**, 296-304.

Zhou K., Laux J J. & Yu L., 2004. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions of their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1118-1123.

.

# Chapitre VII

*Conclusions générales et Perspectives*

# Conclusions générales

Cette thèse est une contribution à l’étude des amylases et leurs applications. Les amylases sont utilisées tout au long du processus de transformation (liquéfaction et saccharification) industrielle de l’amidon. Les amylases d’origine microbienne priment sur les autres en raison de leur facilité de production et de leur stabilité élevée à haute température. Vu l'intérêt important de ces enzymes dans différents secteurs industriels, l’utilisation d’amylases « Low cost » et efficaces est un facteur important surtout pour les pays en développement comme le Sénégal. Dès lors, l’obtention de sources d’enzymes disponibles et peu coûteuses serait un atout pour les industries de ces pays. L'originalité de cette thèse est non seulement d'avoir caractérisé ces enzymes mais surtout d'avoir démontré leurs potentialités d’utilisation pour fabriquer des maltodextrines d'intérêt à partir de matières premières amylacées différentes. Le caractère original se situe aussi au niveau de la mise au point de procédés facilement transposables au Sénégal, que ce soit au niveau du maltage du sorgho cultivé dans le pays, de l'hydrolyse de l'amidon avec le malt et même du séchage des maltodextrines.

La première partie de cette étude était consacrée à la synthèse bibliographique. Elle reprend de manière générale les enzymes amylolytiques, leur mode de production et leurs propriétés. Les amylases d'origine végétale, à l'exemple des amylases du malt de sorgho y sont décrites ainsi que leurs potentialités d'utilisation. Bien que l'emploi d'amylases d'origine végétale dans le secteur industriel soit marginalisé par rapport à celles d'origine microbienne, les amylases du malt de sorgho pourraient être utilisées dans certaines applications industrielles à condition de déterminer leurs propriétés et de choisir la meilleure variété.

La deuxième partie de cette thèse fut le premier objectif de notre recherche expérimentale. Sept variétés de sorgho blanc sélectionnées à l’ISRA (Bambey Sénégal) ont été analysées pour déterminer leur teneur en composés phénoliques et en tanins condensés ainsi que leurs activités antioxydantes. Les variétés ont été aussi maltées pour voir leur capacité à produire des amylases. Parmi ces sept variétés, une s’est révélée la meilleure : la F2-20, compte tenu du niveau des activités amylasiques (α-amylase, β-amylase et pullulanase) de son malt. En outre, cette variété ne contient pas de tanins condensés et présente de faibles teneurs en composés phénoliques. Elle a donc été choisie pour la suite de nos travaux.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons caractérisé d’une part les propriétés des α et β-amylases du malt de la variété F-2-20 et d’autre part nous avons recherché le gène de la β-amylase. Les deux amylases (α et β-amylases) présentent le même pH optimum 5,5 et fonctionnent mieux respectivement à 65 et 55 °C. Le gène de la β-amylase de sorgho a été obtenu à partir de l’ARNm. La séquence protéique du gène, comparée à d’autres séquences déjà établies a montré des similarités élevées : 92 % avec la β-amylase du maïs, 85 % avec l’orge et 84 % avec le riz.

La quatrième partie fut la mise en application des amylases du malt de sorgho dans l’hydrolyse de différentes sources d’amidon : amidon de maïs, amidon de blé, farine de blé et farine de manioc. En travaillant à pH 5,5 et à 65 °C, des dextrines de dextrose équivalent (DE) variable sont obtenues en fonction de la concentration en malt utilisée et de la durée de la réaction. Parmi les substrats étudiés, le manioc a permis d’obtenir les rendements d’hydrolyse les plus importants. Les performances technologiques des amylases ne sont pas très renforcées suite à l’ajout d’ions calcium dans les solutions. La composition chimique des maltodextrines produites a montré que les amylases du malt de sorgho ont un potentiel d’application industrielle, car elles produisent des quantités non négligeables de sucres à courtes chaînes, principalement du maltose, du maltopentaose et le maltotétraose.

Enfin la cinquième et dernière partie des travaux nous a permis de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des maltodextrines produites. L’analyse des diagrammes de diffractionobtenus aux rayons X a montré une structure amorphe des produits. A des concentrations de 30 %, toutes les maltodextrines ont présenté des viscosités très faibles. La mesure de la température de transition vitreuse a permis d’établir une relation entre celle-ci et le DE. Une très grande stabilité des maltodextrines à la température a été mise en évidence. En effet, ce n’est qu’aux alentours de 210 °C qu’un début de dégradation des produits a été observé.

# Exploitation des résultats de l’hydrolyse

Une évaluation des coûts de production de la maltodextrine est réalisée dans le tableau suivant. L’estimation est faite sur la base d’une production annuelle dans une cuve de 20 m3. Cent quarante quatre cuves sont réalisées en utilisant au total 864 tonnes d’amidon et 792 tonnes de sorgho. Le coût total s’élève à 862000 € par an pour une production de 764 tonnes de maltodextrine, ce qui revient à 1,13 € le kg. Les frais du personnel estimés ici peuvent revenir moins chers si la production est réalisée au Sénégal (main d’œuvre plus accessible).

**Tableau 3** : Evaluation des coûts de production de maltodextrine

|  |  |
| --- | --- |
| **Etapes de la production** | **Coût annuel en €** |
| Achat et maltage du sorgho | 270000 |
| Amidon | 216000 |
| Charges directes | 3000 |
| Charges indirectes | 3000 |
| Personnel | 50000 |
| Séchage | 280000 |
| Amortissement | 40000 |
| **Coût total de production** | **862000** |
| Production annuelle (kg) | 763632 |
| Prix de revient du kg de maltodextrine | 1,13 |
| Prix de vente | 1,40 |
| **Bénéfice** | **207085** |

# Perspectives

A travers nos résultats, nous avons démontré les possibilités d’obtention d’amylases avec de bonnes activités par maltage du sorgho et leur application dans des processus d’hydrolyse. Mais nos travaux ouvrent aussi la voie à de nouvelles recherches :

1. Une purification des amylases du malt et leur immobilisation pourraient être explorées. Cette immobilisation pourrait permettre un recyclage des enzymes, un élargissement de leurs gammes de conditions d’utilisation (pH et température), une meilleure stabilité.
2. L’étude génétique de la β-amylase du sorgho pourra être poursuivie. Le gène trouvé pourrait être cloné dans un microorganisme et ainsi faciliter la production de l’enzyme. La mutagenèse dirigée peut constituer une autre option à tester pour améliorer les propriétés de l’enzyme.
3. Les résultats des essais obtenus au laboratoire pourront être conduits de manière à transposer l’hydrolyse à grande échelle tout en tenant compte de certains paramètres. En effet, le fonctionnement d’une enzyme change suivant les conditions d’application à l’exemple de l’agitation du milieu.
4. Ensuite, il faudra envisager le transfert de la technologie dans les pays du sud. Dans les pays en développement, les maltodextrines utilisées dans les industries sont toutes importées ce qui représente un coût non négligeable. Produire des maltodextrines à partir des ressources disponibles sur place aussi bien pour les enzymes que pour les substrats pourrait contribuer au développement de nos sociétés. L’Institut de Technologie Alimentaire (ITA) grâce à son partenariat avec le CWBI de Gembloux et la Communauté française de Belgique a su bénéficier d’un important dispositif technologique qui pourrait être utilisé pour la production de maltodextrines. Au Sénégal, le secteur agro-alimentaire est en plein essor. Des industries laitières, des industries de fabrication de jus de fruits et légumes, de boissons, de biscuiterie et de viennoiserie utilisent dans leurs produits de la maltodextrine, ce qui constitue une potentialité importante de marché.

# Liste des publications

**Articles scientifiques :**

Ba,K., Bwanganga, J.-C.,Tine,E., Béra, F., Destain,J. & Thonart, P. Les enzymes amylolytiques et leur application dans la transformation des produits amylacés : le cas du malt de sorgho en révision dans *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Ba,K., Tine, E., DestainJ., Cissé, N. & Thonart, P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 (1), 131-139.

Ba, K., Dubois-Dauphin R., Tine E., Destain J. & ThonartP. Crude amylase characterization and cDNA analysis β-amylase from sorghum malt (cv F-2-20**)**. Soumis

Ba, K., Aguedo M., Tine,E. Paquot, M., Destain, J. & Thonart P. (2013). Hydrolysis of starches and flours by sorghum malt amylases for dextrins production. *Eur. Food Res. Technol.*, DOI: 10.1007/s00217-013-1937-6

Ba, K., Blecker, C., Danthine, S., Tine, E., Destain, J. & Thonart P. Physicochemical characterization of dextrins prepared by amylases from sorghum malt. Accepté dans *Starch/Stârk*

**Posters :**

Ba, K., Destain, J & Thonart P. (2009, December 16). Hydrolysis of starch by sorghum malt for maltodextrin production. Poster présenté à la 2ème Journée de réflexion de l'EDT GEPROC : " Génie des procédés appliqué aux bio-industries ", Gembloux, Belgique.