

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE

Centre de Recherche en Sciences Biologiques,  
Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN)



**Purification et Propriétés Physico-chimiques des  
Enzymes de *Curculigo pilosa*, *Gladiolus klattianus*  
et *Boscia senegalensis* Catalysant l'Hydrolyse des  
Polysaccharides (Amidon et  $\beta$ -glucanes)**

**THESE**

**De Doctorat de Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE**

**Option: Enzymologie Alimentaire**

*Présentée par :*

**Mamoudou Hama DICKO**

*Maître ès-Sciences*

*Soutenue publiquement le 11 Juin 1999 devant la Commission d'Examen :*

**Président :** Pr. Jacques K. DIOPON, Professeur, Université de Cocody (RCI)

**Membres :** Pr. Gnissa KONATE, Directeur de recherche, C.N.R.S.T. (BF)

Pr. Odile G. NACOULMA, Maître de conférences, Université de Ouagadougou (BF)

Pr. Alfred S. TRAORE, Professeur, Université de Ouagadougou (BF)

## REMERCIEMENTS

L'organisation néerlandaise pour la coopération à l'éducation au supérieur **NUFFIC** (projet MHO), est remerciée pour la bourse Jan Tinbergen Fellowships Programme (TSP) qu'elle nous a octroyé, et qui nous a permis de réaliser une grande partie de ce travail à l'Université Agronomique de Wageningen, au Pays-Bas.

Nous sommes très reconnaissants à notre promoteur, le **Professeur Alfred S. TRAORE**, titulaire de la Chaire de Biotechnologie à l'Université de Ouagadougou pour nous avoir accueilli dans son laboratoire (**CRSBAN**), nous avoir initié dans le domaine de la Biochimie, plus particulièrement en Enzymologie, et pour ses discussions enrichissantes.

Nous remercions notre co-promoteur le **Professeur Frans M. ROMBOUTS**, titulaire de la Chaire de Microbiologie Alimentaire de l'Université Agronomique de Wageningen, pour nous avoir autorisé à conduire des recherches dans son laboratoire et pour son assistance technique et encourageante durant la recherche.

Nous tenons à remercier très profondément le **Professeur Fons A. G. J. VORAGEN**, titulaire de la Chaire de Chimie Alimentaire et Enzymologie de l'Université Agronomique de Wageningen, pour son support sans faille dans la réalisation de ce travail et pour nous avoir autorisé encore à poursuivre des recherches dans son laboratoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude au **Professeur Jacques K. DIPOH**, de l'Université de Cocody, pionnier de la recherche en Biochimie (enzymologie en particulier) en Afrique, pour l'honneur qu'il nous offre en président ce jury.

Nos remerciements s'adressent également au **Professeur Gnissa Konaté**, Directeur de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CNRST) pour sa disponibilité à juger ce présent travail.

Nous remercions le **Professeur Odile G. NACOULMA-OUEDRAOGO**, Chef du département de Biochimie et Microbiologie à l'Université de Ouagadougou, pour sa contribution au choix des plantes ciblées dans cette étude et pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous sommes également très reconnaissants à **Marjo J. F. Searle-van LEEUWEN**, **Dr. Riet HILHORST** et **Dr. Gerrit BELDMAN**, pour avoir accepté de partager avec nous leurs expériences sur la purification et la caractérisation des carbohydrolases.

Mes collègues chercheurs de Levensmiddelenhygiëne en -microbiologie et Levensmiddelenchemie de l'Université Agronomique de Wageningen, et ceux du Département de Biochimie et Microbiologie de l'Université de Ouagadougou sont remerciés pour leur contribution à l'aboutissement de ce travail.

C'est une grande opportunité qui m'a été offerte ici pour remercier mon père monsieur Elhadji Hama H. **DICKO (BIRABIA)** pour sa compréhension et son support moral et financier durant toutes mes études.

Tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail (épouse, amis, frères et sœurs) sont remerciés.

## RESUME

L'objectif de cette étude était de rechercher de nouvelles sources moins cher d'enzymes dégradant les polysaccharides telles que les amylases et les  $\beta$ -glucanases, à partir des plantes locales pour des applications biotechnologiques. L'isolement de deux  $\beta$ -amylases et d'une endo-1,3- $\beta$ -glucanase a été faite en utilisant des méthodes classiques de purification des protéines telles que l'extraction avec une solution tampon, la précipitation au sulfate d'ammonium et les chromatographies d'échange d'ions et de filtration sur gel. Les méthodes utilisées sont simples et facilement reproductibles, suggérant la possibilité de les adapter pour une production à grande échelle.

Dans les rhizomes non germés de *C. pilosa*, seule l'activité d'une  $\beta$ -amylase a été détectée. L'enzyme a été purifiée avec un rendement de 38 %, correspondant à un facteur de purification de 100, et une activité spécifique finale de 4860 à 5650 U/mg. L'enzyme est une protéine monomérique ayant une masse moléculaire de 64 kDa, un pI de 4,2 (pH acide), et il a été montré que l'enzyme est une  $\beta$ -amylase thermostable (50 à 65°C) capable d'hydrolyser de l'amidon brut.

Les bulbes non germés de *G. klattianus* renferment à la fois une  $\alpha$ -amylase et une  $\beta$ -amylase. Cependant, la  $\beta$ -amylase est l'enzyme amylolytique majoritaire dans l'extrait brut (92 %) et son activité est d'environ 444 U/g de matière fraîche; valeur similaire à l'activité de la  $\beta$ -amylase du malt de l'orge germé (400-500 U/g). L'enzyme a été purifiée (47 fois) et partiellement caractérisée. Le rendement final de la purification a atteint 75 %, donnant une activité spécifique de 2360 U/mg. L'enzyme est une protéine dimérique ayant une masse moléculaire de 72 kDa.

Les feuilles de *B. senegalensis* renfermant un complexe multi-enzymatique dégradant les polysaccharides. Les activités de l' $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-exo-glucanase et  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-endo-glucanase sont respectivement 15, 207, 11 et 34 U/g de matière fraîche. L'endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanase (EC: 3.1.1.39), une enzyme dégradant les parois cellulaires, a été purifiée. Le rendement typique de la purification est de 57 %, une activité spécifique finale de 549,2 U/mg, correspondant à un facteur de purification de 203. L'enzyme est une protéine basique (pI  $\geq$  10,3), non glycosylée, possédant une masse moléculaire de 36 kDa. L'enzyme est capable d'hydrolyser les substrats solubles (laminarine), les substrats insolubles ( $\beta$ -glucanes des parois cellulaires des levures), et même d'inhiber la croissance des levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*). Ces propriétés pourraient être liées à l'utilisation traditionnelle des feuilles de *B. senegalensis* pour la protection des céréales contre les insectes et les microbes.

Les enzymes dégradant les polysaccharides telles que les amylases et les  $\beta$ -glucanases sont de nos jours au centre des procédés d'ingéniosité alimentaire, possédant de nombreuses applications en biotechnologie. Ces enzymes sont surtout utilisées pour produire des aliments à valeur nutritive ajoutée (farines de sevrage), dans la production des sirops à teneur élevée en maltose et en brasserie. Les enzymes isolées dans la présente étude, particulièrement les amylases pourraient être utilisées dans la préparation des boissons alcoolisées à base du sorgho, car le malt de sorgho est déficient en  $\beta$ -amylase. En outre, cette investigation constitue une voie de valorisation de sources nouvelles d'amylases et de  $\beta$ -glucanases à partir de plantes supérieures locales. De plus, les enzymes très pures et moins cher auront un futur intéressant pour des applications biotechnologiques telles que l'ingénierie génétique, l'immobilisation des enzymes et pour des besoins analytiques.

**ABSTRACT**

The objective of this study was the research of novel and inexpensive sources of polysaccharides degrading enzymes such as amylases and glucanases from local plants in order to justify their biotechnological applications. The isolation of two  $\beta$ -amylases and an endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase was reached using common protein purification methods such as buffer extraction, ammonium sulfate fractionation, ion-exchange and gel filtration chromatographies. The methods used were simple and easily reproducible, suggesting the possibility of large-scale production.

In the crude extract of *Curculigo pilosa* tuber, only  $\beta$ -amylase was detected as starch degrading enzyme and its activity was approximately 282 U/g of fresh material. The enzyme was purified 100 fold with 38 % yield and giving a final specific activity of 4860 U/mg of the purified protein. The enzyme was determined to be a monomer protein of 64 kDa molecular mass, its isoelectric point was about 4.2 and it was shown to be thermostable enzyme possessing the ability to hydrolyze raw starches.

In the bulb of *Gladiolus klattianus* both  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase activities have been detected. However, the  $\beta$ -amylase was the major starch degrading enzyme (92 %), and its activity was about 440 U/g of fresh material, value similar with that of the  $\beta$ -amylase from barley malt (400-500 U/g). The enzyme was isolated (47 fold) from the bulb by the mean of simple purification techniques and partially characterized. The final purification recovery was up to 75 % giving a specific activity of 2360 U/mg. The enzyme is a dimeric protein with a molecular mass of 72 kDa.

The crude extract of the leaves of *Boscia senegalensis* contained a multienzymic complex of polysaccharide degrading enzymes. Activities of  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-exo-glucanase and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-endo-glucanase were respectively equal to 15; 207, 11 and 35 U/g of fresh plant material. The endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase (EC: 3.1.1.39), a cell wall degrading enzyme, has been purified. The typical yield of the purification was 57 % with 203 purification fold and a final specific activity of 549.2 U/mg. The enzyme is a basic protein ( $pI \geq 10.3$ ), no glycosylated and was able to hydrolyze soluble substrate (laminarin), insoluble substrate (yeast cell wall  $\beta$ -glucan) as well as to inhibit the growth of living yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). These properties may be related to the traditional use of this species for cereal protection against microbial or insect invasions.

Polysaccharide degrading enzymes such as amylases and glucanases are nowadays at the center of food process engineering, evolving enormous applications in biotechnology. These enzymes are especially used in the production of improved nutritive value foods (weaning flour), high maltose-containing syrup and in brewery. The isolated and characterized enzymes in the present work, especially the  $\beta$ -amylases could be used for sorghum beer manufacture to improve its value, because the malted sorghum lacks this enzyme. It could be one way to improve the economical value of a local products widely consumed in whole West African area. Furthermore this could be also a way to enhance the value of novel sources of amylases and glucanases from local higher plants. In addition, more purified and low cost enzymes will have interesting future for biotechnological applications such as genetic engineering, enzyme immobilization and analytical purposes.

# SOMMAIRE

Page

<b>Abréviations</b> .....	1
---------------------------	---

<b>Introduction Générale</b> .....	2
------------------------------------	---

## **Première Partie : Bibliographie**

I. Les Enzymes.....	5
---------------------	---

II. Les Enzymes Dégradant les Polysaccharides .....	6
---	---

II.1 Les Amylases.....	7
------------------------	---

II.2 Les $\beta$ -Glucanases.....	13
-----------------------------------	----

III. Utilisation des enzymes exogènes en brasserie.....	15
---	----

IV. importance biochimique de la purification et de la caractérisation des enzymes.....	18
---	----

## **Deuxième Partie : Matériels et Méthodes**

I. Matériels et produits chimiques .....	24
--	----

I.1 Matériel végétal.....	24
---------------------------	----

I.2 Produits chimiques.....	24
-----------------------------	----

I. Purification des enzymes.....	25
----------------------------------	----

II.1 Extraction des enzymes.....	25
----------------------------------	----

II.2 Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium et lyophilisation .....	26
--	----

II.3 Chromatographie Liquide Rapide des Protéines (FPLC).....	27
---	----

III. Détermination des activités enzymatiques.....	28
--	----

III.1 Dosage des sucres réducteurs par le réactif au 2,2'-disodium bicinchoninate	
---	--

(Essai au BCA).....	29
---------------------	----

III.2 Utilisation des substrats spécifiques.....	29
--	----

IV. Dosage des Protéines.....	31
-------------------------------	----

V. Identification des produits d'hydrolyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et par Spectrométrie de Masse (MALDI-TOF) .....	32
VI. Détermination de la configuration anomérique des produits d'hydrolyse enzymatique.....	34
VII. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	35
VIII. Détermination de la glycosilation des enzymes.....	38
IX. Influence du pH, de la température et des composés chimiques sur l'activité et la stabilité des enzymes.....	39
X. Détermination des paramètres cinétiques des enzymes.....	40
XI. Détermination de l'activité lytique des enzymes.....	40

## **Troisième Partie : Résultats et Discussion**

### **Chapitre 1.**

Purification et caractérisation de la $\beta$ -amylase de <i>Curculigo pilosa</i> .....	41
---	----

### **Chapitre 2**

Purification de la $\beta$ -amylase de <i>Gladiolus klattianus</i> .....	62
--	----

### **Chapitre 3**

Purification et propriétés de l'Endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanase des feuilles de <i>Boscia senegalensis</i> .....	75
--	----

<b>Conclusion générale</b> .....	98
----------------------------------	----

<b>Références</b> .....	104
-------------------------	-----

<b>Annexes</b> .....	120
----------------------	-----

**Abréviations:**

AZCL-amylose, azurine-crosslinked-amylose

BCA, disodium 2,2'-bicinchoninique acide

BSA, sérum albumine bovin

CM-cellulose, carboxymethyl cellulose

DP, degré de polymérisation

DTT, dithiothreitol

E<sub>a</sub>, énergie d'activation

FPLC, chromatographie liquide rapide des protéines

HPAEC, chromatographie d'échange d'anions à haute performance

HPLC, chromatographie liquide à haute performance

HPSEC chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance

MALDI-TOF mass spectrometry, spectrométrie de masse de désorption/ionisation au laser assistée d'une matrice-temps de vol

PAD, détection ampèrométrique impulsée

PMSF, phénylméthanesulphonyl fluoride

PNPG5, *p*-Nitrophenyl maltopentaoside

Q<sub>10</sub>, Rapport de V<sub>max</sub> à T<sub>2</sub> sur V<sub>max</sub> à T<sub>1</sub> tel que T<sub>2</sub>-T<sub>1</sub> = 10°K

RI-réponse, Réponse par indice de réfraction différentiel

# **INTRODUCTION GENERALE**



Les plantes sont traditionnellement utilisées comme réserves naturelles d'un grand nombre de produits entrant dans l'alimentation, la production de fibres, de produits cosmétiques, de produits artisanaux et de combustibles. Le métabolisme des plantes offre la possibilité de produire plus de 100 000 composés de structures différentes (Thomasset et Chopplet, 1997). Les plantes renferment des vitamines, des terpénoïdes, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des pesticides, des acides gras spécifiques, des colorants, des arômes et des enzymes hydrolytiques (polysaccharidases, oxydases et protéases). Les plantes riches en ces composés sont dites "plantes d'intérêt économique et à valeur stratégique" (Wink, 1988). Depuis, les recherches intensives sur leur mécanisme fonctionnel, leurs propriétés catalytiques et leur structure, ont permis d'identifier près de 2500 enzymes (Larreta-Garde, 1997). Il est connu sans ambiguïté que les enzymes catalysent la quasi-totalité sinon toutes les réactions biochimiques du monde vivant.

Depuis des décennies, les feuilles de *Boscia senegalensis*, les rhizomes de *Curculigo pilosa* et les bulbes de *Gladiolus klattianus* sont utilisés en Afrique de l'Ouest, plus particulièrement au Burkina Faso pour des besoins nutritionnels (Touzeau, 1973; Kerharo, 1973; Berhaut, 1974; Fabregues et Lebrun, 1976; Baumer, 1981; Becker, 1986; Diarra, 1995) et pharmacologiques (Touzeau, 1973; Kerharo, 1973; Berhaut, 1974). Leur utilisation est également répandue dans la préparation de la bière de sorgho (dolo). La poudre de ces espèces est souvent mélangée aux bouillies de céréales destinées à l'alimentation infantile, afin d'améliorer leur goût ou d'augmenter leur pouvoir diastasique. Il faut noter à ce titre que l'extrait aqueux de *B. senegalensis* a été testé avec succès dans notre laboratoire, dans la formulation des aliments de complément pour les enfants âgés d'au moins 6 mois (Nanéma, 1998).

Ces recherches nous ont permis de présumer que les espèces ciblées pourraient constituer des réserves intéressantes d'enzymes dégradant les polysaccharides, plus

particulièrement les amylases et les  $\beta$ -glucanases. En effet, un screening de ces enzymes, réalisé récemment dans notre laboratoire (Annexes I et II) nous a permis de confirmer cette hypothèse (Dicko *et al.*, 1996a; 1996b; Angoue, 1996).

En outre, les feuilles de *B. senegalensis* sont d'utilisation courante en Afrique de l'Ouest pour protéger les grains de céréales contre les insectes ravageurs et les champignons (Touzeau, 1973; Kerharo, 1973; Berhaut, 1974; Seck *et al.*, 1993). L'activité biocide de ces feuilles a été justifiée par la détection et la caractérisation des composés organiques possédant une activité insecticide (Lognay *et al.*, 1994). Cependant, aucune investigation enzymatique en rapport avec cette activité n'avait été réalisée auparavant. Les endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanases sont pourtant bien connues comme enzymes dégradant les parois cellulaires, largement utilisées en brasserie et aussi comme "hydrolases antifongiques" ou "protéines liées à une pathogénicité" (Kauffmann *et al.*, 1987; Boller, 1987; Kombrink *et al.*, 1988; Mauch *et al.*, 1988; Broglie *et al.*, 1991; Leah *et al.*, 1991; Grenier et Asselin, 1993; Churngchow *et al.*, 1995; Repka *et al.*, 1997). L'utilisation empirique des feuilles de *B. senegalensis* pour la protection des céréales contre les agents pathogènes et dans la fabrication de la bière de mil, nous a guidés à présumer qu'elles possèdent une activité endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanasique très élevée. Ce qui pourrait justifier en partie ses utilisations traditionnelles.

Dans toute l'Afrique de l'Ouest à part le Nigeria, les malts de céréales et les enzymes exogènes sont importés de l'étranger, pour les besoins industriels. En outre, aucune amylase de source locale n'est utilisée à grande échelle pour améliorer la qualité digestive des farines de céréales (farine diastasée), destinées à l'alimentation des bébés. Par contre dans les pays développés, les micro-organismes aussi bien que le seigle, le céleri, la pomme de terre, le radis, le soja et l'orge sont utilisés pour l'extraction de diverses enzymes amylolytiques. La recherche de nouvelles sources d'enzymes à partir de plantes et de micro-organismes, qui

sont abondantes et relativement moins cher, est donc d'un grand intérêt. Surtout, lorsque que l'on sait que les enzymes trouvées seraient d'un apport exogène pour améliorer la qualité du malt du sorgho, qui est déficient en maltohydrolases (Aisen et Muts, 1987; Taylor, 1992; Etokakpan, 1992; Verbruggen, 1996; Boivin, 1997).

De nos jours, il existe également une demande croissante d'enzymes hautement purifiées et de faible coût pour les applications biotechnologiques telles que l'ingénierie génétique, l'immobilisation des enzymes et pour des besoins analytiques.

L'objectif de cette étude est: 1°) de donner un spectre d'enzymes dégradant les polysaccharides telles que les amylases et les glucanases à partir de chaque espèce, 2°) d'isoler l'enzyme la plus abondante de chaque espèce afin de déterminer ses propriétés physico-chimiques et catalytiques, 3°) de justifier leurs applications biotechnologiques en les valorisant économiquement.

***PREMIERE PARTIE***

**BIBLIOGRAPHIE**

## I. LES ENZYMES

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible sans subir aucune transformation en ce qui concerne leurs structures initiales. Le développement récent du concept des catalyseurs au dix-neuvième centenaire a évolué pas à pas avec la découverte de puissants catalyseurs de source biologique. Ceux-ci ont été appelés ENZYMES et ensuite identifiés comme protéines. Les enzymes coordonnent toutes les réactions de dégradation et de synthèse qui se déroulent dans les organismes vivants. Les enzymes accélèrent les réactions par des facteurs exceptionnels de l'ordre de  $10^6$  et peuvent exprimer ce pouvoir dans les deux sens de la réaction, lorsque celle-ci est réversible. C'est pour cette raison que les enzymes sont employées de façon croissante dans les hautes technologies de ce siècle, occupant une partie importante dans l'expansion biotechnologique. Leur utilisation a créé des affaires de milliards de dollars dans les domaines des procédés industriels de produits de consommation et dans le bourgeolement des biosenseurs (Chaplin et Bucke, 1990). Parmi les avantages des enzymes résident leur spécificité et leur sélectivité non pas pour une réaction particulière, mais aussi pour leur discrimination entre des parties similaires des molécules (régiospécificité). Les enzymes travaillent généralement dans des conditions modérées de température (0-70°C), de pression (1 atm) et de pH (3-8). Cela diminue les besoins en énergie, engendre un gain de temps, réduit le coût économique et de plus permet d'éviter les réactions auxiliaires non désirées, comme celles rencontrées avec les catalyseurs chimiques classiques.

Toutes les enzymes sont constituées d'une ossature protéique (apoenzyme). Dans certaines enzymes, celle-ci est la seule composante de la structure. Des résidus non-protéiques (aglycones) additionnels sont souvent présents. Ceux-ci pourraient participer ou

non à l'activité catalytique. Des groupements d'hydrates de carbone covalentiellement liés sont couramment rencontrés comme composantes structurales. Généralement, ils ne participent pas directement à l'activité catalytique, cependant ils affectent la stabilité, la solubilité et le transport (intracellulaire et extracellulaire) de l'enzyme. Des ions métalliques (cofacteurs) et des molécules organiques de faible masse moléculaire (coenzyme) agissent souvent comme des facteurs essentiels de la catalyse enzymatique.

## **II. LES ENZYMES DEGRADANT LES POLYSACCHARIDES**

Dans le groupe des produits préparés industriellement, les enzymes clivant les polysaccharides occupent une position relativement modeste (Somers *et al.*, 1989; Somers, 1992). Les groupes majoritaires d'enzymes convertissant les polysaccharides sont: les enzymes dégradant l'amidon ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, amyloglucosidase et pullulanase), les pectinases, les cellulases, les hémi-cellulases ( $\beta$ -glucanases) et les enzymes convertissant les monosaccharides (glucose oxydase, glucose isomérase,  $\beta$ -galactosidase, invertase, etc.).

L'application des enzymes effectuant la scission des polysaccharides en industrie des boissons est essentielle, pour la production rapide des jus de fruits à rendements élevés (Somers *et al.*, 1989, Cheetam, 1995). L'un des objectifs de cette application est d'éliminer les colloïdes ou les polymères formant des gels tels que les pectines, l'amidon, les gommes et les protéines (Turecek *et al.*, 1990). Ces derniers provoquent la buée et la turbidité. Un jus de fruit clair ne pourrait être obtenu que si les enzymes dépolymérisant les polysaccharides sont utilisées (Turecek *et al.*, 1990). En outre, l'élimination des polysaccharides stabilisant les colloïdes et l'hydrolyse des parois cellulaires aident à éviter le trouble de post-clarification.

L'utilisation des pectinases et des  $\beta$ -glucanases dans le processus de fabrication des jus de fruits, augmente leurs rendements en sucres et améliore leur filtration. Un obstacle pratique du brassage avec les céréales, plus particulièrement avec le malt de l'orge et du sorgho, est la pauvre filtrabilité du moût et de la bière finale (Aisen et Muts, 1987; Taylor, 1992; Verbruggen, 1996). Jusqu'à présent, les expériences en pâtisserie et en brasserie sont améliorées par un supplément exogène (d'origine bactérienne ou végétale) d'amylases, d'endo-glucanases et de protéases.

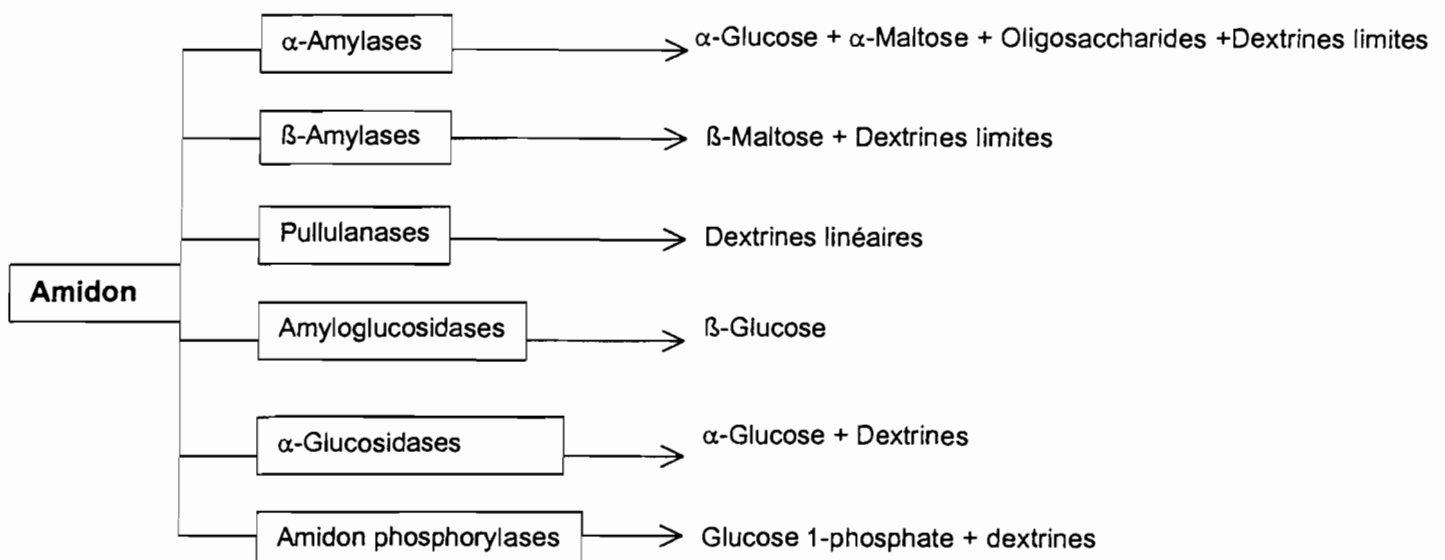
Les enzymes amylolytiques, pectinolytiques, cellulolytiques et protéolytiques sont d'utilisation courante dans les procédés pointus, mais actuellement sur le plan technique et économique les amylases et les pectinases sont les plus importantes (Chaplin et Bucke, 1990; Gerhartz, 1990, Cheetam, 1995; Godfrey et West, 1996).

## **II.1 LES AMYLASES**

Les amylases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'amidon.

L'amidon est le principal polysaccharide de réserve des végétaux. Il est abondant dans les racines, les tiges, les feuilles, les fruits et les graines d'une variété de plantes dans la nature. Les grains de céréales tels que le riz, le maïs, le blé et le sorgho sont majoritairement constitués d'amidon (70-78 %) (Godfrey et West, 1996). L'amidon est localisé dans les chloroplastes au niveau du stroma, occupant une fonction de réserve énergétique et entrant dans l'architecture cellulaire. Structurellement, l'amidon n'est pas un polymère homogène car il est composé de deux homo-polysaccharides de poids moléculaires élevés: l'amylose (DP 200-600) et l'amylopectine (DP  $10^5$ - $10^9$ ). Les proportions de l'amidon et de ses deux polymères varient d'une plante à l'autre (Godfrey et West, 1996). L'amylose est un polymère

essentiellement linéaire (taux de ramification < 1 ‰), formés par l'enchaînement linéaire de résidus D-anhydro-glucopyranoses, associés entre eux par la liaison  $\alpha$ -1,4-glucosidique. Il représente environ 17-30 % de l'amidon total (Monties, 1980). L'amylopectine est une macromolécule ramifiée, constituée aussi de résidus D-anhydro-glucopyranoses associés entre eux par la liaison  $\alpha$ -1,4-glucosidique. Ces résidus sont en chaînes linéaires ou en ramifications greffées les unes aux autres par des liaisons  $\alpha$ -1,6-glucosidiques. Elle représente environ 70-80 % de l'amidon total. Les fonctions physiologiques des amylases dans les plantes ne sont pas clairement élucidées, car elles sont en général incapables d'hydrolyser les granules d'amidon (natif) *in vitro* (Steup, 1988). Toutefois, les amylases largement distribuées dans la nature, sont constamment employées en industrie; plus particulièrement en industrie agro-alimentaire pour la liquéfaction de l'amidon et les matières amylacées brutes. L'action des enzymes dégradant l'amidon gélatinisé peut être représentée schématiquement dans la Figure 1.



**Figure 1. Divers modes d'action des enzymes amylolytiques**



L' **$\alpha$ -amylase** ou  $\alpha$ -1,4-glucane 4-glucanohydrolase (EC: 3.2.1.1) appartient à la classe des endo-amylases. Elle est connue sous le nom d'amylase dextrinase ou liquéfiante. Elle est capable de franchir la liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique de l'amylopectine, sans pourtant l'hydrolyser. Elle est abondante dans la salive (Ptyaline), dans le pancréas, dans les céréales germées et dans les cultures des micro-organismes tels que *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae* et *A. niger*. La fonction physiologique de l' $\alpha$ -amylase dans la plante serait de solubiliser les granules d'amidon grâce à son mode d'action endolytique. Cependant il a été montré que certaines formes de l' $\alpha$ -amylase dans l'orge sont incapables d'hydrolyser les granules d'amidon relativement larges (MacGregor, 1983). Cela entrevoit l'existence d'une fonction physiologique spécifique de chaque  $\alpha$ -amylase, dans le métabolisme de la plante, pour chaque espèce ou pour chacune des formes d' $\alpha$ -amylases de la plante (Mundy, 1982).

Le pH optimum d'activité de l' $\alpha$ -amylase est situé entre 4,5 et 7. Elle est généralement thermostable (75-105 °C) et sa température optimum est entre 50 et 105°C. Certaines  $\alpha$ -amylases thermostables des espèces de *Bacillus* (*B. sp JF2*, *B. stearothermophilus* et *B. licheniformis*) montrent des températures optima d'activité aux températures comprises entre 90 et 105°C (Gerhartz, 1990; Zang *et al.*, 1994). De plus leur température d'inactivation atteint 120°C! (Gerhartz, 1990). Les propriétés de ces enzymes sont donc exploitées en industrie agro-alimentaire, plus particulièrement en brasserie et en pâtisserie.

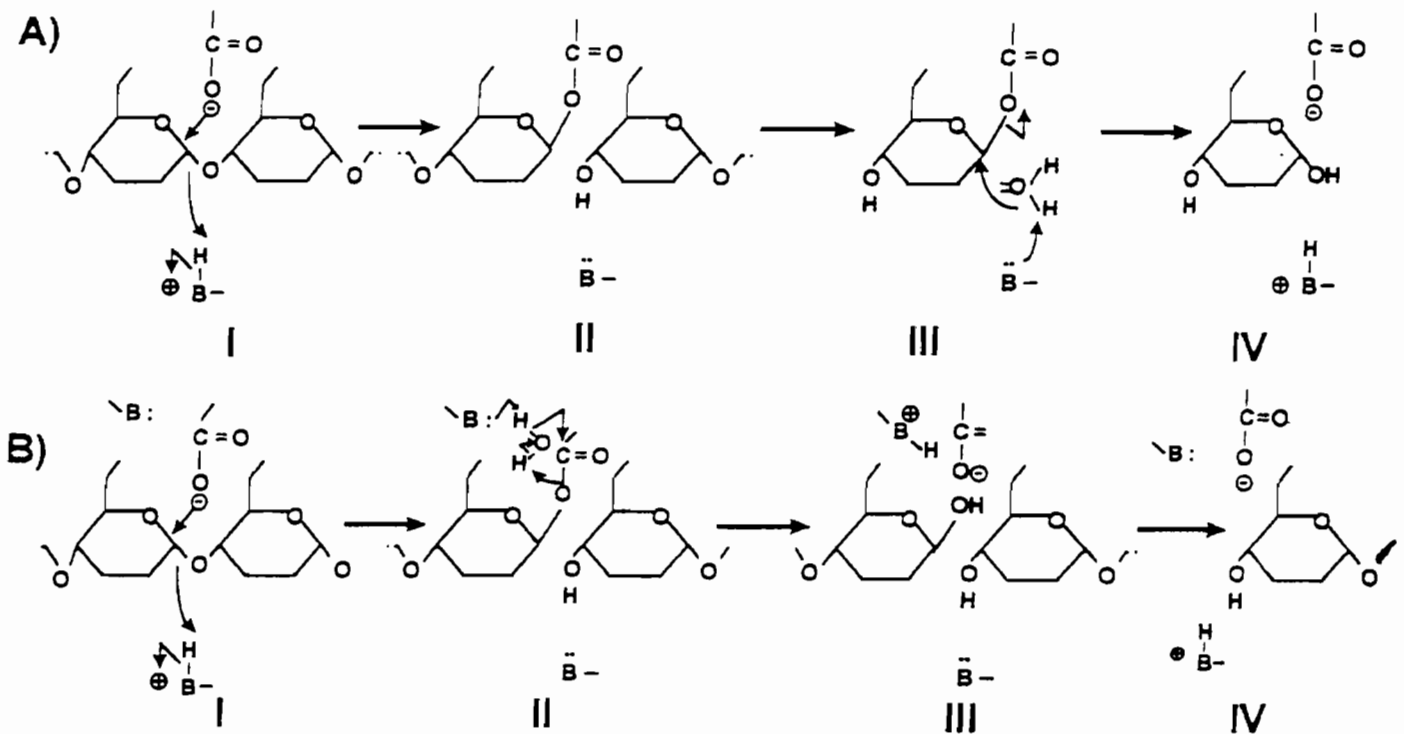
La  **$\beta$ -amylase** ou  $\alpha$ -1,4-glucane maltohydrolase (EC: 3.2.1.2) est une exo-amylase. Elle attaque les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice pour produire du maltose de manière récurrente et des dextrans limites (erythro-dextrans). Le maltose issu d'une  $\beta$ -hydrolyse de l'amidon a une configuration stéréochimique de type  $\beta$ , à cause de la mutarotation ou conversion de Walden qui se produit lors de cette

hydrolyse. Le nom de  $\beta$ -amylase lui est attribué pour cette raison. Dans le cas de l'amylopectine ce procédé s'arrête à deux ou trois résidus de glucose avant la liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique. Elle est incapable de franchir cette liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique. Les optima d'activité en fonction de la température et du pH sont respectivement autour de 40-60°C et aux pH 4-6. La  $\beta$ -amylase est surtout utilisée pour la production d'alcool et en brasserie pour remplacer le malt (Norris et Lewis, 1985). L'enzyme est d'utilisation très répandue dans la fabrication des sirops à teneur élevée en maltose.

La  $\beta$ -amylase est largement distribuée dans les plantes mais elle est aussi répandue dans les champignons et les bactéries. Deux formes de  $\beta$ -amylases des tissus du caryope de l'orge, du blé et du seigle ont été décrites (Shewry *et al.*, 1988; Daussant et Laurière, 1990; Daussant *et al.*, 1990). La  $\beta$ -amylase majoritaire de l'endosperme s'accumule durant la maturation du caryopsis. Par contre, la seconde  $\beta$ -amylase ne s'accumule pas dans l'endosperme en maturation mais apparaît dans d'autres tissus de la graine comme le péricarpe, ainsi que dans les organes végétatifs tels que les feuilles et les racines (Thoma *et al.*, 1971). Ces derniers tissus sont bien connus comme tissus d'accumulation de la  $\beta$ -amylase. Il a été reporté que les  $\beta$ -amylases des plantes n'ont aucune activité significative ou pratiquement aucune activité sur les granules d'amidon natif (Lizotte *et al.*, 1990; Sun and Henson, 1991; Sohn *et al.*, 1996). La  $\beta$ -amylase dégrade les maltodextrines et l'amidon gélatinisé de manière plus efficiente que l'amidon brut. De ce fait, la fonction biologique de la  $\beta$ -amylase dans la dégradation de l'amidon *in vivo* n'a jamais été clairement établie (Thoma *et al.*, 1971; Lizotte *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995). Elle apparaît non essentielle dans la dégradation de l'amidon des tissus de la plante (Thoma *et al.*, 1971). Il a été spéculé que l'une des fonctions physiologiques de la  $\beta$ -amylase serait d'hydrolyser les maltodextrines stockées dans les vacuoles de la plante (Lizotte *et al.*, 1990). En fait, la voie catabolique de l'amidon impliquant toutes les enzymes dégradant l'amidon (amylases, isoamylase, amidon

phosphorylase et  $\alpha$ -glucosidase) n'a été élucidée dans aucune espèce végétale (Beck, 1985).

L'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 des substrats amylicés se fait par un mécanisme de type acide-base (Robyt, 1984). Le site actif des enzymes amylolytiques comporte des sous-unités responsables de la formation du complexe enzyme-substrat et un site catalytique responsable de la coupure qui se trouve entre deux sous-sites adjacents (Sicard, 1997). Ce site catalytique est constitué d'anions carboxylate agissant comme nucléophiles et de cations imidazolium agissant comme électrophiles. Le mécanisme de l'hydrolyse varie selon qu'il y a rétention ou non-rétention de configuration (Figure 2).



**Figure 2. Mécanisme d'hydrolyse de la liaison  $\alpha$ -1,4 de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase (A) et la  $\beta$ -amylase (B) selon Robyt (1984).** L'action de l' $\alpha$ -amylase se fait avec rétention de configuration, par contre celle de la  $\beta$ -amylase se fait avec inversion de configuration. COO<sup>-</sup> = Acide aspartique ou glutamique, \B ou -B<sup>+</sup>-H = Histidine.

**La pullulanase ou isoamylase.** Les liaisons  $\alpha$ -1,6-glucosidiques de l'amidon sont clivées grâce à l'action des isoamylases (enzymes débranchantes). L'enzyme provenant des levures et des moisissures est connue sous le nom de isoamylase (EC : 3.21.68), par contre celle obtenue à partir de *Aerobacter aerogenes* est appelée pullulanase (EC : 3.2.1.41). Incubées avec l'amylopectine, ces enzymes libèrent des fragments d'amylose ou des oligomères de glucose. La pullulanase est combinée avec l'amyloglucosidase dans le processus de saccharification complète de l'amidon. L'activité optimum est atteinte à la température de 60°C et à pH 6.

**L'amyloglucosidase ou glucoamylase ou  $\gamma$ -amylase ou encore acide maltase** (EC : 3.2.1.3) appartient au groupe des exo- $\alpha$ -1,4-D-glucane glucohydrolases. Elle hydrolyse l'amidon à partir de l'extrémité non réductrice pour libérer des monomères de D-glucose. Les principales différences entre l'amyloglucosidase (EC : 3.2.1.3) et l' $\alpha$ -glucosidase (EC : 3.2.1.20) résident en 4 points : 1°) l' $\alpha$ -glucosidase libère de l' $\alpha$ -glucose suite à l'hydrolyse de l'amidon, par contre l'amyloglucosidase libère du  $\beta$ -glucose, 2°) l' $\alpha$ -glucosidase hydrolyse les oligosaccharides plus rapidement que les polysaccharides (qui ne sont pas souvent hydrolysés), mais l'inverse est observé dans le cas de l'amyloglucosidase, 3°) l' $\alpha$ -glucosidase est capable d'hydrolyser le maltose (en deux résidus de glucose) par contre l'amyloglucosidase est incapable d'effectuer cette hydrolyse, finalement 4°) l' $\alpha$ -glucosidase n'est pas à mesure d'hydrolyser la liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique de l'amylopectine par contre celle-ci peut être hydrolysée par l'amyloglucosidase. L'aptitude de l'amyloglucosidase à couper les liaisons  $\alpha$ -1,4- et  $\alpha$ -1,6-glucosidiques de l'amidon, lui confère la possibilité d'hydrolyser complètement l'amidon (en théorie) (Gerhartz, 1990). Les amyloglucosidases ont été isolées de divers micro-organismes tels que *Aspergillus niger*, *A. awamori* et *Rhizopus niveus*. Elles diffèrent considérablement l'une de l'autre selon leur mécanisme

d'hydrolyse de l'amidon. Les optima d'activité en fonction de la température et du pH sont respectivement autour de 55-65°C et aux pH 3-7.

## II.2 LES $\beta$ -GLUCANASES

$\beta$ -glucanase est un nom commun donné aux enzymes catalysant l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ -glucosidique des polysaccharides ( $\beta$ -glucanes), dont le carbone anomérique du monomère d'ose impliqué est de configuration  $\beta$ . Les  $\beta$ -glucanases sont des complexes enzymatiques dans lesquels chaque composante participe à chaque étape de l'hydrolyse des dérivés naturels des glucanes en glucose. Les  $\beta$ -glucanes sont des polysaccharides entrant dans l'architecture des parois cellulaires des végétaux, des champignons et des levures. L'hydrolyse complète de ces glucanes requière l'action synergique de diverses enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, les pectinases et les  $\beta$ -glucanases. Les  $\beta$ -glucanases les plus importantes sont celles qui dégradent les substrats suivants: le curdlane (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucane, la laminarine (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucane, la cellulose (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucane, les glucanes des céréales ou lichénines (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucane, le pustulane (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucane et le (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucane. Les principales classes des  $\beta$ -glucanases sont consignées dans le Tableau 1.

Des variétés d'exo et d'endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanases ont été détectées et purifiées à partir des bactéries, des champignons, des levures et des plantes. Des investigations approfondies ont été réalisées sur les endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanases des grains de l'orge en germination (Hoy *et al.*, 1981; Woodward et Fincher, 1982; Stuart *et al.*, 1986; Ballance et Svendsen, 1988; Høj *et al.*, 1989; Hrmova et Fincher, 1993). Les plus importantes classes caractérisées sont les (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.73), les (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanases

(EC 3.2.1.4) et les (1→3)- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.39). Les (1→3)- $\beta$ -D-glucanases sont distinguées entre elles sur la base de leur spécificité pour le substrat et sur leurs modes d'hydrolyse des (1→3)- et (1→3, 1→4)- $\beta$ -D-glucanes (Anderson et Stone, 1975; Høj *et al.*, 1989). Elles sont également regroupées sur la base de la similarité de leur structure primaire (Henrissat et Bairoch, 1993; Ferrer *et al.*, 1996). Le degré de polymérisation (DP) des produits d'hydrolyse et l'habilité des  $\beta$ -glucanases à hydrolyser les parois cellulaires des levures ou à inhiber leur croissance, sont aussi des critères de caractérisation des  $\beta$ -glucanases (Nagata *et al.*, 1990).

Plusieurs endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanases (Nagata *et al.*, 1990; Ventom et Asenjo, 1991; Saeki *et al.*, 1994) et endo-(1→6)- $\beta$ -D-glucanases (Rombouts et Phaff, 1976; Cruz-de-la *et al.*, 1995) de sources microbiennes possédant des activités lytiques sur les levures vivantes ou sur les parois cellulaires des levures, ont été reportées. Certaines endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanases et chitinases (hydrolases antifongiques) des plantes, se sont avérées capables d'inhiber la croissance des champignons ou des levures (Mauch *et al.*, 1988; Leah *et al.*, 1991; Grenier *et al.*, 1993; Yi et Hwang, 1997). D'autres recherches ont montré que les plantes ne contiennent pas d'endo-(1→6)- $\beta$ -D-glucanes (Varner et Lin, 1989) encore moins les endo-(1→6)- $\beta$ -D-glucanases capables de les dégrader (Cruz-de-la *et al.*, 1995). Par contre les plantes renferment des endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanases à une abondance un peu plus élevée qu'elles n'auraient besoin pour dépolymériser les réserves endogènes de (1→3)- $\beta$ -D-glucanes (polysaccharides minoritaires des plantes) (Høj *et al.*, 1989; Hrmova et Fincher, 1993). De ce fait, les endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanases sont suggérées être des protéines liées à une pathogénicité "PR protéines", jouant un rôle primordial dans les réactions de défense de la plante contre l'invasion des pathogènes tels que les champignons (Kauffmann *et al.*, 1987; Mauch *et al.*, 1988; Grenier *et al.*, 1993) et un rôle de protection d'avant garde (Fincher, 1989; Hrmova et Fincher, 1993).

Tableau 1. Les  $\beta$ -Glucanases et leurs substrats

Enzyme				Substrats	
Nom commun	Nom trivial	Mode d'action	Numéro EC	Nom commun	Principal type de liaison
Endo-1,2- $\beta$ -glucanase	1,2- $\beta$ -D-Glucane glucanohydrolase	Endo	3.2.1.71	1,2- $\beta$ -glucane	(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$
Endo-1,3- $\beta$ -glucanase	1,3-(1,3; 1,4)- $\beta$ -D-Glucane 3(4)-glucanohydrolase	Endo	3.2.1.6 3.2.1.16*	Curdlane, laminarine, glucane de l'orge	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ et (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$
Endo-1,3- $\beta$ -glucanase	1,3- $\beta$ -D-glucane glucanohydrolase	Endo	3.2.1.39	Curdlane, laminarine	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$
Exo-1,3- $\beta$ -glucanase	1,3- $\beta$ -D-Glucane glucohydrolase	Exo	3.2.1.58	Curdlane, laminarine	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$
Cellulase	1,4-(1,3; 1,4)- $\beta$ -D-Glucane glucohydrolase)	Endo	3.2.1.4	Cellulose, glucane de l'orge	(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$
$\beta$ -glucosidase	$\beta$ -D-Glucoside glucohydrolase	Exo	3.2.1.21	Cellobiose, cellodextrine, $\beta$ -D-glucoside	(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$
Exo-1,4- $\beta$ -glucosidase	1,4- $\beta$ -D-Glucane glucohydrolase	Exo	3.2.1.74	Cellulose, cellobiose	(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$
Exocellulase ou exobiohydrolase	1,4- $\beta$ -D-Glucane cellobiohydrolase	Exo	3.2.1.91	Cellulose	(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$
Endo-1,6- $\beta$ -glucanase	1,6- $\beta$ -D-Glucane glucanohydrolase	Endo	3.2.1.75	Pustulane, lutéane	(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$
Lichénase	1,3; 1,4- $\beta$ -D-Glucane 4-glucohydrolase	Endo	3.2.1.73	Lichénine et glucane de l'orge	(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$

### III. UTILISATION DES ENZYMES EXOGENES EN BRASSERIE

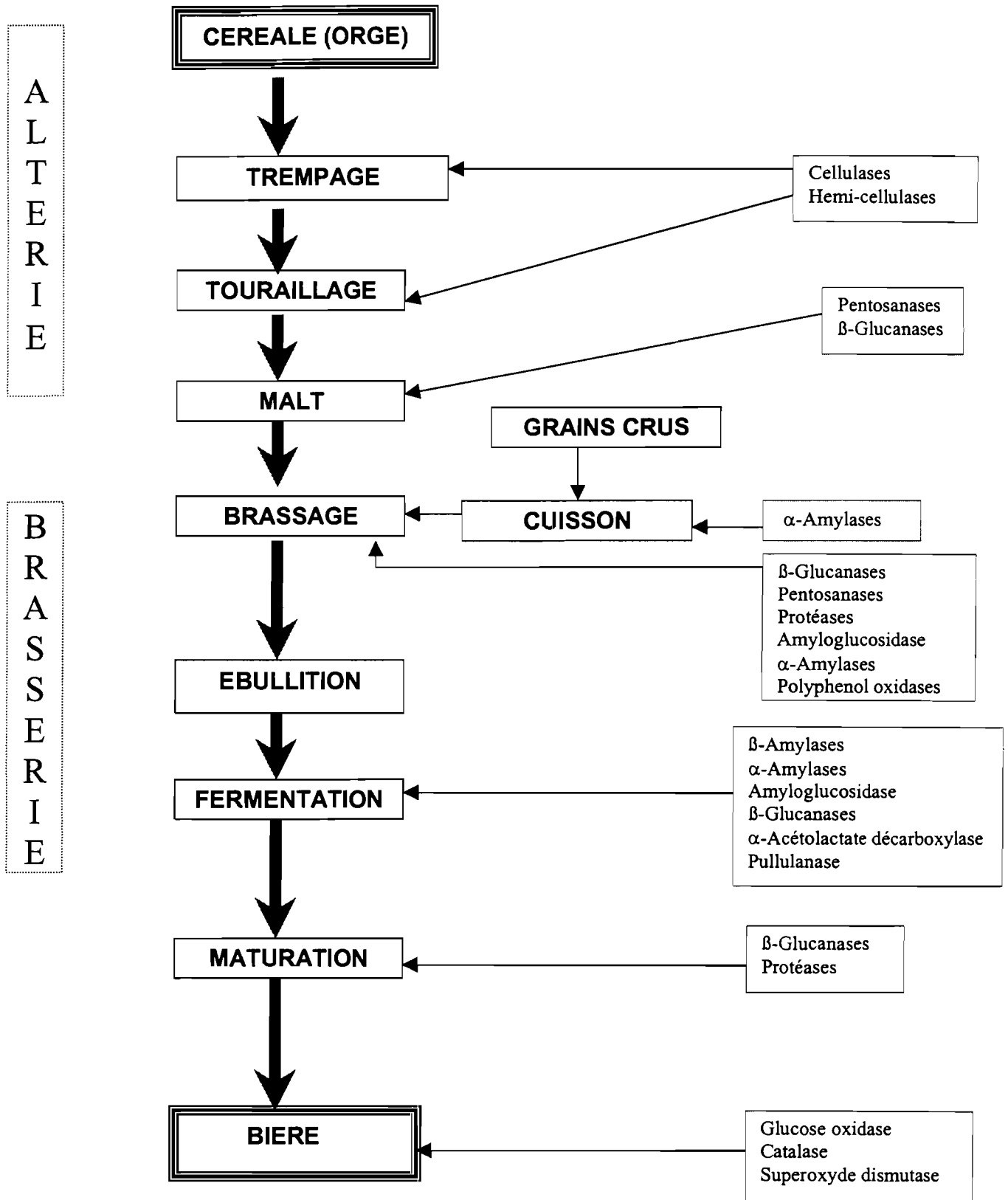
Il est virtuellement impossible de concevoir la production de la bière ou de toute autre boisson alcoolisée sans l'implication des enzymes (Bamforth et Martin, 1983). La fabrication des boissons alcoolisées est un processus impliquant une succession de transformations catalysées par les enzymes. Des fabrications de boissons alcoolisées, à partir uniquement

d'enzymes exogènes et d'amidon ont été réalisées (Morimoto et Horie, 1987). Le malt est un grain de céréale (blé, orge, seigle, sorgho, etc.) humidifié, mis à germer dans des conditions contrôlées et séché doucement pour obtenir un produit stable et riche en enzymes hydrolytiques. Le brassage est l'étape de brasserie au cours de laquelle l'amidon et les protéines (substrats) vont être hydrolysés en sucres fermentescibles et composés azotés par les enzymes endogènes du malt. La source d'amidon peut provenir du malt ou de succédanés. Durant la germination des céréales, de nombreuses enzymes sont synthétisées ou passent d'une forme inactive à une forme active ( $\beta$ -amylase par exemple).

Les enzymes exogènes sont ajoutées aux différents stades du maltage et du brassage (Figure 3). En malterie, les enzymes exogènes utilisées sont les cellulases, les hémicellulases, les pentosanases et les  $\beta$ -glucanases. Ces enzymes enrobant le malt vont agir uniquement lors du brassage grâce à leur pouvoir d'hydrolyser les parois cellulaires de l'endosperme des céréales. En brasserie, de nombreuses enzymes exogènes sont utilisées. Elles regroupent les  $\alpha$ -amylases (liquéfiant l'amidon), les enzymes endo-hydrolytiques ( $\beta$ -glucanases, pentosanases, protéases), les enzymes saccharifiantes ( $\beta$ -amylases, amyloglucosidases, pullulanases, exoglucanases) et enfin les enzymes agissant sur la qualité organoleptique ou sur la couleur du produit fini (polyphénol oxydases, glucose oxydases, catalases, superoxide dismutases, etc.).

Les enzymes exogènes proviennent essentiellement des bactéries (*Bacillus*), des champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*) et parfois de céréales germées (orge, blé). De nos jours, des céréales suppléées avec un cocktail enzymatique sont proposées afin d'améliorer le pouvoir diastasique des malts (Hanneman, 1996). Cet apport enzymatique exogène permet également d'augmenter la filtrabilité de la maische et d'améliorer le goût de la bière (Hanneman, 1996).





#### **IV. IMPORTANCE BIOCHIMIQUE DE LA PURIFICATION ET DE LA CARACTERISATION DES ENZYMES**

De milliers d'enzymes différentes sont libérées lors de la rupture de la membrane d'une cellule végétale, de champignon, de levure ou de bactérie; qui vraisemblablement gouvernent une panoplie de réactions métaboliques. Seulement, lorsqu'une enzyme est purifiée au point où aucune autre enzyme n'est détectable, peut-on être assuré que c'est elle qui dicte la conversion d'une substance A en B et rien d'autre. Seul, dans ce cas le mécanisme de la catalyse de l'enzyme peut être étudié (Kornberg, 1990).

Pour mieux appréhender les processus complexes qui se produisent dans la cellule, il est nécessaire de diviser ces processus en petites pièces et de les étudier indépendamment, pour ensuite les remettre dans leur ordre correct. De ce fait, une chaîne métabolique n'est bien élucidée que si toutes les enzymes qui catalysent la chaîne de réaction sont isolées et étudiées individuellement, en regard de leurs propriétés cinétiques et structurales (Kornberg, 1990).

Le véritable enzymologiste est celui là qui, rarement s'intéresse à la source de l'enzyme, mais voudrait surtout qu'elle provienne de la source la plus convenante (Scopes, 1987). Aucune enzyme n'est purifiée au point d'homogénéité absolue. Même si les protéines contaminantes constituent moins de 1 % de l'enzyme purifiée et échappent à la détection de nos meilleures méthodes; il y a probablement des millions de molécules étrangères dans le mélange réactionnel (Kornberg, 1990). Généralement, ces contaminants ne posent pas de problème si aucun d'eux n'est prépondérant ou s'ils n'interfèrent pas avec le composé étudié (Kornberg, 1990).

La majeure partie des investigations biochimiques implique la purification du matériel d'étude car les substances ciblées doivent être débarrassées de tout contaminant, si leur

caractérisation rigoureuse est envisagée (Scopes, 1987; Deutscher, 1990, Van-Berkel, 1997). Cela est souvent une tâche formidable, car une cellule typique renferme des substances qui se ressemblent à l'égard de leurs propriétés physiques, chimiques et catalytiques. En outre le matériel d'intérêt pourrait être instable et existerait en quantité infime. L'enzyme qui représente moins de 0,1 % de la matière sèche de la cellule doit être ramenée à 98 % de pureté. La purification d'une enzyme consiste à isoler, parmi les diverses molécules présentes dans l'extrait brut, une molécule unique sous une forme biologiquement active et intacte (native). La séparation des groupes de constituants cellulaires tels que les acides nucléiques, les protéines et les glucides est généralement facile, car ils sont fondamentalement différents dans leur structure moléculaire. Par contre, l'isolement d'une protéine unique dans une panoplie de protéines n'est pas toujours une tâche aisée. La méthode de purification utilisée dépend toujours de la source de l'enzyme (tissus animaux, cellules érythrocytaires, mitochondries, tissus de plantes, champignons, levures, bactéries, etc.) et des techniques analytiques disponibles. La méthode de purification employée est étroitement dépendante des objectifs visés (analytiques, préparatifs, conservation ou non des propriétés fonctionnelles, etc.). Selon que l'enzyme recherchée est intracellulaire (cas rare) ou extra-cellulaire (cas le plus fréquent), le procédé d'extraction sera différent.

Les méthodes de purification des enzymes incluent les étapes suivantes:

### **1. Rupture des parois cellulaires et extraction.**

L'hydrolyse des parois cellulaires est réalisée par ultrasonication, choc osmotique, digestion enzymatique (lysozyme,  $\beta$ -glucanases, pectinases, chitinases, mannases, protéases, etc.), solubilisation chimique (toluène), broyage manuel, broyage à lame (Waring blender), broyage en présence d'un abrasif (alumine), utilisation de la presse de French (vigoureuse), etc. La rupture cellulaire est réalisée à basse température (2-4°C) dans un tampon spécifique. Le

choix du tampon est fait en tenant compte de la solubilité de l'enzyme et de sa stabilité dans le tampon. La stabilité de l'enzyme dépend non seulement du pH du tampon mais aussi de sa force ionique et de sa nature chimique. Les sels sodiques d'acides carboxyliques tels que l'acétate, le citrate, le malate, le maléate, l'oxalate et le formiate aux pH compris entre 5 et 7 sont fréquemment utilisés pour l'extraction des glycosyl hydrolases. Afin de stabiliser l'enzyme et de conserver ses propriétés catalytiques, des composés chimiques à de très faibles concentrations ( $10^{-7}$  à  $10^{-3}$  M) sont souvent ajoutés au tampon d'extraction. Les molécules les plus couramment utilisées pour ce but sont les inhibiteurs de protéases (PMSF, pepstatine A, di-isopropyl fluorophosphate, EDTA, benzamidine), les stabilisateurs (dithiothreitol, dithioerythritol,  $\beta$ -mercaptoéthanol, glycérol, NaCl, etc.), les composés complexant les polyphénols (polyvinylpyrrolidone), les bactériostatiques ou inhibiteurs fongiques (azide de sodium, néomycine, pénicilline, nystatine, chloramphénicol, gentamicine, etc.). Les ions métalliques cofacteurs des enzymes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ) sont également additionnés au tampon d'extraction lorsqu'ils sont connus. Le milieu peut également être supplémenté en adjuvant de floculation, de filtration et de clarification tels que terres de diatomées, silices, cérites, charbon actif, etc. (Pinheiro et Cabral, 1993). L'homogénat obtenu est centrifugé entre 5 000 à 20 000 g, pendant 30 à 60 min, à une température comprise entre 0 et 4°C. L'extrait brut (surnageant) est soumis à une dialyse, une ultrafiltration ou à une lyophilisation puis conservé à une température comprise entre -20 et 0°C.

## **2. Précipitation brute.**

Elle est réalisée à basse température (-10 à 0°C) et les solutions utilisées sont refroidies au préalable à la même température. L'avantage de cette méthode en tant qu'étape préliminaire de la purification est dû au fait qu'elle s'applique à presque toutes les enzymes. La précipitation des protéines enzymatiques peut être réalisée en utilisant des pHs extrêmement

acides (pH 2-3) ou basiques (pH 9-11), des températures élevées (60-80°C), des sels d'ammonium (le sulfate d'ammonium est le plus utilisé), des solvants organiques (éthanol, méthanol, butanol, acétone, etc.), des polymères organiques (polyéthylène glycol, glycogène, polysaccharides soudés par des liaisons covalentes) et des protéines basiques (sulfate de protamine, très utile pour débarrasser les acides nucléiques). Un essai pilote est toujours fait au préalable afin de déterminer la zone de précipitation maximale de l'enzyme ciblée.

### **3. Séparation basée sur la caractéristique moléculaire.**

Les caractéristiques intrinsèques de chaque enzyme permettant de la séparer des autres molécules biologiques sont : la solubilité, la charge ionique, la masse moléculaire, les propriétés d'absorption et la liaison spécifique et discriminante avec d'autres molécules biologiques. Les méthodes de purification utilisées et dépendant de la caractéristique de chaque molécule sont:

- a) **La charge.** Les chromatographies d'échange d'ions, de focalisation à gradient de pH; et les techniques électrophorétiques (électrophorèse sur gel, électrophorèse capillaire, isoélectrofocalisation, etc.)
- b) **La polarité.** Les chromatographies d'adsorption (hydroxyapatite, chélation à un métal par affinité), de phase inversée (RP), d'interaction hydrophobique, etc.
- c) **La taille.** La dialyse, l'ultrafiltration, la diafiltration, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration, la chromatographie d'exclusion ou de perméation, etc.
- d) **La chromatographie d'affinité.** C'est une interaction réversible entre l'enzyme et son ligand. Les ligands les plus couramment utilisés sont les substrats insolubles, les substrats polymérisés, les alginates, les inhibiteurs de l'enzyme fixés sur des résines, etc.

La purification de la protéine est supposée être résolue, seulement lorsqu'une seule bande est obtenue à partir d'électrophorèses analytiques telles que la Native-PAGE, la SDS-PAGE (si l'enzyme ne possède pas de sous-unités différentes entre elles par leurs poids moléculaires) et l'isoélectrofocalisation (IEF). L'obtention d'une seule courbe par titration électrophorétique est également un bon critère de pureté.

Comme l'a souligné Arthur Kornberg (1990), il est profitable d'étudier le comportement de l'enzyme à l'état brut, seulement lorsque les propriétés de l'enzyme pure sont connues.

Beaucoup de plantes et de micro-organismes contiennent des produits naturels qui possèdent des activités biologiques. L'isolement de ces composés a permis la découverte de plusieurs molécules telles que la quinine, la morphine, la pénicilline et diverses enzymes. Ces dernières ont été fondamentales dans le développement de la médecine moderne et de la biotechnologie. La plupart de ces composés naturels sont de structure très complexe. Il est difficile, voire impossible, de les synthétiser au laboratoire à un prix abordable. Cependant, la nature est capable de biosynthétiser ces molécules avec une apparente aisance en utilisant des voies biosynthétiques de la catalyse enzymatique. Il y a donc un intérêt considérable dans l'élucidation des voies biosynthétiques des produits naturels importants et dans l'utilisation des enzymes pour produire ces composés naturels *in vitro*.

La purification des enzymes permet ainsi de clarifier la voie d'une réaction ou de son mécanisme, de découvrir de nouvelles enzymes, d'acquérir un réactif analytique unique en son genre ou plus simplement de mieux maîtriser les procédés de purification.

Avec l'enzyme purifiée, les activités catalytiques et l'action des molécules régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) peuvent être mieux appréhendées.

Dans ces dernières décennies, le développement rapide des méthodes analytiques modernes telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPAEC, HPSEC, HI-HPLC, RP-HPLC, FPLC, etc.), la spectrométrie de masse (MALDI-TOF), la résonance

magnétique nucléaire (RMN), la résonance para-électronique (RPE), le dichroïsme circulaire (CD), la microscopie électronique, la diffraction des rayons X, la biologie moléculaire, la bio-informatique, etc. ont considérablement contribué au progrès de l'enzymologie.

L'activation, la production, la purification et la caractérisation des enzymes sont étroitement dépendantes du marché potentiel, du coût du procédé, de la qualité requise et de la technologie disponible (Somers *et al.*, 1989; Cheetam, 1995). Les enzymes brutes ou partiellement purifiées telles que les protéases, les peroxydases et les enzymes hydrolysant les hydrates de carbone sont utilisées pour des besoins industriels. Par contre les enzymes pures (dépourvues de tout contaminant), sont principalement utilisées dans les domaines de la recherche ou de l'analyse médicale.

L'utilisation de la catalyse enzymatique pour des applications commerciales est ainsi un domaine excitant de la biotechnologie industrielle.

Cette étude est focalisée sur l'investigation des protéines enzymatiques qui pourraient justifier les utilisations traditionnelles des rhizomes de *C. pilosa*, des bulbes de *G. klattianus* et des feuilles de *B. senegalensis*. Les enzymes majoritaires impliquées dans ces procédés ont fait l'objet de purification approfondie afin d'élucider leurs propriétés physico-chimiques, catalytiques et d'améliorer leurs applications.

# ***DEUXIEME PARTIE***

## **MATERIELS ET METHODES**



## I. Matériels et produits chimiques

### I.1 Matériel végétal

Les rhizomes non germés de *Curculigo pilosa* (Schum. et Thonn.) Engl. (*Hypoxidaceae* ou *Liliaceae*), les bulbes non germés de *Gladiolus klattianus* Hutch (*Iridaceae*) ont été récoltés dans les faubourgs de Ouagadougou. Les feuilles saines de *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. ex. Poir (*Capparidaceae*) ont été récoltées dans réserve du Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (CNRST). Les échantillons ont été lavés à l'aide d'une solution d'azide de sodium à 0.02 % (p/v), séchés à la température ambiante puis conservés à 4°C avant l'extraction des enzymes.

### I.2 Produits chimiques

L'Amylose et l'amylopectine proviennent de Avebe (Veendam, The Netherlands). L'amidon soluble, le D-glucose et le D-mannose de Merck (Darmstadt, Germany). Le dithiotreitol (DTT), la concanavaline A-Sépharose, la Laminarine dérivée de *Laminaria digitata*, le BSA, le PMSF, le pullulane (de *Aureobasidium pullulans*), le Bleu de Coomassie Brilliant G-250 et l' $\alpha$ -amylase pancréatique proviennent de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Les produits chimiques pour l'électrophorèse, les colonnes de chromatographie, les ampholites, les marqueurs protéiques de masses moléculaires (14.4-94 kDa) et de pI (3,5-9,3) ont été achetés chez Pharmacia-LKB (Uppsala, Sweden). Les amidons bruts de maïs, de blé, de pomme de terre et de riz proviennent de BDH Chemicals Ltd. (The Netherlands). Le PNPG5, l'AZCL-amylose, le *p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside de MegaZyme (Sydney,

Australia). L'ultrogel ACA54 de Sepracor (France). Le disodium 2,2'-bicinchoninate de Pierce (USA). Le pustulane (de *Umbilicaria popullosa*) provient de Calbiochem (La Jolla, California). La CM-cellulose de Akucell (type AF 0305, Akzo, Arnhem, The Netherlands). Le larcwood arabino- $\beta$ -(1,3)/(1,6)-galactane (stractane) de Meyhall Chemical AG (Kreuzlingen, Switzerland). Les membranes YM 10 et 30 kDa proviennent de Amicon Corporation (Danvers, MA). Le (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucane de l'orge provient de Biocon (Kilnagleary, Cork, Ireland). La levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) de Gist-Brocades (Delf, The Netherlands). La levure du brasseur (*S. cerevisiae*) avait été isolée comme précédemment décrit (Konlani *et al.*, 1996). Les maltodextrines MD05 sont de Spreeda (Burghof, Switzerland). Les  $\beta$ -glucanes du sorgho ont été préparés par Verbruggen et collaborateurs (1993) et les  $\beta$ -Glucanes insolubles des levures (*S. cerevisiae*) ont été fournis par le Professeur F. M. Rombouts de Wageningen Agricultural University (The Netherlands). Tous les autres produits chimiques sont de type analytique.

## II. Purification des enzymes

Toutes les extractions et les méthodes de séparation des enzymes ont été réalisées aux températures comprises entre 0 et 4°C. Tous les tampons contenaient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) à 0,02 % (p/v) pour inhiber la croissance microbienne.

### II.1 Extraction des enzymes

Les feuilles de *B. senegalensis* (100 g), les bulbes non germés de *G. klattianus* (50 g) et les rhizomes non germés de *C. pilosa* (50 g) ont été découpés puis broyés dans des mortiers en porcelaine, en présence de la neige carbonée. Le tampon d'extraction (150 ml)

utilisé pour l'extraction des enzymes de *C. pilosa* et de *G. klattianus* est le maléate de sodium 50 mM pH 6. Le tampon (200 ml) d'acétate de sodium 50 mM pH 5 a été utilisé pour l'extraction des enzymes de *B. senegalensis*. Les tampons d'extraction contenaient tous du  $\text{CaCl}_2$  3 mM, de la cystéine 20 mM (ou du DTT 3 mM), du polyvinylpyrrolidone (PVPP) 2 % (p/v), et du PMSF 1 mM. L'homogénat est centrifugé à 10 000 g, pendant 20 min, à 4°C; puis le surnageant est utilisé comme extrait enzymatique brut.

## **II.2 Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium et lyophilisation**

La précipitation des protéines enzymatiques au sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) a été réalisée à l'aide d'un essai pilote afin de déterminer la gamme de fractionnement maximal des enzymes ciblées. La quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour apporter un volume de 1 ml d'extrait à X % de saturation à 0°C, a été lue sur la table donnée par Sasha et Seifter (1990). Des concentrations graduelles en sulfate d'ammonium allant de 0 à 100 % (5 % d'intervalle) ont été réalisées avec 1 ml de l'extrait brut dans des tubes de centrifugation de type Eppendorf (1,5 ml de volume) à 0°C. Le mélange est agité légèrement afin de dissoudre le sel, puis laissé au repos pendant 30 min, à 0°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 min, à la même température. L'activité enzymatique et la concentration en protéine sont déterminées sur le surnageant et le précipité de chaque tube. La comparaison des activités spécifiques des surnageants et des précipités obtenus pour chaque tube, permet ainsi de choisir la fraction au sulfate d'ammonium la plus intéressante pour l'isolement de l'enzyme ciblée. Ainsi, les fractions comprises entre 40-70, 40-65 et 20-70 % (p/v) de saturation en sulfate d'ammonium ont été retenues respectivement, pour l'isolement des enzymes de *C. pilosa*, de *G. klattianus* et de *B. senegalensis*. Les fractions enzymatiques retenues après précipitation au sulfate d'ammonium sont dessalées par la

dialyse contre de l'eau distillée ou contre un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 5. Elles sont ensuite lyophilisées à -50°C, pendant 48 h avant d'être conservées à -20°C pour une purification plus approfondie.

### **II.3 Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)**

La FPLC a été réalisée en utilisant le Système HPLC Pharmacia-LKB (Uppsala, Sweden) avec des colonnes d'échange d'anions (MonoQ HR5/5, 5 x 50 mm, FPLC<sup>®</sup>, Pharmacia-LKB), de cations (MonoS HR5/5, 5 x 50 mm, FPLC<sup>®</sup>, Pharmacia-LKB) et de filtration sur gel ou d'exclusion diffusion (Superdex 75 pg, 60 x 16 mm, FPLC<sup>®</sup>, Pharmacia-LKB; et Ultrogel ACA54, 2,6 x 110 cm, Sepracor, France). L'élution des protéines des colonnes chromatographiques a été suivie à la longueur d'onde de 254 nm. Le tampon Bis-Tris 20 mM pH 6,8 ou le tampon Pipérazine-HCL 20 mM pH 6, a été utilisé pour la séparation des protéines sur la colonne MonoQ. Par contre le tampon d'acétate de sodium 20 mM pH 5, a été utilisé pour la séparation des protéines sur la colonne MonoS et pour la chromatographie de filtration sur gel. Les tampons contenaient du CaCl<sub>2</sub> 3 mM et du DTT 3 mM. Les fractions protéiques (2-5 ml) sont injectées dans les colonnes; puis éluées avec un débit de 0,5 ml/min pour la colonne MonoQ, un débit de 0,8 ml/min pour la colonne MonoS et un débit de 0,15-0,8 ml/min pour la chromatographie de filtration sur gel. Un gradient de type "contrôle automatique" de NaCl de 0-1000 mM a été utilisé pour décrocher les protéines pour toutes les deux colonnes d'échange d'ions. Le gradient final de 100 % correspond à une concentration en NaCl de 1000 mM. Toutes les fractions protéiques sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions automatique (Pharmacia-LKB) et leurs activités enzymatiques sont déterminées. Les fractions actives sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration

(Membrane YM 10 ou 30 kDa, Amicon) et leur degré de pureté est déterminé par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).

### **III. Détermination des activités enzymatiques**

#### **III.1 Dosage des sucres réducteurs par le réactif au 2,2'-disodium bicinchoninate (Essai au BCA)**

L'essai au BCA est basé sur le dosage des monosaccharides ou oligosaccharides réducteurs libérés suite à la dépolymérisation enzymatique des polysaccharides. L'essai peut donc être utilisé pour tous les glycosyl-hydrolases. En effet, les sucres réducteurs libérés réduisent le Cu (II) en cu (I). Le Cu (I) est ensuite complexé avec le 2,2'-disodium bicinchoninate. Le complexe, pourpre, est titré spectrophotométriquement à sa longueur d'onde maximale d'absorption ( $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$ ). L'essai au BCA a été réalisé selon la méthode décrite par Garcia *et al.* (1993) avec des modifications pour la miniaturiser, à l'aide d'une plaque de microtitrage (Plaque ELISA).

Le réactif au BCA est préparé journalièrement en mélangeant des parts égales des solutions A ( $\text{NaCO}_3$  512 mM,  $\text{NaHCO}_3$  288 mM, 2,2'-disodium bicinchoninate 5 mM) et B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 mM, L-sérine 12 mM). Le réactif d'arrêt de la réaction (solution C) est une solution alcaline constituée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  512 mM et de  $\text{NaHCO}_3$  288 mM.

Le substrat glucidique (50  $\mu\text{l}$ ) à la concentration de 0,1-1 % (p/v) est mélangé avec 100  $\mu\text{l}$  de tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 5, dans un puits de microtitrage à température constante (40 ou 55°C). La solution enzymatique (10  $\mu\text{l}$ ) convenablement diluée dans le même tampon est ensuite incubée avec le substrat pendant 5-10 min. Après addition de 50  $\mu\text{l}$  de la solution C (arrêt de la réaction enzymatique) au milieu, 10  $\mu\text{l}$  du mélange sont

combinés avec 100 µl d'eau distillée et 100 µl du réactif au BCA dans un second puits. Le témoin est préparé comme décrit ci-dessus mais la solution enzymatique est additionnée au substrat après ajout de la solution C. La plaque couverte est incubée à 80°C, pendant 1 h à l'étuve. Après refroidissement de la plaque au réfrigérateur pendant 15 min, l'absorbance des puits est lue à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur des plaques de microtitrage (EAR 400, SLT-Labinstrument, Australia). Sauf indication contraire, tous les substrats ont été gélatinisés avant l'essai. Le glucose et le maltose à des concentrations comprises entre 10-500 µM ont été utilisés comme sucres réducteurs standards. Le glucose et le maltose sont respectivement utilisés comme sucre standards pour l'activité des amylases et des β-glucanases. Les équations des droites de corrélations utilisées en référence au glucose et maltose sont respectivement  $Y_{G1} = 92,6 x + 2,7$  et  $Y_{G2} = 89,33 x + 3$ ; où Y est la concentration du sucre réducteur (µM) et x l'absorbance du puits à 550 nm contre le témoin. L'unité enzymatique (U) est définie comme 1 µmol d'équivalents glucose ou maltose libéré par min. L'activité spécifique est exprimée comme étant la quantité d'enzyme qui libère en 1 min, 1 µmol d'équivalents glucose ou maltose.

### III.2 Utilisation des substrats spécifiques

#### -Substrat spécifique pour la β-amylase

Le substrat spécifique utilisé pour caractériser la β-amylase est un maltopentaose lié à un groupement nitrophényl à son extrémité réductrice (PNPG5) (McCleary et Codd, 1989). Ce substrat est relativement court pour être hydrolysé par l'α-amylase en présence de l'EDTA (2 mM) qui, en effet, est un inhibiteur des métallo-enzymes. L'hydrolyse du PNPG5 par la β-amylase libère du β-maltose et du paranitrophényl maltotrioside. Ce dernier est rapidement transformé en para-nitrophénol (incolore) et en glucose par l'α-glucosidase (20

U) présente dans la préparation. La réaction est arrêtée en ajoutant une solution basique du Tris à 1% (Trizma-base) dans le milieu. En milieu basique le para-nitrophénol formé est transformé en para-nitrophénolate (forme basique), qui par contre est coloré en jaune et absorbe à 410 nm ( $\lambda_{max}$ ). Le test est réalisé en incubant l'enzyme (20  $\mu$ l) avec 20  $\mu$ l du substrat (PNPG5). L'incubation est faite dans un tampon maléate de sodium 50 mM pH 6, contenant du BSA 1mg/ml, de l'EDTA 2 mM, de l' $\alpha$ -glucosidase (20 U) et de l'azide de sodium 0.02 % (p/v). La réaction est arrêtée en ajoutant 160  $\mu$ l de Tris 1 % (p/v) au milieu et l'absorbance est lue à 410 nm contre le témoin.

### **-Substrat spécifique pour l' $\alpha$ -amylase**

Le substrat spécifique utilisé pour déterminer l'activité de l' $\alpha$ -amylase est l'azurine-crosslinked-amylose (AZCL-amylose) (McCleary et Sheehan, 1989). Il s'agit d'un polymère de l'amylose hautement ramifié et insoluble dans l'eau; dans lequel l'azurine est incorporé. L'hydrolyse de ce substrat par une endo-enzyme telle que l' $\alpha$ -amylase libère des fragments hydrosolubles colorés en bleu dont l'absorbance est mesurée à 595 nm. Le test est réalisé en incubant 25 mg du substrat (AZCL-amylose) avec 1 ml de la solution enzymatique (diluée) dans un tampon de maléate de sodium 100 mM pH 6, à la température de 40°C, pendant 10 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 4 ml de Tris à 2 % (p/v) au mélange réactionnel. Après centrifugation (10 000 g, 10 min), l'absorbance du surnageant est lue à 595 nm contre un témoin. La conversion en unité enzymatique a été faite en utilisant la courbe standard fournie par MegaZyme (Amylazyme assay, MegaZyme, Sydney, Australia).

La conversion en unité  $\alpha$ -amylasique est donnée par la relation suivante :

$$\text{Activité } \alpha\text{-amylasique (U/ml)} = (1,26 \times A_{595} + 0,21) \times d$$

Où  $A_{595}$ , est l'absorbance du surnageant du milieu réactionnel à 595 nm et d, le facteur de dilution de la solution enzymatique.

### **-Substrat spécifique pour l' $\alpha$ -glucosidase**

Le para-nitrophényl glycoside a été utilisé comme substrat spécifique pour l' $\alpha$ -glucosidase (kits, MegaZyme, Sydney, Australia). Son hydrolyse libère le glucose et le para-nitrophénolate (en milieu basique), dont la concentration est dosée à 410 nm comme ci-dessus.

## **IV. Dosage des protéines**

Les protéines ont été titrées au Bleu de Coomassie Brillant G250 selon la méthode de Sedmak et Grossberg (1977) dans une plaque de microtitrage. Il s'agit d'une variante plus sensible (Deutscher, 1990) de la méthode de Marion Bradford (1976).

**Réactif:** la solution de Bleu de Coomassie G250 (Sigma nr. B-1131) est préparée à une concentration de 0,06 % (p/v) dans une solution d'acide perchlorique à 3 % (p/v). La solution est laissée sous agitation pendant au moins 24 h, puis filtrée. L'absorbance de la solution est réajustée entre 1,3 et 1,5 à 465 nm, à l'aide de la solution d'acide perchlorique à 3 % (p/v). Le réactif, stocké à l'abri de la lumière, pourrait être utilisé pendant un temps infini (Sedmak et Grossberg, 1977).



**Procédure:** l'échantillon à doser (100 µl) renfermant 5-50 µg de protéines/ml est mélangé avec 100 µl du réactif. Les absorbances sont lues directement (la stabilité maximale du complexe est de 1 h) à 465 nm et à 620 nm contre l'eau distillée. Le rapport de l'absorbance à 620 nm sur l'absorbance à 465 nm est calculé pour chaque échantillon. En effet, en présence des protéines l'absorbance diminue à 465 nm, par contre elle augmente à 620 nm. Le BSA a été utilisé comme protéine standard. La courbe d'étalonnage est obtenue en représentant le rapport  $A_{620}/A_{465}$  en fonction de la concentration en BSA (5-50 µg/ml). La droite de corrélation obtenue a pour équation:  $Y = 54.15 x -20$ ; où Y est la concentration en protéine de l'échantillon (µg/ml) et x la valeur du rapport  $A_{620}/A_{465}$  obtenue expérimentalement.

## **V. Identification des produits d'hydrolyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).**

Les produits libérés après incubation des enzymes avec leurs substrats ont été caractérisés par chromatographie d'échange d'ions à haute performance (HPAEC), par chromatographie d'exclusion diffusion à haute performance (HPSEC) et par la spectrométrie de masse: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF).

Les enzymes sont incubées avec leurs substrats pendant une période de temps déterminée, les milieux réactionnels sont ensuite chauffés pour arrêter les réactions enzymatiques. Les mélanges sont centrifugés (10 000 g, 10 min) et les surnageants sont analysés. Des essais témoins où l'enzyme est remplacée par une solution de tampon ont été réalisés pour chaque incubation.

La HPAEC analytique a été réalisée en utilisant le Système HPLC de Dionex Bio-LC GMP-11 (Sunnyvale, CA) équipé d'une colonne Dionex CarboPac PA-100 (4 x 250 mm) en

combinaison avec une colonne de garde CarboPac PA (25 x 3 mm). A un pH basique ( $\text{pH} \geq 13$ ), les glucides se comportent comme des acides faibles ( $12 < \text{pK}_a < 13$ ). Les hydroxyles se dissocient donnant des oxy-anions. Totalement ou partiellement ionisés, les glucides vont pouvoir être séparés par chromatographie d'échanges d'anions. Ce système nécessite l'utilisation d'une phase stationnaire stable aux pH extrêmes. La résine utilisée est constituée de billes de polystyrène-divinyl-benzène de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre sur lesquelles sont greffées à la périphérie des micro-particules de latex (de 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre) porteuses de groupements ammonium quaternaire. Les échantillons (19  $\mu\text{l}$ ) sont injectés à l'aide d'un auto-injecteur Spectra Physics SP8780, équipé d'un rotor Tefzel et d'une valve d'injection Rheodyne 7010. Les éluions (1 ml/min à 20°C) ont été réalisées avec des gradients linéaires de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (dilué dans du NaOH 0,1 M) de 0 à 0,25 M pendant 35 min, puis une augmentation de la concentration du  $\text{CH}_3\text{COONa}$  à 1 M pendant 10 min, ensuite cette concentration est maintenue constante pendant 10 min.

La HPSEC analytique a été réalisée en utilisant le système de pompe HPLC SP8800 (Spectra Physics, San Jose, USA), équipé de trois colonnes Bio-Gel TSK (chacune de 300 x 7,5 mm, Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA) en séries (40 XL, 30 XL, 20 XL), en combinaison avec une colonne de garde BioGel (40 x 6 mm). Les échantillons (20  $\mu\text{l}$ ) ont été injectés et élués à 30°C, avec une solution d'acétate de sodium pH 4,4; à un débit de 0,8 ml/min. L'éluion est suivie en utilisant un système de détection de type indice de diffraction différentiel Shodex SE-61 (Showa Denko K. K, Tokyo, Japan).

La MALDI-TOF est une technique récente de spectrométrie de masse permettant d'analyser rapidement les biopolymères tels que les peptides, les protéines, les oligosaccharides et les acides nucléiques purs ou même dans un extrait brut (Mohr *et al.*, 1995). La macromolécule à analyser est enrobée de petites molécules de la matrice (acide benzoïque par exemple), puis déposée sur un plat doré; lui permettant de s'ioniser et de

s'envoler facilement sous l'effet du bombardement au laser. Les ions sont ensuite accélérés et analysés selon leur temps de vol (time of flight); paramètre dépendant essentiellement de la charge de chaque ion et de sa masse moléculaire. Ainsi, les molécules de faible masse moléculaire s'envolent plus rapidement que celles de masse moléculaire plus élevée. L'échantillon à analyser (1  $\mu$ l) est dessalé à l'aide d'une résine d'échange d'ions Dowex AG 5W-X8 (BioRad), puis combiné avec 9  $\mu$ l de la solution de matrice. La matrice est constituée d'un mélange de 9 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, de 3 mg de 1-hydroxy-isoquinoline (isocarbostryrile), de 300  $\mu$ l d'acétonitrile et de 700  $\mu$ l d'eau millipore. Le mélange (1  $\mu$ l) est transféré sur le plat doré, puis séché à l'air libre à la température ambiante (20°C). Le plat est ensuite directement introduit dans l'appareil VG Analytical ToFSpec (UG Analytical, Manchester, England), pour l'analyse. Les glucides standards utilisés pour calibrer l'appareil sont des maltodextrines MD05 (masse moléculaire de l'ordre de 0,4 à 2 kDa).

## **VI. Détermination de la configuration anomérique des sucres produits après hydrolyse enzymatique**

La variation de la rotation optique des sucres formés après hydrolyse enzymatique a été suivie comme précédemment décrit par Kohno collaborateurs (1989), en utilisant un polarimètre Ceti Polaris (Belgium). L'enzyme (3 U) est incubée avec son substrat (1 %) dissout dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5. Le mélange est transféré rapidement dans la cellule du polarimètre (10 cm de trajet optique), à une température constante (25°C). L'angle de rotation optique ( $\alpha$ ) est mesuré au fur à mesure que la réaction progresse. Il faut noter que les anomères de configuration stéréochimique de type  $\alpha$  possèdent des pouvoirs rotatoires spécifiques plus élevés que ceux de type  $\beta$ , ceci est donc

utilisé comme critère de distinction (Kohno *et al.*, 1989). L' $\alpha$ -amylase du pancréas de porc a été utilisée comme amylase de référence.

## VII. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Toutes les analyses électrophorétiques ont été effectuées en utilisant le système automatique, rapide et miniaturisé d'électrophorèse sur gel (Gel Electrophoresis "PhastSystem", Pharmacia), selon les recommandations du fournisseur Pharmacia-LKB, Co.LTD, Uppsala, Suède. Les protocoles utilisés sont basés sur ceux décrits par Laemmli (1970). Le système est équipé d'une chambre de séparation et d'une chambre de développement; permettant de réaliser une analyse électrophorétique complète en 1 à 2 h, à l'aide de gels de polyacrylamide préfabriqués (Pharmacia electrophoresis gels).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE), a été réalisée sur un gel de gradient de 10-15 %, dans des conditions réductrices (présence du  $\beta$ -mercaptoéthanol). Le SDS de formule  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3\text{Na}^+$ , est le détergent le plus utilisé en électrophorèse. Il a deux fonctions: 1°) dissocier les protéines agrégées peu solubles ou hydrophobes et 2°) permettre une séparation des protéines en fonction de leur géométrie, masse molaire et forme. Il se fixe sur les protéines selon un rapport de masse relativement constant (1,4 g de SDS par g de polypeptide) et les transforme en polyanions. La dissociation-dénaturation intervient sous l'action combinée des réducteurs des liaisons S-S tels que le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le dithiothreitol. La protéine prend ainsi une forme allongée ("random coil"), dont la longueur est proportionnelle à la masse moléculaire. La charge négative permet la migration des protéines vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement par effet de tamis moléculaire. Les marqueurs protéiques de faible poids moléculaires suivants ont été utilisés pour estimer la masse

moléculaire des enzymes:  $\alpha$ -lactalbumine (14,4 kDa), inhibiteur de la trypsine (20,1 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), ovalbumine (43 kDa), sérum albumine bovin (67 kDa) et la phosphorylase b (94 kDa). La droite de calibration a été construite selon le modèle de Fergusson ( $\log_{10} M_r = a + b.R_f$ ), en utilisant un logiciel approprié (BioGraphic), après avoir coloré les gels et les avoir scannés par densitométrie. Cela permet une estimation des masses moléculaires des protéines en se référant à la distance de migration ( $R_f$ ) des protéines standards de masse moléculaire relative connue ( $M_r$ ) et analysées exactement dans les mêmes conditions.

L'isoélectrofocalisation (IEF) a été effectuée sur des gels contenant des ampholites de pH variant entre 3 et 9. Des marqueurs protéiques de pI compris entre 3,5 et 10,3 ont été utilisés: amyloglucosidase (pI 3,5), inhibiteur trypsique du soja (pI 4,55),  $\beta$ -lactoglobuline A (pI 5,20), anhydrase carbonique bovine B (pI 5,85), anhydrase carbonique humaine B (pI 6,55), myoglobine acide (6,85), myoglobine basique (pI 7,35), lentille lectin-middle (pI 8,85), trypsinogène (pI 9,30), cytochrome C (pI 10,3).

Les courbes de titration électrophorétique ont été réalisées afin de choisir le meilleur pH pour la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions. Ces analyses ont été effectuées sur les mêmes gels que pour l'IEF.

Les gels d'électrophorèse ont été révélés soit au Bleu de Coomassie, soit au Nitrate d'argent. Tous les réactifs de coloration sont préparés journalièrement et ne sont pas recyclés. Un volume de 100 ml du réactif est introduit dans la chambre de coloration pour chaque trempage.

## Coloration au Bleu de Coomassie

Après la migration électrophorétique, les gels sont trempés successivement dans les solutions suivantes:

- a) Fixation des protéines: acide trichloroacétique à 20 % (20 min, 20°C). Etape non nécessaire pour l'SDS-PAGE.
- b) Lavage 1: mélange méthanol-acide acétique-eau 40/10/50 ( 2 min, 20°C)
- c) Coloration: Bleu de Coomassie Brillant R250 0,1 % (p/v) dans un mélange méthanol-acide acétique-eau 40/10/50 (10 min, 50°C). Du CuSO<sub>4</sub> à 0,1 % (p/v) est additionné pour l'IEF.
- d) Lavage 2: solution b. Trois fois pour l'SDS-PAGE et Native-PAGE, une fois pour l'IEF.
- e) Préservation: glycérol 5 % (5 min, 50°C)

### **Coloration au nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>)**

Après la migration électrophorétique, les gels sont trempés successivement dans les solutions suivantes:

- a) Fixation des protéines: acide trichloroacétique à 20 % (20 min, 20°C). Pas nécessaire pour l'SDS-PAGE.
- b) Lavage 1. Mélange d'éthanol-acide acétique-eau millipore 50/10/40 (2 min, 50°C)
- c) Lavage 2. Mélange d'éthanol-acide acétique-eau millipore 10/10/80 (2-4 min, 50°C). 2 trempages successifs. Etape non nécessaire pour l'SDS-PAGE
- d) Sensibilisateur: glutardiadéhyde 8,3 % dans l'eau millipore (6 min, 50°C)
- e) Lavage 3. 2 trempages successifs de la solution b (3-5 min, 50°C). Etape non nécessaire pour l'SDS-PAGE
- f) Lavage 4: eau millipore (2 min, 50°C). 2 trempages successifs.
- g) Coloration au nitrate d'argent: AgNO<sub>3</sub> 0,5 % (p/v) pour l'IEF et Native-PAGE, 0,25 % (p/v) pour l'SDS-PAGE (10-13 min, 40°C).
- h) Lavage 5: eau millipore (0,5 min, 30°C). 2 trempages successifs.

- i) Développement: formaldéhyde 0,015 % (v/v) dans du carbonate de sodium à 2,5 % (p/v), pendant 0,5 à 4 min, à 30°C.
- j) Lavage 6: acide acétique 5 % (2 min, 50°C)
- k) Préservation: mélange acide acétique-glycérol-eau 10/5/85 ou 10/10/80 (3 min, 50°C).  
Etape non nécessaire pour l'IEF.

Après révélation, les gels sont photographiés ou scannés, puis conservés à 4°C au réfrigérateur dans des boîtes de pétris, contenant un mélange de glycérol-acide acétique-eau millipore 5/10/85.

## VIII. Détermination de la glycosilation des enzymes

La structure glycoprotéique des enzymes a été déterminée par deux méthodes:

- a) Révélation de la structure glucidique par la méthode du résorcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, décrite par Monsigny *et al.* (1988). L'échantillon à analyser (200 µl) est combiné avec 200 µl de résorcinol (1 mg/ml) et 1 ml d'acide sulfurique à 75 %. Les tubes sont homogénéisés au vortex et chauffés à la température de 90°C dans un bain marie, pendant 30 min. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain glacé, puis placés à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance des tubes est mesurée à 430 nm au spectrophotomètre (Milton Roy Spectronic 601) contre un blanc. Le D-glucose et le D-mannose ont été utilisés comme oses simples standards.
- b) Fixation des glycoprotéines sur la concanavalline A-Sepharose par chromatographie d'affinité. L'enzyme purifiée (4 U) est incubée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,1, contenant du MgCl<sub>2</sub> 2 mM, du CaCl<sub>2</sub> 2 mM et la concanavalline A-Sepharose (100 µl); pendant 30 min. Après centrifugation (10 000g, 1 min) l'activité enzymatique du

surnageant est comparée à celle du témoin n'ayant pas été incubé avec la concanavalline A-Sepharose. En effet les glycoprotéines renfermant des résidus de D-mannose ou D-glucose (peu sensible) se fixent par affinité à la concanavalline A. La liaison d'une protéine à la concanavalline A indique donc qu'elle est une glycoprotéine.

## **IX. Influence du pH, de la température et des composés chimiques sur l'activité et la stabilité des enzymes.**

L'effet du pH sur l'activité est déterminé en incubant l'enzyme avec son substrat 0,5 % (p/v); dans des tampons Mcllvaine (phosphate/citrate) à des pH compris entre 2,5 à 9 (intervalles de pH de 0,5 unités), pendant 10 min à température constante (40°C). Le pH de stabilité a été déterminé par préincubation de l'enzyme dans les mêmes tampons mentionnés ci-dessus pendant 1,5 h, à 30°C. Après cela, le pH est réajusté à pH 5, à l'aide d'un tampon acétate de sodium 1 M pH 5. L'activité résiduelle est ensuite déterminée.

La température optimum est déterminée par incubation de l'enzyme avec son substrat 0,5 % (p/v); à des températures variant de 20 à 90°C pendant 10 min, dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5. La stabilité thermique est étudiée par préincubation de l'enzyme dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 5, pendant 1 à 1,5 h. L'activité résiduelle a été déterminée par incubation de l'enzyme avec son substrat 0,5 % (p/v) à 55°C, pendant 10 min.

L'influence des composés chimiques (aux concentrations de 0,5 et 2 mM) sur l'activité enzymatique est étudiée à 30°C, à pH 5. Le temps de préincubation pour la détermination de l'activité et de la stabilité sont respectivement 5 et 45 min.



## X. Détermination des paramètres cinétiques des enzymes

Les constantes de Michaelis-Menten ont été calculées à partir des représentations de Lineweaver-Burk des données obtenues en mesurant les vitesses initiales d'hydrolyse des substrats par les enzymes. Les activités enzymatiques ont été déterminées en mesurant la production des sucres réducteurs, par l'essai au BCA. Pour le calcul de l'énergie d'activation ( $E_a$ ), le  $Q_{10}$  est déterminé et l' $E_a$  est calculée selon la méthode de Segel (1975). L'énergie d'activation est donnée par la relation:

$$E_a = 0,23 R T_2 T_1 \log(Q_{10})$$

R, constante des gaz parfaits,  $T_2$  et  $T_1$  températures en °K, telle que  $T_2 - T_1 = 10$  °K,  $Q_{10}$  = rapport de  $V_{max}$  à  $T_2$  sur  $V_{max}$  à  $T_1$

## XI. Détermination de l'activité lytique des enzymes

L'activité lytique d'une enzyme est définie comme étant sa capacité à catalyser la lyse des parois cellulaires des microbes ou d'inhiber leur croissance par la lyse cellulaire. C'est une propriété que possède certaines enzymes endolytiques capables d'hydrolyser les parois cellulaires des micro-organismes (champignons et les levures). Les enzymes possédant cette propriété sont les  $\beta$ -glucanases, le lysozyme, les chitinases et les protéases. L'activité lytique des enzymes isolées a été déterminée sur des cellules de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). La croissance des levures a été suivie en mesurant la turbidité du milieu à 610 nm, comme précédemment décrit par Nagata *et al.* (1990). Le milieu de culture utilisé est le milieu Czapek :  $KNO_3$  (3 g),  $K_2HPO_4$  (1 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g), KCl (0,5 g),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,02 g), glucose (10 g),  $H_2O$  (q.s.p. 1000 ml). Le pH du milieu a été réajusté à 6.

***TROISIEME PARTIE***

**RESULTATS ET DISCUSSION**

---

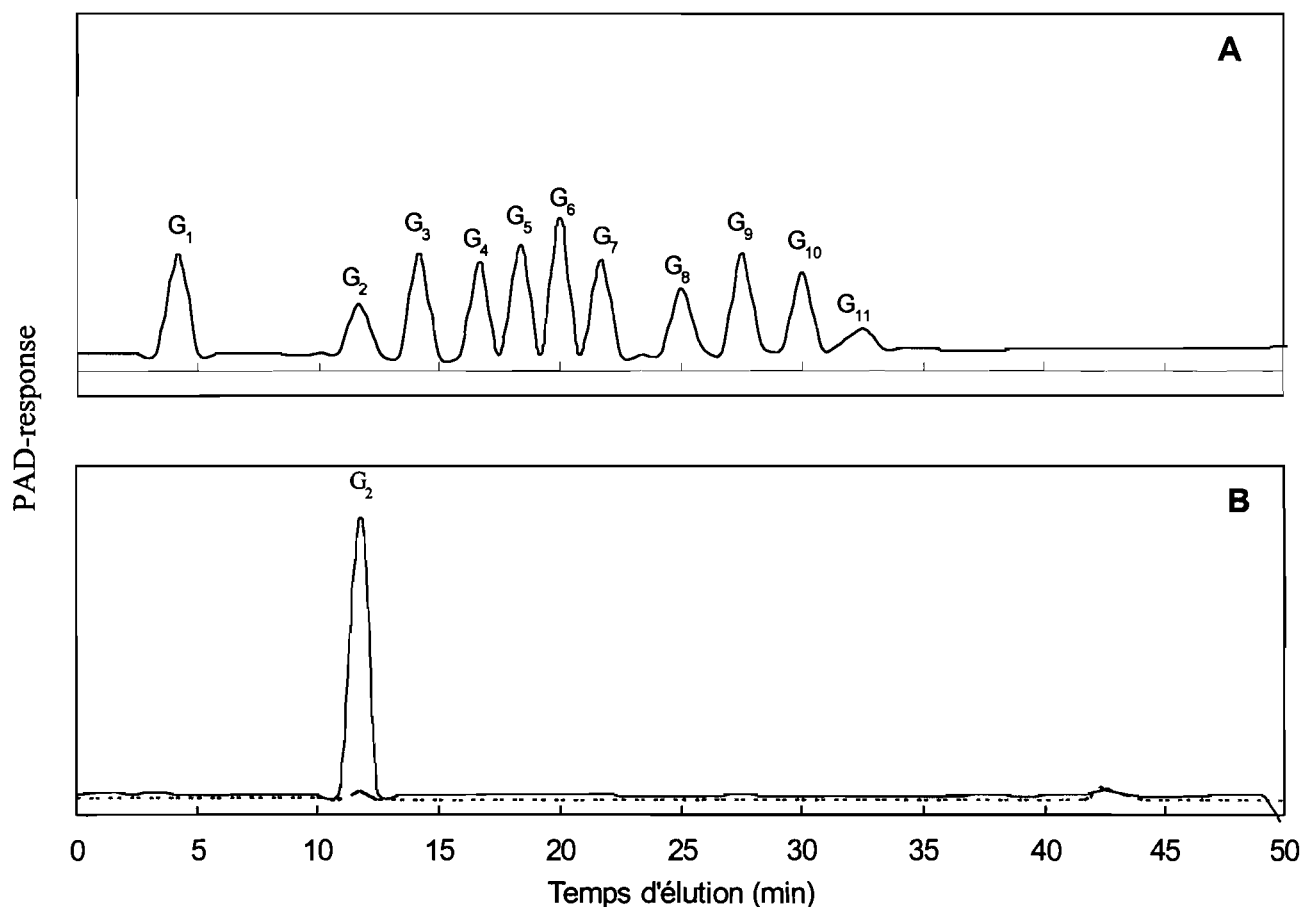
**CHAPITRE 1**

**PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA  $\beta$ -AMYLASE DE  
*CURCULIGO PILOSA* (Schum. et Thonn.) Engl.**

---

## Purification de la $\beta$ -amylase

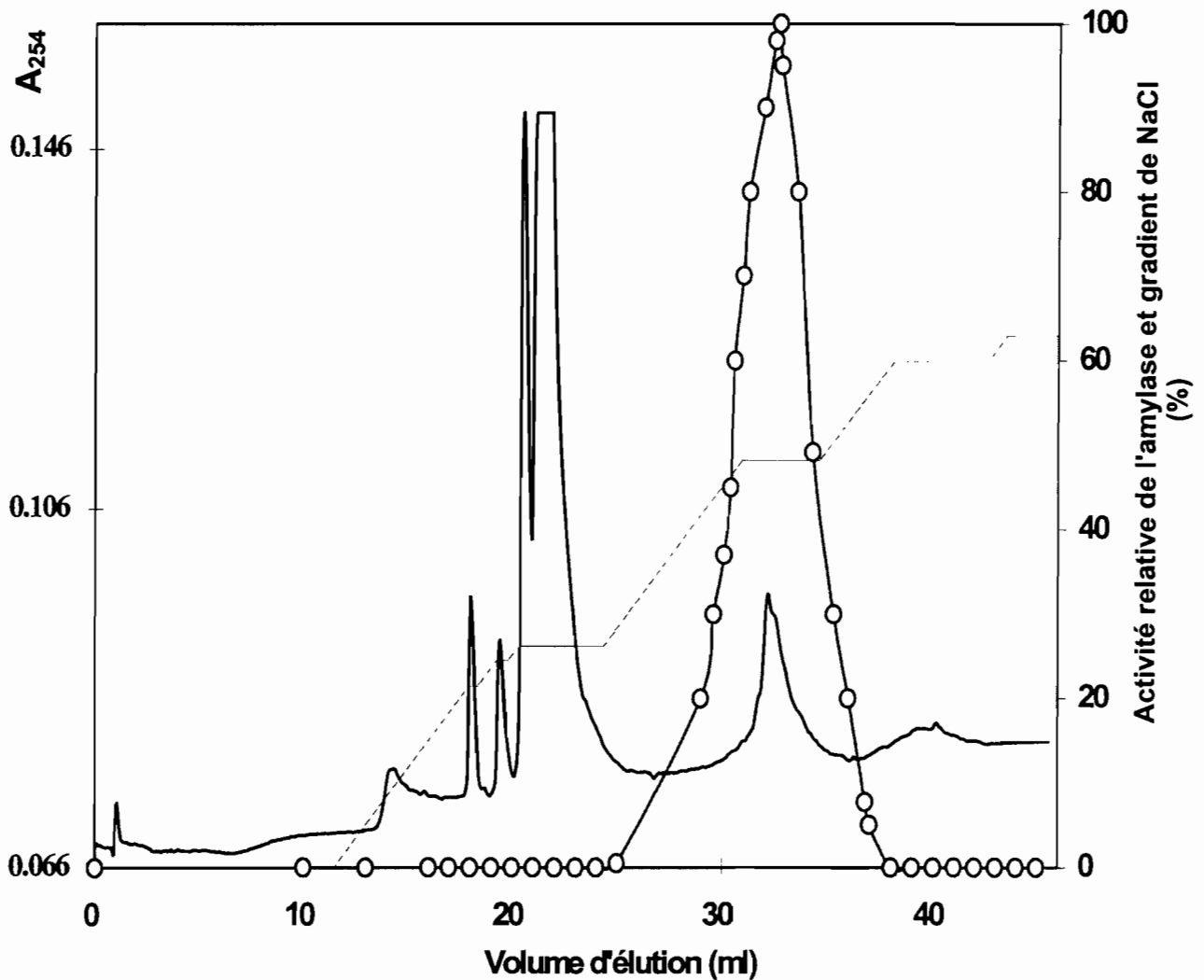
Depuis des décennies, les rhizomes de *Curculigo pilosa* (Schum. et Thonn.) Engl. (*Hypoxidaceae* ou *Liliaceae*) sont traditionnellement utilisés dans la préparation de la bière de mil (dolo). Il a donc été présumé qu'ils renferment des activités amylasiques élevées.



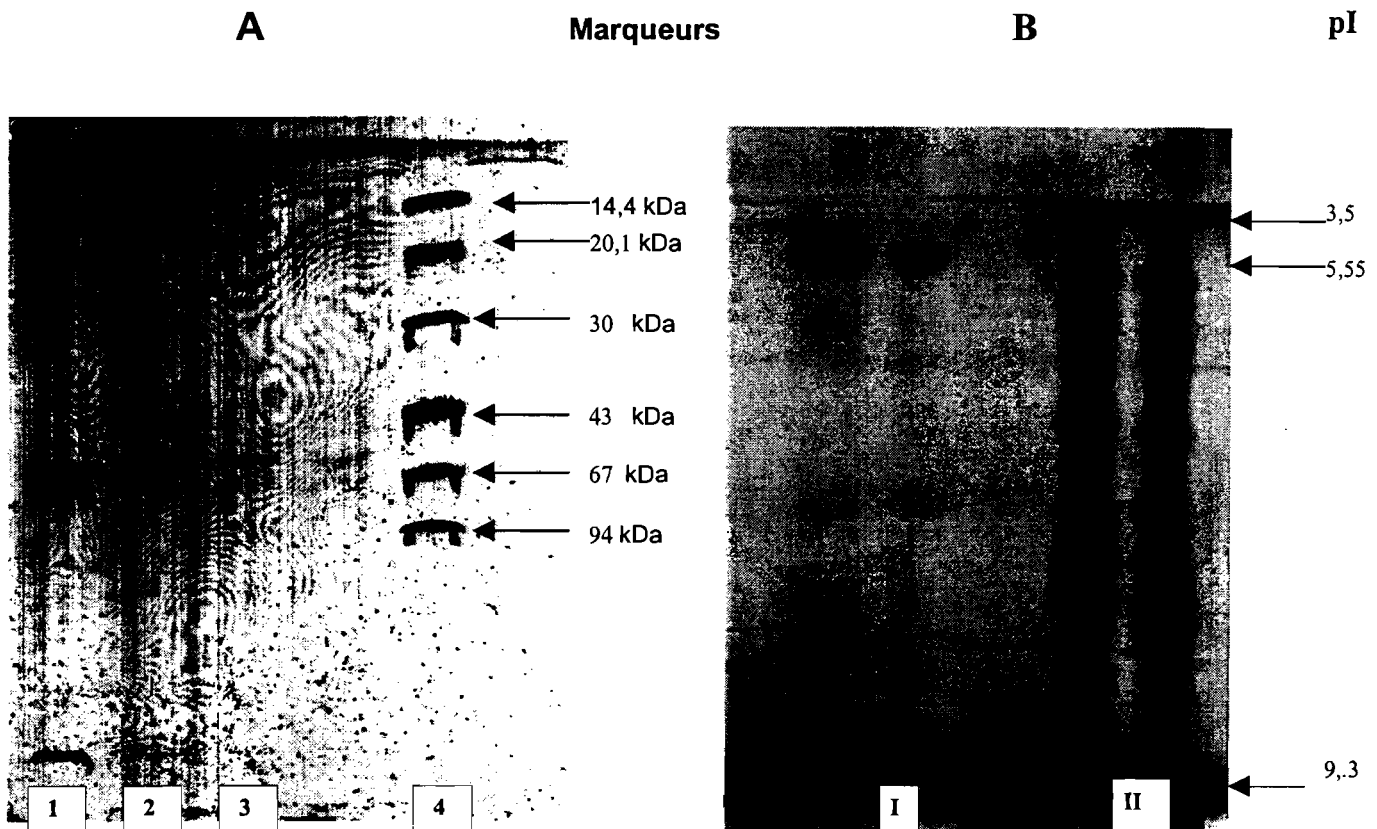
**Figure 1. Analyse par HPAEC du mode d'action de la fraction dialysée de l'extrait enzymatique brut de *C. pilosa* sur l'amidon de pomme de terre gélatinisé. A,** Profile d'élution des maltodextrines standards (0,5 mg/ml); G<sub>n</sub>, oligomères de glucose (n = degré de polymérisation). **B,** l'amidon de pomme de terre gélatinisé (10 mg) a été incubé avec l'extrait enzymatique brut dialysé (10 unités), dans un tampon de maléate de sodium 50 mM pH 6, pendant 5 min, à la température de 40°C. Substrat seul (.....), substrat + extrait enzymatique brut (—).

En utilisant des substrats appropriés, l'extrait brut a été testé pour les activités de l' $\alpha$ -amylase, de la  $\beta$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase. Cependant, aucune activité de l' $\alpha$ -amylase ou de l' $\alpha$ -glucosidase n'a pu être détectée à la limite de la sensibilité des essais utilisés. Ces résultats sont confirmés par l'analyse par chromatographie d'échange d'ions à haute performance (HPAEC) des mixtures d'incubations de l'amidon soluble avec l'extrait enzymatique brut (Figure 1). Seul le maltose pouvait être détecté comme produit. A notre avis *C. pilosa* diffère considérablement des autres plantes pour cette propriété.

La  $\beta$ -amylase a été purifiée à partir de l'extrait brut comme indiqué dans les matériels et méthodes. La synthèse des étapes essentielles et le bilan de la purification, sont résumés dans le Tableau 1. A partir de deux étapes de précipitations au sulfate d'ammonium, approximativement 60 % des protéines ont été débarrassées, la viscosité de l'échantillon a été réduite et 64 % de l'activité enzymatique a été retenue. L'étape de la chromatographie de la filtration sur gel a été utile pour séparer l'échantillon des composés colorés aussi bien que pour augmenter l'activité spécifique de l'enzyme. La dernière étape (chromatographie d'échange d'ions sur colonne MonoQ, Figure 2) a permis d'obtenir un rendement final de 38 % avec un facteur de purification de 100. Les activités spécifiques finales sont de 4859 et 5650 U/mg en utilisant respectivement comme substrats l'amidon soluble et le PNPG5. Ces activités sont plus élevées que celles des  $\beta$ -amylases les plus actives telles que la  $\beta$ -amylase de la pomme de terre (4664 U/mg) (Chang *et al.*, 1996) et la  $\beta$ -amylase de *Clostridium thermosulphurogenes* (4215 U/mg) (Shen *et al.*, 1988).



**Figure 2. Profil d'élution par FPLC de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* à travers une colonne d'échange d'anions MonoQ. Les protéines liées ont été éluées avec un gradient de NaCl (—), l'élution protéique a été suivie à 254 nm ( ——— ) et les activités amylolytiques (O) ont été déterminées par l'essai au BCA. Le gradient final de 100 % correspond à une concentration en NaCl de 500 mM.**



**Figure 3. Electrophorèse sur PhasGel de la  $\beta$ -amylase des rhizomes de *C. pilosa*, pour la détermination de la masse moléculaire et du pI. A, SDS-PAGE sur un PhastGel de gradient de 10 à 15 % des différentes étapes de la purification. Le gel a été révélé au Bleu de Coomassie Brilliant R250 : ligne 1, fraction obtenue par la précipitation au sulfate d'ammonium ; ligne 2, fractions rassemblées provenant de la chromatographie de filtration sur gel; ligne 3, fractions rassemblées provenant de la séparation par FPLC sur la colonne MonoQ et ligne 4, marqueurs protéiques de faibles masses moléculaires (Pharmacia). B, Isoélectrofocalisation de la  $\beta$ -amylase purifiée à partir des rhizomes de *C. pilosa*. Le gel a été révélé au nitrate d'argent : I, deux applications de la  $\beta$ -amylase purifiée, deux applications des marqueurs protéiques de pI (Pharmacia).**

La  $\beta$ -amylase purifiée migre en unique bande par la native-PAGE et par la SDS-PAGE dans des conditions réductrices, c'est à dire en présence du  $\beta$ -mercaptoéthanol (Figure 3A). La protéine possède une masse moléculaire apparente de 64 kDa (estimée par SDS-PAGE et confirmée par la native PAGE), en bon accord avec les  $\beta$ -amylases monomériques des plantes ( $60 \pm 5$  kDa) (kohno *et al.*, 1990). L'enzyme est incapable de se lier à la

concanavalline A, suggérant qu'elle ne soit pas une glycoprotéine. Le point isoélectrique (pI) de l'enzyme estimé par isoélectrofocalisation (Figure 3B) est situé au pH 4,2, dans la zone acide. Ce pI est plus petit que celui rapporté pour les  $\beta$ -amylases de l'orge, du blé et du grain de soja, mais il est comparable à celui de la  $\beta$ -amylase du pois d'épicotyl (pI 4,35) (Lizotte *et al.*, 1990) et de la  $\beta$ -amylase du maïs (pI 4,2-4,4) (Laurière *et al.*, 1992).

**Tableau 1. Résumé de la purification de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*.**

Étape de fractionnement	Protéines totales (mg)	Activités totales (U)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	291	14100	48,5	1	100
Précipitation au sulfate d'ammonium	119	9050	76	1,6	64
Filtration sur gel (ACA54)	7,2	6480	900	18,6	46
FPLC (MonoQ)	1,1	5345	4859	100,2	38

## Identification de l'enzyme purifiée comme étant une $\beta$ -amylase

L'enzyme purifiée est incapable de libérer des fragments colorés à partir de l'azurine crosslinked amylose (AZCL-amylose) ou d'hydrolyser le *p*-Nitrophényl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, confirmant qu'elle n'appartient pas aux groupes de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase. En outre, sa capacité à hydrolyser le PNPG5 est caractéristique pour une  $\beta$ -amylase (McCleary et Codd, 1989). De plus encore, les produits d'hydrolyse des amidons (soluble et insoluble), de l'amylose et de l'amylopectine donnent exclusivement le maltose comme le seul produit détecté et aucun oligomère de poids moléculaire élevé n'a été identifié ni par l'analyse par

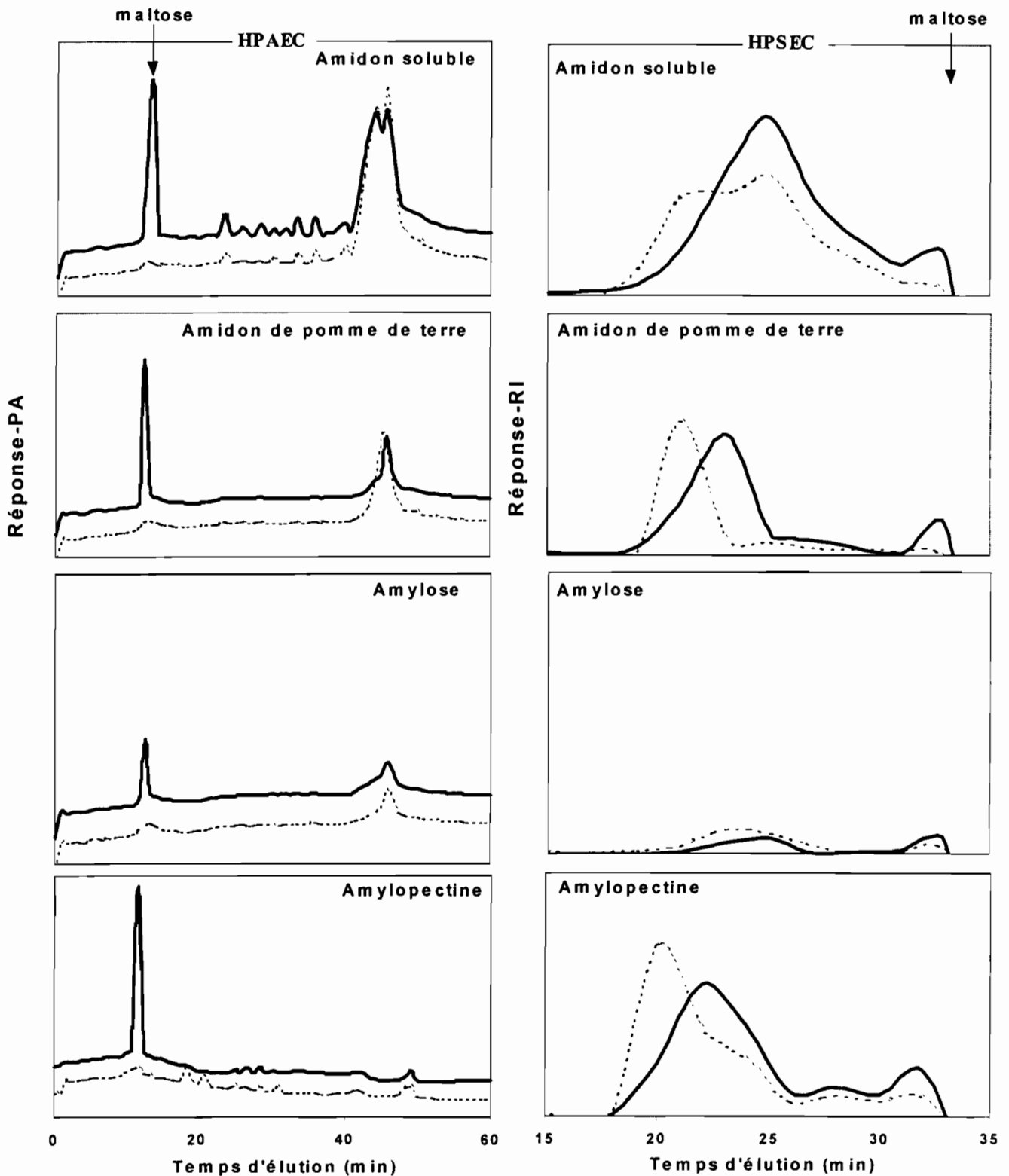


HPAEC ni par HPSEC (Figure 4). Ce mode d'hydrolyse s'avère typique pour les exoenzymes. Les résultats du screening des activités enzymatiques sont également confirmés par la migration électrophorétique de la fraction obtenue après la précipitation au sulfate d'ammonium (Figure 3A); car la  $\beta$ -amylase isolée apparaît comme étant la protéine majoritaire juste après cette étape. Si d'autres protéines amylolytiques étaient présentes, leurs bandes auraient pu être détectées sur le gel.

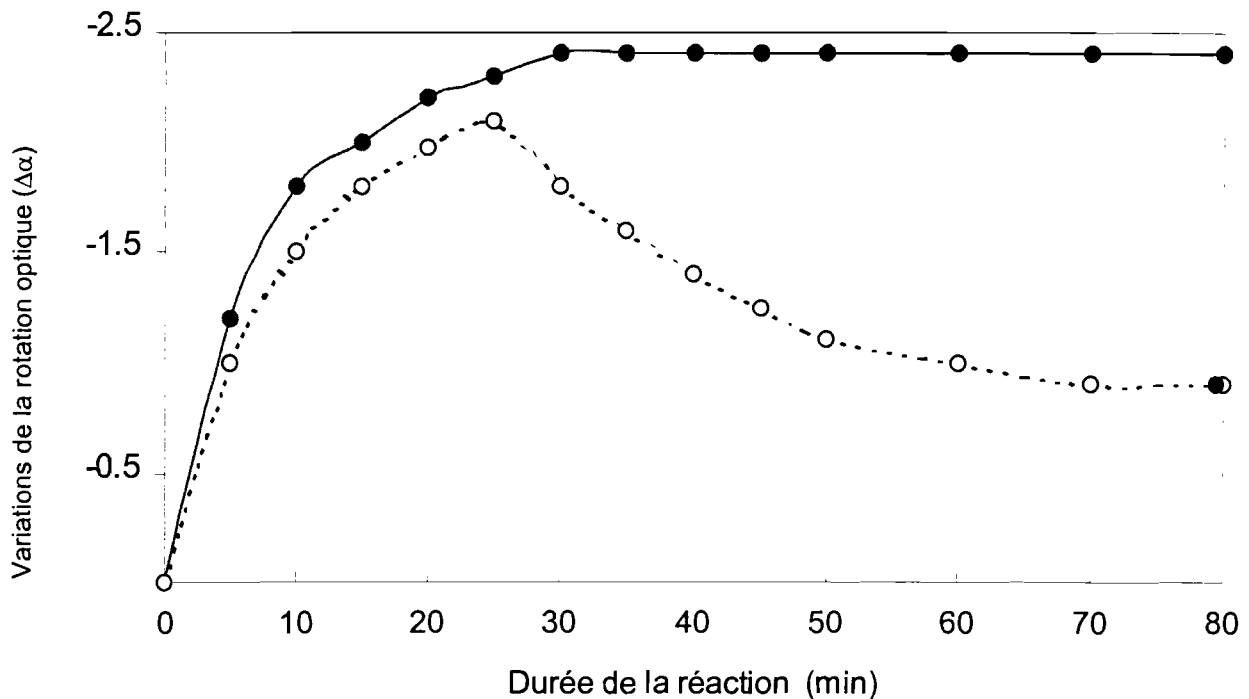
Les hydrolysats formés par la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* ont été identifiés comme étant de configuration anomérique  $\beta$  selon les observations suivantes (Figure 5):

-(1) La mutarotation est diminuée dans le cas de l'enzyme de *C. pilosa*, mais augmente dans le cas de l' $\alpha$ -amylase du pancréas de porc, en accord avec l'observation de Yamasaki et collaborateurs (1989) pour la  $\beta$ -amylase du ginseng.

-(2) Après 25 min d'incubation, la variation de la rotation optique décroît lentement, résultant de la conversion du  $\beta$ -maltose formé en  $\alpha$ -maltose à cause de la mutarotation (Kohno *et al.*, 1989). Il faut noter à ce titre que le pouvoir rotatoire spécifique de l' $\alpha$ -maltose est plus élevé que celui du  $\beta$ -maltose. De même, pour deux polyssacharides formés avec les unités d'un même ose, celui qui a le DP le plus élevé possède également le pouvoir rotatoire spécifique le plus élevé (pour les mêmes concentrations massiques). Par exemple le pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon soluble est plus élevé que celui des maltodextrines ou du glucose. Basé sur ces observations, le maltose formé après l'hydrolyse de l'amidon soluble par l'amylase de *C. pilosa* est déterminé comme étant de configuration anomérique de type  $\beta$ . Ces résultats montrent donc que l'enzyme purifiée à partir de rhizomes non germés de *C. pilosa* est une  $\beta$ -amylase.



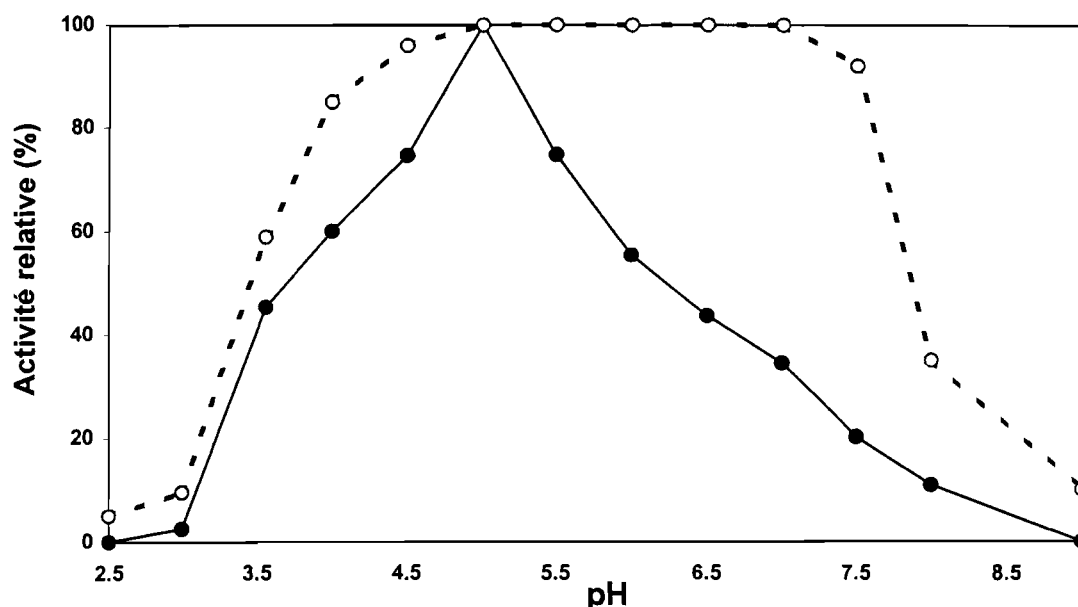
**Figure 4. Mode d'élu-tion par HPAEC et HPSEC des mélanges réactionnels de la  $\beta$ -amylase purifiée, avec l'amidon soluble, l'amidon de pomme de terre, l'amylose et l'amylopectine.** Les incubations enzymatiques ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, pH 5, à 55°C pendant 5 min. Substrat seul (.....), substrat + enzyme (—).



**Figure 5. Mutarotation des sucres formés par la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*.** Les enzymes purifiées (3 U) sont mises en incubation avec l'amidon soluble dissout dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 5. Le mélange est incubé dans la cellule du polarimètre (1 dm de long) thermostatée à la température de 30°C.  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* ( $\circ$ ),  $\alpha$ -amylase du pancréas de porc ( $\bullet$ ),  $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$  où  $\alpha_0$  est l'angle initial de la rotation optique et  $\alpha$  l'angle mesuré au cours de la progression de la réaction enzymatique.

## Effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

L'optimum d'activité de l'enzyme se situe autour du pH 5, et l'enzyme est stable aux pHs compris entre 5 et 7,5 (Figure 6). Ces valeurs sont situées dans la gamme d'activité optimum observée pour les  $\beta$ -amylases d'autres espèces végétales (Yamasaki *et al.*, 1989; Hagenimana *et al.*, 1994; Rashad *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996).



**Figure 6. Activité (●) et stabilité (○) de la β-amylase en fonction du pH.**

La β-amylase de *C. pilosa* déploie son maximum d'activité à la température de 55°C et est stable dans une large zone de température (Figure 7). L'enzyme conserve plus de 90 % de son activité aux températures inférieures à 65°C, après 1,5 h d'incubation. La courbe de la libération du maltose en fonction du temps est linéaire pendant 50 min à la température de 55°C, et l'enzyme est active à cette température, en présence du substrat pendant plus de 3 h (Figure 8). Cette β-amylase est plus thermostable à 55°C, que la plupart des β-amylases des plantes reportées dans la littérature (Kohno *et al.*, 1989; Yamasaki *et al.*, 1989; Lizotte *et al.*, 1990, Hagenimana *et al.*, 1994; Rashad *et al.*, 1995, Okoda *et al.*, 1995; Samson et Morel, 1995; Chang *et al.*, 1996). Comme l'ont souligné Saha et Zeikus (1989, 1990), la thermostabilité et la thermoactivité élevées des amylases sont très importantes dans les procédés de transformation biotechnologiques de l'amidon en sirops de maltose. Cela constitue un atout pour des applications de cette enzyme en biotechnologie alimentaire.

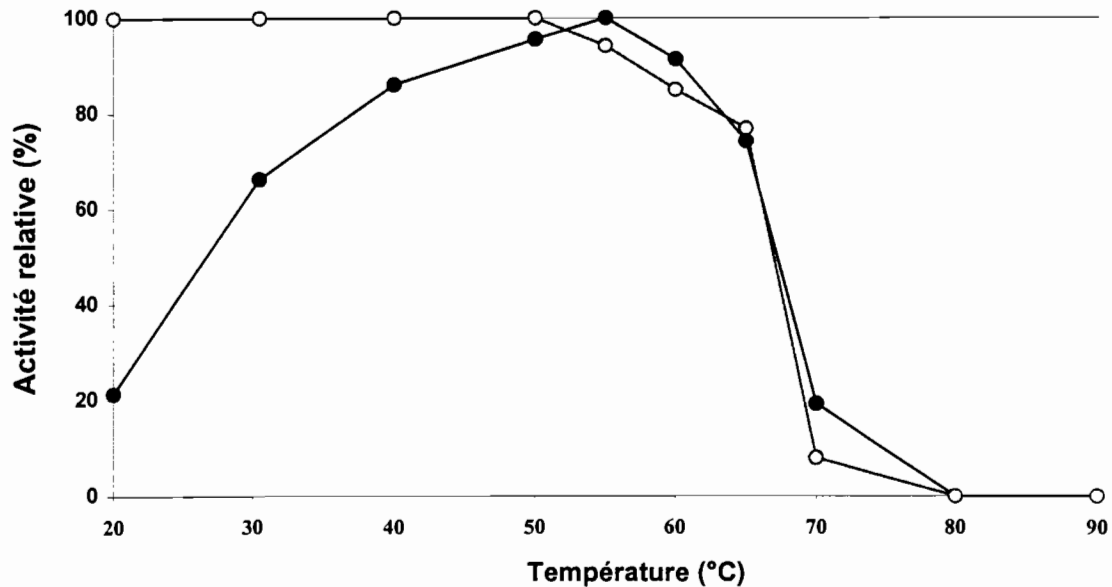


Figure 7. Activité (●) et stabilité (○) de la  $\beta$ -amylase en fonction de la température.

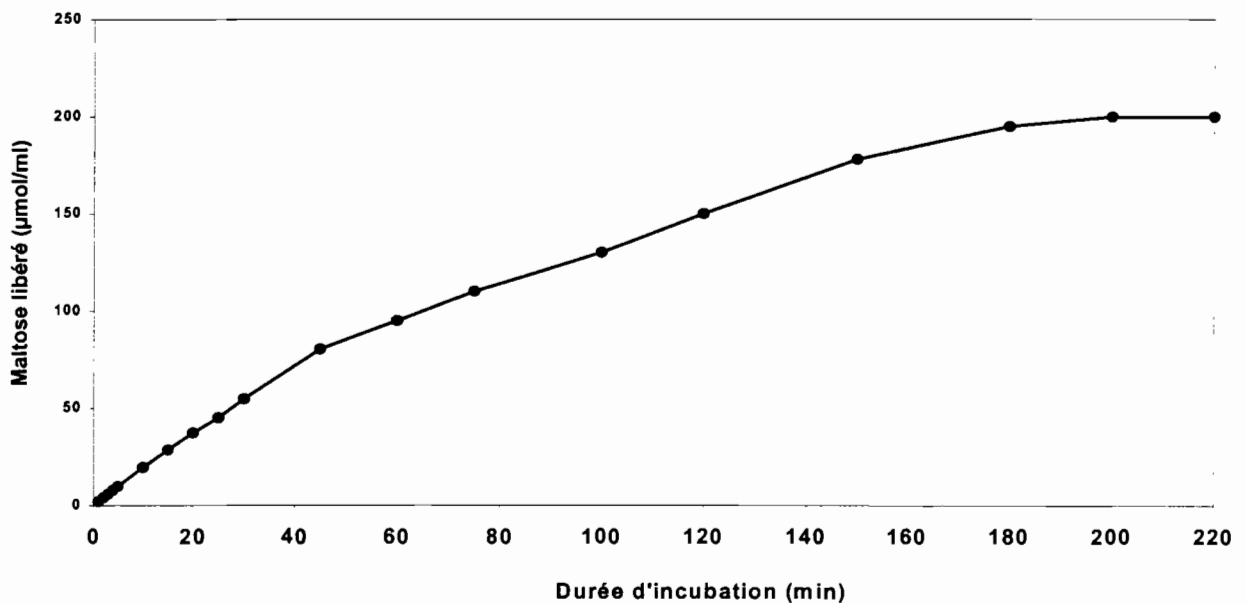


Figure 8. Cinétique de la libération du maltose à partir de l'amidon soluble par la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*. Le milieu réactionnel (1,1 ml) contenait 70 mg d'amidon soluble et 2 unités de l'enzyme dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, pH 5 à 55°C. Après l'incubation, 10  $\mu$ l du mélange sont prélevés à des intervalles de temps réguliers, puis les sucres réducteurs produits sont quantifiés par l'essai au BCA.

## Effet de quelques substances chimiques sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.

L'enzyme est fortement activée et stabilisée par les métaux alcalins et les alcalino-terreux aux concentrations de 0,5 mM et 2 mM (Tableau 2). Certains ions des métaux de transitions ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ) sont inhibiteurs et affectent considérablement la stabilité de l'enzyme. Ces métaux sont bien connus comme inhibiteurs des  $\beta$ -amylases (Lizotte *et al.*, 1990; Rashad *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996). Cependant le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et le  $\text{MnSO}_4$  augment l'activité de l'enzyme. Quand bien même une augmentation de l'activité enzymatique est observée en présence du  $\text{Co}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$ , l'enzyme est instable en leur présence. Les agents réducteurs (Cystéine, DTT,  $\beta$ -mercaptoéthanol) améliorent l'activité de l'enzyme à faible concentration (0,5 mM). Comme consigné dans le Tableau 2, à la concentration de 2 mM la stabilité de l'enzyme est significativement affectée par la présence de l'EDTA et du  $\beta$ -mercaptoéthanol. D'une manière surprenante ces substances sont communément utilisées pour l'extraction de la  $\beta$ -amylase (Kohno *et al.*, 1989, Hagenimana *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1997). L'instabilité de l'enzyme pourrait être donc due à l'effet de la température. L'enzyme est fortement inhibée par le *p*-chloromercuribenzoate de sodium (PCMB), un agent chélatant des fonctions thiols (-SH) et cela est vérifié pour presque toutes les  $\beta$ -amylases. Ces résultats montrent que la cystéine est impliquée dans la catalyse de l'enzyme. Les résidus sulfureux (cystéine, méthionine) aussi bien qu'aspartyl, glutamyl et leucyl sont clairement identifiés comme étant essentiels pour la catalyse de la  $\beta$ -amylase (Mikami *et al.*, 1980, 1993; Toda *et al.*, 1993; Totsuka et Fukazawa, 1996).

**Tableau 2. Effet de quelques composés chimiques sur l'activité et la stabilité de la β-amyrase de *C. pilosa*.**

Composé chimique	Activité initiale (%) et activité résiduelle (%) à la concentration indiquée du réactif.			
	Activité		Stabilité	
	0,5 mM	2 mM	0,5 mM	2 mM
Témoin*	100	100	100	100
KCl	112	113	107	109
NaCl	132	138	120	132
BaCl <sub>2</sub>	126	130	124	115
CaCl <sub>2</sub>	112	114	102	103
CoCl <sub>2</sub>	111	124	91	83
CuCl <sub>2</sub>	93	96	20	18
MgCl <sub>2</sub>	102	106	91	87
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	62	61	14	3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110	115	104	95
MnSO <sub>4</sub>	129	132	49	10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	17	13	11	2
ZnSO <sub>4</sub>	114	115	108	105
AgNO <sub>3</sub>	29	0	0	0
β-mercaptoéthanol	102	70	100	63
DTT	104	118	103	117
Cystéine	105	110	100	106
EDTA	126	122	89	69
SDS	109	86	79	55
PCMB	8	0	0	0
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	71	44	67	36

\*Le témoin est préparé en remplaçant le composé chimique avec de l'eau distillée. Les blancs (contenant le composé chimique) ont été préparés pour chaque incubation comme dans l'essai standard au BCA. L'erreur relative des mesures est de l'ordre de 3 %.

## Constantes cinétiques de l'enzyme

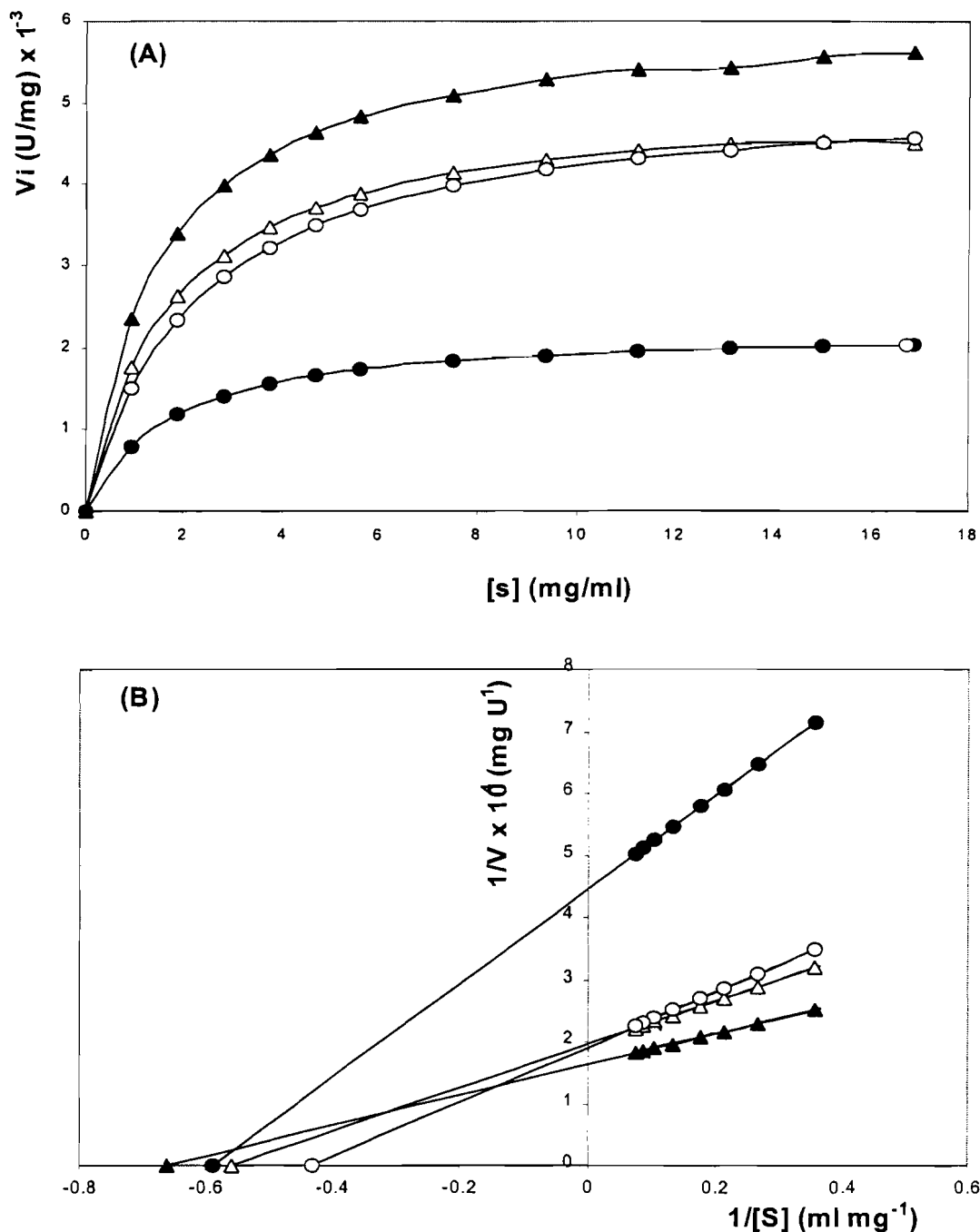
La vitesse d'hydrolyse enzymatique en fonction de la concentration du substrat obéit à la loi cinétique de Michaelis-Menten (Figure 9A), et des relations linéaires de  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$  ont été obtenues pour tous les substrats utilisés (Figure 9B). A cause de la nature hétérogénique des molécules d'amidon, les masses moléculaires des substrats ne pouvaient pas être déterminées. De ce fait les valeurs de  $K_m$  ont été exprimées en mg/ml au lieu des concentrations molaires (Tableau 3). Le  $K_m$  apparent pour l'amylopectine est plus élevé que ceux de l'amidon soluble, de l'amidon de pomme de terre et de l'amylose, impliquant une faible affinité de l'enzyme pour ce substrat.

**Tableau 3. Paramètres cinétiques**

Substrat	$K_m$ (mg/ml)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat.} \times 10^{-3}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat.} K_m^{-1} \times 10^{-3}$ (s <sup>-1</sup> ml mg <sup>-1</sup> )	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Amidon soluble	1,5 ± 0,1	6135 ± 215	6,54 ± 0,23	4,36 ± 0,15	18,3 ± 0,9
Amidon de pomme de terre	1,8 ± 0,1	5125 ± 205	5,46 ± 0,22	3,03 ± 0,12	26,5 ± 1,3
Amylose	1,7 ± 0,1	2254 ± 113	2,40 ± 0,12	1,41 ± 0,07	29,5 ± 1,5
Amylopectine	2,3 ± 0,1	5208 ± 260	5,55 ± 0,27	2,3 ± 0,12	21,4 ± 1,1

L'enzyme possède cependant l'efficacité catalytique ( $k_{cat.}/K_m$ ) la plus faible pour l'amylose. La rapidité d'hydrolyse de l'amidon et de l'amylopectine par rapport à l'amylose avait également été rapportée pour les  $\beta$ -amylases des plantes (Lizotte *et al.*, 1990; Monroe et Preiss, 1990; Wang *et al.*, 1996; Vikso *et al.*, 1997). Par contre, l'inverse a pu être observé pour les  $\beta$ -amylases de source microbienne (Shen *et al.*, 1988; Sohn *et al.*, 1996).



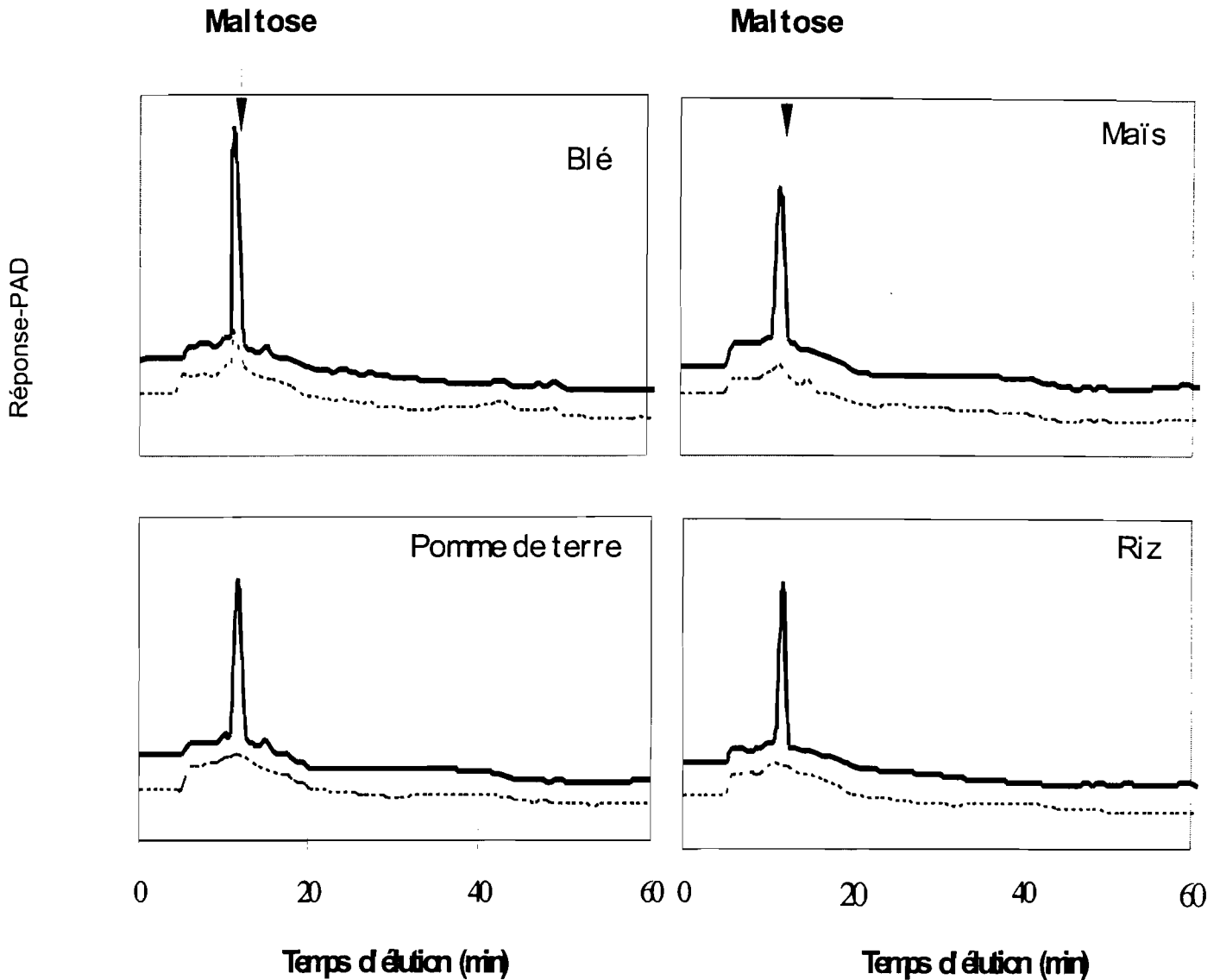


**Figure 9. Effet de la concentration en substrat sur l'activité de l'enzyme. A, Tracé de Michaelis-Menten; B, tracé en double inverse de Lineweaver-Burk.** L'étude cinétique a été réalisée dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, pH 5, à la température de 55°C. Les sucres réducteurs produits ont été dosés par l'essai au BCA comme décrit en matériels et méthodes. Les vitesses initiales d'hydrolyse de l'amidon soluble (▲), de l'amidon gélatinisé de pomme de terre (△), de l'amylose (●) et de l'amylopectine (○), ont été déterminées par l'essai au BCA.

Comme l'a mentionné Lizotte et collaborateurs (1990), l'hydrolyse de l'amylose pourrait être limitée par la disponibilité de l'extrémité non réductrice, et plus probablement par sa solubilité dans l'eau. Les  $K_m$  pour l'amidon soluble et l'amidon gélatinisé de la pomme de terre sont plus faibles que ceux des  $\beta$ -amylases de la patate douce (Hagenimana *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1996) et de la  $\beta$ -amylase de pea epicotyl (Lizotte *et al.*, 1990). Cela indique que l'enzyme possède une forte affinité pour ces substrats. Cependant, le  $K_m$  pour l'amylopectine est plus élevé que celui de la  $\beta$ -amylase de *Arabidopsis thaliana* (Monroe et Preiss, 1990). Le  $K_m$  et  $k_{cat}$ . (turnover number) de cette  $\beta$ -amylase pour l'amidon soluble sont similaires à ceux de la  $\beta$ -amylase de *C. thermosulphurogenes* (1,6 mg/ml et  $6,66 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ , respectivement) (Shen *et al.*, 1988). Les énergies d'activation ( $E_a$ ) calculées (Tableau 3) pour ces substrats sont en corrélation avec leurs turnover numbers et ces valeurs sont dans la zone de la plupart des  $\beta$ -amylases végétales (20-80 kJ/mol) (Houvet, 1986; Lizotte *et al.*, 1990).

## Digestion de l'amidon brut

L'analyse par HPAEC (Figure 10) ne révèle la présence d'aucun oligomère sur les surnageants des amidons bruts avant l'incubation enzymatique. Cependant, après l'hydrolyse enzymatique, des unités de maltose sont libérées. Cela est démontré par la présence d'un seul pic après élution des surnageants des milieux réactionnels par HPAEC (Figure 10). De plus, une augmentation de la production du maltose au cours de la durée d'incubation a pu être observée (Tableau 4).



**Figure 10. Profile d'élutions par HPAEC des produits de la digestion enzymatique des amidons bruts, par la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*.** Les incubations ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, pH 5 à 40°C, pendant 2 h. Substrat seul (-----), substrat + enzyme (—).

La  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* montre une activité hydrolytique sur les amidons bruts alors que d'autres  $\beta$ -amylases des plantes (Lizotte *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1991; Hagenimana *et al.*, 1992), s'avèrent incapables d'effectuer cela. La digestion des amidons bruts par cette  $\beta$ -amylase est comparable à celle des  $\beta$ -amylases microbiennes, considérées comme étant

des amylases dégradant l'amidon brut (Saha *et al.*, 1987, Mizukami *et al.*, 1992; Sohn *et al.*, 1996). Il faut cependant noter que cette enzyme ne fait pas de différence entre les origines botaniques des amidons. Cette propriété de l'enzyme n'est pas habituelle pour les β-amylases végétales. La capacité de l'enzyme à amorcer l'hydrolyse de l'amidon pourrait expliquer son éventuel rôle dans la dégradation des granules d'amidons au sein des tissus végétatifs des rhizomes de *C. pilosa*.

Etant donné qu'il existe une homologie dans le site ou domaine de liaison des enzymes dégradant l'amidon brut (Svenson *et al.*, 1989), il serait intéressant de déterminer la structure primaire de l'enzyme.

A partir de ces résultats, il pourrait être remarqué que la β-amylase de *C. pilosa* ressemble à la β-amylase de *C. thermosulphurogenes* (Saha *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 1988), à l'égard de certaines de leurs propriétés catalytiques ( $K_m$ ,  $K_{cat}$  et digestion des granules d'amidon natif); il faut cependant souligner que cette dernière est une protéine constituée de 4 sous-unités identiques (homo tétramère).

**Tableau 4. Hydrolyse (%) des amidons bruts\***

Durée d'incubation	Amidon de blé	Amidon de maïs	Amidon pomme de terre	Amidon de riz
2 h	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,01
70 h	6,23 ± 0,19	4,45 ± 0,13	6,10 ± 0,18	5,83 ± 0,17

\*L'hydrolyse complète de 1 mg d'amidon est estimée produire 3 μmol d'e maltose.

## Perspectives d'application de la $\beta$ -amylase de *C. pilosa*

Certaines populations sub-sahariennes utilisaient traditionnellement l'extrait brut de *C. pilosa* au cours du procédé de la préparation de la bière de sorgho. Il est bien connu que les rhizomes des plantes sont des organes de réserves de l'amidon, donc cela pourrait être l'une des raisons de l'utilisation empirique des rhizomes pour la fabrication de la bière de mil. Toutefois, cette quantité de rhizomes ajoutée est relativement faible comparée à la poudre du malt de sorgho utilisée. De plus, si les rhizomes sont utilisés essentiellement à cause de l'amidon qu'ils contiennent, il ne serait pas nécessaire de les utiliser en deux étapes lors de la préparation du dolo; c'est à dire à l'étape du brassage et avant la fermentation. Donc cette première hypothèse n'est pas très plausible.

Cette présente étude a montré sans ambiguïté que les rhizomes de *C. pilosa* renferment des teneurs élevées en activités  $\beta$ -amylasiques. De ce fait, l'extrait brut des rhizomes pourrait augmenter le pouvoir diastasique du moût obtenu à partir du malt du sorgho. Cela pourrait être l'une des raisons essentielles de l'utilisation traditionnelle des rhizomes de la plante. L'adjonction de la poudre des rhizomes pourrait améliorer la qualité du dolo, par une augmentation de la teneur en sucres fermentescibles dans le moût. Des essais pilotes de maltage réalisés au laboratoire avec plus de soixante variétés de sorgho, ont montré que dans la plupart des cultivars l'activité  $\beta$ -amylasique était faible ou totalement absente (Dufour *et al.*, 1992). L'une des caractéristique des moûts obtenus à partir des malts du sorgho est la saccharification incomplète de l'amidon (Swanston *et al.*, 1993; Chukwurah *et al.*; 1995). De plus, la déficience de l'activité de la  $\beta$ -amylase dans le malt du sorgho a été démontrée par la faible teneur en maltose du moût obtenu à partir de ce malt (Aniche et Anih, 1994). Depuis 1988, il est interdit au Nigeria d'importer les malts de l'orge et de blé, pour encourager la production et l'utilisation des malts de sorgho produits localement.

L'inconvénient majeur rencontré par les brasseurs dans l'utilisation du malt du sorgho est sa faible teneur en  $\beta$ -amylase (Okon, 1985; Okafor, 1995; Boivin, 1997). Un essai récent de la fabrication de la bière avec 100 % du malt de sorgho (*Sorghum vulgare* cv, Fara Fara), réalisé dans notre laboratoire par Verbruggen et collaborateurs (1996), a également montré l'absence de la  $\beta$ -amylase dans le malt. Pour améliorer le pouvoir diastasique du malt du sorgho le clonage des gènes de la  $\beta$ -amylase de l'orge ou des microbes dans certaines variétés de sorgho, a été proposé (Okafor, 1995). Donc, alternativement à ces manipulations génétiques sophistiquées, l'utilisation des extraits partiellement purifiés de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* comme source exogène de  $\beta$ -amylase dans la préparation de la bière de sorgho pourrait être envisagée. L'habilité que possède l'enzyme à amorcer l'hydrolyse de l'amidon natif avant que celui-ci ne soit gélatinisé, lui confère une large possibilité incontestable d'être utilisée dans la formulation des aliments à valeur nutritive ajoutée. Ces aliments (farines de céréales par exemple) pourraient jouer un rôle important dans la nutrition infantile.

## Conclusion

Une  $\beta$ -amylase ayant une forte activité et possédant des caractéristiques spécifiques peut être purifiée au point d'homogénéité, à partir des rhizomes de *C. pilosa* en quelques étapes. L'enzyme identifiée comme une  $\beta$ -amylase montre une activité et une thermostabilité plus intéressantes que les  $\beta$ -amylases des plantes décrites jusqu'à présent. L'enzyme est capable de dégrader significativement les amidons bruts, indépendamment de leurs sources, en libérant des unités de  $\beta$ -maltose comme les seuls produits détectables. A part le maltose, ni le glucose ni d'autres maltosaccharides n'ont pu être détectés après l'hydrolyse de l'amylose, de l'amylopectine, des amidons gélatinisés ou mêmes des amidons bruts. Cette propriété fait d'elle une  $\beta$ -amylase qui se rapproche plus des  $\beta$ -amylases microbiennes que

des β-amylases végétales. L'activité élevée de l'enzyme additionnée à son large zone d'activité et de stabilité en fonction du pH et de la température suggèrent son potentiel pour des applications industrielles. Une caractérisation biochimique plus approfondie de l'enzyme telle que la détermination de sa structure primaire, son mécanisme de liaison sur l'amidon brut et son effet synergique avec d'autres enzymes amylolytiques, serait envisageable. Cela pourrait sans doute amener à expliquer la propriété de l'enzyme à hydrolyser l'amidon brut. L'absence des activités de l'α-amylase et de l'α-glucosidase dans les rhizomes non germés de *C. pilosa* pourrait avoir un lien sur la propriété particulière de cette β-amylase, c'est à dire sa capacité à hydrolyser les granules d'amidon. Ces présents résultats sont importants pour justifier l'une des raisons essentielles pour laquelle, cette espèce végétale est utilisée par les fabricants locaux du dolo comme source d'amylase possédant des propriétés particulières.

---

**CHAPITRE 2**

**PURIFICATION DE LA  $\beta$ -AMYLASE DE *GLADIOLUS KLATTIANUS* HUTCH  
(*IRIDACEAE*)**

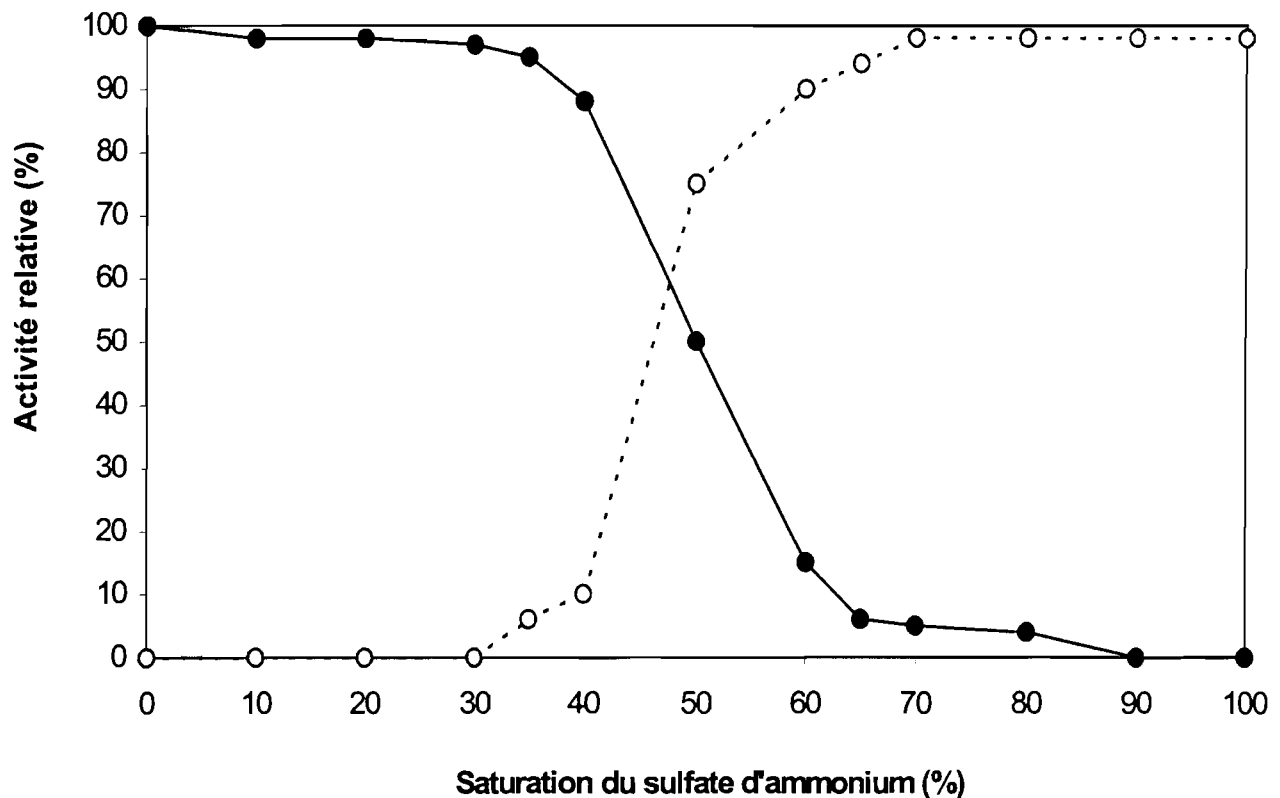
---



## Purification de l'enzyme

L'activité de l' $\alpha$ -amylase dans l'extrait brut des bulbes de *Gladiolus klattianus* a été quantifiée par son habilité à libérer des composés colorés en bleu, suite à l'hydrolyse du polymère AZCL-amylose (McCleary et Sheehan, 1989). L'activité spécifique de l' $\alpha$ -amylase dans l'extrait brut est de 4,4 U/mg, correspondant à approximativement 8 % de l'activité amylasique totale. Par contre l'activité spécifique de la  $\beta$ -amylase est de 50,2 U/mg (92 % de l'activité amylasique totale); activité mesurée en utilisant le PNPG5 comme substrat spécifique (McCleary et Codd, 1989) ou par le dosage des sucres réducteurs avec l'essai au BCA. Cependant, aucune activité de l' $\alpha$ -glucosidase n'a été détectée dans l'extrait brut. La  $\beta$ -Amylase apparaît donc comme étant l'enzyme amylolytique majoritaire des bulbes de *G. klattianus*. En effet, dans beaucoup d'espèces végétales, la  $\beta$ -amylase est identifiée comme la plus abondante parmi les enzymes dégradant l'amidon (Adams *et al.*, 1981; Hildebrand et Hymowitz, 1981; Houvet *et al.*, 1982). L'activité de la  $\beta$ -amylase dans les bulbes correspond à environ 440 unités par gramme de matière fraîche. Cette valeur est similaire à l'activité de la  $\beta$ -amylase dans l'orge germé (400-500 U/g de matière fraîche, Boehringer, Mannheim, Germany). L'enzyme a été purifiée et caractérisée pour cette raison. L'essai pilote de précipitation sélective des protéines enzymatiques (Figure 1), a permis de choisir la gamme de concentration en sulfate d'ammonium comprise entre 40 et 65 % de saturation pour la précipitation de la  $\beta$ -amylase. La fraction obtenue était débarrassée de nombreuses protéines contaminantes et 96.4 % de l'activité totale de l'enzyme était conservée (Tableau 1). De même une augmentation de l'activité spécifique de l'ordre de 8,6 fois a pu être atteinte, seulement après cette première étape. Cette fraction a été injectée deux fois de suite sur une colonne de chromatographie de filtration sur gel (Superdex 75 pg, 60 x 16 mm, FPLC®, Pharmacia), pour non seulement isoler l'enzyme mais aussi élucider son poids moléculaire (Figures 2B et 2C). La deuxième élution a permis d'obtenir une activité

spécifique finale de 2360 U/mg, un facteur de purification de 47 et un rendement final de l'opération de 75 %. Ces étapes ce sont avérées importantes car non seulement l'enzyme obtenue est homogène mais aussi le rendement résultant est très élevé. Le rendement de la purification de cette  $\beta$ -amylase est comparable à celui obtenu par Chang et collaborateurs (1996), pour la purification des  $\beta$ -amylases de la patate douce. Le résumé et les étapes essentielles de la purification sont consignés dans le Tableau 1. L'activité totale résiduelle de l'enzyme correspond à 330 unités de protéines pures par gramme de matière végétale fraîche.

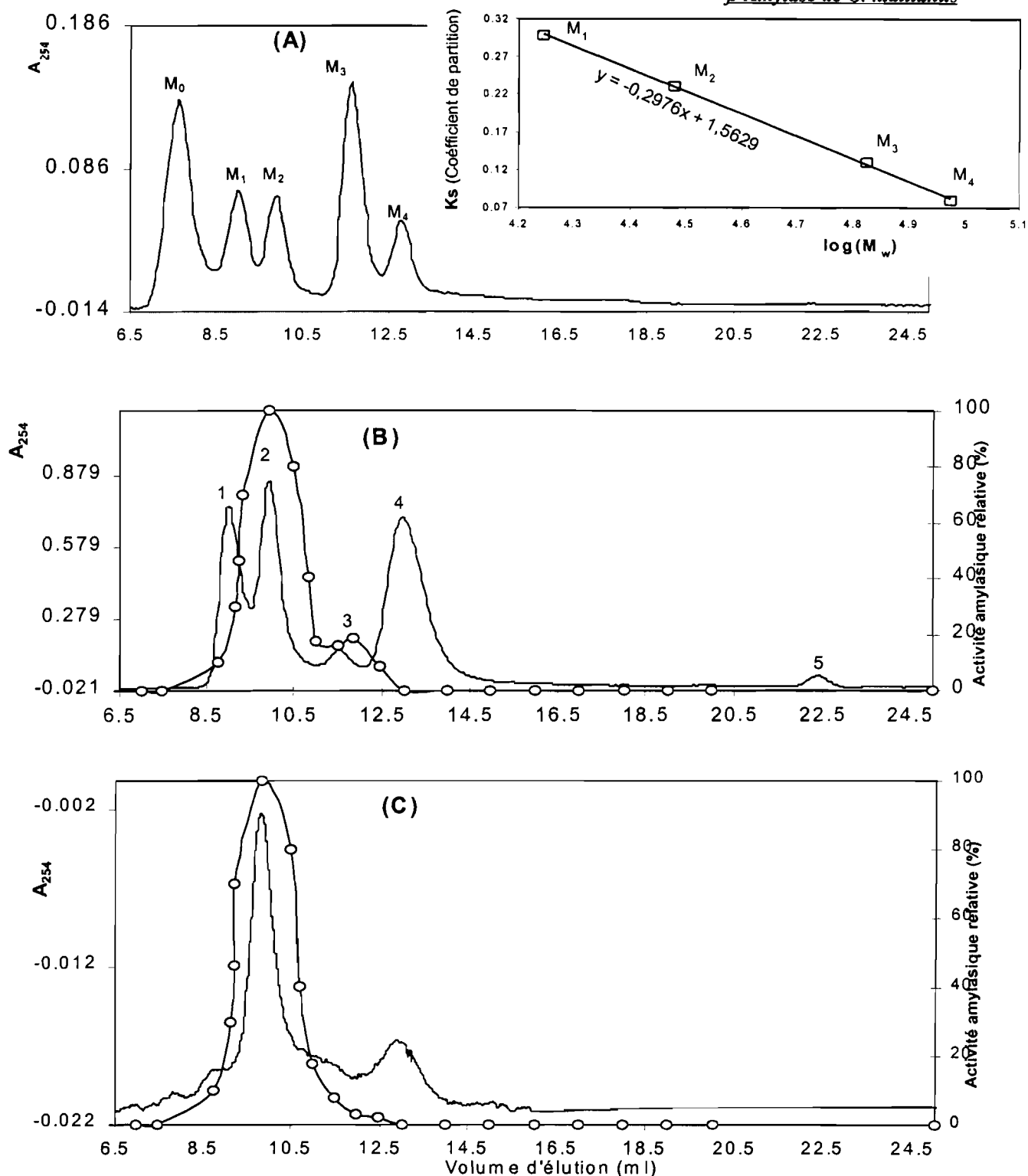


**Figure 1. Essai pilote de précipitation de la  $\beta$ -amylase dans l'extrait brut des bulbes de *G. klattianus*.** Des concentrations graduelles en sulfate d'ammonium ont été réalisées avec 1 ml d'extrait brut contenu dans un tube Eppendorf (1,5 ml) à la température de 0°C. Les tubes sont légèrement secoués pour dissoudre le sel, puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. L'activité de la  $\beta$ -amylase est déterminée par l'essai au BCA en utilisant l'amidon soluble comme substrat. Les activités enzymatiques et les concentrations protéiques ont été dosées sur les surnageants (●) et les précipités (○) après dissolution dans le tampon d'extraction.

Plusieurs protéines étaient présentes dans l'extrait brut initial, pourtant seulement cinq bandes protéiques ont été révélées après la séparation par SDS-PAGE (révélation au Bleu de Commassie), de la fraction obtenue après la précipitation au sulfate d'ammonium (Figure 3).

Les pics détectés après séparation des protéines à l'aide de la colonne de filtration sur gel (Figure 2B), ne se superposent pas directement aux bandes observées après la SDS-PAGE (Figure 3). C'est pourtant la même fraction provenant de la précipitation au sulfate d'ammonium qui a été utilisée pour les deux cas. En effet, une différence sur les masses moléculaires des protéines obtenues est observée selon que c'est la SDS-PAGE ou la chromatographie de filtration sur gel qui a été utilisée. Il faut noter que la SDS-PAGE a été réalisée dans des conditions dénaturantes (conditions réductrices), par contre en chromatographie de filtration sur gel, la structure native des protéines est conservée. Par exemple le premier pic (dénommé 1) élué sur la colonne Superdex (1) possède une masse moléculaire de 102,5 kDa (Figure 2B), par contre sa bande n'apparaît pas sur la Figure 3 (SDS-PAGE), en utilisant le bleu de coomassie comme révélateur. Cela pourrait s'expliquer par la présence des protéines dimériques, ayant des sous-unités de poids moléculaire différent dans la fraction du sulfate d'ammonium. Cependant, le premier pic ne possède aucune activité amylasique. Seuls les pics 2 et 3 (Figure 2B) possèdent des activités amylasiques, en utilisant l'amidon soluble comme substrat et en dosant les sucres réducteurs avec l'essai au BCA. La fraction du pic 2 est très active sur le PNGP5, suggérant donc qu'elle renferme une  $\beta$ -amylase (McCleary et Codd, 1989). Par contre la fraction du pic 3 contient une amylase qui est incapable d'hydrolyser le PNGP5, supportant l'hypothèse qu'il s'agit de l' $\alpha$ -amylase dont l'activité avait été détectée au préalable dans l'extrait brut. La masse moléculaire native de cette  $\alpha$ -amylase est estimée à 31,5 kDa. Comme le montre la Figure 2B, l'activité de l' $\alpha$ -amylase est relativement plus faible que celle de la  $\beta$ -amylase. De ce fait, l'enzyme n'a pas été caractérisée d'avantage. La fraction collectée de la colonne Superdex 1,

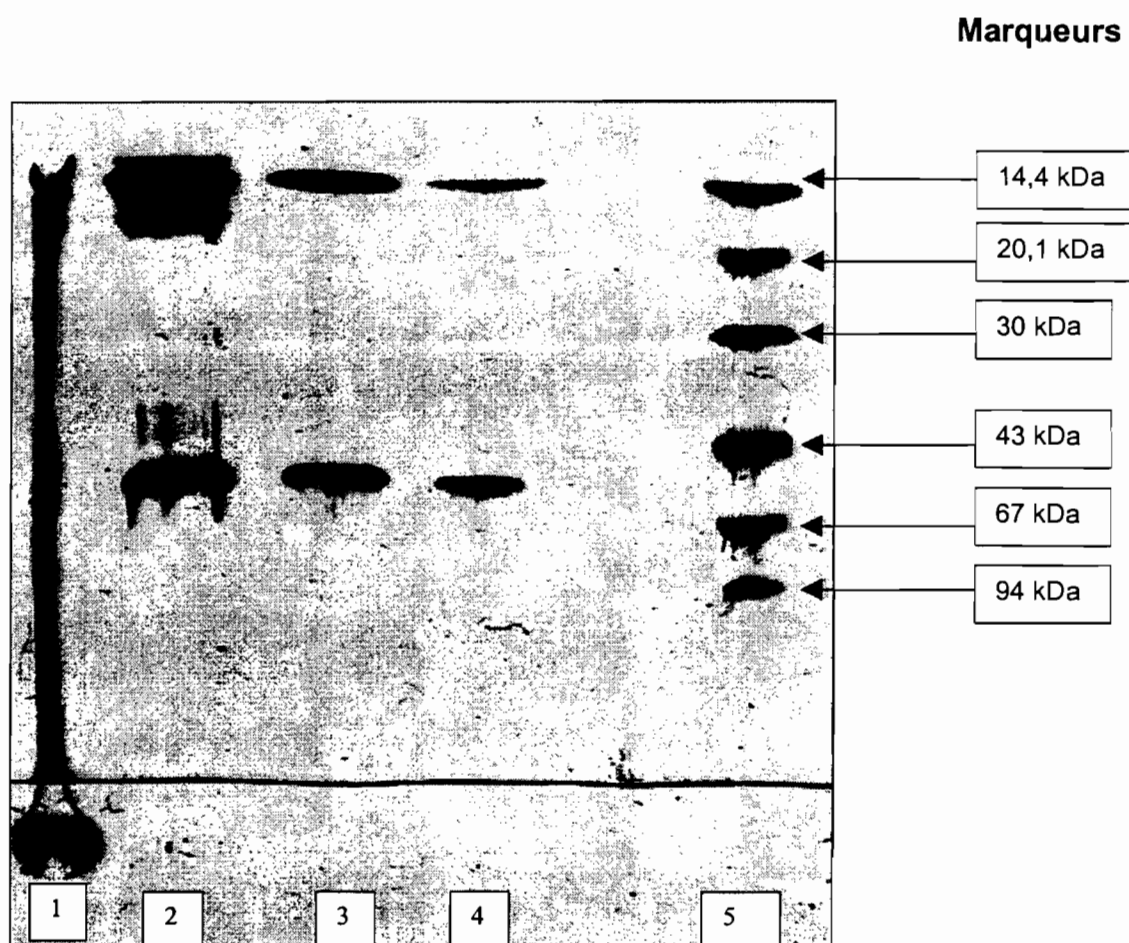
a été éluée une seconde fois sur la même colonne, dans le but d'élucider la masse moléculaire native de l'enzyme et de vérifier sa pureté. Cette seconde élution a également permis d'améliorer la pureté de l'enzyme en augmentant son activité spécifique (Tableau 1). Après la seconde élution sur la colonne Superdex (2), comme d'ailleurs sur la première colonne (Superdex 1), seules 2 bandes protéiques de poids moléculaires respectifs de 12 et 60 kDa sont détectées sur la Figure 3 (SDS-PAGE). Cependant un pic symétrique d'environ 72 kDa ayant une activité  $\beta$ -amylasique, a été détecté sur les séparations avec les colonnes Superdex 1 et 2 (Figures 2B et 2C). Ces résultats permettent de poser l'hypothèse que la  $\beta$ -amylase isolée à partir des bulbes de *G. klattianus* est une protéine dimérique constituée de sous-unités ayant respectivement pour masses moléculaires 12 et 60 kDa. Ces résultats seront confirmés par l'analyse de l'enzyme par isoélectrofocalisation ou par la Native-Page. La masse moléculaire de l'enzyme est plus élevée que celles des  $\beta$ -amylases monomériques du ginseng (63 kDa) (Yamasaki *et al.*, 1989), du seigle (56,7 kDa) (Sadowsky *et al.* 1993), de l'alfalfa (61 kDa) (Kohno *et al.*, 1989) et de l'épicotyle du pois (57 kDa) (Lizotte *et al.*, 1990). Plusieurs multimériques  $\beta$ -amylases ont été reportées (Saha *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1996) mais dans la plupart des cas, l'enzyme est constituée de deux à quatre sous-unités ayant la même masse moléculaire (Hagenimana *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1996). L'enzyme isolée dans ce présent travail est suffisamment décontaminée de plusieurs protéines pour permettre de déterminer certaines de ses propriétés catalytiques.



**Figure 2. FPLC avec une colonne de filtration sur gel (Superdex 75 pg).** **A;** marqueurs protéiques,  $M_0$  = bleu dextrant (300 kDa) utilisé pour déterminer le volume à vide ( $V_0$ ),  $M_1$  = phosphorylase b (94 kDa),  $M_2$  = BSA (67 kDa),  $M_3$  = anhydrase carbonique (30 kDa) et  $M_4$  = protéine du TMV coat (17,5 kDa). **B;** Elution de la fraction obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium sulfate (Superdex 1). **C;** Elution des fractions collectées après la séparation au Superdex 1. Les elutions ont été réalisées avec un débit de 0,8 ml/min dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, contenant du NaCl 150 mM et du  $CaCl_2$  3 mM. La colonne a été calibrée avec le même tampon avant l'injection des échantillons. Les activités amylasiques ont été déterminées en dosant les sucres réducteurs par l'essai au BCA.

**Tableau 1. Résumé de la purification de la  $\beta$ -amylase des bulbes de *Gladiolus klattianus***

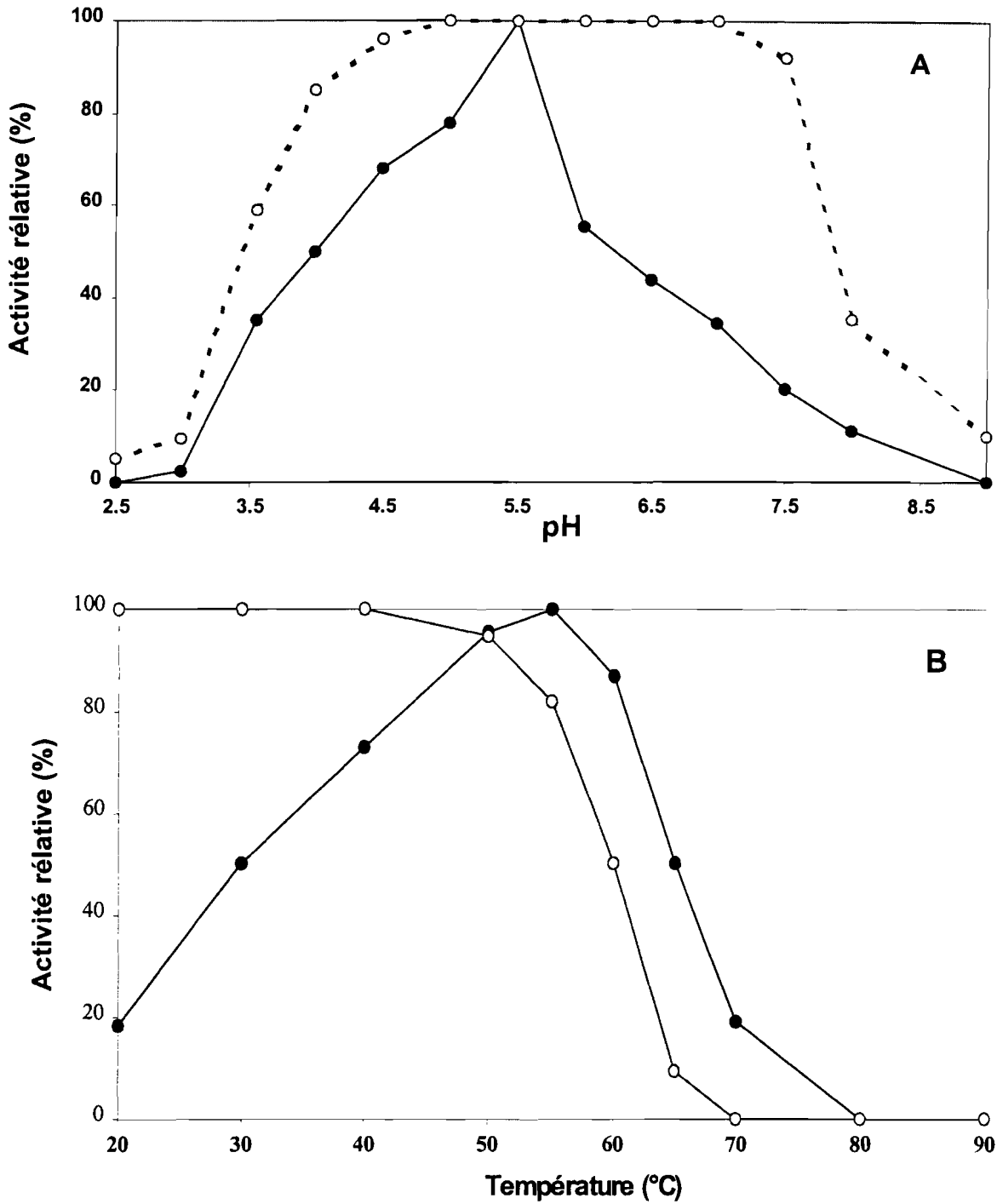
Etape de purification	la	Protéines totales (mg)	Activités totales (U)	Activités spécifiques (U/mg)	Facteur de purification n	Rendement (%)
Extrait brut		875,7	43 960	50,2	1	100
Précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	au	98,1	42 379	432	8,6	96
Superdex 75 (1)		18,4	33 377	1814	36	76
Superdex 75 (2)		14,0	33 040	2360	47	75



**Figure 3. SDS-PAGE sur un gel PhasGel de gradient de 10-15 %, des étapes de la purification de la  $\beta$ -amylase des bulbes de *Gladiolus klattianus*. Le gel a été révélé au bleu de Coomassie R250. Ligne 1, extrait brut; ligne 2, fraction du sulfate d'ammonium; ligne 3, fraction du Superdex 1; ligne 4, fraction du Superdex 2; et ligne 5, marqueurs protéiques de poids moléculaires (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suède).**

## Paramètres optima d'activité et de stabilité en fonction du pH et de la température

Les effets du pH sur l'activité de l'enzyme et sur son activité résiduelle après une certaine période d'incubation ont été déterminés en utilisant l'amidon soluble comme substrat (Figure 4A). La  $\beta$ -amylase exhibe une activité optimum d'hydrolyse de l'amidon au pH 5,5. L'enzyme est stable aux pH compris entre 4,5 et 8, mais la stabilité décroît graduellement dans les zones de pH fortement acide ou basique (Figure 4A). Le comportement de l'enzyme est similaire à celui de la plupart des  $\beta$ -amylases végétales, qui sont instables aux pH extrêmes (Hagenimana *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1996). L'effet de la température sur l'activité et sa capacité à supporter les températures extrêmes ont été également étudiées (Figure 4B). L'enzyme montre un optimum d'activité à la température de 55°C. Incubée aux températures inférieures ou égales à 50°C en absence du substrat pendant 1,5 h, l'enzyme conserve toute son activité initiale. De plus, même stockée à la température de 55°C pendant 1,5 h en absence du substrat, l'enzyme conserve plus 80 % de son activité originale. L'enzyme est moins stable que la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* mais sa stabilité est comparable à beaucoup de  $\beta$ -amylases extraites d'autres plantes (Hagenimana, 1994; Rashad *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996)



**Figure 4. Effets du pH (A) et de la température (B) sur l'activité (●) et la stabilité (○) de la β-amylase de *G. klattianus*.** L'activité de l'enzyme a été déterminée en dosant les sucres réducteurs produits après l'incubation enzymatique par l'essai au BCA.



## Mode d'action de l'enzyme

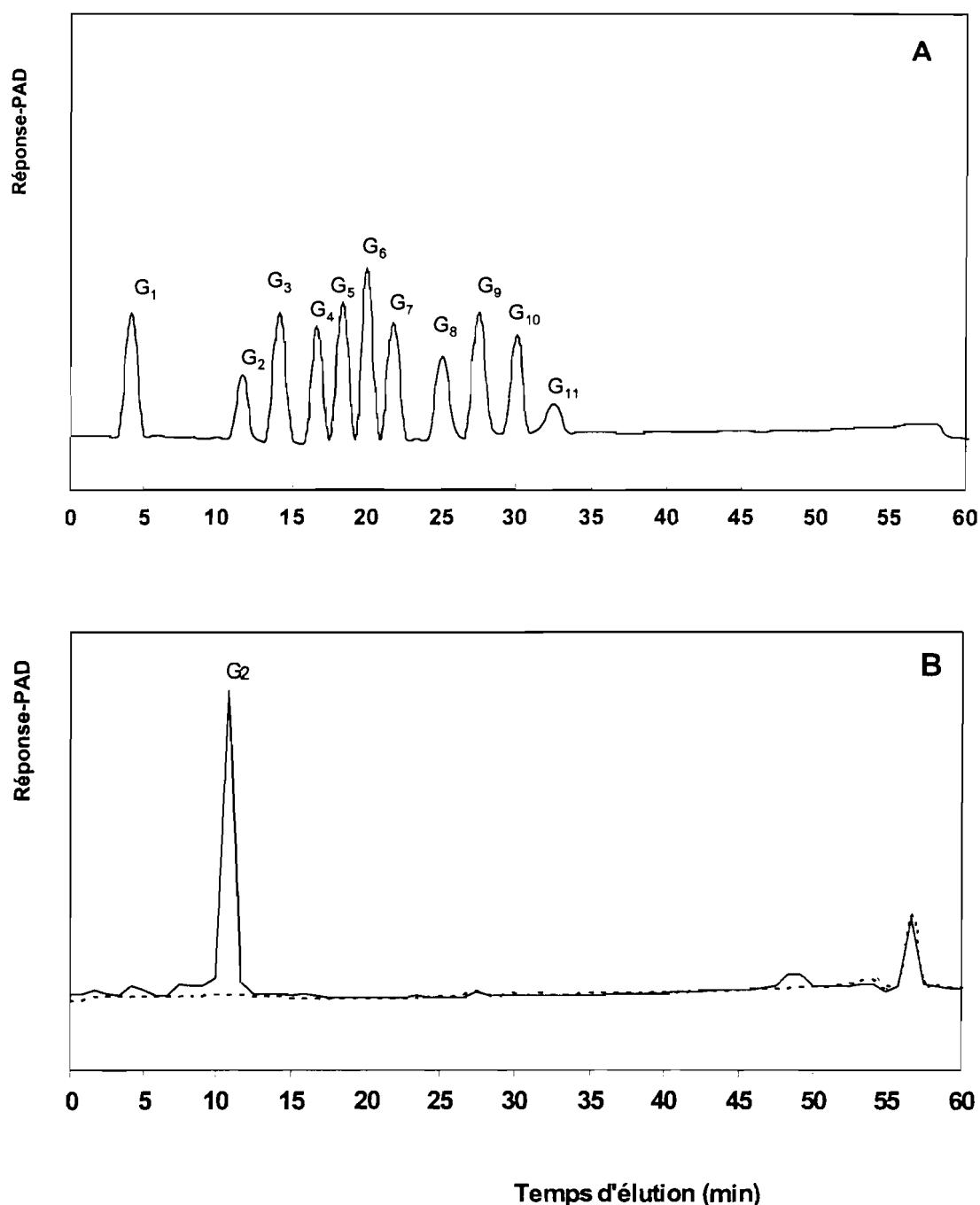
Le mode d'action de l'enzyme c'est à dire son mode d'hydrolyse du substrat (amidon soluble), a été examiné par chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC) en utilisant des maltodextrines standards de DP variant de 1 à 12 pour calibrer la colonne. Le système enzymatique produisait exclusivement du maltose après 5 min d'incubation dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 5,5; à la température de 55° (Figure 5). Ces résultats permettent de conclure que l'enzyme hydrolyse son substrat selon le mode "Exo", car aucun pic de maltotriose, maltotétraose, maltopentaose ou d'autres maltosaccharides n'ont été détectés après une longue période d'incubation de l'enzyme avec son substrat.

Pour déterminer la configuration anomérique des produits d'hydrolyse, la variation lente du pouvoir rotatoire spécifique (mutarotation) du milieu réactionnel durant la catalyse enzymatique, a été observée. L'angle de rotation optique est mesuré au fur à mesure que la réaction se déroulait à l'aide d'un polarimètre Ceti Polaris (Belgium). L'action de l'enzyme isolée des bulbes de *G. klattianus* a été comparée à celles de l' $\alpha$ -amylase du pancréas de porc et de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*. Les produits d'hydrolyse formés suite à l'action de la  $\beta$ -amylase de *G. klattianus* sur l'amidon soluble ont été identifiés comme ayant une configuration anomérique de type  $\beta$  sur la base des observations suivantes (Figure 6):

-(1) La mutarotation ralentit dans le cas de l'amylase de *G. klattianus*, mais elle augmente dans le cas de l' $\alpha$ -amylase du pancréas de porc, en accord avec l'observation de Yamasaki et collaborateurs (1989) pour la  $\beta$ -amylase du ginseng.

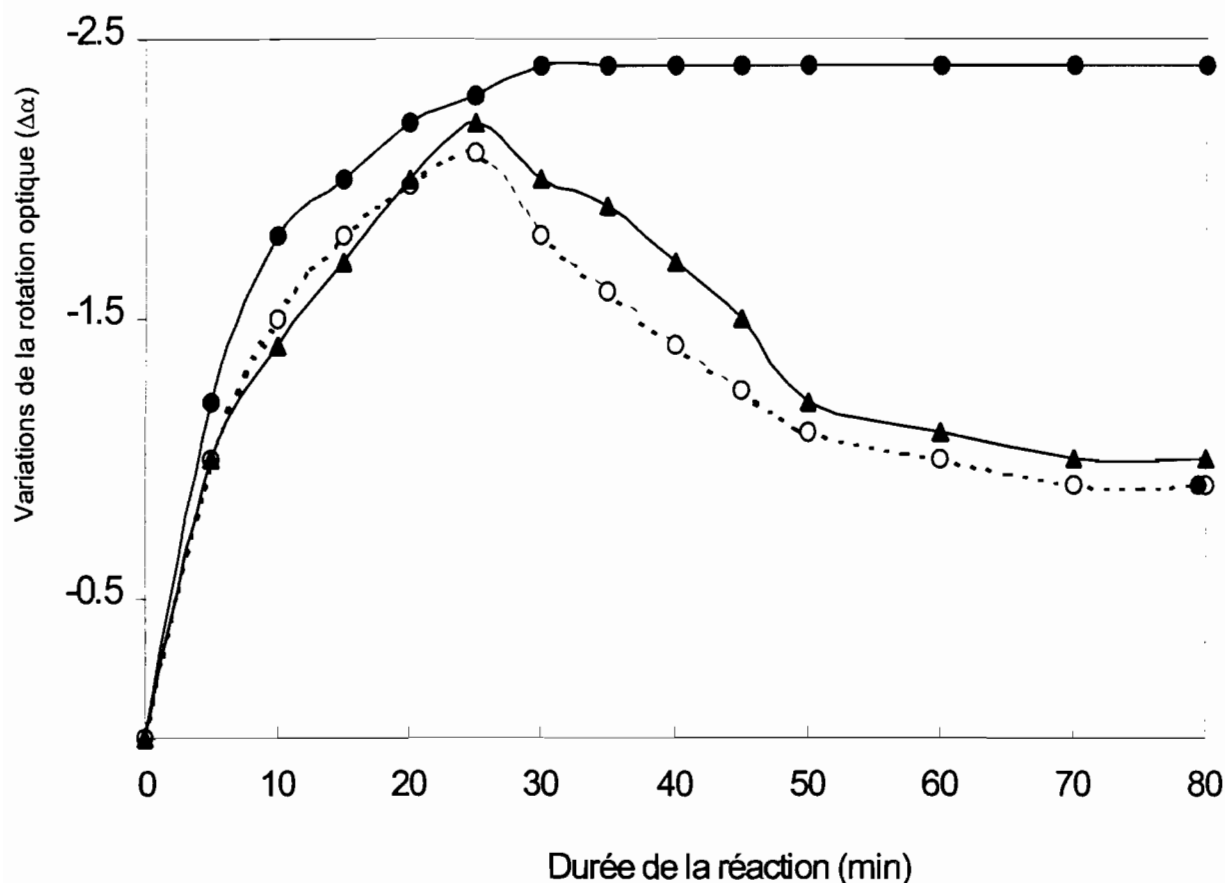
-(2) Après 25 min d'incubation, la variation de l'angle de rotation optique décroît lentement, résultant de la conversion du  $\beta$ -maltose formé en  $\alpha$ -maltose, à cause de la mutarotation (Kohno *et al.*, 1989).

-(3) Le mode catalytique de l'enzyme est similaire à celui de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*.



**Figure 5. Analyse du mode d'action de la  $\beta$ -amylase de *G. klattianus* par HPAEC. A,** Mode d'élution des maltodextrines standards; **B,** mélanges des incubations de l'enzyme (2 unités) avec 5 mg d'amidon de pomme de terre gélatinisé, dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM, pH 5,5, à la température de 55°C pendant 5 min. G<sub>n</sub>, oligomères du glucose (n = degré de polymérisation). Substrat seul (----), substrat + enzyme (—).

Donc, les produits d'hydrolyse de l'enzyme sont de configuration anomérique  $\beta$ . Ces résultats permettent de conclure que l'enzyme isolée à partir des bulbes de *G. klattianus* est belle et bien une exo-amylase et plus exactement une  $\beta$ -amylase.



**Figure 6. Mutarotation des sucres formés après l'hydrolyse de l'amidon soluble par l'amylase de *G. klattianus*.** Les enzymes pures (3 U) ont été mises en incubation avec l'amidon soluble dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 5, dans une cellule de polarimètre incubée à la température de 30°. Amylase de *G. klattianus* (▲),  $\beta$ -amylase de *C. pilosa* (○),  $\alpha$ -amylase du pancréas de porc (●),  $\Delta\alpha = \alpha - \alpha_0$  où  $\alpha_0$  est l'angle initial de la rotation optique mesuré au temps  $t = 0$  min et  $\alpha$  l'angle de la rotation optique mesuré au cours de la progression de la réaction.

## Conclusion

Une  $\beta$ -amylase a pu être purifiée à partir d'une matière brute moins cher telle que les bulbes non germés de *Gladiolus klattianus*. L'enzyme pourrait être isolée en utilisant deux méthodes classiques de séparation biochimique telles que la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et la chromatographie de filtration sur gel ou d'exclusion diffusion. Le rendement de la purification est relativement élevé (74,2 %), suggérant une possible production plus large de l'enzyme par ces deux techniques précédentes ou par d'autres techniques telle que la chromatographie d'échange d'ions. L'activité de l'enzyme dans l'extrait brut des bulbes de *G. klattianus* est de 440 U/g de matière fraîche; valeur similaire à l'activité de la  $\beta$ -amylase de l'orge germé (400 à 500 U/g de matière fraîche, Boehringer, Mannheim, Germany). Vue l'importance économique de la  $\beta$ -amylase dans la production des sirops à teneur élevée en maltose et en brasserie (Norris, 1985), la  $\beta$ -amylase isolée et partiellement caractérisée dans ce présent travail pourrait être envisagée pour des applications industrielles. De plus, même l'extrait brut de l'enzyme pourrait être utilisé pour améliorer la valeur nutritive des bouillies de céréales destinées à la nutrition infantile. En effet, l'extrait brut de l'enzyme est relativement limpide et ne devrait pas être toxique car il est traditionnellement utilisé pour la nutrition humaine et cela semble être un atout pour la plante. Ces résultats permettent donc d'envisager de breveter la découverte d'une  $\beta$ -amylase abondante dans une espèce végétale largement répandue dans toute l'Afrique de l'Ouest et même en Europe et qui pourrait être certainement utilisée pour des applications biotechnologiques.

---

## CHAPITRE 3

### PURIFICATION ET PROPRIETES DE L'ENDO-(1→3)-β-D-GLUCANASE DES FEUILLES DE *BOSCIA SENEGALENSIS* (Pers.) Lam. ex. Poir.

---

## Activités totales des amylases et des β-glucanases dans l'extrait brut des feuilles de *B. senegalensis*

Les activités de l'α-amylase, de la β-amylase, de l'exo-(1→3, 1→4)-β-D-glucanase, ainsi que celle de l'endo-(1→3)-β-D-glucanase ont été détectées dans l'extrait brut des feuilles saines de *B. senegalensis* (Tableau 1). L'exo-(1→3, 1→4)-β-D-glucanase a été capable d'hydrolyser à la fois les β-glucanes de l'orge et les β-glucanes insolubles des parois cellulaires du sorgho. Cependant aucune activité de l'α-glucosidase et de l'endo-(1→3, 1→4)-β-D-glucanase n'ont été détectées à la limite des essais de la sensibilité des essais réalisés.

**Tableau1. Screening des activités amylasiques et β-glucanasiques dans l'extrait brut des feuilles de *B. senegalensis*.**

Enzyme dont le screening a été réalisé	Substrat utilisé	*Activité spécifique de l'enzyme (U/mg)	Activité totale par gramme de matière fraîche (U/g)
α-Amylase	AZCL-amylose	1,3 ± 0,1	15 ± 0,4
β-Amylase	PNPG5	16,1 ± 0,4	207 ± 6,2
α-Glucosidase	p-nitro-glycoside	Non détectée	/
**Exo-(1,3; 1,4)-β-D-glucanase	(1,3; 1,4)-β-D-glucane de l'orge	0,87 ± 0,02	11 ± 0,3
**Exo-(1,3; 1,4)-β-D-glucanase	(1,3; 1,4)-β-D-glucane du sorgho	1,3	17 ± 0,5
**Endo-(1,3; 1,4)-β-D-glucanase	(1,3; 1,4)-β-D-glucane de l'orge	Non détectée	/
**Endo-(1,3)-β-D-glucanase	Laminarine	2,7 ± 0,1	34,7 ± 1,0

\*Les protéines totales dans l'extrait brut sont approximativement égales à 1287,6 mg pour 100 g de matière fraîche.

\*\*Le mode d'action de l'enzyme (Exo ou Endo) a été déterminé par l'analyse des produits finaux d'hydrolyse de chaque enzyme, par chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC).

L'activité relativement élevée de l'endo-(1→3)-β-D-glucanase et son habilité à hydrolyser les parois cellulaires insolubles des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ont motivé sa purification. L'enzyme a été purifiée dans l'objectif de mieux appréhender ses propriétés catalytiques, surtout sa spécificité et son mode d'action sur différents substrats.

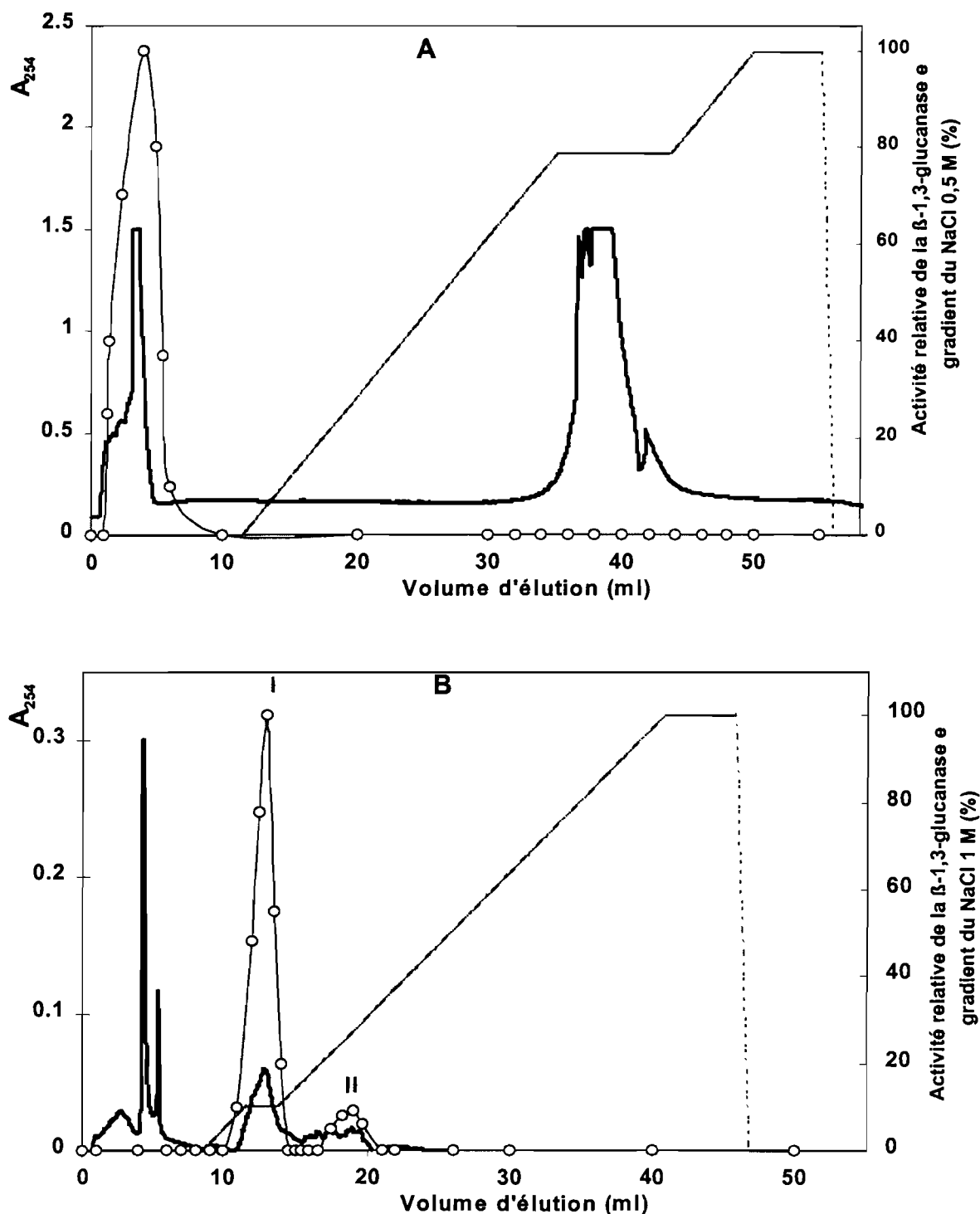
## **Purification de l'endo-(1→3)-β-D-glucanase**

Pour pallier la croissance microbienne, les surfaces des feuilles ont été stérilisées. De même pour inhiber l'activité des protéases dans l'extrait brut, notamment celle des séril-protéases, le PMSF a été ajouté au tampon d'extraction des enzymes. La purification a été réalisée le plus rapidement possible pour minimiser également d'autres protéolyses des enzymes ciblées (Hrmova et Fincher, 1993). La présence dans l'extrait brut de plusieurs enzymes dégradant les polysaccharides autre que l'endo-(1→3)-β-D-glucanase, a nécessité le screening de toutes les glycosyl hydrolases à chaque étape de la purification. Des substrats spécifiques pour les amylases et les (1→3, 1→4)-β-D-glucanases ont été utilisés pour contrôler leur présence dans toutes les fractions afin d'éviter leurs contaminations.

La majorité de la (1→3)-β-D-glucanase a été précipitée dans la fraction du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de saturation comprise entre 20-70 %. Cela a permis d'augmenter l'activité spécifique de l'extrait brut d'un facteur de 3,3 (facteur de purification), avec un rendement de 78,5 %. La fraction du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 20-70 % de saturation a été lyophilisée sans aucune perte d'activité. L'analyse de cette fraction du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sur une courbe de titration électrophorétique a révélé la présence des protéines très basiques ( $\text{pI} > 9$ ). Cette analyse a permis de choisir le meilleur pH du tampon à utiliser pour les chromatographies d'échange d'ions. Lorsque cette fraction a été appliquée sur une colonne MonoQ d'échange d'anions (Figure 1A), approximativement 90 % des protéines totales sont retenues alors que 95 % de

l'activité de la (1→3)-β-D-glucanase a traversé la colonne sans être retenue. Cette étape a permis de purifier l'enzyme avec un facteur de 28. Cette fraction non retenue sur la colonne MonoQ a été injectée sur une colonne MonoS d'échange de cations et éluée avec un gradient de chlorure de sodium (Figure 1B). Deux pics (désignés par I et II) ayant une activité (1→3)-β-D-glucanasique, représentant respectivement 96 et 4 % de l'activité (1→3)-β-D-glucanasique totale, ont été distingués. L'examen par HPAEC des modes d'action des enzymes a révélé qu'elles sont toutes les deux des (1→3)-β-D-glucane endohydrolases. La fraction du premier pic est débarrassée de beaucoup de protéines contaminantes et d'autres glucanases. Etant donné que cette fraction renferme la majorité de l'endo-glucanase, elle a été purifiée d'avantage par chromatographie de filtration sur gel et caractérisée pour ces raisons. Les étapes typiques de la purification sont consignées dans le Tableau 2. Le rendement final de la purification de l'extrait brut est approximativement égale à 57 %, correspondant à 0,036 mg d'enzyme pure par gramme de matière végétale initiale (20 U/g). L'activité spécifique finale de l'enzyme pure (549,2 U/mg) est plus élevée que celles des endo-(1→3)-β-D-glucanases d'autres plantes (Churngchoow, 1995; Hrmova et Fincher, 1993; Krebs et Grumet, 1993; Shi *et al.*, 1993; Ji et Kuc, 1995). Le rendement de récupération de la protéine active est plus élevé que celui obtenu par Hrmova et Fincher (1993), lors de la purification des trois isoenzymes de l'endo-(1→3)-β-D-glucanase des feuilles de l'orge (*Hordeum vulgare*).





**Figure 1. Profils d'élué par FPLC de la (1→3)-β-D-glucanase des feuilles des *B. senegalensis* sur des colonnes MonoQ et MonoS. A, fraction de la précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

**B, Les fractions non retenues sur la colonne MonoQ, contenant des activités (1→3)-β-D-glucanasiques ont été rassemblées puis injectées sur la colonne d'échange de cations MonoS. Dans les deux cas, les protéines retenues sur les colonnes sont décrochées avec le gradient de NaCl (-----) comme décrit en Matériels et Méthodes. Les élué des protéines**

**( — ) ont été suivies à la longueur d'onde de 254 nm et les activités enzymatiques (O) ont été déterminées par l'essai au BCA.**

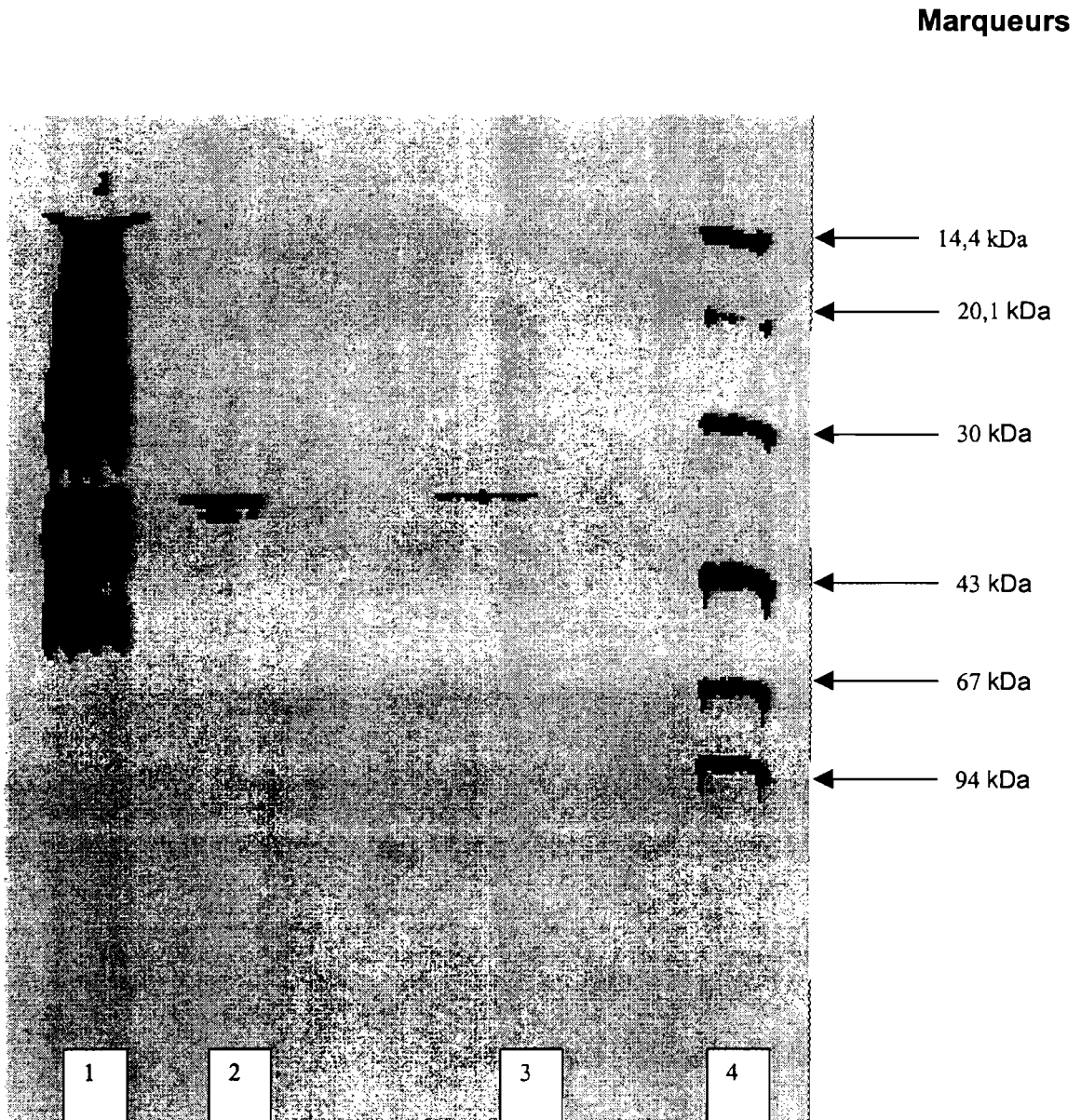
**Tableau 2. Résumé de la purification de la (1→3)-β-D-glucanase des feuilles de *B. senegalensis***

Étape de la purification	Protéines totales (mg)	Activités totales (U)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	1287,6	3476	2,7	1	100
Précipitation au (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	305,8	2731	8,9	3	78,6
FPLC MonoQ	34,4	2597	75,5	28	74,7
FPLC MonoS	7,5	2294	305,6	113	66,6
Superdex 75 pg	3,6	1977	549,2	203	57

### Propriétés physiques de la (1→3)-β-D-glucanase

Après la séparation de l'enzyme sur la colonne de chromatographie de filtration sur gel, la protéine enzymatique a migré en bande unique par SDS-PAGE dans des conditions réductrices (Figure 2). La masse moléculaire de l'enzyme estimée par cette méthode est de 36 kDa. Cette valeur est en accord avec celle de la masse moléculaire native de l'enzyme estimée à 37 kDa par la chromatographie de filtration sur gel. Ces résultats permettent d'établir que la (1→3)-β-D-glucanase isolée des feuilles de *B. senegalensis* est une protéine monomérique ayant une masse moléculaire de 36 kDa. La masse moléculaire de l'enzyme est similaire à celles des endo-(1→3)-β-D-glucanases des feuilles du concombre (Ji et Kuc, 1995), des racines du céleri (Krebs et Grumet, 1993) et des suspensions cellulaires des pois (Vogelsang et Barz, 1993); mais elle est plus élevée que celles des endo-(1→3)-β-D-glucanases des feuilles de l'orge (Hrmova et Fincher, 1993), du riz (Akiyama *et al.*, 1996), de

la tomate (Shi *et al.*, 1993) et du soja (Yi et Hwang, 1997). L'enzyme est une protéine très basique ayant un point isoélectrique (pI) situé à un pH supérieur ou égale à 10,3. En effet, plusieurs (1→3)-β-D-glucane endohydrolases ayant un pI situé à un pH extrême (pI 8-11) ont été isolées des plantes (Høj *et al.*, 1989, Hrmova et Fincher, 1993; Vogelsang et Barz, 1993; Akiyama *et al.*, 1996) et des microbes (Joosten *et al.*, 1995, Cruz-de-la *et al.*, 1995). Pour les organismes où coexistent les deux formes basiques (pI > 8) et acides (pI < 6), il a été constaté que les isoenzymes les plus basiques (les plus chargées positivement) sont en général les plus hydrolytiques (Nagata *et al.*, 1990; Joosten *et al.*, 1995; Cruz-de-la *et al.*, 1995). L'essai au résorcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Monsigny *et al.*, 1988) a révélé que soit la (1→3)-β-D-glucanase purifiée n'est pas glycosylée ou le degré de glycosylation est suffisamment faible pour ne pas être détecté dans les conditions expérimentales.



**Figure 2. SDS-PAGE sur un gel PhastGel de gradient compris entre 10-15 %, des étapes de la purification de la 1,3-β-D-glucanase de *B. senegalensis*.** Le gel a été révélé au bleu de Coomassie Brilliant R250. Ligne 1, fraction du sulfate d'ammonium de 20-70 % de saturation; ligne 2, fraction collectée de la colonne FPLC MonoQ; ligne 3, fraction obtenue de la colonne FPLC MonoS et soumise à une séparation par chromatographie de filtration sur gel (Superdex 75 pg) et ligne 4, marqueurs protéiques standards (Pharmacia).

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés avec les isoenzymes GI et GII de la (1→3)-β-D-glucanase des feuilles de l'orge, qui ne sont pas des glycoprotéines (Hrmova et Fincher, 1993).

### **Effets du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.**

La (1→3)-β-D-glucanase purifiée montre un maximum d'activité au pH 4,5 (Figure 3) et à la température de 50°C (Figure 4) pour l'hydrolyse de la laminarine. La stabilité de l'enzyme aux différents pHs est illustrée par la Figure 3. Quand l'enzyme est incubée à 30°C pendant 1,5 h, l'activité résiduelle est maximum aux pHs compris entre 4 et 6,5. Après 1 h de préincubation à des températures croissantes (0-100°C), la température d'inactivation apparaît à 60°C (Figure 3). Chauffée à la température de 35° pendant 1 h dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,5 (optimum), l'enzyme conserve toute son activité initiale, sans changer de comportement entre la présence et l'absence du substrat.

La (1→3)-β-D-glucanase de *B. senegalensis* partage des optima similaires d'activité en fonction du pH et de la température avec plusieurs autres plantes (Hrmova et Fincher, 1993; Krebs et Grumet, 1993; Shi *et al.*, 1993; Churngchow *et al.*, 1995), mais l'enzyme est relativement plus thermostable que les (1→3)-β-D-glucanases de l'orge (Hrmova et Fincher, 1993) et de la tomate (Shi *et al.*, 1993). Cependant l'enzyme tolère moins la chaleur que les isoenzymes de la (1→3)-β-D-glucanase du latex de *Hevea brasiliensis* (Churngchow *et al.*, 1995).

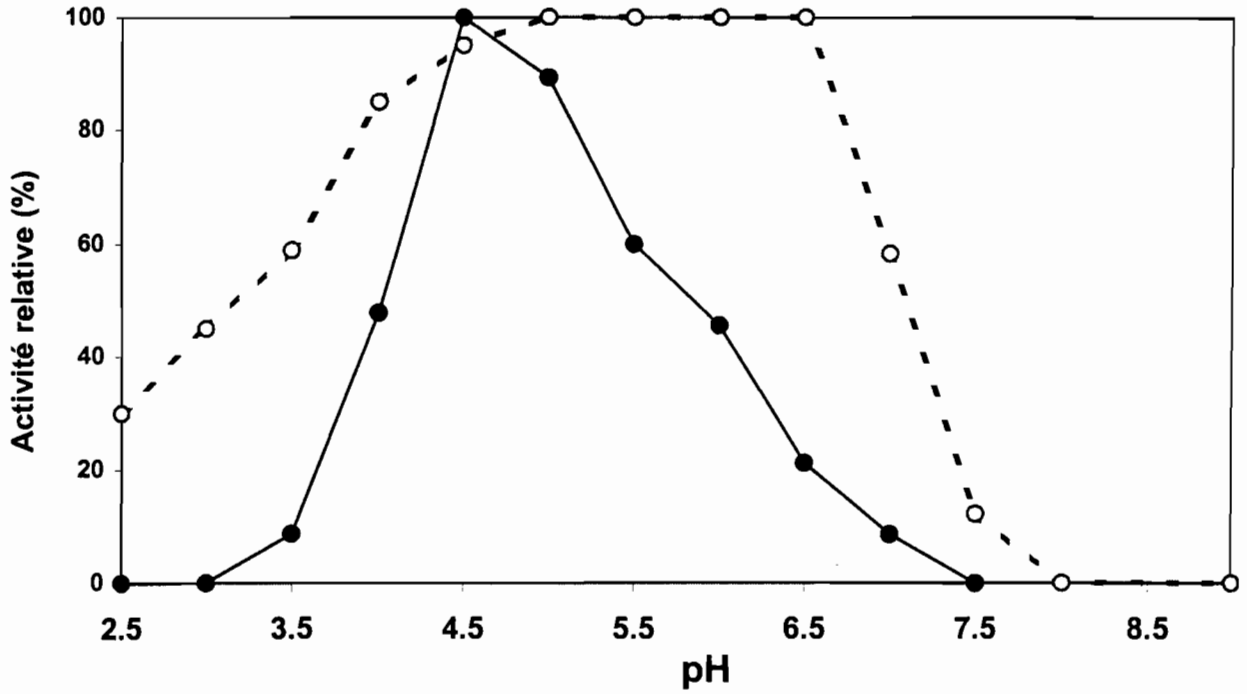


Figure 3. Activité (●) et stabilité (○) de la (1→3)-β-D-glucanase en fonction du pH.

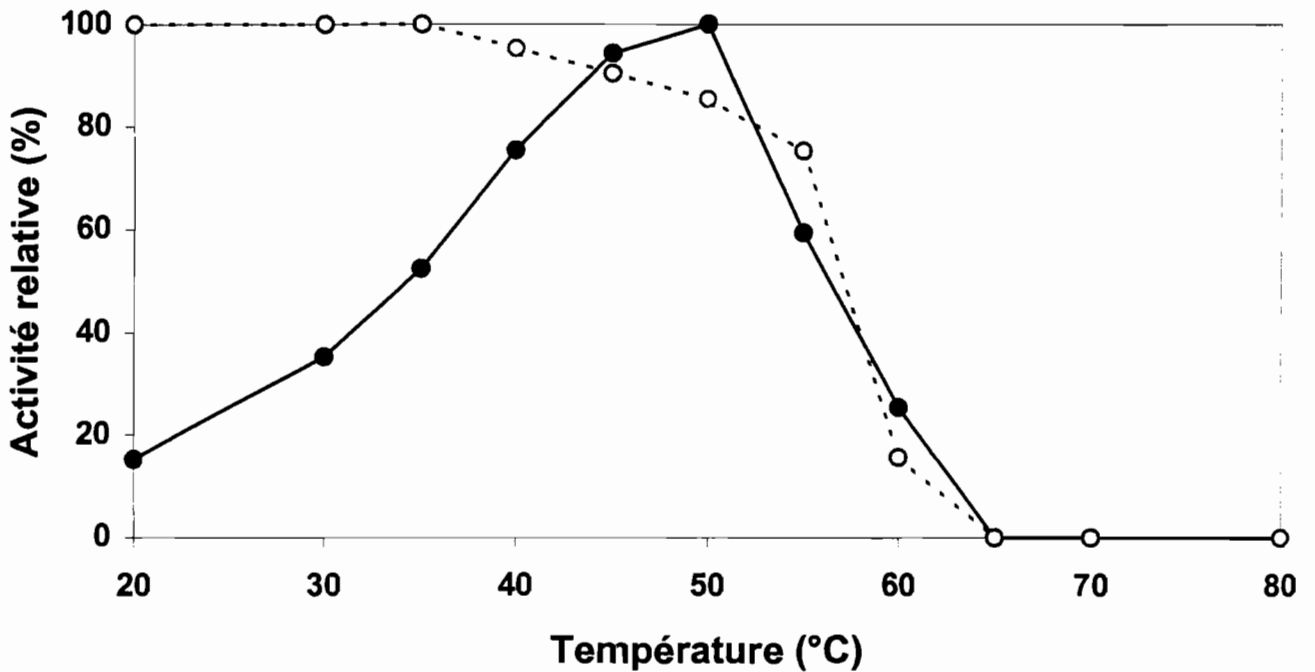


Figure 4. Activité (●) et stabilité (○) de la (1→3)-β-D-glucanase en fonction de la température

## Constantes cinétiques de la (1→3)-β-D-glucanase

La vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat obéit à la loi de Michaelis-Menten. Des relations linéaires de  $V^{-1}$  en fonction de  $[S]^{-1}$  sont obtenues avec des concentrations de la laminarine de *L. digitata* variant de 25 à 500  $\mu\text{M}$  (0,1 à 2 mg/ml). L'étude cinétique a permis de calculer une valeur de  $K_m$  apparent de 105  $\mu\text{M}$  (0,42 mg/ml). En même temps une vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) de 658,8 U/mg et une constante catalytique  $k_{\text{cat}}$  (turnover number) de 395,3  $\text{s}^{-1}$  ont été calculées. Le  $K_m$  de l'enzyme mesuré pour l'hydrolyse de la laminarine (0,42 mg/ml) est substantiellement plus petit que ceux rapportés pour les (1→3)-β-D-glucanases de plusieurs espèces végétales (Hrmova et Fincher, 1993; Krebs et Grumet, 1993; Shi *et al.*, 1993; Churngchow *et al.*, 1995). Cependant, cette valeur est plus élevée que le  $K_m$  de la β-glucanase du champignon *Aspergillus fumigatus* (0,3 mg/ml) (Fontaine *et al.*, 1997). La valeur relativement faible du  $K_m$  trouvée permet d'inférer que l'enzyme possède plus d'affinité pour la laminarine que pour les plantes analogues. La valeur du turnover number ( $k_{\text{cat}} = 395 \text{ s}^{-1}$ ) est plus élevée que celles des isoenzymes de la (1→3)-β-D-glucanase des feuilles de l'orge (Hrmova et Fincher, 1993) et de la (1→3)-β-D-glucanase des racines de céleri (Krebs et Grumet, 1993). L'énergie d'activation déduite ( $E_a = 26 \text{ kJ/mol}$ ) est située dans l'ordre de la plupart des polysaccharides hydrolases. Comme l'ont souligné Hrmova et Fincher (1993), les paramètres cinétiques des polysaccharides hydrolases sont des valeurs approximatives à cause de l'hétérogénéité moléculaire des substrats et aussi parce que les produits d'hydrolyse sont de potentiels substrats.

## Spécificité du substrat pour l'enzyme

La laminarine de *L. digitata* et les β-glucanes des parois cellulaires des levures sont bien connus comme étant des polysaccharides qui sont essentiellement linéaires (Bull et Chesters, 1963; Hrmova et Fincher, 1993). Ces β-glucanes sont très faiblement ramifiés par des liaisons β-1,6-glycosidiques. Le Tableau 2 montre que l'enzyme clive spécifiquement les molécules contenant des liaisons β-(1→3)-glycosidiques linéaires telles que celles rencontrées dans les molécules de la laminarine et des β-glucanes des parois cellulaires des levures. Cependant, aucune activité n'est détectée lorsque l'enzyme est incubée avec l'arabino-β-(1,3)/(1,6)-galactane, la CM-cellulose, le (1→6)-β-glucane (pustulane), le (1→3, 1→4)-β-glucane de l'orge ou du sorgho, l'amidon et le pullulane (Tableau 2). Aucune activité croisée n'a pu être détectée avec une incubation prolongée de l'enzyme avec l'arabino-β-(1,3)/(1,6)-galactane, montrant que l'enzyme est spécifique pour la liaison (1→3)-β impliquant des résidus de D-glucose exclusivement. Ces données indiquent que l'enzyme est une β-1,3-D-glucanase qui nécessite pour sa catalyse, des substrats possédant au moins deux liaisons (1→3)-β-D-glucosyl contiguës (Høj *et al.*, 1989).



**Tableau 2. Spécificité de la (1→3)-β-D-glucanase de *B. senegalensis* à travers divers glucanes.**

<b>Substrats</b>	<b>Type de Liaison majoritaire</b>	<b>Activité relative (%)</b>
Laminarine	β-(1→3)	100
Glucane insoluble des levures ( <i>S. cerevisiae</i> )	β-(1→3,1→6)	78
Pustulane	β-(1→6)	0
CM-cellulose	β-(1→4)	0
Glucane de l'orge	β-(1→3,1→4)	0
Glucane du sorgho	β-(1→3,1→4)	0
Arabino-galactane*	β-(1→3,1→6)	0
Amidon	α-(1→4)	0
Pullulane	α-(1→6)	0

\*Oligomères d'arabinose et de galactose, tous les autres glucanes sont formés de résidus de glucose

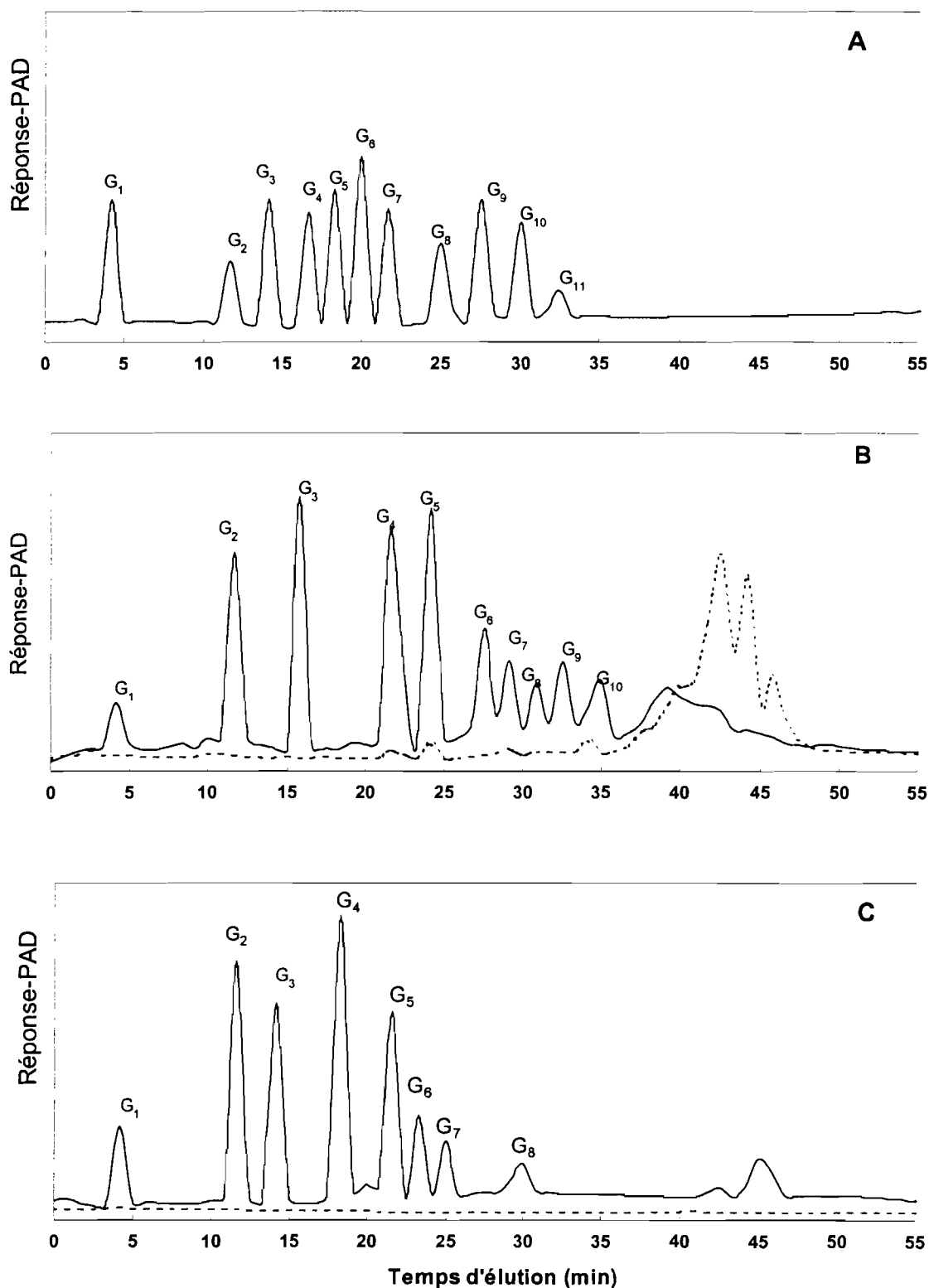
### Mode d'action de l'enzyme

Le mode d'action de la (1→3)-β-D-glucanase sur ses substrats a été étudié en identifiant la structure des produits d'hydrolyse par chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC), par chromatographie d'exclusion-diffusion ou de perméation sur gel à haute performance (HPSEC) et par spectrométrie de masse "Matrix Assisted Laser

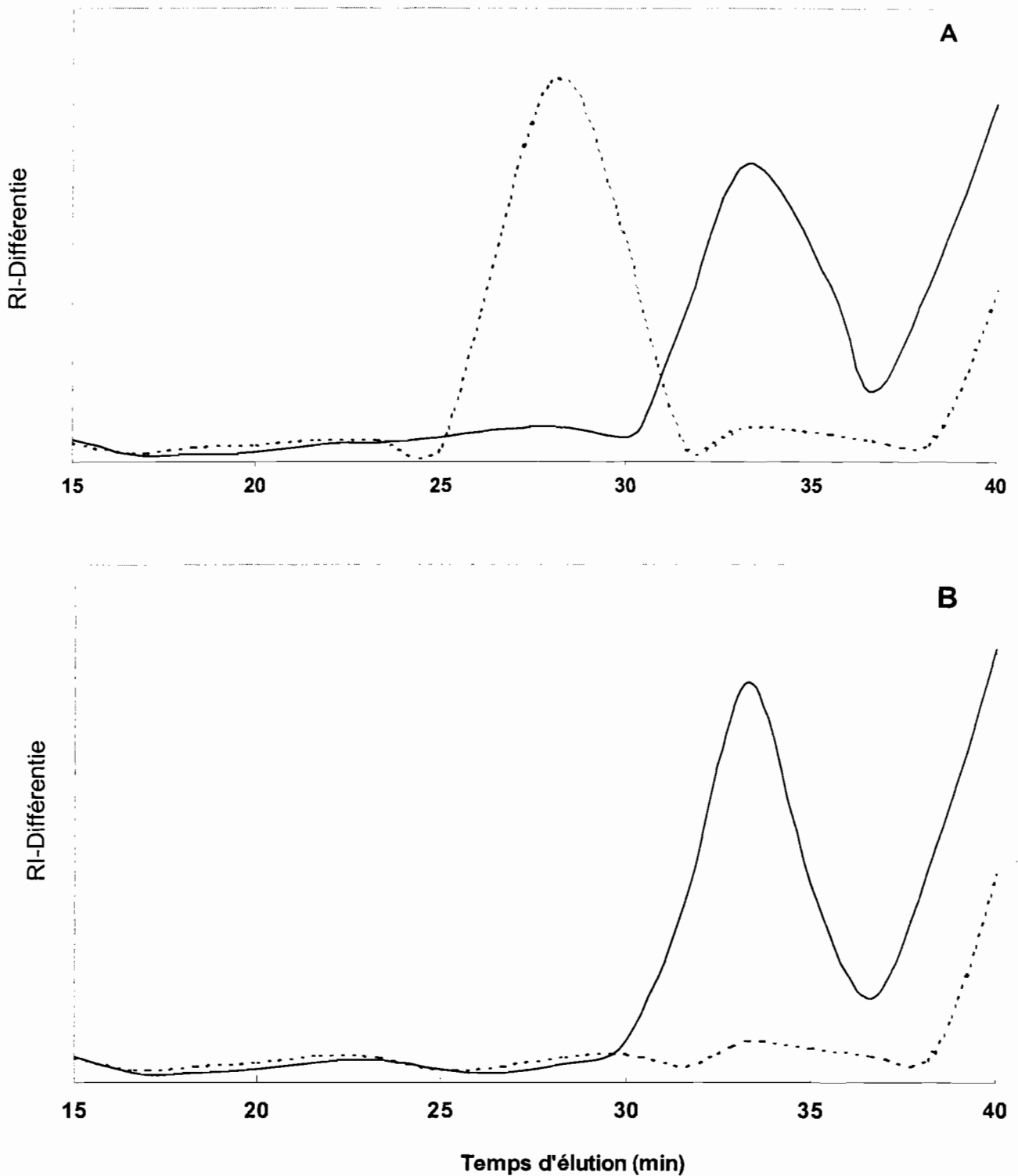
Desorption/ionisation-Time of flight mass spectrometry" (MALDI-TOF). L'analyse par HPAEC des oligosaccharides produits après l'hydrolyse de la laminarine (Figure 5B) et des parois cellulaires insolubles des levures (Figure 5C) montre que l'enzyme hydrolyse son substrat en libérant des oligosaccharides de DP variés; donc selon le mode hydrolytique de type "Endo". L'analyse par HPSEC des surnageants des milieux réactionnels des mixtures d'incubations de l'enzyme avec la laminarine (Figure 6A) montre une diminution du poids moléculaire du substrat initial avec une production des oligomères de glucose ayant un poids moléculaire relativement plus faible que le substrat initial. En effet, en HPSEC comme toute séparation basée sur l'exclusion moléculaire, les molécules de poids moléculaires élevés sont éluées en premier lieu, ensuite suivent celles qui possèdent les poids moléculaires les plus faibles. Ce mode d'éluion des produits d'hydrolyse, obtenu dans la figure 6B est caractéristique pour les endo-enzymes car elles ne libèrent pas un seul type de composé à partir d'une extrémité mais coupent la molécule du substrat à l'intérieur de sa chaîne. De plus, les analyses par HPAEC (Figure 5C) et HPSEC (Figure 6B), ne révèlent la présence d'aucun oligomère de glucose dans les surnageants des β-glucanes des parois cellulaires des levures avant l'incubation enzymatique. Par contre, l'incubation enzymatique (30 min) entraîne une production dans le milieu réactionnel des oligomères de glucose de poids moléculaires variés (Figures 5A et 5B). Les différences observées au niveau des temps de rétention dans les Figures 5A, 5B et 5C, pour les molécules ayant le même DP sont dues au fait que ces polymères n'ont pas les mêmes structures chimiques. Dans les maltodextrines (Figure 5A), les résidus de glucose sont reliés principalement par des liaisons α-1,4-glucosidiques linéaires (très faiblement branchés par des ponts α-1,6-glucosidiques). Cependant, la laminarine et les β-glucanes des levures sont des polymères légèrement branchés, formés d'unités de glucose liées par des liaisons β-1,6-glucosidiques aux points de branchement, en plus des liaisons β-1,3-glucosidiques linéaires (Hrmova et Fincher, 1993). Ces derniers

sont également différents les uns des autres, à cause de leur taux de ramification et du rapport des liaisons  $\beta$ -1,3 sur les liaisons  $\beta$ -1,6 (Hrmova et Fincher, 1993). Le degré de polymérisation des produits libérés lors de la catalyse enzymatique (DP) a été déterminé par la spectrométrie de masse MALDI-TOF, en utilisant le spectrographe VG Analytical ToFSpec (UG Analytical, Manchester, England). Des maltodextrines, oligomères de D-glucose MD05 (Spreda, Burghof, Switzerland) de DP compris entre 1 à 12, ont été utilisés pour calibrer l'appareil (Figure 7A). Durant l'hydrolyse de la laminarine (Figure 7B) et les  $\beta$ -glucanes insolubles des parois cellulaires des levures (Figure 7C), des séries de laminaridextrines avec des DP variant de 3 à 15 pouvaient être détectées. La combinaison des spectres obtenus par HPAEC (Figures 5A et 5B) et par la masse spectrométrie MALDI-TOF (Figures 7B et 7C), montre que les produits majoritaires d'hydrolyse (après 30 min d'incubation) sont les oligomères  $G_2$  à  $G_{10}$  pour les deux substrats.

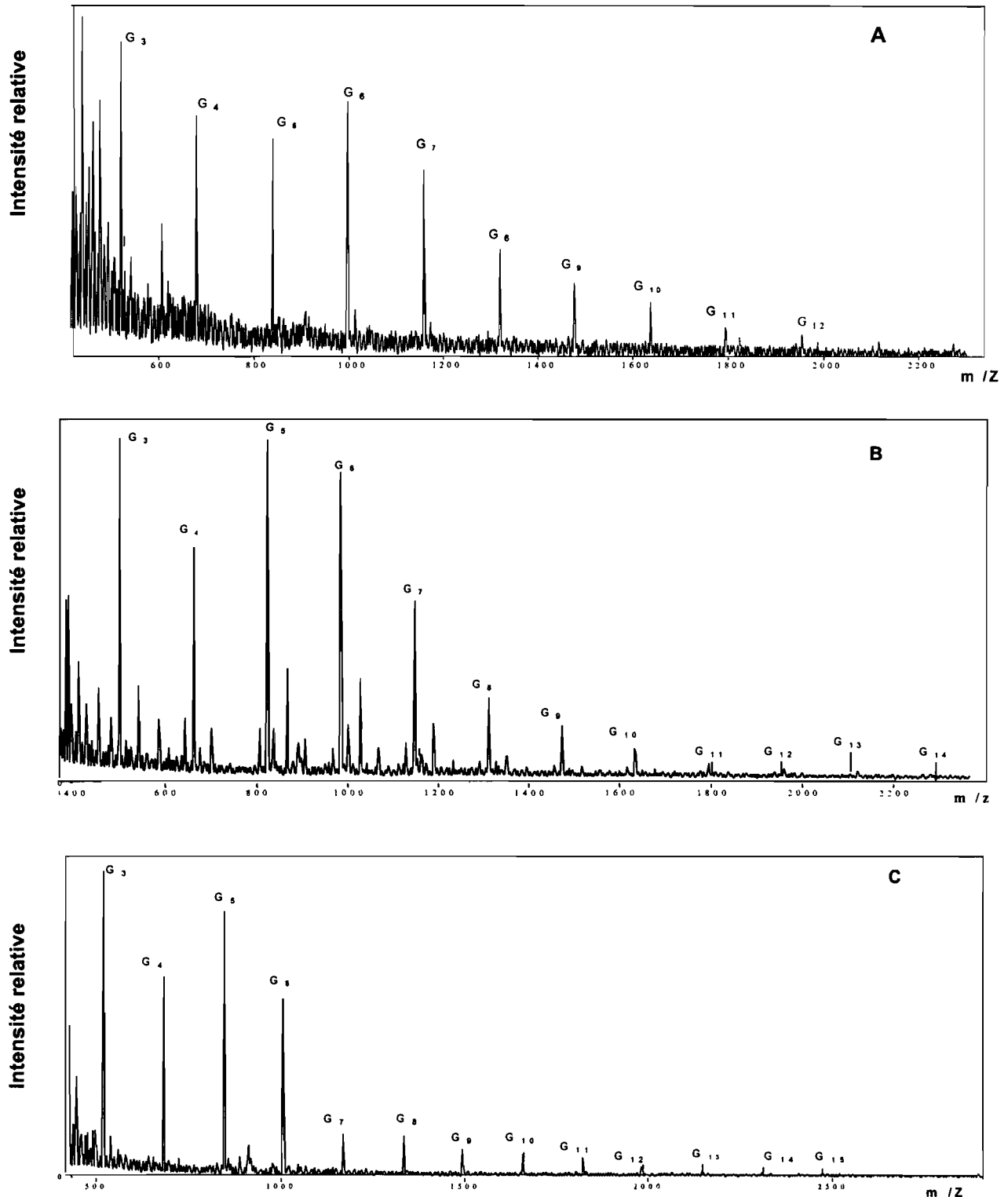
De ce fait, tous ces résultats convergent à soutenir que la (1→3)- $\beta$ -D-glucanase purifiée dans ce présent travail agit selon le mécanisme d'hydrolyse de type Endo. La (1→3)- $\beta$ -D-glucanase purifiée est donc une endo-hydrolase; hypothèse soutenue par la libération d'une quantité plus importante d'oligosaccharides que de glucose (Figures 5A et 5B) dans le milieu réactionnel (Cruz-de-la *et al.*, 1995). Contrairement aux (1→3)- $\beta$ -D-glucanases des feuilles de l'orge qui dégradent les (1→3)- $\beta$ -D-glucanes pour générer des oligosaccharides de DP compris entre 2 à 9 (Hrmova et Fincher, 1993), l'endo-(1→3)- $\beta$ -D-glucanase des feuilles de *B. senegalensis*, libère des oligomères de glucose de DP allant jusqu'à 15 (Figures 7B et 7C). A l'opposé des (1→3)- $\beta$ -D-glucanases des feuilles de l'orge qui sont incapables d'hydrolyser les  $\beta$ -glucanes insolubles des parois cellulaires des levures *S. cerevisiae* (Hrmova et Fincher, 1993), la (1→3)- $\beta$ -D-glucanase des feuilles de *B. senegalensis* est quant à elle, à mesure de solubiliser ces derniers en libérant des oligomères de glucose (Figures 5C, 6B et 7C).



**Figure 5. Analyse du mode d'action de la (1→3)-β-D-glucanase par HPAEC. (A);** Mode d'éluion des maltodextrines standards; Surnageants des mixtures d'incubation de l'enzyme (0,1 unités) avec 5 mg de laminarine **(B)** ou des β-glucanes insolubles des parois cellulaires des levures. Les incubations ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,5, à la température de 40°C, pendant 30 min. G<sub>n</sub>, oligomères de glucose (n = degré de polymérisation). Substrat seul (-----), substrat + enzyme (—).



**Figure 6. Analyse du mode d'action de la (1→3)-β-D-glucanase par HPSEC.** Surnageants des mélanges d'incubation de l'enzyme (0,1 unités) avec 5 mg de laminarine (**A**) ou des β-glucanes insolubles des parois cellulaires des levures (**B**). Les incubations ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,5; à la température de 40°C, pendant 30 min.



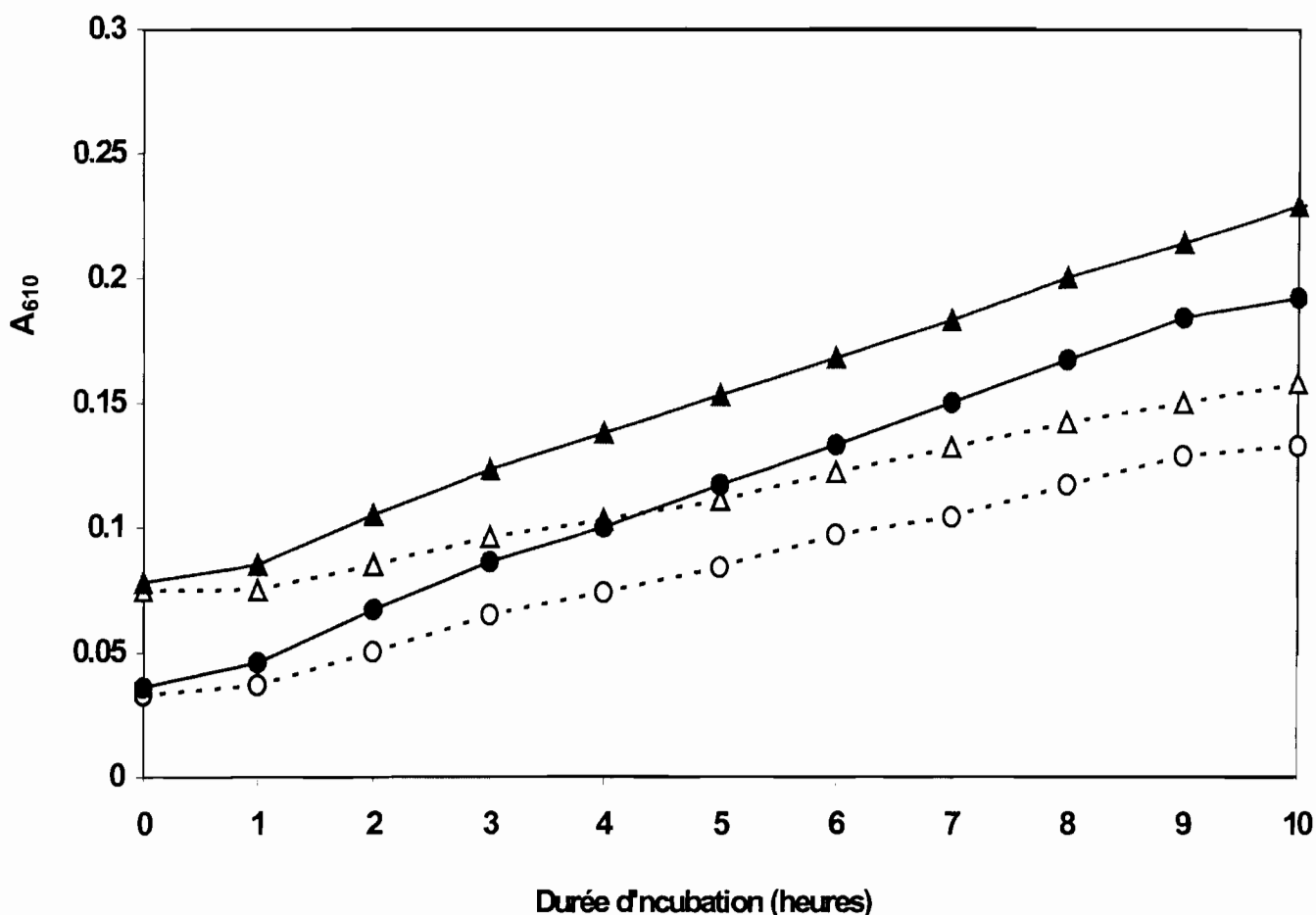
**Figure 7. Analyse du mode d'action de la (1→3)-β-D-glucanase par la spectrométrie de masse MALDI-TOF.** A, Spectre des oligomères standards de glucose (maltodextrines MD05). Spectres des surnageants des mélanges d'incubation de l'enzyme (0,1 unités) avec 5 mg de laminarine (**B**) ou des β-glucanes insolubles des parois cellulaires des levures (**C**). Les incubations ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,5, à la température de 40°C, pendant 30 min. L'échantillon dessalé contenant environ 10 picomol/μl de sucre, est combiné avec 9 μl de la solution de matrice, puis transféré sur la plaque dorée pour l'analyse. G<sub>n</sub>, oligomères de glucose (n = degré de polymérisation).

Le mode d'action de l'enzyme est comparable à la (1→3)-β-D-glucanase de *Flavobacterium dormitator*, produisant des oligosaccharides de poids moléculaires élevés (Nagata *et al.*, 1990).

L'ensemble de ces résultats justifie la classification de l'enzyme comme une endo-(1→3)-β-D-glucane glucanohydrolase (EC: 3.2.1.39), produisant des polysaccharides de hauts poids moléculaires.

### **Effet de la (1→3)-β-D-glucanase de *B. senegalensis* sur la croissance des levures**

L'action de l'enzyme sur la croissance de deux espèces de *Saccharomyces cerevisiae* (levure boulangère et levure de pain) a été testée. Comme le montre la Figure 8, les croissances de ces deux espèces de levure ont été inhibées de manière significative par l'endo-(1→3)-β-D-glucanase des feuilles de *B. senegalensis*. Une inhibition de la croissance de ces levures allant à un taux de 30 à 33 %, a été observée après 10 h d'incubation de l'enzyme avec des cellules vivantes. Non seulement l'enzyme solubilise les parois cellulaires des levures d'une manière endo-lytique (Figures 5C, 6B et 7C) mais elle est également à mesure d'inhiber la croissance des levures (Figure 8). L'inhibition de la croissance des levures serait probablement due au fait que l'enzyme hydrolyse leurs parois cellulaires. Ces résultats montrent que l'enzyme hydrolyse les parois des levures, apparemment sans l'aide des enzymes lytiques telles que les chitinases et les protéases.



**Figure 8. Inhibition de la croissance des levures vivantes par la (1→3)-β-D-glucane endohydrolase, dans un milieu Czapek ajusté au pH 6.** Levure de pain sans l'enzyme (▲), levure de pain + enzyme (Δ); levure de bière sans l'enzyme (●), levure de bière + enzyme (○). Les cellules des levures ont été activées dans le milieu de culture pendant 16 h avant l'incubation enzymatique. La solution enzymatique (5,5 Unités) correspondant à approximativement 10 µg de protéine a été incubée avec la suspension de cellules de levure dans un volume total de 10 ml, à la température de 37°C, pH 6. La croissance a été suivie en mesurant la turbidité du milieu au spectrophotomètre (Milton Roy Spectronic 601) à la longueur d'onde de 610 nm.

L'activité lytique de l'enzyme est comparable à celles des endo-(1→3)-β-D-glucanases lytiques des microorganismes (Usui *et al.*, 1985; Nagata *et al.*, 1990; Saeki *et al.*, 1994; Cruz-de-la *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1996) et aux (1→3)-β-D-glucanases des plantes induites par une pathogénicité, c'est à dire les "PR protéines" (Boller, 1987; Mauch *et al.*,



1988; Grenier *et al.*, 1993). Cependant, l'enzyme exhibe une activité endo-hydrolytique plus élevée que les (1→3)-β-D-glucanases des feuilles saines de l'orge (Hrmova et Fincher, 1993) ou des hypocotyles du soja (Yi et Hwang, 1997). Cette propriété de l'enzyme serait certainement impliquée dans la résistance des feuilles de *B. senegalensis* face aux agents pathogènes.

## Conclusion

Une endo-(1→3)-β-D-glucanase a pu être séparée des amylases, des (1→3, 1→4)-β-D-glucanases et d'autres macromolécules biologiques qui étaient présentes dans l'extrait brut des feuilles de *B. senegalensis*. L'enzyme a été isolée en quatre étapes fondamentales: extraction à l'aide d'un tampon organique, précipitation au (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, chromatographie d'échange d'anions et de cations et chromatographie de filtration sur gel. La particularité de l'enzyme par rapport à ses analogues isolées d'autres plantes réside dans sa capacité non seulement à hydrolyser les parois cellulaires des levures mais aussi à inhiber leur croissance. En effet, il est connu que les (1→3)-β-D-glucanases dépolymérisent les (1→3)-β-D-glucanes de la plante ou de l'hôte pour produire des oligosaccharides et elles interviennent dans la différenciation cellulaire. Il a été soutenu que ces enzymes représentent une large stratégie développée par la plante pour sa protection contre les agents pathogènes (Fincher, 1989). Ce mécanisme de protection fait intervenir des relations hormonales (Vogelsang et Barz, 1993) ou de médiations des gènes (Kaku *et al.*, 1997). Des propriétés moléculaires et catalytiques similaires ont été trouvées entre les (1→3)-β-glucanases de l'orge, du tabac, du haricot, de la tomate et du soja; mais leur fonction biologique dans la plante fait l'objet de nombreuses controverses (Joosten *et al.*, 1995).

Des molécules organiques de faibles poids moléculaires ayant des activités biocides ont déjà été détectées dans les feuilles de *B. senegalensis* (Lognay *et al.*, 1994). En plus de ces composés, la (1→3)-β-D-glucanase purifiée dans ce travail pourrait également jouer un rôle dans les mécanismes de défense de la plante contre l'invasion pathogène. L'enzyme pourrait fonctionner dans un mécanisme de protection développée par la plante qui ne nécessite pas forcément la présence d'un pathogène. Cette hypothèse est soutenue par l'abondance relativement plus élevée de l'enzyme dans la plante, que les besoins de la plante pour le catabolisme des β-1,3-glucanes (Høj *et al.*, 1989; Hrmova et Fincher, 1993). A cause de l'habilité de l'enzyme à hydrolyser les (1→3)-β-D-glucanes solubles ou insolubles et de sa capacité à inhiber la croissance des levures; l'endo-(1→3)-β-D-glucanase de *B. senegalensis* pourrait être impliquée dans la défense de la plante contre les microbes ou les insectes ravageurs.

L'utilisation traditionnelle des feuilles de la plante pour la protection des grains de céréales (Kerharo et Adams, 1974; Baumer, 1981; Becker, 1986; Diarra, 1995; Seck *et al.*, 1993), serait liée non seulement à la présence des insecticide ou bactéricide (Lognay *et al.*, 1994), mais également à cause de l'activité endo-(1→3)-β-D-glucanasique qu'elles renferment.

D'autre part, la production et l'activation des enzymes dégradant les parois cellulaires du malt du sorgho sont faibles. Cela explique la persistance des résidus cellulaires dans le moût et/ou dans la bière finale et constitue un obstacle de la filtration (Aisen et Muts, 1987; Etokakpan, 1992; Verbruggen, 1996). Quand bien même les (1→3)- et les (1→3, 1→4)-β-glucanes sont des polymères mineurs des polysaccharides des céréales, leur solubilisation dans le processus de la préparation de la bière pourrait augmenter la filtration et améliorer la qualité de la bière (Bamforth et Martin, 1983). Cette propriété pourrait justifier l'utilisation empirique des feuilles au cours de la préparation du dolo.

Compte tenu du fait que l'extrait brut des feuilles renferme un complexe multienzymatique constitué d'enzymes clivant les polysaccharides telles que les amylases, les (1→3, 1→4)-β-D-glucanases et l'endo-(1→3)-β-D-glucanase, il serait d'un apport très intéressant dans la formulation des farines de céréales destinées à la nutrition infantile (Malleshi et Desikachar, 1988). La poudre des feuilles pourrait être utilisée dans la formulation des aliments à valeur nutritive ajoutée exactement comme cela se pratique avec le malt de l'orge ou les enzymes microbiennes (Malleshi et Desikachar, 1988).

Dans le futur, non seulement les propriétés catalytiques des carbohydrases des feuilles de *B. senegalensis* seront approfondies, mais également les voies d'applications biotechnologiques de ces enzymes seront recherchées.

## **CONCLUSION GENERALE**

L'objectif global de cette étude était de valoriser économiquement les plantes supérieures locales, en justifiant leur importance pour les applications biotechnologiques; surtout dans l'alimentation humaine. Les enzymes hydrolysant les polysaccharides, ciblées dans cette étude sont les amylases et les  $\beta$ -glucanases, à cause de leurs nombreuses applications dans l'alimentation humaine, notamment celle des enfants. Le screening de ces enzymes a été réalisé sur les tissus des espèces végétales suivantes: les rhizomes (non germés) de *Curculigo pilosa*, les bulbes (non germées) de *Gladiolus klattianus* et les feuilles de *Boscia senegalensis*. Ces espèces ont été choisies parce qu'elles sont utilisées traditionnellement pour des besoins nutritionnels et dans la préparation du dolo. Cette investigation avait pour but spécifique de valoriser ces espèces, par l'exploitation rationnelle de leurs constituants possédant des activités biologiques intéressantes.

En effet, les enzymes sont des macromolécules biologiques possédant la propriété de catalyser toutes les réactions biochimiques qui se déroulent dans le monde vivant. Ces biocatalyseurs, possèdent cependant, des conditions spécifiques d'activité et de stabilité, pour leur utilisation optimum. Leur isolement, la détermination de leurs paramètres optima d'activité et la connaissance de leurs propriétés physico-chimiques s'avèrent donc essentielles pour leurs applications.

Le spectre d'enzymes dépolymérisant les polysaccharides, obtenu à partir de ces espèces est consigné dans le tableau suivant (Tableau 1) :

**Tableau 1. Activités enzymatiques dans les extraits bruts de *C. pilosa*, *G. klattianus* et *B. senegalensis*, pour 100 g de matière fraîche.**

Espèce végétale	Enzyme	Activité spécifique (U/mg)	Activités totales (U/100 g)
<b><i>C. pilosa</i></b>	$\beta$ -amylase	$48,5 \pm 1,4$	$28200 \pm 846$
<b><i>G. klattianus</i></b>	$\alpha$ -amylase	$4,4 \pm 0,1$	$8792 \pm 263$
	$\beta$ -amylase	$50,2 \pm 1,5$	$87920 \pm 2637$
<b><i>B. senegalensis</i></b>	$\alpha$ -amylase	$1,3 \pm 0,1$	$1500 \pm 45$
	$\beta$ -amylase	$16,1 \pm 0,4$	$20700 \pm 621$
	Exo-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-glucanase	$1,3 \pm 0,1$	$1700 \pm 51$
	Endo-(1,3)- $\beta$ -D-glucanase	$2,7 \pm 0,1$	$3476 \pm 104$

La purification de la  $\beta$ -amylase de *C. pilosa*, de la  $\beta$ -amylase de *G. klattianus* et de l'endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase de *B. senegalensis* a pu être réalisée. Les étapes fondamentales utilisées afin d'isoler ces enzymes sont:

1°) l'extraction des protéines enzymatiques par un tampon organique, 2°) le fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium, suivie d'une dialyse ou d'une ultrafiltration, 3°) la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions par HPLC et enfin 4°) la séparation des protéines sur la base de leur masse moléculaire ou de leur volume, par chromatographie de filtration sur gel.

La mise au point d'un micro-essai, pour le dosage des sucres réducteurs en utilisant le 2,2-disodium bicinchoninate (BCA) a permis de déterminer rapidement l'activité des enzymes. Les analyses par HPLC, l'utilisation des substrats spécifiques des enzymes et l'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ont permis de déterminer la spécificité

de chaque enzyme pour son substrat. Ces analyses ont été également utiles pour la caractérisation des produits d'hydrolyse des enzymes. En outre, la mesure du pouvoir rotatoire spécifique des oligosaccharides libérés après hydrolyse enzymatique, a permis d'identifier leurs configurations anomériques.

Dans l'extrait brut des rhizomes de *C. pilosa*, seule l'activité de la  $\beta$ -amylase a été détectée. A notre connaissance, elle diffère dans ce respect, de la plupart des végétaux dont le screening des enzymes a été effectué. Dans la majorité des plantes supérieures, coexistent une  $\alpha$ -amylase et une  $\beta$ -amylase. L'activité de l'enzyme dans l'extrait brut est estimée à 282 U/g de matière fraîche, correspondant à une activité spécifique de 76 U/mg de protéines. L'enzyme a été purifiée avec un rendement de 38 %, une activité spécifique finale de 4860 U/mg de protéine pure, correspondant à un facteur de purification de 100. L'enzyme isolée a été caractérisée comme étant une protéine monomérique non glycosylée, possédant une masse moléculaire de 64 kDa et un point isoélectrique (pI) de 4,2. Les optima d'activité de l'enzyme en fonction du pH et de la température sont respectivement à pH 5 et à la température de 55°C. L'enzyme s'est avérée être thermostable aux températures inférieures à 65°C (température de dénaturation), surtout en présence de son substrat (amidon). L'enzyme isolée est une  $\beta$ -amylase produisant exclusivement du  $\beta$ -maltose. Elle est capable d'hydrolyser aussi bien l'amidon soluble que les amidons bruts de blé, de maïs, de pomme de terre et de riz. Il faut noter qu'elle est particulière pour cette dernière propriété. L'enzyme amorce l'hydrolyse de l'amidon avant que celui-ci ne soit gélatinisé, suggérant donc son intérêt considérable en brasserie et dans la formulation des aliments à valeur nutritive ajoutée (farine diastasée).

Dans l'extrait brut des bulbes de *Gladiolus klattianus*, les activités de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase ont été détectées. La  $\beta$ -amylase était l'enzyme majoritaire (92 %) alors que l'activité de l' $\alpha$ -amylase était moins de 8 % de l'activité amylasique totale. L'activité de la  $\beta$ -

amylase dans l'extrait brut était approximativement égale à 440 U/g de matière fraîche; valeur similaire à l'activité  $\beta$ -amylasique du malt de l'orge (kit de Boehringer, Mannheim, Germany). L'enzyme a été isolée (avec un facteur de purification de 47), en utilisant des méthodes simples, puis partiellement caractérisée. Le rendement de la purification est très élevé (75 %), conférant une activité spécifique finale de 2360 U/mg de protéine pure. La protéine enzymatique a été identifiée comme étant un hétérodimère, composé de deux sous-unités de 60 et 12 kDa, ayant une masse moléculaire totale de 72 kDa. L'activité optimum de l'enzyme est atteinte à la température de 55°C et à pH 5,5. La  $\beta$ -amylase est abondante dans cette plante suggérant que cette enzyme trouvera de nombreuses applications dans la confection des sirops riches en maltose. L'avantage de cette espèce réside dans le fait que son extrait brut est limpide et dépourvu de beaucoup de protéines ou d'autres molécules contaminantes.

Contrairement aux rhizomes de *C. pilosa* ou aux bulbes de *G. klattianus*, les feuilles de *B. senegalensis* renferment un complexe multienzymatique de glycosyl-hydrolases ayant des propriétés catalytiques fondamentalement différentes les unes des autres. Les activités de l' $\alpha$ -amylase, de la  $\beta$ -amylase, de la  $\beta$ -(1→3, 1→4)-exo-glucanase et de la  $\beta$ -(1→3)-endo-glucanase ont été détectées dans l'extrait brut. L'exo-glucanase catalyse non seulement l'hydrolyse des substrats solubles (glucanes de l'orge) mais aussi les  $\beta$ -glucanes insolubles des parois cellulaires du sorgho. Son action sur ces  $\beta$ -glucanes libère exclusivement des monomères de glucose. Cette enzyme pourrait être intéressante dans la production du sirop de glucose à partir des farines de céréale.

Une  $\beta$ -(1→3)-endo-glucanase (EC: 3.1.1.39), hydrolysant les parois cellulaires des levures a été également purifiée à partir des feuilles saines de *B. senegalensis*. Le rendement typique de la purification est de 57 %, une activité spécifique finale de 549,2 U/mg de protéine pure, correspondant à un facteur de purification de 203. L'enzyme est une



protéine basique, non glycosylée, possédant une masse moléculaire de 36 kDa et un point isoélectrique très élevé ( $pI \geq 10,3$ ). Les optima d'activité de l'enzyme en fonction de la température et du pH sont respectivement 50°C et à pH 4,5. L'enzyme est capable d'hydrolyser les substrats solubles (laminarine), les substrats insolubles ( $\beta$ -glucanes des parois cellulaires des levures) et même d'inhiber la croissance des levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*). En effet, il est bien connu que les endo-1,3-glucanases, le lysozyme, les chitinases et les protéases, sont des enzymes hydrolytiques, impliquées dans la résistance des plantes contre l'invasion pathogène. Grâce à l'aptitude qu'elles possèdent à hydrolyser les parois cellulaires de leurs hôtes, elles confèrent ainsi à la plante une protection naturelle. Elles sont désignées pour cette raison comme étant des "hydrolases antifongiques" ou "protéines liées à une pathogénicité" (PR-protéines). Cette propriété de l'enzyme pourrait être liée à l'utilisation traditionnelle des feuilles de *B. senegalensis* pour la protection des céréales contre les agents ravageurs tels que les insectes et les champignons. En outre, les  $\beta$ -glucanes sont des polysaccharides des parois cellulaires des céréales (orge, sorgho, maïs, mil, etc.), dont l'hydrolyse augmente leur digestion, leur utilisation en brasserie (par augmentation de la filtration du moût).

Les enzymes dépolymérisant les polysaccharides telles que les amylases et les  $\beta$ -glucanases, sont de nos jours au centre des procédés d'ingéniosité alimentaire, ayant de nombreuses applications en biotechnologie. Les céréales constituant l'aliment essentiel (plus de 80 % de l'alimentation totale) des pays sahéliens, sont composées de 70 à 80 % d'amidon et de 8 à 12 % de  $\beta$ -glucanes. Dans toute l'Afrique, mis à part le Nigeria où l'introduction des malts de céréales étrangers est interdite, les enzymes exogènes utilisées en brasserie, en boulangerie et dans l'industrie-agroalimentaire sont importées de l'étranger. Il s'avère donc évident qu'une exploitation rationnelle de ces nouvelles sources d'enzymes dépolymérisant les polysaccharides sera d'un apport considérable dans la transformation des farines de

céréales en sucres fermentescibles. Cela pourrait sauver non seulement des devises mais aussi valoriser les sources locales de nos pays en voie de développement.

Les enzymes isolées dans cette étude pourraient être utilisées pour produire des farines de céréales diastasées pour la nutrition infantile ou la formulation des aliments de sevrage. Elles pourraient également être utilisées dans le but d'améliorer la qualité du malt du sorgho, qui est déficient en diastases, ou plus probablement de se substituer au malt de l'orge importé de l'Europe. De plus, les enzymes très pures et moins chères sont intéressantes dans le futur, pour les applications biotechnologiques.

L'objectif spécifique de cette étude a été atteint car, nous savons dorénavant que *C. pilosa* renferme une  $\beta$ -amylase thermostable, *G. klattianus* est riche en  $\beta$ -amylase et possède une activité  $\alpha$ -amylasique non négligéable et que *B. senegalensis* est une source nouvelle d'un complexe multienzymatique constitué d' $\alpha$ -amylase, de  $\beta$ -amylase, d'exoglucanase et d'endo-glucanase.

Dans le futur, les propriétés biochimiques des enzymes isolées seront investies, mais l'accent sera surtout mis sur leurs applications biotechnologiques. D'une manière générale l'étude sera focalisée sur la valorisation des enzymes de sources locales, non seulement celles qui dégradent les polysaccharides mais aussi les protéases, les polyphénol-oxydases et les peroxydases.

## REFERENCES

- Adams, C. A., Broman, T. H. and Rinne, R. W. (1981)** Ann. Bot. London. **48**, 433-440
- Aisen, A. O. and Muts, G. C. J. (1987)** Micro-scale malting and brewing studies of some sorghum varieties. J. Inst. Brew. **93**, 328-331
- Akiyama, T., Kaku, H. and Shibuya, N. (1996)** Purification and properties of a basic endo-1,3- $\beta$ -glucanase from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol. **37**, 702-705
- Anderson, M. A. and Stone, B. A. (1975)** A new substrate for investigating the specificity of  $\beta$ -glucan hydrolases. FEBS Lett. **52**, 202-207
- Angoue, A. N. (1996)** Etudes des amylases de *Curculigo pilosa* (Schum. et Thorin) Engl., en vue de leur utilisation possible dans la fabrication de dolo. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso
- Aniche, G. N. and Anih, A. C. (1994)** Malting properties of two sorghum cultivars and the effect of mashing schemes on their wort properties. Process Biochem. **29**, 369-371
- Ballance, G. M. and Svendsen, I. (1988)** Purification and amino acid sequence determination of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from barley. Carlsberg Res. Commun. **53**, 411-419
- Bamforth, C. W., and Martin, H. L. (1983)** The degradation of  $\beta$ -glucan during malting and mashing: the role of  $\beta$ -glucanases. J. Inst. Brew. **89**, 303-307
- Baumer, M. (1981)** Rôle de *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. dans l'économie rurale africaine: sa consommation par le bétail. In Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, vol. 34, N°3. pp. 325-328, France

- Beck, E. (1985)** The degradation of transitory starch granules in chloroplasts. In Regulation of carbon partitioning in photosynthetic tissue (R. Heath, J Preiss, eds.), pp. 27-44. American society of plant physiologists, Rocville, MD
- Becker, B. (1986)** Wild plants for human nutrition in the sahelian zone. *J. Arid Env.* **11**, 61-64
- Berhaut, J. (1974)** Flore illustrée du sénégal. Tome II, Ministère du développement rural, Direction des eaux et forêts, Dakar, Sénégal
- Boivin, P. (1997)** Les enzymes en brasserie. *In* Enzymes en agroalimentaire (Multon, J. L. ed.) pp.138-168, Collection Sciences et techniques agroalimentaires, Londres, Paris, New York
- Boller, T. (1987)** Hydrolytic enzymes in plant disease resistance, in plant-microbe interactions Molecular and genetic perspective (Kosuge, T. and E. W, ed.) vol. 2, pp. 385-413, MacMillan, New York
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brogliè, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvals, C. J. and Brogliè, R. (1991)** Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science.* **254**, 1194-1197
- Bull, A. T. and Chesters, C. G. C. (1963)** The Biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. *In* Advances in Enzymology (Nord, F. F., ed.), pp. 325-364, Interscience publishers/John and Sons, New York, London and Sydney

- Chang, C. T., Liou, H. Y., Tang, H. L. and Sung, H. Y. (1996)** Activation, purification and properties of  $\beta$ -amylase from sweet potatoes (*Ipomea batatas*). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 13-18
- Chaplin, M. F. and Bucke, C. (1990)** Enzyme technology. Reader University, Department of Biotechnology, South Bank Polytechnique, UK
- Cheetam, P. S. J. (1995)** Principles of industrial catalysis and bioprocessing. *In* handbook of enzyme biotechnology (Wiseman A. ed.), pp. 152-172, Ellis Horwood, London
- Chukwurah, E. N. (1995)** Industrial utilization: limitations of sorghum in brewing. *In* Processing and industrial utilization of sorghum and related cereals in Africa (OUA/STRC-SAFGRAD, eds.), pp. 71-75, Agence Internationale de Communication pour le Développement, Ougadougou
- Churngchow, N., Suntaro, A. and Witisuwannakul, R. (1995)**  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes from latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry.* **39**, 505-509
- Cruz-de-la, J., Pintor-Toro, Benitez, T., Llobell, A. and Luis, C. R. (1995)** A novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN131, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* **177**, 6937-6945
- Cruz-de-la, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., and Llobell, A. (1995)** Purification and characterization of an end- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **177**, 1864-1871
- Daussant, J. and Laurière, C. (1990)** Detection and partial characterization of two antigenically distinct  $\beta$ -amylases in developing kernels of wheat. *Planta.* **181**, 505-511

- Daussant, J., Sadowski, J., Rorat, T., Mayer, C. and Laurière, C. (1991)** Independent regulatory aspects and posttranslational modifications of two  $\beta$ -amylases of rye. *Plant Physiol.* **96**, 84-90
- Deutscher, M. P. (1990)** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* **182**, 779-780
- Diarra, A. (1995)** Gathering: a survival occupation in arid zones in Mali. *In Agriculture et développement*, N°3. pp. 29-38. Montpellier, France
- Dicko, M. H., Nacoulma-Ouédraogo, G. O. and Traoré, A. S. (1996a)** Comparaison des activités amylasiques des feuilles de *Boscia senegalensis* à celles du malt de l'orge et actions sur quelques substrats amylicés. 2<sup>èmes</sup> Journées SOACHIM. Vol. I, Chimie organique-Biochimie, pp. 49-51, Dakar, Sénégal
- Dicko, M. H., Nacoulma-Ouédraogo, G. O. and Traoré, A. S. (1996b)** Purification partielle des amylases des feuilles de *Boscia senegalensis*. 2<sup>èmes</sup> Journées SOACHIM. Vol. I, Chimie organique-Biochimie, pp. 75-77, Dakar, Sénégal
- Dufour, J. P., Melotte, L. and Srebrnik, S. (1992)** Sorghum malts for the production of a lager beer. *ASBC Journal.* **50**, 110-119
- Etokakpan, O. U. (1992)** Enzymic degradation and nature of the endosperm cell walls of germinating sorghums and barley. *J. Sci. Food Agri.* **61**, 389-393
- Fabregues, B. P. and Lebrun, J. P. (1976)** Catalogue des plantes vasculaires du Niger pp. 44-47
- Ferrer, P., Halkier, T., Hedegaard, L., Savva, D., Diers, I. and Asenjo, J. A. (1996)** Nucleotide sequence of a  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzyme II<sub>A</sub> gene of *Oerskovia*

- xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **168**, 1272-1276
- Fincher, G. B. (1989)** Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**, 305-346
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquin, M. and Latge, J. P. (1997)** Purification and characterization of an endo- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. Eur. J. Biochem. **243**, 315-321
- Garcia, E., Johnston, D., Whitaker, J. R. and Shoemaker, S. P. (1993)** Assessment of endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase activity by a rapid colorimetric assay using disodium 2,2'-bicinchoninate. J. Food Biochem. **17**, 135-145
- Gerhartz, W. (1990)** Enzymes in Industry (VCH eds.), pp. 77-82, Germany
- Godfrey, T. and West, S. (1996)** Industrial enzymology, 2<sup>nd</sup> ed. London, UK
- Grenier, J., Potvin, C. and Asselin, A. (1993)** Barley pathogenesis-related proteins with fungal cell wall lytic activity inhibit the growth of yeast. Plant Physiol. **103**, 1277-1283
- Høj, P. B., Hartman, D. J., Morrice, N. A., Doan, D. N. P. and Fincher G. B. (1989)** Purification of (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -glucan endohydrolase isoenzyme II from germinated barley and determination of its primary structure from cDNA clone. Plant Mol. Biol. **13**, 31-42
- Hagenimana, V., Vézina, L. P. and Simard, R. E. (1992)** Distribution of amylases within sweet potato (*Ipomea batatas* L.) Root Tissue. J. Agri. Food Chem. **40**, 1777-1783
- Hagenimana, V., Vézina, L. P. and Simard, R. E. (1994)** Sweet potato  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases: characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors. J. Food Sci. **59**, 373-377

- Hannemann, W. (1996)** Enzymes as a tool to overcome bottlenecks in a brewery, 24 th IOB convention, Singapore
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993)** New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788
- Hildebrand, D. F. and Hymowitz, T. (1981)** *Physiol. Plant.* **53**, 513-522
- Houvet, D. (1986)**  $\beta$ -amylase de tubercules d'igname *Diocorea esculenta*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, tome 303, série III, **12**, 501-506
- Houvet, D., Diopoh, J., Kétékou, F. S. and Marchis-Mouren, G. (1982)** Caractérisation et évolution des activités amylasiques des tubercules germés et non germés d'igname. *Physiol. Veg.* **20**, 451-458
- Hoy, J. L., Macauley, B. J. and Fincher, G. B. (1981)** Cellulases of plant and microbial origin in germinating barley. *J. Inst. Brew.* **87**, 77-80
- Hrmova, M. and Fincher, G. B. (1993)** Purification and properties of three (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* **239**, 453-461
- Ji, C. and Kuc, J. (1995)** Purification and characterization of an acidic  $\beta$ -1,3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 899-905
- Joosten, M. H. A. J., Verbakel, H. M., Nettekoven, M. E., Vossen, R. T. M.-van-der., Wit, P. J. G. M.-de., Van-Leeuwen, J., Van-der-Vossen, R. T. M. and De-Wit, P. J. G. M (1995)** The phytopathogenic fungus *Cladoporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase defence proteins of its host, tomato. *Plant Physiol. Mol. Pathol.* **46**, 45-59



- Kaku, H., Shibuya, N., Xu, P. L., Aryan, A. P. and Fincher, G. B. (1997)** N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)- $\beta$ -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Planta.* **100**, 111-118
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987)** Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *EMBO J.* **6**, 3209-3212
- Kerharo, J. and Adams, J. R. (1973)** *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex. Poir. In La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques (Vigot Frères ed.) pp. 314-315. Paris, France
- Kohno, A., Nanmori, T. and Shinke, R. (1989)** Purification of  $\beta$ -amylase from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Seeds. *J. Biochem.* **105**, 231-233
- Kombrink, E., Schröder, M., and Hahlbrock, K. (1988)** Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3- $\beta$ -glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 782-786
- Konlani, S., Degenes, J. P., Moletta, R., Traoré, A. S. and Doh, A. (1996)** Isolation and physiological characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food Biotechnol.* **10**, 29-42
- Kornberg, A. (1990)** Why to purify enzymes. *Methods Enzymol.* **182**, 1-5
- Krebs, S. L. and Grumet, R. (1993)** Affinity purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from celery. *Plant Sci. Limerick.* **93**, 31-39
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685

- Larreta-Garde, V. (1997)** In Enzymes en agroalimentaire (Multon, J. L. ed.), pp. 4-12, Collection Sciences et techniques agroalimentaires, Londres, Paris, New York
- Laurière, C., Doyen, C., Thévenot, C. and Daussant, J. (1992)** A study of the maize  $\beta$ -amylase system. *Plant Physiol.* **100**, 887-893
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. and Mundy, J. (1991)** biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* **266**, 1564-1573
- Lizotte, P. A., Henson, C. A. and Duke, S. H. (1990)** Purification and characterization of pea epicotyl  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol.* **92**, 615-621
- Lognay, G., Marlier, M., Seck, D., Haubruge, E., Wathelet, J. P., Coulibaly, A. D, Gaspar, C. and Severin, M. (1994)** Head space sampling and GC-MS detection of the biocide molécules from *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex. Poir. Leaves. *Bull. Res. Agro. Gembloux, Belgium.* **29**, 117-124
- MacGregor, A. W. (1983)** In Seed proteins (Daussant, J., Mosé, J. and Vaughan, J, eds.), pp. 1-34. Academic Press, New York
- Mallesh, N. G. and Desikachar, H. S. R. (1988)** Reducing the paste viscosity (dietary bulk) of roller dried weaning foods using malt or fungal amylase. *J. Fd. Sci. Technol.* **25**, 1-3
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988)** Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase. *Plant Physiol.* **88**, 936-942
- McCleary, B. V. and Codd, R. (1989)** Measurement of  $\beta$ -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. *J. Cereal Sci.* **9**, 17-33.

- McCleary, B. V. and Sheehan, H. (1989)** Measurement of cereal  $\alpha$ -amylase: A new assay procedure. *J. Cereal. Sci.* **6**, 237-251
- Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y. (1980)** Chemical modification of sulfhydryl groups in soybean  $\beta$ -amylase. *J. Biochem.* **88**, 103-111
- Mikami, B., Hehre, E. J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y. and Sacchettini, J. C. (1993)** The 2.0-Å resolution structure of soybean  $\beta$ -amylase complexed with  $\alpha$ -cyclodextrin. *Biochem.* **32**, 6836-6845
- Mizukami, M., Yamagata, H., Sakaguchi, K. and Udaka, S. (1992)** Efficient production of thermostable *Clostridium thermosulphurogenes*  $\beta$ -amylase by *Bacillus brevis*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 112-115
- Mohr, M. D., Börnsen, K. O. and Widmer, H. M. (1995)** Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Improved matrix for oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 809-814
- Monroe, J. D. and Preiss, J. (1990)** *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. *Plant Physiol.* **94**, 1033-1039
- Monsigny, M., Petit, C. and Roche, A. C. (1988)** Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* **175**, 525-530
- Monties, B. (1980)** Les polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés. *Biochimie Appliquée. Collection Gauthier-Villard, Paris, France*
- Morimoto, K., and Horie, Y. (1987)** Enzyme saccharification technology for brewing barley. *Monatsschrift für brauwissenschaft.* **10**, 410-415
- Mundy, J. (1982)** *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 263-274

- Nagata, S., Sawatani, M., Kuriyama, M., Misono, H. and Nagasaki, S. (1990)** Purification and characterization of nonlytic endo- $\beta$ -1,3-glucanase I from *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae*. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2107-2114
- Nanéma, S. (1998)** Contribution à l'étude des farines infantiles au Burkina-Faso: Analyses des propriétés nutritionnelles et étude de la stabilité des farines locales enrichies par apport de protéines à base d'arachide. Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> Cycle, Université de Ouagadougou
- Nielsen, T. H., Deiting, U. and Stitt, M. (1997)** A  $\beta$ -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* **113**, 503-510
- Norris, K., and Lewis, M. J. (1985)** Application of commercial barley  $\beta$ -amylase in brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**, 96-101
- Okafor N. and Aniche G. N. (1987)** Studies on the brewing of lager beer from sorghum. *J. Food Sci. Tech.* **24**, 131-134
- Okafor, N. (1995)** Improving and extending the utilization of sorghum and other tropical cereals, with particular reference to brewing. In *Processing and industrial utilization of sorghum and related cereals in Africa (OUA/STRC-SAFGRAD, eds.)*, pp. 77-85
- Okoda, Yukio., Yoshigi, N., Sahara, H. and Koshino, S. (1995)** Increase in thermostability of recombinant barley  $\beta$ -amylase by random mutagenesis. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1152-1153
- Okon, E. U and Uwaifo, A. O. (1985)** Evaluation of malting sorghum. 1 The malting properties of Nigerian varieties of sorghum. 2 The development and assessment of the saccharogenic activities of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase. *Brewers Digest*. December, pp. 24-29

- Pinheiro, H and Cabral, J. M. S. (1993)** Filtration. *In* Recovery processes for biological materials (Kennedy, J. F. and Cabral. J. M. S. ed.). pp. 47-66, John Wiley and Sons, Chichester
- Rashad, M. M., Jwanny, E. W., El –Sayed, S. T. and Mahmoud, A. E. (1995)** Glycosidases in tissues of some *Brassicaceae*. Radish -root  $\beta$ -amylase: extraction, purification and characterization. *Biores. Technol.* **51**, 183-186
- Repka, V., Tamas, L., Fischerova, I. and Fric, F. (1997)** Identification and partial characterization of  $\beta$ -1,3-glucanase from virus-infected cucumber cotyledons. *Acta Virologica.* **41**, 35-39
- Roby, J. F. (1984)** Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. *In* Starch: chemistry and technology, Whistler R. L., Bemiller J. N. and Paschall E. F. eds.) pp. 87-123, Academic Press, New York
- Rombouts F. M. and Phaff, H. J. (1976)** Lysis of yeast cell walls. Lytic  $\beta$ -1,6-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *Eur. J. Biochem.* **63**, 109-120
- Sadowsky, J., Rorat, T., Cooke, R. and Delseny, M. (1993)** Nucleotide sequence of cDNA encoding ubiquitous  $\beta$ -amylase in rye (*Secale cereal L.*). *Plant Physiol.* **102**, 315-316
- Saeki, K., Iwata, J., Yamazaki, S., Watanabe, Y. and Tamai, Y. (1994)** Purification and characterization of a yeast-lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 407-412
- Saha, B. C. and Zeikus, J. G. (1989)** Improved method for preparing high maltose conversion syrups. *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 299-303
- Saha, B. C. and Zeikus, J. G. (1990)** Preparation of high conversion syrups by using thermostable amylases from thermoaerobes. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 229-231

- Saha, B. C., Shen, G. J. and Zeikus, J. G. (1987)** Behavior of a novel thermostable  $\beta$ -amylase on raw starch. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 598-601
- Samson, M. F. and Morel, M. H. (1995)** Heat denaturation of durum wheat semolina  $\beta$ -amylase effects of chemical factors and pasta processing conditions. *J. Food Sci.* **60**, 1313-1320
- Sasha, E. and Seiffter, S. (1990)** Purification procedures: bulk precipitation. *Methods Enzymol.* **182**, 285-316
- Scopes, K. R. (1987)** Protein purification: principles and practice, 2<sup>nd</sup> eds. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokyo.
- Seck, D., Lognay, G., Haubruge, E., Wathelet, J. P., Marlier, M., Gaspar, C. and Severin, M. (1993)** Biological activity of the shrub *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex. Poir. (Capparaceae) on stored grain insects. *J. Chem. Eco.* **2**, 377-389
- Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. (1977)** A rapid , sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **79**, 553-560
- Segel, I. H. (1975)** "Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems", pp. 933-991. John Wiley and Sons, New York
- Shen, G. J., Saha, B. C., Lee, Y. E., Bhatnar, L. and Zeikus, J. G. (1988)** Purification and characterization of a novel thermostable  $\beta$ -amylase from *Clostridium thermosulphurogenes*. *Biochem. J.* **254**, 835-840
- Shewry, P. R., Parmar, S., Buxton, B., Gale, M. D., Liu, C. J., Hejgaard, J. and Kreiss, M. (1988)** Multiple molecular forms of  $\beta$ -amylase in seed and vegetative tissues of barley. *Planta.* **176**, 127-134

- Shi, Y. M., Yan, J. Q., Fei, X. N. and Xu, Y. Q. (1993)** Purification and properties of a  $\beta$ -1,3-glucanase in tomato leaves infected with TMV (tobacco mosaic virus). *Acta. Phytophysiol. Sinica.* **19**, 333-338
- Sicard, P. (1997)** Valorisation enzymatique des glucides d'origine agricole. In *Enzymes en agroalimentaire* (Multon, J. L. ed.) pp. 203-225, Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Londres, Paris, New York
- Sohn, C. B., Lee, S.M., Kim, M. H., Ko, J. H., Kim, K. S., Chang, J. E., Ahn, Y. K. and Kim, C. H. (1996)** Purification and characterization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus polymyxa* No.26-1. *J. Food Sci.* **61**, 230-234
- Somers, W. (1992)** Downstream processing of polysaccharide degrading enzymes by affinity chromatography. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
- Somers, W., Visser, J., Rombouts, F. M. and van't Riet, K. (1989)** "Developments in downstream processing of (poly)saccharide converting enzymes". *J. Biotechnol.* **11**, 199-222
- Steup, M. (1988)** Starch degradation. In *The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise* (Stumpf, P. K. and Conn, E. E. eds.) Vol. 14. Carbohydrate (Preiss, J.). pp. 255-289. Academic Press, San Diego, New York, Berkeley, Boston..etc
- Stuart, I. B., Loi, L. and Fincher, G. B. (1986)** Development of (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanase isoenzymes in extracts of germinating of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* **80**, 310-314

- Sun, Z. and Henson, C. A. (1991)** A quantitative assessment of the importance of barley seed  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, debranching enzyme, and  $\alpha$ -glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 298-305
- Svenson, B., Jespersen, H., Sierks, M. R. and MacGregor, E. A. (1989)** Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch degrading enzymes. *Biochem. J.* **264**, 309-311
- Swanston, J. S., Taylor, K., Rao, N. S., Subramanian, V. and Murty, D. S. (1993)** The use of rapid screening tests to compare changes during malting in sorghum. *J. Inst. Brew.* **99**, 483-486
- Taylor, J. R. N. (1992)** Mashing with malted grain sorghum. *ASBC Journal.* **50**, 13-18
- Thoma, J. A., Spradlin, J. E. and Dygert, S. (1971)** Plant and animal amylases. In *The Enzymes*, Ed.3 (PS Boyer, ed.), Vol. 5, pp. 255-296. Academic Press, New York
- Thomasset, B. and Chopplet, M. (1997)** Introduction et expression de nouvelles activités enzymatiques chez les végétaux. In, *Enzymes dans l'agroalimentaire* (Multon, J. L. ed.) pp. 349-374. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Londres, Paris, New York
- Toda, H., Nitta, Y., Asanami, S., Kim, J. P. and Sakiyama, F. (1993)** Sweet potato  $\beta$ -amylase primary structure and identification of the active-site glutamyl residue. *Eur. J. Biochem.* **216**, 25-38
- Totsuka, A. and Fukazawa, C. (1996)** Functional analysis of Glu380 and Leu383 of soybean  $\beta$ -amylase: a proposed action mechanism. *Eur. J. Biochem.* **240**, 655-659



- Touzeau, J (1973)** Les arbres fourragers de la zone sahéenne de l'Afrique. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse, Toulouse, France
- Turecek, P. L., Pittner, F. and Birkner, F. (1990)** Degradation of polysaccharides by immobilized depolymerizing enzymes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **25**, 1-8
- Usui, T., Tonaki, K., Totsuka, A. and Oguchi, M. (1985)** Purification of endo- $\beta$ -D-1,3-glucanase lysing yeast cell walls from *Rhizoctonia solani*. *Biochim. Biophys. Acta.* **840**, 255-263
- Van Berkel, W. J. H. (1997)** Biochemical separation methods (3<sup>rd</sup> ed.), Department of Biochemistry, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
- Varner, J. E. and Lin, L. S. (1989)** Plant cell architecture. *Cell.* **56**, 231-239
- Ventom, A. M. and Asenjo, J. A. (1991)** Characterization of the major glucanase of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 71-75
- Verbruggen, M. (1996)** Glucuronoarabinoxylans from sorghum grain. Ph. D. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Verbruggen, M. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. and M. Hollemans (1993)** Water-unextractable cell wall material from sorghum: isolation and characterization. *J. Cereal Sci.* **17**, 71-82
- Vikso, A. N., Christensen, T. M. I. E., Bojko, M. and Marcussen, J. (1997)** Purification and characterization of  $\beta$ -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Planta.* **99**, 190-196
- Vogelsang, R. and Barz, W. (1993)** Purification, characterization and differential hormone regulation of a  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta.* **189**, 60-69

- Wang, Q., Monroe, J. and Sjölund, R. D. (1995)** Identification and characterization of a phloem-specific  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol.* **109**, 743-750
- Wink, M. (1988)** Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites (natural products) biosynthesized. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 225-233
- Woodward, J. R. and Fincher, G. B. (1982)** Purification and chemical properties of two 1,3;1,4- $\beta$ -glucan endohydrolases from germinating barley (*Hordeum vulgure*). *Eur J. Biochem.* **121**, 663-669
- Yamasaki, K., Yokoyama, H., Miyano, K., Nunoura, Y., Higashihara, M., Kitahata, S., Yoneda, K. and Umezawa, C. (1989)** Purification and characterization of  $\beta$ -amylase from ginseng. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 973-978
- Yi, S. Y. and Hwang, B. K. (1997)** Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa  $\beta$ -1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae f. sp. Glycines*. *Mol. Cells.* **7**, 408-413
- Zang, X., Xie, S., Wu, X., Jin, F. and Li, X. (1994)** Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp.-JF2* strain. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 985-987

# ANNEXES

---

## **Annexe 1.**

**Comparaison des activités amylasiques de *Boschia senegalensis* à celles du malt de l'orge et actions sur quelques substrats amylacés**

---

## COMPARAISON DES ACTIVITES AMYLASIQUES DE *BOSCIA SENEGALENSIS* (Pers.) Lam. ex. Poir A CELLES DU MALT DE L'ORGE ET ACTIONS SUR QUELQUES SUBSTRATS AMYLACES

Mamoudou H. DICKO<sup>(1)</sup>, Odile G. NACOULMA<sup>(2)</sup> et Alfred S. TRAORE<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Technologie Alimentaire (LBTA); <sup>(2)</sup>Laboratoire de Biochimie et Chimie Organique Appliquées (LABIOCA), Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou 03 Burkina Faso.

### Résumé

*Les activités amylasiques ont été mises en évidence dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles et fruits), cependant les feuilles possèdent les activités les plus élevées. Les activités dextrinasiques et saccharolytiques des amylases des feuilles représentent respectivement 72,22 % et 32,25 % de celles du malt de l'orge germé, dans les conditions optimales. Les amidons de certaines céréales consommées au Burkina constituent des substrats potentiels des amylases de *B. senegalensis*.*

### INTRODUCTION

Les enquêtes ethnobotaniques ont révélé que les extraits des feuilles et des racines de *B. senegalensis* sont utilisés dans le pétrissement de la pâte des gâteaux et dans la préparation du dolo. Elle est donc présumée contenir des enzymes amylolytiques en général et les amylases en particulier. Il existe deux types d'amylases: l' $\alpha$ -amylase ou  $\alpha$ -1,4-glucane-4-glucanohydrolase (E.C: 3.2.1.1) et la  $\beta$ -amylase ou  $\alpha$ -1,4-glucane maltohydrolase (E.C: 3.2.2). Elles catalysent l'hydrolyse de l'amylose pour libérer des unités de maltose, par contre leurs actions sur l'amylopectine conduit à un mélange de maltose, de glucose et de dextrines limites. Ces biocatalyseurs sont impliqués dans tous les processus de transformations biotechnologiques des substrats amylicés en sucres fermentescibles. Dans cette étude un screening des activités amylasiques a été réalisé et celles-ci ont été comparées à celles du malt de l'orge germé.

### MATERIELS ET METHODES

**Matériel végétal.** Les grains de malt de l'orge (*Hordeum vulgare*) nous ont été offerts par la Société Burkinabé des Brasseries (SO.B.BRA). Les différentes parties de *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex. Poir. (*Capparidaceae*) ont été rincées à l'eau du robinet, ensuite à l'eau distillée, puis séchées et broyées au laboratoire.

**Extraits enzymatiques.** L'extraction des amylases a été réalisée dans un tampon de citrate de sodium 0,1 M pH 6 contenant du  $\text{CaCl}_2$  3 mM, du  $\beta$ -mercaptoéthanol 3 mM et du glycérol à 20 % (v/v). La matière végétale (10 g) est mélangée avec le tampon d'extraction (100 ml); le mélange est homogénéisé pendant 5 min, puis centrifugé à 5 000 rpm pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant est traité par une source d'ultrasons (Labson IC 200) pendant 5 min, tout en les maintenant dans des cristaux de glace. Il est centrifugé de nouveau à 10 000 rpm pendant 20 min, puis le surnageant est utilisé comme extrait enzymatique brut.

**Activités enzymatiques.** L'activité dextrinasique a été déterminée selon la méthode de SMITH ET ROE [1]. Elle est donnée par la relation  $A (\%) = (D-D')/D \times 100$  où D est l'absorbance à 620 nm du complexe iode-amidon en absence d'enzyme et D', cette absorbance en présence de l'enzyme. L'activité saccharolytique a été déterminée selon la méthode de BERNFELD modifiée [2]. L'activité spécifique correspond à la quantité d'équivalents maltoses libérés par unité de temps et par unité de protéine. Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de LOWRY et coll. modifiée [3]. Le substrat (amidon 1 %) est préparé selon le protocole décrit par Moreno et coll. [4]. L'amidon (1 ml) est incubé avec 0,1 ml d'extrait enzymatique, à 33°C, pendant 5 min, puis la réaction a été arrêtée pour déterminer l'activité enzymatique. Le test de la présence de l'amidon phosphorylase a été réalisé selon la méthode décrite par MAO et KINSELLA [5].

**Extraction et dosage de l'amidon.** L'extraction de l'amidon a été réalisée selon la méthode décrite par CLAIRE et coll. [6]. Le dosage de l'amidon est réalisé par la méthode spectrophotométrique comme précédemment [7] décrit en utilisant le réactif à l'iode. La lecture de la DO au spectrophotomètre (Cam Spec M302) a été faite à 620 nm.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le test de l'amidon phosphorylase n'entraîne aucune baisse d'activité amylasique, suggérant que son activité soit négligeable dans les feuilles. Les feuilles possèdent les activités dextrinasiques et saccharolytiques les plus élevées (Tableau I et II), et celles-ci représentent respectivement 38,40 et 44,47 % de celles du malt de l'orge à 33°C et au pH 6,9. Cependant, elles correspondent respectivement à 72,22 et 32,25 % de celles du malt de l'orge dans les conditions optimales de leurs enzymes. Cette abondance des amylases dans les feuilles serait probablement due au fait qu'elles sont riches en hétérosides soufrés [8]. Ces derniers stabilisent les amylases et augmentent leurs activités [9, 10].

**Tableau I. Activités dextrinasiques des feuilles, fruits, tiges et racines de *B. senegalensis* et du malt de l'orge à 33° et au pH 6,9.**

Matière végétale	Feuilles	Fruits	Tiges	Racines	Malt de l'orge
A (%)	30,73	11,44	11,55	5,53	80,03

A (%) = Activité dextrinasique (taux de réduction du complexe iode-amidon)

**Tableau II. Activités saccharolytiques des feuilles, fruits, tiges et racines de *B. senegalensis* et celles du malt de l'orge, à 33°C et au pH 6,9**

Matière végétale	Vol (ml)	A. T. <sup>a</sup> (U)	P. T. <sup>b</sup> (mg)	A. <sup>c</sup> (U/ml)	A. S. <sup>d</sup>	F. P. <sup>e</sup>	Rdt. <sup>f</sup> (%)
Feuilles	50	3235	302,8	12,94	10,68	2,61	95,46
Fruits	50	2529	225,4	10,11	11,22	1,51	67,10
Tiges	50	1914	107,7	07,66	17,77	2,05	83,40
Racines	50	2117	289,7	08,47	07,30	1,2	82,80
Malt de l'orge		7278	206,8	29,10	35,2	2,2	94,59

<sup>a</sup>Activités saccharolytiques totales (U):  $\mu\text{mol}$  de maltose/min, <sup>b</sup>Protéines totales; <sup>c</sup>Activités saccharolytiques totales,

<sup>d</sup>Activité spécifique:  $\mu\text{mol}$  de maltose/min/mg de protéine; <sup>e</sup>Facteur de purification; <sup>f</sup>Rendement de la purification.

L'action des amylases sur les amidons du maïs, du millet, du sorgho blanc, et du sorgho rouge germé révèle qu'ils constituent des substrats potentiels des amylases de *B. senegalensis* en vue de la production des sucres fermentescibles.

**Tableau III. Activités saccharolytiques des amylases de *B. senegalensis* sur l'amidon de quelques céréales.**

Origines de l'amidon	Maïs	Millet	Sorgho blanc	Sorgho rouge	Sorgho germé	Pomme de terre*
% d'amidon/matière sèche	70,40	65,67	67,58	66,33	61,79	-
Amidon utilisé (mg/ml)	5	5	5	5	5	5
Activité (U/ml)	7,72	5,17	7,28	7,17	7,59	7,64

\*Amidon soluble pur du Laboratoire Merck

Une exploitation rationnelle des amylases de *B. senegalensis* sera d'un apport considérable dans la transformation des substrats amylacés en sucres fermentescibles. L'utilisation des feuilles de cette plante comme source d'amylases ( $\alpha$  et  $\beta$ ), pour substituer le malt importé d'Europe serait envisageable. Cela pourrait engendrer un gain d'énergie et une conservation des devises.

### Références bibliographiques

1. Smith, B. W. and Roe, J. H. (1949) A photometric method for determination of  $\alpha$ -amylase in blood and urine with use of starch iodine color. J. Biol. Chem. 179, 53-56
2. Houvet, D., Diopoh, J., Ketekou, S. F. et Mouran, G. F. (1982) Physio. Vég. 20, 451-457
3. Eggstein, M and Kreutz, F. H. (1955) Klin. Wochschr. 33,879-885
4. Moreno, J., Roque, O. P., Nevada, J. Z. and Carlos, G. F.(1994) Testing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean, an experiment on selective inhibition of animal enzymes by natural defense proteins of plant. J. Chem. Ed. 71, 350-351
5. Mao, W. W. and Kinsella, J. E. (1981) Amylase activity in banana fruit: properties and changes in activity with ripening. J. Food Sci. 46, 1400-1403
6. Claire, A., Verrier, E. and Justiin, N. M. (1988) Analyse par chromatographie HPLC des principaux glucides solubles repartis dans le flagelle des tiges volubiles et amidon. Compte. R. Acad. Sci. Série III. 13, 735-740
7. Jarvis, C. E. and Walker, J. R. L. (1993) Simultaneous, rapid, spectrometric determination of total starch, amylose and amylopectin
8. Kheraro, J. and Adam, J. R. (1973) La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. pp. 314-315
9. Makoto, N., Matsukuro, S., Kimura, K. and Odaka, T. (1988) Methionine in stabilized enzyme solutions. Tokyo Koho. Japon. 63, 17690-17698
10. Kekos, D. and Macris, B. J. (1983) Production and characterization of amylase from *Calvatia gigantea*. Appl and Env. Microbiol. 45, 935-941

---

## **Annexe 2.**

**Purification partielle et caractéristiques des amylases des feuilles de *Boscia senegalensis***

---



## PURIFICATION PARTIELLE ET CARACTERISTIQUES DES AMYLASES DES FEUILLES DE *BOSCIA SENEGALENSIS* (Pers.) Lam. ex. Poir

Mamoudou H. DICKO<sup>(1)</sup>, Odile G. NACOULMA<sup>(2)</sup> et Alfred S. TRAORE<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Technologie Alimentaire (LBTA); <sup>(2)</sup>Laboratoire de Biochimie et Chimie Organique Appliquées (LABIOCA), Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou 03 Burkina Faso.

### Résumé

La précipitation des protéines enzymatiques dans l'éthanol à 70 % (à 4°C), suivie d'une dialyse a permis d'obtenir un facteur de purification de 2,61 et un rendement de purification de 95,46 %. Les proportions de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase dans l'extrait sont respectivement de 28 à 35 % et de 65 à 72 %. Les conditions optima d'activité se situent aux pH 5 à 6 et aux températures comprises entre 60 et 70°C. Les  $K_m$  de l' $\alpha$ -amylase (2,64 mg/ml) et de la  $\beta$ -amylase (2,89 mg/ml) montrent que ces enzymes possèdent de fortes affinités pour l'amidon.

### INTRODUCTION

L' $\alpha$ -amylase et la  $\beta$ -amylase ont en commun quelques propriétés physico-chimiques mais elles diffèrent dans la catalyse de l'hydrolyse de l'amidon [1]. L'action de l' $\alpha$ -amylase (endoglycosidase) sur l'amylose libère du glucose, de l' $\alpha$ -maltose et du maltotriose. L'hydrolyse de l'amylose par la  $\beta$ -amylase (exo-glycosidase) libère essentiellement du  $\beta$ -maltose; par contre son action sur l'amylopectine est limitée au niveau des liaisons  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidiques; les produits obtenus sont le  $\beta$ -maltose et des dextrines- $\beta$ . L'action combinée des amylases, de la maltase et de l' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidase complète l'hydrolyse de l'amidon [2]. Le screening des activités amylasiques de *B. senegalensis* avait révélé qu'elles sont abondantes dans les feuilles de *B. senegalensis*. Cela a suscité d'effectuer une approche dans la connaissance de quelques propriétés de ces amylases endogènes.

### MATERIELS ET METHODES

**Matériel végétal.** Les feuilles de *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex. Poir. (*Capparidaceae*) ont été rincées à l'eau du robinet, ensuite à l'eau distillée, puis séchées et broyées au laboratoire.

**Extraits enzymatiques.** L'extraction des amylases a été réalisée dans un tampon de citrate de sodium 0,1 M pH 6 contenant du  $\text{CaCl}_2$  3 mM, du  $\beta$ -mercapto-éthanol 3 mM et du glycérol à 20 % (v/v). La matière végétale (10 g) est mélangée avec le tampon d'extraction (100 ml); le mélange est homogénéisé pendant 5 min, puis centrifugé à 5 000 rpm pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant est traité par une source d'ultrasons (Labson IC 200) pendant min tout en les maintenant dans des cristaux de glace. Il est centrifugé de nouveau à 10 000 rpm pendant 20 min, puis le surnageant est recueilli.

**Purification partielle.** Elle a été réalisée selon le protocole décrit par KEKOS et MACRIS [3]. De l'éthanol à 4°C est additionné doucement dans l'extrait brut pour obtenir une concentration finale en éthanol de 70 % (v/v). Le précipité est séparé par centrifugation à 5 000 rpm pendant 10 min à 4°C et dissout dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5.

La solution est dialysée une nuit contre de l'eau distillée avec un rapport de 200/1 (v/v) à 4°C. La fraction dialysée est diluée dans un tampon de citrate de sodium 100 mM pH 6 contenant du glycérol à 20 % (v/v) du CaCl<sub>2</sub> 3 mM et du β-mercapto-éthanol 3 mM.

**Activités enzymatiques.** L'activité amylasique a été déterminée par la méthode de BERNFELD modifiée [4], en dosant les sucres réducteurs par le réactif à l'acide dinitro salicylique (DNS). L'unité amylasique (U.A) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit en 1 min, 1 μmol de maltose par hydrolyse de l'amidon. Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de LOWRY et Coll. modifiée [5]. Le substrat (amidon 1%) est préparé selon le protocole décrit par MORENO et Coll. [6]. Le substrat (1 ml) est incubé avec 0,1 ml d'extrait enzymatique, à 33°C, pendant 5 min, puis la réaction est arrêtée pour déterminer le dosage des sucres réducteurs libérés.

**Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique.** L'effet du pH sur l'activité amylasique est déterminé en incubant l'enzyme avec son substrat dans des tampons de pH variant de 2 à 10. L'activité en fonction de la température a été déterminée en incubant l'enzyme avec son substrat dans un bain marie thermostaté à des températures variant de 10 à 100°C. La stabilité thermique de l'enzyme a été déterminée en préincubant l'enzyme aux températures ci-dessus pendant 60 min, puis en dosant l'activité enzymatique résiduelle.

**Type d'amylase.** Le type d'amylase (α ou β) contenu dans l'extrait enzymatique été déterminé par la méthode de ROBYT et FRENCH [7]. L'amylase de référence utilisée est l'α-amylase humaine (ptyaline). **Détermination**

**de l'activité de l'α-amylase et de la β-amylase.** Quatre procédés d'inhibition de l'activité de l'α ou de la β-amylase dans l'extrait ont été utilisés. La connaissance de l'activité de l'une permettant ainsi la déduction de l'autre par soustraction. Il s'agit de : a) inactivation thermique de la β-amylase [8], b) inhibition de la β-amylase par du HgCl<sub>2</sub> 100 μM [8], c) inhibition de l'α-amylase par l'acide salicylique saturé [9] et d) inhibition de l'α-amylase par le molybdate d'ammonium 10 mM [10].

**Effet de la concentration en substrat.** La vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat est obtenue en incubant l'extrait enzymatique avec de l'amidon de concentration variant de 0,1 à 10 % (p/v).

## RESULTATS ET DISCUSSION

La purification partielle a permis d'obtenir un facteur de purification de 2,61 et un rendement de 95,46 % (Tableau I). Une augmentation d'activités à l'étape de la dialyse a été observée. Cela pourrait être du à une diffusion des inhibiteurs des amylases car la maille de la membrane à dialyse utilisée est de 12 000 à 14 000 Da. Le spectre UV-visible de l'extrait révèle un pic majoritaire aux longueurs d'ondes comprises entre 280 et 290 nm, caractéristique des protéines. Il apparaît que l'extrait renferme essentiellement des protéines.

**Tableau I. Bilan de la purification partielle des amylases des feuilles.**

Fraction	Activités (U.A/ml)	Protéines (mg)	Act. Spéci. (U.A/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Brute	13,56	828,8	4,09	1	100
Ethanolique	9,56	460,2	5,19	1,27	70,60
Dialyse	12,94	302,8	10,68	2,61	95,46

La courbe de l'activité de l'amylase (méthode de ROBYT et FRENCH) des feuilles a l'allure de celle de la ptyaline mais elles ne sont pas superposables. Il apparaît donc une coexistence des deux types d'amylases dans l'extrait avec une activité  $\beta$ -amylasique prédominante. L'estimation des proportions des deux enzymes à partir des tests d'inhibition donne une proportion de l' $\alpha$ -amylase de 28 à 35 % et celle de la  $\beta$ -amylase de 65 à 72 %, dans l'extrait des feuilles à 33°C et au pH 5,5. Les caractéristiques physico-chimiques suivantes correspondent respectivement à celles des amylases globales, de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase.

- pH optimum: 5,5; 6 et 5,2
- Température optimum: 65, 70 et 60°C
- Stabilité thermique (60 min): 0-55, 0-60 et 0-35°C
- Energie d'activation ( $E_a$ ): 26,20; 20,68 et 37,35 kJ/mol
- Constantes de Michaélis ( $K_m$ ): 2,78; 2,67 et 2,89 mg/ml
- Vitesse maximum ( $V_m$ ): 2,02; 1,46 et 0,58 U.A

Les  $K_m$  des amylases des feuilles ont de fortes affinités pour leur substrat. Le  $K_m$  peut toutefois varier en fonction de la température du substrat [11], du degré de pureté de l'enzyme, de la température ou du pH du milieu réactionnel [12]. La purification totale de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase des feuilles serait envisageable. Cela permettra d'avoir une connaissance plus approfondie de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques.

### Références bibliographiques

1. Bunzo, M., Morito, Y. and Fukazuwa, C. (1988) Scikagaku. 60, 211-216
2. Yeboua, A. F., Kouadio, N. E., Hamdan, J. et Diopoh, K. J. (1994) Purification et étude de quelques propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -glucosidase du termite *Macrotermes subhyalinus*. Ann. III. Université nationale de Côte d'Ivoire.
3. Kekos, D. and Macris, B. J. (1983) Production and characterization of amylase from *Calvatia gigantea*. Appl. and Env. Microbiol. 45, 935-941
4. Houvet, D., Diopoh, J., Ketekou, S. F. et Mouran, G. F. (1982) Physio. Vég. 20, 451-457
5. Eggstein, M and Kreutz, F. H. (1955) Klin. Wochschr. 33,879-885
6. Moreno, J., Roque, O. P., Nevada, J. Z. and Carlos, G. F.(1994) J. Chem. Ed. 71, 350-351
7. Robyt, J. F. and French, D. (1967) Multiple
8. Doehlert, D. C. and Stanley, H. D. (1983) Specific determination of  $\alpha$ -amylase activity in crude plant extract containing  $\beta$ -amylase. Plant Physiol. 71, 229-234
9. Hemberg, T. (1967) Acta. Chem. Scand. 21, 1665-1678
10. Mulimani, V. H., Shashikala, R. and Dharpur, M. S. (1986) Ammonium molybdate: a potential inhibitor of barley amylase. Curr. Sci. 55, 441-443
11. Yururu, S., Nagayama, T., Nakaro, H. and Oishi, K. (1987) Purification and characterization of maltotriogenic- $\alpha$ -amylase-I and a maltogenic  $\alpha$ -amylase-II capable of cleaving  $\alpha(1\rightarrow6)$  bonds in amylopectin. Starch/staercke, 39, 246-252
12. Pelmont, J. (1993) Enzymes. 2<sup>nd</sup> édition. 605p. Presses Universitaires Grenoble