

**ORIGINAL**

Purification partielle et caractérisation de la dextrinase limite du malt de sorgho *Safirari*

^aNguemogne Annick Chancelle / ^{*b} Desobgo Zangué Steve Carly / ^aNso Emmanuel Jong /

Affiliation des auteurs

^aEcole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI), Département Génie des Procédés et Ingénierie, Laboratoire Génie Technologie Alimentaire (LAGETA), BP 455 ENSAI Ngaoundéré, Université de Ngaoundéré, Cameroun

^bInstitut Universitaire de Technologie (IUT), Département Génie Alimentaire et Contrôle Qualité, Laboratoire Génie Technologie Alimentaire (LAGETA/ENSAI) / Laboratoire de Bioprocédés (LBP/IUT), BP 455 IUT Ngaoundéré, Université de Ngaoundéré, Cameroun

Corresponding author

Desobgo Zangué Steve Carly

Email:

desobgo.zangue@gmail.com

Funding source

None.

Abstract

Limit dextrinase from *Safirari* sorghum malt was purified by maximizing its ammonium sulfate precipitation followed by dialysis. This purification led to a partially purified extract whose yield was 75% for a purification factor of 6.5. The characteristics of the purified limit dextrinase are as follows: optimum pH for activity and stability of 5.0-5.5; optimum temperature for activity and stability of 50 – 60°C. The kinetic parameters were 0.03 mg.mL⁻¹.sec⁻¹ and 2.4 mg.mL⁻¹ for V_{max} and K_M respectively. Limit dextrinase is a sulfhydryl enzyme and its activity is enhanced in the presence of ascorbic acid; but also, in the presence of bovine serum albumin or calcium chloride. The filtration of sorghum mash is improved in the presence of purified exogenous limit dextrinase.

Keywords: *Safirari*; Limit dextrinase; Natural pullulan; Megazyme kit; Purification; Enzyme activity.

Résumé

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

Mots clés : *Safirari* ; dextrinase limite ; pullulan naturel ; kit Megazyme ; purification ; activité enzymatique.

1. Introduction

Les enzymes, dans les conditions d'exploitation industrielle (température, pression, agitation, pH, présence d'oxygène etc.), sont sujets à des

dénaturations (Kotzia *et al.*, 2012; Lewis & Bamforth, 2006). L'utilisation des micro-organismes comme source d'enzyme satisfait bien



à cette exigence, vu leur permanente disponibilité (Andrés Illanes, Altamirano, & Wilson, 2008). Les enzymes d'origine végétales y sont également exploitées (Illanes *et al.*, 2008). L'avantage de pouvoir optimiser les conditions de synthèse enzymatique chez les céréales pendant le procédé de maltage, pourrait permettre d'aboutir à des quantités d'enzyme exploitables à l'échelle industrielle. Toutefois, la présence d'autres composés dans l'extrait enzymatique brut pourrait constituer une gêne pour certaines applications, d'où le recours à la purification. La purification des enzymes amylolytiques endogènes au malt de sorgho a concerné pour la plupart des travaux l' α - et la β -amylase (El Nour & Yagoub, 2010), mais pour ce qui est de la dextrinase limite, seuls les travaux de Hardie *et al.* (1976) ont porté sur de telles investigations en Afrique du Sud. Ceux-ci ont eu en effet à purifier la dextrinase limite de la variété de sorgho *Kaffircorn*. Toutefois, les techniques de purification des enzymes sont connues et pour ce qui est du cas particulier de la dextrinase limite à partir des céréales, ces techniques vont des méthodes de précipitation simple (au sulfate d'ammonium) aux techniques chromatographiques sophistiquées. Celles-ci tournent essentiellement autour de deux schémas principaux: la précipitation au sulfate d'ammonium suivie de l'électrophorèse continue puis de la gel-filtration (Whitaker, Voragen, & Wong, 2002) d'une part, et d'autre part la précipitation au sulfate d'ammonium suivie des techniques chromatographiques diverses (Whitaker *et al.*, 2002). Or, les enzymes utilisées à l'échelle industrielle sont généralement purifiées par des techniques de faible résolution à l'instar de la précipitation au sulfate d'ammonium, ce qui n'aboutit pas nécessairement à des extraits totalement purifiés (Khattak, Ul-Islam, Ullah, Khan, & Park, 2015). Le but de ce travail est donc de purifier la dextrinase limite du malt de sorgho

Safrari extraite dans des conditions optimales, par précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué du sorgho *Safrari* obtenu à l'Institut de Recherche Agronomique pour le Développement (IRAD) de Maroua/Cameroun.

2.1.2 Logiciels

Le logiciel Sigmaplot version 14.5 (Systat Software, Inc., 501 Canal Blvd, Suite E, Point Richmond, CA 94804-2028, USA) a servi aux tracés des courbes.

2.2 Méthodes

2.2.1 Procédé d'extraction de la dextrinase limite

Le broyat de malt vert (100 g) a été pesé et mélangé à 640 mL de tampon acétate (100 mM, pH 5,0), incubé à 23 °C au bain-marie (HH-S, Chine). L'ensemble a été homogénéisé et laissé au repos à 23 °C pour extraction pendant 10 h avec agitation lente pendant cinq secondes toutes les heures. Après extraction, l'ensemble a été centrifugé (Heraeus Biofuge Primo R, Allemagne) à 6000 g pendant 30 min à 4 °C ; puis le surnageant a constitué l'extrait enzymatique brut. L'utilisation du kit enzymatique K-PullG6 a exigé la présence de dithiothréitol (10 mM de DTT) pendant l'extraction.

2.2.2. Purification de la dextrinase limite

La purification de la dextrinase limite est décrite à la figure 1.

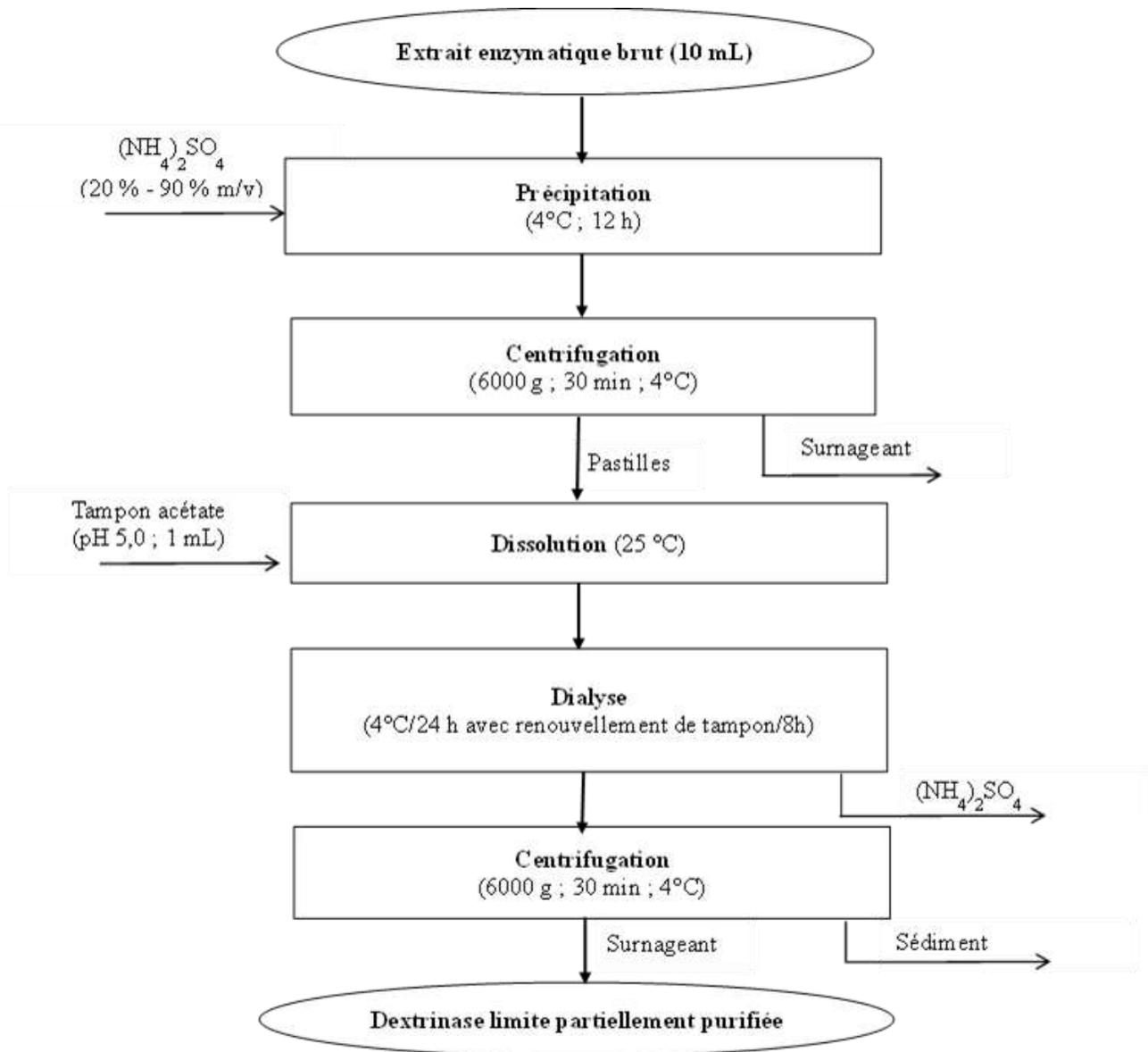


Figure 1 : Procédé de purification partielle de la dextrinase limite

2.2.2.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

La maximisation de la précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium a été faite selon la technique proposée par Barros *et al.* (2001) avec modification, en variant les pourcentages de saturation de l'extrait enzymatique brut de 20 % à 90 % m/v.

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

2.2.2.2 Dialyse à l'équilibre

La dialyse a été effectuée selon Barros *et al.* (2001) avec modification. En effet, l'échantillon à dialyser (60 mL) a été introduit dans le sac de dialyse (seuil de coupure de 11311 daltons et de 33 mm de largeur ; Sigma Aldrich) ; qui a été placé dans un récipient contenant une grande quantité (1 L) de solution tampon acétate de sodium (100 mM, pH 5,0). La séparation a été menée pendant 24 h à 4 °C dans l'incubateur, avec changement du tampon toutes les 8 heures.

2.2.3 Détermination de l'activité de la dextrinase limite

La détermination de l'activité de la dextrinase limite a été faite par deux méthodes : celle au pullulan naturel et celle au kit enzymatique de Megazyme (Megazyme, 2016).

2.2.3.1 Détermination de l'activité de la dextrinase limite par la méthode au pullulan naturel

L'activité de la dextrinase limite a été déterminée par dosage des sucres réducteurs (Fischer & Stein, 1961).

Une solution (0,25 mL) à 0,5 % de pullulan (Sigma Aldrich, USA) a été ajoutée à 0,25 mL d'extrait enzymatique contenant 100 mM de tampon acétate de sodium pH 4,0 (0,75 mL). L'ensemble a été incubé à 37°C au bain-marie (Memmert, Allemagne et HH-S, Chine) pendant 30 min. La réaction a été stoppée avec 0,25 mL de réactif au DNS (2,5 g d'acide dinitrosalicylique +75 g de tartrate double sodium potassium +50 mL de NaOH 2 N). Le mélange a été porté dans un bain bouillant pendant cinq minutes. L'ensemble a été ensuite refroidi dans un bain de glace et 4 mL d'eau distillée y ont été ajoutées. L'intensité de la coloration a été déterminée par spectrophotométrie contre un blanc ne contenant

pas le pullulan. La concentration en sucres réducteurs, exprimée en mg de maltose par mL a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage :

$$DO = aQ + b \quad (1)$$

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

L'activité enzymatique est la quantité d'enzyme qui libère un µmol de maltose équivalent du pullulan en 1 min à 37 °C, à pH 4,0 et s'exprime en U/mL. Elle a été calculée comme suit :

$$A_{Enz} (U / mL) = \frac{[Sucres]}{t} \quad (2)$$

A_{Enz} : activité enzymatique ; [Sucres] : Concentration en sucre (µmol/mL) ; t : temps (min)

2.2.3.2 Détermination de l'activité de la dextrinase limite par la méthode au kit Megazyme

Le substrat K-PullG6 et l'extrait de dextrinase limite ont été pré-incubés séparément à 40°C pendant 5 min. Par la suite, à chaque tube contenant le substrat K-PullG6 (0,10 mL), 0,1 mL d'extrait de dextrinase limite a été ajouté. L'ensemble a été incubé à 40 °C pendant 30 min. Après, 1,5 mL de tampon Tris (2 % m/v) pH 9,0 a été ajouté à chaque tube et agité vigoureusement. Les absorbances des solutions ont été lues à 590 nm.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme (présence d'un excès d' α -glucosidase et de β -glucosidase thermostables) nécessaire pour libérer une micromole de 4-nitrophenol du substrat 4,6-O-benzylidene-4-nitrophenyl-6³- α -D-maltotriosyl-maltotriose

(BPNPG₃G₃) en une minute dans les conditions définies par le test.

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

$$A_{DL} = \frac{DA_{400}}{t} \cdot \frac{V_t}{V_e} \cdot \frac{1}{e_{mM}} \cdot \frac{V_{ext}}{M_m} \cdot D \quad (3)$$

Avec :

ΔA_{400} (absorbance de la réaction - absorbance du blanc), t (temps d'incubation), V_t (Volume total dans le tube à essai), V_e (Volume de la prise d'essai), ϵ_{mM} du *p*-nitrophenol (à 400 nm) dans 2 % de tampon Tris, M_m (masse de malt), V_{ext} (volume d'extraction), D (facteur de dilution de l'extrait enzymatique de départ).

2.2.4 Dosage des protéines solubles

La détermination des teneurs en protéines solubles a été faite avec la méthode de (Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall, 1951).

A 1 mL de chaque solution stock d'une part et d'échantillon à doser d'autre part, contenus dans des tubes à essai, 1 mL de solution alcaline de cuivre a été ajouté, les tubes ont été agités et laissés au repos pendant 10 min. Ensuite, 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (DC Panreac Quimica, Espagne) a été ajouté à chaque tube, l'ensemble a été agité et incubé à l'obscurité pendant 30 min. Après incubation, les contenus des tubes ont été à nouveau homogénéisés avant la lecture des absorbances à 660 nm au spectrophotomètre.

2.2.5 Le tableau de purification enzymatique

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

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

$$A_{EnzT} (U) = A_{Enz} \cdot V_{Enz} \quad (4)$$

Avec : A_{EnzT} : Activité enzymatique totale (U); A_{Enz} : Activité enzymatique (U/mL); V_{Enz} : volume de l'extrait enzymatique

$$A_{EnzS} (U/mg) = \frac{A_{EnzT}}{Q_p} \quad (5)$$

Avec : A_{EnzS} : Activité enzymatique spécifique (U/mg); Q_p : masse de protéines (mg)

$$Rdt (\%) = \frac{A_{EnzT}^i}{A_{EnzT}} \cdot 100 \quad (6)$$

Rdt : Rendement (%); A_{EnzT}^i : Activité enzymatique totale à l'étape i de purification (U); A_{EnzT} : Activité enzymatique totale (U)

$$F_p = \frac{A_{EnzS}^i}{A_{EnzS}} \quad (7)$$

Avec : F_p : Facteur de purification; A_{EnzS}^i : Activité enzymatique spécifique à l'étape i de purification (U/mg)

2.2.6 Détermination du pH optimum d'activité et de stabilité

Les solutions enzymatiques ont été incubées à des pH variant de 3,0 à 6,5 en utilisant le tampon phosphate à 100 mM. Les tests d'activité au kit et au pullulan ont été conduits comme décrit précédemment. Pour déterminer le pH de stabilité de la dextrinase limite, les extraits enzymatiques (0,1 mL) ajoutés de 1 mL de

tampon acétate au pH correspondant ont été incubés sur une durée de 90 minutes à 40 °C. Après quoi le substrat du kit (0,1 mL) y a été ajouté pour le test d'activité.

2.2.7 Détermination de la température optimale d'activité et de stabilité

Les tests d'activité au pullulan et au kit ont été menés en incubant les milieux réactionnels aux températures d'étude (20 °C à 70 °C). Le tampon acétate (100 mM pH 5,0) a été utilisé.

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

2.2.8 Détermination des propriétés catalytiques K_m et V_{max}

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} ont été déterminés par linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten en utilisant la représentation graphique de Lineweaver-Burk et selon le protocole décrit par (Dicko, 2006). L'iode (I_2) interagit avec l'amidon pour donner une coloration bleue qui absorbe à une longueur d'onde de 580 nm.

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

$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M} \quad (8)$$

Avec : V_i : vitesse initiale de la réaction enzymatique ; V_{max} : Vitesse maximale de l'enzyme ; K_M : constante de Michaelis.

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

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

2.2.9 Détermination de l'activité de la dextrinase limite en présence de quelques effecteurs d'activité enzymatique (EDTA, DTT, $CaCl_2$, SAB, acide ascorbique)

L'activité enzymatique a été évaluée par ajout de solutions tampons (0,75 mL pour le test au pullulan et 1 mL pour le test au kit) contenant chacune l'additif à évaluer (DTT à 1 mM, ou acide ascorbique à 5 mM, ou $CaCl_2$ à 5 mM, ou EDTA à 1 mM, ou SAB à 10 mg/mL) dans des tubes à essai contenant l'extrait enzymatique (0,1 mL pour le test au kit et 0,25 mL pour le test au pullulan), avant l'ajout du substrat (K-PullG6 ou pullulan selon le test) dans le milieu. Les tests au pullulan et au kit ont été conduits tels que précédemment décrits.

2.2.10. Application de la dextrinase limite à des brassins de sorgho

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

2.2.10.1 Détermination de l'effet de la dextrinase limite au brassage

Le sorgho *Safiri* a été malté dans les conditions optimales définies par Nguemogne *et al.* (2020). Le malt obtenu a été touraillé à 50 °C pendant 24 h, broyé et tamisé ($\emptyset \leq 1$ mm). Quant au brassage, le procédé a été celui décrit par Desobgo *et al.* (2011) (brassage par décoction) et est présenté à la figure 2.

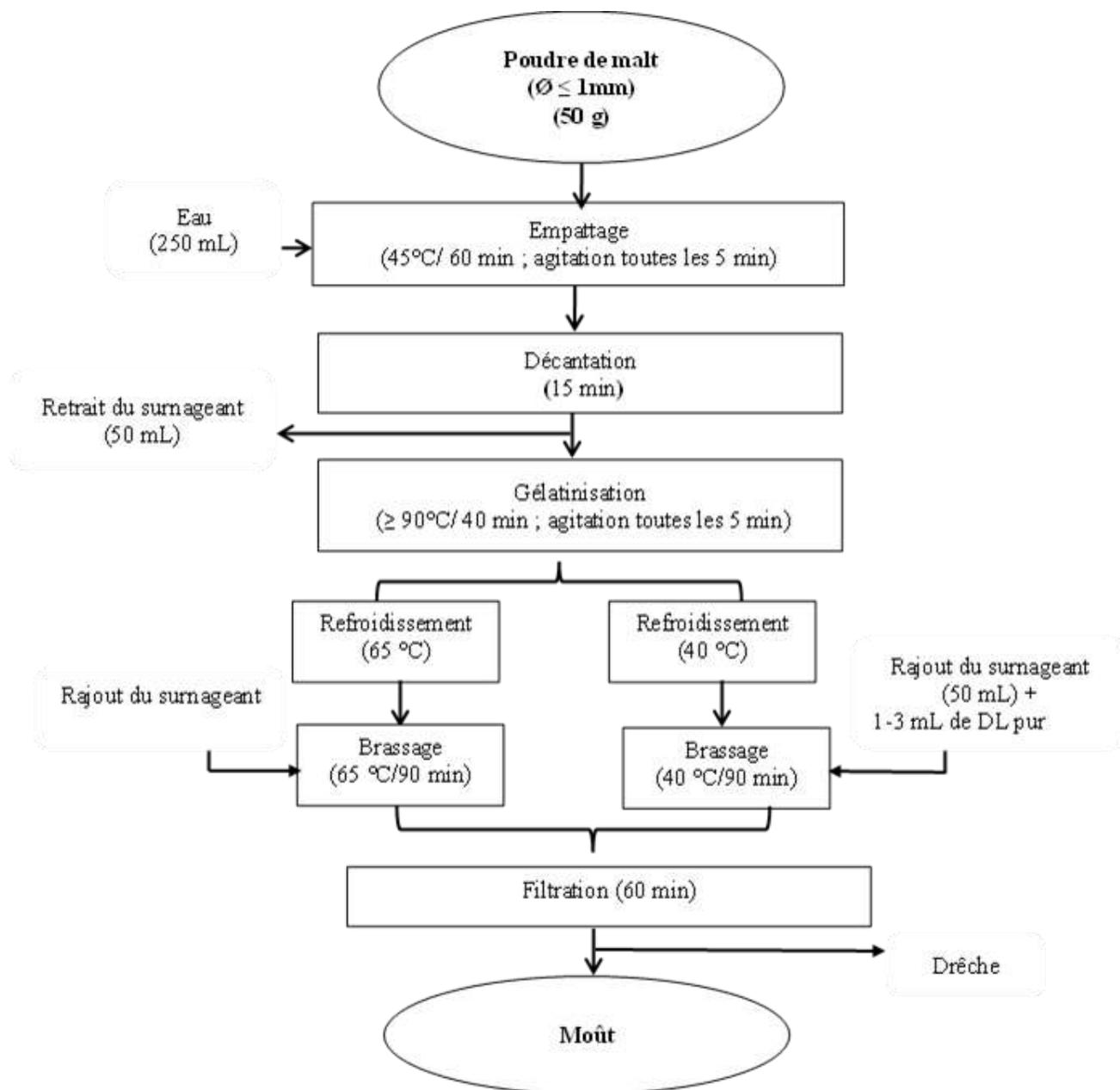


Figure 2 : Procédé de purification partielle de la dextrinase limite

Quatre brassins ont été ainsi préparés : le premier (brassin témoin), a été à l'étape de refroidissement, refroidi à 65 °C sans ajout de la dextrinase limite purifiée ; les second, troisième et quatrième brassins (brassins tests) ont été refroidis à 40 °C (température optimale de stabilité de la dextrinase limite) avant ajout des différents

surnageants mélangés avec 1 mL, 2,5 mL et 3 mL de dextrinase limite purifiée, respectivement.

2.2.10.2 Détermination de la teneur en sucres réducteurs des moûts

La teneur en sucres réducteurs a été déterminée comme précédemment indiqué.

2.2.10.3 Test de filtrabilité des brassins

La filtration des brassins a été faite avec du papier filtre Whatman N° 1. Cette filtrabilité a été déterminée en relevant les volumes cumulatifs de filtrats toutes les cinq minutes sur une durée de 1 h. Les courbes donnant les volumes cumulatifs de filtrat en fonction du temps ont par la suite été tracées et ont servi à observer les vitesses de filtration desdits brassins.

3. Résultats et discussion

3.1 Précipitation de la dextrinase limite au sulfate d'ammonium

Le maximum d'activité en dextrinase limite a été obtenu à 20 % m/v de saturation au sulfate d'ammonium (Tableau 1). Cette valeur se rapproche de 30 % utilisée par Yellowlees, (1980) avec la dextrinase limite des pois non germés, mais reste inférieure aux valeurs obtenues par Dunn *et al.* (1973) et Hardie *et al.* (1976) qui étaient de 30 - 50 % avec le sorgho malté.

Tableau 1 : Activités enzymatiques des précipités au sulfate d'ammonium

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

nd : non déterminé car activité enzymatique totale non détectée.

Les différences observées avec Yellowlees (1980), Dunn *et al.* (1973) et Hardie *et al.* (1976) pourraient s'expliquer par le fait que la précipitation varie d'une protéine à une autre; et aussi, en fonction de la source, une même protéine peut avoir des tailles et des solubilités variables (Labrou, 2014). Par ailleurs, la concentration de 20 % de saturation en sulfate d'ammonium pourrait permettre de postuler que la dextrinase limite du sorgho *Safiri* aurait une masse moléculaire beaucoup plus élevée que celle des précédents auteurs, étant donné que plus la masse moléculaire d'une protéine est élevée, moins de sulfate d'ammonium sera utilisé pour sa précipitation (Fiechter, 1983).

3.2 Purification de la dextrinase limite

Pour le test au kit (Tableau 2), l'activité enzymatique totale augmente après la première étape de purification (précipitation au SAM), puis diminue après la dialyse ; tandis que l'effet inverse est observé pour ce qui est du test au pullulan naturel. Ces observations se répercutent sur les rendements de purification. Quel que soit le test d'activité appliqué, l'activité enzymatique spécifique augmente après chaque étape de purification. Quel que soit le test d'activité appliqué, le facteur de purification augmente après chaque étape de purification. Cette activité totale évolue en dents de scie.

Pour ce qui est de l'activité enzymatique spécifique (Tableau 2), les conditions idéales d'augmentation de celle-ci après chaque étape de purification sont observées. Ce qui atteste de l'effectivité de la purification. Toutefois, l'activité enzymatique spécifique finale (après dialyse) avec le test au pullulan est d'environ 05 fois supérieure à celle obtenue avec le kit enzymatique.

Tableau 2 : Purification de la dextrinase limite

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

SAM : sulfate d'ammonium

La hausse d'activité dans les cas où cela est observée pour le cas du kit megazyme, serait due aux pertes de matières impliquant des inhibiteurs qui gêneraient l'activation de l'enzyme à purifier ; pertes d'inhibiteurs qui seraient considérables par comparaison à une éventuelle perte d'enzyme. Ces observations se reflètent sur les rendements de purification. La même tendance a été obtenue

par Emenike, Chibuzo, & Sabinus (2015) avec l'α-amylase des grains germés de l'arbre à pain.

La plus grande activité observée pour le pullulan par rapport au kit megazyme (Tableau 2) peut s'expliquer par le fait de la haute spécificité du test au kit pour des extraits enzymatiques purifiés ou non, contrairement au test au pullulan qui n'est spécifique que pour des extraits purs en dextrinase limite. N'ayant pas utilisé des techniques de purification de haute résolution telles les techniques chromatographiques, l'on serait donc en présence d'un extrait en dextrinase limite partiellement purifié, d'où la surestimation de l'activité observée avec le test au pullulan naturel. En plus, la haute spécificité du test au kit enzymatique se reflète même dans la valeur du rendement final, qui est d'environ 100 fois supérieur à celui du test au pullulan.

3.3 pH optimum d'activité et de stabilité de la dextrinase limite

On peut observer sur la figure 3, deux pics d'activité : à pH 3,5 et à pH 5,5, le maximum se situant à 3,5. La présence de ces 02 pics suggérerait que l'extrait enzymatique présenterait une activité liée à la possible présence d'autres enzymes amylolytiques. On constate une meilleure activité enzymatique située dans la plage 5,0-5,5 pour ce qui est du Kit. Etant donné que le substrat utilisé est spécifique à cette enzyme, une conclusion peut donc être tirée faisant état de ce que la plage de pH d'activité de 5,0 - 5,5 est celle correspondante à la dextrinase limite.

La variation du pH de 3,5 à 5,5 révèle que la dextrinase limite est plus active et stable à pH 5,5. Seulement 5 % d'activité sont perdues par rapport au contrôle (Tableau 3). En deçà du pH 5,0 (correspondant au contrôle), la chute d'activité est rapide et atteint son minimum au pH 3,5 (Figure 4).

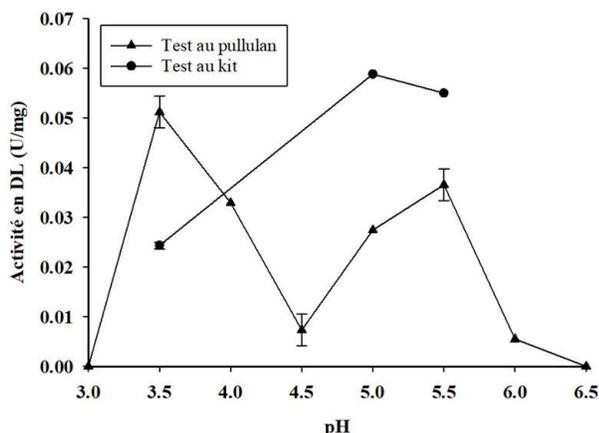


Figure 3 : Activité de la dextrinase limite (DL) en fonction du pH (test au pullulan et au Kit)

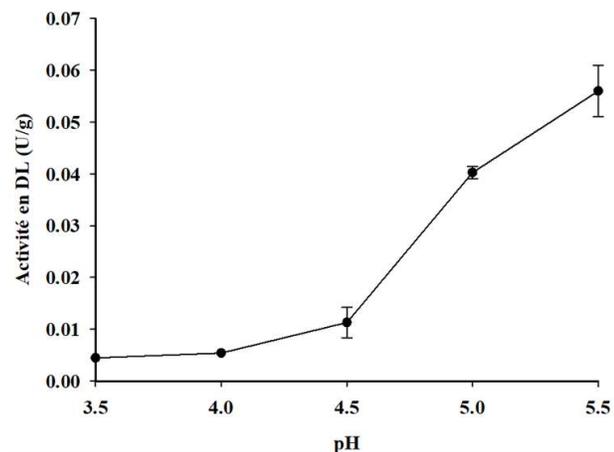


Figure 4 : Stabilité de la dextrinase limite en fonction du pH (40 °C/90 min)

A l’observation de la figure 3, le pic à pH 3,5 serait celui de l’ α -glucosidase dont le pH optimum d’activité dans les malts de sorgho d’après Taylor & Dewar (1994) et Agu & Palmer (1997) est de 3,75. La plage de pH optimum de 5,0 - 5,5 obtenue avec la dextrinase limite du malt de sorgho *Safარი* dénote de la préférence de cette enzyme pour des pH légèrement acides. Ce

comportement est similaire à celui des amylases céréalières en général dont la plage de pH optimale d’activité est de 4,0 - 5,5 (Osman, Coverdale, Cole, Hamilton, & de Jersey, 2002). La chute d’activité (Figure 4) peut s’expliquer soit par la formation de formes ioniques inadaptées de l’enzyme ou du substrat, soit par l’inactivation de l’enzyme ou la combinaison de ces phénomènes (Andrés Illanes *et al.*, 2008; Kotzia *et al.*, 2012; Mohan, Long, & Mutneja, 2013; Singh, Saini, & Kennedy, 2010).

Tableau 3: Activités relatives de la dextrinase limite en fonction du pH

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

3.4 Température optimale d’activité et de stabilité de la dextrinase limite

D’après le test au pullulan (figure 5), l’augmentation d’activité devient très rapide au-delà de 30 °C pour atteindre le pic d’activité (\approx 0,12 U/mg) à 40 °C. Au-delà de 40 °C, l’on observe une chute abrupte de 40 à 45 °C (0,02 U/mg), puis faible de 45 à 50 °C (0,005 U/mg). L’on peut donc faire le constat qu’à 35 et 45 °C on a une perte d’activité respectivement de 55 et 80 % par rapport à 40 °C.

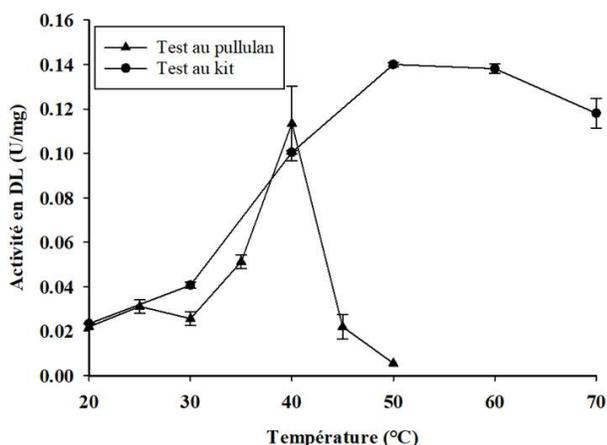


Figure 5 : Activité de la dextrinase limitée en fonction de la température (test au pullulan et au kit megazyme)

D’après cette figure 5, l’activité de la dextrinase limitée (test au kit megazyme) croit avec l’augmentation de la température pour atteindre le maximum ($\approx 0,14$ U/mL) entre 50 et 60 °C ; puis décroît légèrement au-delà de 60 °C pour atteindre environ 0,12 U/mL à 70 °C.

D’après la figure 6, la dextrinase limitée est plus stable aux températures ≤ 55 °C. Toutefois, l’exposition de celle-ci pendant 90 min entraîne près de 80 % de perte d’activité entre 50 et 55 °C par rapport au contrôle (Tableau 4). Ce résultat est similaire à celui de [Stenholm & Home \(1999\)](#) qui ont obtenu une perte d’activité en dextrinase limitée de 70 % après 1 h d’incubation à 55 °C. Au-delà de 55 °C, la perte d’activité continue jusqu’à atteindre les 95 % à 65 °C.

Les vitesses des réactions catalysées par les enzymes croissent avec l’augmentation de la température jusqu’à l’atteinte d’un maximum dit température optimale ([Andrés Illanes *et al.*, 2008](#); [Kotzia *et al.*, 2012](#); [Lewis & Bamforth, 2006](#); [Mohan *et al.*, 2013](#)). Au-delà de cette

température, la vitesse chute généralement drastiquement.

Tableau 4: Activités relatives de la dextrinase limitée en fonction de la température

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

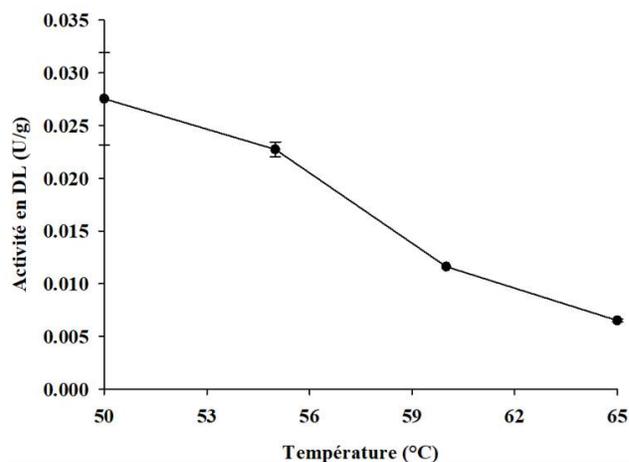


Figure 6: Stabilité de la dextrinase limitée en fonction de la température

Du fait que l’augmentation de l’énergie des molécules due à l’élévation de température, il y aurait une rupture des liaisons qui maintiendrait les enzymes dans leur forme optimale d’activité et progressivement, l’enzyme se dénaturerait ([Andrés Illanes, 2008](#); [Kotzia *et al.*, 2012](#); [Mohan *et al.*, 2013](#)).

La température optimale de 40 °C obtenue ici a également été similaire à celle obtenue par des auteurs ayant travaillé avec le riz (Furegon, Peruffo, & Curioni, 1997).

Les résultats obtenus pour le test au kit (figure 5) sont similaires à ceux de Stenholm & Home (1999) qui ont obtenus l'optimum de 50 °C avec l'orge, et à ceux de Yamasaki *et al.* (2008), qui ont obtenus la valeur optimale de 55 °C avec le riz. Par ailleurs, près de 85 % d'activité est préservée à 70 °C. La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait donc une enzyme thermorésistante.

D'après la figure 6 et en comparaison au résultat de Stenholm & Home (1999) où la perte d'activité était complète après 20 min d'incubation à 60 °C avec l'orge, il pourrait s'en déduire que la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* est plus thermostable. La stabilité de la dextrinase limite à sa température optimale d'activité (50 °C/30 min, Tableau 4) est comparable à celle de la pullulanase 65 - 70 °C/30 min (Nakamura, Sashihara, Nagayama, & Horikoshi, 1989). La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* peut être utilisée comme enzyme industrielle au même titre que les pullulanases.

3.5 Propriétés catalytiques K_M et V_{max}

La constante de Michaelis (K_M) et la vitesse maximale (V_{max}) ont été calculées à l'aide de la représentation graphique de Lineveaver-Burk (Figure 7). Ces valeurs sont de 0,2128 mg.mL⁻¹ et de 0,0033 mg.mL⁻¹.sec⁻¹ respectivement pour K_M et V_{max} .

La valeur de K_M obtenue à la figure 7 est inférieure de celle du riz (Yamasaki *et al.*, 2008), et à celle obtenue par Singh *et al.* (2010) avec la pullulanase de *Aureobasidium pullulans*. Ceci laisserait penser que la dextrinase limite de *Safrari* aurait plus d'affinité pour l'amidon que la pullulanase microbienne. Par ailleurs, le pouvoir

catalytique de la pullulanase serait similaire à celle de la dextrinase limite du sorgho *Safrari* sur l'amidon. En effet, on a pour V_{max} les valeurs de 0,21 et 0,20 U.min⁻¹ respectivement pour la pullulanase (Singh *et al.*, 2010) et pour la dextrinase limite de *Safrari*.

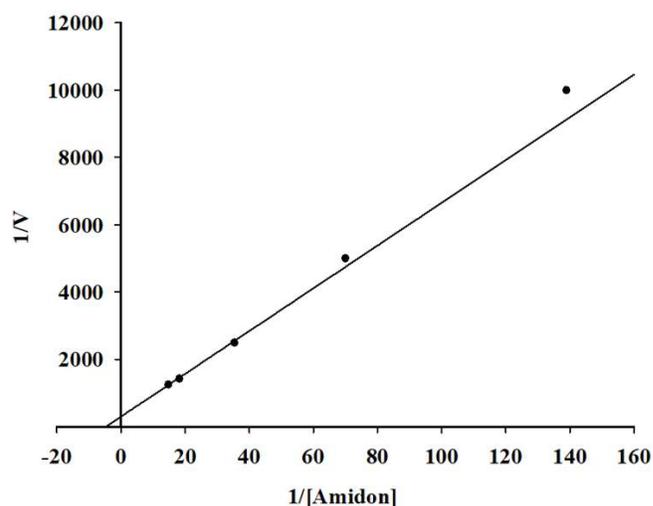


Figure 7: Représentation de Lineveaver-Burk ($1/V = f(1/[Amidon])$) pour la détermination de K_M et V_{max}

3.6 Effets de l'EDTA, le DTT, le CaCl₂, le SAB et l'acide ascorbique sur l'activation de la dextrinase limite

3.6.1 Cas du test au pullulan naturel

L'activité de la dextrinase limite est améliorée uniquement en présence d'agents réducteurs (Figure 8). Ceci de l'ordre de 80 % avec le DTT et de 400 % avec l'acide ascorbique. Tandis qu'elle baisse avec le SAB et le CaCl₂ respectivement de l'ordre de 46 % et 65 %, pour s'annuler presque à 92 % avec l'EDTA.

Le comportement de l'enzyme pendant l'extraction serait différent de celui au cours de la purification (Figure 8). En effet, pendant l'extraction, il y avait plutôt inhibition en présence

de ces composés pour le même test d'activité (Nguemogne *et al.*, 2020). Ceci voudrait signifier que quoique la dextrinase limite n'aie pas besoin d'agents réducteurs pour son extraction (d'après le test au pullulan), ceux-ci sont plutôt indispensables pour l'activation de l'enzyme purifiée, la préférence étant pour l'acide ascorbique. L'accroissement d'activité de la dextrinase limite purifiée en présence d'agents réducteurs à l'instar du DTT a également été observé par Yamasaki *et al.* (2008). L'inhibition en présence d'EDTA ou de CaCl₂ (Figure 8) voudrait signifier que la dextrinase limite aurait besoin pour son activation, de la présence d'ions métalliques qui ne seraient pas les ions calcium car étant inhibiteurs. Cette inhibition en présence de CaCl₂ a également été observée par Morinaga *et al.* (1997). La différence de pourcentage d'inhibition avec celui de Morinaga *et al.* (1997) serait due à la différence de concentration en CaCl₂. L'inhibition en présence d'EDTA a également été observée par Hardie *et al.* (1976).

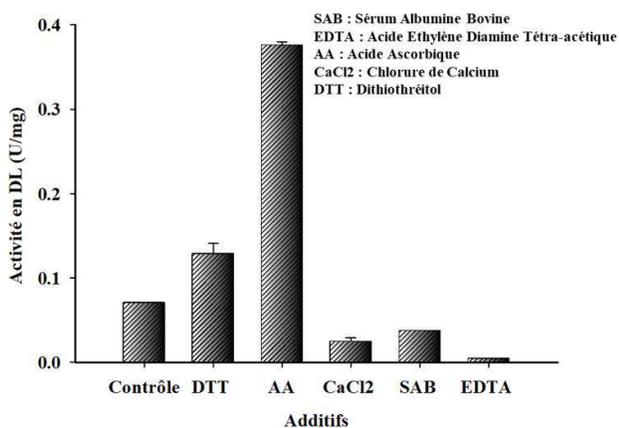


Figure 8: Effet de quelques effecteurs sur l'activité en dextrinase limite (test au pullulan)

3.6.2 Cas du test au kit Megazyme K-Pull G6

Avec le test au kit Megazyme, on observe un accroissement d'activité de la dextrinase limite

quel que soit l'effecteur (Figure 9). Toutefois, l'effet d'activation et/ou de stabilisation dû aux agents réducteurs se confirme. En effet, la méthode du kit Megazyme voudrait que la dextrinase limite soit extraite en présence de DTT. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme extraite dans ces conditions et purifiée est d'avantage améliorée en présence d'acide ascorbique qui est également un agent réducteur. La dextrinase limite du malt de sorgho *Safrari* serait donc une enzyme sulfhydrique et demanderait un environnement réduit pour son extraction, son activation et même sa stabilisation.

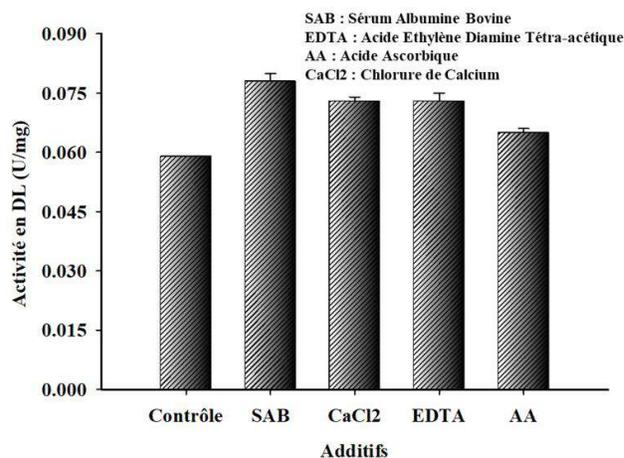


Figure 9: Effet de quelques effecteurs sur l'activité de la dextrinase limite (test au kit K-PullG6)

L'accroissement d'activité de la dextrinase limite observée en présence d'agents réducteurs à l'instar du DTT est en accord avec les travaux de Sissons (1991), MacGregor, Macri, Schroeder, & Bazin (1994), Kristensen *et al.* (1998). Notons que le pic d'activité enzymatique est obtenu en présence de SAB est similaire aux travaux de MacGregor *et al.* (1994) qui, ont montré que l'activité de la dextrinase limite se multiplie par trois en présence de SAB. En outre, l'activité de la dextrinase limite bien qu'améliorée, est la même en présence d'EDTA qu'en présence de

CaCl₂. Ceci voudrait signifier que la dextrinase limite et des inhibiteurs éventuels présents dans le milieu seraient des métalloprotéines, mais la concentration en EDTA ne serait pas assez pour complexer les ions calcium de manière à inhiber la dextrinase limite d’une part, et d’autre part, cette concentration serait assez pour complexer les ions métalliques nécessaires à l’action des inhibiteurs.

3.7 Impact de l’ajout de la dextrinase limite purifiée sur la filtrabilité et la teneur en sucres des brassins de sorgho

Le constat peut être fait de ce que la vitesse de filtration croît avec l’augmentation de la quantité d’extrait en dextrinase limite (Figure 10). Mais pour ce qui est de la teneur en sucres réducteurs les comportements entre le témoin et les moûts ajoutés de dextrinase limite sont différents (Tableau 5). Il résulte en effet une différence statistiquement significative de la teneur en sucres réducteurs entre le moût témoin et ceux ajoutés d’extrait de dextrinase limite (Tableau 5).

Tableau 5 : Test des étendues multiples pour sucres réducteurs par moût

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

La différence statistique observée au tableau 5 pourrait s’expliquer par le fait de la présence à la fois de la dextrinase limite et d’autres enzymes saccharifiantes endogènes au brassin témoin, ayant atteint leur maximum d’activité. Par ailleurs,

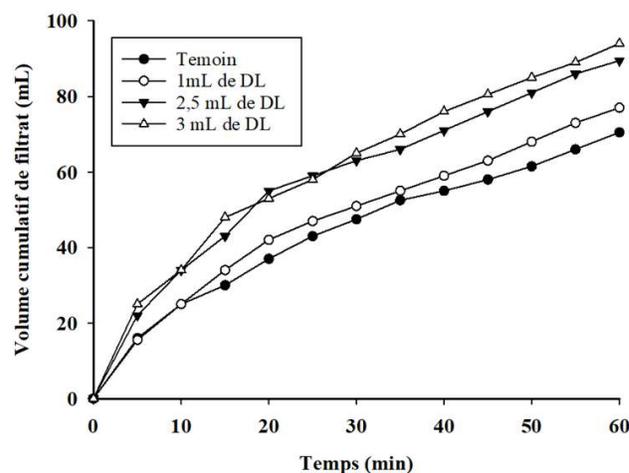


Figure 10: Volumes cumulatifs de filtrats des brassins en fonction du temps de filtration (DL mis pour dextrinase limite)

le substrat de la dextrinase limite dans ces conditions n’est plus le pullulan, mais plutôt les dextrines ramifiées dont l’hydrolyse donne les dextrines linéaires (Macgregor, 1996), d’où son action liquéfiant. L’absence de différence statistiquement significative en sucres réducteurs pour les moûts ajoutés de dextrinase limite partiellement purifiée témoigne de l’action majoritaire de cette enzyme (exogène) dans la fluidification desdits brassins. Comme conséquence directe, l’on a une meilleure filtrabilité de ces moûts par rapport au brassin témoin (Figure 10). Par ailleurs, les dextrines linéaires obtenues après activité de la dextrinase limite sont des substrats à l’action d’autres enzymes amylolytiques; enzymes dont l’action saccharifiante entrainerait nécessairement l’augmentation de la teneur en sucres réducteurs. Mais il n’en est rien pour les moûts ajoutés de dextrinase limite partiellement purifiée (Tableau 5) ; ce qui justifierait l’action majoritaire de cette enzyme dans la liquéfaction du milieu. Ceci met à nouveau à l’évidence que l’optimisation partant

du maltage jusqu'à la purification, en passant par l'extraction aurait permis d'obtenir un extrait enrichi en dextrinase limite et appauvri en d'autres enzymes amylolytiques.

4. Conclusion

L'objectif de ce travail était de purifier de manière partielle la dextrinase limite du malt de sorgho *Safrazi*, purification faite par maximisation de la précipitation au sulfate d'ammonium suivie de la dialyse. La disparité observée dans les caractéristiques de la dextrinase limite en fonction du test d'activité appliqué a permis de dire que le procédé de purification appliqué a conduit à un extrait en dextrinase limite partiellement purifié pouvant renfermer des traces éventuelles d'autres enzymes amylolytiques. Comme corollaire à cela, la méthode de test d'activité de la dextrinase limite basée sur la mesure du pouvoir réducteur n'était pas adaptée en raison de la possible augmentation de ce pouvoir par l'action de l' α -glucosidase (éventuellement) sur le maltotriose (pour donner d'autres sucres réducteurs), produit de l'hydrolyse du pullulan par la dextrinase limite. Les caractéristiques spécifiques à la dextrinase limite retenues ont donc été celles obtenues avec le kit enzymatique K-PullG6. L'activité enzymatique a été rehaussée en présence d'agents réducteurs (dithiothréitol, acide ascorbique), de sérum albumine bovine et aussi de chlorure de calcium. Par ailleurs, l'application de l'extrait en dextrinase limite à des brassins de sorgho a permis d'améliorer leur filtrabilité, classifiant la dextrinase limite comme enzyme liquéfiant. Ce pouvoir liquéfiant a été également évalué sur l'amidon afin de déterminer les paramètres cinétiques de la dextrinase limite.

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement le Département de Génie des Procédés de l'École

Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI), Université de Ngaoundéré (Cameroun), les laboratoires LAGETA et LBP de l'ENSAI et l'IUT respectivement ainsi que, l'université de Ngaoundéré pour avoir fourni les installations nécessaires à la réussite de ces travaux de recherche.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont pas de conflits d'intérêt.

Éthique

Cette étude n'est pas faite sur des hommes ou des animaux.

Références

- Agu, R. C., & Palmer, G. H. (1997). α -Glucosidase activity of sorghum and barley malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(1), 25-29. <https://doi.org/10.1002/j.2050-416.1997.tb00933.x>
- Barros, R. M., Ferreira, C. A., Silva, S. v., & Malcata, F. X. (2001). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9), 541-547. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00431-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00431-8)
- Desobgo, Z. S. C., Nso, E. J., & Tenin, D. (2011). Optimisation of the Action of Commercial Mashing Enzymes on Wort Extracts and Free Amino Nitrogen of the Safrazi Sorghum Cultivar. *Technical Quarterly*, 48(3), 77-86. <https://doi.org/10.1094/tq-48-3-0829-01>
- Dewar, J., Orován, E., & Taylor, J. R. N. (1997). Effect of alkaline steeping on water uptake and malt quality in sorghum. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(5), 283-285. <https://doi.org/10.1002/j.2050-416.1997.tb00957.x>
- Dicko, M. H. (2006). *Travaux pratiques de biochimie structurale et d'enzymologie*. Wageningen: Bepress.
- Dunn, G., Hardie, D. G., & Manners, D. J. (1973). Observations on the action of limit dextrinases on

- amylopectin like polysaccharides. *Biochemical Journal*, 133(2), 413–416.
<https://doi.org/10.1042/bj1330413>
- El Nour, M. E. M., & Yagoub, S. O. (2010). Partial purification and characterization of α and β -amylases isolated from sorghum bicolor cv. (feterita) malt. *Journal of Applied Sciences*, 10(13), 1314–1319.
<https://doi.org/10.3923/jas.2010.1314.1319>
- Emenike, O. B., Chibuzo, C. F., & Sabinus, O. O. E. (2015). Characterization of Partially Purified α -amylase from Germinating African Breadfruit (*Treculia africana*) Seeds. *International Journal of Primatology and Medical Science*, 5(1), 15–21.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ijpms.2015.5.1.1111>
- Fiechter, A. (1983). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin, Germany: Heidelberg : Springer Verlag.
- Fischer, E., & Stein, E. A. (1961). DNS Colorimetric Determination of Available Carbohydrates in Foods. *Biochemical Preparation*, 30–37.
- Furegon, L., Peruffo, A. D. B., & Curioni, A. (1997). Immobilization of rice limit dextranase on γ -alumina beads and its possible use in starch processing. *Process Biochemistry*, 32(2), 113–120.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00054-4)
- GE-Healthcare. (2010). *Strategies for Protein Purification Handbook*. Uppsala, Sweden: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Hardie, D. G., Manners, D. J., & Yellowlees, D. (1976). The limit dextrinase from malted sorghum (*sorghum vulgare*). *Carbohydrate Research*, 50(1), 75–85.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84084-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84084-7)
- Illanes, Andrés. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. (Andrés Illanes,Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Illanes, Andrés, Altamirano, C., & Wilson, L. (2008). Homogeneous enzyme kinetics. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications* (pp. 107–153). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7_3
- Khattak, W. A., Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., & Park, J. K. (2015). Endogenous hydrolyzing enzymes: Isolation, characterization, and applications in biological processes. In K. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (pp. 535–579). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_55
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. (2012). Biocatalysis, Enzyme Engineering and Biotechnology. In B. K. Simpson, L. M. L. Nollet, F. Toldrá, S. Benjakul, G. Paliyath, & Y. H. Hui (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing* (pp. 125–166). John Wiley & Sons, Inc.
- Kristensen, M., Planchot, V., Abe, J. I., & Svensson, B. (1998). Large-scale purification and characterization of barley limit dextrinase, a member of the α -amylase structural family. *Cereal Chemistry*, 75(4), 473–479.
<https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.4.473>
- Labrou, N. E. (2014). Protein purification: An overview. In N. E. Labrou (Ed.), *Methods in molecular biology: Protein downstream processing: design, development and application of high and low resolution methods* (Vol. 1129, pp. 3–10). Humana Press Inc.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1
- Lewis, M., & Bamforth, C. W. (2006). *Essays in brewing science*. New York: Springer.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Macgregor, A. W. (1996). Malting and brewing science: Challenges and opportunities. *Journal of the Institute of Brewing*, 102(2), 97–102.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-416.1996.tb00900.x>
- MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., & Bazin, S. L. (1994). Limit dextrinase from malted barley : extraction, purification, and characterization. *Cereal Chemistry*, 71(6), 610–617.
- Megazyme. (2016). Assay procedure (PullG6 Method) for the measurement of microbial pullulanase and malt limit-dextrinase.
- Mohan, C., Long, K. D., & Mutneja, M. (2013). *An Introduction to Inhibitors and Their Biological*

- Applications* (1st ed.). Darmstadt, Germany: EMD Millipore Corporation, Billerica MA.
- Morinaga, K., Honda, E., Morohashi, Y., & Matsushima, H. (1997). Pullulanase in mung bean cotyledons. Purification, some properties and developmental pattern during and following germination. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 519-525.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01032.x>
- Nakamura, N., Sashihara, N., Nagayama, H., & Horikoshi, K. (1989). Characterization of Pullulanase and α -Amylase Activities of a *Thermus* sp. AMD33. *Starch - Stärke*, 41(3), 112-117.
<https://doi.org/10.1002/star.19890410310>
- Nguemogne, A. C., Desobgo, Z. S. C., & Nso, J. E. (2020). Optimisation de l'Extraction de la Dextrinase Limite de la Variété de Sorgho Camerounais Safrari Funding source. *Journal of Food Stability*, 3(2), 9-26.
<https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.3.2.2020-0016>
- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., & de Jersey, J. (2002). Characterization and Assessment of the Role of Barley Malt Endoproteases During Malting and Mashing1. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(1), 62-67.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-416.2002.tb00125.x>
- Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. (2010). Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 401-407.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.040>
- Sissons M. J. (1991). *Studies of barley limit dextrinase*. Doctor of Philosophy thesis. University of Adelaide. Glen Osmond, South Australia. 1-270 pp.
- Stenholm, K., & Home, S. (1999). A new approach to limit dextrinase and its role in mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(4), 205-210.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-416.1999.tb00020.x>
- Taylor, A. I., & Leach, R. M. (1995). Enzymes in the food industry. In G. A. Tucker & L. F. J. Woods (Eds.), *Enzymes in Food Processing* (2nd ed., pp. 26-40). Dordrecht: Springer Science+Business Media.
- Taylor, J. R. N., & Dewar, J. (1994). Role of alpha-glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mashes. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(6), 417-419.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-416.1994.tb00840.x>
- Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., & Wong, D. W. S. (2002). Limit Dextrinase, 766-775.
<https://doi.org/10.1201/9780203910450-62>
- Yamasaki, Y., Nakashima, S., & Konno, H. (2008). Pullulanase from rice endosperm. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), 507-510.
- Yellowlees, D. (1980). Purification and characterisation of limit dextrinase from *Pisum sativum* L. *Carbohydrate Research*, 83(1), 109-118.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85370-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85370-7)

Cite this paper as: Nguemogne, A.C., Desobgo, Z.S.C. & Nso, E.J. (2023). Purification partielle et caractérisation de la dextrinase limite du malt de sorgho Safrari. *Journal of Food Stability*, 6 (2), 34-50.
[DOI: 10.36400/J.Food.Stab.6.2.2023-001](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.6.2.2023-001)