



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par *L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)*
Discipline ou spécialité : *Ingénieries Microbienne et Enzymatique*

Titre de la thèse :

*Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de Bacillus
Production sur milieu solide et caractérisation*

Doctorant : *Sameh MAKTOUF*

Date de soutenance : *18/02/13*

JURY

Youssef Tallel Gargouri (Pr)

Said JABBOURI (Pr)

Farid LIMAM(Pr)

Claire Moulis (MC)

Mamdouh Ben Ali(MC)

Magali Remaud Siméon (Pr)

Semia Ellouz Chaabouni(Pr)

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire d'ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés

Directeur(s) de Thèse :

Magali Remaud –Siméon et Semia Ellouz Chaabouni

DEDICACES

A

Mes très chers parents.

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices.

Sans vous, cette thèse n'aurait jamais pu avoir lieu.

A

Mon mari , toute ma famille et tous mes proches. Merci d'être toujours à mes cotés.

A

Mon petit bout de chou Mahdi.

Ma merveille, t'es ma plus grande réussite et ma plus grande fierté. J'espère qu'un jour tu liras ce mémoire et que tu sauras que tu es la plus belle chose qui me soit arrivée. Que dieu te protège.

Sameh Maktouf

DEDICACE A MES CHERES ENZYMES !!

Quelques mots alliant poésie et biologie pour décrire mes années de labeur

Bacillus, lichenase, amylase, voici mes compagnons de tous les jours.

Entre la France et la Tunisie, nous étions partagés, ensemble les difficultés on a pu les surmonter. 6 mois par ci, 6 mois par là ; c'était dur mais au fil du temps vous étiez de plus en plus pures.

Nous allions ensemble à la banque retirer vos séquences, les déposer sur l'ordi pour analyser vos ressemblances.

Thermostabilité était l'une de vos principales qualités, je l'avoue, je l'ai fortement exploitée. Mais je sais que vous saurez me pardonner, et pour cela le millet m'a fortement aidé.

Avec un bon pain diététique, vous serez certainement satisfaits, et Je vous ai dédié quelques articles publiés pour honorer notre amitié.

REMERCIEMENTS

Au cours des années passées à préparer ma thèse, j'ai eu la possibilité de vivre une expérience extrêmement enrichissante au niveau personnel et professionnel. Ceci, je le dois notamment aux nombreuses personnes qui m'ont entourée, encouragée et soutenue tout au long de cette épreuve, et pour lesquelles je tiens à exprimer toute ma gratitude.

À Semia Ellouz Chaabouni et Magali Remaud Siméon, mes deux directrices de thèse, qui m'ont permis de prendre part à cette collaboration et qui m'ont guidé tout au long de cette aventure. Merci de votre confiance, patience, soutien, pour tous ces échanges oh combien enrichissants, et pour avoir partagé votre passion avec moi. Merci aussi pour les coups de gueules qui, loin de me décourager, m'ont redonné confiance et m'ont permis de mener à terme ce travail.

Un grand merci à Claire Moulis, t'as été pour moi un vrai soutien durant cette thèse, t'as toujours su me redonner confiance, me booster et m'encourager. J'ai pu apprécier ta rigueur scientifique, ta gentillesse et ta sympathie. Nul remerciement ne serait suffisant pour t'exprimer ma gratitude, mon amitié et mon profond respect.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Monsieur Moncef Chaabouni, Madame Raoudha Ellouz Ghorbel, madame Amel Kamoun et Monsieur Nabil Miled pour toute l'aide que vous m'avez apportée, les discussions fructueuses qu'on a eues, et votre grande gentillesse.

J'ai été sensible à l'honneur que m'ont fait Professeur Said Jabbouri et Professeur Farid Limam en acceptant d'être les rapporteurs de ma thèse. Je les remercie pour leurs pertinentes critiques.

Mes remerciements vont également à monsieur Mamdouh Ben Ali pour avoir accepté de se joindre à mon jury de thèse.

C'est un grand honneur pour moi de voir siéger dans mon jury de thèse Professeur Youssef Tallel Gargouri. Je le remercie d'avoir accepté de présider ce jury.

J'adresse mes remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes et laboratoires au cours de ma thèse. J'ai apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun de vous. Je voudrais ici exprimer ma gratitude à toutes et à tous. A défaut de pouvoir adresser un mot à chacun, je remercie les membres de l'équipe «Catalyse et Ingénierie Moléculaire enzymatiques» : Sandra, Juliette, Elisabeth, Romain Cedric, Faten, Sophie, Sandrine etc., et les membres de l'équipe «Unité Enzymes et Bioconversion» Mohamed, Fatma (C+B²+K), Monia, Simsim, Dorra, Nadhem, Ali, Anissa, Rafik, Imen

Mes remerciements vont également aux différents stagiaires que j'ai eu au cours de cette thèse et qui m'ont prêté main forte au cours de ce travail : Mariem, Donies, Hejer, Salma, Olfa et je cite tout particulièrement mademoiselle Hanene Chaabane, j'ai pu apprécier en toi une rigueur scientifique remarquable, une patience extraordinaire et une bonne humeur continue. Je te souhaite une bonne continuation. Tu iras loin ...

Ma chère Lobna, Merci d'être toujours là. Merci d'être Lobloba une amie sincère, dévouée, soucieuse des autres. Surtout, reste comme tu es. Très bonne continuation.

Enfin à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ce travail ou été présentes lors de la thèse, je vous remercie du fond du cœur.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles internationaux

Sameh Maktouf, Raoudha Ellouz-Ghorbel, Hejer Hajji, Claire Moulis, Magali Remaud-Simeon and Semia Ellouz Châabouni. Chemical and functional characterization of Millet Flour: Effect on wheat dough properties and bread quality. *Submitted to journal of carbohydrates polymers*.

Sameh Maktouf, Claire Moulis, Amel Kamoun, Fatma Chaari, Semia Ellouz Chaabouni and Magali Remaud-Simeon . A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under Solid state fermentation on crude millet. *Industrial Crops and Products*; 43 (2013) 349– 354

Sameh Maktouf, Amel Kamoun, Claire Moulis, Magali Remaud-Simeon Dhouha Ghribi, And Semia Ellouz Châabouni. A raw starch digesting α -amylase from *Bacillus sp.*: Production under Solid state fermentation on crude millet and Biochemical characterization. *Accepted in journal of Microbiology and Biotechnology*

Sameh Maktouf, Claire Moulis, Nabil Miled, Semia Ellouz Chaabouni and Magali Remaud-Simeon. A highly thermostable lichenase from *Bacillus sp* UEB-S: Biochemical and molecular characterization. *Submitted to Bioresource Technology*.

Brevet

Sameh Maktouf, Raoudha Ellouze Ghorbel, Hajer Hajji, Claire Moulis, Magali Remaud-Siméon et Semia Ellouze Chaabouni Formulation d'une farine Diététique Millet-Blé et application dans la panification Brevet d'invention TN2011/0602.

Autres publications

Fatma Chaari, Fatma Bhiri, Monia Blibech, **Sameh Maktouf**, Semia Ellouz-Chaabouni, Raoudha Ellouz-Ghorbel (2012) Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, Volume 47, Issue 3, Pages 509-516

Dhouha Ghribi, Lobna Abdelkefi-Mesrati, Ines Mnif, Radhouan Kammoun, Imen Ayadi, Imen Saadaoui, **Sameh Maktouf** and Semia Chaabouni-Ellouze.(2012).Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation.*Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2012/373682

Fatma Chaari, Monia Blibech, Fatma Bhiri, **Sameh Maktouf**, Raoudha Ellouz-Ghorbel & Semia Ellouz-Chaabouni. Production of Mixed-Linkage Beta-Oligosaccharides from Lichenan Using Immobilized *Bacillus licheniformis* UEB CF Lichenase; *Appl Biochem Biotechnol* DOI 10.1007/s12010-012-9804-7.

Raoudha Ellouz Ghorbel, **Sameh Maktouf**, Ezedine Ben Massoud, Samir Bejar and Semia Ellouz Chaabouni.(2008) New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 1, 50-60.

Blibech M., **Maktouf S.**, Chaari F, Neifar M., Zouari S., Besbes S., Ghorbel R.E. Galactomannan extracted from Tunisian carob seeds: characterization and application as bread improver. *Accepted in Journal of Food Science and Technology* (2012).

Sameh Maktouf, Raoudha Ellouz-Ghorbel, Amel Kamoun and Semia Ellouz Châabouni. An optimal Breadmaking formulation based on barley flour enrichment : A response surface methodology study *Submitted to journal of food engeneering*.

Sameh Maktouf , Dhouha Ghribi, Meriam ben kridis, Donies Frikha , and Semia Ellouz Châabouni Improvement of *Bacillus* sp UEB-S Amylase production: Optimization of MediumComposition and Adequate Control of Aeration. *Submitted to journal of Microbiology and Biotechnology*.

Sameh Maktouf, Salma Jallouli Drira, Semia Baklouti, Manel fendri and Semia Ellouz Châabouni. Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Submitted to journal of Bioproducts and Food processing*.

Brevet:

Chaari F., Ellouze Ghorbel R., Bhiri F., Blibech M., **Maktouf S** et Ellouze Chaabouni S. Une nouvelle enzyme β 1-3: β 1-4 glucanase de *Bacillus subtilis* CF1 active dans une large gamme de pH potentiellement utilisée en panification. Brevet d'invention N°TN0078.

Communications par affiches

(1) **Sameh maktouf**, Raoudha Ghorbel et Semia Ellouz Chaabouni. Communication par affiche dans International Symposium on Biotechnology du 4 au 8 Mai 2008. Thème: Microbial and environmental Biotechnology. Purification and characterization of an amylase activity from a newly isolated strain of *Bacillus* SBG.

(2)**Sameh Maktouf**, Raoudha Ellouz Ghorbel, Amel Kamoun, Claire Moulis, Magali Remaud Siméon et Sémia Ellouz Chaabouni ; Communication par affiche dans les Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2010) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech) du 19 au 22 Décembre 2010, Thème Biotechnologie Microbienne et Enzymatique et Bioprocédés. Millet Flour: a Solid substrate for enzyme production and a Bread improver.

Communications orales:

Sameh Maktouf , Claire Moulis , Amel Kamoun, Semia Ellouz Chaabouni and Magali Remaud-Simeon .Biochemical and molecular characterization of a highly thermostable lichenase from *Bacillus* sp UEB-S 23 ème congrès de l'ATSB du 21 au 24 mars 2012 à Hammamet

Une réponse, c'est forcément le chemin
qu'on a déjà parcouru. Seules les questions
peuvent montrer le chemin qu'il reste à faire.

Jostein Gaarder

NOM: MAKTOUF PRENOM: SAMEH

TITRE : ACTIVITES AMYLASE ET LICHENASE D'UNE NOUVELLE SOUCHE DE
BACILLUS : PRODUCTION SUR MILIEU SOLIDE ET CARACTERISATION
DOCTORAT

SPÉCIALITÉ: INGENIERIES MICROBIENNE ET ENZYMATIQUE

ANNÉE: 2013 LIEU: INSA TOULOUSE

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse était d'isoler de nouvelles glycoside-hydrolases à partir d'une souche de *Bacillus* issue d'un Biotope sud-tunisien. Cette souche a montré des potentialités à produire une amylase et une lichenase à 45°C et à pH 9. La production de ces deux hydrolases a été optimisée en fermentation solide sur millet, une agro-ressource de faible coût. Cette optimisation a été conduite en adoptant la méthodologie des plans d'expériences. Nous avons ainsi obtenu des niveaux de production de l'ordre de 680 Unités d'activités amylase par gramme de substrat solide et 503 U/g d'activité lichenase. Ces deux protéines ont été par la suite purifiées et caractérisées biochimiquement. L'amylase présente un pH et une température d'activité optimaux de 5 et 70°C, respectivement. La lichenase a montré une thermoactivité et une thermostabilité remarquables qui la distinguent des lichenases précédemment décrites. En effet, l'enzyme conserve plus de 20% de son activité à 100°C, et plus de 60% de son activité après une incubation de 30 min à 90°C. Le gène codant pour cette protéine a été isolé par la construction d'une banque fosmidique dans *E. coli*. La comparaison de sa séquence avec la banque de données NCBI a montré que le gène de la lichenase UEB-S possède une très forte homologie avec celle de *Bacillus subtilis* 168, avec les positions de deux acides aminés seulement qui divergent. Un modèle de la lichenase construit au cours de cette étude laisse supposer que l'un de ces deux acides aminés (Val 69) pourrait être impliqué dans sa thermostabilité, et ce en modifiant la géométrie du site de fixation au calcium.

Mots clés : Lichenase ; amylase ; *Bacillus*, thermostabilité, millet, caractérisation, fermentation solide

NOM: MAKTOUF PRENOM: SAMEH

TITRE : AMYLASE AND LICHENASE ACTIVITIES FROM A NEW STRAIN OF BACILLUS: PRODUCTION IN SOLID MEDIUM AND CHARACTERIZATION DOCTORAT

SPÉCIALITÉ: INGENIERIES MICROBIENNE ET ENZYMATIQUE

ANNÉE: 2013 LIEU: INSA TOULOUSE

ABSTRACT :

The aim of this thesis was to isolate new glycoside hydrolases from a *Bacillus* strain isolated from a Biotope in the south of Tunisia. This strain was able to produce a lichenase and an amylase at 45 ° C and pH 9. The production of these two hydrolases was optimized in solid state fermentation using millet, a low cost. agro-resource as solid substrate. This optimization was carried out using response surface methodology (RSM) based on Doehlert design. We obtained production levels of around 540 units of amylase activity per gram of solid substrate and 503 U / g of lichenase activity. Both proteins were subsequently purified and characterized biochemically. The amylase has a pH and a temperature optimum of activity of 5 and 70 ° C, respectively. The lichenase showed a remarkable thermostability which distinguishes it from described lichenases. Indeed, the enzyme retained more than 20% of its activity at 100 ° C, and more than 60% of its activity after incubation for 30 min at 90 ° C. The gene encoding this protein was isolated by the construction of a genomic library in *E. coli*. Comparison of its sequence with the NCBI database showed that the gene coding for UEB-S lichenase has a very high homology with that of *Bacillus subtilis* 168, with a difference in the position of only two amino acids. A model for UEB-S lichenase built during this study suggests that one of these two amino acids (Val 69) could be involved in its thermostability probably by changing the geometry of the calcium binding site.

Keywords : Lichenase ; amylase ; *Bacillus*, thermostability, millet , characterization , Solid state fermentation

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIÈRE PARTIE: LES GLYCOSIDE HYDROLASES	4
1. GENERALITES	4
2. MODES D'ACTION ET MECANISME CATALYTIQUE DES GHS	6
2.1 MODES D'ACTION	6
2.2 MECANISMES D'ACTION CATALYTIQUE	7
2.2.1 MÉCANISME D'INVERSION.....	7
2.2.2 MÉCANISME DE RÉTENTION:	8
3. PRODUCTION DES GLUCOSIDE HYDROLASES	9
DEUXIEME PARTIE : L'ACTIVITÉ LICHENASE	12
1. LE LICHENANE	12
2. DONNEES STRUCTURALES ET MECANISTIQUES SUR LES LICHENASES	13
2.1. LA FAMILLE GH12.....	13
2.1.1. MODE D'ACTION	13
2.1.2. LES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE LA FAMILLE.....	13
2.1.3. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE	14
2.2. LA FAMILLE GH16.....	14
2.2.1. STRUCTURE TRI-DIMENSIONNELLE	14
3. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES LICHENASES	18
NB : POUR TOUTES LES SOUCHES CITEES DANS LE TABLEAU 3, ET POUR TOUS LES PARAMETRES DETERMINEES, LE SUBSTRAT UTILISE EST LE LICHENAN DE <i>CETRARIA ISLANDICA</i>	19
4. APPLICATIONS DES LICHENASES	20
4.1 ALIMENTATION ANIMALE	20
4.2 BRASSERIE	20
4.3 PRODUCTION DE BIOCARBURANTS.....	20
4.4 PRÉPARATION DE PROTOPLASTES	21
TROISIEME PARTIE: LES ACTIVITÉSAMYLOLYTIQUES	23
1. L'AMIDON.....	23
2. DONNEES STRUCTURALES ET MECANISTIQUES DES ENZYMES DE DEGRADATION DE L'AMIDON	24

2.1	LA FAMILLE GH13.....	24
2.1.1	SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT ET DE PRODUIT	25
2.1.2	LES DIFFÉRENTS TYPES D'ACTIVITÉS AMYLOLYTIQUES	25
2.1.3	STRUCTURE ET MÉCANISME	27
2.2	LA FAMILLE GH57	30
2.2.1	MODE D'ACTION	30
2.2.2	LES DIFFERENTES ACTIVITÉS	31
2.2.3	STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE	31
2.3	LA FAMILLE GH119	32
2.4	LA FAMILLE GH31	33
2.4.1	MODE D'ACTION	33
2.4.2	LES DIFFERENTES ACTIVITÉS	34
2.4.3	STRUCTURE	35
2.5	LA FAMILLE GH14	37
2.5.1	MODE D'ACTION	37
2.5.2	STRUCTURE	37
2.6	LA FAMILLE GH15	38
2.6.1	MECANISME.....	38
2.6.2	STRUCTURE	38
3.	LES ACTIVITES AMYLOLYTIQUES DU GENRE <i>BACILLUS</i>	39
3.1	INTERET DE LA PRODUCTION CHEZ <i>BACILLUS</i>	39
3.2	REGULATION DE LA PRODUCTION DES AMYLASES	40
3.2.1	RÉPRESSION CATABOLIQUE.....	40
3.2.2	RÉGULATION TEMPORELLE	40
3.3	MÉTHODE DE PRODUCTION.....	41
4.	APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES ACTIVITES AMYLOLYTIQUES	43
4.1	LIQUEFACTION DE L'AMIDON ET LA SACCHARIFICATION	43
4.2	PAIN ET INDUSTRIE DE LA BOULANGERIE	43
4.3	DÉSENCOLLAGE DES TEXTILES	44
4.4	PRODUCTION DE BIOCARBURANT.....	44
4.5	LA DETERGENCE	45

MATERIELS ET METHODES

1.	CARACTERISATION CHIMIQUE DU MILLET.....	60
1.1.	DETERMINATION DU TAUX D'HUMIDITE	60
1.2.	DETERMINATION DU TAUX DE CENDRES.....	60
1.3.	DETERMINATION DE LA COMPOSITION MINERALE	60
1.4.	DOSAGE DES PROTEINES TOTALES.....	60

1.5.	DOSAGE DE LA MATIERE GRASSE LIBRE	60
1.6.	ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA MATIERE GRASSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	60
1.7.	DETERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON	61
1.8.	DETERMINATION DE LA TENEUR EN CELLULOSE.....	61
2.	ETUDE DES PROPRIETES TECHNOFUNCTIONNELLES DU MILLET.....	61
2.1.	POUVOIR DE RETENTION D'EAU.....	61
2.2.	POUVOIR DE RETENTION D'HUILE (PRH)	62
2.3.	PROPRIETES RHEOLOGIQUES: ALVEOGRAPHE CHOPIN	62
2.4.	CARACTERISTIQUES THERMO-MECANQUES : MIXOLAB	62
2.5.	ESSAI DE PANIFICATION ET MESURE DU VOLUME	63
3.	CULTURES DE MICROORGANISMES	64
3.1.	SOUCHES.....	64
3.2.	CONDITIONS DE CULTURES.....	64
3.3.	CONSERVATION DES SOUCHES	64
4.	METHODES BIOCHIMIQUES	64
4.1.	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PROTEINES PURIFIEES	64
4.1.1.	DOSAGE DE L'ACTIVITE LICHENASE.....	64
4.1.2.	DOSAGE DE L'ACTIVITE AMYLASE	65
4.1.3.	DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE	65
4.1.4.	DETERMINATION DU PH OPTIMUM	65
4.1.5.	EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA STABILITE	65
4.1.6.	EFFET DU PH SUR LA STABILITE	65
5.	METHODES ANALYTIQUES	66
5.1.	TURBIDIMETRIE	66
5.2.	DOSAGE DES PROTEINES.....	66
5.3.	HPAEC-PAD (CHROMATOGRAPHIE HAUTE PERFORMANCE D'ECHANGE D'IONS COUPLEE A UNE DETECTION AMPEROMETRIQUE PULSEE).....	66
5.4.	ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.....	66
6.	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	67
6.1.	CONSTRUCTION D'UNE BANQUE FOSMIDIQUE.....	67
6.2.	CRIBLAGE FONCTIONNEL HAUT DEBIT	67
6.3.	EXTRACTION DE L'ADN FOSMIDIQUE.....	68
6.4.	SEQUENÇAGE DE L'ADN GENOMIQUE CONTENU DANS LES CLONES CANDIDATS	68
6.5.	TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE DES SEQUENCES	68

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET APPLICATIONS POTENTIELLES D'UNE AGRO-RESSOURCE

ARTICLE 1: CHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MILLET FLOUR: EFFECT ON WHEAT DOUGH PROPERTIES AND BREAD QUALITY

INTRODUCTION	72
1. SUMMARY	73
2. INTRODUCTION	73
3. MATERIALS AND METHODS.....	74
3.1. RAW MATERIAL	74
3.2. WHEAT FLOUR.....	74
3.3. CHEMICAL COMPOSITION	74
3.4. MINERAL CONTENT	74
3.5. FATTY ACIDS ANALYSIS	74
3.6. STARCH ISOLATION AND AMYLOSE CONTENT	75
3.7. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.....	75
3.8. ¹³ C NMR SPECTRA	75
3.9. FUNCTIONAL PROPERTIES.....	75
3.10. BULK DENSITY:	76
3.11. DETERMINATION OF RHEOLOGICAL BEHAVIOR USING MIXOLAB	76
3.12. DOUGH RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS (ALVEOGRAPH TEST).....	77
3.13. BREAD-MAKING.....	77
3.14. TEXTURAL PROPERTIES OF BREAD	77
3.15. STATISTICAL ANALYSIS	78
4. RESULTS AND DISCUSSION	78
4.2. CHEMICAL COMPOSITION	78
4.3. ¹³ C NMR SPECTRA	79
4.4. FUNCTIONAL PROPERTIES	80
4.4.1. WATER AND OIL ABSORPTION CAPACITIES	80
4.4.2. FOAMING AND EMULSION CAPACITIES	80
4.4.3. BULK DENSITY	80
4.5. THERMOMECHANICAL BEHAVIOR OF WHEAT AND COMPOSITE DOUGH	80
4.6. RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMPOSITE DOUGH AND BREAD QUALITY	81
4.7. TEXTURAL PROPERTIES	83
5. CONCLUSION	83
6. ACKNOWLEDGMENTS	84
7. REFERENCES	84

PARTIE 2 : IDENTIFICATION D'ACTIVITES ENZYMATIQUES D'INTERET DANS UNE NOUVELLE SOUCHE DE *BACILLUS* SP., ET OPTIMISATION DE LEUR PRODUCTION SOUS SSF

ARTICLE 2: A LAUNDRY DETERGENT COMPATIBLE LICHENASE: STATISTICAL OPTIMIZATION FOR PRODUCTION UNDER SOLID STATE FERMENTATION ON CRUDE MILLET

INTRODUCTION	89
1. SUMMARY	90
2. INTRODUCTION	90
3. MATERIELS AND METHODS	91
3.1. STRAIN	91
3.2. SOLID SUBSTRATE	91
3.3. EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS	91
3.4. LICHENASE PRODUCTION FROM <i>BACILLUS</i> UEB-S BY SOLID-STATE FERMENTATION (SSF)	94
3.5. ENZYME ASSAYS	94
3.6. EFFECT OF DETERGENT ADDITIVES ON LICHENASE ACTIVITY	94
3.7. COMPATIBILITY WITH LAUNDRY DETERGENT	94
4. RESULTS AND DISCUSSION	95
4.1. LICHENASE PRODUCTION FROM <i>BACILLUS</i> UEB-S	95
4.2. EFFECT OF OXIDANTS, DENATURING AGENTS AND BLEACHES AGENTS	98
4.3. DETERGENT COMPATIBILITY	99
5. CONCLUSION	99
6. ACKNOWLEDGMENTS	99
7. REFERENCES	99

ARTICLE 3: A NEW RAW STARCH DIGESTING ALPHA AMYLASE PRODUCTION UNDER SOLID STATE FERMENTATION ON CRUDE MILLET AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

1. SUMMARY	102
2. INTRODUCTION	102
3. MATERIAL AND METHODS	103
3.1. STRAIN	103
3.2. SOLID SUBSTRATE	103
3.3. AMYLASE PRODUCTION FROM <i>BACILLUS</i> UEB-S BY SOLID-STATE FERMENTATION (SSF)	103
3.4. DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY	104
3.5. EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSES	104
3.6. AMYLASE PURIFICATION	106
3.7. PROTEIN ASSAY AND POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS	107
3.8. PROPERTIES OF PURIFIED AMYLASE	107
3.8.1. SUBSTRATE SPECIFICITY	107
3.8.2. ANALYSIS OF HYDROLYSIS PRODUCTS	107
3.8.3. EFFECT OF pH AND TEMPERATURE	107
3.8.4. DETERMINATION OF THE N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF AMYLASE UEB-S	108
3.8.5. RAW STARCH HYDROLYSIS	108
3.8.6. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	108

4.	RESULTS AND DISCUSSION	108
4.1.	AMYLASE PRODUCTION ON MILLET	108
4.2.	AMYLASE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION	111
4.3.	SUBSTRATE SPECIFICITY AND AMYLOLYTIC PRODUCT ANALYSIS	112
4.4.	EFFECT OF pH ON THE AMYLASE ACTIVITY AND STABILITY	113
4.5.	EFFECT OF TEMPERATURE ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY	114
4.6.	RAW STARCH HYDROLYSIS	115
5.	CONCLUSION	116
6.	ACKNOWLEDGMENTS	116
7.	REFERENCES	116

PARTIE 3 : RECHERCHE DES GENES CODANT POUR DES ACTIVITES GLYCOSIDASES DANS LA SOUCHE DE BACILLUS SP. UEB-S

ARTICLE 4: A HIGHLY THERMOSTABLE LICHENASE FROM BACILLUS SP UEB-S: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

INTRODUCTION	121
1. SUMMARY	122
2. INTRODUCTION	122
3. MATERIALS AND METHODS	123
3.1. STRAINS	123
3.2. ENZYME ASSAYS	123
3.3. ENZYME PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION	123
3.3.1. ELECTROPHORETIC ANALYSIS	124
3.3.2. SUBSTRATE SPECIFICITY	124
3.3.3. HYDROLYTIC PROPERTIES OF THE PURIFIED LICHENASE:	124
3.3.4. EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON LICHENASE ACTIVITY	124
3.4. CONSTRUCTION OF THE FOSMIDIC LIBRARY	125
3.4.1. HIGH-THROUGHPUT FUNCTIONAL SCREENS	125
3.4.2. PYROSEQUENCING, READ ASSEMBLY, AND GENE PREDICTION	125
3.4.3. LICHENASE SEQUENCE ANALYSIS	126
3.4.4. 3D MODEL OF LICHENASE UEB-S	126
4. RESULTS AND DISCUSSION	126
4.1. ENZYME PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION	126
4.2. SUBSTRATE SPECIFICITY	127
4.3. EFFECT OF pH ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY	128
4.4. EFFECT OF TEMPERATURE ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY	128
4.5. ENZYME MOLECULAR CHARACTERIZATION	129

4.5.1. PYROSEQUENCING , GENE PREDICTION AND HOMOLOGY MODELING	129
4.5.2. HOMOLOGY MODELING	130
5. CONCLUSION	131
6. ACKNOWLEDGMENTS	131
7. REFERENCES	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	133
ANNEXES	134

LISTE DES TABLEAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

Tableau 1 : Les superfamilles de repliements des CBMs (Hashimoto, 2006).....	5
Tableau 2. Comparaison entre la fermentation en milieu liquide et la fermentation en milieu solide	
Tableau 3: Caractérisation biochimique de quelques lichénases microbiennes	19

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE 1:

Table 1. Instrumental settings defined in the mixolab for running the samples.....	76
Table 2: Effect millet flour addition on wheat dough characteristics during mixing determined by mixolab.....	81
Table 3: Effect of millet flour addition on dough alveographic properties and bread volume.....	82
Table 4: Effect of millet flour addition on wheat bread textural properties	83

ARTICLE 2

Table 1. Experimental domain for the Doehlert Design.....	92
Table 2. Experimental conditions of Doehlert design and corresponding experimental and predicted responses	93
Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of lichenase activity	95
Table 4. Validation of the model by check points.....	96

ARTICLE 3

Table 1. Experimental domain for the Doehlert Design.....	105
Table 2. Experimental conditions of Doehlert design and corresponding experimental and predicted responses	106
Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of amylase activity.....	109
Table 4: Validation of the model with check points.....	109

LISTE DES FIGURES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Structures tridimensionnelles de quelques CBMs	6
Figure 2: Exemples de topologie du site actif des glycoside hydrolases.....	7
Figure 3 : Mécanisme d'inversion de configuration.....	8
Figure 4 : Mécanisme de retention de la configuration anomérique décrit pour la CGTase de <i>Bacillus circulans</i>	9
Figure 5. Sites de coupure des endo-enzymes (A) et des exo-enzymes (B).....	9
Figure 6 : Produits d'hydrolyse du lichénane par les lichenases le 3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose (G4G3G) et le 3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose (G4G4G3G)	12
Figure 7 : Structure du lichénane de <i>Cetraria islandica</i>	13
Figure 8: Structure tridimensionnelle de l'endoglucanase CelB de <i>Streptomyces lividans</i> (PDB 1NLR)	
Figure 9: Structure tridimensionnelle de la lichénase de <i>Bacillus subtilis</i> 168 (PDB305S)	15
Figure 10 : Sites actifs et résidus catalytiques de la famille GH16	16
Figure 11 : Les sous sites de la lichénase H(A16-M) de <i>Bacillus subtilis</i>	17
Figure 12 : Interactions enzyme-substrat dans le site actif de la lichénase H(A16-M) de <i>Bacillus subtilis</i>	
Figure 13 : Structure de l'amylose	23
Figure 14 : Structure de l'amylopectine	24
Figure 15 : Représentation schématique de la diversité de fonction des enzymes de la famille GH13	
Figure 16 : Structure tridimensionnelle (A) de l' α -amylase de <i>Bacillus sp.</i> strain KSM-K38 (PDB 1UD2) et de (B) la cyclodextrine glucanotransferase de <i>Bacillus circulans</i> (PDB 1CDG)	27
Figure 17. Régions conservées de quelques enzymes de la Famille GH 13.....	29
Figure 18 : Positionnement des régions conservées chez les enzymes de la Famille GH 13	29
Figure 20 : Structure de (a) la 4- α -glucanotransferase de <i>Thermococcus litoralis</i> (PDB 1K1W) et de (b) son domaine catalytique	31
Figure 21: Les cinq régions conservées dans la famille GH57.	32
Figure 22 : Les cinq régions conservées de la famille GH119.....	33
Figure 23 : mécanisme d'action des alpha-glucan lyases.....	34
Figure 24 : Les quatre sous-groupes représentatifs de la famille GH31	34
Figure 25. Structure de l' α glucosidase de <i>R. obeum</i> ATCC 29174 (PDB 3N04).....	35
Figure 26 : Les 7 régions conservées observées dans la famille GH31.....	36
Figure 27 : Structure tridimensionnelle de la β -amylase d'orge PDB (1B1Y)	37
Figure 28 : Structure tridimensionnelle de la glucoamylase de <i>Trichoderma Reesei</i> (PDB2VN4) e	
Figure 29: Contrôle de la biosynthèse d'alpha amylase chez <i>Bacillus subtilis</i>	41
Figure 30 : Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose..	43

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE 1

Figure 1. Scanning electron microscopy of isolated Pearl millet starch.....	79
Figure 2. ¹³ C NMR spectra of millet starch.....	79

Figure 3. Overall observation and cut loaves of bread baked views of traditional Tunisian bread baked

ARTICLE 2

Figure 1. Contour and response surface plots of lichenase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X_1) and L/S (X_2) levels at midlevel (zero on coded level) of time of fermentation (4 days) and temperature (37 °C); B) time of fermentation (X_3) and temperature (X_4) levels at midlevel (zero on coded level) of inoculum (0.8×10^9 CFU/g) and L/S ratio (4 mL/g).97

Figure 2. Contour and response surface plots of lichenase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X_1) and L/S (X_2) at fixed levels of time of fermentation (4.6 days) and temperature (35 °C)..... 98

ARTICLE 3

Figure 1. Contour and response surface plots of amylase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X_1) and L/S (X_2) levels at midlevel (zero on coded level) of time of fermentation (4 days) and temperature (37 °C); B) time of fermentation (X_3) and temperature (X_4) levels at midlevel (zero on coded level) of inoculum (0.8×10^9 CFU/g) and L/S ratio (4 mL/g)..... 110

Figure 2: SDS–PAGE analysis (A) and activity staining (B) of the purified amylase..... 112

Figure 3. HPAEC-PAD profile of products obtained after α -amylase digestion of soluble starch for 1, 2 and 24h 113

Figure 4. Effect of pH on the activity and stability of the purified α -amylase 113

Figure 5. Effect of temperature on the activity and stability of the purified α -amylase 114

Figure 6. SEM images of : (A,B,C) respectively untreated Wheat flour , barley Flour and millet (D, E, F) respectively hydrolysed wheat , barley and millet by the purified amylase 115

ARTICLE 4

Figure 1. SDS–PAGE analysis (A) and activity staining (B) of the purified lichenase 127

Figure 2. Hydrolysis properties of the purified lichenase: 127

Figure 3. Effect of pH on the activity of the purified lichenase 128

Figure 4. Effect of temperature on the activity of the purified lichenase 129

Figure 5: A. Ribbon representation of the structure of *Bacillus subtilis* 168 lichenase and the model of UEB-S lichenase.....128

INTRODUCTION

Les polysaccharides sont des polymères qui présentent une grande diversité. Ils peuvent jouer un rôle de structure, de réserve ou encore intervenir dans des phénomènes de communication et de signalisation cellulaire. A cette diversité de structures est associée une diversité d'activités enzymatiques intervenant dans la synthèse, la dégradation ou encore la modification de ces polysaccharides. Parmi les enzymes agissant sur les glucides, les plus étudiées sont les Glycosides Hydrolases (GH). Impliquées dans l'hydrolyse des liaisons osidiques, ces enzymes sont largement répandues dans le monde vivant. A ce jour, on dénombre en effet 131 familles de GH dans la banque de données CAZy (<http://www.cazy.org>) (Cantarel *et al.*, 2009). Parmi elles, certaines sont mises à profit dans des procédés industriels de transformation du carbone renouvelable pour les secteurs de l'alimentaire, de la santé, de la chimie fine, des détergents ou des bioénergies. Stimulée par la raréfaction des matières fossiles et une demande forte pour de nouveaux procédés, à la fois propres et durables, l'emploi de glycoside hydrolases pour les biotechnologies industrielles est amené à se développer dans les années à venir. Dans ce contexte, l'accès à des enzymes plus performantes, isolées de la diversité naturelle ou optimisées par les techniques d'ingénierie des protéines, sera essentiel pour soutenir la croissance attendue dans ces secteurs d'activité.

Les équipes de Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatiques (CIMEs) de l'INSA de Toulouse et de l'Unité Enzymes et Bioconversion de L'ENIS se sont spécialisées dans l'étude des glycoside-hydrolases. C'est dans le cadre d'une collaboration entre ces deux groupes de recherche que s'inscrit ce travail portant sur l'étude de deux glycoside hydrolases, une lichenase et une amylase, sécrétées par une souche appartenant au genre *Bacillus* isolée dans un sol du sud de la Tunisie (oliveraie).

Le premier chapitre de ce manuscrit consiste en une présentation des éléments bibliographiques permettant de situer la problématique. Après une partie dédiée à la présentation générale des glycosides hydrolases, les familles de GH qui ont fait l'objet de notre étude sont présentées plus en détail. Le deuxième chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux employés au cours de l'étude, qu'ils aient ou non été inclus dans une publication. Vient ensuite le chapitre consacré aux résultats acquis au cours de la thèse. Il est divisé en trois parties :

- La première porte sur la caractérisation physicochimique et fonctionnelle du millet, une agro ressource de faible coût qui a été utilisée pour la production des enzymes étudiées.
- La seconde décrit l'identification d'activités enzymatiques d'intérêt dans une nouvelle souche de *Bacillus* sp. et l'optimisation de leur production sous SSF ;
- Enfin, la dernière partie traite de la recherche des gènes codant pour des activités glycosidases dans la souche de *Bacillus* sp. UEB-S

Le manuscrit se termine par les conclusions et les perspectives envisagées à ce travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Première Partie** : les glycosides hydrolases
- **Deuxième Partie** : les lichenases
- **Troisième Partie** : les activités amylolytiques

PREMIERE PARTIE: LES GLYCOSIDE HYDROLASES

1. GENERALITES

Les Glycoside Hydrolases (GH) sont des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des liaisons osidiques. Dans la classification des enzymes établie par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie moléculaire (IUBMB), elles sont regroupées sur la base de la réaction catalysée, de la spécificité de substrat et de produit. Cette classification qui est très utile pour rendre compte de la spécificité ne permet cependant pas de mettre en lumière les homologues de séquences et de structures ou les liens mécanistiques pouvant exister au niveau moléculaire entre les différentes classes. Pour pallier à ces défauts, une autre classification des glycosides hydrolases a été proposée dans les années 1990 par Bernard Henrissat et ses collaborateurs. Elle repose sur des similitudes structurales et mécanistiques (Henrissat *et al.*, 1993 ; Cantarel *et al.*, 2009).

Ce classement est disponible dans la base de données CAZy (Carbohydrate Active Enzymes (www.cazy.org)). Il a conduit à la définition de 131 familles de GHs différentes. Sur la base de leurs liens de parenté (structuraux et mécanistiques), certaines familles peuvent être regroupées en «clans». On distingue ainsi 14 clans parmi les GHs, du clan GH-A au clan GH-N (données novembre 2012). A titre d'exemple, les glycosides hydrolases des familles 13 (famille des α -amylases), 70 et 77 sont regroupées dans le clan GH-H. Les glycosides hydrolases possèdent très souvent une organisation modulaire (Henrissat et Davies, 2000) qui consiste en un module catalytique et un ou plusieurs modules non-catalytiques, dont certains sont impliqués dans la fixation au substrat. Ces derniers sont regroupés sous le nom de « Carbohydrate Binding Modules » (CBM) (Bolam *et al.*, 1998). Un CBM est défini comme un domaine protéique contigu à un domaine catalytique et qui possède des propriétés de fixation des sucres. Initialement découverts (en 1988) chez les cellulases, notamment de *Trichoderma reesei* et *Cellulomonas fimi*, ces domaines étaient appelés Cellulose Binding Domains (CBD), en raison de leur fixation spécifique sur la cellulose (Gilks, 1988 ; Tomme *et al.*, 1988). A partir de 1999, les CBDs furent inclus dans le groupe élargi des CBMs qui comprend aussi des modules protéiques capables de se lier à d'autres polysaccharides tels que la chitine, les β -1,3-glucanes, les β -1,3-1,4-glucanes, les xylanes, les galactanes, les mannanes, les glucomannanes, l'amidon, etc...

A ce jour, 64 familles de CBM sont connues. Du point de vue structural, ces modules renferment entre 30 à 200 résidus d'acides aminés et peuvent se présenter aussi bien sous la forme d'un seul domaine que sous la forme de multi-domaines. Les CBM sont généralement reliés au domaine catalytique des GHs par l'intermédiaire de séquences de liaison (linker) riches en proline et en acides aminés hydroxylés tels que la sérine et/ou la thréonine (Tomme *et al.*, 1995; Dvine *et al.*, 1998). Ces résidus peuvent être, dans certains cas, O-glycosylés, ce qui contribue à la stabilité de ces séquences en les protégeant de la protéolyse (Gilks *et al.*, 1991).

La résolution de la structure 3D de plus de 35 familles de CBMs a permis de les classer en sept superfamilles (Tableau 1).

Tableau 1 : Les superfamilles de repliements des CBMs (Hashimoto, 2006)

Super-Famille	Repliement	Famille des CBMs
1	Beta-sandwich	4, 6,11,25,26,31,33,34
2	Beta-trèfle	13,42
3	Nœud de cystéine	1
4	Unique	5,12
5	Motif OB	10
6	Motif Hévéine	18
7	Unique	14

La plupart des CBMs présentent un repliement tridimensionnel de type β -sandwich, constitué essentiellement de deux feuillets β , comprenant chacun trois à six brins β anti-parallèles (Figure 2). Ce repliement est observé entre autres dans les CBM des familles 4 et 11 fixant les β -1,3-1,4-glucanes ou encore les CBM des familles 20, 21, 25, 26, et 34 fixant l'amidon (Hashimoto *et al.*, 2006 ; Bae *et al.*, 2008 ; Gregg *et al.*, 2008 ; Janeček *et al.*, 2011).

Les CBMs déployant une structure de type β -sandwich et β -trèfle (Super familles 1 et 2) présentent différentes spécificités de liaison leur permettant de s'associer à des polysaccharides très divers. En revanche, les CBMs appartenant aux super-familles 3 et 5 (repliements en "noeud de cystéine", Cystéine Knot et en motif "OB" (ou Oligonucleotide/oligosaccharide binding) sont beaucoup plus sélectifs (Boraston *et al.*, 2004). Ces derniers sont en effet de petits polypeptides de 30 à 60 résidus d'acide aminés renfermant uniquement un feuillet β et une boucle et fixant spécifiquement la cellulose et/ou la chitine (Figure 1C et 1D).

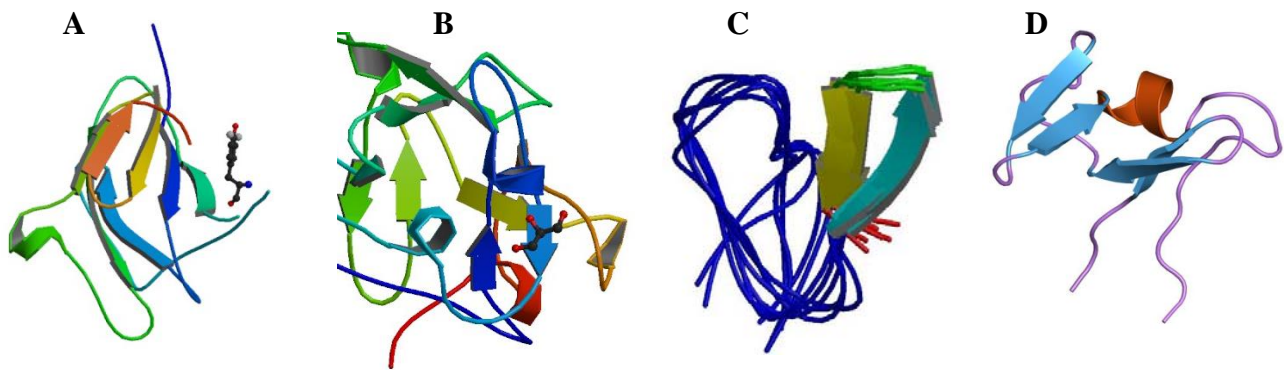


Figure 1 : Structures tridimensionnelles de quelques CBMs

A: CBM25 de l'amylase de *Bacillus halodurans* (pdb2c3v); **B:** CBM13 de la xylanase de *Streptomyces lividans* (pdb1knl) ; **C:** CBM 1 de la cellobiohydrolase de *Trichoderma reesei* (pdb1az6) ; **D :** CBM 10 de la xylanase A de *Pseudomonas* (pdb1e8r).

2. MODES D'ACTION ET MECANISME CATALYTIQUE DES GHS

2.1 MODES D'ACTION

Les glycosides hydrolases peuvent dégrader leur substrat selon deux modes d'action :

- un mode endolytique : la rupture de la liaison osidique se produit de manière aléatoire à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique.
- un mode exolytique : la dégradation du polysaccharide se produit à partir de l'extrémité réductrice ou non réductrice et peut être processive. Dans ce cas, le substrat reste associé à l'enzyme et les sucres sont libérés à partir de l'extrémité nouvellement créée.

Récemment, Lafond et al (2012) ont mis une évidence pour la première fois une glucanase bifonctionnelle présentant une activité exo b-1,3 /1,6 et une activité endo b-1,4 glucanase. Cette dernière ne pouvant pas être classée dans les familles des glucosides-hydrolases décrites a été classée dans une nouvelle famille : la famille GH131 (Lafond *et al.*, 2012).

Le mode d'action d'une enzyme est dicté par la structure du site actif (Davies et Henrissat, 1995) (figure 2). Ainsi, les endo enzymes présentent généralement un site actif exposé au solvant formant une crevasse ou un sillon (Figure 2A) qui permet la fixation de plusieurs unités saccharidiques. En revanche, le site actif des exo-enzymes est le plus souvent en forme de "poche" (figure 2B), permettant la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice ou réductrice d'une chaîne d'oligo- ou de polysaccharide (par exemple, les arabinofuranosidases GH 51). Enfin, les enzymes processives ont la particularité de posséder de longues boucles

qui referment partiellement la crevasse catalytique pour former une structure en tunnel (Figure 2C). Cette topologie en tunnel permet aux GH de fixer la chaîne polysaccharidique et de progresser de façon processive le long de celle-ci, de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, et d'un site de coupure à l'autre. C'est le mode d'action de certaines cellobiohydrolases I (GH48), par exemple (Guimarães *et al.*, 2002).

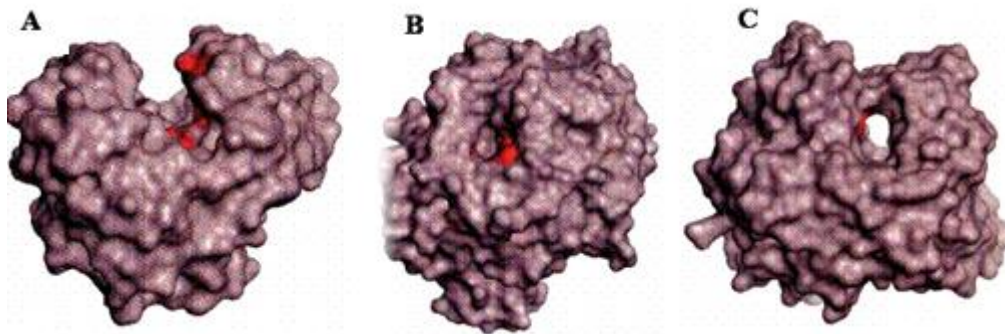


Figure 2: Exemples de topologie du site actif des glycosides hydrolases en forme de poche (A), en forme de sillon (B) et en forme de tunnel (C)

2.2 MECANISMES D'ACTION CATALYTIQUE

Deux principaux mécanismes de rupture de la liaison osidique sont généralement adoptés et connus sous le nom de mécanisme d'inversion (figure 3) ou de rétention (figure 4) de la configuration anomérique (Koshland., 1953). Nous nous attacherons à décrire ces deux mécanismes car ils sont les plus fréquemment rencontrés, mais il faut reconnaître que des variantes existent, notamment un mécanisme catalytique reposant sur l'action du cofacteur NADH proposé pour les familles GH 4 et GH 109 (Rajan *et al.*, 2004 ; Yip *et al.*, 2004).

2.2.1 MECANISME D'INVERSION

Le mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration anomérique se déroule en une seule étape (Figure 3). L'atome d'oxygène interglycosidique est protoné par le résidu acide/base et le départ de l'aglycone s'accompagne de l'attaque d'une molécule d'eau activée par la base. Cette substitution conduit à la libération d'un produit de configuration opposée à celle du substrat. Les deux résidus sont généralement distants de 10 Å.

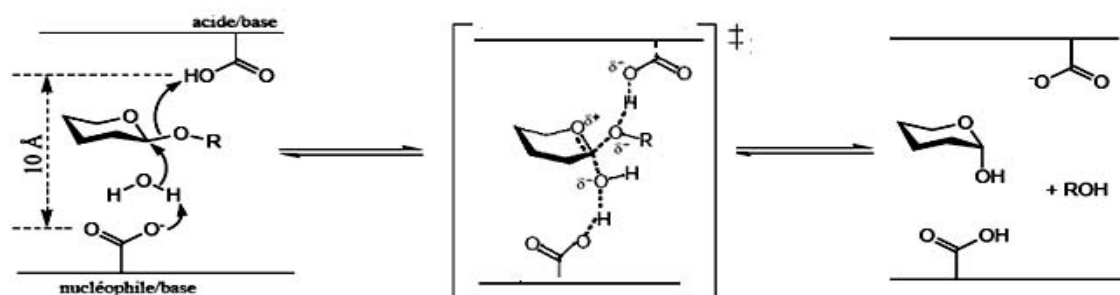


Figure 3 : Mécanisme d'inversion de configuration

2.2.2 MECANISME DE RETENTION:

L'hydrolyse de la liaison osidique se produit en deux étapes et met aussi généralement en jeu deux acides carboxyliques : un résidu acide/base et un nucléophile (Davies et Henrissat, 1995). Ces deux résidus sont distants de 5,5 Å (Coutinho and Henrissat, 1999). Lors de la première étape (glycosylation), le groupe carboxylique du résidu acide/base cède un proton à l'oxygène de la liaison osidique. Simultanément, le carbone C1 de la partie 'glycone' du substrat est attaqué par le nucléophile, générant la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme et la libération de la partie réductrice du substrat. Des expériences de diffraction aux rayons X ont été réalisées sur des cristaux de complexes enzyme-analogues de substrats et ont permis une description fine de la catalyse notamment pour la CGTase de *Bacillus circulans* (Uitdehaag *et al.*, 1999). Au cours de la seconde étape (déglycosylation), une molécule d'eau activée par l'acide aminé déprotoné au cours de la première étape exerce une attaque nucléophile sur l'intermédiaire glycosyl-enzyme libérant ainsi le glycosyle. Cette seconde étape pourra conduire à une réaction de transglycosylation lorsque le groupement nucléophile attaquant le glycosyl-enzyme proviendra, non pas de la molécule d'eau mais d'un sucre. Le rapport entre activité d'hydrolyse et de transglycosylation est étroitement lié à la structure du site actif des glycoside-hydrolases permettant la reconnaissance d'accepteurs différents de la molécule d'eau. Le mécanisme fait intervenir différents états de transition de type ion oxocarbone (Figure 4). Il faut souligner que les conformations adoptées par le substrat au cours de ces réactions varient en fonction de l'enzyme (Sinnott, 1990 ; Vocadlo et Davies, 2008). L'ion oxocarbone comporte une double liaison partielle entre les atomes O5 et C1, sur lesquels une charge positive est délocalisée. Il est caractérisé par une configuration plane des atomes C2, C1, O5 et C5. Cet état hautement instable a une durée de vie inférieure à 10^{-12} sec (Banait et Jencks., 1991).

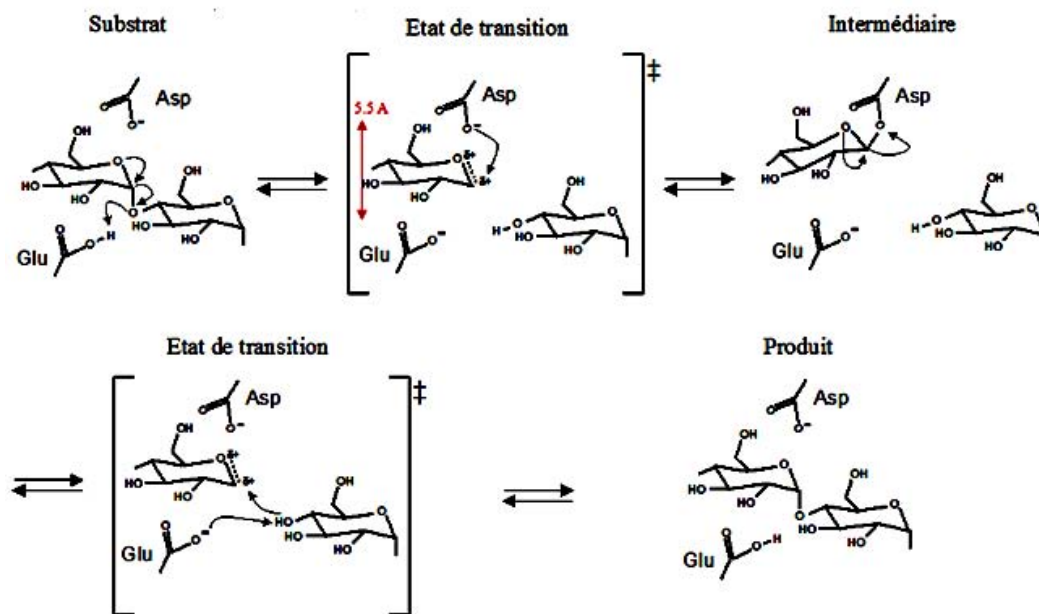


Figure 4 : Mécanisme de rétention de la configuration anomérique décrit pour la CGTase de *Bacillus circulans* (Uitdehaag *et al.*, 1999)

Le site actif des GHs est généralement formé par un ensemble de sous sites permettant l'arrimage du substrat et la rupture de la liaison osidique. Une nomenclature a été proposée pour faciliter la description de ces sites (Davies *et al.*, 1997). Ils sont numérotés de $-n$ à $+n$ (Figure 5). Par convention, la rupture de la liaison osidique se produit entre les positions -1 et $+1$, le glucide présentant son extrémité réductrice du côté positif. Les interactions protéine/sucre dans chaque sous-site sont généralement assurées par un réseau de liaisons hydrogène et des interactions dites de « stacking » entre les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine) et les anneaux glycosyle.

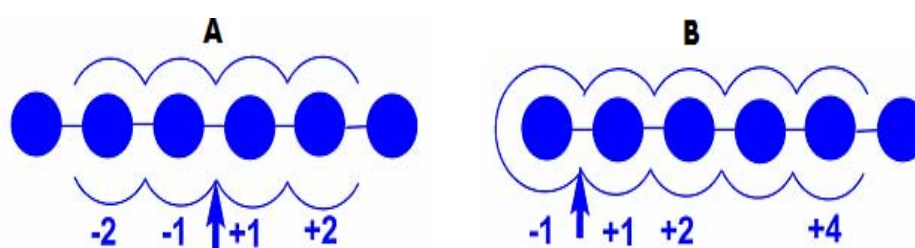


Figure 5. Sites de coupe des endo-enzymes (A) et des exo-enzymes (B) (Davies *et al.*, 1997).

3. PRODUCTION DES GLUCOSIDE HYDROLASES

Les systèmes fongiques et bactériens sont largement utilisés pour la production d'hydrolases en fermentation submergée, encore appelée SMF pour SubMerged Fermentation en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération et l'humidité (Couto et Sanromán 2006 ; Gangadharan *et al.*, 2008). Cependant, de plus en plus

de travaux ont porté, ces dernières années, sur la production d'enzymes par fermentation sur milieu solide, appelée SSF pour « Solid State Fermentation » (Soni *et al.*, 2003 ; Kunamneni et Singh, 2005). La fermentation sur milieu solide est définie comme une culture réalisée dans un milieu pauvre en eau généralement constitué d'une matière première naturelle utilisée comme source de carbone et d'énergie. Il s'agit le plus souvent d'un sous-produit agricole. La fermentation solide peut aussi reposer sur l'emploi d'un matériau inerte servant de matrice solide. Dans ce cas, la matrice pourra être imbibée par une solution nutritive. Les substrats solides fournissent généralement un bon environnement d'habitation pour la flore microbienne comprenant des bactéries, levures ou encore des champignons. Comparée à la fermentation submergée, la fermentation solide présente de nombreux avantages qui sont notamment d'ordre économique. En effet, cette technique est peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. Elle permet de simplifier le processus « down stream » de séparation et d'extraction des produits et permet d'atteindre à moindre coût des concentrations plus élevées (Ramakrishna *et al.*, 1982). En outre, elle permet de surmonter de façon significative la répression catabolite (Ramesh et Lonsane, 1991). Le tableau 2 résume les principales différences entre les deux procédés de fermentation solide et liquide.

Tableau 2. Comparaison entre la fermentation en milieu liquide et la fermentation en milieu solide (Holker *et al.*, 2004).

	Fermentation en milieu liquide	Fermentation en milieu solide
Substrats	Préférentiellement solubles.	Polymères insolubles ± substrats solubles
Contrôle de la chaleur	Facile	Plus difficile surtout en FMS statique (faible transfert)
Aération	Faible solubilité de l'O ₂ Fort niveau d'aération requis	Aération facile. Grande interface air- substrat.
Contrôle du pH	Facile	Nécessité d'utilisation de milieux tamponnés
Consommation d'énergie	Elevée	Faible en FMS statique
Consommation d'eau	Elevée	Faible
Volume et coût des installations	Grand volume, coût élevé	Volumes et coût plus faibles,
Récupération des produits d'intérêt	Produits dilués	Produits concentrés

Comme pour la fermentation en milieu liquide, plusieurs facteurs importants doivent être pris en considération pour le développement des processus de SSF. Il s'agit notamment des facteurs physico-chimiques et biologiques tels que le pH du milieu, la température, la durée d'incubation, l'âge et la taille de l'inoculum. Le choix d'un substrat adéquat est un autre aspect clé de la SSF. Les résidus agro-industriels sont généralement considérés comme les meilleurs substrats pour les processus de SSF. Ces modes de production suscitent un regain d'intérêt notamment pour la production d'amylases et de β -glucanases comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

DEUXIEME PARTIE : L'ACTIVITE LICHENASE

Les lichénases, ou β -1,3/ β -1,4-D-glucanases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β -1,4 glycosidiques des unités glucopyranosyle 3-O-substitués présentes dans le lichénane pour libérer le trisaccharide (3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose) et le tétrasaccharide (3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose) (Figure 6)

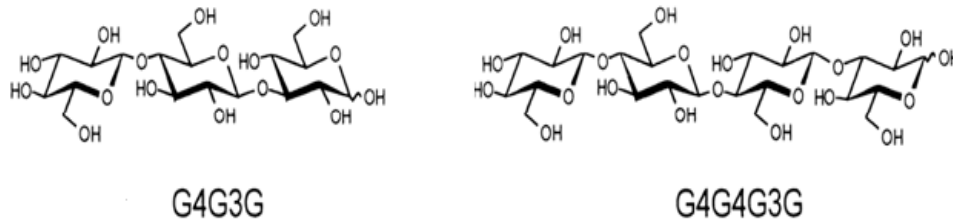


Figure 6 : Produits d'hydrolyse du lichénane par les lichenases le 3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose (G4G3G) et le 3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose (G4G4G3G) (Planas, 2000)

Elles sont classées sur la base de leur homologie de séquences dans les familles 12, 16 et 17 des glycosides hydrolases. Signalons à ce niveau que les lichénases de la famille 17 sont d'origine végétale. Nous décrirons dans cette partie bibliographique brièvement la famille 12 mais nous nous attarderons davantage sur la famille 16. Au préalable, il nous paraît nécessaire de présenter la structure du substrat cible de ces enzymes, à savoir le lichénane.

1. LE LICHENANE

Les 1,3-1,4 β -glucanes ou lichénane sont des polysaccharides des parois cellulaires des plantes appartenant à la famille des Poaceae et notamment des graminées. Ils sont particulièrement abondants dans les cellules de l'albumen des céréales telles que l'orge (2,8-11%), l'avoine (1,8-8%), le sorgho et le millet (1,5-8%) (Stone et Clarke 1992 ; Saastamoinen *et al.*, 2004; Hozová *et al.*, 2007). La masse molaire de ce polymère varie entre 49 000 and 3.10^6 g/mol. Cette variabilité dépend principalement des conditions d'extraction ainsi que des méthodes d'analyse (Autio *et al.*, 1996).

Structurellement, ce sont des glucanes linéaires de résidus β -D-glucosyle liés par des liaisons glycosidiques β -1,3 et β -1,4 (Figure 7), la proportion de liaisons β -1,3 est généralement comprise entre 25 et 30%.

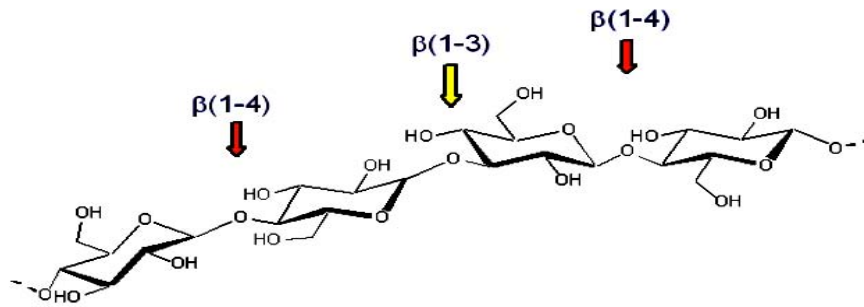


Figure 7 : Structure du lichénane de *Cetraria islandica* (Hrmova *et al.*, 1997)

2. DONNEES STRUCTURALES ET MECANISTIQUES SUR LES LICHENASES

Les lichénases sont des glycoside hydrolases ubiquitaires, produites par des microorganismes aussi bien procaryotes qu'eucaryotes notamment des bactéries du genre *Bacillus* (Planas 2000), des champignons tels que *Rhizopus microsporus* (Celestino *et al.*, 2006) ou encore des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (Sanchez *et al.*, 1983). Les lichénases sont également produites par certaines plantes telles que le millet (Ramachandre Kini *et al.*, 2000) et l'orge (Woodward et Fincher, 1982) où elles interviennent dans la dépolymérisation enzymatique des 1,3-1,4 β -glucanes durant le processus de germination (Stone et Clarke 1992 ; Hrmova *et al.*, 1997). Ces enzymes ont été classées dans trois familles distinctes: la famille GH12, GH16 et GH17.

2.1. LA FAMILLE GH12

La famille GH12 comporte 311 séquences dont 54 caractérisées et correspondant à 4 types d'activités enzymatiques. Elle forme, avec la famille GH11, le clan GH-C.

2.1.1. MODE D'ACTION

Le mode d'action des enzymes de cette famille a été décrit pour la première fois en 1993 pour l'endoglucanase 3 d'*Humicola insolens*. Ces enzymes clivent la liaison osidique suivant le mécanisme de rétention de configuration décrit par Koschland (Schou *et al.*, 1993).

2.1.2. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE LA FAMILLE

La famille GH12 regroupe des activités *endo*- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), xyloglucan *endo*-hydrolase (EC 3.2.1.151), *endo*- β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73) et xyloglucan *endo*-transglycosylase (XET, EC 2.4.1.207). Parmi les lichénases répertoriées dans cette famille, seules les enzymes produites par *Cochliobolus carbonum* (Kim *et al.*, 2001) et *Magnaporthe grisea* 70-15 (Dean *et al.*, 2005) ont été caractérisées.

2.1.3. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Dans cette famille, la première structure tridimensionnelle résolue par cristallographie aux rayons X est la structure de l'endoglucanase de *Streptomyces lividans* (Sulzenbacher *et al.*, 1997) (Figure 8)

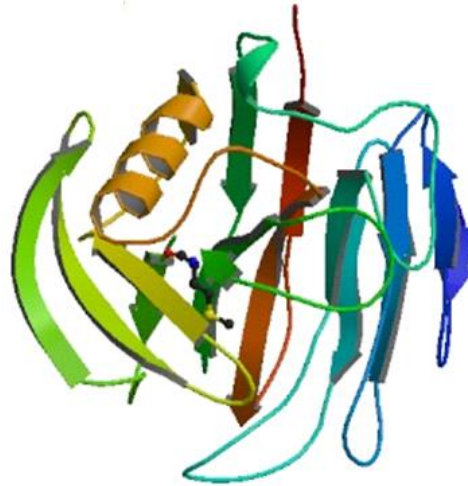


Figure 8: Structure tridimensionnelle de l'endoglucanase CelB de *Streptomyces lividans* (PDB INLR) (Sulzenbacher *et al.*, 1997)

Elle montre une structure compacte sous forme de feuillets bêta arrangés en structures de type sandwich et incurvés pour créer un vaste site de liaison du substrat sur la face concave du feuillet bêta. Les deux résidus catalytiques (deux acides glutamiques) sont séparés par 7 Å.

2.2. LA FAMILLE GH16

La famille GH16 regroupe 2463 séquences dont 177 caractérisées. Elle forme avec la famille GH7 le Clan GH-B. Elle regroupe des xyloglucan:xyloglucosyl-transferases (EC 2.4.1.207); keratan-sulfate endo-1,4- β -galactosidases (EC 3.2.1.103); endo-1,3- β -glucanases (EC 3.2.1.39); endo-1,3(4)- β -glucanases (EC 3.2.1.6); β -agarase (EC 3.2.1.81); k-carrageenases (EC 3.2.1.83); xyloglucanases (EC 3.2.1.151); endo- β -1,3-galactanases (EC 3.2.1.-); β -porphyranases (EC 3.2.1.178) et des lichénases (EC 3.2.1.73).

2.2.1. STRUCTURE TRI-DIMENSIONNELLE

Les enzymes de cette famille présentent toute une structure tridimensionnelle de type β sandwich. La première structure tridimensionnelle obtenue avec une résolution de 2 Å fut celle d'une 1,3-1,4 β -glucanase hybride résultant de la fusion des 16 premiers acides aminés de la lichénase de *B. amyloliquefaciens* et les résidus 17 -214 de celle de *B. macerans* (Keitel *et al.*, 1993). Vingt-cinq structures sont aujourd'hui recensées dans la famille. Parmi celles-ci,

cinq structures correspondent à des enzymes caractérisées biochimiquement comme étant des lichénases comparables à la lichénase de *Bacillus subtilis* 168 (Figure 9).

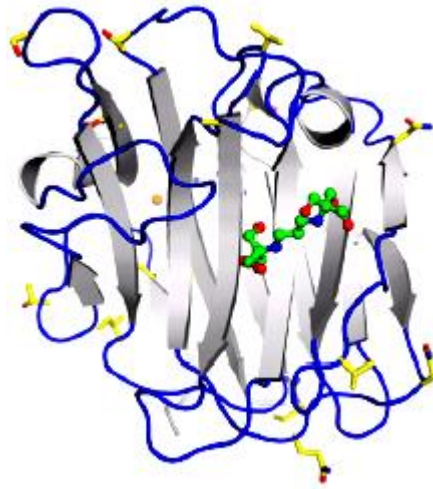


Figure 9: Structure tridimensionnelle de la lichénase de *Bacillus subtilis* 168 (PDB305S) (Furtado et al., 2011)

En jaune sont représentés les résidus variables entre la lichénase de *Bacillus subtilis* et celle de *B.licheniformis*. **En vert** : une molécule de bis-tris-propane, **en rouge** les ions calcium

• LE SITE ACTIF

Des études de mutagenèse dirigée confirmées par des analyses structurales sur les lichénases ont permis de déterminer la nature et la position des acides aminés catalytiques (Viladot *et al.*, 1998) qui sont strictement conservés dans la famille GH16. Le mécanisme de rupture de la liaison osidique fait intervenir deux résidus acide glutamique, l'un jouant le rôle du nucléophile (**E105**) pour la lichénase de *B. licheniformis*) l'autre celui du catalyseur acide-base (**E109**), numérotation de la lichénase de *B. licheniformis*)(Juncosa *et al.*,1994). Ces résidus sont généralement retrouvés dans une séquence conservée de type EXDXE dans le cas des lichénases ou **EXDXXE** pour les carraghenases par exemple (Figure 10). X représente un acide aminé hydrophobe de type valine, isoleucine, méthionine. Le résidu D (**D107**) pour *Bacillus licheniformis* est un résidu conservé qui interviendrait dans l'activation du résidu nucléophile par une liaison hydrogène (Strohmeier *et al.*, 2004).

La présence d'un acide aminé hydrophobe supplémentaire pointant vers le cœur hydrophobe de la protéine, entraîne la formation d'un renflement β dans le site actif (Figure 10), la distance entre les résidus catalytiques étant conservée. Le renflement β de type EXDXXE est très répandu dans la famille 16. Il est également retrouvé dans la famille GH7 indiquant que

l'ancêtre commun posséderait cette structure de site actif (Michel *et al.*, 2001). Ce motif aurait par la suite évolué vers une structure plus régulière du brin (Figure 10).

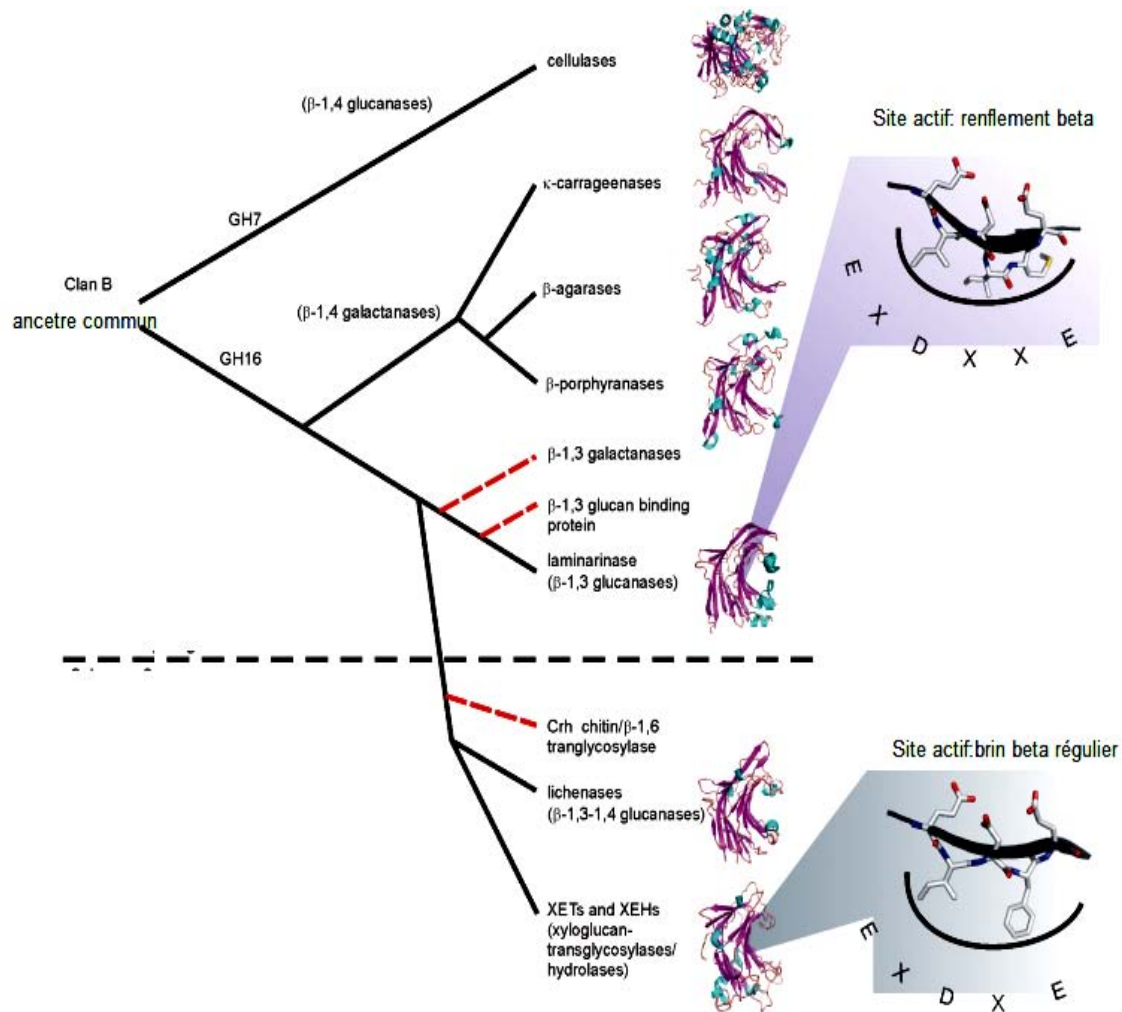


Figure 10 : Sites actifs et résidus catalytiques de la famille GH16

LE SITE DE FIXATION DU SUBSTRAT

Les lichénases présentent plusieurs sous sites de fixation au substrat. Par exemple, la lichénase H(A16-M) de *B. subtilis* possède six sous sites numérotés de -4 à +2 (Abel *et al.*, 2003). L'hydrolyse du lichénane se produit par clivage de la liaison β -(1,4) entre les unités glucosyle positionné entre les sous sites -1 et +1 et nécessite obligatoirement la présence d'une liaison β -(1,3) entre les sous sites -1 et -2 et une liaison β -(1,4) entre les sous sites -2 et -3 (Figure 11) (Gaiser *et al.*, 2006).

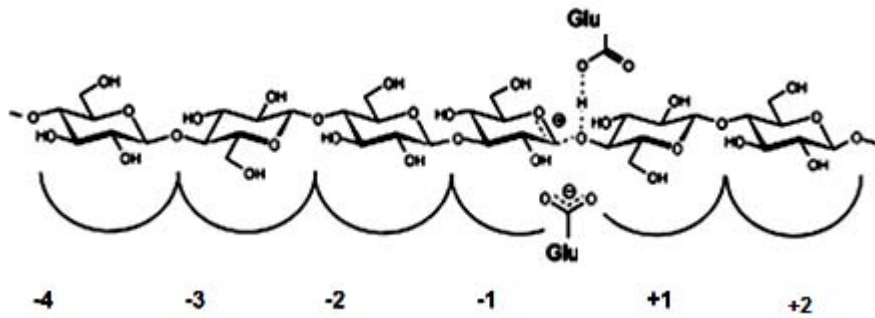


Figure 11 : Les sous sites de la lichénase H (A16-M) de *Bacillus subtilis* (Gaiser *et al.*, 2006)

La fixation du substrat fait intervenir des résidus établissant un réseau de liaisons hydrogène ou des interactions de type stacking avec les différents sous sites (Figure12) comme Phe92 au niveau du sous site -2 ou encore Tyr94 au niveau du sous site -3.

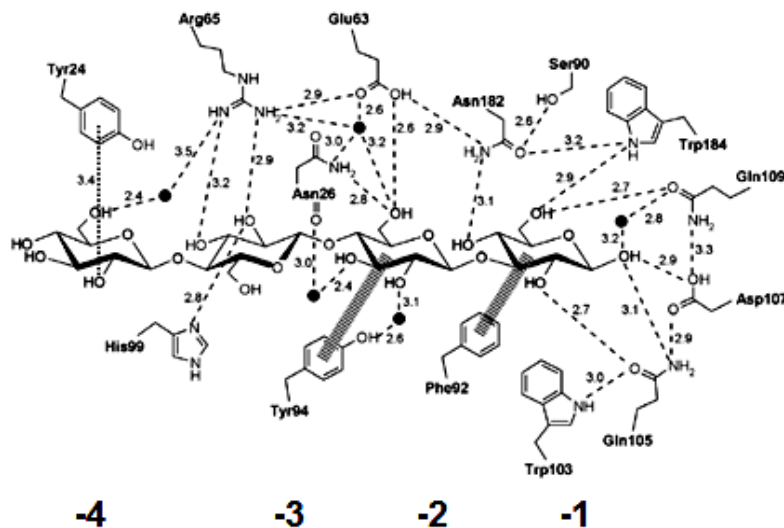


Figure 12 : Interactions enzyme-substrat dans le site actif de la lichénase H (A16-M) de *Bacillus subtilis* (---- : liaison hydrogène, (//////////) : liaison stacking) (Gaiser *et al.*, 2006)

LE SITE DE FIXATION DU CALCIUM

La plupart des lichénases présentent un ion calcium, situé du côté opposé du site actif, qui joue un rôle important dans la stabilisation de la structure de la protéine native notamment à haute température. Pour la lichénase de *B. macerans*, le site de fixation du calcium est constitué de trois acides aminés: Pro9, Gly45 et Asp207 (Welfe *et al.*, 1995). Des études de mutagenèse dirigée et de dichroïsme circulaire réalisées sur trois lichénases hybrides (résultant de la fusion des fragments N-terminaux de la lichénase de *Bacillus amyloquefaciens* et C-terminaux de *Bacillus macerans*) ont montré que la position exacte de ces acides aminés, et par conséquent la géométrie du site de fixation du calcium, influe considérablement sur la thermostabilité de l'enzyme (Welfe *et al.*, 1995).

3. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES LICHENASES

Les lichénases sont le plus souvent produites par culture en milieu liquide. Les premiers travaux traitant de production par fermentation sur milieu solide ont été publiés par Sun *et al.* en 2002. La culture de *Trichoderma reesei* sur le son de blé a permis d'atteindre un niveau de production de 9023 U lichénase/gds (Sun *et al.*, 2002). Par la suite, Prajamban et ses collaborateurs ont obtenu une production de 4.5 U/gds en cultivant *Aspergillus terreus* sur un milieu constitué de paille de blé (Prajamban *et al.*, 2008). Les seuls travaux faisant référence à la production de lichénases sur milieu solide par le genre *Bacillus* sont les travaux récemment publiés par Chaari *et al.* (2012). Un plan d'expériences s'appuyant sur la méthodologie de surface de réponses a permis d'optimiser la sécrétion de lichénases de *Bacillus licheniformis* UEB-CF cultivée sur écorces de petits pois. Le meilleur niveau de production rapporté atteint 280 U/gds (Chaari *et al.*, 2012).

Par ailleurs, différentes lichénases microbiennes ont été purifiées et caractérisées. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractérisation biochimique de quelques lichénases microbiennes

Microorganisme	Température opt (°C)	Stabilité temperature	pH opt	Km (mM)	AS(μmol/min/mg)	Références
<i>B. subtilis</i>	60	T _{1/2} vie : 30 min à 50°C	6	1.53	555	Apiraksakorn <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus sp</i>	50	-	7.2	0.45	-	Gaiser <i>et al.</i> , 2006
<i>B. licheniformis</i> UEB-CF(EG1)	70	T _{1/2} vie : 10min à 70°C	5	2.1	15.62	Chaari <i>et al.</i> , 2012
<i>F. succinogenes</i>	50	80% d'activité résiduelle après 10 min à 90°C	6	2.5	2065	Wen <i>et al.</i> , 2005
<i>Thermomonospora sp</i>	50	T _{1/2} vie : 5min à 80°C	7	2	792	Anish <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus subtilis</i> 168 (recombinante)	50	T _{1/2} vie 5min à 60°C	6	3.1	-	Furtado <i>et al.</i> , 2011
<i>B. licheniformis</i> UEB-CF(EG2)	60	T _{1/2} vie 52min à 70°C	5	1.82	767	Chaari <i>et al.</i> , 2012

NB : Pour toutes les souches citées dans le tableau 3, et pour tous les paramètres déterminés, le substrat utilisé est le lichenan de *Cetraria islandica*.

4. APPLICATIONS DES LICHENASES

Les lichénases sont des enzymes largement utilisées aussi bien dans le secteur agroalimentaire que biotechnologique. Certaines de ces enzymes sont commercialisées comme la lichénase de *Bacillus s* commercialisée par Megazyme, par exemple, active à 40°C et à pH 6.5, ou la lichénase de *Clostridium thermocellum* commercialisée par Nzytech, active à pH 6 et à 65°C, mais instable au-delà de 70°C.

4.1 ALIMENTATION ANIMALE

Ces dernières années, les β -glucanases ont été utilisées comme additifs dans l'alimentation des volailles et des ruminants. Un régime alimentaire riche en orge contient des quantités non négligeables de composés appartenant au groupe des hémicelluloses (arabinoxylanes, β -glucanes). Ces derniers sont d'une part non digestibles par les enzymes endogènes des animaux, et diminuent l'absorption des aliments d'autre part, ralentissant ainsi la digestion, le transit intestinal ainsi que l'évacuation des déchets (Demeyer *et al.*, 1988).

Pour remédier à cela, il est intéressant d'incorporer dans les régimes utilisant massivement les céréales viscosifiantes telles que l'orge des préparations enzymatiques contenant des lichénases pour hydrolyser ces hémicelluloses en polysaccharides de plus petites tailles, de manière à améliorer la digestion (Yang *et al.*, 2007).

4.2 BRASSERIE

Les β -glucanes sont hydrolysés par les β -glucanases au cours du maltage du grain d'orge, principalement pendant les trois premiers jours de germination (Ferrari *et al.*, 2010). Cependant, les β -glucanases endogènes sont relativement peu thermostables et hydrolysent partiellement les β -glucanes qui forment des précipités gélatineux dans la bière et gênent les étapes de filtration (Meikle *et al.*, 1994). L'ajout de lichénases exogènes est pratiqué pour réduire la viscosité, améliorer la clarification du moût, et la filtrabilité du produit final.

4.3 PRODUCTION DE BIOCARBURANTS

La production de biocarburants à partir de biomasse végétale (cellulose, hémicellulose et lignine) constitue aujourd'hui un enjeu économique capital. Une attention particulière est en effet accordée à l'utilisation de ressources renouvelables, en particulier les sous-produits agricoles et industriels, pour la production des biocarburants de seconde

génération. Dans ce cadre, l'exploitation des matières premières telles que les lichénanes, xyloglucanes, le glucomannane et les β -glucanes peut constituer une véritable opportunité.

Ainsi, Menon et ses collaborateurs ont proposé en 2011 un procédé de production d'éthanol à partir de lichénane en couplant l'action d'une lichénase issue d'une souche thermophile de *Thermomonospora sp.* à la fermentation d'une souche de *Saccharomyces sp.* La valeur du rendement de production d'éthanol atteint 0,45g/g-0.48g /g avec une efficacité de conversion du lichenane de 93% à 96% (Menon *et al.*, 2011).

4.4 PRÉPARATION DE PROTOPLASTES

La fusion des protoplastes, appelée aussi hybridation somatique, est très utilisée pour l'amélioration des plantes. L'obtention de protoplastes, qui exige la dégradation de la paroi pectocellulosique, pourrait être améliorée grâce à l'action de chitinases ou pectinases combinée à celle des β -glucanases (Yano *et al.*, 2004).

TROISIEME PARTIE: LES ACTIVITES AMYLOLYTIQUES

L'activité α -amylolytique est définie comme une activité enzymatique responsable de la rupture des liaisons α -1,4-glycosidiques présentes dans l'amidon. Cette activité endolytique est déployée par deux catégories différentes d'enzymes classées sur la base de leur homologie de séquences dans les familles 13, 57 et 119 des glycosides hydrolases. Par ailleurs, l'amidon peut aussi être hydrolysé par des enzymes exolytiques du type β -amylases (famille GH14) voir des glucoamylases (famille GH31, GH15, GH65). Dans cette partie bibliographique, nous décrirons les principales caractéristiques des différentes familles de GHs actives sur l'amidon. En préambule, il nous a semblé important de rappeler quelques éléments concernant la structure de l'amidon.

1. L'AMIDON

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale composé de l'assemblage de deux homopolymères de glucose : l'amylose et l'amylopectine.

L'Amylose

L'amylose représente 15-à 25% de l'amidon. Il est constitué de longues chaînes linéaires d'unités D-glucopyranosyle liées par des liaisons α -(1,4) pouvant aller de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 Da en masse moléculaire (Figure 13). L'amylose présente une structure hélicoïdale renfermant de 6 à 8 résidus glucopyranosyle par tour de spire (pas de l'hélice $10,6\text{\AA}$,) et est localisé dans la zone amorphe du granule d'amidon (Malumba *et al.*, 2011).

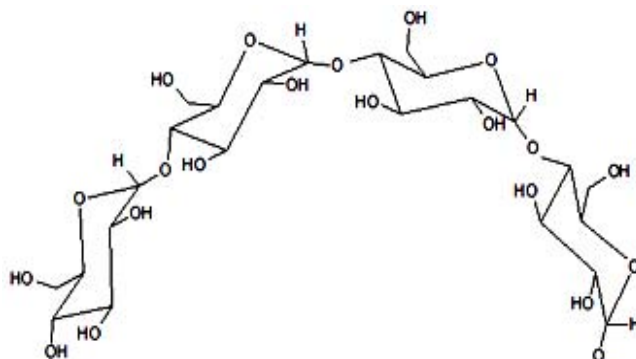


Figure 13 : Structure de l'amylose (Malumba *et al.*, 2011)

L'amylopectine

C'est l'un des plus grands polymères d'unités glucosyle présents dans la nature avec un poids moléculaire compris entre 10^7 et 10^8 Da. Il est principalement constitué d'une chaîne linéaire de résidus D-glucopyranosyle liés en α -(1,4), et 5 à 6% de ramifications en α -(1,6). L'ensemble confère à l'amylopectine une structure arborescente (Figure 14). L'amylopectine est constituée par 3 chaînes différentes : les chaînes B les plus internes, les chaînes A plus courtes et qui viennent se greffer sur les chaînes B, et les chaînes C. Les chaînes A ont la possibilité de s'associer entre elles pour se mettre sous la forme de double hélice. L'étude de l'amylopectine par diffraction des rayons X montre que la zone de ramification est une région amorphe alors que la région renfermant les enchaînements en α -(1,4) présente une structure semi-cristalline (Parada, 2012)

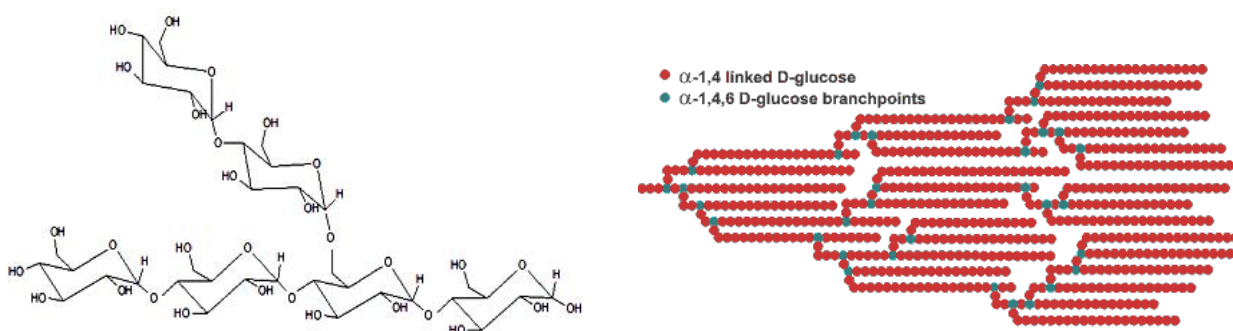


Figure 14 : Structure de l'amylopectine (Parada, 2012)

Industriellement, l'amidon est devenu une agro-ressource de base pour la production d'une grande diversité de produits tels que les édulcorants, les épaississants, les agents d'anti-rassissement, le bioéthanol, les agents de revêtement etc... La complexité et la diversité de ces industries à base d'amidon exige le recours à une large gamme d'enzymes de modification de l'amidon ayant des spécificités différentes et que nous allons décrire ci-après.

2. DONNEES STRUCTURALES ET MECANISTIQUES DES ENZYMES DE DEGRADATION DE L'AMIDON

Les enzymes de dégradation de l'amidon sont classées sur la base de leur homologie de séquences dans les familles GH13, 57, 119, 14, 15 et 32.

2.1 LA FAMILLE GH13

La famille 13 des glycoside hydrolases renferme 13464 séquences dont 723 caractérisées et compte 23 activités enzymatiques différentes regroupant des hydrolases, des

transglycosidases et des isomérases (MacGregor *et al.*, 2001) (données Novembre 2012). Cette famille renferme également des transporteurs d'acides aminés mais ne présentant pas d'activité glycosidase (Fort *et al.*, 2007). Différentes spécificités de substrats et de produits ont été identifiées. L'analyse des homologies de séquences a permis de classer ces différentes enzymes de la familles GH 13 en 37 sous-familles (Stam *et al.*, 2006).

2.1.1 SPECIFICITE DE SUBSTRAT ET DE PRODUIT

La famille GH13 est la famille qui présente le plus de diversité de fonction dans le groupe des enzymes clivant les liaisons α -glycosidiques. Se trouvent ainsi regroupées des enzymes qui catalysent le clivage ou la synthèse de liaisons α -1,4, α -1,6 et plus rarement les liaisons α -1, 2 et α -1,3-glycosidiques (Figure 15) et qui peuvent agir sur une large variété de substrats tels que l'amylose, l'amidon, le glycogène, les maltooligosaccharides ou encore le saccharose et le tréhalose (Kelly *et al.*, 2009).

2.1.2 LES DIFFERENTS TYPES D'ACTIVITES AMYLOLYTIQUES

Les différentes activités amylolytiques regroupées dans la famille GH13 comprennent:

Les Glucohydrolases spécifiques des liaisons α -1,4 : regroupant les activités α -amylase (EC 3.2.1.1), α -glucosidase (EC 3.2.1.20), maltogenic amylase (EC 3.2.1.133), maltotetraose-forming α -amylase (EC 3.2.1.60), cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54), maltohexaose-forming α -amylase (EC 3.2.1.98), maltotriose-forming α -amylase (EC 3.2.1.116), neopullulanase (EC 3.2.1.135) et maltopentaose-forming α -amylase (EC 3.2.1.-) ;

Les Glucohydrolases spécifiques des liaisons α -1,6 : regroupant les activités iso-amylase (EC 3.2.1.68), oligo α -1,6-glycosidase (EC 3.2.1.10) et pullulanase (EC 3.2.1.41).

Les trehalose-6-phosphate hydrolases (EC 3.2.1.93) sont également classées au sein de la famille GH13.

Les Transglucosidases: regroupant les activités amyломaltase (EC 2.4.1.25), cyclodextrine glucanotransférase (EC 2.4.1.19), amylosaccharase (EC 2.4.1.4), saccharose phosphorylase (EC 2.4.1.7) et des enzymes de branchement (EC 2.4.1.18).

Les Isomérases : regroupant les activités trehalose synthétase (EC 5.4.99.16), isomaltulose synthase (EC 5.4.99.11).

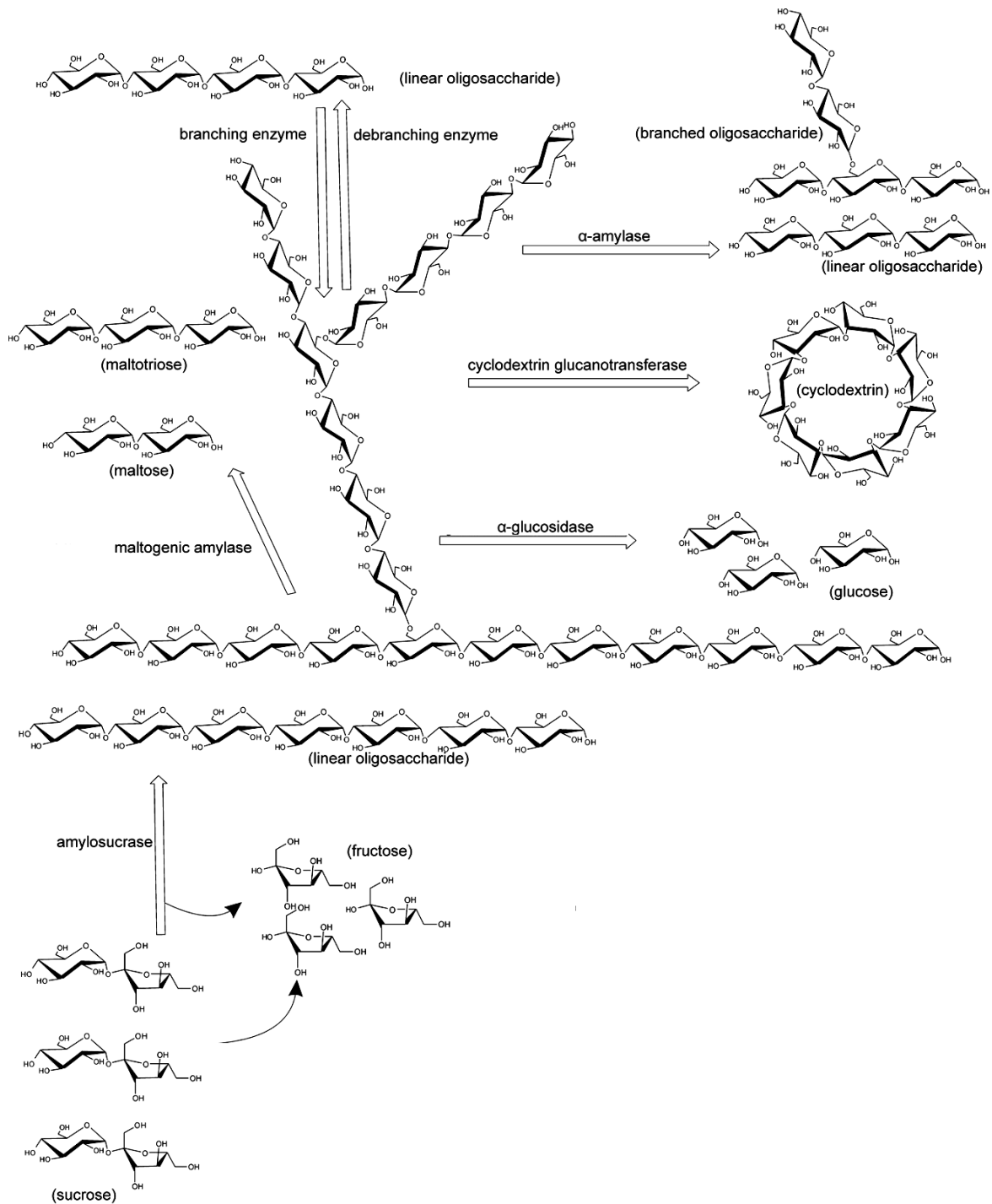


Figure 15 : Représentation schématique de la diversité de fonction des enzymes de la famille GH13 (Kelly *et al.*, 2009).

2.1.3 STRUCTURE ET MECANISME

Les enzymes de la famille 13 sont des enzymes multimodulaires composées de trois à cinq domaines (Figure 16), dont les domaines nommés A, B et C en sont les principales caractéristiques.

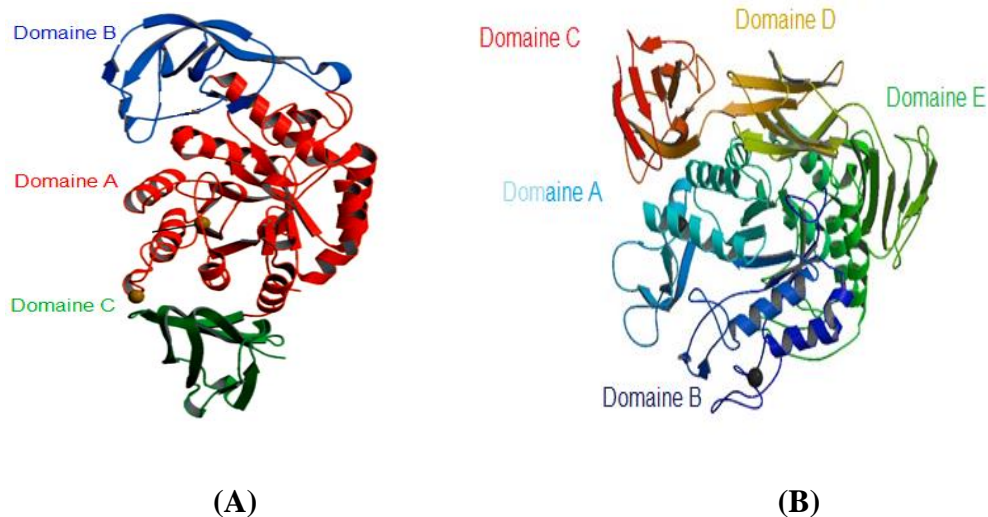


Figure 16 : Structure tridimensionnelle (A) de l' α -amylase de *Bacillus sp.* KSM-K38 (PDB 1UD2) et de (B) la cyclodextrine glucanotransferase de *Bacillus circulans* (PDB 1CDG)

• LE DOMAINE A

Ce domaine situé dans la plupart des cas à l'extrémité N-terminale de la protéine correspond au domaine catalytique et adopte une structure en tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (Macgregor *et al.*, 1996). Le site actif comprend une triade catalytique formée d'un acide glutamique jouant le rôle du donneur de proton, d'un acide aspartique agissant comme nucléophile et d'un second acide aspartique intervenant dans la stabilisation de l'intermédiaire covalent glucosyl-enzyme (Uitdehaag *et al.*, 1999; Yoshioka *et al.*, 1997).

• LE DOMAINE B

Ce domaine correspond à une boucle située entre le brin β -3 et l'hélice α -3 du tonneau $(\beta/\alpha)_8$. C'est un domaine qui est peu conservé et qui comprend des acides aminés très souvent impliqués dans la spécificité des enzymes de la famille 13 (Janecek *et al.*, 1997). A titre d'exemple, pour les α -amylases du genre *Bacillus*, ce domaine présente une structure complexe en feuillets β (Machius *et al.*, 1995).

- LE DOMAINE C

C'est un domaine dit en « clé grecque » très conservé, et essentiellement formé de feuillets β reliés au domaine A. Plusieurs fonctions ont été attribuées à ce domaine. Sa fonction a été peu investiguée. Il est proposé par exemple qu'il contribue à la stabilisation du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (Strobl *et al.*, 1998) et qu'il facilite le parcours du substrat vers le site actif (Qian *et al.*, 1995). De plus, Doyon et ses collaborateurs (2002) ont montré que pour une amylase pancréatique de rat le domaine C est essentiel pour le repliement post -traductionnel de la protéine.

En dehors de ces trois domaines, certaines enzymes de la famille possèdent aussi des modules supplémentaires.

- LE DOMAINE D

La structure du domaine D, retrouvé notamment chez les cyclodextrine glucanotransférases, est analogue à celle des immunoglobulines. Cependant, aucune fonction ne lui a été attribuée jusqu'à présent (Janec̣ek *et al.*, 2003)

- LE DOMAINE E

Composé de feuillets β antiparallèles, le domaine E semble jouer un rôle de binding des molécules de sucres. Deux sites de fixation du maltose ont ainsi été mis en évidence au niveau du domaine E d'une CGTase produite par une souche de *Bacillus circulans*. Cette fixation fait intervenir deux résidus tryptophane et un résidu tyrosine (Jemli *et al.*, 2008).

L'alignement de séquences de différentes α -amylases a permis de mettre en évidence 4 régions conservées (numérotées de I à IV) (Figure 17) (Macgregor *et al.*, 1996) se trouvant au niveau du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ sur les brins 3, 4 et 5 et dans la boucle reliant le brin 7 à l'hélice 7 (Figure 18).

Enzyme	Région VI β2	Région I β3	Région II β4	Région III β5	Région IV β7
TAKA	56_GFTAIWIT-P	117_DVVANH	202_GLRIDTVKH	230_EVLD	292_FVE--NHD
AMY1	34_GVYHVWLP-P	88_DIVINH	176_AWRIDFARG	205_EVWD	286_FVD--NHD
AS	126_GLTYLHLM-P	182_DFIFNH	282_ILRMDAVAF	328_EAIV	388_YVR--SHD
OLG	44_GIDVIWLS-P	98_DLVVNH	195_GFRMDVINP	255_EMPG	324_YWN--NHD
CGT	70_GVTALWISQP	135_DFAPNH	225_GIRVDVAVKH	257_EWFL	323_FID--NHD
SUP	34_AIGGVHLL-P	82_DFMINH	192_LIRLDAFAY	215_EIWD	290_TLD--THD
TRS	54_GVDCLWVP-P	108_DFVMNH	206_GFRLDVAVPY	252_EANQ	322_FLR--NHD

Figure 17. Régions conservées de quelques enzymes de la Famille GH 13 (Sarcabal *et al.*, 2000)

Rouge : résidus strictement conservés (triade catalytique) ; **Bleu** : résidus les mieux conservés. TAKA : α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, AMY1 : α -amylase d'orge, AS : l'amylosaccharase de *N. polysaccharea*, OLG : oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*, CGT : cyclodextrineglucanotransférase de *Bacillus circulans* 8, SUP : sucrose phosphorylase de *Leuconostoc mesenteroides*, TRS : trehalose synthétase de *Pimelobacter* sp. R48.

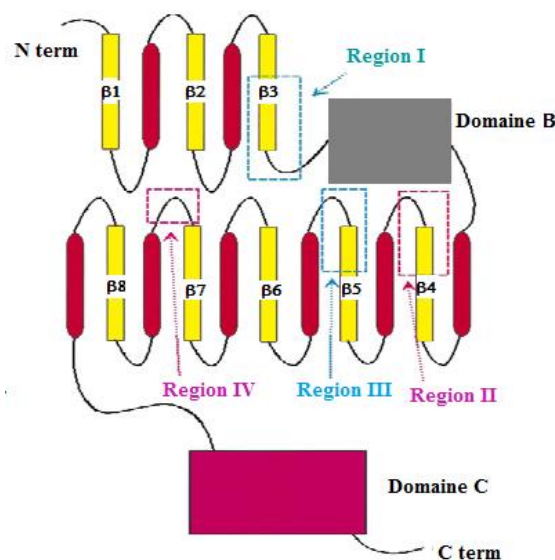


Figure 18 : Positionnement des régions conservées chez les enzymes de la Famille GH 13

L'alignement des structures de différentes enzymes de la famille 13 a révélé que les boucles du domaine A présentent une grande variabilité influençant le nombre des sous-sites de fixation du substrat (Figure 19) qui est propre à chaque enzyme (János *et al.*, 2011).

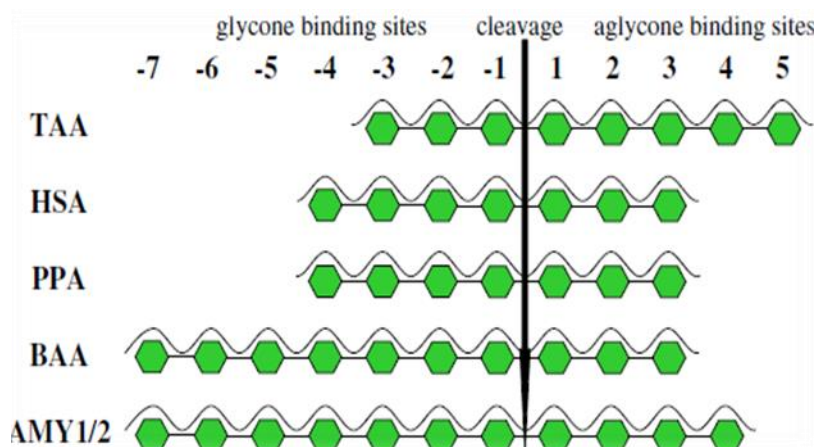


Figure 19 : Architecture du site de fixation du substrat. Les hexagones verts représentent les unités glucosyle du substrat, la flèche noire désigne le site de coupure. TAA : Taka-amylase A (*Aspergillus oryzae*-amylase) ; HSA : amylase salivaire humaine ; PPC : amylase pancréatique de porc ; BAA : α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens*; Amy 1,2 : AMY1, α -amylase de l'orge isoenzyme1; AMY2, isoenzyme 2 (János *et al.*, 2011)

2.2 LA FAMILLE GH57

La Famille 57 des glycoside hydrolases a été créée en 1996 et repose sur l'existence des séquences de deux « α -amylases» qui étaient différentes des α -amylases décrites dans la famille GH13 (MacGregor *et al.*, 2001) : l' α -glucanotransférase thermostable de *Thermophilum Dictyoglomus* découverte en 1988 (Fukusumi *et al.*, 1988) et l' α -glucanotransférase extrêmement thermostable de *Pyrococcus furiosus* identifiée en 1993 (Laderman *et al.*, 1993). Depuis, cette famille s'est élargie et compte aujourd'hui 903 dont 18 caractérisées et représentant 5 spécificités différentes.

2.2.1 MODE D'ACTION

La détermination par RMN des produits de réaction catalysée par l'enzyme de branchement produite par *Thermus thermophilus* ainsi que l'observation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme ont permis de mettre en évidence que l'enzyme agissait selon le mécanisme de rétention de la configuration anomérique décrit par Koshland (cf partie I).

La structure aux rayons X de la 4- α -glucanotransférase de *Thermococcus litoralis* a révélé une distance moyenne de 6,72 Å entre le nucléophile catalytique (Glu123) et le catalyseur acide/base (Asp214) dans la forme libre de l'enzyme (Imamura *et al.*, 2003).

2.2.2 LES DIFFERENTES ACTIVITÉS

La famille GH57 comprend des activités α -amylase (EC 3.2.1.1), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), amylopullulanase (CE 3.2.1.41), 4- α -glucanotransférase (CE 2.4.1.25) et des enzymes de branchement (EC 2.4.1.18).

2.2.3 STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Avant la résolution de la première structure d'une enzyme de la famille GH57, plusieurs efforts ont été déployés pour tenter d'unir cette famille à la famille GH13 dans le clan GH-H. Cependant, l'indépendance de la famille GH57 du clan GH-H est fondée non seulement sur les différences observées dans le domaine catalytique, mais aussi sur les différences des séquences des régions conservées (Janecek, 2002 ; Zona *et al.*, 2004). Les enzymes de la famille GH57 présentent un domaine A constitué du centre catalytique (de type TIM barrel (β/α)₇), un domaine B essentiellement constitué d'hélices alpha imbriquées dans le domaine A et un domaine C (Figure 20).

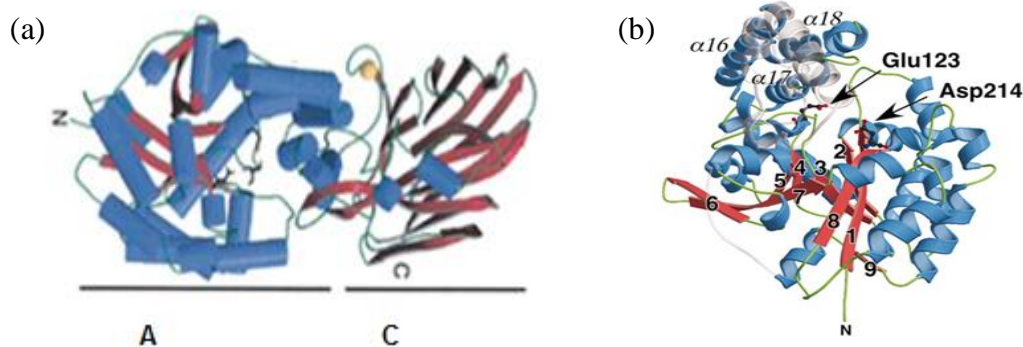


Figure 20 : Structure de (a) la 4- α -glucanotransférase de *Thermococcus litoralis* (PDB 1K1W) et de (b) son domaine catalytique (Imamura *et al.*, 2003)

Les membres de la famille GH57 ont des tailles variables pouvant aller de 400 résidus à 1600 résidus. Certaines enzymes ne présentent pas de domaine C-terminal, comme par exemple les α -galactosidases. D'autres enzymes de la famille, comme les amylopullulanases (1300 résidus) renferment un domaine supplémentaire de type SLH (surface layer homology) formé d'une quarantaine d'acides aminés. Parmi eux, 10 à 15 résidus conservés seraient impliqués dans la fixation de la protéine au niveau de la paroi cellulaire (Zona et Janeček, 2005). A noter que ce domaine SLH a également été décrit chez trois amylopullulanases de la famille GH13.

L'alignement de toutes les séquences disponibles de la famille GH57 (Zona *et al.*, 2004) a permis de mettre en évidence cinq régions conservées. Le nucléophile catalytique (Glu) et le

catalyseur acide/base (Asp) étant situés respectivement dans les régions conservées 3 et 4 (Figure 21). Les résidus His13, Glu79, Glu216 et Asp354 avec Trp120, Trp221 et Trp357 (numérotation de l'amylopullulanase *Thermococcus hydrothermalis*) sont des résidus impliqués dans les spécificités de la famille GH57. Parmi ceux-ci, le Trp221 a déjà été décrit comme un résidu contribuant à l'activité de transglycosylation de l'enzyme 4- α -glucanotransférase de *Pyrococcus furiosus*. En effet sa mutation en Histidine entraîne une nette diminution de l'activité de transglycosylation (Tang *et al.*, 2006).

		1	2	3	4	5
AAMY	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	8_EVHQP	96_GNVELI	142_RNTELI	235_YMDYETFGHEH	349_LQTSNDLNY
PAMY	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	9_EIHQI	98_GCCEFL	143_RNSSLI	240_FMELSALGMA	343_LQASNNFRF
APU	<i>Pyrococcus furiosus</i>	39_HQHQP	262_GNVEVT	314_WAAESA	418_TLDGENPWEH	566_AEASDWFWW
APU	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	40_HQHQP	263_GNVEVT	315_WAAESA	418_TLDGENPVEN	565_AEASDWFWW
APU	<i>Thermococcus litoralis</i>	37_HQHQP	260_GNVEVT	312_WAAESA	416_TLDGENPWEH	562_AEASDWFWW
APU	<i>Thermococcus sibiriacus</i>	45_HQHQP	268_GNVEVT	320_WAAESA	424_TLDGENPWEH	572_AEGSDWFWW
BE	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	10_HTHIP	134_GYVEVI	180_WLPECA	352_PYDTELFQHW	463_LEASDWQFL
BE	<i>Thermus thermophilus</i>	9_HAHLF	135_GQVELI	181_WLPEMA	351_PFDAELEFGHW	456_LEASDWPFLL
BE	<i>Thermotoga maritima</i>	10_HAHLF	135_GKLEIV	182_WLABCG	347_PFDAELEFGHW	460_AQSSDWAFI
4AGT	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	11_HNHQP	76_GQIEIV	120_WLTERV	212_HDDGEKFGVW	350_AQCNDAYWH
4AGT	<i>Pyrococcus furiosus</i>	12_HNHQP	76_GQIEIV	121_WLTERV	213_HDDGEKFGIW	351_AQCNDAYWH
4AGT	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	11_HNHQP	76_GQIEIV	120_WLTERV	212_HDDGEKFGVW	350_AQCNDAYWH
4AGT	<i>Thermococcus litoralis</i>	11_HNHQP	76_GQIEIV	120_WLTERV	212_HDDGEKFGVW	350_AQCNDAYWH
4AGT	<i>Diacyclops thermophilus</i>	12_HNHQP	77_GQIEIV	122_WLABRV	214_FDDGEKFGVW	359_GQANDAYWH
AGAL	<i>Pyrococcus furiosus</i>	7_HGNLQ	69_GLIEIL	114_WLPELA	246_GTDIEFLGYR	331_AENSDARGW
MGA	<i>Pyrococcus furiosus</i>	10_HAYQP	104_TYVEPV	150_WLPENV	251_SSDLESVAV	445_ANHSCPRFW
AMY	Uncultured bacterium	10_HFYQP	106_GHGNAI	151_WLPETA	261_ATDGETYGH	426_MYTSCGWFF

Figure 21: Les cinq régions conservées dans la famille GH57 (Janeček *et al.*, 2012).

en rouge : les résidus catalytiques, en jaune les résidus décrits comme importants dans l'activité ou la spécificité des enzymes. AAMY, α -amylase ; PAMY, α -amylase putative-like protein; APU, amylopullulanase; BE, enzyme de branchement; 4AGT4- α -glucanotransférase; AGAL, α -galactosidase; MGA, maltogenic amylase; AMY, amylase

2.3 LA FAMILLE GH119

La famille 119 des glycosides hydrolases contient l' α -amylase produite par *Bacillus circulans* et cinq autres protéines hypothétiques. A l'heure actuelle, très peu d'informations sur les caractéristiques biochimiques, mécanistiques et structurales de cette famille sont malheureusement disponibles. Janeček et ses collaborateurs (2012) ont très récemment mis en évidence une relation nette entre les familles GH57 et GH119. Une analyse *in silico* indique en effet clairement une similarité entre les régions conservées (Figures 22), les résidus catalytiques et le repliement du domaine catalytique (de type $(\beta/\alpha)_7$ pour ces deux familles). Dans la séquence de l' α -amylase de *B. circulans* les résidus Glu231 et Asp373 jouent

respectivement le rôle de nucléophile et de donneur de proton). Janeček propose de ce fait de regrouper les familles GH57 et GH119 dans un nouveau clan (Janeček *et al.*, 2012)

	CSR1	CSR2	CSR3	CSR4	CSR5
<u><i>GH119:</i></u>					
119_Bacci	40_HNHMP	178_NRLDLI	228_FPT E LG	371_AHDGDNSSGR	502_AKTAEQIWL
119_Cocco	34_HNHMP	172_RSLDLI	222_FPT E LG	367_AHDGDNSSGR	497_AKTAEQIWL
119_Pabcu	48_HNHMP	186_RTMDLI	236_FPT E LG	379_AHDGDNASGR	510_AQTAEQIWL
119_Pabmu_1	38_HNHMP	176_RTMDMV	226_FPT E LG	369_AHDGDNSSGR	500_AKTAEQIWL
119_Pabmu_2	81_HNHMP	219_RTMDMV	269_FPT E LG	412_AHDGDNSSGR	543_AKTAEQIWL
119_Stiau	33_HNHMP	171_RTLDLI	221_FPT E LG	366_AHDGDNSSGR	496_AKTAEQIWL

Figure 22 : Les cinq régions conservées de la famille GH119

Bacci : *Bacillus circulans* AM7 ; **Cocco** : *Corallocooccus coralloides* DSM 2259; **Pabcu**: *Paenibacillus curdolanolyticus*; **Pabmu_1**: *Paenibacillus mucilaginosus* 3016; **Pabmu_2**: *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414 ; **Stiau**: *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1

2.4 LA FAMILLE GH31

La famille 31 des glycosides hydrolases renferme 1871 séquences dont 101 caractérisées correspondant à 6 activités enzymatiques différentes. Elle constitue avec les familles GH27 et GH36 le clan GH-D.

2.4.1 MODE D'ACTION

Les enzymes de la famille GH31, à l'exception des α -glucane lyases, agissent par rétention de la configuration anomérique selon le mécanisme de Koshland. Les α -glucane lyases de la GH31 catalysent quant à elle la dégradation séquentielle des α (1, 4)- D-glucanes à partir de l'extrémité non réductrice, pour libérer du glucose et du 1,5-anhydro-D-fructose. Cette enzyme ne peut pas attaquer les liaisons α -1,6- glucosidiques. De ce fait, la dégradation d'un glucane ramifié tel que l'amylopectine ou le glycogène par ces enzymes conduira à la formation de 1,5-anhydro-D-fructose en plus d'une dextrine limite (Frandsen *et al.*, 1998). Elles procèdent au clivage des polymères via un mécanisme de β -élimination plutôt que par hydrolyse impliquant un intermédiaire glycosyl- enzyme (Figure 23)

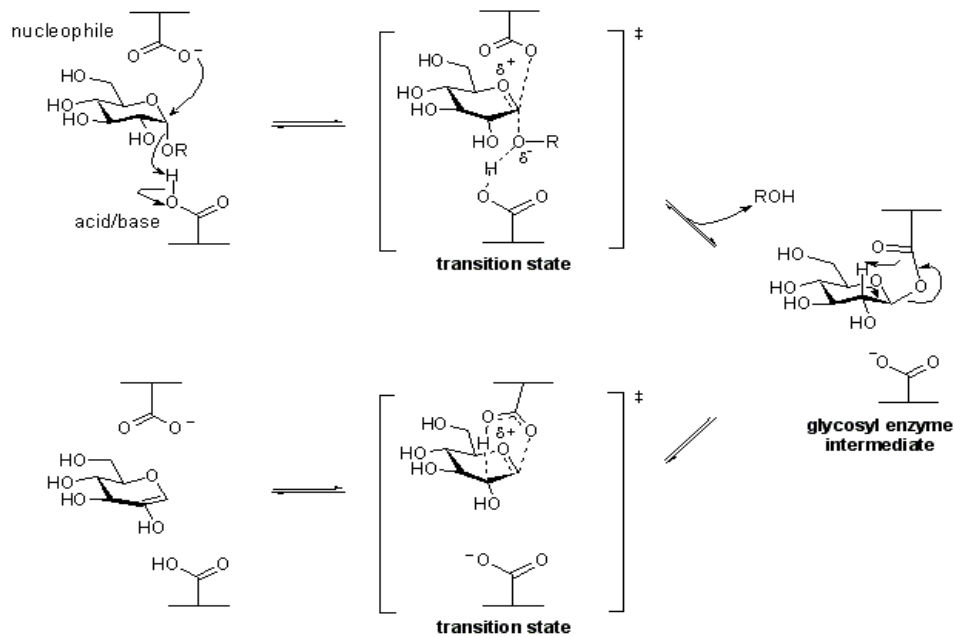


Figure 23 : mécanisme d'action des alpha-glucan lyases (Lee *et al.*, 2003)

2.4.2 LES DIFFERENTES ACTIVITES

La famille GH31 renferme les activités α -glucosidase (EC 3.2.1.20); α -1,3-glucosidases (EC 3.2.1.84); sucrase-isomaltases (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); α -xylosidases (EC 3.2.1.177); L' α -glucan lyases (EC 4.2.2.13) ; isomaltosyltransferases (EC 2.4.1.-). Elle est subdivisée en 4 sous-groupes selon la similarité de séquences entourant le résidu nucléophile (Ernst *et al.*, 2006) (Figure 24).

Sous-groupe	Motif conservé dans la région du nucléophile	Activités enzymatiques
1	Plantes Animaux Champignons Bactéries Archaea * P Y L D G L W L D M N E S N F	α -glucosidase glucoamylase sucrase-isomaltase α -xylosidase
2	Algues Champignons Cyanobactéries * G L F V W Q D M T P A	α -1,4 glucan lyase
3	Archaea Bactéries * G R E W L D E P E	α -xylosidase
4	Bactéries Champignons * G V D F K T D F G E R I P	α -xylosidase

Figure 24 : Les quatre sous-groupes représentatifs de la famille GH31 (Ernst *et al.*, 2006)

2.4.3 STRUCTURE

La première structure tridimensionnelle résolue dans cette famille est celle de l' α -xylosidase d'*Escherichia coli*, publiée en 2005. Depuis, 7 autres structures ont été résolues dont notamment celle de l' α -glucosidase de *R. obeum* (Figure 25) (Tan *et al.*, 2010).

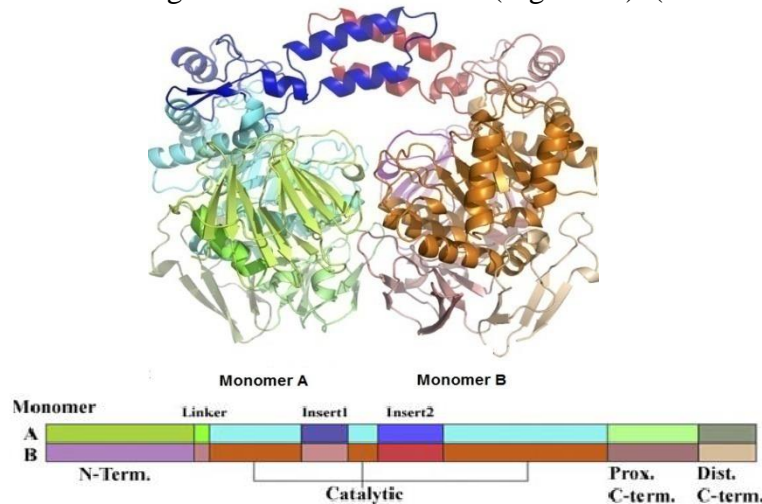


Figure 25. Structure de l' α glucosidase de *R. obeum* ATCC 29174 (PDB 3N04) (Tan *et al.*, 2010)

La structure tridimensionnelle de l' α -glucosidase de *R. obeum* montre que c'est une enzyme dimérique et chacun des monomères présente 4 domaines : un domaine N-terminal (N) de structure type beta sandwich, un domaine catalytique (A) central adoptant une structure en tonneau (β/α)₈, un domaine proximal (C) du côté c-terminal et un dernier domaine distal (D) également en β sandwich. Cette même organisation a été observée pour l' α glucosidase de *Sofolubus solfataricus* (Ernst *et al.*, 2006).

• LE DOMAINE N

Ce domaine est fortement conservé dans la famille GH31. Son rôle est jusqu'à maintenant inconnu, cependant il a été suggéré qu'il puisse être impliqué directement dans la liaison du substrat et le maintien de l'architecture du site actif. En outre, le traitement protéolytique de ce domaine semble avoir modulé la spécificité de substrat de plusieurs enzymes de la famille GH31 appuyant ainsi l'hypothèse que le domaine N est porteur d'un site secondaire de reconnaissance pour le substrat (Monroe *et al.*, 1999 ; Moreland *et al.*, 2005).

• LE DOMAINE CATALYTIQUE (A)

Le domaine A présente une topologie similaire à celui de la famille GH13 mais révèle deux hélices supplémentaires permettant un groupement avec les domaines N et C-terminaux. Les

régions les plus conservées dans la famille GH31 sont situées à l'extrémité C-terminale du tonneau (Figure 26) (Kashiwabara. *et al.*, 2000). Ce dernier renferme les résidus catalytiques identifiés comme étant un acide aspartique jouant le rôle de nucléophile, et un acide glutamique jouant le rôle de catalyseur acide/base ainsi que les résidus intervenant dans la fixation du substrat.

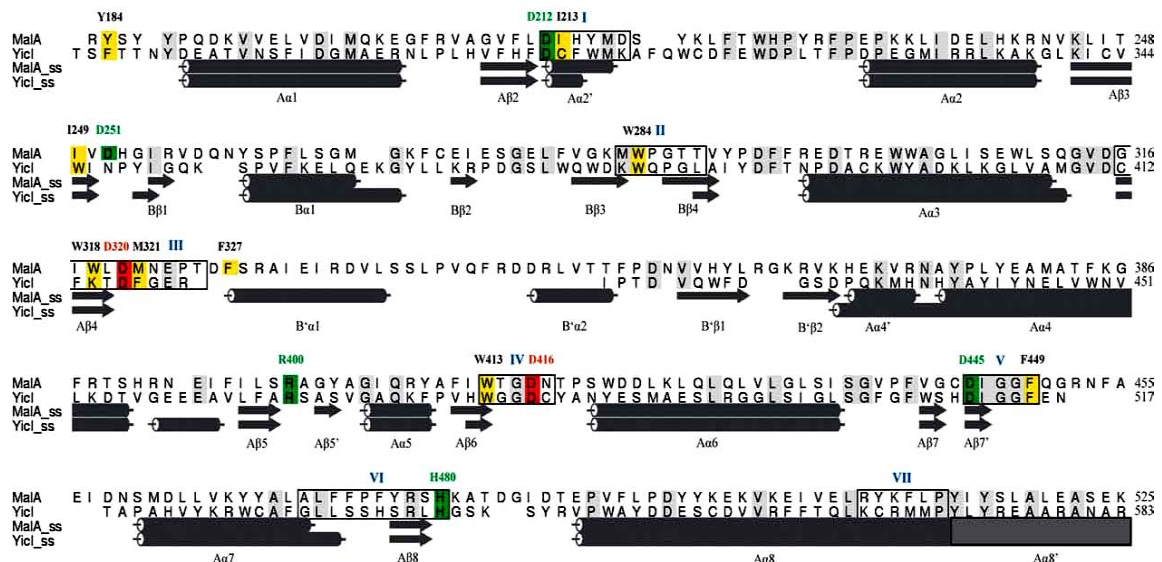


Figure 26 : Les 7 régions conservées observées dans la famille GH 31(Ernst *et al.*, 2006).

En rouge les résidus catalytiques, en jaune, résidus hydrophobes impliqués dans la fixation du substrat .Les régions conservées sont numérotées de I à VII. MalA : α -glucosidase de *Sulfolobus solfataricus* ; YicI : α -xylosidase de *E. coli*

• LE DOMAINE C

C'est le domaine le plus conservé de la famille GH31. Il coopère étroitement avec les domaines A et D et semble jouer un rôle important dans la stabilisation du domaine catalytique. Ce domaine est équivalent au domaine C observé dans la famille GH13 (Ernst *et al.*, 2006).

• LE DOMAINE D

Le domaine distal D représente le domaine le plus variable de la famille GH31. Compte tenu de cette diversité, il aurait évolué pour remplir plusieurs fonctions. Il pourrait jouer le rôle d'un domaine de fixation pour l'amidon natif comme cela a été mis en évidence pour une α -glucosidase végétale. Dans d'autres enzymes de la famille le rôle de ce domaine n'a pas encore été identifié. Notons que chez certaines enzymes de la famille, le domaine D est absent (Okuyama *et al.*, 2004).

2.5 LA FAMILLE GH14

La famille GH14 renferme 327 séquences dont 30 caractérisées et correspondant à une seule activité enzymatique : l'activité β -amylase (EC 3.2.1.2)

2.5.1 MODE D'ACTION

La β -amylase est une exo-enzyme qui hydrolyse les liaisons 1,4- α -glucosidiques à partir des extrémités non réductrices dans des substrats polysaccharidiques de type amidon pour produire du maltose. Cette hydrolyse se produit selon un mécanisme d'inversion de la configuration. L'amylose est hydrolysé à 100% alors que l'amylopectine ne sera hydrolysé qu'à 55-60%. Etant incapable d'hydrolyser les liaisons α 1-6, la β -amylase va agir sur l'amylopectine et s'arrêter à 3 ou 4 résidus glucosyl avant la ramification et libérer des dextrines limites.

2.5.2 STRUCTURE

Les β -amylases se présentent sous forme de trois domaines : un domaine N-terminal catalytique en tonneau (β/α)₈, un deuxième domaine formé par trois boucles et un dernier domaine constitué de feuilletts β (Figure 27). Ce dernier domaine semble jouer le rôle de domaine de fixation au substrat. Le site actif, situé à l'extrémité C-terminale du domaine catalytique, renferme les deux acides glutamiques catalytiques. Le domaine A renferme également un site de fixation pour le calcium qui stabiliserait la structure.



Figure 27 : Structure tridimensionnelle de la β -amylase d'orge PDB (1B1Y) (Mikami *et al.*, 1999)

2.6 LA FAMILLE GH15

La famille GH15 renferme un nombre total de séquences de 1210 dont 62 ont été caractérisées. Elle forme avec les familles 65 et 125 le clan GH-L. A l'heure actuelle, l'activité la plus souvent caractérisée est celle de la glucoamylase (EC 3.2.1.3), aussi connue sous le nom d'amyloglucosidase. D'autres spécificités sont également décrites dans la famille : les activités glucodextranase (EC 3.2.1.70) et α -tréhalase (EC 3.2.1.28).

2.6.1 MECANISME

Les glucoamylases de la famille GH15 sont des exo-enzymes qui agissent à partir de l'extrémité non réductrice selon le mécanisme d'inversion de configuration (Weil *et al.*, 1954). Il a été constaté que les glucoamylases fongiques sont capables de dégrader non seulement les liaisons α -1,4-glycosidiques, mais aussi les liaisons de type α -1, 6, α -1, 3 et α -1,2 (Meagher et Reilly 1989).

2.6.2 STRUCTURE

La glucoamylase d'*Aspergillus awamori* est la première enzyme de la famille GH15 dont la structure a été résolue (Aleshin *et al.*, 1992). Six autres structures sont aujourd'hui disponibles, entre autres celle des glucoamylases de *Trichoderma Reesei* (figure 28) (Botte *et al.*, 2008) et d'*Aspergillus Niger* CBS (Lee *et al.*, 2011)

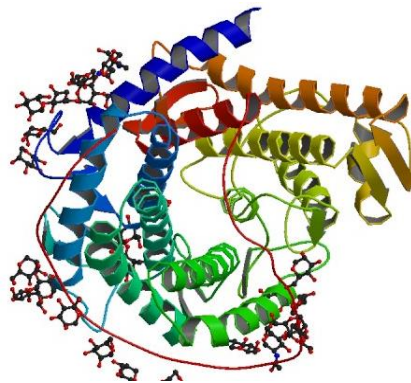


Figure 28 : Structure tridimensionnelle de la glucoamylase de *Trichoderma Reesei* (PDB2VN4)
(Botte *et al.*, 2008)

Les glucoamylases sont généralement formées d'un domaine catalytique et d'un domaine de fixation du substrat, ces deux domaines étant reliés par une chaîne plus ou moins longue d'acides aminés (linker).

• LE DOMAINE CATALYTIQUE

Le domaine catalytique de la glucoamylase d'*Aspergillus awamori* var. X100 est formé par 13 hélices alpha dont douze forment le tonneau (α/α)₆ renfermant le site catalytique. Les deux résidus catalytiques ont été identifiés comme étant deux acides glutamiques (Sauer *et al.*, 2000).

• . DOMAINE DE LIAISON A L'AMIDON

Le domaine de fixation à l'amidon situé du côté C-terminal est formé par 8 brins organisés sous formes de deux feuillets β o rganisés en β -sandwich. Il renferme deux sites de liaisons à l'amidon présentant des structures distinctes (Coutinho *et al.*,1997).

• LA REGION LINKER

La region linker est une région fortement O-glycosylée, essentiellement au niveau de son extrémité C-terminale, et plus précisément au niveau d'un segment d'environ 30 acides aminés qui interagit avec le domaine de fixation à l'amidon. Ce segment semble jouer un rôle très important dans la stabilité, la sécrétion et la digestion de l'amidon natif. Ce segment permet également le positionnement du site de fixation à l'amidon à proximité du domaine catalytique.

3. LES ACTIVITES AMYLOLYTIQUES DU GENRE *BACILLUS*

Au cours des dernières décennies, des recherches considérables ont été entreprises sur les amylases extracellulaires produites par une grande variété de microorganismes (Gupta *et al.*,2003). En particulier, les amylases produites par le genre *Bacillus* sont largement répandues dans les procédés industriels de biotransformation de l'amidon en raison de leur thermostabilité. De nombreux travaux ont été consacrés à leur adaptation à des conditions extrêmes de température et de pH. A cet égard, plusieurs amylases remarquablement stables ont été produites par des techniques de bioingénierie.

3.1 INTERET DE LA PRODUCTION CHEZ *BACILLUS*

Les microorganismes du genre *Bacillus* sont des microorganismes dont la biochimie ainsi que la physiologie ont été très bien étudiées. Certaines espèces possèdent un statut GRAS (Generally Recognized as Safe). Ils possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires (*type* amylases, xylanases ou protéases,

par exemple) à des concentrations de l'ordre de 20 à 25 g/L (Schallmeyer *et al.*, 2004). Ces performances placent ces microorganismes parmi les plus importants producteurs d'enzymes industrielles.

3.2 REGULATION DE LA PRODUCTION DES AMYLASES

Plusieurs études ont montré que les amylases sont produites avec un niveau basal qui va permettre l'hydrolyse de l'amidon et la libération de produits de faible masse moléculaire. Ces produits d'hydrolyse vont pénétrer par la suite dans la cellule et induire la synthèse d'amylases. Dans ce cadre, le maltotétraose a été décrit comme un bon inducteur des amylases aussi bien chez *Bacillus stearothermophilis* (Fergus, 1977) que *Bacillus licheniformis* (Saito et Yamamoto, 1975).

3.2.1 REPRESSION CATABOLIQUE

Chez le genre *Bacillus*, en présence de glucose (substrat facilement assimilable), la biosynthèse des amylases est généralement réprimée. Cette répression implique principalement deux protéines : la protéine HPr composante du système PTS (phosphoenolpyruvate-dépendant phosphotransférase) et la protéine CcpA répresseur de la synthèse des amylases (Martin *et al.*, 1996). Dans ces conditions de répression, certains intermédiaires de la glycolyse comme le fructose-1,6-biphosphate vont activer la HPr kinase (Warner *et al.*, 2000). Cette dernière va phosphoryler la protéine HPr au niveau d'un résidu sérine. La HPr (serP) interagit avec la protéine CcpA et le complexe HPr-CcpA va alors réprimer la transcription des gènes codant pour les amylases, en se fixant sur une séquence consensus *cre* (catabolite responsive element).

3.2.2 RÉGULATION TEMPORELLE

Chez le genre *Bacillus*, la synthèse de plusieurs enzymes est réprimée durant la phase exponentielle de croissance, principalement durant les phases de différenciation cellulaire, et la sporulation. Entre la phase exponentielle et la sporulation, la bactérie passe par un état transitoire au cours duquel elle essaye de chercher de nouvelles sources de nutriments afin de garder son état végétatif. Elle s'adapte alors à ce nouvel environnement par la régulation de la synthèse de certaines protéines (Figure 29). Ce mécanisme fait intervenir deux composantes du système de régulation (Fergus, 2000) :

- une histidine kinase DegS qui va répondre aux changements de certains facteurs (pH, pression, oxygène) se produisant en début de phase stationnaire en phosphorylant une protéine régulatrice DegU au niveau d'un résidu histidine ;
- DegU phosphorylée active certains opérons et induit la synthèse de plusieurs enzymes extracellulaires telles que les amylases.

D'ailleurs, la capacité de la bactérie à s'adapter aux changements environnementaux a incité certains chercheurs à exploiter cette caractéristique pour la surproduction d'amylases. En effet, Mishra et ses collaborateurs ont réussi, en 2005, à surproduire une amylase de *Bacillus subtilis* en induisant un stress oxydatif par l'ajout d'agents inducteurs tel que le peroxyde d'hydrogène.

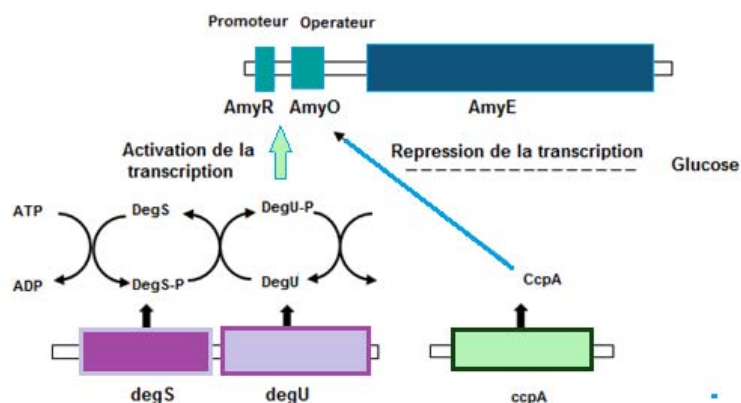


Figure 29: Contrôle de la biosynthèse d'α-amylase chez *Bacillus subtilis* (Priest, 1993)

3.3 MÉTHODE DE PRODUCTION

Comme pour les lichénases, le procédé de production le plus couramment utilisé pour la production des enzymes amylolytiques reste encore aujourd'hui la fermentation en milieu liquide. Cependant de plus en plus d'études s'intéressent à la production de ces enzymes par fermentation en milieu solide (SSF) (Dhayna *et al.*, 2006 ; Hema *et al.*, 2006).

Parmi les substrats solides utilisés, on trouve le son d'orge, les épluchures de pomme de terre, le sorgho ou encore la noix de coco (Kunamneni *et al.*, 2005 ; Ashis *et al.*, 2009). Cependant, le son de blé, souvent complété d'une solution nutritive ou d'amidon, semble être le substrat de choix pour la production en SSF (Kunamneni et Singh, 2005 ; Soni *et al.*, 2005 ; Hashemi *et al.*, 2010). En vue de minimiser davantage le coût de production de ces enzymes en SSF, l'utilisation d'une agro-ressource comme seule composante du milieu de production pourrait être une alternative.

Parmi les agro-ressources décrites comme étant des milieux riches susceptibles de supporter la croissance microbienne et la production enzymatique, le millet est un support prometteur. En effet, cette céréale, peu exploitée jusqu'à présent, appartient à la famille des graminées. Elle est connue par sa tolérance aux conditions extrêmes de sécheresse, d'aridité et d'alcalinité du sol. Comparé aux autres céréales, le millet présente une plus forte teneur en protéines (Caballero *et al.*, 2003) et en minéraux (O'Kennedy *et al.*, 2006).

En 2005, El huq *et al.* ont testé la production d'amylase par *Bacillus licheniformis* sur différentes agroressources (millet, riz, maïs, blé) en fermentation liquide et ont montré que, parmi les agroressources testées, le millet à une teneur de 1.5% (P/P) permettait d'atteindre les meilleurs niveaux de production. En effet, l'activité amylolytique produite sur amidon de pomme de terre atteint le niveau de 700 U/ml contre 936 U/ml lors d'une culture sur millet. De plus, comme le millet riche en protéines et en minéraux, son utilisation a permis de réduire les concentrations de sources d'azote (peptone et extrait de viande) additionnées au milieu de 1% à 0.25% (P/V). A ce jour, les travaux de El Huq restent à notre connaissance les seuls travaux décrivant le millet comme source carbonée pour la production d'enzymes, et ce uniquement en milieu liquide. L'utilisation du millet comme substrat de fermentation en milieu solide semblait donc intéressante à tester.

4. APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES ACTIVITES AMYLOLYTIQUES

Commercialisées pour la première fois en 1984 (Gupta *et al.*, 2003), les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie, leur marché représentant environ 25% du marché mondial des enzymes (Rajagopalan and Krishnan, 2008; Reddy *et al.*, 2003). Elles trouvent des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles, ou encore de l'industrie pharmaceutique.

4.1 LIQUEFACTION DE L'AMIDON ET LA SACCHARIFICATION

Les enzymes amylolytiques sont très utilisées pour la production d'hydrolysats d'amidon, en particulier de sirops à haute teneur en fructose très utilisés comme édulcorants dans les boissons gazeuses. Le processus comprend deux étapes enzymatiques : la liquéfaction et la saccharification. Il exploite toute une panoplie d'enzymes qui, utilisées seules ou en synergie, donnent un ensemble varié de produits (Buléon *et al.*, 1990). (Figure 30).

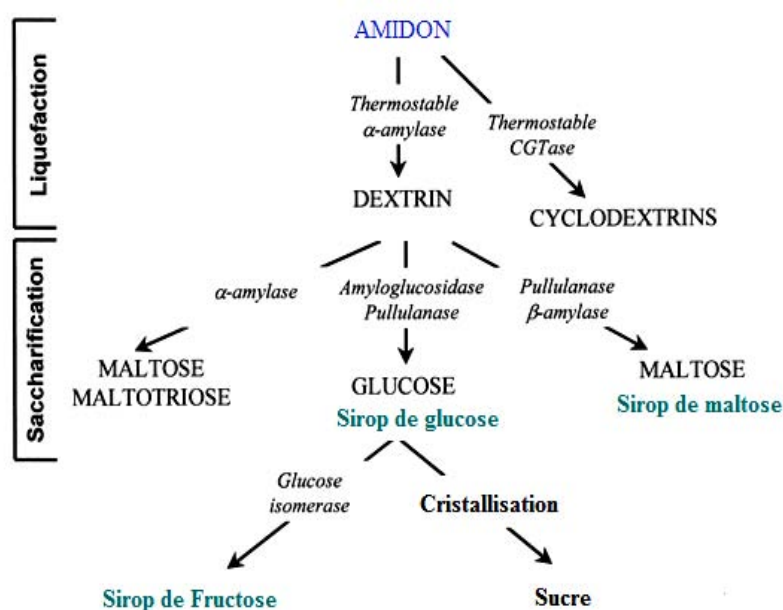


Figure 30 : Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose

4.2 PAIN ET INDUSTRIE DE LA BOULANGERIE

Les amylases sont aussi largement employées en panification afin d'améliorer les propriétés texturales et rhéologiques de la pâte à pain. L'addition d'amylase à des doses spécifiques dans des farines à faible pouvoir diastasique permet d'améliorer les propriétés fermentaires de la pâte, permettant une amélioration du volume et de la texture du produit (Hamer, 1995)

Lors du stockage, la mie est susceptible de devenir sèche et ferme, la croûte perd son croquant, le goût du pain est détérioré, la durée de vie du produit est réduite. Tous ces changements indésirables dans le pain sont connus sous le nom de rassissement. L'amidon et ses constituants (l'amylose et l'amylopectine) sont les molécules responsables du rassissement. En effet, suite à la cuisson, l'organisation cristalline des grains d'amidon se trouve largement dégradée. Au cours du refroidissement et de la conservation, l'amylose et l'amylopectine ont tendance à recristalliser, ce qui conduit au rassissement du produit (Morgan *et al.*, 1997).

Les additifs classiquement utilisés pour empêcher le rassissement et améliorer la texture et la saveur du pain comprennent des produits chimiques, des émulsifiants (monoglycérides, diglycérides, esters de sucre, lécithine, etc...) (Azizi *et al.*, 2003). Une alternative consiste aussi à rajouter des amylases thermorésistantes pour limiter la vitesse de rassissement du pain en hydrolysant partiellement les zones amorphes de l'amidon rétrogradé.

4.3 DÉSENCOLLAGE DES TEXTILES

Les procédés modernes de production de textiles exigent souvent l'application de fortes pressions entraînant le cassage des fils, notamment pendant le tissage. Pour remédier à cela, une couche de protection temporaire peut être appliquée sur les fils, dont l'amidon constitue un des matériaux attrayant par son faible coût et sa disponibilité. Il sera ensuite facilement éliminé par dégradation enzymatique à l'aide d'amylases (Hendriksen *et al.*, 1999).

4.4 PRODUCTION DE BIOCARBURANT

Plus récemment, la commercialisation d'amylases a été fortement stimulée par le développement des biocarburants de première génération, en particulier pour la production de bioéthanol. L'amidon est, en effet, le substrat le plus utilisé en raison de son faible prix et de sa disponibilité (Chi *et al.*, 2009). La bioconversion de l'amidon en éthanol comprend une première étape de liquéfaction et de saccharification faisant intervenir des microorganismes amylolytiques, généralement suivie d'une étape de fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Oner 2006). Suite à son activité thermostable, l'amylase produite par *Bacillus licheniformis* est souvent décrite pour cette première étape d'hydrolyse des suspensions d'amidon (Sanchez et Cardona, 2008).

Afin d'obtenir une nouvelle souche de levure qui puisse directement produire de l'éthanol à partir d'amidon sans avoir recours à une pré-saccharification, la fusion de protoplastes a été réalisée entre la levure amylolytique *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae* (chi *et al.*, 2009).

4.5 LA DETERGENCE

Les amylases sont les enzymes les plus utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques derrière les protéases. Plus de 90% des détergents liquides en contiennent (Gupta *et al.*, 2003 ; Hmidet *et al.*, 2009 ; Mitidieri *et al.*, 2006). Ces enzymes sont utilisées pour dégrader les résidus de féculents tels que les pommes de terre, les sauces, crème, chocolat...

La stabilité des amylases est l'un des critères les plus importants pour leur utilisation dans les détergents qui sont très agressifs du fait du pH, de la température et de l'environnement très oxydant dû à la présence d'agents chlorés. De plus, ces enzymes montrent généralement une dépendance au calcium et leur stabilité se trouve gravement compromise dans un environnement pauvre en calcium, d'où la nécessité d'isoler des amylases calcium-indépendantes et stables dans des conditions extrêmes de pH et température.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

ABEL, M., A. PLANAS, et al. Presteady-state kinetics of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase: binding and hydrolysis of a 4-methylumbelliferyl trisaccharide substrate. *Biochem J* 2001, **357**, 195-202.

ALESHIN A, GOLUBEV A, FIRSOV LM, *et al.* crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.2Å^o resolution. *J Biol Chem*, 1992, 267, p. 19291-19298

ANISH R, RAO M. Biochemical characterization of a novel β -1-3, 1-4 glucan 4-glucanohydrolase from *Thermomonospora* sp. having a single active site for lichenan and xylan. *Biochimie*, 2007, 89, p.1489-1497

APIRAKSAKORN, J. (2006). "Characterization of Grass Degrading Bacteria Active on β -1,3-1,4-D-glucans from *Bacillus subtilis* GN156 Potential Use for Grass Silage-Making."

ASHIS K, MUKHERJEE MB, SUDHIR RK. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation ad exploration of feasibility for inclusion of alpha amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng.*, 2009, 43, p.149-156

AUTIO K. Functional aspects of cereal cell wall polysaccharides. In *Carbo-hydrates in food*. Eliasson A-C (ed.), Marcel Dekker, New York, 1996, p. 227-264

AZIZI M.H., RAJABZADEH N., RIAHI E., Effect of mono-diglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 2003, 36, 189–193.

B

BAE B, OHENE-ADJEI S, KOCHERGINSKAYA S, *et al.* Molecular basis for the selectivity and specificity of ligand recognition by the family 16 carbohydrate-binding modules from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* ManA. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 18, p.12415-12425

BANAÏT, N. S., and JENCKS, W. P. (1991) *Journal of the American Chemical Society* 113, 7951-7958.

BOLAM DN, CIRUELA A, MCQUEEN-MASON, S *et al.*, *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem.*, 1998, p.775-781

BORASTON A B, BOLAM D N, GILBERT HJ, *et al.*, Carbohydrate binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 2004, 382, p.769- 781

BOTT, R., SALDAJENO, M., CUEVAS, W., WARD, D *et al.* Three-dimensional structure of an intact glycoside hydrolase family 15 glucoamylase from *Hypocrea jecorina*. *Biochemistry*, 2008, **47**, 5746-5754

C

CABALLERO B, TRUGO LC, FINGLAS PM. *Food Sciences and Nutrition*, 2003, 2ed, (Ed.)

CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37,233-238

Celestino KR, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a beta-glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry.. *BMC Biochem.* 2006 ,5, 7-23.

CHI Z, CHI Z, LIU G, *et al.* *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 2009, 27, p.423-431

CHAARI, F., KAMOUN, A., BHIRI, F., BLIBECH, M., ELLOUZ-GHORBEL, R., ELLOUZ-CHAABOUNI, S. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly iso-lated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. *Ind. Crops Prod.*2012a, 40, 192–198.

CHAARI, F., BHIRI, F., BLIBECH, M., MAKTOUF, S., ELLOUZ-CHAABOUNI, S., ELLOUZ-GHORBEL, R. Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: purification and characterization. *Process Biochem.*2012b, 47, 509–516.

COUTINHO PM, REILLY PJ. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships, *Proteins*, 1997, 29, p. 334-347

COUTINHO PM, HENRISSAT B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated Database approach, p. 3, Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1999

COUTO SR, SANROMÁN MA. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Food Engineering*, 2006, 76, p.291-302

D

DAVIES G, HENRISSAT B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995, 3, p.853-859

DAVIES, G. J., WILSON, K. S., & HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* 1997. **321 (Pt 2)**, 557-9.

DEAN RA, TALBOT NJ, EBBOLE DJ, *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 2005, 434, p. 980-986

DEMEYER DI, MEULEMEESTER M, DE GRAEVE K, GUPTA BW .Effect of fungal treatment of nutritive value of straw. *Med Fac Landbouwn Rijksuniv Gent* , 1988, 53, 1811-1819

DIVNE, C., STAHLBERG, J., TEERI, T. T. & JONES, T. A.High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50Å ° long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* 1998,275, 309–325.

DOYON, Y., HOME, W., *et al.*. Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic alpha-amylase secretion and activity. *The Biochemical Journal*,2002, 362, 259-264

F

FERGUS G PRIEST, (2000).Enzymes, extracellular.enEncyclopedia of microbiology, 2,210-221.

FERRARI B, BARONCHELLI M, *et al.* Constitutive differences between steely and mealy barley samples associated with endosperm modification. *Journal of the Science of Food and Agriculture* ,2010, 90, 12, p.2105-2113.

FORT J, DE LA BALLINA LR, *et al.* The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282, 43; 31444-52

FRANSEN TP, SVENSSON B. Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol. Biol.* 1998, 37, p. 1-13

FUKUSUMI S, KAMIZONO A, HORINOUCI S, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur. J. Biochem.* 1988, 174, p.15-21

FURTADO GP, RIBEIRO LF, *et al.* Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry*, 2011,46,5, p.1202-1206

G

GAISER OJ, PIOTUKH K, *et al.* Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *J. Mol. Biol.* 3006, 357, 1211-1225

GANGADHARAN D, SIVARAMAKRISHNAN S, NAMPOOTHIRI KM, *et al.* Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol*, 2008, 99, p.4597-4602

GILKES, NR, HENRISSAT B, *et al.* Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev*, 1991, 55, 2, p.303-315.

GOFFEAU A, BARRELL, BG, BUSSEY, H, *et al.* Life with 6000 genes. *Science*,1996, 274, 546, p. 563-7.

GREGG KJ, FINN R, ABBOTT DW, BORASTON AB. Divergent Modes of Glycan Recognition by a New Family of Carbohydrate-binding Modules. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 18, p.12604-12613

GUIMARÃES BG, SOUCHON H, LYTLE BL, *et al.* The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase cels, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome, *J. Mol. Biol*, 2002, 320, p. 587-96

GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, *et al.* Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 2003, 38, p.1599 -1616

H

HAMER, R. 1995. *Enzymes in the baking industry in Tucker GA, Woods LFJ editors.* Black Academic and Professional, Galsgow.

HASHEMI M, RAZAVI SH, SHOJAOSADATI S A, *et al.* Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Biosci. Bioeng.*, 2010, 110, p.333-337

HASHIMOTO H. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 2006, 63, p. 2954-2967

HASHIMOTO H. Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cell. Mol. Life Sci*, 2006, 63, p. 2954-2967

HENDRIKSEN H, PEDERSEN S, BISGARD-FRANTZEN H. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent Application WO*, 1999, 99/35325.

HENRISSAT B, BAIROCH A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities. *Biochem*, 1993, 293, p.781-788

HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem*, 1991, 280, p. 309-316

HEMA A, TRIVEDI UB, PATEL KC. Glucoamylase production by solid state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate, *Bioresour. Technol.* 2006, 97(10): 1161-1166.

HOLKER U, HÖFER M, LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64, p.175-186

HOZOVA B, KUNIAK L, MORAVCIKOVA P, *et al.* Determination of water-insoluble β -D-glucan in the whole-grain cereals and pseudocereals. *J. Food Sci*, 2007, 25, p. 316-324
HRMOVA M, BANIK M, HARVEY AJ, *et al.* *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, 21, p.67-72

I

IMAMURA H, FUSHINOBU S, YAMAMOTO M, *et al.* Crystal structures of 4-alpha-glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, p. 19378-19486

J

JANEČEK Š, KUČTOVA A. In silico identification of catalytic residues and domain fold of the family GH119 sharing the catalytic machinery with the α -amylase family GH57. *FEBS Lett.* 2012, 586, p. 3360-3366

JANECEK S, SVENSSON B, MAC GREGOR E A. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49, p.429- 440

JANECEK S. A motif of a microbial starch-binding domain found in human genethonin. *Bioinformatics*, 2002, 18, 11, p.1534-1537

JÁNOS A. MÓTYÁN, GYÖNGYI GYÉMÁNT JÁNOS HARANGI PÉTER BAGOSI Computer-aided subsite mapping of α -amylases. *Carbohydrate Research*, 2011,346, 3, p. 410-415

JEMLI S, BEN ME, et al .The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain: molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *J Biomed Biotechnol* 2008:692573

JUNCOSA M, PONS J, DOT T *et al.* Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-b-D-glucan 4- glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *Biol. Chem.*, 1994, 269, p. 14530-14535

K

KASHIWABARA S, AZUMA S, TSUDUKI M. *et al.* The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric α -glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, p. 1379-1393

KEITEL T, SIMON O, BORRISS R, *et al.* Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993.,**90**,11, p. 5287-5291.

KELLY CT, BOLTON DJ, FORGATY WM. Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnology letters*, 1997, 197, p. 675-677

KELLY, R.M., L. DIJKHUIZEN AND H. LEEMHUIS. Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. *J. Biotechnol.*, 2009,140: 184-193.

KIM H, AHN JH, GÖRLACH JM, *et al.* Mutational analysis of beta-glucanase genes from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Mol. Plant Microbe Interact*, 2001, 14, p. 1436-43

KOSHLAND DE. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.Camb. Philos. Soc*, 1953, 28, p. 416-436.

KUNAMNENI A, KUTTANPILLAI SK, SUREN S. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of alpha-amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of alpha-amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. *Afr. J. Biotechnol.*, 2005, 4, p.708- 716

KUNAMNENI A, SINGH S.. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochem.Eng*, 2005, 27, p. 179-190.

L

LADERMAN KA, ASADA K, UEMORI T, *et al.* Alpha-amylase from the hyperthermophilic *Archaeobacterium pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, p. 24402-7

LEE SS, YU S, AND WITHERS SG. *Detailed dissection of a new mechanism for glycoside cleavage: alpha-1,4-glucan lyase*. *Biochemistry*. 2003 11;42(44):13081-90.

M

MACGREGOR EA, JANECEK S, SVENSSON B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1546, p.1-20

MACGREGOR EA, JESPERSEN HM, SVENSSON B. A circularly permuted alphaamylase-type alpha/beta-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett*, 1996, 378, p.263-266

MACHIUS M, WIEGAND G, HUBER R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* amylase 2.2-_A resolution. *Mol. Biol*, 1995, 246, p. 545-559

MALUMBA P, SEBASTIEN J, CLAUDE D, *et al.* Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011, 15, 2, p. 315-326

MARTIN I. VOSKUIL AND GLENN H. CHAMBLISS Significance of HPr in Catabolite Repression of α -Amylase JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1996, 7014–7015

MEIKLE PJ, HOOGENRAAD NJ, *et al.* A (1→3,1→4)- β -glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1→3,1→4)- β -glucans *The Plant Journal*, 1994, 5,1, p. 1-9

MENON, V., R. DIVATE, AND M. RAO. 2011. Bioethanol production from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp and thermotolerant yeast. *Fuel Process Technol* 92:401-406.

Michel G, Chantalat L, *et al.* The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases. *Structure*. 2001 9(6):513-25.

MONROE JD, GOUGH CG, CHANDLER LE, *et al.* Structure, properties, and tissue localization of apoplastic α -glucosidase in crucifers. *Plant Physiol*, 1999, 119, p. 385-397

MORELAND RJ, JIN X, ZHANG XK, Decker, *et al.* Lysosomal acid α -glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *J. Biol. Chem*, 2005, 280, p. 6780-6791

MORGAN KR, GERRARD JA, EVERY D, *et al.* Staling in starch breads: the effect of anti-staling bread α -amylases. *Starch*, 1997, 49, p. 54-59

O

O'KENNEDY MM, GROOTBOOM A, SHEWRY PR. Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. *cer.Sc*, 2006, 44, p. 224-235

ÖNER ET. Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 2006, 23, p. 849-856.

P

PARADA J, AGUILERA J M. Effect of native crystalline structure of isolated potato starch on gelatinization behavior and consequently on glyceimic response. *Food Research International*. 2012, 45, p. 238-243

PLANAS A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1543, p. 361-382

PRIEST FG. Enzymes, extracellular, *Encyclopedia of microbiology.*, 2000, 2, p.210-221

PRIEST FG. Extracellular enzymes synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.*, 1977, 41, 3, p.711-753

R

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

RAJAN SS, YANG X, COLLART F, *et al.* Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺ -dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, 2004, 12, 9, p. 1619-29

Ramachandra Kini K , Vasanthi N.S. Umesh-Kumar Shekar Shetty, H. Purification and properties of a major isoform of b-1,3-glucanase from pearl millet seedlings. *Plant Sci*, 2000, 150, 139–145

REDDY NS, NIMMAGADDA A, SAMBASIVA RAO KRS. An overview of the microbial alpha-amylase family. *Afr. J. Biotechnol*, 2003, 2, p. 645-648

S

SAASTAMOINEN M, HIETANIEMI V, PIHLAVA J-M, *et al.* β -glucan contents of groats of different oat cultivars in official variety, in organic cultivation, and in nitrogen fertilization trials in Finland. *Agric. Food. Sci*, 2004, 13, p. 68-79

SAITO N, YAMAMOTO K. Regulatory factors affecting alpha amylase production in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol*, 1975, 121, p.848-856

SANCHEZ OJ, CARDONA CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, 2008, 99, p. 5270-5295

SCHOU, C., RASMUSSEN, G., KALTOFT, M.-B., HENRISSAT, B. AND SCHIILEIN, M. Specificity, kinetics and stereochemistry of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases. *European J. Biochem.* 1993, 217, 947-953.

SINNOT, M. L. 1990. Catalytic mechanisms of glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**.

SONI SK, KAUR A, GUPTA JK. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochem*, 2003, 39, p.185-192

STONE BA, CLARKE AE. *Chemistry and Biology of 1,3- β -Glucans*. La Trobe University Press, Bundoora, Australia. 1992.

STROBL S, MASKOS K, BETZ M, *et al.* Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol*, 1998, 278, p. 617-628

STROHMEIER, M., HRMOVA, *et al.* "Molecular modeling of family GH16 glycoside hydrolases: potential roles for xyloglucan transglucosylases/hydrolases in cell wall modification in the poaceae." *Protein Sci*, 2004, 13(12): 3200-3213.

SULZENBACHER G, SHARECK F, MOROSOLI R, *et al.* The *Streptomyces lividans* Family 12 Endoglucanase: Construction of the Catalytic Core, Expression, and X-ray Structure at 1.75 Å Resolution. *Biochemistry*, 1997, 36, p. 16032-16039

SUN, J., H. WANG, *et al.* "Cloning and expression of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350." *Annals of Microbiology*, 2011, 1-8.

TANG SY, YANG SJ, CHA H, *et al.* Contribution of w229 to the transglycosylation activity of 4-alpha-glucanotransferase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 1764, p. 1633-1638

U

UITDEHAAG JCM, MOSI R, KALK KH, *et al.* X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alphaamylase family. *Nat. Struct. Biol.* 1999, 6, 5, p. 432-436

V

VILADOT JL, DE RAMON E, DURANY O, *et al.* Probing the mechanism of Bacillus 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry*, 1998, 37, p. 11332-42

VOCADLO DJ, DAVIES GJ, LAINE R, *et al.* Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 2001, 412, 6849, p. 835-838

W

WELFLE, K; , MISSELWITZ, R; WELFLE, H; POLITZ, O; BORRISS, R. Influence of Ca²⁺ on conformation and stability of three bacterial hybrid glucanases . *Eur. J. Biochem.* 1995, 229, 726-735.

WOODWARD JR, FJ MORGAN, GB FINCHER 1982 Amino acid sequence homology in two 1,3; 1,4-fl-glucan endohydrolases from germinating barley (*Hordeum vulgare*). *FEBS Lett* 138: 198-200

Y

YANG P, SHI P, WANG Y *et al.* Cloning and overexpression of a *Paenibacillus* beta-glucanase in *Pichia pastoris*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17,1, p. 58-66

YANO S, RATTANAKIT, N, WAKAYAMA M, *et al.* A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004, 68,6, p. 1299-1305

YIP VL, VARROT A, DAVIES GJ, *et al.* An unusual mechanism of glycoside hydrolysis involving redox and elimination steps by a family 4 beta-glycosidase from *Thermotoga maritima*. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 27, p. 8354-8355

YOSHIOKA Y, HASEGAWA K, MATSUURA Y, *et al.* Crystal structures of a mutant maltotetraose-forming exo-amylase cocrystallized with maltopentaose. *Mol Biol*, 1997, 271, p. 619-628

Z

ZONA R, CHANG-PI-HIN F, O'DONOHUE MJ, *et al.* Bioinformatics of the glycoside hydrolase family 57 and identification of catalytic residues in amylopullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*. *Eur. J. Biochem*, 2004, 271, p. 2863-2872

ZONA R, JANEČEK Š. Relationships between SLH motifs from different glycoside hydrolase families. *Biologia Bratislava*, 2005, 16, p.115-121

MATERIEL ET METHODES

1. CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU MILLET

1.1. DÉTERMINATION DU TAUX D'HUMIDITÉ

La détermination de la teneur en eau consiste en la détermination de la perte de masse du produit porté pendant 1h30 min à une température comprise entre 130 et 133°C.

1.2. DÉTERMINATION DU TAUX DE CENDRES

La teneur en cendres est déterminée après incinération de la matière sèche du produit à 550 °C pendant 4 heures

1.3. DETERMINATION DE LA COMPOSITION MINERALE

Les ions: calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+), sodium (Na^+), magnésium (Mg^{2+}), fer (Fe^{2+}), cuivre (Cu^{2+}) et zinc (Zn^{2+}) sont dosés par un spectrophotométrie d'absorption atomique. Cette analyse a été réalisée à l'Unité de Services communs «Adsorption atomique» de l'ENIS.

1.4. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES

Le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1995). Le principe de cette méthode consiste à minéraliser puis à distiller la prise d'essai. L'ammoniac ainsi formé est titré par une solution d'acide sulfurique 0,1N. Le coefficient utilisé pour exprimer le taux de protéines à partir du taux d'azote est de 5,7.

1.5. DOSAGE DE LA MATIERE GRASSE LIBRE

L'extraction de la matière grasse libre se fait à chaud grâce à l'éther de pétrole par distillation à 40-60°C pendant au moins 6 h. Cette opération est réalisée à l'aide d'un appareil Soxhlet.

1.6. ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA MATIERE GRASSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

- **Préparation des esters méthyliques d'acides gras**

La préparation des esters méthyliques d'acides gras a été réalisée suivant la méthode décrite par Metcalfe *et al* (1966). Elle consiste dans un premier temps à saponifier 50 µl de lipide en présence de 2 ml d'hexane et de 200 µl d'une solution méthanolique de KOH (2 N). Le mélange est homogénéisé et centrifugé pendant 2 min à 1000 rpm. La phase aqueuse est récupérée et mélangée avec 200 µl d'acétate de sodium. Après centrifugation, la phase organique est lavée avec 500 µl d'eau distillée. Les esters méthyliques se trouvent dans la phase organique.

- **Chromatographie en phase gazeuse**

Les esters méthyliques d'acides gras obtenus sont séparés par un système de Chromatographie en phase gazeuse Shimadzu, GC 17A (colonne capillaire polaire de type DB-wax, 30 m x 0.25 mm, J&W Scientific). Le gaz vecteur est l'azote avec un débit 1.13 ml/min. Un gradient de température du four est de 100 à 150°C avec un taux de 30°C/min, un premier palier à 150°C pendant 5 min, un chauffage jusque 190°C à un taux de 10°C/min, un second palier à 190°C pendant 14 min, un chauffage à 255°C à 5°C/min, et un dernier palier à 255°C pendant 10 min. Les températures du détecteur à ionisation de flamme (FID) et de l'injecteur sont respectivement 270°C et 255°C. Les acides gras sont identifiés en fonction de leurs temps de rétention par comparaison avec ceux des acides gras étalons. Un calcul qualitatif des pourcentages en acides gras est le rapport entre la surface du pic correspondant à un acide gras et la somme des surfaces des pics correspondant aux autres acides gras a été utilisé comme une estimation (non quantitative) du pourcentage de l'acide gras considéré.

1.7. DETERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON

La teneur en amidon est déterminée par la méthode enzymatique. Pour cela, deux enzymes sont utilisées: l' α -amylase et l'amyloglucosidase. Le pourcentage d'amidon est déterminé après avoir mesuré le taux de glucose libéré après l'hydrolyse (Dubois *et al.*, 1956).

1.8. DETERMINATION DE LA TENEUR EN CELLULOSE

La teneur en cellulose a été déterminée selon la méthode décrite par Updegraff (1969).

2. ETUDE DES PROPRIÉTÉS TECHNOLOGIQUES DU MILLET

2.1. POUVOIR DE RETENTION D'EAU

Le pouvoir de rétention d'eau est mesuré par la méthode décrite par Lin and Zayas (1987). 100 mg de farine sont trempés dans 10 ml d'eau distillée pendant une nuit à 30°C. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 50 min à 14000 g. Le surnageant est éliminé soigneusement par aspiration sous vide. L'eau non fixée est décantée et la masse d'eau retenue est déterminée par différence.

Le PRE est exprimé en gramme d'eau fixée par gramme d'échantillon. Il est calculé par l'expression suivante :

$$PRE = \frac{\text{masse humide} - \text{masse sèche}}{\text{masse sèche}}$$

2.2. POUVOIR DE RETENTION D'HUILE (PRH)

Le pouvoir de rétention d'huile est mesuré par l'addition de 10 ml d'huile de maïs à 0,5 g de farine. La mixture est mélangée 30 secondes toutes les 5 minutes pendant 30 minutes et ensuite centrifugé à 1600 g pendant 25 minutes. L'huile non fixée est éliminée et la masse d'huile retenue est déterminée par différence (Lin et Zayas., 1987). La capacité de rétention d'huile est exprimée en grammes d'huiles retenues par gramme d'échantillon selon la relation suivante :

$$PRH = \frac{\text{masse après décantation} - \text{masse de la prise d'essai}}{\text{masse de la prise d'essai}}$$

2.3. PROPRIETES RHEOLOGIQUES: ALVEOGRAPHE CHOPIN

L'effet de l'incorporation de la farine de millet sur les propriétés rhéologiques d'une farine a été étudié moyennant l'alvéographe Chopin. Cette méthode consiste à former une bulle en insufflant de l'air sous une fine lamelle de pâte de farine jusqu'à sa rupture. L'alvéogramme représente l'évolution de la pression d'air résultante en fonction du temps.

L'alvéogramme permet d'évaluer principalement quatre paramètres:

- W: force boulangère de la pâte exprimée en 10-4 joules. C'est le travail nécessaire pour développer la bulle jusqu'à sa rupture ;
- P: pression maximale atteinte au cours de l'essai. Elle se rend compte de la ténacité de la pâte et de sa résistance à la déformation ;
- L: l'extensibilité de la pâte correspondant à l'abscisse moyenne (min) de la rupture ;
- P/L: rapport de la ténacité sur l'extensibilité. Il renseigne sur l'équilibre général de l'alvéogramme. Ce rapport est considéré comme un indicateur de la capacité de rétention du gaz de la pâte et de son pouvoir d'hydratation. Une valeur proche de 1, traduisant l'équilibre entre la valeur de P et L, est nécessaire pour l'obtention des pâtes panifiables.

2.4. CARACTERISTIQUES THERMO-MECANIKES : MIXOLAB

Le Mixolab est un pétrin enregistreur qui permet de mesurer le comportement rhéologique des pâtes soumises à la double contrainte du pétrissage et de la température. Il mesure en temps réel le couple de torsion (en Nm) produit par la pâte entre deux friseurs. Le test se base sur la confection d'une masse de pâte constante hydratée de manière à obtenir une

consistance cible lors de la première phase du test. En protocole « Chopin » la masse de la pâte est de 75 grammes et la consistance cible est de 1,1 Nm. La courbe Mixolab (Figure 1) est séparée en cinq stages :

- **C1** : sert à déterminer la quantité d'eau que la farine peut absorber pour obtenir une consistance donnée pendant la phase où la température est constante ;
- **C2** : représente l'affaiblissement des protéines de la farine sous l'action de la température ;
- **C3** : renseigne sur la gélification de l'amidon ;
- **C4** : mesure la stabilité du gel formé à chaud ;
- **C5** : informe sur la rétrogradation de l'amidon en phase de refroidissement.

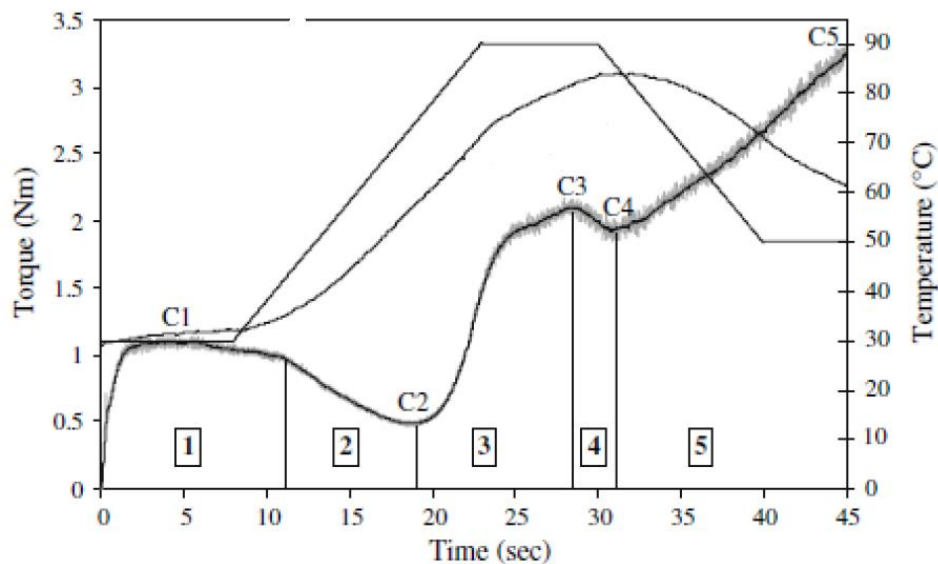


Figure 1 : Courbe de Mixolab de la farine de blé

2.5. ESSAI DE PANIFICATION ET MESURE DU VOLUME

La farine a été mélangée et cuite selon la recette traditionnelle du pain en Tunisie. La formulation de base de la pâte utilisée est composée de 1 Kg de farine avec ou sans farine de millet, 30 g de levure boulangère, 18 g de chlorure de sodium et 630 ml d'eau. Après mélange, la pâte obtenue est laissée au repos pendant 15 min dans une enceinte de fermentation à 30° C et à une humidité relative de 70%. La pâte est ensuite divisée en morceaux de 250 g et moulée à la main. Quatre morceaux de pâte ont été cuits au four à 200 °C pendant 18 min (Ghorbel *et al.*, 2010). Le volume du pain a été déterminé selon la méthode de Ribotta *et al.* (2004)

3. CULTURES DE MICROORGANISMES

3.1. SOUCHES

- *Bacillus sp* UEB-S : Souche microbienne isolée au cours de ce travail, notamment productrice de lichenase et d'amylase.
- EPI300™-T1R Phage T1-resistant *E. coli* strain [F⁻ mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu) 7697galUgalK λ-rpsLnupGtrfAtonAdhfr]

3.2. CONDITIONS DE CULTURES

- Les souches d'*E. coli* sont cultivées sur milieu Luria Bertani (LB).

Milieu Luria-Bertani (LB): 5 g/l Extrait de levure (Diagnostics Pasteur); 10 g/l Bacto tryptone (Difco) ou Pastone (Diagnostics Pasteur); 10 g/l NaCl

Milieu LB solide: LB liquide + 1,5 % agar avec ou sans antibiotiques.

- *Bacillus* UEB-S est cultivée sur le millet selon les conditions optimisées au cours de ce travail (Partie Résultats et Discussion)

3.3. CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches d'*E. coli* et de *Bacillus* UEB-S sont conservées à 4°C sur milieux solides ou à -80°C dans le milieu liquide LB contenant 15 % (v/v) de glycérol.

4. MÉTHODES BIOCHIMIQUES

4.1. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES PURIFIÉES

4.1.1. DOSAGE DE L'ACTIVITE LICHENASE

Le protocole du dosage de l'activité lichenase est le suivant : 0.5 ml d'une solution de substrat lichenan 0.5% et 0.5 ml d'une solution enzymatique sont incubés 30 min à 60°C. Les sucres réducteurs libérés après hydrolyse sont dosés par DNS. La densité optique est ensuite mesurée à 550nm contre un blanc ne contenant pas d'enzyme. La quantité desucres réducteurs libérés est déterminée par rapport à une gamme étalon de glucose entre 0 et 2 g/L.

Une unité d'activité lichenase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de glucose par minute.

4.1.2. DOSAGE DE L'ACTIVITE AMYLASE

L'activité amylase de la souche est déterminée selon le protocole du dosage suivant: 0,5 ml d'une solution d'amidon (Sigma) (1% P/V) et 0,3 ml du tampon citrate phosphate 0,2M pH 6 sont incubés en présence de 0,2 ml de la solution enzymatique à 70 °C pendant 5 minutes. Les sucres réducteurs libérés sont dosés par DNS suite à une réaction d'oxydo-réduction. La réduction du DNS entraîne l'apparition d'une coloration orange stable proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu (Summer et Somers, 1944). La densité optique est mesurée à 550 nm contre un blanc (ne contenant pas d'enzyme). La quantité de sucres réducteurs libérée est déterminée par rapport à une gamme étalon de glucose. Une unité d'enzyme est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une micromole de glucose par minute.

4.1.3. DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE

Les activités amylase et lichenase ont été mesurées respectivement sur l'amidon et le lichenan (10g/L) en faisant varier la température d'incubation de 30 à 100°C. Le tampon utilisé pour le dosage d'activité amylases est le tampon acétate pH5, 50mM celui pour l'activité lichenase et le tampon acétate pH6 ,50 mM

4.1.4. DETERMINATION DU PH OPTIMUM

Les activités amylase et lichenase ont été mesurées respectivement sur l'amidon et le lichenan (10g/L) à différents pH (2-12) et à leurs températures optimales respectives. Les tampons utilisés sont le tampon acétate pour les pH de 2 à 7; Tris-HCl pour les pH 8 et 9 et le tampon Glycine NaOH pour les pH de 10 à 12.

4.1.5. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA STABILITE

La stabilité des protéines en fonction de la température a été étudiée en incubant ces enzymes sans substrat à différentes températures (30 à 100°C) pendant 30 minutes. Après centrifugation, l'activité résiduelle dans le surnageant est mesurée dans les conditions optimales.

4.1.6. EFFET DU PH SUR LA STABILITE

Les enzymes sont incubées sans substrat à des pH variant de 2 à 12. Après 24, 48 et 72H heures d'incubation à 4°C, les échantillons sont centrifugés et les activités mesurées dans les conditions optimales.

5. METHODES ANALYTIQUES

5.1. TURBIDIMÉTRIE

La concentration en biomasse est déterminée par mesure de l'absorbance du milieu de culture à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Safas (Monaco). L'absorbance est en relation linéaire avec la concentration en biomasse pour les valeurs comprises entre 0,1 et 0,6 unités d'absorbance. Des dilutions du milieu réactionnel sont donc éventuellement effectuées, de façon à respecter ce domaine de linéarité.

5.2. DOSAGE DES PROTÉINES

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976), basée sur le déplacement du maximum d'absorption d'une solution acide de bleu de Coomassie G250c de 465 nm à 595 nm provoquée par la présence de protéines. La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution d'albumine de sérum de bovin (BSA) de 0 à 20 mg/L.

5.3. HPAEC-PAD (CHROMATOGRAPHIE HAUTE PERFORMANCE D'ÉCHANGE D'IONS COUPLÉE A UNE DÉTECTION AMPÉROMÉTRIQUE PULSÉE)

Nous avons réalisé les analyses HPLC sur colonne Dionex CarboPac PA100 afin d'identifier les oligosaccharides libérés. L'injection automatique (10 µl) est réalisée par un injecteur injecteur ICS 758. La détection est de type tri-impulsionnelle grâce à un détecteur ampérométrique pulsé (Electrochemical Detector ED40). L'acquisition et l'intégration des données sont effectuées par le logiciel HPChem (Hewlett Packard).

Des solutions de glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose et maltopeptaose (de 5 à 25 mg/l) sont utilisées comme étalons pour l'activité amylase et des solutions de 1,3:1,4-β-Glucotriose et 1,3:1,4-β-Glucotetraose (de 5 à 25 mg/l) sont utilisés comme étalons pour l'activité lichenase. Les échantillons sont dilués dans de l'eau ultra pure à raison d'une concentration en sucres totaux maximale de 50 mg/L.

Les conditions de séparation sont les suivantes :

Température : 22 °C

Phase mobile (NaOH 150 mM) : 1 ml/min

Gradient : Acétate de sodium de 6 mM à 300 mM en 28 min

5.4. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ou natives a été réalisée selon la méthode de Laemmli et Favre (1973).

6. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

6.1. CONSTRUCTION D'UNE BANQUE FOSMIDIQUE

L'ADN génomique a été extrait et cassé en grands fragments par pipetage, ces fragments ont été par la suite séparés pendant 18h par électrophorèse en champ pulsé à 4.5V/cm avec 5 à 40 temps de pulsation grâce à un appareil CHEFDRIII (Biorad). Les fragments d'ADN compris entre 35 et 45 kb ont été isolés et récupérés à partir du gel avec de la GELase (Epicentre technologies). Ils ont été par la suite clonés dans le fosmide pCC1FOS (Epicentre technologies) en suivant les recommandations du fournisseur. Les colonies recombinantes *E. coli* EPI100-TR ont été transférées dans des microplaques 384 puits contenant du milieu LB supplémenté en glycérol à 15%. Après une croissance à 37°C de 22h, les microplaques ont été stockées à -80°C. La banque contient 100000 clones fosmidiques chacun contenant un insert d'ADN génomique d'environ 36 kb.

6.2. CRIBLAGE FONCTIONNEL HAUT DÉBIT

La banque fosmidique a été criblée grâce au robot Qpix colony picker de la plateforme Ingénierie Combinatoire et criblage à haut débit d'Enzymes Originales. La banque arrangée en microplaques 384 puits a d'abord été repiquée dans du milieu LB, couverte avec une membrane microporeuse et incubée à 37°C pendant 18h sans agitation. Afin de détecter des activités d'hydrolyse des polysaccharides, chaque clone de la banque a été déposé sur un Qtray 22cmx22 cm contenant le milieu solide de criblage. Les substrats testés sont l'AZCL-amylose (Megazyme) à 0.1% (m/v), l'AZCL-galactane l'AZCL-xylane (Megazyme) à 0.025%, l'AZCL- β glucane à 0.1% et l'AZO-fructane à 0.1% (megazyme). Les Qtray ont été incubés entre 3 et 7 jours à 37°C. Les clones positifs (hits) ont été identifiés grâce à la présence d'un halo bleu autour de la colonie témoin de la dégradation du substrat dans le milieu. En effet, les substrats AZCL sont des polysaccharides possédant des molécules de colorant bleu liées de façon covalente à leur chaîne principale. L'hydrolyse enzymatique du polysaccharide libère des polysaccharides solubles, dont la couleur bleue diffuse dans le milieu autour de la colonie. Après une validation sur le même substrat, chaque clone positif a été remis en culture dans du milieu LB et stocké en double exemplaire dans des tubes glycérolés -80°C.

6.3. EXTRACTION DE L'ADN FOSMIDIQUE

L'extraction de l'ADN fosmidique a été réalisée en utilisant le kit Macherey-Nagel Nucleobond PC100, en suivant le protocole du fournisseur.

6.4. SEQUENÇAGE DE L'ADN GENOMIQUE CONTENU DANS LES CLONES CANDIDATS

Le pyroséquençage des inserts a été effectué grâce à la technologie 454 GS FLX (Roche) de la plateforme Genome & Transcriptome du Genotoul de Toulouse, France.

6.5. TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE DES SÉQUENCES

Les différents scripts informatiques nécessaires au traitement des séquences ont été développés par Christophe Klopp, ingénieur de recherche de la plate-forme Bioinformatique du Genotoul (Toulouse, France). L'assemblage des reads en contig a été réalisé par le logiciel Cap3. Les séquences du vecteur osidique ont été éliminées à l'aide du logiciel Cross match. Cela a permis d'obtenir un unique contig par fosmide contenant plus de 90% de la séquence totale. La détection des gènes (ORFs) a été effectuée grâce au logiciel Metagene.

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE :

Le millet : Caractérisation physico-chimique et applications potentielles d'une agro-ressource

Sameh Maktouf, Raoudha Ellouz-Ghorbel, Monia blibech, Hejer Hajji, Claire Moulis, Magali Remaud-Simeon, and Semia Ellouz Châabouni. Chemical and functional characterization of Millet Flour: Effect on wheat dough properties and bread quality. Submitted to journal of carbohydrates polymers

Brevet

Sameh Maktouf, Raoudha Ellouze Ghorbel, Hajer Hajji, Claire Moulis, Magali Remaud-Siméon et Semia Ellouze Chaabouni Formulation d'une farine Diététique Millet-Blé et application dans la panification Brevet d'invention TN2011/0602

INTRODUCTION

Le millet, apparu en Inde et en Chine, est une céréale qui appartient à la famille des graminées. On distingue plusieurs espèces de millet telles que le millet perlé (*Pennisetum glaucum*), le millet des oiseaux (*Setaria italica*), le millet proso (*Panicum mitiaceum*), l'espèce la plus étudiée restant le millet perlé.

Cette céréale, connue pour sa bonne tolérance aux conditions extrêmes de sécheresse, d'aridité et d'alcalinité du sol présente des vertus nutritionnelles importantes de par sa richesse en fibres, minéraux et protéines. De plus, elle est exempte de gluten et constitue de ce fait une céréale non allergène, contrairement aux autres céréales. Il était donc intéressant d'approfondir son étude et de l'exploiter davantage, notamment pour des applications en alimentation humaine. Le premier chapitre de cette thèse est ainsi consacré à la caractérisation physicochimique et fonctionnelle d'une variété tunisienne de millet perlé. Nous décrirons dans un premier temps sa composition chimique et ses propriétés fonctionnelles, avant de terminer par une étude sur l'effet de l'incorporation de farine de millet en substitution à une partie de la farine de blé sur la qualité de produits de boulangerie tels que le pain.

CHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MILLET FLOUR: EFFECT ON WHEAT DOUGH PROPERTIES AND BREAD QUALITY

1. SUMMARY

Chemical composition and functional properties of Mediterranean (Tunisian) pearl millet flour were studied, showing a high protein, lipid and mineral content and a great technological potentiality as oil absorption capacity. Furthermore, the incorporation millet flour (5%) in low bread-making quality wheat flour leads to an increase of the dough strength (W), the dough elasticity-to-extensibility ratio (P/L) and the bread volume by 31%; 65% and 46% respectively. Mixolab parameters indicates that millet incorporation induce a great benefit on wheat dough behaviour, resulting in an improved stability during mixing, and a slowing down of starch retrogradation. The bread texture and quality (loaf volume and crumb characteristic) are thus largely improved, suggesting a potential application of this new flour for bakery industry.

2. INTRODUCTION

Millet cereal is grown mostly in marginal areas (FAO, 2008). This cereal is well adapted to many soil and climatic conditions, and requires very little water (Theisen *et al.*, 1978, Hulse *et al.*, 1980). Millet is a good source of dietary proteins, carbohydrates, fats, vitamins and minerals (Uprety and Austin., 1972; Hulse *et al.*, 1980). The presence of all the required nutrients in millet makes it suitable for large scale utilization in the manufacture of baby foods, snack foods and dietary food. In addition and being gluten-free, it answers to the growing demand for gluten-free foods and beverages from people with coeliac diseases and other intolerances to wheat (Kasarda, 2001). Finally, millet cereal shows also hypocholesterolemic, hypoglycemic and antiulcerative characteristics indicating the scope for its utilization and consumption (O'Kenned *et al.*, 2006).

This cereal is widely used in India and some African countries and is considered as an important staple food. Singh *et al* (2012) showed that a partial substitution of wheat flour by millet one led to bakery products with equivalent sensory characteristics.

In Tunisia, pearl millet isn't the staple food of rural populations. Nevertheless, it occupies a very important part of surfaces in the South of the country (FAO, 2003). However, very little information is available about its composition and functional properties.

Therefore, our study aimed at determining the chemical composition and functional properties of a flour issued from millet cereals grown under local conditions, in order to explore its

potentials in food formulation. Formulation of a bakery product composed of millet/wheat composite flour was assayed, in order to investigate the effect of pearl millet flour addition onto rheological, thermomechanical and textural properties, compared to breads exclusively composed of wheat flour of low-bread making quality.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. RAW MATERIAL

Pearl Millet seeds were harvested from the arid region of Tunisia. It was milled and sieved to produce pearl millet flour (MF) having a particle size between 500–1000 μm . Millet flour represented 60% of the weight of the entire seeds. For subsequent analyses, the flour samples were stored at 4°C in metalized polyester containers, and in the presence of oxygen absorbers.

3.2. WHEAT FLOUR

Wheat flour used in this study (WF) was provided by the company “Couscousserie Du Sud” (CDS Sfax, Tunisia) and was characterized by a low bread-making quality. Composite wheat/millet flours (CF) were obtained by the substitution of wheat flour by 1, 2, 5 or 10% millet flour.

3.3. CHEMICAL COMPOSITION

Total nitrogen, lipid, moisture and ash contents of flours were analyzed according to the American Association of Cereal Chemists 2000 standard methods 46-30, 30-10, 44-19 and 08-01, respectively. The starch content was determined using the enzymatic colorimetric method described by Dubois *et al.* (1956). Cellulose content was determined using the method described by Updegraff (1969).

3.4. MINERAL CONTENT

The sample was prepared for analyses as described by Al-Showiman (1990). The amounts of iron, calcium, copper, sodium and potassium were determined using atomic absorption spectrophotometer (Hitachi Z6100, Japan). Phosphorus was determined as previously described by Chapman and Pratt (1982).

3.5. FATTY ACIDS ANALYSIS

Fatty acids were extracted and fatty acids methyl esters (FAMES) were prepared (Metcalf *et al.*, 1966). FAMES were analyzed by gas chromatography using a Shimadzu Gas chromatograph (GC-17A) equipped with polar capillary column (DB-WAX: 30 m length,

0.25 mm I.D., 0.25 microm film thickness; Supelco). The oven temperature was programmed from an initial temperature of 150°C (0.5 min hold), rising to 200°C at 6°C/min, then to 230°C at 4°C/min, and held isothermal (250°C) for 15 min. Nitrogen was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection port and the flame ionization detector were maintained at 250°C. Identification was made by comparison of retention times to those of authentic standards.

3.6. STARCH ISOLATION AND AMYLOSE CONTENT

The method of Adebawal and Lawal (2002) was employed with modifications. One kg of millet flour was suspended in 10L of 0.3% (w/v) NaOH solution. It was stirred for 4h at 25°C. After stirring, the suspension was centrifuged at 1600g for 30 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in distilled water and centrifuged. This process was repeated three times. The starch suspension was then neutralized and the sediment starch was dried at 45°C for 12 h and stored in sealed plastic bags at 4°C prior to use. The estimation of amylose content of millet starch was based on the calorimetric method (William's *et al.*, 1958).

3.7. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Flour samples were stuck on a specimen holder using a silver plate, and then coated with gold by Ion Sputter (Bio-Rad SC-500, Hercules, CA). The specimens obtained were viewed in a scanning electron microscope Philips XL 30 (Philips, Leimeil-Brevannes, France).

3.8. ¹³C NMR SPECTRA

The Structure of the starch was determined by ¹³C NMR (Madison, USA). Samples were dissolved in deuterated chloroform (CDCl₃) containing trace amounts of tetramethylsilane, which was used as an internal chemical shift reference to indicate, in parts per million (ppm), the difference of the resonance frequency.

3.9. FUNCTIONAL PROPERTIES.

Foaming capacity (FC) and foam stability (FS) were determined as described by Akintayo *et al* (1999). Emulsion activity (EA) and stability (ES) were determined as described by Naczka *et al.* (1985). Water and oil absorption capacities of samples (respectively designed as WAC and OAC) were determined at 30°C as described by Lin and Zayas (1987). Gelation capacity was determined according to the method described by Coffman and Garcia (1977).

3.10. BULK DENSITY:

The bulk density (BD) was determined by the method of Wang and Kinsella (1976). Ten grams of sample were placed in a graduated cylinder (50 ml) and packed by gently tapping the cylinder on the bench top (10 times) to from a reasonable height. The volume of sample was recorded. BD was expressed as grams material per milliliter.

3.11. DETERMINATION OF RHEOLOGICAL BEHAVIOR USING MIXOLAB

Mixing and pasting behavior of wheat flour and blends dough were studied using Mixolab (Chopin, Tripette et Renaud, Paris, France), which measured the torque (expressed in Nm) produced by the passage of dough between two kneading arms, thus allowing the study of its rheological behavior. For the assays, 50 g of flour were placed into the Mixolab bowl and mixed with the amount of water needed for obtaining 55% (v/w, flour basis) water absorption. The settings used in the test are detailed in Table 1.

Table 1. Instrumental settings defined in the mixolab for running the samples

Duration first plateau	8 min
Heating rate	4 °C/min
Temperature second plateau	90°C
Duration second plateau	7 min
Cooling rate	4 °C/min
Temperature third plateau	60°C
Duration third plateau	10 min
Total analysis time	30 min

The parameters obtained from the recorded curve provide information about the protein stability subjected to mechanical and thermal constraints, and both the gelatinization and gelling of starch (Huang *et al.*, 2010). Those parameters included initial maximum consistency (Nm) (C1), (Rosell and Collar, 2009), minimum torque (nm) produced by dough passage subjected to mechanical and thermal constraints (C2), maximum torque produced during the heating stage (C3), minimum torque during the heating period (nm) (C4), and the

torque (nm) obtained after cooling at 50°C (C5). The different curve slopes during the assay were related to the flour different properties: speed of the protein network weakening due to heating (alfa); gelatinization rate (beta) and cooking stability rate (gamma).

3.12. DOUGH RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS (ALVEOGRAPH TEST)

Alveograph measurements were obtained using an Alveograph MA82 (Tripette et Renaud, France), under conditions of constant dough water content and mixing times, using the standard method (AACC, 2000). Each sample (250 g) was obtained by mixing wheat and pearl millet flour according to the desired substitution (1, 2, 5 and 10%).

The monitored alveograph parameters were as follows: maximum overpressure needed to blow the dough bubble (P index of resistance to extension), average abscissa at bubble rupture (L index of dough extensibility) and deformation energy (W index of dough strength). These characteristics were used to evaluate the wheat flour bread-making quality (Indrani *et al.*, 2007).

3.13. BREAD-MAKING

Flours were mixed and baked according to the traditional recipe of Tunisian bread (Ghorbel *et al.* 2010). The bread loaf specific volume was determined by rapeseed displacement and weighed 24 h after baking (Ribotta *et al.*, 2004).

3.14. TEXTURAL PROPERTIES OF BREAD

Textural Properties were determined according to the standard method published by the American Association of Cereal Chemistry (AACC 1998) and performed by a Texture Analyser (Texture Analyser: LLOYD). Two slices of bread (20 mm thick) were compressed with a 3.5-cm-diameter cylindrical probe using the same speed as the firmness measurement to 40% of strain, held for 60 s, and then removed.

The parameters recorded were hardness (peak force on first compression [N]), cohesiveness (ratio of the active work done under the second force–displacement curve to that done under the first compression curve [dimensionless]), adhesiveness (work necessary to overcome the attractive forces between the surface of food and that of the sensor during the first and second compression cycle [N mm]), springiness (distance of the sample recovered after the first compression [mm]) and chewiness ([hardness \times cohesiveness \times springiness {N, mm}]). The texture analyzer was interfaced with a computer, which controls the instruments and analyses the data, using the software supplied by Texture Technologies Corp. (Scarsdale, NY).

3.15. STATISTICAL ANALYSIS

All the tests were performed in triplicate and data were averaged. Standard deviation was also calculated. Duncan's multiple-range test (Steel and Torrie 1980) was used to evaluate significant differences ($P < 0.05$) between means for each sample.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.2. CHEMICAL COMPOSITION

Pearl millet flour analysis revealed that it contains (on dry basis) proteins ($16.10 \pm 0.02\%$, w/w), fat ($5.1 \pm 0.2\%$, w/w), moisture ($7 \pm 0\%$, w/w), starch ($43 \pm 0.1\%$), cellulose ($1.5 \pm 0.3\%$, w/w), and Ashes ($3.92 \pm 0.02\%$, w/w). Notably, the amount of proteins, ashes and lipids are higher than those reported by Mepba *et al.* (2007) for wheat flour (0.4% ash content and 12.8% proteins, fat 1.4%) and by Ghrobel *et al.* (2009) (0.41 % ash and 9.8% proteins). In addition, mineral contents of pearl millet flour encompass calcium (0.23 mg/g), phosphore (1.52 mg/g), potassium (1.86 mg/g), sodium (1.33 mg/g) and iron (0.11 mg/g). These amounts are also slightly higher than those reported for wheat flour (Akman and Kara., 2003).

Analysis of Fatty acid composition in pearl millet showed that this oil is rich in Palmitic acid (16%), oleic acid (39%) and linoleic acid (41%). This composition is similar to other vegetable oils like olive oil which contains about 3.5 to 21% of linoleic acid ; 7.5 to 20% of palmitic acid and 55 to 83% of oleic acid (León, 2004) and corn germ oil which contain 13% of palmitic acid, 29% oleic acid and 55% of linoleic acid (Winkler-Moser and Breyer, 2011). In this respect, pearl millet is a good source for extraction of polyunsaturated vegetable oils.

Scanning Electron Microscopy (SEM) of Pearl millet starch granules (Figure 1) showed that this granules (5-10 μ m) adopt a polygonal shape and are very different from wheat starch granules, which consist of large (15 to 40 μ m) and small size (1–10 μ m) lenticular shaped granules (Salman *et al.*, 2009). The size of the starch granules were reported to have bearing on the digestibility of some starches by microbial enzymes, smaller the granule the better the digestibility (Madhusudhan and Tharanathan., 1995). Notably, the amylose content (25%, w/w of starch) was in the range of that usually reported for pearl millet starch, which varies from 17 to 29% (Beleai *et al.*, 1980).

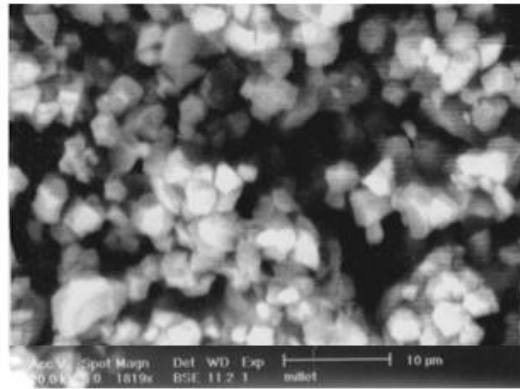


Figure 1. Scanning electron microscopy of isolated Pearl millet starch

4.3. ^{13}C NMR SPECTRA

For cereal starch, three distinct crystalline forms have been characterized. The A and B forms consist of double-helical arrangements of starch chains with difference in water association and crystal symmetry. The V form, which consists of starch chains in a single-helical arrangement, has a cylindrical hydrophobic cavity that can include molecules such as iodine and alkyl chains of surfactants.

For millet flour (Figure 2) the C-1 peak is a 2-peak cluster (~ 101 and 100 ppm) which is a chemical shifts characteristic of the B conformation. Signal at 81 is attributed to C-4 Signals at 61 and 70 ppm are respectively associated with the hydroxymethyl carbon-6 and C-2, 3, 5 in hexapyranose. The small peak at 31 ppm is attributed to the formation of inclusion complexes of lipids with amylose. Similar results have been described by Cheetham and Leping (1998). So pearl millet starch seems to have a major B crystalline form with a small amount of lipids–Amylose complexes characteristics of the V forms.

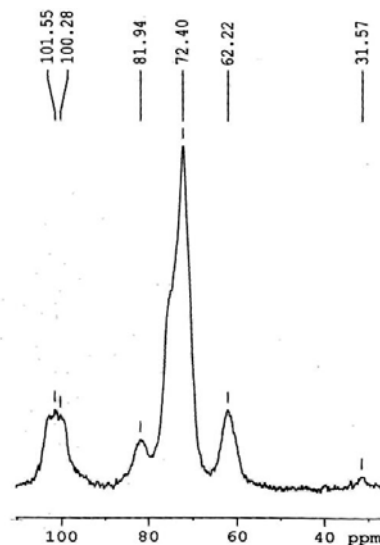


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of millet starch

4.4. FUNCTIONAL PROPERTIES

4.4.1. WATER AND OIL ABSORPTION CAPACITIES

The oil absorption capacity of millet flour was 2.3g oil/g which is in good agreement with values varying from 0.55 to 2.7 g reported by Akubor and Obiegbuna, (1999) and Oshodi *et al* (1999). This parameter is very important as it affects the texture and mouth feel of foods (Okezie and Bello, 1988). The higher oil absorption capacity of the millet flour could be due to protein hydrophobicity, known to play a major role in this phenomenon (Voutsinas and Nakai, 1983).

4.4.2. FOAMING AND EMULSION CAPACITIES

The foaming capacity (FC) and stability (FS) FC and the FS of our millet flour were 10 and 92%, respectively. Peter and Akubor (2003) reported higher FC for wheat flour (40%) but lower foam stability (78%). Foamability is function of the configuration of protein molecules. Flexible protein molecules give good foamability whereas highly ordered globular molecules give low foamability, as they cannot reduce the surface tension of the air-water interface (Ma CT, Harwalker VR, 1984).

The results showed that millet flour had excellent emulsifying properties. In particular, emulsion activity and stability were of 80 and 90%, respectively. Emulsion capacity is linked to soluble protein content of a substance (Kinsella, 1976). The high emulsion activity and stability of the flour suggests its possible use in cakes, sausages and other colloidal food systems.

4.4.3. BULK DENSITY

Low bulk density is a desirable character when powdered foodstuffs are to be packed in a limited space, even if materials of high bulk density also find uses (incorporation into light snack foods, for instance) (Padmashree *et al.*, 1987). The bulk density of this millet flour was determined at 652kg/m³, a value close to that of soybean flour (Padilla *et al.*, 1996).

4.5. THERMOMECHANICAL BEHAVIOR OF WHEAT AND COMPOSITE DOUGH

The rheological behavior of wheat flour containing different amounts of our Millet flour (MF) was studied using the Mixolab. The main effects induced by MF addition are summarized in Table 2. In the initial mixing stage, an increase of consistency was observed in the presence of additional amounts of millet flour. Moreover, the addition of MF to wheat flour decreased both the Mixolab development time (DT) and the stability (ST). For example, DT and ST of

dough containing 5% MF changed from 4.3 to 1.18 min and 11.1 to 9.46 min, respectively, showing that less work was needed during dough development after MF incorporation.

Table 2: Effect millet flour addition on wheat dough characteristics during mixing determined by mixolab

Samples	Time (min)	C1 Torque (Nm)	Stability Time (min)	C2 (Nm)	Alfa (Nm/min)	C3 (Nm)	C4 (Nm)	C5 (Nm)	Beta (Nm/min)	Gamma (Nm/min)
Control*	4.31±0.01	0.86±0.02	11.12±0.1	0.4±0.03	-0.054	1.4±0.04	1.28±0.05	2.32±0.05	0.318	-0.032
1% MF	1.04±0.03	1.37±0.03	7.10±0.6	0.52±0.02	-0.09	1.93±0.05	1.62±0.02	1.92±0.03	0.144	-0.035
2% MF	2.21±0.05	1.23±0.06	9.25±0.5	0.52±0.03	-0.084	1.94±0.03	1.58±0.03	1.91±0.03	0.12	-0.041
5% MF	1.18±0.05	1.43±0.03	9.46±0.3	0.57±0.01	-0.086	1.98±0.02	1.71±0.03	2.01±0.02	0.13	-0.044
10%MF	5.23±0.07	1.37±0.02	10.24±0.7	0.58±0.02	-0.12	2.06±0.06	1.64±0.02	1.83±0.06	0.15	-0.04

By first increasing and then decreasing the temperature, the following effects were observed: a higher minimum torque (C2), a higher maximum torque (C3), a higher minimum torque during the heating period (C4) and a lower rate of starch gelatinization (beta) compared to the control (Table 2). These data indicated that the MF improved the protein heat resistance in dough system and made starch in dough more stable at heating. Moreover, it induced a lower level of retrogradation during cooling and a higher cooking stability rate (gamma).

4.6. RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMPOSITE DOUGH AND BREAD QUALITY

The effects of addition of MF at different levels (1%, 2%, 5% and 10%) on the strength (W) and elasticity-to-extensibility ratio (P/L) of wheat dough characterized by a low bread-making quality are given in Table 3. It was found that the addition of 5% of MF had the most significant positive effect on the dough alveographic properties. At this addition level, W and P/L of the composite dough ($W = 210 \times 10^{-4}$ J and $P/L = 1.1$) increased by 31 and 65%, respectively, compared with those for the control wheat flour ($W = 160 \times 10^{-4}$ J and $P/L = 0.65$).

Table 3: Effect of millet flour addition on dough alveographic properties and bread volume

Samples	Alveographic properties of dough		Bread Volume Cm ³ /100g
	W (10 ⁻⁴ J)	P/L ratio	
Control*	160±5.00	0.65±0.02	294±4.00
1% MF	188±4.00	0.71±0.01	ND
2% MF	199±2.00	0.82±0.02	ND
5% MF	210±3.00	1.1±0.01	430±7.00
10%MF	160±5.00	1.17±0.01	280±7.00

ND: not determined

*Control is referred to dough without added MF

Note: Reported values correspond to the means ± standard deviation

The traditional Tunisian views of breads baked with (5%, 10% flour basis) or without MF addition are presented in figure 3.

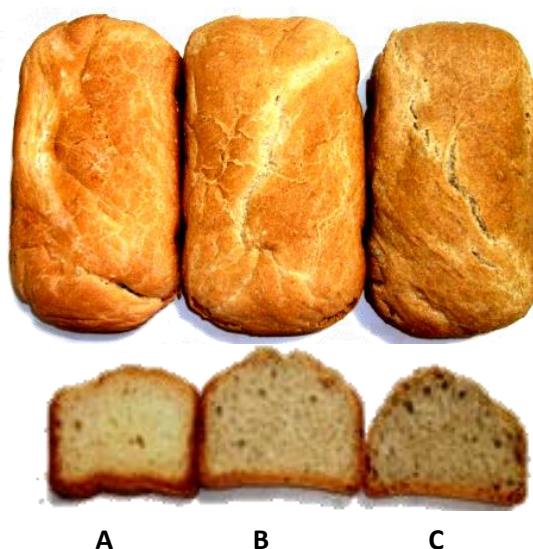


Figure 3: Overall observation and cut loaves of bread baked with different views of traditional Tunisian bread baked without Millet Flour addition (A); with 5% of MF (B) and with 10% of MF (C)

Compared with bread baked without MF, 5% MF enriched breads exhibited a larger bread volume with a more open crumb structure. Its loaf-specific volume was $430 \pm 7 \text{ cm}^3/100\text{g}$ versus a volume of $294 \pm 4 \text{ cm}^3/100\text{g}$ for the wheat flour baked without millet addition (Table

3). Lipids content could contribute to the difference in the loaf volume. The positive influence of lipids (in particular the polar fraction) in the bread-making quality is attributed to their ability to form lipid monolayers at the gas/liquid interphase of the gas cells, thus increasing the dough gas retention (Gan *et al.*, 1995). In contrast, an addition of 10% millet flour induced a better crumb structure, but a lower specific volume ($280 \pm 7 \text{ cm}^3/100\text{g}$). It seems clear that millet addition at a level of 5 % improved wheat flour characteristics and gave composite flour suitable for bread making. A higher level of substitution appears to be less convenient. However, Poongodi *et al.* (2009) tested high levels of substitution (10, 20 and 30%) and concluded that millet flour addition was suitable for the preparation of pasta, crackers, rusk or suji toast, biscuits, chapatti but not for bread -making .

4.7. TEXTURAL PROPERTIES

Analysis and evaluation of food texture is very important in food processing (Wang *et al.*, 2007). Wheat and blend flours textural properties are shown in Table 4.

Table 4: Effect of millet flour addition on wheat bread textural properties

Parameters	WF	MF 5%	MF 10%
Hardness(N)	130±0.14	121±0.12	124±0.11
Chewiness ((Nmm))	165±0.41	129±0.52	131±0.45
Cohesiveness (dimensionless)	0.39±0.02	0.36±0.04	0.41±0.003
Springiness (mm)	6.02±0.03	5.64±0.04	6.13±0.05
Adhesiveness (N)	56.16±0.54	19±0.34	29±0.32

Note: Reported values correspond to the means \pm standard deviation

5% MF enriched breads exhibited significantly lower adhesiveness and chewiness than those of wheat flour. No significant difference in hardness was observed. Variations in textural properties between the different samples can largely be attributed to differences in the chemical composition. A significant correlation between amylose content, textural attributes and bread-making quality of starch was reported by Lee *et al.* (2001)

5. CONCLUSION

In this work, the physico-chemical and functional properties of a Tunisian pearl millet flour were investigated. Pearl millet represents a good source for food, due to its high content of protein, lipid, and ash and its good functional properties. Being gluten-free, millet flour alone

is not abroad-making flour. It can, however, be successfully associated with commercial wheat flour to improve its nutritional composition and to produce bread with better bread-making properties and textural characteristics. Therefore, the prospect of replacing a portion of wheat by millet seems particularly interesting, in particular for economical reasons.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to the French Institute of Cooperation (Campus France) for providing financial support to carry out this work and awarding a doctoral fellowship to Sameh MAKTOUF. The authors express their gratitude to Mr. Jamil Jaoua, Head of the English Unit at the Sfax Faculty of Science, for having proofread this paper.

7. REFERENCES

- AACC (1998) Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Modified version of Method 290 74-09: Determination of Bread Firmness. American Association of Cereal Chemists, St, Paul, MN
- AACC. (2000). Approved Methods of the AACC, t.E., Methods 46-30, 30-10, 44-19,08-01, 54-30, The American Association of Cereal Chemists, St.Paul,MN. 10th Ed ed.
- Adebawal, K.O& Lawal, O. S. (2002). Effect of annealing and heat moisture conditioning on the physicochemical characteristics of bambara groundnut (*Voandzeia subterranean*) starch. *Nahrung/Food* 46, 311-316.
- Akintayo, E.T., Oshodi, A.A., & Esuosol, K.O. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry* 66, 51-56.
- Akman, Z., & Kara, B.(2003) Genetopic variation for mineral content at different growth stages in wheat (*triticum aestivum* L). *Cereal .Research.Communications* ;31:459-466.
- Akubor, P., & Obiegbuna, JE.(1999). Certain chemical and functional properties of ungerminated and germinated millet flour. *Food Science and Technology* 36(3), 241-293.
- Akubor, P. (2003). Functional properties and performance of cowpea/plantain/wheat flour blends in biscuits. *Plant Foods for Human Nutrition* 58, 3, 1-8
- Al-Showiman, S.S.(1990). Chemical composition of date seeds (*Phoenix dactylifera* L.) in Saudi Arabia. *J. Chem. Soc;* 12:15-24
- Basman, A.,& Köksel, H. (2001). Effects of barley flour and wheat bran supplementation on the properties and composition of Turkish flat bread, yufka. *Food Research Technology* 212 198-202.

Beleia, A.E., Varrino-Marston, E., & Hoseney, R.C (1980). Characterization of starch from pearl millet. *Cereal Chemistry* ; 57: 300-303.

Chapman, H.D., & Pratt, P.F.(1982) *Method and of analysis of soil, plant and water*. 2nd Ed. California: California University Agricultural Division;p.170

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton ,J., Rebers, P.A., & Smith,F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry* 28, 350-356.

FAO., 2008. *Sorghum and Millets in Human Nutrition*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

Gan, Z., Ellis, P.R., & Schofield, J.D. (1995). Mini review: Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *Cereal Science* 21, 215-230.

Ghorbel, R.E., Kamoun, A., Neifar, M. & Chaabouni, S.E.(2009). Optimization of new flour improver mixing formula by response surface methodology. *Food Process Engineering*. doi: 10.1111/j.1745 4530. 2008.00270.x

Ghorbel, R.E., Kamoun,. A, Neifar, M., & Chaabouni, S.E. (2010). Optimization of new flour improver mixing formula by response surface methodology. *Food Process Engineering* 33, 234-256.

Huang, W., LI, L., Wang, F., Wan, J., Tilley, M., Ren, C.,& Wu, S. (2010). Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough. *Food Chemistry* 121, 934-939.

Hulse, JH, Laing, EM., & Pearson OE. (1980). *Sorghum and the millets: Their composition and nutritional value*. New York, USA: Academic Press. 89 pp.

Indrani, D., Sai manohar, R., Rajiv, J.,& Rao, J.V (2007). Alveograph as a tool to assess the quality characteristics of wheat flour for parotta making. *Food Engineering* 78,1202-1206.

Kaack, k., Pedersen, L., Nygaard Laerke, H.,& Meyer A. (2006). New potato fibre for improvement of texture and colour of wheat bread . *Food Research Technology* 224, 199-207.

Kasarda , D.D. (2001). Grains in relation to celiac disease. *Cereal Foods World*, 46, 209-210.

Kinsella, J.E.(1976). Functional properties of proteins in foods. A Survey. *Food Science and Nutrition* 7, 219-232.

Lee, M.R., Swanson, B.G., & Baik, B.K.(2001). Influence of amylase content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*. 78, 701-706.

Lin, C.S.,& Zayas, J.F.(1987). Functional of corn germ proteins in a model system: Fat binding capacity and water retention. *Food Science* 52, 1308.

Ma, C., & Harwalker, VR.(1984). Chemical characterization foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field pea and pecan flours. *Food Science* 42, 1444-1449.

Madhusudhan, B., & Tharanathan, R. (1995). Legume and cereal starches—Why difference in digestibility? Part-II. Isolation and characterization of starches from rice (*Oryza sativa*), ragi (*Eleusinecoracana*). *Carbohydrate Polymers*, 28, 153–158.

Mepba, H D., Eboh, L., & Nwaojigwa, S.U.(2007) Chemical composition , Functional and baking properties of Wheat-Plantain composite flours. *African journal of food Agriculture, nutrition and development*, 1,1-22.

Metcalf, L.D., Schmitz, A. A., & Pelka, J. (1966). RBF3-methanol procedure for rapid quantitative preparation of methyl esters from lipids. *International Journal of analytical Chemistry*; 38: 514

Morgan, KR., Furneaux, R. H., & Larsen, N.G (1995) Solid-state NMR studies on the structure of starch granules. *Carbohydrate Research* 276; 387-399

Nacz, M., Diosady, L L., & Rubin, L.J.(1985). The Functional Properties of Canola Meals Produced by a Two-phase Extraction System. *Food Science* 50, 1685-1689.

O'Kenned, M.M., Grootbooma, A., & Shewr P.R.(2006). Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. *Cereal Science* 44, 224-235.

Okezie, B.O., & Bello, A.B.(1988). Physico-chemical and functional properties of winged bean our and isolate compared with soy iso-late. *Food Science* 43, 450-454.

Padmashree, T.S., Vijayalakshim, L., & pultaraj, S. (1987). Effect of traditional processing on the functional properties of cowpea (*Vigna catjany*) flour. *Food Science and Technology*, 24: 221- 224.

Poongodi, V., & Jemima, B. (2009). Formulation and characterization of Millet flour blend incorporated composite flour. *International Journal of Agriculture Science* 1 (2), 46-54.

Rosell, C.M., & Collar, C.(2009). Effect of temperature and consistency on wheat dough performance. *International. Food Science and Technology* 44, 493-502.

Salman, J., Blazek, A., Lopez-Rubio, E.P., Gilbert, T., & Hanley Copeland, L.(2009). Structure– function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content, *Carbohydrate Polymers* ;75: 420–427.

Sathulse, JH., & Pearson, OE .(1980). Sorghum and the millets: Their composition and nutritional value, Academic Press, pp. 89.

Singh, K.P., Mishra, H. N., & Saha, S. (2012a). Changes during accelerated storage in millet-wheat composite flours for bread. *Food and Bioprocess Technology*.doi.org/10.1007/s11947-011-0769-2.

Singh, K.P., Mishra, A., & Mishra, H.N. (2012b). Fuzzy Analysis of Sensory Attributes of Bread Prepared from Millet-Based Composite Flours. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 276-282.

Theisen, AA., Knox, EG., & Mann, FL. 1978. Feasibility of introducing food crops better adapted to environmental stress. Pages 168–172 in Individual crop reports. Vol. II. Arlington, Virginia, USA: National Science Foundation.

Updegraff, DM (1969). "Semimicro determination of cellulose in biological materials". Analytical Biochemistry 32 (3): 420–424

Uprety, D.C., & Austin, A. (1972). Varietal differences in the nutrient composition of improved bajra (Pearl millet) hybrid. Bulletin of Grain Technology, 10, 249-255.

Voutsinas, L.P., & Nakai, S. (1983). A simple turbidimetric method for determining the fat binding capacity of proteins. Agriculture and Food Chemistry 31, 58-61.

Wang, J.C., & Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein. Journal of Food Science, 41, 286–292.

William, P.C., Kuzina, F.D., & Hlynka, I. (1958). Rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flour. Cereal Chemistry; 4, 411-420

Winkler-Moser, J K., & Breyer, L (2011) Composition and oxidative stability of crude oil extracts of corn germ and distillers grains Industrial Crops and Products 33 572–578

DEUXIEME PARTIE :

Identification d'activités enzymatiques d'intérêt dans une nouvelle souche de *Bacillus* sp et optimisation de leur production sous SSF

Sameh Maktouf, Claire Moulis, Amel Kamoun, Fatma Chaari, Semia Ellouz Chaabouni and Magali Remaud-Simeon. A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under Solid state fermentation on crude millet. *Industrial Crops and Products*; 43 (2013) 349– 354

Sameh Maktouf, Amel Kamoun, Claire Moulis, Magali Remaud-Simeon, Dhouha Ghribi and Semia Ellouz Châabouni. A new Raw starch digesting alpha amylase production under solid state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *Submitted to Journal of Microbiology and Biotechnology*

INTRODUCTION

Les glycosides hydrolases sont des enzymes largement employées en biotechnologie industrielle. La recherche d'enzymes toujours plus performantes, que cela soit en puisant dans la diversité naturelle qu'en les améliorant par diverses techniques d'ingénierie enzymatique, reste encore aujourd'hui un des challenges majeurs. Dans ce contexte, différents échantillons de sol prélevés du Biotope Tunisien ont été criblés afin d'isoler des microorganismes producteurs de glycoside-hydrolases thermostables et alcalines. Une souche isolée à partir du sol d'une oliveraie de la région de Ben Gardene dans le sud Tunisien a été retenue au terme de ce criblage. L'analyse de l'ARN 16S (acession number HM10077) a permis de montrer qu'il s'agit d'une bactérie appartenant au genre *Bacillus* mais dont l'espèce ne peut être déterminée. Cette souche a été ainsi nommée *Bacillus* sp. UEB-S. Elle est capable d'hydrolyser la caséine, le xylan, l'amidon et le lichenane à pH 9 et à une température de 45°C. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux activités amylase et lichenase. La production de ces deux glycosides hydrolases a été effectuée en conditions solides (SSF), en choisissant le millet préalablement caractérisé comme substrat solide. L'optimisation de cette production a été conduite en adoptant la méthodologie des plans d'expérience. L'ensemble des résultats obtenus est présenté sous forme d'articles rédigés en anglais.

Le premier article décrit la production d'une lichenase ainsi que son éventuelle application dans les détergents. Le second traite de la production de l'amylase, de sa purification et de sa caractérisation biochimique. Nous présentons également une éventuelle application pour l'hydrolyse des amidons natifs.

A LAUNDRY DETERGENT COMPATIBLE LICHENASE: STATISTICAL OPTIMIZATION FOR PRODUCTION UNDER SOLID STATE FERMENTATION ON CRUDE MILLET

1. SUMMARY

The optimisation of lichenase production by *Bacillus* sp UEB-S in solid state fermentation (SSF) with millet as solid support was carried out using response surface methodology (RSM) based on dohlert design. Four variables (inoculum volume, millet -to-moisture ratio temperature and duration of fermentation) were regarded as factors in the optimisation process. The maximum enzyme activity predicted by the model was 525 ± 76 U/g of dry substrate when using 1.5×10^9 CFU/g as inoculation level and 6.16:1 (mL/g) as moisture ratio, for 4.6 days of cultivation at 35°C. Using these conditions, 503 U/g of enzyme activity were experimentally obtained, which is in agreement with the predicted one. The enzyme was stable toward non-ionic surfactants and oxidizing agents. In addition, it showed a good stability and compatibility with a wide range of commercial solid detergents suggesting that lichenase from UEB-S is a potential candidate in detergent formulation.

2. INTRODUCTION

1,3-1,4- β -Glucans are polysaccharide components of the cell walls of Poaceae and are abundant in the endosperm cell walls of cereals with commercial value such as barley, rye, sorghum, rice, and wheat. Structurally, they are linear glucans of up to 1200 β -D-glucosyl residues linked through α -1,3 and β -1,4 glycosidic bonds, with variations in the proportion of both types of linkages (25-30% β -1,3). The enzymatic depolymerisation of 1,3-1,4- α -glucans is catalysed by endogenous glycosyl hydrolases with at least three different specificities: 1,4- α -D-glucan 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4), 1,3- α -D-glucan 3-glucanohydrolase (EC 3.2.1.39), and 1,3-1,4- α -D 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.73) called also lichenases. This latter enzyme exhibits a strict substrate specificity for cleavage of α -1,4 glycosidic bonds in 3-O-substituted glucopyranose units. Most of the known lichenases are of bacterial origin and belong to family 16 of glycoside hydrolases. The most studied lichenases are produced by *Bacillus* species.11–17 (Ekinici *et al.*, 1997; Planas 2000; Huang *et al.*, 2008). Lichenases has attracted the interest of many research groups during the past few years because of their potential application in various industrial processes, such as bioconversion of lignocellulosic materials into fermentative products, improvement of digestibility of animal feedstock, clarification of juices, and reducing the amount of chlorine required for bleaching in pulp and paper industry.

Lichenase production from microorganisms has been reported especially under submerged (SmF) fermentation conditions (Tang *et al.*, 2004); and only few lichenase produced under solid state fermentation (SSF) were described notable produced by Fungi (Sun *et al.*, 2002)

The optimization of process and downstream conditions under SSF is generally done by varying one factor at a time approach. However, these strategies are laborious and time-consuming especially for a large number of variables and often do not consider interactions among variables. Understanding and modeling of both individual and interactive effects enables each reaction parameter to be optimized in coherence with others for achieving maximum product yield (Box *et al.*, 1978; Carlson, 1992; Myers and Montgomery, 1995; Sarabia and Ortiz, 2009) In this respect, optimization carried out by response surface methodology (RSM), not only allows quick screening of large experimental domain but also reflects role of each factor. Thus, the objective of the present investigation was to statistically optimize the production a laundry detergent compatible lichenase from *Bacillus* under SSF, using a low cost solid substrate: the millet. Response Surface Methodology (RSM) using a Doehlert design, was applied to fit and exploit a mathematical model representing the relationship between the response (production yield) and the fermentation parameters: inoculum size, moisture to millet ratio, temperature and duration of fermentation)

3. MATERIELS AND METHODS

3.1. STRAIN

Bacillus sp. UEB-S (accession number HM10077) was isolated from a Southern area of Tunisia.

3.2. SOLID SUBSTRATE

Millet is a local agroressource largely available in Tunisia and having the following composition: starch ($43\pm 0.1\%$, w/w of dry matter), cellulose ($1.5\pm 0.3\%$, w/w), proteins ($16\pm 0.02\%$, w/w), fat ($5\pm 0.2\%$, w/w), moisture ($7\pm 0\%$, w/w) and ashes ($3.92\pm 0.025\%$, w/w).

3.3. EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS.

A Doehlert uniform shell design (Doehlert, 1970; Sarabia and Ortiz, 2009; Goupy, 2009) was set up to determine the best experimental conditions for optimal enzyme production. The influence of four independent parameters including the inoculum volume (U_1), the ratio of moisturizing agent to solid substrate (U_2), the incubation temperature (U_3) and the

fermentation duration (U_4) were examined. The Doehlert matrix consists of N experiments with $N=K^2+K+1$, where K is the number of variables. Since $K=4$, the matrix comprised 21 experiments which were uniformly scattered in the space of the coded variables (X_j). The levels for the four variables (Table1) were determined from the results of preliminary experiments (data not shown).

Table 1. Experimental domain for the Doehlert Design

Variable	Factor	Unit	U_0	ΔU_j
X_1	U_1 : Inoculum	10^9 CFU/g	0.80	0.70
X_2	U_2 : Moisture to solid ratio	mL/g	4.00	3.00
X_3	U_3 : Time	days	4.0	3.0
X_4	U_4 : temperature	°C	37.0	8.0

The Doehlert design experimental conditions (Table 2) were deduced from the experimental matrix, by converting coded variables X_j into the real variables (which were experimentally used) U_j , using the relationship:

$$X_j = (U_j - U_{j(0)}) / \Delta U_j$$

Where $U_{j(0)}$ was the level of U_j at the center of the domain and ΔU_j was the increment of U_j corresponding to a variation of X_j equal to 1.

The experimental results of experiments 1 to 24 were fitted to a second-order polynomial model. The model parameters were estimated by the least square regression method using the Nemrodw Software (Mathieu *et al.*, 2000).

Table 2. Experimental conditions of Doehlert design and corresponding experimental and predicted responses

Run N°	Inoculum (10 ⁹ CFU/g)	Moisture/Solid (mL/g)	Time (days)	Temperature (°C)	lichenase activity (U/g)	Predicted lichenase activity (U/g)	
1	1.50	4.00	4.0	37.0	352	348.1	
2	0.10	4.00	4.0	37.0	5	8.9	
3	1.15	6.60	4.0	37.0	423	398.8	
4	0.45	1.40	4.0	37.0	30	54.2	
5	1.15	1.40	4.0	37.0	12	31.3	
6	0.45	6.60	4.0	37.0	56	36.7	
7	1.15	4.87	6.5	37.0	285	315.8	
8	0.45	3.13	1.5	37.0	3	-27.6	
9	1.15	3.13	1.5	37.0	29	39.8	
10	0.80	5.73	1.5	37.0	45	67.0	
11	0.45	4.87	6.5	37.0	55	44.2	
12	0.80	2.27	6.5	37.0	88	66.0	
13	1.15	4.87	4.6	43.3	245	242.3	
14	0.45	3.13	3.4	30.7	8	10.7	
15	1.15	3.13	3.4	30.7	280	253.8	
16	0.80	5.73	3.4	30.7	89	110.5	
17	0.80	4.00	5.8	30.7	180	182.1	
18	0.45	4.87	4.6	43.3	120	146.2	
19	0.80	2.27	4.6	43.3	19	-2.5	
20	0.80	4.00	2.2	43.3	77	74.9	
21	0.80	4.00	4.0	37.0	300	263.8	
Center points	22	0.80	4.00	4.0	37.0	280	263.8
	23	0.80	4.00	4.0	37.0	245	263.8
	24	0.80	4.00	4.0	37.0	230	263.8
	25	0.52	4.68	3.5	36.0	164	148.5
	26	1.08	4.68	3.5	36.0	352	337.0
Check points	27	0.80	5.37	3.5	36.0	260	251.7
	28	0.80	4.00	5.4	36.0	274	254.4
	29	0.80	4.00	4.0	41.0	240	222.6

The fitted model can be written as:

$$\hat{y} = b_0 + \sum b_j X_j + \sum b_{jj} X_j^2 + \sum b_{jm} X_j X_m,$$

where \hat{y} represents the estimated response (the predicted amyolytic enzyme production) and b_0, b_j, b_{jj}, b_{jm} , correspond to the estimates of the model coefficients.

The four replicates at the center point of the design (experiments 21 to 24) permitted us to estimate the variability of the experimental results. The statistical significance of the model was checked using the variance analysis (ANOVA). The five supplementary experiments (25 to 29) were used to subsequently check the validity of the fitted model before a predictive use of it, by comparing, by means of the t-test, the experimental results at the five check points with those calculated from the model (Goupy, 1999; Lewis *et al.*, 1999; Sarabia and Ortiz, 2009). The relationship between the response and the experimental variables was graphically

illustrated by plotting the three-dimensional response surface and the two dimensional isoreponse curves (Goupy, 1999; Lewis *et al.*, 1999, Sarabia and Ortiz, 2009). They were drawn by plotting the response variation against two of the factors, whereas the others were held at their middle levels (Kamoun *et al.*, 1999; Ghorbel *et al.*, 2009).

3.4. LICHENASE PRODUCTION FROM *BACILLUS* UEB-S BY SOLID-STATE FERMENTATION (SSF)

Dried Millet flour (1g) was transferred into 250 mL erlenmeyer-flask. The volume was then adjusted by addition of water on the basis of experimental conditions indicated in table 2 (taking into account the volume of the inoculum). The contents were thoroughly mixed and autoclaved at 121°C for 20min. After fermentation, distilled water (1:10 W/V) was added to the flask and the content was stirred at 180 rpm, 30 °C for 30 min. The resulting solid suspensions were centrifuged at 8000g for 10 min at 4 °C, and the harvested supernatant was used as crude enzyme extract.

3.5. ENZYME ASSAYS

Lichenase activity was assayed by reducing sugar release from lichenan substrate (MP Biomedical – Solon, USA) using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1956). The assay mixture (0.5% (w/v) lichenan, 50mM MES, pH 6.0) was incubated with enzyme for 10 min and the reaction was stopped by the addition of the DNS reagent. Reducing sugar release was quantified by measuring the A540, and comparing to a glucose standard. All assays were performed in triplicate. One activity unit (U) was the amount of enzyme releasing 1µmol of reducing sugar from lichenan per minute and specific activity the activity units per milligram of enzyme.

3.6. EFFECT OF DETERGENT ADDITIVES ON LICHENASE ACTIVITY

The effect of some oxidizing agents (Tween-20, Tween-80, Triton X-100), surfactants SDS, and bleaches (H₂O₂, sodium perborate) on enzyme activity and stability was studied by pre-incubating the purified enzyme at 40°C for 24 h. The activity of the enzyme (without any additive) was taken as 100%.

3.7. COMPATIBILITY WITH LAUNDRY DETERGENT

The compatibility of the purified lichenase with some commercial liquid and solid detergents was investigated. The liquid detergents included Dinol (ProNET, Tunisia) Ariel(Procter Gamble, Switzerland) and SIC-linge (Chemical Society of Innovation, ENIS, Tunisia). The solid detergents used were, OMO (Unilever, France), Nadhif, Fino and Dixan (Henkel-Alki,

Tunisia). These commercial detergents were diluted in tap water in order to give a final concentration of 7 mg/mL (to simulate washing conditions) (Sallemi Kamoun *et al.*, 2008). The endogenous lichenases contained in these laundry detergents were inactivated by heating the diluted detergents for 1 h at 65°C, prior to the addition of the purified enzyme according to Banik *et al.* (2004). A 0.125 U/g (total activity/g of detergent) of lichenase was shaking-incubated with each laundry detergent for 1 h at 40°C and the residual activity was determined at pH 6.0 and 60°C. The enzyme activity of a control (without any detergent) incubated under similar conditions was taken as 100%.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. LICHENASE PRODUCTION FROM *BACILLUS* UEB-S

Experiments were carried out using the conditions reported in Table 2. The observed responses (lichenase activity) obtained from experiments 1 to 24 were used to compute the model coefficients using the least square method and propose the following model equation for the lichenase production (\hat{y}):

$$\hat{y} = 263.00 + 169.6 X_1 + 100.9 X_2 + 69.20X_3 - 15.3X_4 - 85.30X_1^2 - 149.4X_2^2 - 202.2X_3^2 - 133.8X_4^2 + 222.1 X_1X_2 + 45.2X_1X_3 + 14.9X_2X_3 - 186.6X_1X_4 + 133.1X_2X_4 - 43.4 X_3X_4$$

The variance analysis for the fitted model indicates that the model is statistically meaningful (P-value < 0.01) and the lack of fit is not significant (Table 3).

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of lichenase activity

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	P-value Significance
Regression	3.74564	14	2.67546	23.0469	< 0.01 ***
Residuals	1.04478	9	1.16087		
Lack of fit	7.37911	6	1.22985	1.2023	47.7
Pure error	3.06875	3	1.02291		
Total	3.85012	23			

(***): significant at the level 99.9 %; (NS): non significant at the level 95 %

$$R^2 = 0.973; R_A^2 = 0.931$$

The coefficients of determination are high ($R^2 = 0.973$ and $R_{Adjusted}^2 = 0.93$). They indicate that more than 93% of the variability in the response could be explained by the second-order polynomial predicted equation given above. The results of the check point (experiments 25 to 29) indicate that the experimental values are very close to the predicted ones, as revealed by the Student's t-test (Table 4).

Table 4. Validation of the model by check points

Run N°	y_i	\hat{y}_i	$d = (y_i - \hat{y}_i)$	$s(y_i - \hat{y}_i)$	$t_{exp.}$	p-value
25	164.0	148.5	15.5	37.893	0.410	0.691
26	352.0	337.0	15.0	37.893	0.395	0.702
27	260.0	251.7	8.3	37.524	0.220	0.831
28	274.0	254.4	19.6	37.528	0.523	0.614
29	240.0	222.6	17.4	37.493	0.463	0.654

y_i , experimental response value; \hat{y}_i , estimated response value; d , difference between experimental and estimated response values; $s(y_i - \hat{y}_i)$: Standard deviation of $(y_i - \hat{y}_i)$; $t_{exp.}$, Student t statistics .

The relationship between the response (lichenase yield) and the experimental variables were illustrated graphically by isoresponse curves and response surfaces (Figures 1) As shown in Figure 1A lichenase production by *Bacillus* sp UEB-S, was enhanced by increasing both the inoculum size and the L/S ratio (initial moisture content). Lichenase production values reaches 420 U/g when the inoculum size and L/S ratio are higher than $1.2 \cdot 10^9$ CFU/g and 5.1 mL/g, respectively. Figure 1A clearly shows that at a fixed level of inoculum (0.1 to $0.8 \cdot 10^9$ CFU/g), increasing L/S ratio from 1 to 4 mL/g improved lichenase production. However, above 4 mL/g value, the enzyme yield decreases. At a level of inoculums higher than $0.8 \cdot 10^9$ CFU/g, increasing L/S ratio from 1 to 6 mL/g improved lichenase production. As reported by many researchers an increase of the inoculum size ensures a rapid proliferation of biomass and enzyme synthesis. The critical role of the moisture level may be attributed to physical changes of the solid particles with moisture. Indeed, too high values of moisture may reduce substrate porosity and diffusion. In contrast, too low values did not provide conditions appropriate for solid substrate nutrient solubility (Ashis *et al.*, 2009)

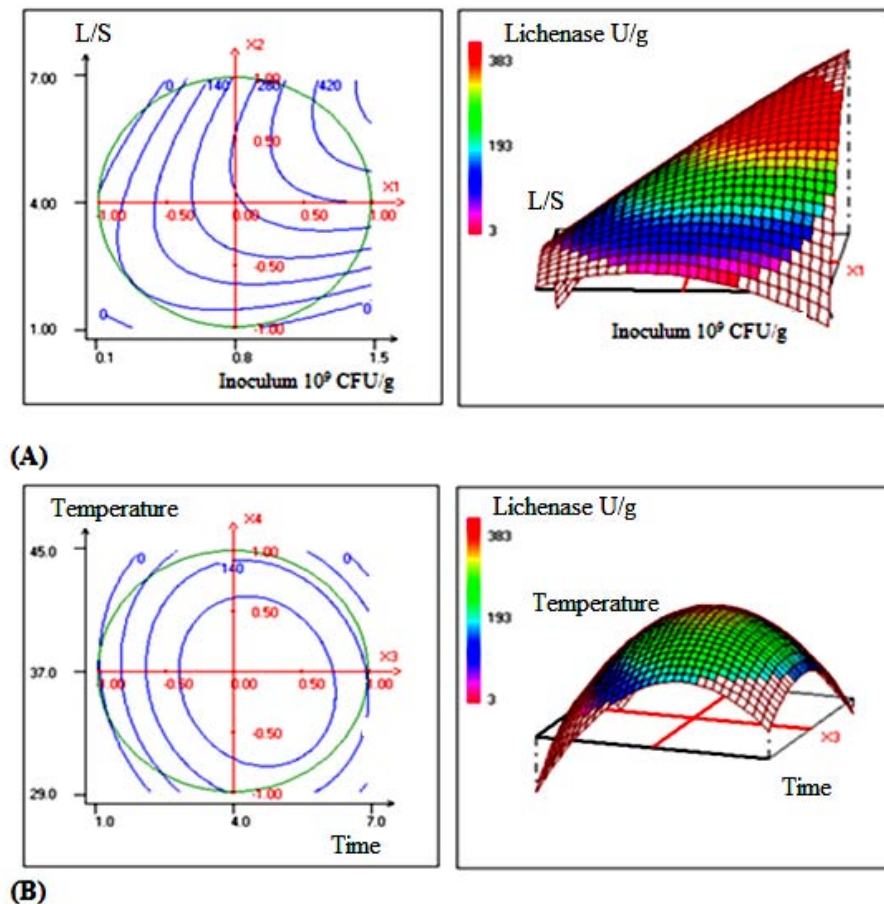


Figure 1. Contour and response surface plots of lichenase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X₁) and L/S (X₂) levels at midlevel (zero on coded level) of time of fermentation (4 days) and temperature (37 °C); B) time of fermentation (X₃) and temperature (X₄) levels at midlevel (zero on coded level) of inoculum (0.8 10⁹ CFU/g) and L/S ratio (4 mL/g). Green Circles indicate the limits of the studied domain.

Figure 1B shows that a relatively high level of lichenase production (210 U/g) is reached when the reaction time varies from 3.0 to 5.5 days and the temperature is comprised between 32 and 40°C. At higher incubation temperatures and/or times, a decrease of lichenase activity, probably due to medium dehydration, is observed. When taking into account the complete results obtained from the isoreponse curves study, we can conclude that the optimal conditions for lichenase activity production were the use of an inoculum level higher than 1.2*10⁹ CFU/g, a moisture to millet ratio higher than 5.1 mL/g, a reaction time in the range of 3.0 to 5.5 days and a temperature in the range of 32 to 40°C. When fixing the incubation time and temperature respectively at 4.6 days and 35°C, the model predicted a maximum lichenase activity of 480 ±52 U/g for an inoculum size of 1.4 10⁹ CFU/g and an L/S ratio of 5.44 mL/g. To validate the predictions, two experiments were carried out in these conditions. Lichenase production reached 477 and 448 U/g, respectively, showing that the enzyme yield is reproducible and in agreement with the prediction. Furthermore, these results suggested

checking an extrapolation consisting in increasing both the inoculum level and the moisture to millet ratio while maintaining the incubation time and temperature levels respectively at 4.6 days and 35°C (Figure 2).

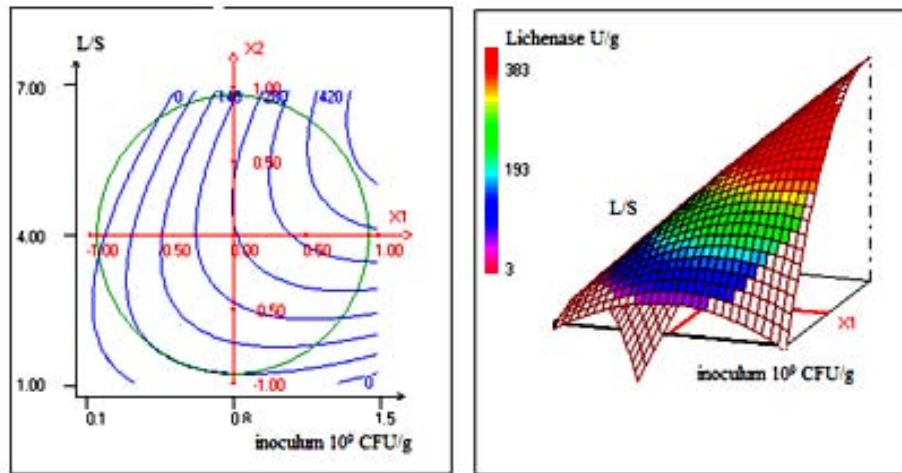


Figure 2. Contour and response surface plots of lichenase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X_1) and L/S (X_2) at fixed levels of time of fermentation (4.6 days) and temperature (35 °C) Green Circles indicate the limits of the studied domain

The model predicted a lichenase activity of 525 ± 76 U/g when increasing the inoculum level to $1.5 \cdot 10^9$ CFU/g and the moisture to millet ratio to 6.16 mL/g. A supplementary experiment was thus carried out under these conditions and better results were then obtained (lichenase production reached 503 U/g). This level is higher than the one obtained by Chaari *et al* (2012) which was 280U/g of lichenase activity using pea pomace as solid substrate (Chaari *et al.*,2012)

4.2. EFFECT OF OXIDANTS, DENATURING AGENTS AND BLEACHES AGENTS

The enzyme was highly stable at 1% and 5% of oxidizing agents (Tween-80, Triton X-100) and exhibited also high stability against the strong anionic surfactants particularly SDS . In fact, UEB-S lichenase retains its activity upon treatment with 0.8% SDS. A 72% residual activity was obtained after incubation with 1% SDS .UEB-S lichenase was also very stable against bleaching agents since it retained 75% and 41% of its initial activity after treatment with 1% hydrogen peroxide and 1% sodium perborate,

Therefore UEB-S lichenase could be considered as a potential candidate for use as cleaning additive in detergents. In fact enzyme incorporated into detergent formulations must be compatible and stable with the commonly used detergent compounds like surfactants, and bleaches (Kumar and Takagi, 1999).

4.3. DETERGENT COMPATIBILITY

We have already demonstrated that lichenase UEB-S exhibit a remarkable stability in the common ingredients in bleach based detergent formulations. Here, we check its compatibility with laundry detergents. Lichenase UEB-S was stable and compatible with some commercial liquid detergents. In fact, it retained about 92, and 80% of its initial activity in the presence of Dinol and Ariel, respectively however, it was less stable in the presence of SIC-linge, where it retained 62% of its activity. Furthermore, it showed excellent stability and compatibility in the presence of some commercial solid detergents such as OMO, Nadhif and Fino retaining about 98, 97, 93 % of its initial activity, respectively. However, it was less stable in the presence of Dixan retaining 69% of its initial activity. In this context, Chaari *et al*, 2012 described the potential use of two lichens isolated from *Bacillus licheniformis* in solid detergent.

5. CONCLUSION

This work described lichenase production by solid state fermentation on crude millet. Useful amounts of lichenase were obtained. To our knowledge, such productions have never been attempted before and demonstrate the potential of crude millet, a renewable resource, largely available in Tunisia and other emerging countries, to be used as raw material for enzyme production. The stability of this enzyme towards oxidizing agents and its compatibility with either solid or liquid detergent make it a good candidate in industrial use

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to the French Institute of Cooperation (Campus France) for providing financial support to carry out this work and awarding a doctoral fellowship to Sameh MAKTOUF. The authors thank LPRAI – Marseille Company for supplying us with Nemrod software.

7. REFERENCES

- Ashis, K., Mukherjee, MB., Sudhir, RK.(2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of alpha amylase in laundry detergent formulations, *Biochem. Eng. J.* 43:149-156.
- Banik, R. M., Prakash, M (2004). "Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*." *Microbiol. Res* **159**: 135-140.
- Box, EP., Hunter, WG., Hunter, JS. 1978. *Statistics for Experimenters*. Wiley, New York.

Carlson, R. 1992. Design and Optimization in Organic Synthesis. Elsevier, Amsterdam, pp.234.

Chaari, F., Bhiri, F., Blibech, M., Maktouf, S., Ellouz-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel, R. (2012a) Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization; *Process Biochem*, 47 :509-516.

Chaari, F., Kamoun, A., Bhiri, F., Blibech, M., Ellouz-Ghorbel, R., Ellouz-Chaabouni, S. (2012b) Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support, *Food Bioprocess Technol* 40:192-198.

Dhayna, G., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Pandey A. (2006) Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. *Food Technol. Biotechnol.* 44:269-274

Doehlert, D. H. (1970). "Uniform shell designs." *Appl Statistics* **19**: 231-239.

Ekinci, M. S., McCrae, S.I., Flint, H.J (1997). "Isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular β -(1,3-1,4)-glucanase from *Streptococcus bovis* JB1." *Appl Environ Microbiol* **63**: 3752-3756.

Ghorbel, R. E., Kamoun, A., Neifar, M., Chaabouni, S.E (2009). "Optimization of new flour improver mixing formula by response surface methodology. ." *J. Food Process Eng* **33**(2): 234-256.

Goupy, J. (1999). *Plans d'Expériences Pour Surfaces de Response*. Paris, Dunod.

Huang, H. Q., Yang, P.L., Luo, H.Y., Tang, H.G., Shao, N., Yuan, T.Z., Wang, Y.R., Bai, Y.G., Yao, B (2008). "High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation, ." *Appl. Microbiol Biotechnol* **78**: 95-103.

Kamoun, A., Samet, B., Bouaziz, J., Chaabouni, M (1999). "Application of a rotatable orthogonal central composite design to the optimization of the formulation and utilization of an useful plasticizer for cement." *Analysis* **27**: 91-96.

Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint, *Biotechnol Adv.* 17, 561-594

Lewis, G. A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R (1999). *Pharmaceutical experimental design*. M. Dekker. New York, Inc.

Mathieu, D., Nony, J., Phan-Tan-Luu, R. (2000.). *NEMROD-W software*. Marseille, LPRAI.

Miller, GL.1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31, 426-429.

Myers, R.H., Montgomery, D.C. 1995. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, Wiley, New York.

Planas, A. (2000). "Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering." *Biochem Biophys Acta* **1543**: 361-382.

Sarabia, L. A., Ortiz, M.C (2009). Response surface methodology. Comprehensive Chemometrics : Chemical and Biochemical Data Analysis. T. Brown, Elsevier.

Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E., Ghorbel- Frikha B., Kanoun S., Nasri , M (2008). "Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations." *Microbiol. Res* **163**: 299-306

Sun, J.Y., Li, W.F., Xu, Z.R., Gu, S.H. 2002. Purification and some of a β -glucanase from a strain, *Trichoderma reesei* GXC. *Journal of Zhejiang University Science*, 3, 106-112.

Tang, X. J., He, G.Q., Chen, Q.H., Zhang X.Y., Ali A.M (2004). "Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology." *Bioresource Technol.* **93**: 175-181.

A NEW RAW STARCH DIGESTING α -AMYLASE: PRODUCTION UNDER SOLID STATE FERMENTATION ON CRUDE MILLET AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION.

1. SUMMARY

A new *Bacillus* strain degrading starch, named *Bacillus* sp. UEB-S, was isolated from a southern Tunisian area. Amylase production using solid state fermentation on millet, an inexpensive and available agro-resource, was investigated. Response surface methodology was applied to establish the relationship between enzyme production and four variables: inoculum size, moisture to millet ratio, temperature and fermentation duration. The maximum enzyme activity recovered was of 680 U/g of dry substrate when using 1.38×10^9 CFU/g as inoculation level, 5.6:1 (mL/g) as moisture ratio (86%), for 4 days of cultivation at 37°C, which was in perfect agreement with the predicted model value. Amylase was purified by Q-Sepharose anion exchange and Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with a 14-fold increase in specific activity. Its molecular mass was estimated at 130 kDa. The enzyme showed maximal activity at pH 5 and 70°C, and efficiently hydrolyzed starch to yield glucose and maltose as end products. The enzyme proved its efficiency for digesting raw cereal below gelatinization temperature and hence, it's potentiality to be used in industrial processes.

2. INTRODUCTION

α -Amylases (E.C.3.2.1.1) hydrolyze α -1-4-glycosidic bonds in starch, glycogen and other related carbohydrates starch to yield diverse products including dextrans and progressively smaller polymers of glucosyl units. Being one of the major industrial enzymes with approximately 25% of the enzyme market, amylases have found numerous applications in food, chemical, textile, laundry, baking and energy sectors (Gupta, 2003; Matteo, 2007).

Amylases are commonly produced under submerged conditions but solid state fermentation is often employed to produce larger amounts (Pandey, 1992; Pandey, 2000a). Many agro-industrial residues such as wheat bran, coconut oil cake, rice, sweet potato or sweet sorghum have been used as supporting insoluble materials for bacterial or fungal SSF (Kunamneni *et al.*, 2005; Singhania *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2000b). For optimal usage, these matrixes should provide all the needs for growth without supply of additional nutrients (Pandey *et al.*, 2000a; Baysal *et al.*, 2003).

Among agricultural crops, pearl millet is an attractive matrix for SSF. This insoluble starchy substrate, usually used in animal feed, has recently been shown to efficiently promote growth of several types of organisms in semi-SSF systems, in which additional nutrient sources were

supplied for growth. For instance, Haq *et al.* (2003) reported that addition of pearl millet to a rich medium containing other starch resources at 1% (w/v) allowed doubling of amylase production level by *B. licheniformis*. However, raw pearl millet has never been tested as a unique source of nutrients for the production of starch-degrading enzymes from bacterial or fungal origin. Due to the expanding development of starch-industry, there is still a demand for enzymes produced at a low cost with improved properties such as high efficiency, Ca²⁺ independency, stability and raw starch digestibility (Kelly *et al.*, 2009). In recent years, a worldwide interest has been focused on the raw starch digesting amylases, which would be of value to simplify the starch process conversion, and to reduce the resulting production cost (Goyal *et al.*, 2005; Achi *et al.*, 1992). It was reported that fungi and yeast, such as *Aspergillus* sp. (13) and *Rhizopus* sp (Matsubara *et al.*, 2004) were good producers of raw starch digesting amylases, while there were few reports on raw starch degradation by *Bacillus* sp. α -amylases. In this investigation, a statistical approach based on Dohler design was used to optimize a raw cereal digesting alpha amylase production under SSF conditions. Millet, a local and economical starchy product, was used as crude substrate. Further, the enzyme was purified and characterized.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. STRAIN

Bacillus sp. UEB-S (accession number HM10077) was isolated from a Southern area of Tunisia.

3.2. SOLID SUBSTRATE

The millet seeds were harvested, washed, dried (at 50°C for 48h) and crushed. Crushed millet having a particle size between 500–1000 μ m was used as solid substrate for amylase production. It has the following composition: starch (43 \pm 0.1%, w/w of dry matter), cellulose (1.5 \pm 0.3%, w/w), proteins (16 \pm 0.02%, w/w), fat (5 \pm 0.2%, w/w), moisture (7 \pm 0%, w/w) and ashes (3.92 \pm 0.025%, w/w) (Article 1)

3.3. AMYLASE PRODUCTION FROM BACILLUS UEB-S BY SOLID-STATE FERMENTATION (SSF)

Crushed millet (1g) was transferred into 250 mL erlenmeyer-flask. Water was then added (taking into account the inoculum volume) to reach the desired moisture to millet ratio (Liquid to Solid ratio; L/S). The mixtures were thoroughly mixed and autoclaved at 121°C

for 20 min. After fermentation, 10 ml of distilled water was added to the flask, and the content was stirred at 180 rpm, 30°C for 30 min. The resulting solid suspensions were centrifuged at 8000g for 10 min at room temperature, and the harvested supernatant was used as a crude enzyme extract.

3.4. DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY

Amylase activity was determined as previously described (Okolo et al, 1955). The reaction mixture consisted of 0.5 mL of 1 % soluble starch (w/w), 0.4 mL of 0.1 M acetate buffer (pH, 5.0) and 0.1 mL of crude enzyme extract. After 5 min of incubation at 70°C, the released reducing sugars (glucose equivalents) were measured by the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Sumner and Howell 1935). One unit (U) of amylolytic activity is defined as the amount of enzyme releasing one μmol of glucose equivalent / minute. Amylase yield was expressed as the total units of crude enzyme produced /gram of dry substrate (U/g).

3.5. EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSES.

A Doehlert uniform shell design (Doehlert 1970; Sarabi et Ortiz 2009; Goupy,1999) was set up to determine the best experimental conditions for optimal enzyme production. The influence of four independent parameters including the inoculum volume (U_1), the ratio of moisturizing agent to solid substrate (U_2), the incubation temperature (U_3) and the fermentation duration (U_4) was examined. The Doehlert matrix consists of N experiments with $N=K^2+K+1$, where K is the number of variables. Since $K=4$, the matrix comprised 21 experiments which were uniformly scattered in the space of the coded variables (X_j). The levels for the four variables (Table 1) were determined from the results of preliminary experiments (data not shown).

Table 1. Experimental domain for the Doehlert Design

Variable	Factor	Unit	U_0	ΔU_j
X_1	U_1 : Inoculum	10^9 CFU/g	0.80	0.70
X_2	U_2 : Moisture to solid ratio	mL/g	4.00	3.00
X_3	U_3 : Time	days	4.0	3.0
X_4	U_4 : temperature	°C	37.0	8.0

The Doehlert design experimental conditions (Table 2) were deduced from the experimental matrix, by converting coded variables X_j into the real variables (which were experimentally used) U_j , using the relationship: $X_j = (U_j - U_{j(0)}) / \Delta U_j$

where $U_{j(0)}$ was the level of U_j at the center of the domain and ΔU_j was the increment of U_j corresponding to a variation of X_j equal to 1.

The experimental results of experiments 1 to 24 were fitted to a second-order polynomial model. The model parameters were estimated by the least square regression method using the Nemrodw Software (Mathieu *et al.*, 2000).

The fitted model can be written as: $\hat{y} = b_0 + \sum b_j X_j + \sum b_{jj} X_j^2 + \sum b_{jm} X_j X_m$,

where \hat{y} represents the estimated response (the predicted amyolytic enzyme production) and b_0 , b_j , b_{jj} , b_{jm} , correspond to the estimates of the model coefficients. The four replicates at the center point of the design (experiments 21 to 24) enabled us to estimate the variability of the experimental results. The model statistical significance was checked using the variance analysis (ANOVA). The five supplementary experiments (25 to 29) were used to subsequently check the validity of the fitted model before a predictive use of it, by comparing, by means of the t-test, the experimental results at the five check points with those calculated from the model (Doehlert 1970; Sarabi et Ortiz 2009; Goupy, 1999). The relationship between the response and the experimental variables was graphically illustrated by plotting the three-dimensional response surface and the two-dimensional isoresponse curves (Doehlert 1970; Sarabi et Ortiz 2009; Goupy, 1999). They were drawn by plotting the response variation

against two of the factors, whereas the others were held at their middle levels (Lewis *et al.*, 1999; Kamoun *et al.*, 1999)

Table 2. Experimental conditions of Doehlert design and corresponding experimental and predicted responses

Run N°	Inoculum (10 ⁹ CFU/g)	Moisture/Solid (mL/g)	Time (days)	Temperature (°C)	Amylase activity (U/g)	Predicted Amylase activity (U/g)	
1	1.50	4.00	4.0	37.0	548	542	
2	0.10	4.00	4.0	37.0	46	53	
3	1.15	6.60	4.0	37.0	616	587	
4	0.45	1.40	4.0	37.0	100	129	
5	1.15	1.40	4.0	37.0	51	95	
6	0.45	6.60	4.0	37.0	108	64	
7	1.15	4.87	6.5	37.0	496	524	
8	0.45	3.13	1.5	37.0	118	90	
9	1.15	3.13	1.5	37.0	265	283	
10	0.80	5.73	1.5	37.0	181	255	
11	0.45	4.87	6.5	37.0	246	228	
12	0.80	2.27	6.5	37.0	304	230	
13	1.15	4.87	4.6	43.3	479	488	
14	0.45	3.13	3.4	30.7	210	201	
15	1.15	3.13	3.4	30.7	528	471	
16	0.80	5.73	3.4	30.7	248	245	
17	0.80	4.00	5.8	30.7	384	452	
18	0.45	4.87	4.6	43.3	212	269	
19	0.80	2.27	4.6	43.3	70	73	
20	0.80	4.00	2.2	43.3	377	309	
21	0.80	4.00	4.0	37.0	518	543	
Center points	22	0.80	4.00	4.0	37.0	571	543
	23	0.80	4.00	4.0	37.0	521	543
	24	0.80	4.00	4.0	37.0	562	543
	25	0.52	4.68	3.5	36.0	320	349
	26	1.08	4.68	3.5	36.0	590	624
Check points	27	0.80	5.37	3.5	36.0	468	491
	28	0.80	4.00	5.4	36.0	490	529
	29	0.80	4.00	4.0	41.0	414	474

3.6. AMYLASE PURIFICATION

All purification steps were carried out at 4 °C. Enzyme extract (10 mg of protein) was dialysed against buffer A (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8) and applied to a Q-Sepharose column (1.6 cm x 11cm) pre-equilibrated with the same buffer. The column was washed and bound proteins were eluted with a linear gradient of 0.05–1 M NaCl in buffer A at a flow rate of 1 ml/min. Fractions containing amylase activity were pooled and concentrated by freeze-drying. The resulting concentrate was dissolved in a minimal volume of buffer A and loaded on a Sephacryl S- 200 gel filtration column (2 cm x160 cm) pre-equilibrated with the same

buffer. Elution was done with a flow rate of 0.4 ml/min (3 ml /fraction). The fractions with amylase activity were pooled, concentrated by freeze-drying and used for further biochemical characterization.

3.7. PROTEIN ASSAY AND POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

Protein concentration was determined using the Bradford method with bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Proteins were separated by electrophoresis using 3-8 % Tris-acetate gels (Invitrogen) in native or denaturing conditions (Laemmli, 1970). After migration, the gel was (1) stained with Colloidal Blue (Invitrogen) or (2) washed three times with 50 mM sodium acetate buffer pH 5 and incubated for 30 min at 50°C in the same buffer supplemented with 100 g/l of starch (Sigma). The active band was then detected by iodine solution staining.

3.8. PROPERTIES OF PURIFIED AMYLASE

3.8.1. SUBSTRATE SPECIFICITY

To determine the substrate specificity of the amylase, the enzyme assay was performed in the reaction mixture containing 1% each of soluble starch, amylose, amylopectine and pullulan.

3.8.2. ANALYSIS OF HYDROLYSIS PRODUCTS

Purified amylase was incubated with 10 mg starch in 1mL of 100mM acetate buffer pH 5.0 (buffer B) at 50°C. Aliquots were periodically withdrawn and the reaction was stopped by placing the samples in boiling water for 10 min. Product analysis of enzymatic hydrolysis (10µl) was performed by HPAEC-PAD using a 4x250 mm Dionex Carbo-pack PA100 column. A gradient of sodium acetate from 6 to 300 mM in 28 min in 150 mM NaOH was applied at 1 ml/min flow rate. Detection was performed using a Dionex ED 40 module with a gold working electrode and an Ag/AgCl pH reference.

3.8.3. EFFECT OF PH AND TEMPERATURE.

The effect of pH on the enzyme activity was determined by incubating the reaction mixture at various pH values ranging from 3 to 10 using the following buffers: citrate (100mM, pH 3–4), sodium acetate (100mM, pH 5–6), phosphate (100mM, pH 6–8), glycine–NaOH (100mM, pH 9–10). To determine the pH stability, the enzyme was pre-incubated at different pH values (3–10) for 24h and 48h at 4 °C. The residual activity was determined using the standard assay as mentioned above. To evaluate the optimal enzyme temperature, various temperatures ranging

from 30°C to 90°C were assayed. The enzyme thermostability was determined by pre-incubating the preparation with or without 2 mM CaCl₂ for 30 and 60 min, at temperatures ranging from 30°C to 90°C. Residual activity was measured using standard assay.

3.8.4. DETERMINATION OF THE N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF AMYLASE UEB-S

The NH₂-terminal sequence was determined with an automated Edman's degradation, using an Applied Biosystems Protein Sequencer Procise.

3.8.5. RAW STARCH HYDROLYSIS

The potential raw starch digestion ability of UEB-amylase was tested by monitoring the hydrolysis of raw starches directly from the dry-milled wheat, barley and millet flour. The reaction was performed at 50°C. After a 24-h incubation, the mixture was centrifuged for 10 min at 10,000 g and the amount of reducing sugar in the supernatant was quantified using the DNS method.

The rate of raw starch hydrolysis (Rh) was calculated according to the equation as follows:

$Rh(\%) = (A1/A0) \times 100$, where A1 is the amount of reducing sugars in the supernatant after hydrolysis, and A0 the amount of raw starch before the reaction.

3.8.6. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Flour samples were stuck on a specimen holder using a silver plate, and then coated with gold by Ion Sputter (Bio-Rad SC-500, Hercules,CA). The specimens obtained were viewed in a scanning electron microscope Philips XL 30 (Philips, Leimeil-Brevannes, France).

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. AMYLASE PRODUCTION ON MILLET

Pearl millet could be considered as rich medium containing the main nutrients necessary for most microorganism growth and metabolite production. In addition, this renewable resource, largely available in Tunisia and other emerging countries can ensure useful amounts of amylase production. Therefore it was used as solid substrate for amylase production by *Bacillus sp.*UEB-S. Experiments were carried out using the conditions reported in Table 2. The observed responses (amylolytic activity) obtained from experiments 1 to 24 were used to compute the model coefficients using the least square method and propose the following

model equation for the amylolytic production (\hat{y}) :

$$\hat{y} = 543.00 + 244.50 X_1 + 123.52X_2 + 70.20X_3 - 36.96X_4 - 246.00X_1^2 - 349.81X_2^2 - 252.43X_3^2 - 201.29X_4^2 + 321.35 X_1X_2 - 50.03X_1X_3 - 138.01X_1X_4 + 18.47X_2X_3 + 248.55X_2X_4 - 112.61 X_3X_4$$

The variance analysis for the fitted model indicates that the model is statistically meaningful (P-value < 0.01) and the lack of fit is not significant (Table 3).

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of amylase activity

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	P-value Significance
Regression	811744	14	57982	14.20	0.000 ***
Residuals	36743	9	4083		
Lack of fit	34489	6	5748	7.65	0.062 ^{ns.}
Pure error	2254	3	751		
Total	848487	23			

(***): significant at the level 99.9 % ; (^{ns.}): non -significant at the level 95 %

$$R^2 = 0.957 ; R_A^2 = 0.889$$

The coefficients of determination are high ($R^2 = 0.957$ and $R_{Adjusted}^2 = 0.889$). They indicate that more than 89% of the variability in the response could be explained by the second-order polynomial predicted equation given above. The results of the check point (experiments 25 to 29) indicated that the experimental values are very close to the predicted ones, as revealed by the Student's t-test (Table 4).

Table 4: Validation of the model with check points

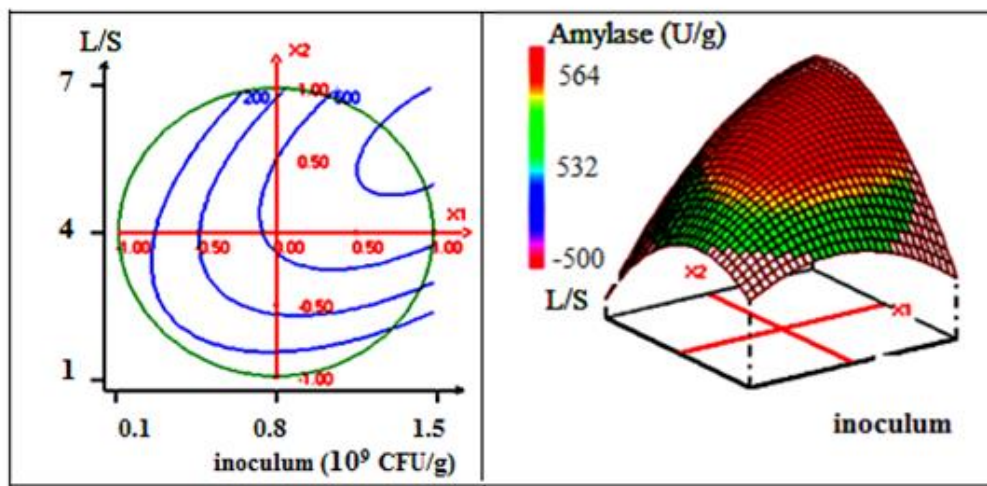
Run N°	y_i	\hat{y}_i	$d = (y_i - \hat{y}_i)$	$s(y_i - \hat{y}_i)$	t_{exp}	p-value
25	320	349	-29	71	-0.410	0.691
26	590	624	-34	71	-0.472	0.648
27	468	491	-23	70	-0.331	0.748
28	490	529	-39	70	-0.552	0.594
29	414	474	-60	70	-0.856	0.414

y_i , experimental response value; \hat{y}_i , estimated response value; d , difference between experimental and estimated response values; $s(y_i - \hat{y}_i)$; Standard deviation of $(y_i - \hat{y}_i)$; t_{exp} , Student

The relationship between the response (amylase yield) and the experimental variables were illustrated graphically by isoresponse curves and response surfaces (Figures 1A and B).

As shown in Figure 1A, amylase production by *Bacillus* sp UEB-S was enhanced from 200 to 650 U/g by increasing both the inoculum size and the L/S ratio (initial moisture content). Amylase production values reached 650 U/g when the inoculum size and L/S ratio are higher than 1.1×10^9 CFU/g and 4.8 mL/g, respectively. Lower inoculum level resulted in lower biomass production and enzyme yield. The importance of the inoculum level on the production of *B. amyloquefaciens* α -amylase by SSF on wheat bran/ groundnut oil cake medium was previously reported (Dhayna *et al.*, 2006).

A



B

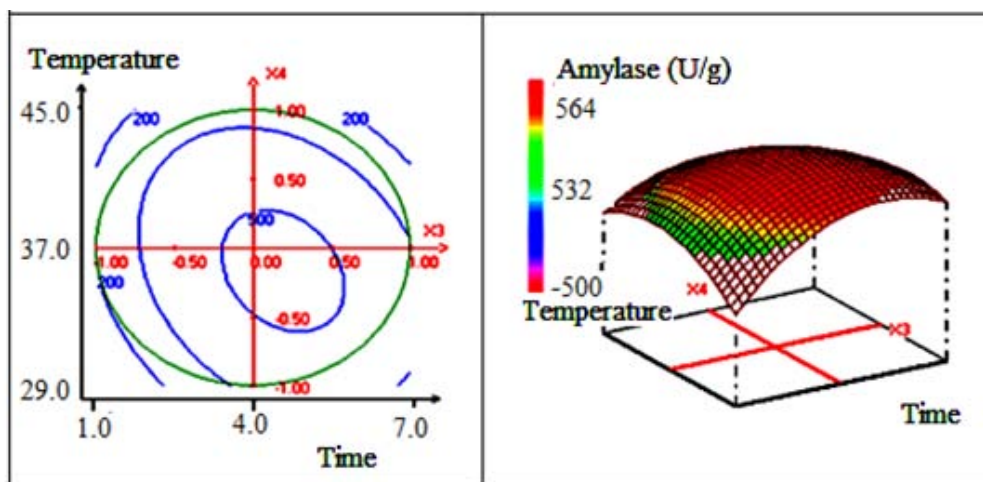


Figure 1. Contour and response surface plots of amylase production by *Bacillus* sp. UEB-S as function of : A) inoculum (X_1) and L/S (X_2) levels at midlevel (zero on coded level) of time of fermentation (4 days) and temperature (37°C); B) time of fermentation (X_3) and temperature (X_4) levels at midlevel (zero on coded level) of inoculum (0.8×10^9 CFU/g) and L/S ratio (4 mL/g).

Circles indicate the limits of the studied domain

Figure 1A also shows that at a fixed level of inoculum ($< 0.8 \times 10^9$ CFU/g), increasing L/S ratio from 1 to 4 mL/g improved amylase production. However, above 4 mL/g value, the enzyme yield decreases. Similar effects of moisture content were also reported (Ashis *et al.*, 2009). By increasing the initial moisture content of potato peels from 25% to 100%, amylase production by *B. subtilis* DM03 was enhanced from 319 to 484 U/g and then decreased above this value. The critical role of the moisture level might be attributed to physical changes of the solid particles with moisture. Indeed, too high values of moisture might reduce substrate porosity and diffusion. In contrast, too low values did not provide conditions appropriate for solid substrate nutrient solubility (Babu et Satyanarayana, 1995).

Figure 1B shows that a relatively high level of amylase production (500 U/g) is reached when the reaction time varies from 3.4 to 5.7 days and the temperature is comprised between 32 and 39°C. At higher incubation temperatures and/or times, a decrease of amylase activity, probably due to medium dehydration, is observed.

From the isoresponse curves, we can conclude that the optimal conditions for amylase activity production were the use of an inoculum level higher than 1.1×10^9 CFU/g, a moisture to millet ratio higher than 4.8 mL/g; a reaction time in the range of 3.4 to 5.7 days and a temperature in the range of 32 to 39°C. When fixing the incubation time and temperature at their middle values (*i.e* 4 days and 37°C, respectively), the model predicted a maximum amylase activity of 684 ± 90 U/g for an inoculum size of 1.38×10^9 CFU/g and an L/S ratio of 5.6 mL/g (86% moisture). To validate the predictions, two experiments were carried out in these conditions. Amylase production reached 679 and 682 U/g, respectively, showing that the enzyme yield was reproducible and in agreement with the prediction. In addition, it compares favorably to the level of activity produced by another *Bacillus sp.* on not supplemented wheat bran matrix ((94.2 U/g of dry substrate, Anto *et al.*, 2006).

4.2. AMYLASE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

The amylase was purified 14- fold with 51% of recovery, by combination of Q-Sepharose ion exchange and Sephacryl S-200 gel filtration chromatography. The specific activity obtained was of 900 U/mg of protein. The purified amylase showed a single band on SDS-PAGE corresponding to a protein with a molecular mass of approximately 130 kDa which also revealed an amylase activity as shown on the zymogram (Figure 2).

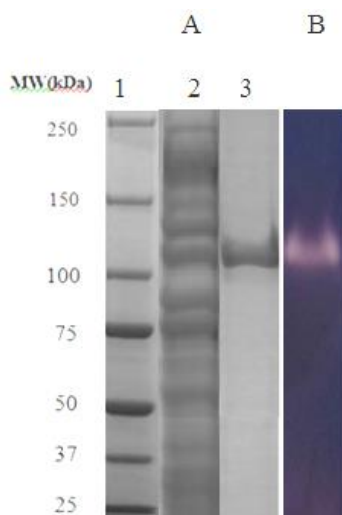


Figure 2: SDS-PAGE analysis (A) and activity staining (B) of the purified amylase
lane 1: Molecular mass markers, lane 2: Crude extract, lane 3: Sephacryl S-200 purified amylase

Molecular weights of α -amylases are usually between 50-60 kDa. However, several high-molecular-weight amylases belonging to Glycoside Hydrolase (GH) families 13, 57 or 119 and produced by various *Bacillus* sp have also been reported. For instance, the amylases from *Bacillus* sp. TS-23 (Lin *et al.*, 1998), *B. clausii* (Duedahl-Olesen *et al.*, 2000) and *B. stearothermophilus* DSM 2358 (Egelseer *et al.*, 1995) showed molecular weights values of 150, 101 and 184 kDa, respectively.

The N-terminal amino acid sequence of this protein was determined to be DILGAPAILPQ. No significant homology with known microbial amylase sequences present in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein databases was found suggesting that this amylase may display original traits.

4.3. SUBSTRATE SPECIFICITY AND AMYLOLYTIC PRODUCT ANALYSIS

The amylase substrate specificity was determined using different polysaccharides. The purified enzyme showed the highest activity towards amylose (1140 U/mg) and soluble starch (900 U/mg), compared to that for amylopectine (495 U/mg). No hydrolytic activity towards pullulan was observed. Analysis of soluble starch hydrolysis products is presented in Figure 3. It showed that maltose, maltotriose, maltotetraose and small amounts of maltopentaose are the main products at early stages of the reaction (1 and 2h) indicating that the purified enzyme possesses an endoamylase activity. After 24h of hydrolysis, these maltooligosaccharides are cleaved to yield large amounts of maltose and glucose at the end of the reaction

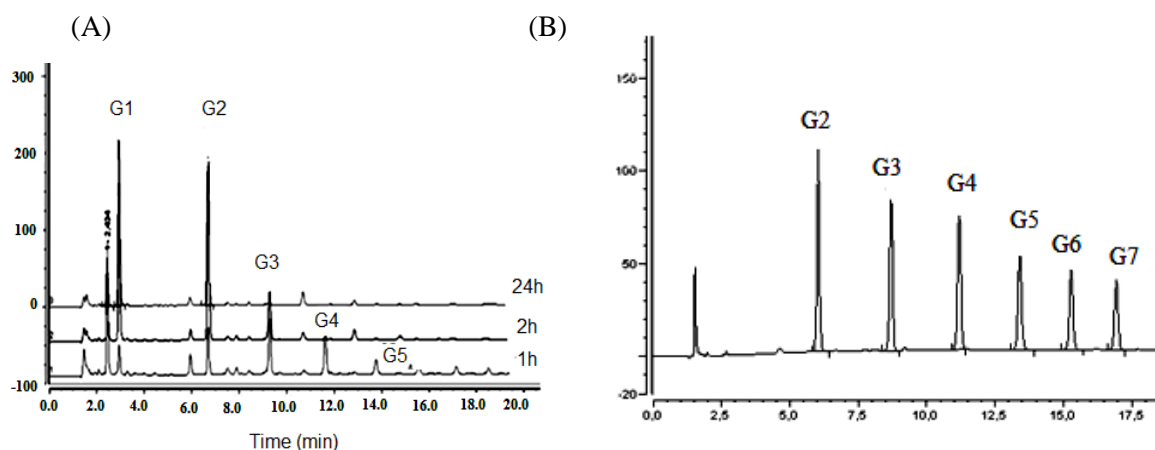


Figure 3. (A) of products obtained after α -amylase digestion of soluble starch for 1, 2 and 24h (B) HPAEC-PAD profile of standards

G1: glucose; G2: maltose; G3: maltotriose; G4: maltotetraose; G5: maltopentaose; G6: maltohexaose and G7: maltopeptaose

4.4. EFFECT OF PH ON THE AMYLASE ACTIVITY AND STABILITY

The enzyme was active between pH 4.0 and 9.0, with an optimum at pH 5.0 (Figure 4). The relative activities at pH 4.0 and 9.0 were of about 30% and 51%, respectively, and rapidly decreased above pH 9.0.

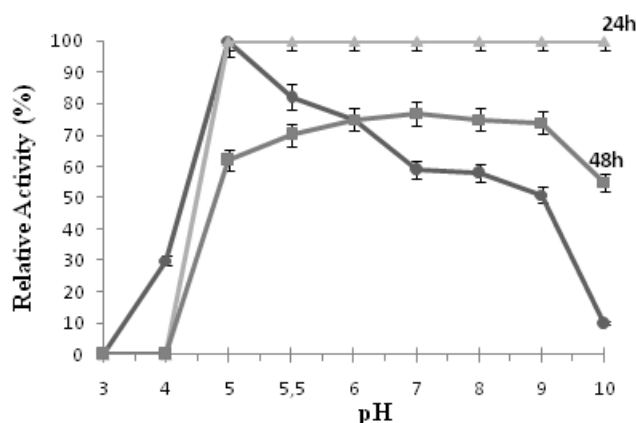


Figure 4. Effect of pH on the activity and stability of the purified α -amylase

(●) optimum pH and (▲, ■) pH stability respectively after 24 and 48 h

The enzyme activity was very stable within a broad pH range from 5.0 to 10, retaining at least more than 50% of its activity after 48h incubation (Figure 4).

These results can be compared with those of the α -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1, also active over a broad range of pH (from pH 5 to 10, with an optimum at pH 7 (Kikani et Singh, 2011). Note that an optimal activity at low pH value (pH 5.0) with a good stability at this pH is very important for industrial applications (Sajedi *et al.*, 2005) reducing the formation of some by-products such as maltulose (Goyal *et al.*, 2005) Thus, this enzyme could be tried in synergism with glucoamylase for the hydrolysis of starchy mashes.

4.5. EFFECT OF TEMPERATURE ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY

As shown in Figure 5A, the purified amylase was active at temperatures ranging from 30 to 90°C, with an optimum at 70°C. The relative activities at 30 and 80°C were of 22% and 60%, respectively. In particular, the enzyme retained 18% of its activity at 90°C. This makes UEB – S alpha amylase a good candidate for industrial applications, requiring enzyme activities in a wide temperature range. Moreover, the enzyme retained its activity after 60 min incubation in the temperature range of 30-50°C (figure 5B). However, the enzyme was inactivated sharply at 60° C. α -amylase from *Nesterenkonia* sp showed the same results for the thermostability (Shafiei et al., 2010).

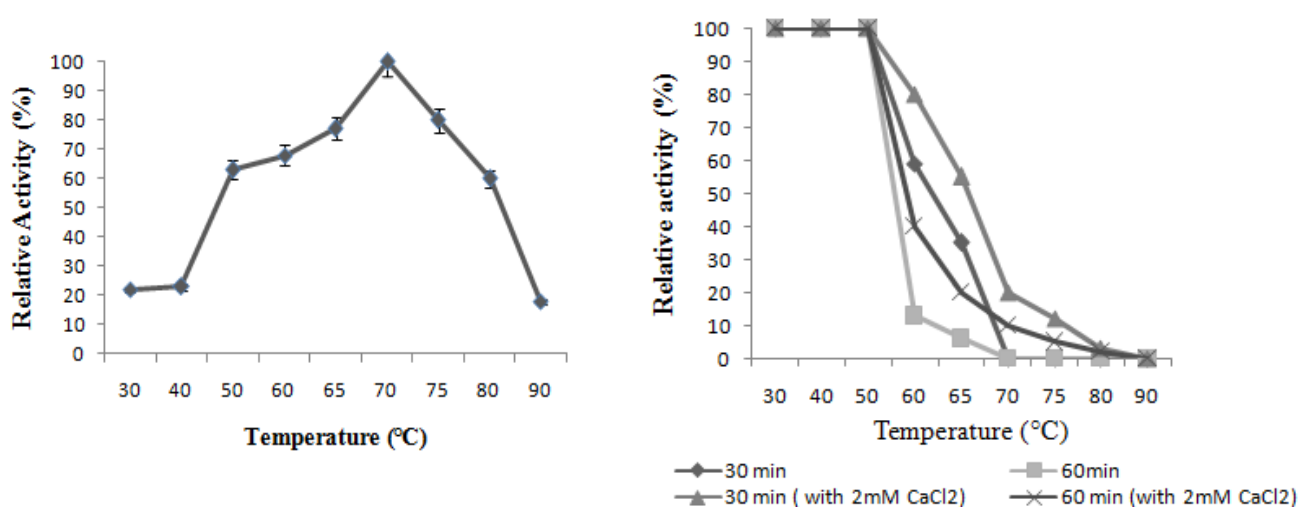


Figure 5: (A) Effect of temperature on the activity of the purified α -amylase (B) Effect of temperature on stability of the purified α -amylase in the absence and presence of 2 mM Ca^{2+}

This is comparable to the results reported for *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus* US 147 amylases (Gangadaharan *et al.*, 2009; Ghorbel *et al.*, 2009), even if higher optimal temperatures up to 100°C have been reported for alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* (Adeyanju *et al.*, 2007). Moreover, addition of calcium ions improved the thermal stability of the purified enzyme. In fact in the absence of Ca^{2+} the enzyme retained 35% of its initial activity at 65°C after 30 min incubation but in the presence of 2mM of Ca^{2+} , it retained 55% (Figure 5B). Similarly, the enzyme lost all its activity after incubation at 70°C for 30 min and 60 min but in the presence of Ca^{2+} ion, it retained respectively 20% and 10 % of its initial activity. The role of Ca^{2+} ion in the stability of amylases was already reported and it has been suggested that the binding of Ca^{2+} ions increase the α -helical structure of α -amylase leading to increased stability (Kim *et al.*, 1991).

4.6. RAW STARCH HYDROLYSIS

Raw starch digesting ability of the enzyme was tested on various raw starch granules. The enzyme hydrolyzed raw barley, wheat, and millet starch granules in the rate of 32%, 45% and 30 %, respectively after 24 h incubation. Raw starch digesting amylases from *Bacillus stearotherophilus* NCA 26 usually need prolonged time of incubation for efficient raw starch hydrolysis (Dettori *et al.*, 1992). Mitsuiki *et al.*(2005) obtained 50% hydrolysis of raw wheat at 40 °C after 5 days (Mitsuiki *et al.*, 2005) whereas Natasa *et al.* (2011) described an hydrolysis rate of 60% at 65°C after only 4 h (Natasa *et al.*, 2011). Degradation patterns towards wheat, barley and millet starch granules were observed by the SEM (Figure 6). The structure of visible starch granules was more or less completely damaged. Amylase UEB-S degraded wheat, barley and millet granules as digging means (from the surface to the center) producing holes on the granules

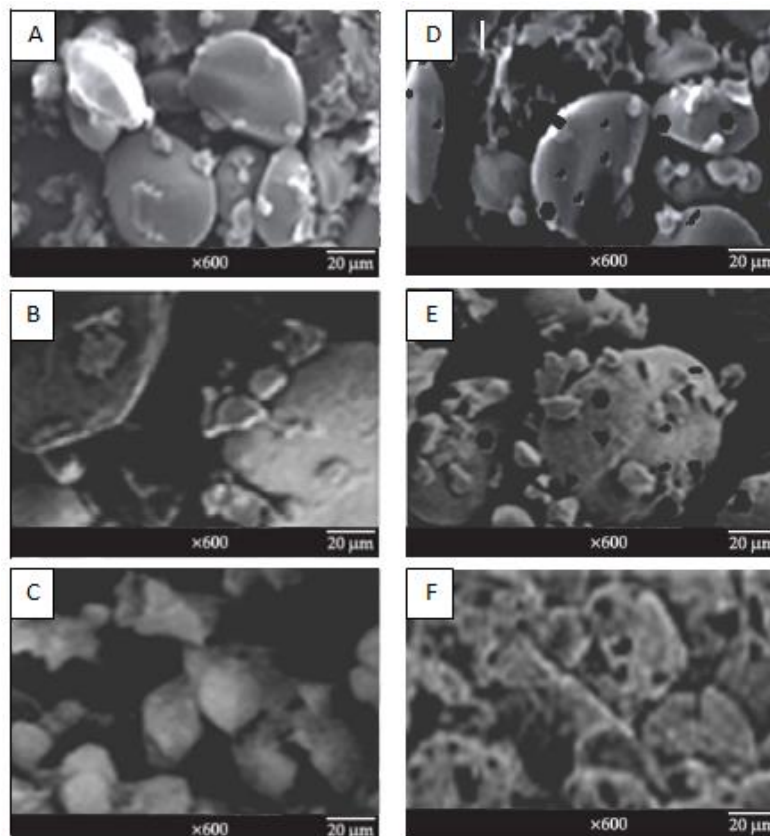


Figure 6. SEM images of : (A,B,C) respectively untreated Wheat flour , barley Flour and millet (D, E, F) respectively hydrolysed wheat , barley and millet by the purified amylase

5. CONCLUSION

This work described the amylase production by solid state fermentation of a new *Bacillus* sp. strain isolated from a southern Tunisian area and its biochemical characterization. For the first time, amylase production was performed using local millet without any nutrient supplementation, which could promote its use as a natural resource. The enzyme was purified and partially characterized. Notably, it showed a good tolerance to a large pH range as well as an attractive ability to digest raw cereals. The N-terminal part of the enzyme does not correspond to any known protein. All these features indicate that the enzyme deserves further characterization to further evaluate its originality and its potentialities for applications.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Sandrine LAGUERRE and Mohamed NAIFAR for their help in reviewing this article. They also wish to extend their thanks to Pr. Jamil JAOUA, former Head of the English Unit at the Sfax Faculty of Science. The authors thank LPRAI – Marseille Company for supplying us with the software package NemrodW and the French Institute of Cooperation (Campus France) for providing financial support to carry out this work and awarding a doctoral fellowship to Sameh MAKTOUF.

7. REFERENCES

- Adeyanju, M.M., F.K., Agboola, B.O. Omfuvbe, O.H. Oyefuga, and O.O. Adebayo. 2007. A Thermostable Extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Cassava Steep Water. *Biotechnology*. **6**:473–480.
- American association of cereal chemists (AACC): Approved Methods of the AACC, 10th Ed., (2000) *Methods* 46-30, 30-10, 44-19, 08-01, *The American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN*
- Anto, H., U. Trivedi, and K. Patel. 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: (2) 241–245.
- Arikan, B. 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelating resistant amylase from thermophilic *Bacillus* isolate A3-15. *Bioresour. Technol.*; **99**, 3071–3076.
- Asgher, M., M.J. Asad, S.U. Rahman, and R.L. Legge. 2007. A thermostable amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing *J. Food. Eng.* **79**:950–955.
- Ashis, K., MB. Mukherjee, and RK. Sudhir. 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of alpha amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.* **43**:149-156.

Baysal, Z., and F. Uyar. 2003. Aytakin. Solid-state fermentation for production of alpha-amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochem.* **38**:1665–1668.

Bradford, M.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.

Dettoni, B.G., F.G. Priest, and J.R Stark. 1992. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26, *Process Biochem.* **27**:17–21.

Dhayna, G., S.Sivaramakrishnan, K.M. Nampoothiri, and A .Pandey. 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. *Food Technol. Biotechnol.***44**:269-274.

Doehlert, D.H., Uniform shell designs. *Appl Statistics* 19 ; 1970.p. 231-239

Dubois, M., K.A Gilles, J.K. Hamilton, P.A.Rebers, and F . Smith.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356

Duedahl-Olesen, L., K.M.Kragh, and W. Zimmermann.2000. Purification and characterization of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Res.* **329**: 97-107.

Egelseer, E., I. Schocher, and M.Sara. 1995. The S-layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high-molecular-weight amylase. *J. Bacteriol.***177**:1444-1451.

Ellaiah, P., K.Adinarayana, Y. Bhavani, P . Padmaja, and B. Srinivasulu.2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* **38**: 615-620.

Gangadharan, D., K.M. Nampoothiri, S.Shivaramakrishnan, and A.Pandey. 2009.Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus amyloliquefaciens* *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**:653–662.

Ghorbel, R.E., A. Kamoun, M.Neifar, and S.E. Chaabouni. 2009. Optimization of new flour improver mixing formula by response surface methodology. *J. Food Process Eng.* **3**: 234-256.

Ghorbel, R.E., S.Maktouf, E. Ben Massoud, S. Bejar, and S.E. Chaabouni.2009. New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157** :50–60

Goupy J. Plans d'Expériences Pour Surfaces de Reponses, Paris : Dunod ; 1999.

Goyal. N., JK. Gupta, and SK. Soni. 2005. A novel raw starch digesting thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch, *Enzyme Microb Technol.* **37**:723–34.

- Gupta. R., P. Gigras, H.Mohapatra, V.K.Goswami, and B. Chauhan. 2003. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* **38**:1599–1616.
- Gurtler, V.A., and V.A. Stanish. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S -23S rDNA spacer region. *Microbiology.***142**: 3-16.
- Haq, I., H. Ashraf, M.A. Qadeer, and J. Iqbal. 2003.Production of alpha- amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour. Technol.* **87**:57-61.
- Kamoun, A., B.Samet, J. Bouaziz, and M. Chaabouni. 1999. Application of a rotatable orthogonal central composite design to the optimization of the formulation and utilization of a useful plasticizer for cement. *Analysis.* **27**: 91-96.
- Kelly, R M., L.Dijkhuizen, and H. Leemhuis. 2009. Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. *Biotechnol. J.* **140**: 184-193.
- Kikani, B.A., and SP. Singh. 2011. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent α -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). *Inter J Biol Macr.* **48**:676-681.
- Kim, K.H., S.W. Suh, and M.U. Choi.1991. Spectroscopic and Electrophoretic Studies on Structural Stability of alpha-Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Korean Journal of Biochemistry* **24**: 158-167.
- Kunamneni, A., S.K.Kuttanpillai, and S.Suren.2005. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of alpha-amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. *Afr. J. Biotechnol* **4**:708- 716.
- Laemmli, U.K. 1970.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.***227**:680-685.
- Lewis, G.A., D.Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu, *In* Marcel Dekker: Pharmaceutical experimental design. New York ; 1999.
- Lin, L.L., C.C. Chyau, and W.H. Hsu. 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Applied Biochem.* **28**: 61-68.
- Mateo, C., J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, , J.M.Guisan, R. Fernandez-Lafuente. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40** :1451–1463.
- Mathieu, D., J.Nony,and R. Phan-Tan-Luu, NEMROD-W Software. *LPRAI, Marseille, France* ; 2000.
- Mitsuiki, S., K.Mukae, M. Sakai, M. Goto, S.Hayashida, and K. Furukawa.2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains, *Enzyme Microb. Technol.* **37**:410–416.
- Mulimani, V.H., and G.N. Ramalingam Patil. 2000. Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochem Edu.* **28**:161-163.

- Natasa, B., J.Ruizb , J. López-Santínb, and Z. Vujčić. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochem. Eng J.* **53**: 203–209.
- Okolo, B.N., L.I. Ezeogu, and C.N. Mba. 1995. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. *J. Sci. Food Agric.* **69**: 109-115.
- Pandey, A., P. Nigam, C. Soccol, V.T. Sccol, D.Singh, and R. Mohan. 2000a. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Applied Biochem.* **31**:135-152.
- Pandey, A., C.R.Soccol, and D. Mitchell. 2000b. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* **35**:1153-1169.
- Puspasari, F., O.K. Radjasa, A.S. Noer, Z. Nurachman, Y.M. Syah, M.van der Maarel, L.Dijkhuizen, Š. Janeček, and D. Natalia. 2012. Raw starch-degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied Microbiol.* doi: 10.1111/jam.12025(2012)
- Sarabia, L.A., and M.C.Ortiz.2009. Response surface methodology in T.R.E.W.B. Brown S editors, *Comprehensive Chemometrics : Chemical and Biochemical Data Analysis*: Elsevier ; 2009. Chapitre 1.12.
- Shafiei, M; Z.Abed-Ali, and A. Mohammad Ali. 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F *Process Biochemistry* **45**:694–699
- Singhania, E.E., A.K.Patel, C.R.Soccol, and A. Pandey. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng.* **44**:13-18.
- Sumner, J., and SA . Howell. 1935. Method for determination of invertase activity. *J Biol Chem.* **108**:51-54.

TROISIEME PARTIE:

**Recherche des gènes codant pour des activités glycosidases
dans la souche de *Bacillus sp.* UEB-S**

Sameh Maktouf, Claire Moulis , Nabil Miled, Semia Ellouz Chaabouni and Magali Remaud-Simeon.
A highly thermostable lichenase from *Bacillus sp* UEB-S: Biochemical and molecular characterization
(Submitted to *Bioresource Technology*)

INTRODUCTION

Les glycosides hydrolases caractérisées précédemment présentent des propriétés intéressantes sur le plan de leur résistance à la température et aux pH alcalins. Pour identifier les facteurs moléculaires responsables de ces caractéristiques, initier l'étude des relations structure fonction, et éventuellement améliorer davantage ces catalyseurs, nous avons entrepris le clonage des gènes codant ces protéines. Pour cela, nous avons choisi de construire une librairie d'ADN de fragments génomiques insérés dans des fosmides. La banque créée a ensuite été soumise à un criblage fonctionnel sur diverses activités glycoside-hydrolases incluant les activités amylolytiques et lichenases, ainsi que galactanases, fructanases, xylanases et feruoyl estérases. Au terme de ce crible, 50 clones positifs ont été isolés, présentant des activités amylases, lichenases, xylanases ou galactanases. Nous avons sélectionné quatre clones différents correspondant à chacune de ces activités, et ils ont été pyroséquencés. Nous ne décrivons ici que le clone présentant une activité sur lichenane, la caractérisation des autres inserts n'ayant pu être entamée dans le temps imparti pour nos travaux.

Nous décrivons donc dans un premier temps la purification et la caractérisation biochimique de la lichenase produite sur le millet, pour enchaîner ensuite sur sa caractérisation moléculaire et finalement la modélisation de sa structure tri-dimensionnelle.

A HIGHLY THERMOSTABLE LICHENASE FROM *BACILLUS* SP UEB-S: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

1. SUMMARY

A highly thermostable and alkaline lichenase was isolated from the newly isolated strain *Bacillus* UEB-S. A single step purification was achieved by heating the enzyme extract for 30 min at 90°C. The purified enzyme was a monomeric protein with a molecular weight of 28 kDa. The optimal temperature and pH for UEB-S lichenase activity were 60°C and 6.0, respectively. More remarkably, the purified lichenase was stable over a broad range of temperature and pH. It retained more than 60% of its activity after incubation at 90°C for 30 min. Substrate specificity studies revealed that the enzyme is a true lichenase and hydrolyses lichenan to yield trisaccharides and tetrasaccharides as the main products. A genomic library was screened to sort out lichenase-active clones. It allows the identification of a gene that encodes a putative lichenase showing 98% identity with the lichenase from *Bacillus subtilis* 168. Sequence comparison revealed that the two enzymes only differed by two mutations at positions 69 and 83, where Val69 and Ser83 are replaced by Met and Ala amino acids, respectively. The 3D model of the protein was generated using the 3D structure of the lichenase from *Bacillus subtilis* 168 as template (Pdb code: 3o5sA). Comparison of the two 3D structures suggested that Val69 stabilizes a calcium binding site and could be involved in the higher stability of the enzyme.

2. INTRODUCTION

Biofuels as renewable energy suppliers are currently increasing interest. Their potential for sustainability as well as reduction of green house gas emissions makes them stand as attractive alternatives to the petroleum-based fuels. In particular, advanced biofuels (second and third generation) that could be produced from lignocellulosic material appear to be more competitive in terms of life-cycle emissions without threatening food stocks. Improving such biomass degradation using appropriate enzyme cocktails is thus very challenging and this stimulates the search for microorganisms or carbohydrate-active enzymes such as lichenases (CAZy) that could efficiently assist plant cell wall deconstruction (McCarthy *et al.*, 2003; Boyce and Walsh ; 2007; Yang *et al.*, 2008). Lichenase exhibit strict substrate specificity for the cleavage of β -1,4-glycosidic bonds of 3-O-substituted glucopyranose units. Most of the known lichenases are of bacterial origin and belong to glycoside hydrolase family 16. The most studied lichenases are produced by *Bacillus* species (Ekinici *et al.*, 1997; Planas 2000;

Teng *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008) and a number of reports have been focused on the isolation of thermostable lichenases because of their potential applications in various industrial processes including bioconversion of lignocellulosic materials into fermentative products, improvement of digestibility of animal feedstock, clarification of fruit juices and the treatment of pulp and papers (Beguin et al. 1994; Bhat 2000; Beckmann *et al.* 2006).

We have recently reported the solid state fermentation of *Bacillus UEB-S* strain isolated in a Tunisian area and optimized the production a lichenase activity (Maktouf *et al.*, 2013). Herein, we describe the biochemical and molecular characterization of the enzyme responsible for this activity.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. STRAINS

Bacillus UEB-S (accession number HM10077) was isolated from a southern area of Tunisia (Maktouf *et al.*, 2013)

EPI300™-T1R Phage T1-resistant *E. coli* strain [F⁻ mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) ϕ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu) 7697galUgalK λ-rpsLnupGtrfAtonAdhfr]

3.2. ENZYME ASSAYS

Lichenase activity was assayed by measuring the release of reducing sugar resulting from lichenan substrate degradation (MP Biomedical – Solon, USA) using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Sumner et Howell, 1935). The assay mixture (0.5% (w/v) lichenan, 50 mM acetate buffer, pH 6.0) was incubated with the enzyme for 10 min and the reaction was stopped by addition of DNS reagent. Reducing sugar release was quantified from a standard calibration curve established with glucose. All the assays were performed in triplicate. One activity unit (U) is defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 μmol of reducing sugar (equivalent to one 1 μmol of glucose) per minute.

3.3. ENZYME PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Lichenase production by *Bacillus UEB-S* was carried out by solid state fermentation using the optimal fermentation conditions described by Maktouf *et al.* (2013). The crude enzyme extract was then heated at 90°C for 30 min. The denatured proteins were removed by

centrifugation at 10000 rpm and 4°C. The supernatant was harvested and used as enzyme source.

3.3.1. ELECTROPHORETIC ANALYSIS

Proteins were separated by electrophoresis using 3-8 % Tris-acetate gels (Invitrogen) in native or denaturing conditions. After migration in denaturing conditions, the gel was stained with Colloidal Blue (Invitrogen). A zymogram was carried out from the electrophoresis carried out in native conditions. After migration, the gel was washed three times with 50 mM sodium acetate buffer pH 6 and incubated for 30min in the same buffer supplemented with 100 g/l lichenan. The active band was then detected by Congo red staining following the protocol described by Garcia-Carreno *et al.* (1993).

3.3.2. SUBSTRATE SPECIFICITY

The enzymatic activity of the purified protein was assayed using a variety of substrates including β -1,3-1,4 glucan, avicel, carboxymethylcellulose (CMC), laminarin, lichenan, oat spelt xylan, and starch. The activity measurements were all determined in 20 mM acetate buffer (pH 6.0) at 60°C using the dinitrosalicylic acid assay method.

3.3.3. HYDROLYTIC PROPERTIES OF THE PURIFIED LICHENASE:

10U of purified lichenase was incubated with 10mg of lichenan in 1mL of acetate buffer pH 6.0 at 60°C. Aliquots were periodically withdrawn and the reaction was stopped by placing the samples in boiling water for 10 min. Products of enzymatic hydrolysis (10 μ l) were analyzed by HPAEC-PAD using a 4x250 mm DionexCarbo-pack PA100 column. A gradient of sodium acetate from 6 to 300 mM in 28 min in 150 mMNaOH was applied at 1 ml/min flow rate. Detection was performed using a Dionex ED40 module with a gold working electrode and anAg/AgCl pH reference.

3.3.4. EFFECT OF TEMPERATURE AND PH ON LICHENASE ACTIVITY

The optimal temperature was determined by incubating the reaction mixture for 30 min at pH 6.0 and temperatures ranging from 30 °C to 100°C. For determination of thermal stability, the purified enzyme fractions were dialyzed against acetate buffer pH 6.0. The dialyzed enzyme samples were incubated at temperatures ranging from 30 °C to 90°C and aliquots were withdrawn at regular time intervals and immediately cooled on ice. Residual activities were determined using the DNS assay. The effect of pH on activity was determined at 60 °C in

50mM buffers over the pH range of 2–12 (acetate buffer pH 2–7; Tris–HCl – pH 8–9, glycine NaOH pH10-12).

3.4. CONSTRUCTION OF THE FOSMIDIC LIBRARY

Bacillus sp UEB-S genomic DNA isolation was carried out using the Blood and Cell Culture DNA Maxi kit (Qiagen). It was further fragmented by pipetting, loaded on 0.8% low-melting-temperature gel (Bio- Rad) and separated for 18 h by pulsed-field gel electrophoresis at 4.5 V/cm with 5- to 40-sec pulse times with a CHEFDRIII apparatus (Bio-Rad). DNA fragments with sizes ranging from 30 to 40 kb were recovered from the gel with GELase (Epicentre Technologies) and cloned into fosmids using the pCC1FOS fosmid library production kit (Epicentre Technologies) as recommended by the manufacturer. Recombinant colonies were transferred to 384-well microliter plates containing freezing medium (Luria-Bertani, 8% (v/v) glycerol complemented with 12.5 g/mL chloramphenicol), using an automated colony picker (QpixII; Genetix). After 22 h of growth at 37°C without any agitation, the plates were stored at 80°C.

3.4.1. HIGH-THROUGHPUT FUNCTIONAL SCREENS

Recombinant clones were screened for polysaccharide digestion activities by spotting them on 22 cm x 22 cm bioassay trays containing LB-agar medium supplemented with 12.5 mg/L chloramphenicol and the chromogenic polysaccharide AZCL-Barley β 1-3,1-4 glucan using a QPixII colony picker (Genetix). The positive clones were visually detected by the presence of a blue halo resulting from the production of colored oligosaccharides that diffused around the bacterial colonies.

3.4.2. PYROSEQUENCING, READ ASSEMBLY, AND GENE PREDICTION

Pyrosequencing of the fosmid insert was performed on a 454 Life Sciences GS FLX system (Roche) by the GeT of Toulouse (Toulouse, France). Read assembly was done using CAP3 (Huang and Madan 1999), a DNA Sequence Assembly Program. PCC1FOS sequences were identified using Crossmatch (<http://bozeman.mbt.washington.edu/phredphrapconsed.html>), discarded, and replaced by NNN. The Metagene program (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/metagene>) was used to predict open reading frames from the resulting sequence. For the selected clone, the large contig sequence has been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession number JX649943.

3.4.3. LICHENASE SEQUENCE ANALYSIS

The sequenced lichenase gene was compared to available sequences from GenBank using the BLASTX programs (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The deduced amino acid sequence was analyzed with EXPASY tools (<http://expasy.org/>). The signal peptide sequence was predicted by SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The nucleotide sequence of the UEB-S lichenase was deposited into the GenBank database under accession number AEJ89794.1.

3.4.4. 3D MODEL OF LICHENASE UEB-S

The 3-D coordinates of the *Bacillus subtilis* 168 lichenase structure (PDB code: 3o5sA) were extracted from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) and used as template to build a model of UEB-S lichenase 3D-structure by using the structure-modelling program Deep View/Swiss-Pdb Viewer v 3.7 (Arnold *et al.*, 2006; Schwede *et al.*, 2003; Guex and Peitsch, 1997), using the alignment mode. The model was then minimized using the Gromos software implemented to View/Swiss-Pdb. Three steps containing each 20 cycles of minimisation using a conjugated gradient were applied. The quality of the model structure was checked using the Procheck program (Procheck, 1993). The visualization and picture generation were carried out using PyMol version 0.99beta06 (<http://www.pymol.org>).

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. ENZYME PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Lichenase activity was purified to homogeneity in one step by simply heating the enzyme extract at 90°C for 30 minutes. The purification factor and recovery yield values were respectively of 67-fold and 62%. The purified enzyme had an apparent molecular weight of approximately 28kDa (figure 1A). This molecular weight is close to that of *Bacillus licheniformis* UEB CF and *Bacillus brevis* lichenases which are of 30 kDa and 29 kDa, respectively (Chaari *et al.* 2012a, Louw *et al.* 1993). As shown in Figure 1B, activity staining of the purified lichenase revealed the presence of a single clear band, confirming the lichenase hydrolysis ability.

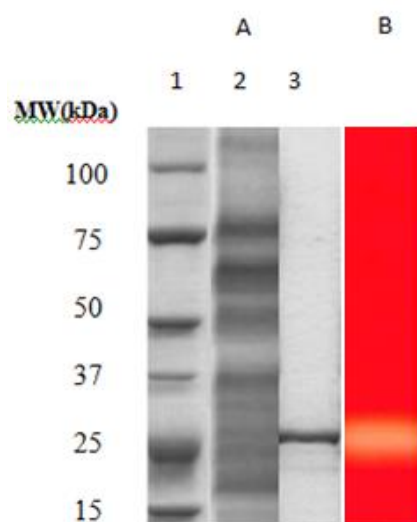


Figure 1. SDS-PAGE analysis (A) and activity staining (B) of the purified lichenase
lane 1: Molecular mass markers, lane 2: Crude extract, lane 3: purified lichenase

4.2. SUBSTRATE SPECIFICITY

UEB-lichenase was active on barley β 1-3,1-4-glucan and lichenan, but exhibited no activity onto α -1,4, α -1,6 glucan; β -1,4, β -1,6 glucan, laminarin and CMC. Therefore it was considered a true lichenase (Grishutin *et al.*, 2006). Hydrolysis products formed during the action of purified UEB-lichenase on lichenan are shown in figure 2.

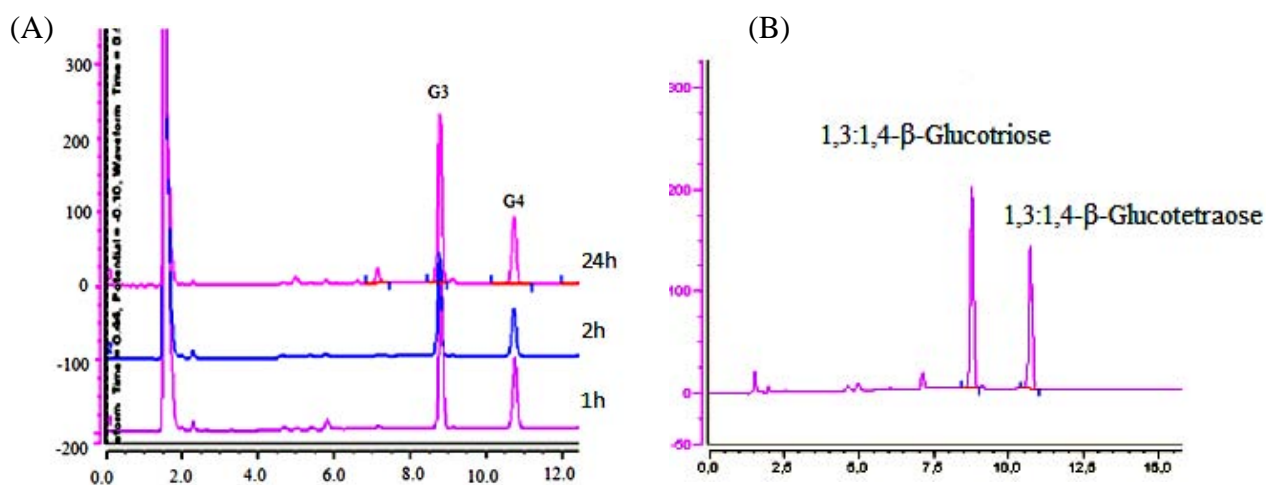


Figure 2. (A) Hydrolysis properties of the purified lichenase: Product pattern obtained by HPAEC-PAD after hydrolysis for 1, 2 and 24h (B)The 1,3-1,4- β -Glucotriose and the 1,3-1,4- β -Glucotetraose were used as standards

After 24h, the percentage of lichenan hydrolysis by UEB-S lichenase reached 68 %, a yield higher than that reported by Chaari *et al.* (2012b) which was only 37% using a lichenase produced by *Bacillus licheniformis* UEB-CF.

The major products formed were 1,3-1,4- β -Glucotriose (60%) and 1,3-1,4- β -Glucotetraose (30%). Similar results were reported by Barry and Mcclary (1988) who obtained mainly trisaccharide (53%) and tetrasaccharide (25%) fractions, with lesser amounts (17%) of

oligomers of higher DP (5-15) and an insoluble precipitate (3%) using a purified lichenase from *Bacillus subtilis*.

4.3. EFFECT OF PH ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY

The enzyme was highly active between pH 2.0 and 11.0. The activity was maintained at the same level between pH 2 and 8 (Figure.3) and the enzyme retained 89 % and 80 % of activity at pH 9.0 and 11. The relative activity decreased rapidly above pH 11.0 (12% at pH 12).

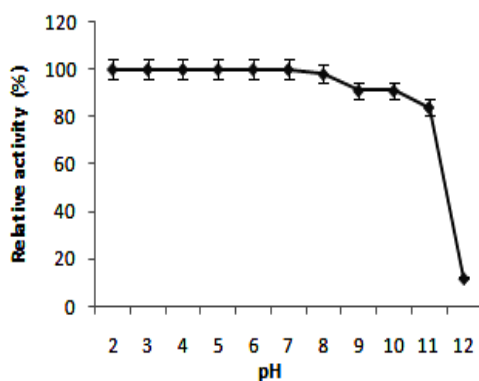


Figure 3. Effect of pH on the activity of the purified lichenase

The pH profile is comparable to that of most other *Bacillus* lichenases, which displayed an optimum pH between 6 and 7.5 values. Two exceptions were reported, the enzymes of *B. Brevis* which showed a pH opt value of 9 and the alkophilic *B. sp N137* which kept more than 80% of its activity between pH 7 and 12 (Planas, 2000).

The pH stability was determined after 72 h-incubation in different buffers of pH ranging from 7.0 to 12.0 at 4° C. The determination of residual activity was carried out at pH 6.0 and 60°C. The enzyme remained fully active at pH ranging from 7.0 to 11 for 48h. After 72h of incubation, lichenase UEB-S retained more than 60% of its activity at pH range 7-11. The stability rapidly decreased above pH 12 as only 15% of remaining activity was determined.

4.4. EFFECT OF TEMPERATURE ON ENZYME ACTIVITY AND STABILITY

As shown in Figure 4, the purified UEB-S lichenase was active at temperatures ranging from 30 to 100° C with an optimum at 60° C. The relative activity values at 30 and 95° C were 96% and 44%, respectively. At 100°C, the enzyme remained active and showed 20% of residual activity. Lower optimal temperatures were determined for *B. subtilis* MA139 enzyme (40°C, Qiao *et al.*, 2009) and for *Bacillus subtilis* 168 lichenase (50°C, Furtado *et al.*, 2011).

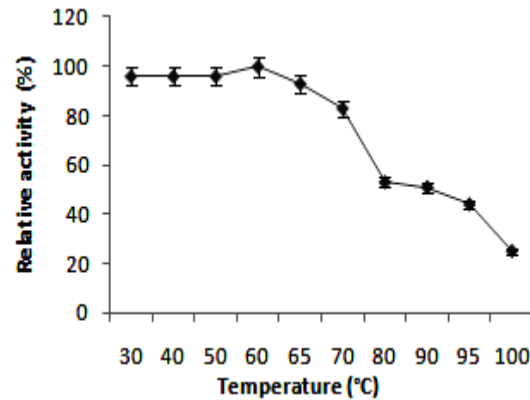


Figure 4. Effect of temperature on the activity of the purified lichenase

Lichenase UEB-S retained its activity after incubation at temperatures ranging from 30 to 60°C for 60 minutes. The residual activity is higher than 60% and 30% after incubation at 90°C for 30 and 60 minutes, respectively. Compared to these values, the thermostability of *Bacillus subtilis* 168 lichenase was lower. Indeed, this enzyme retained less than 40% of its activity after 10 min incubation at 60 °C (Furtado *et al.*, 2011).

4.5. ENZYME MOLECULAR CHARACTERIZATION

A genomic library consisted of 100,000 *Escherichia coli* fosmid clones was first constructed. Three thousand clones were screened for their ability to hydrolyze β -glucan that was previously treated with dyes to allow visual detection of the positive clones. In total, 6 positive clones were obtained. One positive clone showing an ability to degrade lichenan was selected for further analyses.

4.5.1. PYROSEQUENCING , GENE PREDICTION AND HOMOLOGY MODELING

The insert showing lichenase activity was sequenced. Read assembly resulted in 1 large contig obtained with a coverage sequencing depth of 115. The high sequencing depth allowed accurate gene predictions. The total number of predicted genes sizing at least 93nt was 25.

The analysis of the sequence matching with those of known lichenases showed that the insert contained an open reading frame of 727 bp, which encodes a putative lichenase of 242 amino acids with a deduced molecular weight of 27.26 kDa and a predicted pI of 6.41. A signal peptide of 28 aa was predicted by the SignalP program (Emanuelsson *et al.*, 2007). The deduced amino acid sequence shared 98.1% similarity with that of *Bacillus subtilis* 168 lichenase.

4.5.2. HOMOLOGY MODELING

A model was built for the UEB-S lichenase structure using as template the 3-D structure of *Bacillus subtilis*168 lichenase. The UEB-S lichenase sequence displayed two differences compared to the template's one: Val 69 and Ser 83 instead of Met 69 and Ala 83 for *Bacillus subtilis* 168 lichenase sequence. Both Val69 and Ser83 are located far from the catalytic pocket (figure 5A).

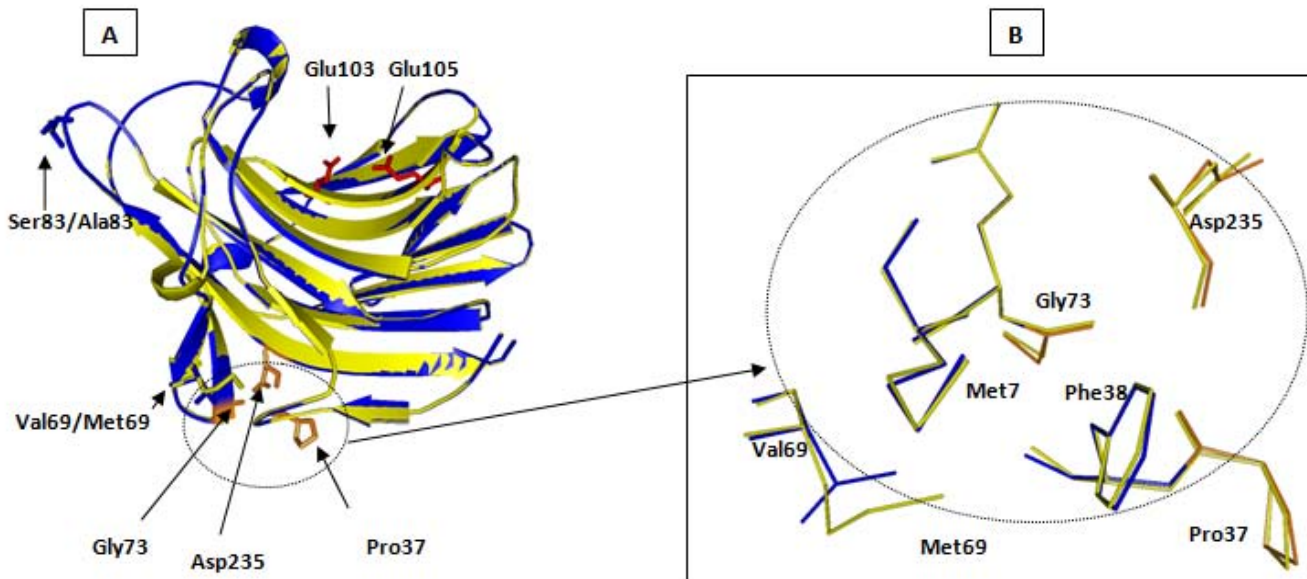


Figure 5: A. Ribbon representation of the structure of *Bacillus subtilis* 168 lichenase (PDB code: 3o5sA) and the model of UEB-S lichenase showing catalytic residues Glu103 and Glu105 as sticks. Residues Ser83/Ala and Val69/Met of the model structure as compared to the template are also shown as sticks. Residues Pro37, Gly73 and Asp235 involved in calcium binding site are also shown as sticks. B. Zoom from A showing as sticks the residues Pro37, Gly73 and Asp235 involved in calcium site as well as residue Val69/Met69 making hydrophobic interactions with residues Phe38 and Met75.

Val 69 is at the opposite side of the catalytic cavity. Interestingly this residue is located nearby a calcium site involving amino acids Pro37, Gly73 and Asp235(Welfle *et al.*, 1995). The presence of Met69 seems to have changed the configuration of the calcium site due to its large hydrophobic radical (figure 5B). Met69 makes strong hydrophobic interactions with residues Phe38 and Met75 which could destabilize calcium binding residues Pro37 and Gly73 (figure 5B). This fact might explain the higher stability of the UEB-S lichenase for which the presence of Val69 seems to be compatible with a higher stability of the calcium site. Lichenases are known to be stabilized in the presence of calcium and similar observations were reported by Welfle *et al.* (1995) who suggested that the geometry of the Ca^{2+} binding

site might explain the different extent of stabilization of three hybrid glucanases due to Ca^{2+} binding (Welfle *et al.*, 1995).

5. CONCLUSION

We report here the biochemical characterization of a highly thermostable lichenase namely UEB-S lichenase. The purification of this protein was achieved to homogeneity in one step. It showed remarkable stability to high temperatures. In addition, the gene encoding this enzyme was isolated from a genomic library of *Bacillus* UEB-S, which was screened for lichenan hydrolyzing activity. The size of the deduced protein is similar to that determined by electrophoresis for the native enzyme. The 3D model analysis of UEB-S lichenase suggested that a modification in the geometry of the calcium binding site could explain the higher stability. The structure-function relationships of this recombinant protein will be now further characterized through sub-cloning of the putative lichenase encoding gene and site-directed mutagenesis experiments which should allow to confirm the stabilization suggested to be due to improved calcium binding.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The high-throughput screening work was performed at the Laboratory for BioSystems & Process Engineering (Toulouse, France) with the ICEO automated facility. ICEO is supported by grants from the Region Midi-Pyrenees, France, the European Regional Development Fund, and the Institut National de la Recherche Agronomique, France (the French National Institute for Agricultural Research). We thank Sophie Bozonnet and Sandrine Laguerre for their assistance. The authors are thankful to the French Institute of Cooperation (Campus France) for providing financial support to carry out this work and awarding a doctoral fellowship to Sameh MAKTOUF.

7. REFERENCES

- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201
- Beckmann, L., Simon, O., Vahjen, W. 2006. Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1, 3-1, 4- β -glucanase activities. *J. Basic Microbiol*, 46, 175-185.

Buliga, G.S., Brant, D.A., Fincher, G.B., 1986. The sequence statistics and solution conformation of a barley (1, 3-1, 4)- β -D-glucan. *Carbohydr Res*, 157, 139-156.

Boyce, A., Walsh, G. 2007. Production, purification and application relevant characterization of an endo-1, 3(4)- β -glucanase from *Rhizomucormiehei*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **76**, 835- 841.

Chaari, Fatma ., Bhiri , F., Blibech, M., Maktouf,S., Ellouz-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel,R 2012a. Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization *Process Biochemistry* 47 , 509–516

Chaari, Fatma ., Blibech, M ., Bhiri , F., Maktouf,S., Ellouz-Ghorbel,R., Ellouz-Chaabouni, S 2012b Production of Mixed-Linkage Beta-Oligosaccharides from Lichenan Using Immobilized *Bacillus licheniformis* UEB CF Lichenase *Appl Biochem Biotechnol* DOI 10.1007/s12010-012-9804-7

Ekinci, M.S., McCrae, S.I., Flint, H.J. 1997. Isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular β -(1,3-1,4)-glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl Environ Microbiol.*, **63**, 3752-3756.

Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G.V., Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat. Protocols*;2: 953–71.

Farrell, A.E., Plevin, R.J., Turner, B.T., Jones, A.D., O'Hare, M. and Kammen, M.D.M. 2006 Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311, 506–508.

Furtado, G P., Ribeiro, L., Santos, C.R., Tonoli, C C., Rodrigues, A ., Oliveiran, R., Murakami, M.T., Ward, R 2011 Biochemical and structural characterization of a β -1,3–1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168 *Process Biochemistry* 46 , 1202–120

Garcia-Carreno, F.L., Dimes, L.F., Haard, N.F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinase or proteinaceous proteinase inhibitors, *Anal Biochem.* 214, 65-69.

Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Dzedzyulya, E.I., Sinitsyn, A.P. 2006. A lichenase-like family 12 endo-(1,4)- β -glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on β glucans in comparison with other glycoside hydrolases. *Carbohydr Res.*, **341**, 218-229.

Guex, N. and Peitsch, M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723)

Huang, H.Q., Yang, P.L., Luo, H.Y., Tang, H.G., Shao, N., Yuan, T.Z., Wang, Y.R., Bai, Y.G., Yao, B. 2008. High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **78**, 95-103.

Huang, X., Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868–877.

Kumar, R., Singh, S. and Singh, O.V. 2008 Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 377–391.

Maktouf, S., Moulis, C., Kamoun, A., Chaari, F., Ellouz Chaabouni, S., Remaud-Simeon M. 2013. A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under solid state fermentation on crude millet *Industrial Crops and Products*, 43, 349-354

McCarthy, T., Hanniffy, O., Savage, A., Tuohy, M.G. 2003. Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3,1,4-linked glucans. *Int J Biol Macromol*, 33, 141-148.

McCleary, BV. 1988 Lichenase from *Bacillus subtilis* *Methods in enzymology*, 160, 572-575

Planas, A. 2000. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochem Biophys Acta*, 1543, 361-382.

Pauly, M., Keegstra K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J*, 54, 59-68

Procheck. (1993) Procheck 3.4 for Windows NT (eds), pp. 32-bit Windows version. Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S & Thornton J M

Qiao, JY., Dong, B., Li, YH., Zhang, B., Cao, YH. 2009. Cloning of a beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152, 334-42.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch MC 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385

Sumner, S., Howell, J 1935. Method for determination of invertase activity. *Biol Chem*, 108, 51-54.

Tang, X.J., He, G.Q., Chen, Q.H., Zhang X.Y., Ali A.M. 2004. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresource Technol.*, 93, 175-181.

Tsai, Y.C., Juang, R.Y., Lin, S.F., Chen, S.W., Yamasaki, M., Tamura, G, . 1988. Production and further characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. *Appl. Environ. Microbio*, 54, 3156-3161.

Welfle, K, ; MISSELWITZ, R; WELFLE, H; POLITZ, O; BORRIS, R. 1995. Influence of Ca^{2+} on conformation and stability of three bacterial hybrid glucanases . *Eur. J. Biochem.* 229, 726-735.

Yang, S., Yan, Q., Jiang, Z., Fan, G., Wang, L. 2008. Biochemical characterization of a novel thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *J Agric Food Chem*, 56, 5345-535

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de caractériser les activités glycoside hydrolases produites par une nouvelle souche de *Bacillus* isolée à partir du Biotope Tunisien afin de mettre en évidence leurs potentialités fonctionnelles.

En vue de produire ces enzymes, nous avons dans un premier temps opté pour une agroressource de faible coût, le millet et un mode de production également peu onéreux, la fermentation sur milieu solide. Nos travaux ont ainsi débuté par la caractérisation de la farine de millet.

Ils ont ensuite comporté plusieurs volets :

- l'identification des activités glycoside hydrolases produites par fermentation de la souche de *Bacillus* sur milieu solide
- l'optimisation de la production de deux activités enzymatiques : une activité amylolytique et une activité lichenase.
- la caractérisation biochimique et moléculaire de l'enzyme présentant les plus fortes potentialités, retenue pour son activité lichenase remarquablement stable à haute température et sur une large gamme de pH.

Le millet : une céréale aux potentialités sous-estimées

Une variété tunisienne de farine de Millet perlé a été caractérisée du point de vue physicochimique et fonctionnel. L'étude a montré que cette farine est plus riche en protéines, lipides et en minéraux que la farine de blé et qu'elle possède un très bon pouvoir d'absorption d'huile et d'eau, très recherché pour les applications alimentaires. Ces propriétés nous ont donné l'idée d'incorporer la farine de millet dans une farine à faible valeur boulangère et d'étudier l'effet de cet ajout sur les propriétés rhéologiques de la pâte et la texture du pain. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une substitution de 5% (w/w) permettait d'obtenir une pâte plus souple, moins collante et un pain présentant une meilleure texture et un volume plus important. Il s'avère donc que cette céréale, qui jusque là était faiblement exploitée en Tunisie, pourrait être incorporée dans notre alimentation et constituer, entre autres, un améliorant de panification. D'autres types d'applications pourraient être envisagés pour les farines de millet, qu'il sera important d'explorer dans la suite de ce travail.

D'autre part, la richesse de cette céréale en protéines, minéraux et carbohydrates a confirmé son potentiel à promouvoir une croissance microbienne et une production enzymatique. Nous l'avons donc testé dans la deuxième partie de notre étude consacrée à la fermentation sur farine de millet d'une souche de *Bacillus sp.* locale ayant révélé son aptitude à hydrolyser la

caséine, le xylane, l'amidon et le lichenane à pH 9 et à une température de 45°C. Dans notre étude, nous avons cherché à optimiser la production des activités amylolytiques et lichenases.

La production de glycoside hydrolases par fermentation sur farine de millet

La production d'amylases et lichenases par fermentation en milieu solide sur farine de millet a été optimisée sur la base des résultats d'un plan d'expérience de type Dohler à quatre variables incluant la taille de l'inoculum, l'humidité, la température et la durée de fermentation. Les conditions optimales établies ont permis d'atteindre un niveau de production de 680 U/g et 503 U/g de farine pour les activités amylolytique et lichenase, respectivement. Les procédés développés ne nécessitent pas d'équipements hyper sophistiqués et permettent de produire, à partir de millet, les enzymes cibles avec des rendements comparables -voire supérieurs- à ceux déjà décrits dans la littérature sur d'autres substrats.

Caractérisation et potentialités fonctionnelles des activités amylase et lichenase

Les enzymes ainsi produites par fermentation sur milieu solide ont été purifiées et caractérisées biochimiquement. L'amylase s'est distinguée de par sa capacité à dégrader les amidons natifs de certaines céréales comme le son de blé, le millet et la farine d'orge. De plus, sa séquence N-terminale est apparue originale et ne présente aucune homologie avec des séquences disponibles dans les banques de données. L'enzyme mérite donc d'être plus amplement caractérisée. Nous avons isolé un clone déployant une activité amylolytique par criblage d'une librairie génomique. Nous envisageons donc en perspective à ces travaux de séquencer ce clone et d'identifier l'activité amylolytique par mutagenèse de transposition et/ou analyse de séquences. Nous pourrions ainsi déterminer la famille à laquelle appartient cette enzyme et compléter sa caractérisation.

D'autre part, nous avons montré que l'activité lichenase produite sur milieu solide par *Bacillus* UEB-S est, quant à elle, remarquable sur plusieurs plans. Elle est très facilement purifiable par traitement thermique à 90°C. L'enzyme conserve en effet plus de 60 % de son activité après 30 min d'incubation tandis que les autres protéines sécrétées sont facilement éliminées par dénaturation. De plus, la stabilité exceptionnellement élevée à la température et aux pH alcalins de cette enzyme la place parmi les enzymes les plus performantes de sa catégorie. De plus, nous avons démontré sa résistance en présence d'agents de blanchiment et sa compatibilité avec des détergents liquides et solides qui permettent d'envisager son utilisation notamment pour les secteurs de la détergence. Ces potentialités nous ont conduits à

investiguer plus avant les propriétés de ce catalyseur et à tenter d'isoler le gène codant pour cette enzyme. Nous avons construit avec succès une banque génomique par insertion de fragments d'ADN génomique dans un vecteur fosmidique. Le criblage de cette librairie sur lichenane a, de plus, permis de retenir un clone qui a été séquencé. L'analyse de séquence a révélé la présence d'un gène codant une protéine présentant une très forte identité avec la lichenase de *B. subtilis* 168, seuls deux acides aminés divergeants ayant été identifiés. Cette analyse suggère donc que ce gène code bien pour la lichenase hyperthermostable que nous avons caractérisée. Malgré une très forte homologie, les deux enzymes présentent des différences notables de stabilité à la température, la lichenase de *B. subtilis* 168 étant instable au-delà de 60°C. Pour rechercher d'éventuels facteurs structuraux responsables de ces propriétés, nous avons généré un modèle de la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *Bacillus sp* UEB-S. Son analyse a révélé que la valine en position 69 (remplacée par une alanine dans l'enzyme de *B. subtilis* 168) se trouve à proximité du site de fixation du calcium et entraîne une modification géométrique du site. Ces changements structuraux pourraient renforcer l'arrimage de l'ion et ainsi contribuer à une meilleure stabilité de la protéine.

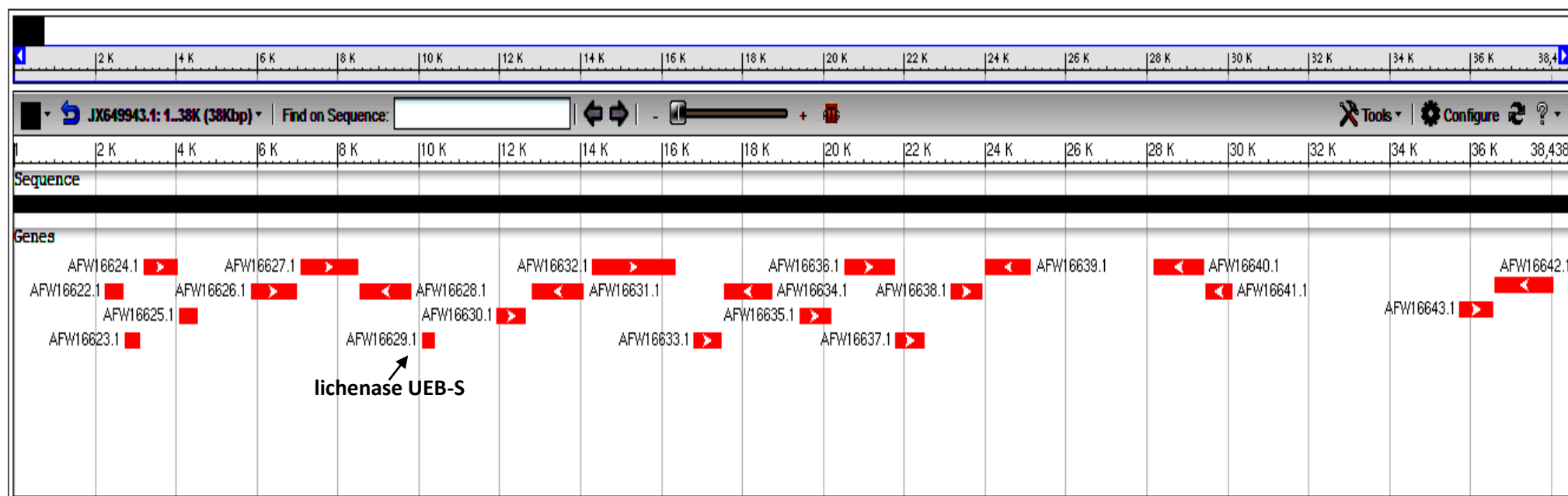
Pour confirmer ces résultats, les travaux futurs devront s'orienter vers la poursuite de la caractérisation de la lichenase. Pour cela le gène identifié devra être sous cloné et exprimé dans *E. coli* ou un autre hôte. Des expériences de mutagenèse dirigée ciblant le site de fixation du calcium pourront alors être entreprises. D'autre part, nous envisageons également de tenter de résoudre la structure 3D par cristallographie des rayons X. Enfin, le criblage de la banque génomique a permis d'isoler différents clones positifs sur d'autres substrats tels que le xylan ou la pectine, dont nous envisageons une poursuite de la caractérisation.

La suite de ce travail portera donc sur :

- Une meilleure exploitation du millet, agroressource riche et de faible coût,
- Le sous-clonage du gène codant pour la lichenase issue de *Bacillus subtilis* UEB-S pour son expression dans un système hétérologue;
- Une mutation de la valine 69 ainsi que la sérine 83, l'expression des protéines mutées et la comparaison de leur propriété biochimiques avec la protéine native,
- Etudier les autres gènes issus du crible de la banque génomique.

ANNEXES

ANNOTATION DU CONTIG JX649943.1



AFW16622.1 hypothetical protein
 AFW16623.1 putative nucleic acid binding protein
 AFW16624.1 hypothetical protein
 AFW16627.1 putative esterase
 AFW16625.1 ATP-dependent RNA helicase
 AFW16626.1 putative efflux transporter
 AFW16628.1 putative lipoprotein
 AFW16629.1 **lichenase**
 AFW16630.1 citrate transporter
 AFW16631.1 catalase \downarrow
 AFW16632.1 hypothetical protein

AFW16633.1 putative purine nucleoside transporter
 AFW16634.1 putative ribosomal RNA methyltransferase
 AFW16635.1 putative permease
 AFW16636.1 succinyl CoA: 3-oxoacid CoA-transferase
 AFW16637.1 putative dehydrogenase
 AFW16638.1 putative methyltetrahydrofolate methyltransferase
 AFW16639.1 peptidase T
 AFW16640.1 putative sensory transduction protein
 AFW16641.1 efflux transporter
 AFW16642.1 benzaldehyde dehydrogenase
 AFW16643.1 efflux transporter

AUTRES PUBLICATIONS

ARTICLE 1: Raoudha Ellouz Ghorbel, **Sameh Maktouf**, Ezedine Ben Massoud, Samir Bejar and Semia Ellouz Chaabouni.(2008) New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 157, Number 1, 50-60.

ABSTRACT

A new thermophilic bacterial strain identified as *Bacillus cohnii* US147 was isolated from the southern Tunisian soil. The identification was based on physiological tests and molecular techniques related to the 16S ribosomal ribonucleic acid. The isolated strain produced amylase, which was purified. This amylase had an apparent molecular mass of 30 kDa as estimated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. Amylase US147 showed K_m and V_{max} values of 0.7 mg/ml and 2.2 U/ml, respectively, with starch as the substrate. The enzyme was active in acid and basic pH and had a maximal activity on starch at pH 9 and 70 °C. The enzyme was stable at pH 9 for 72 h and retained half of its activity after incubation at 70 °C for 150 min. A partial inhibition (15%, 25%, 23%, 20%, and 22%) was obtained with 1 mM SDS, 1 mM NaBO₃, 1 mM H₂O₂, 1 mM Zn⁺², and 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), respectively. The amylase recovered its original activity by the addition of 10 mM Ca²⁺ to the 5 mM EDTA. These properties indicated a possible use of this amylase in starch saccharification, in detergent, and in other industrial applications.

ARTICLE 2: Dhouha Ghribi, Lobna Abdelkefi-Mesrati, Ines Mnif, Radhouan Kammoun, Imen Ayadi, Imen Saadaoui, **Sameh Maktouf** and Semia Chaabouni-Ellouze.(2012).Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation.Journal of Biomedicine and Biotechnology.Volume 2012

ABSTRACT

During the last years, several applications of biosurfactants with medical purposes have been reported. Biosurfactants are considered relevant molecules for applications in combating many diseases. However, their use is currently extremely limited due to their high cost in relation to that of chemical surfactants. Use of inexpensive substrates can drastically decrease its production cost. Here, twelve solid substrates were screened for the production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant and the maximum yield was found with millet. A Plackett-Burman design was then used to evaluate the effects of five variables (temperature, moisture, initial pH, inoculum age, and inoculum size). Statistical analyses showed that temperature, inoculum age, and moisture content had significantly positive effect on SPB1 biosurfactant production. Their values were further optimized using a central composite design and a response surface methodology. The optimal conditions of temperature, inoculum age, and moisture content obtained under the conditions of study were 37°C, 14 h, and 88%, respectively. The evaluation of the antimicrobial activity of this compound was carried out against 11 bacteria and 8 fungi. The results demonstrated that this biosurfactant exhibited an important antimicrobial activity against microorganisms with multidrug-resistant profiles. Its activity was very effective against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, and so forth.

ARTICLE 3: Fatma Chaari, Fatma Bhiri, Monia Blibech, **Sameh Maktouf**, Semia Ellouz-Chaabouni, Raoudha Ellouz-Ghorbel (2012) Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization *Process Biochemistry*, Volume 47, Issue 3, Pages 509-516

ABSTRACT

Two thermostable and alkali-stable β -1,3–1,4 glucanases (EC 3.2.1.73) EG1 and EG2 from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF were purified. The molecular weights of EG1 and EG2 enzymes determined by SDS–PAGE were approximately 30 kDa and 55 kDa, respectively. The N-terminal amino acid sequences of EG1 and EG2 β -glucanases were determined to be GAAPIKKGTTKLN and DINGGGATLPQK, respectively. The optimum temperature, optimum pH, K_m and V_{max} of EG1 were 70 °C, 5.0, 2.1 mg/ml and 21.25 mol/min/mg, respectively. These values for EG2 were 60 °C, 7.0, 1.82 mg/ml and 18.54 mol/min/mg, respectively. Both endoglucanases were highly active against barley β -glucan and lichenan. However, they were inactive against CMC and laminarin. The purified β -glucanases were found to be relatively stable toward non-ionic surfactants and oxidizing agents. In addition, both enzymes showed excellent stability and compatibility with a wide range of commercial solid detergents suggesting that they are a potential *candidate in detergent industries formulation*.

ARTICLE 4: Fatma Chaari , Monia Blibech , Fatma Bhiri , **Sameh Maktouf** , Raoudha Ellouz-Ghorbel & Semia Ellouz-Chaabouni. Production of Mixed-Linkage Beta-Oligosaccharides from Lichenan Using Immobilized *Bacillus licheniformis* UEB CF Lichenase; Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-012-9804-7

ABSTRACT

Lichenase from *Bacillus licheniformis* UEB CF was immobilized on Amberlite IR120 H. The immobilization yield and lichenase activity were 87 and 92.81 % of initial activity, respectively. The immobilized enzyme exhibited a shift in the optimal pH from 5.0 to 3.0, but the activity optimal temperature was not affected. The immobilized enzyme showed a residual activity of 50 % after five uses. It also exhibited high storage stability and retained 50 % of its initial activity after 120 days at 4 °C. The main hydrolysis products yielded from lichenan were trisaccharide and tetrasaccharide. The resulting mixed-linkage beta-oligosaccharides could be used as a special nutriment for lactic bacteria.

