

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTE DE GENIE DES PROCEDES

DEPARTEMENT GENIE PHARMACEUTIQUE

N° d'ordre :... ..

Série :... ..

Mémoire de Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Application et optimisation d'un procédé de production de l' α -amylase
par *Bacillus amyloliquefaciens*, sur milieu solide

Dirigé par :

Mme A. BENAÏSSA-KACEM CHAOUCHE

Grade : Maitre de Conférences classe A

Rédigé par :

GUIDOUM Soumia

SETTAF Chahinez

Année Universitaire 2017/2018

Table des matières

<i>Les titres matières</i>	<i>Page</i>
Liste des tableaux	<i>I</i>
Liste des figures	<i>II</i>
Liste des abréviations	<i>III</i>
Introduction générale	<i>1</i>
1. Aperçu bibliographique	<i>3</i>
1.1. Enzymes	<i>3</i>
1.1.1. Définition	<i>3</i>
1.1.2. Caractéristiques particulières aux enzymes	<i>3</i>
1.1.3. Historique des enzymes	<i>3</i>
1.1.4. Origine des enzymes	<i>4</i>
1.1.5. Classification, inconvénients et avantages des enzymes	<i>4</i>
1.1.6. Application et marché des enzymes	<i>6</i>
1.2. Amylases	<i>6</i>
1.2.1. Définition	<i>6</i>
1.2.2. Type des amylases	<i>7</i>
1.2.2.1. α -amylase	<i>7</i>
1.2.2.2. β - Amylase	<i>7</i>
1.2.2.3. Gluco-amylase	<i>8</i>
1.2.3. Définition et structure de l' α -amylase	<i>8</i>
1.2.4. Mécanisme d'action de l' α -amylase	<i>8</i>
1.2.4.1. Attaque aléatoire	<i>8</i>

1.2.4.2. Mécanisme uni-chaine	8
1.2.4.3. Mécanisme multi-chaine	9
1.2.4.4. Attaque répétitive ou multiple	9
1.2.5. Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases	9
1.2.5.1. Température et pH optimaux	9
1.2.5.2. Poids moléculaire	9
1.2.5.3. Spécificité du substrat	9
1.2.5.4. Effet des ions métalliques	10
1.2.6. Différentes sources de l' α -amylase	10
1.2.6.1. Source animale	10
1.2.6.2. Source végétale	10
1.2.6.3. Source microbienne	10
1.2.7. Production de l' α -amylase	11
1.2.8. Facteurs influençant la production de l'alpha amylase	12
1.2.8.1. Température	12
1.2.8.2. pH	12
1.2.8.3. Composition du milieu de culture	12
1.2.8.4. Temps d'incubation	12
1.2.9. Applications industrielles et biotechnologiques de l' α -amylase	13
1.2.9.1. Hydrolyse de l'amidon	13
1.2.9.2. Industrie de la boulangerie	13
1.2.9.3. Industrie du détergent	14

1.2.9.4. Désencollage des textiles	14
1.2.9.5. Industrie du papier	14
1.2.9.6. Industrie de biocarburant	14
1.2.9.7. Industries agro-alimentaires	14
1.2.9.8. Industrie des boissons	15
1.2.9.9. Autres applications des α - amylases	15
1.3. Bactéries	15
1.3.1. Définition	15
1.3.2. Croissance bactérienne	15
1.3.3. Facteurs influence des conditions de croissance	16
1.3.3.1. Température	16
1.3.3.2. pH	16
1.4. Fermentation	16
1.4.1. Généralités	16
1.4.2. But de la fermentation	17
1.4.3. Types de fermentation	17
1.4.3.1. Fermentation alcoolique	17
1.4.3.2. Fermentation lactique	17
1.4.3.3. Fermentation acétique	17
1.4.3.4. Fermentation malolactique	17
1.4.4. Approches de la fermentation	17
1.4.4.1. Approche microbiologique	17
1.4.4.2. Approche mathématique	17
1.4.4.3. Approche technologique	17

1.4.5. Fermenteur	18
1.4.5.1. Types de fermenteur	18
1.4.5.2. Extrapolation des bioréacteurs	18
1.4.5.3. Technologie des bioréacteurs	19
1.4.5.4. Modes de conduite des bioréacteurs	20
2. Matériel et méthodes	23
2.1. Matériel	23
2.1.1. Matériel non biologique	23
2.1.1.1. Verrerie et les outils utilisés	23
2.1.1.2. Réactifs et produits	23
2.1.1.3. Appareillage	24
2.1.2. Matériel biologique	25
2.1.2.1. Définition	26
2.1.2.2. Classification	26
2.1.2.3. Origine et réactivation de la souche au laboratoire	26
2.2. Procédure expérimentale	27
2.2.1-Détection de l'activité amylasique	28
2.2.2-Production de l'Alpha-amylase sur milieu solide	28
2.2.2.1-Déchets Agricoles utilisés	28
2.2.2.2- Purification de la souche bactérienne	30
2.2.2.3-Préparation de l'inoculum	30
2.2.2.4- Comptage des cellules à l'aide de la cellule de Thomas	30

2.2.3-Préparations du milieu de fermentation à base de Son de blé	31
2.2.4. Procédé de fermentation proprement dit	31
2.2.5-Extraction de l'enzyme Alpha-amylase à partir des milieux solides SSF	32
2.2.6- Détermination de l'activité amylasique	33
2.2.6.1. Principe	33
2.2.6.2. Protocole expérimental	33
2.2.6.3. Mode opératoire de préparation des étalons purs de glucose	34
2.2.6.4. Spectrophotométrie UV-visible	36
2.3. Sélection des facteurs et optimisation du milieu de production	37
2.3.1. Définition de la réponse étudiée	37
2.3.2. Plan d'expérience	38
2.3.3. Choix des facteurs	39
2.3.3. 1. Choix de la température	39
2.3.3. 2. Choix de temps d'incubation	39
2.3.3.3. Choix de la masse de substrat	39
2.3.4. Organisation des expériences	39
2.3.5. Analyse statistique	42
2.4. Extrapolation de la production d' α -amylase à l'échelle pilote (en fermenteur de 10litres)	42
2.4.1. Méthode aux sulfites pour la détermination du K_{La} dans un milieu dépourvu de microorganismes	42
2.4.1.1. Mode opératoire	43

3. Résultats et discussion	45
3.1. Détection de l'activité enzymatique	45
3.2. Comptage des cellules	45
3.3. Vérification de la faisabilité d'une production de l'enzyme sur milieu solide, à l'échelle de laboratoire	46
3.4. Optimisation de la réponse	48
3.4.1-Plan d'expérience Box-Behnken	48
3.4.2. Estimation des effets	51
3.4.3. Quantification des effets principaux et interactifs	52
3.4.4. Signification des effets	53
3.4.4.1. Test de Student	53
3.4.4.2. Analyse de la variance (ANOVA)	54
3.4.4.3. Détermination de R^2	56
3.4.5. Etude de la réponse	56
3.4.5.1. Méthodologie des surfaces de réponse (MSR)	56
3.4.5.2. Optimisation de réponse	58
3.5- Détermination des caractéristiques de transfert du bioréacteur de 10 L	59
Conclusion générale	68
Références bibliographiques	70
Annex	76

Résumé :

En l'Algérie des quantités importantes de déchets de son de blé, sont générées. Ces déchets peuvent être transformés par divers procédés biotechnologique ; la fermentation est une technique qui permet de transformer des déchets agro-industriels en de nombreux produits à haute valeur ajoutée, tel que les enzymes. Ce travail s'intéresse à la production d'alpha amylase par une souche amylolytique. La première partie de l'étude consiste à la revivification et la purification de la souche Ayant une activité amylolytique. *Bacillus amyloliquefaciens* a été sélectionnée pour la fermentation. Le milieu solide de fermentation a été préparé à base de son de blé. une étude préliminaire est mené afin d'optimiser la masse de substrat, la température et le temps d'incubation qui aboutissent à une meilleur activité amylasique. L'optimisation faite par la méthodologie de surface de réponse et le model de Box-Behnken avec des facteurs influencent sur l'activité à savoir la masse de substrat, la température et le temps d'incubation, avec des valeurs de (2g et 50°C et 24hr) nous a permis d'améliorer l'activité amylasique et obtient 0.0305 mmol /g.

Mot clé : l'alpha amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, son de blé, fermentation, optimisation, plan Box-behnken.