

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTE DE GENIE DES PROCEDES

DEPARTEMENT GENIE DES PROCEDES PHARMACEUTIQUE

N° d'ordre :

Série :

Mémoire de Master

Filière : Génie des procédés
pharmaceutique

Spécialité : Génie

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES MOLECULES
ANTIMICROBIENNES A PARTIR DE MOISSURE
ASPERGILLUS ORYZAE SUR MILIEU SOLIDE (SSF)

Dirigé par:

Mme Nacef.H.

Présenté par :

BOUHOUCHE Nawele

BELAALA Aicha

Année Universitaire 2016/2017.

Session : (juin)

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale1

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction	2
1.2. Définition des mycotoxines.....	2
1.3. Antibiotiques.....	3
1.3.1. Définition.....	3
1.3.2. Histoire des antibiotiques	3
1.3.3. Mode d'action des antibiotiques.....	4
1.3.3.a. Action sur la paroi bactérienne.....	4
1.3.3.b. Action sur la membrane cellulaire.....	4
1.3.3.c. Action sur l'ADN.....	5
1.3.3.d. Action sur la synthèse protéique.....	5
1.3.4. Classification des antibiotiques.....	5
1.3.5. Extraction de l'antibiotique.....	5
1.3.5.1. Extraction aux solvants organiques.....	6
1.3.5.2 Purification partielle par CCM.....	6
1.3.6. Résistance aux antibiotiques.....	7
1.4. Fermentation.....	7
1.4.1. Définition.....	7
1.4.2. Buts de la fermentation industrielle.....	8
1.4.3. Types des procédés de fermentation.....	9
1.4.3.1. Procédé discontinu (batch).....	9
1.4.3.2. Procédé discontinu alimenté (fed-batch).....	9
1.4.3.3. Procédé continu.....	9

1.4.4. Avantages et inconvénients des trois procédés.....	9
1.4.5. Fermenteur	10
1.4.6. Types de fermentation.....	11
1.4.6.1. Fermentation liquide ou <i>Submergée Fermentation (SmF)</i>	11
1.4.6.2. Fermentation solide (SSF).....	12
1.4.6.2.1. Définition de la fermentation solide.....	12
1.4.6.2.2. Histoire de la fermentation en milieu solide.....	12
1.4.6.2.3. Avantages et inconvénients de la fermentation solide.....	14
1.4.7. Comparaison par la fermentation solide et la fermentation liquide.....	15
1.4.8. Facteurs physiques (facteurs extrinsèques).....	16
1.5. Substrats utilisés.....	16
1.6. Son de blé.....	17
1.7. Micro-organismes utilisés.....	18
1.7.1. Bactéries.....	18
1.7.2. Champignons.....	18
1.7.2.1. Levures.....	19
1.7.2.2. Moisissures.....	19
1.8. <i>Aspergilles</i>	20
1.8.1. <i>Aspergillus oryzae</i>	21
1.8.2. Utilisation d' <i>Aspergillus oryzae</i>	22
1.9. Méthodes d'optimisations.....	23
1.10. Les plans d'expériences.....	23

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique.....	25
2.2 Matériel de laboratoire.....	25
2.3 Produits chimiques.....	25
2.4 Préparation des milieux des cultures.....	26
2.5 Revivification de La souche.....	28
2.6 Identification de la souche sélectionnée.....	28
2.6.1 Identification macroscopique.....	28
2.6.2. Identification microscopique.....	29
2.7. Préparation de l'inoculum.....	29
2.8. Dénombrement des spores.....	30
2.9. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	30

2.9.1. Préparation de milieu de fermentation SSF (solide state fermentation).....	30
2.9.2. Extraction.....	30
2.10. Test de l'activité antimicrobienne.....	35
2.10.a. Conservation des souches.....	35
2.10.b Milieux de cultures.....	35
2.10.c. Préparation des pré cultures.....	36
2.10.d. Tests antimicrobiens.....	36
2.11. Purification partielle par chromatographie sur couche mince CCM.....	37
2.12. Méthodes d'optimisation.....	38
2.12.1. Optimisation de la production par la méthode classique.....	38
2.12.1.1. Effet de température.....	38
2.12.1.2. Effet du PH.....	38
2.12.1.3. Effet du NaCl.....	38
2.12.2. Optimisation à l'aide d'un plan factoriel.....	39

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Identification morphologique de la souche isolée.....	42
3.1.1. Caractérisation macroscopique.....	42
3.1.2. Caractérisation microscopique.....	42
3.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche <i>A.oryzae</i>	43
3.2.1. Fermentation solide (SSF).....	43
3.3. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	47
3.4. Optimisation de la fermentation par la méthode classique.....	48
3.4.1. Effet de la température.....	48
3.4.2. Effet du pH.....	51
3.4.3. Effet de NaCl.....	53
3.5. Optimisation de la fermentation à l'aide du plan factoriel.....	56
3.5.1. Traitement statistique des résultats.....	57
3.5.2. Effet des facteurs sur l'activité antimicrobienne pour les trois souches testés.....	58
3.6. Discussion.....	66

CONCLUSION GENERALE.....	68
---------------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXS

RESUME

Résumé

La présente étude a été initiée dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait fongique d'*Aspergillus oryzae* qui a été isolé à partir de sol salin (sebkhah EL-baida) région Hammam EL-Soukhana (Batna) par fermentation solide SSF qui a été réalisée sur un milieu à base de son de blé.

L'analyse de l'extrait est obtenue par la technique de la chromatographie sur couche mince. La révélation par la lumière UV (365 nm), a montré que l'extrait du milieu SSF contient six taches dont les R_f, et l'extrait de SSF témoin donnant aussi quatre taches, les deux taches supplémentaires de teste considérer comme des nouvelles molécules bioactives qu'ont une activité antimicrobienne.

L'extrait obtenu par l'acétate d'éthyle a donné un résultat positif au dépistage de l'activité antimicrobienne sur deux bactéries : *E.coli* ; *S.aureus* et une levure pathogènes : *C.albicans* par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, les zones d'inhibitions varient entre 0 et 17mm. Les conditions optimales de l'activité antimicrobienne de l'extrait fongique ont été déterminées par la méthode classique et : température de 35°C, pH 6 et une concentration en NaCl de 0M, et les résultats obtenus par la méthode statistique utilisant le plan d'expérience température 25°C, pH entre 4 et 11 avec l'absence de NaCl.

Mots clés

Aspergillus oryzae, fermentation solide (SSF), son de blé, activité antimicrobienne, extraction,

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص فطر *Aspergillus oryzae* المعزول من تربة مالحة، وذلك بتتميته على وسط صلب يحتوي على نخالة القمح.

أظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة احتواء المستخلص على ستة بقع مختلفة مقارنة مع الشاهد الذي أظهر أربع بقع، حيث تم اعتبار البقعتين الإضافيتين جزئيات جديدة ذات خاصية مضادة للميكروبات.

أعطى اختبار النشاط المضاد للميكروبات نتائج إيجابية على العزلات المختبرة وهي *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* باستعمال طريقة الانتشار في الوسط، حيث وصلت بقع التثبيط إلى 17مم.

الظروف المثالية لإنتاج هذه الجزئيات تم تحديدها بالطريقة الكلاسيكية وهي كالأتي: درجة الحرارة 35°C، الأس الهيدروجيني 6، تركيز الملح 0 مولار. أما بالطريقة الإحصائية باستعمال التصميم التجريبي فقد كانت النتائج كالأتي: درجة الحرارة 25°C، الأس الهيدروجيني ما بين 4-11، تركيز الملح 0 مولار.

الكلمات المفتاحية

Aspergillus oryzae، التخمر على وسط صلب، نشاطية مضادة للميكروبات، استخلاص، سموم فطرية.