**Travaux pratique de Bioprocédés, Fermenteurs**

**But**: Suivi d’une production fermentaire, en déterminant les paramètres microbiologiques d’état (Xi, Si, Pi). Pour atteindre ce but, une culture microbienne est réalisée afin de produire des amylases en utilisant un sous produit des industries Agro-alimentaire.

**Matériel végétal**

 Le sous-produit agricole (épluchures de pomme de terre) est choisi comme matériel végétatif à raison de son faible coût et sa disponibilité. Les épluchures de pomme récoltées, nettoyées de tout résidu de terre, sont séchées dans une étuve à 40 °C puis broyées et tamisées pour obtenir une poudre qui sera utilisée comme milieu de base de la fermentation pour la production de l’amylase.

 **Matériel microbien (souche amylolitique)**

 La levure boulangère *Saccharomyces Cerevisiae* représente le microorganisme de ce travail pratique.

Une pré-culture est préparée avant d’ensemencer le milieu fermentaire, et ceci en solubilisant **1g** de cette souche lyophilisé dans **50 ml** de bouillon nutritif, sous des conditions stériles, et l’ensemble est incubé à 30°C pendant 18 heures. Après un temps de **18** heures d’incubation, un examen microscopique suivi d’un dénombrement sur cellule Malassez sont effectués, pour l’obtention d’un inoculum de 105 levures par millilitre.

**Mise en évidence de la capacité amylolytique de la souche utilisée**.

 Les souches développées sont repiquées aseptiquement sur le milieu gélose d’amidon

incubées à 37°C pendant 24h jusqu'à l’obtention des souches pures **(Abd-elhalem *et al.,* 2015*).***

Les souches sont repiquées aseptiquement par la technique de spots sur le milieu gélose à l’amidon pH=7. Après incubation à 37°C/48h les boites sont inondées avec une solution de **Lugol**, afin de mettre en évidence l’activité amylasique : les souches à halo claire sur le pourtour sont considérées comme productrices d’amylases **(Fossi *et al*., 2005).**

**Déroulement et suivi de la fermentation**

 La poudre d’épluchure de pomme de terre qui représente le milieu de base pour la production de l’amylase par la souche étudiée est additionnée de  **0.2 (%)** MgSO4.7H20, KH2PO4 et de **0.1 (%)** CaCl2. Les cultures sont réalisées dans des flacons (Erlenmeyer) en verre de 250 ml à raison de (10g/100 ml d’eau distillée), puis stérilisé à 120°C/20min.

Les milieux sont ensuite ensemencés par 2mL de la suspension microbienne âgée de 18 heures. Les flacons (Erlenmeyers) de fermentation sont ajusté au pH optimale et incubées (Top°C) sous agitation à 150 tr/ min à 37 °C.

Le suivi de la production fermentaire, est effectué par la mesure des paramètres d’état microbiologique (Xi, Si, Pi) et également par la mesure de l’activité enzymatique a des intervalles de temps : 0j ; 3j ; 5jours

**Evaluation de l’Activité amylasique**

 L’activité amylasique est définie par l’hydrolyse enzymatique de l’amidon qui libère le glucose. Cette activité est mesurée par la méthode décrite par **Bernfeld (1980)**, qui utilise l’amidon soluble comme substrat. La réaction est colorimétrique et l’intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres libérés.

 Un volume de 200 µl du solution amidon 1% (m/v) est additionnée avec 200 µl de tampon phosphate (pH =7 à 0.1 M) au quel sont ajoutes 200 µL de l’extrait enzymatique, Le mélange est incubé à 45°C pendant 30 minutes, la réaction est stoppé par l’addition de 300µl de DNS, un chauffage à 100°C est réalisé au bain marie pendant 5 minutes et le mélange est complété avec 1.5 ml de l’ eau distillée ; la densité optique est mesurée l’aide d’un spectrophotomètre a une longueur d’onde de 530 nm**.**

**Dosage des sucres totaux**

 Le taux de sucre totaux est évalué selon la méthode de **Dubois, (1956)** .La solution à doser est obtenue par dissociation de 1g de poudre dans 100 ml d’eau distillée suivie d’une filtration,

2 ml de sels de carries I et II sont ajoutés respectivement au filtrat récupéré afin de faire précipiter les protéines, les lipides et les fibres. Après clarification ,1ml de l’extrait est prélevé et 1ml de phénol 5% et 3 ml d’acide sulfurique concentré sont respectivement. Après un repos de 20 min à l’abri de la lumière, la densité optique est mesurée à 550 nm à l’aide d’un spectrophotomètre.

Les teneurs sont déterminés en référence à une gamme d’étalon de glucose.

**Dosages des sucres réducteurs**

Le dosage des sucres réducteurs est estimé selon la méthode de **Miller, (1959).** Cette technique consiste à mélanger 300 µl de réactif DNS à 200 µl de l’extrait à doser chauffer à

100°C pendant 5 min dans un bain marie compléter avec 1.5 ml d’eau distillée. La densité optique est mesurée à 530 nm. Les teneurs sont déterminés en référence à une gamme d’étalon de glucose.

**Dosage des protéines**

La méthode choisie est celle décrite par **Bradford (1976),** qui s’effectue à l’aide du réactif le bleu de Coomassie. La méthode consiste à faire réagir 100 µl de la solution à doser avec 3 ml du réactif, suivie d’une mesure d’absorbance à 595nm à l’aide d’un spectrophotomètre .les résultats sont obtenue à partir d’une gamme d’étalon réalisée avec la BSA.