

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département de microbiologie.
Filière : Sciences Biologiques.
Option : Biotechnologie microbienne.



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Optimisation par la méthodologie de surface de reponse de
l'activité enzymatique à partir des épluchures de pomme de
terre**

Présenté par :

Ouaglal Sara & Yous Meriem

Soutenu le: **24 juin 2017**

Devant le jury composé de:

	Grade	
Mr. MADANI. K	professeur	Président
MME FELLA née TEMZI.S	MAA	Examinatrice
Mr. BOUKHALFA .F	MAA	Encadreur

Année universitaire: 2016 /2017

Dédicace

Au nom du Dieu le tout puissant, à qui je dois tout, et surtout d'avoir honoré et éclairé mon chemin par le savoir

A ma très chère maman que j'aime beaucoup et en qui je témoigne ma gratitude et mes reconnaissances pour tous ses sacrifices, tous les mots n'exprimeront pas mes reconnaissances et mon amour pour elle je lui souhaite santé et satisfaction

A mon chère père pour ses conseils et sa bonne humeur je lui souhaite santé et satisfaction

Que ce travail vous soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde et infinie reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi, j'espère que je serai toujours à la hauteur de vos espérances.

A mon très chère unique frère Bilel

A mon cher fiancé Lamine et à toute sa famille qui m'ont soutenu jusqu'au bout,

A ma binôme

À tous mes chers amis :

Nafaa qui m'a beaucoup aidé. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect

*Amanda , Celia , Nesrine , Yacine , Yuba, Kenza, Meriem , makhlouf, salem
..... et bien d'autres que j'estime,*

Tous mes professeurs , Dr Chouikh et ma promotion BM

Je dédie à toutes les personnes qui ont contribué, à un moment de notre travail, au bon déroulement et à l'achèvement de ce mémoire

Meriem

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Mes très chers parents, que DIEU les bénisses

Mes chers (es) frères et sœurs

A toute ma famille

A ma binôme

A tous mes amis (es).....

Et à l'ouverture de l'esprit.

SARA

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu DIEU, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur Monsieur BOUKHALFA.F, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail. Son encadrement était le plus exemplaire.

. Nos remerciements vont aussi à Mr.MADANI.K, d'avoir eu l'aimabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider ce Jury.

Nous tenons à remercier également Mme FELLA.S, d'avoir acceptée, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Notre reconnaissance et nos grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nous soutenue avec patience et prouvé leur confiance. Nous leur exprime notre éternelle gratitude.

Nous nous permettons d'adresser nos remerciements à nos familles, qui ont contribués Beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels Nous disons tout simplement merci.

Sommaire

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste d'abréviation

Introduction :	1
-----------------------------	---

Synthèse bibliographique

I-Pomme de terre	3
I- 1 Généralité sur la pomme de terre.....	3
I-2 Composition de la pomme de terre	3
I-3 Utilisation de la pomme de terre	3
I-4 Production mondiale de pomme de terre.....	4
I-5 Production de pomme de terre en Algérie	4
I-6 Impacte des déchets sur l'environnement.....	5
II- Les enzymes	5
II - 1 Généralité sur les enzymes.....	5
II - 2 Source d'enzyme.....	5
II- 3 Aperçue sur l'amylase.....	6
II -4 Domaine d'application de l'amylase.....	7
III- Généralité sur les <i>Bacillus sp</i>	8
IV- Plan d'expériences.....	8
VI-1 Terminologie	9
VI-2 Plans pour surfaces de réponses (RSM).....	10
VI-3 Plan Box-behnken (BBD).....	10
VI- 4 Quelques applications du plan Box-Behnken (BBD).....	10

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I- Echantillonnage.....	11
I-1. Matériel végétal.....	11
I-2 Culture et microorganisme	11
I-2-1- Isolement du microorganisme.....	11
I-2-2-Purification du microorganisme.....	11
I-3- Mise en évidence de l'activité enzymatique et sélection des souches amylolytiques.....	11
I-4-Identification du microorganisme	12
I-4-1 Identification macroscopique et microscopique.....	12
I-4-2 Orientation vers l'identification de la souche isolée	12
I-4-3 Identification biochimique	13
II-caractérisation physique et chimique des épluchures de pomme de terre.....	13
II-1-Test d'humidité	13
II-2-Détermination de Matière sèche	14
II-3- déterminations du taux des cendres	14
II-4- Mesure du potentiel Hydrogène	14
II-5- Détermination de l'acidité titrable	14
II-6- Dosage des sucres totaux.....	15
II-7- dosages des sucres réducteurs	15
II-8- Dosage des protéines	15
II-9-Dosage de l'azote total	15
III- optimisation des conditions de Production de l'enzyme par fermentation submergée	16
III-1 Etude préliminaire	17
III-2 L'optimisation par la méthodologie de surface de réponse (RSM).....	17
III-2-1 Choix des paramètres	17

Résultat et discussions

I-Isolement des souches	21
I-1- sélection des souches amylolytiques	21
I-2 Identification de la souche sélectionnée.....	22
II- caractérisation physicochimique de la poudre des épluchures de pomme de terre	26
III- Optimisation des conditions de Production de l'enzyme amylase.....	28
III-1- Etude préliminaire.....	28
IV- Plan d'expérience Box-Behnken	30
IV-1-Analyse global du modèle.....	32
IV-2-Effet des facteurs	34
IV-3-Modèle mathématique.....	37
IV-4-Solution	37
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé/ Abstract	

Liste d'abréviations

AAF	Aero-anaérobie facultatif
AE:	Activité enzymatique
ANOVA:	Analysis of variance.
AS	Aérobie strict
BBD :	Box- Behnken Design
BSA:	Bovine Serum Albumin
°C :	Celsius
DNS :	3,5-dinitrosalicylic acid
D.O :	Densité optique
FAO :	Food and Alimentation Organization
GN	Gélose nutritive
MADR :	Ministère d'agriculture et du développement rural
Ox :	Oxydase
RM	Rouge de Méthyle
RSM :	Reponse surface methodology
PT:	Protéines
STX:	Sucres totaux
SR:	Sucres réducteurs
VF :	Viande-Foie
VP :	Voges-Proskauer
m/v :	masse/Volume
nm:	Nanomètre.

Liste des figures

Figure 1 :	Photographie de souches isolées	21
Figure 2 :	photographie des résultats du test mise en évidence de l'activité amylasique	21
Figure 3 :	Photographie De coloration de Gram de la souche (S2) sous le microscope optique (à l'objectif $\times 100$).....	22
Figure 4 :	L'effet de la concentration de substrat sur la production des protéines (%) en fonction de temps de fermentation (h).....	28
Figure 5 :	Effet de temps d'incubation sur l'activité enzymatique et le taux de Dégradation de sucres totaux et réducteur et de synthèse de protéine par la Souche étudiée.....	29
Figure 6 :	Plan de prédiction réel de la production de l'enzyme	33
Figure 7 :	Surfaces de réponses des interactions d'influence du pH- concentration de peptone sur l'activité amylasique.....	36
Figure 8 :	Surfaces de réponses des interactions d'influence du température- pH sur L'activité amylasique	36
Figure 9 :	Surfaces de réponses des interactions d'influence du température- Concentration de peptone sur l'activité amylasique.....	36
Figure 10 :	Résultats de test confirmatif effectué dans conditions optimales.....	39

Liste des figures dans l'annexe

Figure 1 :	Plan Box- Behnken pour trois facteur
-------------------	--------------------------------------

Liste des tableaux

Tableau I :	Niveaux des variables choisis pour les essais	18
Tableau II :	Tableau récapitulatif des expériences de plan Box-Behnken pour trois Facteur	19
Tableau III :	Résultats des tests biochimiques.....	24
Tableau IV :	Caractéristique physique et chimique de la poudre d'épluchures Pomme de terre.....	26
Tableau V:	Optimisation des conditions de production de l'enzyme par le plan d'expérience Box-Behnken (BBD).....	31
Tableau VI :	l'étude de la variance du modèle et le manque d'ajustement.....	33
Tableau VII:	Estimation des coefficients de régression du model polynomiale Seconde degré de production d'amylase.....	34
Tableau VII :	conditions optimales de production d'enzyme (amylase) par le genre <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> à partir des épluchures de pomme de terre.....	36

Liste des tableaux en annexes

Tableau I :	Principaux pays producteurs de pomme de terre en 2014
Tableau II :	Evaluation de pomme de terre de consommation (2010-2014)
Tableau III	Matrice d'expériences (unité codées) du plan de Box-Behnken à 3 facteurs

Introduction

Introduction général

La pomme de terre est l'une des cultures agricoles les plus importantes pour la consommation humaine, dont sa production dépasse 381 millions de tonnes chaque année.

Les déchets de pommes de terre sont un sous-produit de valeur nulle, une fois rejeté, ces déchets provoquent des préoccupations environnementales en raison de sa détérioration microbienne (**Wu Di, 2016**). Cependant, les épluchures de pomme de terre contiennent la même quantité de composés précieux que le légume comestible (**Mirabella, 2013**). Ce sous-produit peut être classé en deux grandes catégories : sous-produits issus du marché du frais et les sous-produits issus de l'industrie agro-alimentaire de transformation de l'alimentation humaine et la production de féculerie (**Decruyenaere, 2005**).

Des méthodes de caractérisation et de recyclage de ce sous-produit ont été étudiées. Les principaux résultats montrent qu'il existe un grand potentiel pour les épluchures de pomme de terre dans les systèmes alimentaires en raison de leur composition chimique (**Sepelev et Galoburda, 2015**).

De nombreux travaux scientifiques ont été menés sur ce sujet au cours des dernières années, offrant des solutions et des approches originales, qui se rapportent à l'utilisation de sous-produit à potentiel d'application tel que la production de différents enzymes industriels; les acides organiques, bioéthanol, biogaz et l'extraction des acides phénoliques des déchets de pommes de terre (**Olayinka, 2015**).

Les enzymes d'origine microbienne telle que les amylases peuvent servir potentiellement dans les industries chimiques et pharmaceutiques (**Augustin et al., 1981 ; Pandey et al., 2000**), dont leurs activités peuvent être influencées par des facteurs physique et chimique tel que le pH, la température, l'agitation et la source d'azote.

À cette effet, l'optimisation des paramètres culturels et des conditions de production par l'approche statistique et la méthodologie de surface de réponse s'impose nécessaire, pour l'élaboration de l'enzyme amylasique par voie microbienne. Cette démarche a de l'impact sur l'économie et la praticabilité du processus afin d'améliorer le rendement de production.

Pour réaliser cet objectif, la présente étude est divisée en deux parties, dont la première est une partie théorique qui vise à la culture de la pomme de terre et son intérêt nutritionnel et économique, ainsi que un aperçu général sur les enzymes et leur application dans les domaines.

La deuxième partie est une partie pratique qui se porte sur la recherche, l'isolement et la purification de souche à activité amylasique, ainsi que la caractérisation physicochimique de la poudre de pomme de terre. Des essais préliminaires, pour déterminer l'influence de la concentration de substrat et le temps d'incubation sur la production de protéine sont effectués afin de faciliter le choix et l'application des paramètres a études dans le model de box behnken.

Synthèse bibliographique

I- La pomme de terre

I-1 Généralité sur la pomme de terre

La Pomme de terre *Solanum tuberosum* L, appartient à la famille des *Solanacées* originaires des pays andins (**Dominique, 2010**). En tant que quatrième culture mondiale après le blé, le riz et le maïs. Est l'une des cultures agricoles les plus importantes pour la consommation humaine et la culture de la pomme de terre est une culture prometteuse qui offre de nombreux atouts ; d'un point de vue agronomique, sa culture est aisée (**Bentley, 2015**), son potentiel de rendement est important (20 à 30 t/ha) et la quantité produite chaque année dans le monde entier est importante elle est estimée à 381 682 144 tonnes, pour une superficie de 19 098 328 ha (**FAO , 2014**). D'un point de vue nutritionnel, elle se classe parmi les plantes à tubercule les plus nutritives avec une teneur énergétique élevée. D'un point de vue commercial, elle est très appréciée par les populations et elle constitue une culture de rente pour de nombreux agriculteurs.

La place qu'elle occupe comme aliment de base pour la population mondiale a conduit l'Organisation des Nations Unies à déclarer l'année 2008 « Année internationale de la pomme de terre ». D'après Jacques Diouf (directeur général de la FAO - 2008), la pomme de terre est en première ligne dans la lutte contre la faim et la pauvreté dans le monde.

I-2 Composition de la pomme de terre

Les pommes de terre est l'un des légumes les plus consommés dans le monde entier elle contient principalement des glucides, et en particulier, des vitamines, des minéraux et des photochimiques, comme les caroténoïdes Et des phénols nature. Le tubercule de pomme de terre contient environ les trois quart de son poids en eau une quantité relativement élevée en glucides, un faible taux en substances azotées et très peu de lipides (**Delaplace et Fauconnier, 2004**)

I- 3 Utilisation de la pomme de terre

Une quarantaine de produits finis élaborés existe à partir de la pomme de terre, parmi lesquels les frites réfrigérées, les frites précuites et surgelées, les chips et snacks, les produits sous vide, les purées déshydratées, la fécule, les féculs modifiées. (**Anonyme**).

Les débouchés non alimentaires de la fécule sont importants : papeteries pour plus de 75% des débouchés mais également des secteurs de pointe comme la chimie (5%), le textile (3%), la pharmacie... (**Anonyme**).

De nouveaux débouchés pourraient s'ouvrir pour la production de pommes de terre féculières en particulier dans la fabrication de biomatériaux. La substitution de plastiques d'origine pétrochimique par des plastiques biodégradables offre un potentiel de valorisation très important pour la pomme de terre féculière **(Delaplace et Fauconnier, 2004)**

I-4 Production mondiale de pomme de terre

Les pommes de terre sont l'une des cultures de base les plus importantes pour la consommation humaine, ainsi que le blé, le riz et le maïs. À l'heure actuelle, le secteur mondial de la pomme de terre subit des changements majeurs. **(Wu DI, 2016)**

La quantité de pomme de terre produite dans le monde entier chaque année est très importante, La production mondiale de cette culture est estimée aux environs 381 682 144 tonnes, pour une superficie de 19 098 328 ha. **(FAO, 2014).**

Les grands pays producteurs sont représentés dans **(Annexe I)** tableau I

La Chine est le plus grand producteur de pommes de terre d'une production de (859 954 49) tonnes, suivie d'Inde (395 474 900tonnes), de la Russie (353 586 240tonnes), de l'Ukraine (230 152 950tonnes), des États-Unis (217 104 392 tonnes), de l'Allemagne (123 310 328tonnes) et de la Pologne (106 340 017tonnes). **(FAO, 2014).**

I-5 Production de pomme de terre en Algérie

La pomme de terre a probablement été introduite par des colonialistes français ou des négociants algériens en Algérie vers 1856 **(Ramoul et Sedkaoui, 1978)**. Les premiers chiffres de production datent de la fin du XIXe siècle lorsque les pommes de terre ont été cultivées spécifiquement pour l'exportation vers les marchés français. Avant l'indépendance la production annuelle moyenne est d'environ 250 000 tonnes, dont 60 000 à 80 000 tonnes sont exportées. **(Anonyme).**

De nos jours, la pomme de terre est devenue une culture de plus en plus importante pour la consommation domestique en Algérie **(Benkeblia, 2000).**

L'Algérie est classé deuxième pays producteur de pomme de terre en Afrique avec un taux de production estimée de 2591873.07 tonnes après l'Égypte qui produit 3155151.13 tonnes selon le rapport de **FAO (2014)**

Les valeurs présentées dans **l'Annexe I**, le tableau II indiquent que la production de pomme de terre en Algérie dépasse le seuil de trois millions de tonnes durant la période (2010-2015), pour une superficie qui dépasse 121 miles hectares **(MADR Alger 2017).**

I-6 Impacte des déchets sur l'environnement

Les industries de pomme de terre génèrent des quantités énormes en déchets, qui sont une matière destinée à l'abandon, qui peuvent être à l'origine d'activité nouvelle. Ceux qui peuvent être non valorisable dans des conditions économiques données, peuvent être valorisés sous d'autres conditions **(René, 2009)**. Ces déchets gênent un effet, direct ou indirect, immédiat ou à long terme, d'une intervention planifiée sur un environnement. Ces effets se manifestent dans un intervalle de temps donné et sur une aire géographique définie **(Pierre et al., 2010)**.

Beaucoup de pollution peuvent être perçues par un ou plusieurs de nos cinq sens. On peut ainsi en évaluer directement les désagréments. D'autre changement sont plus insidieux car on ne les remarque pas mais ils peuvent avoir, à long terme, des conséquences importantes. C'est en particulier le cas de l'accroissement de l'effet de serre dû aux activités humaines **(Christian et Alain, 2004)**.

II- Les enzymes

II – 1 Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques intervenant dans diverses réactions. **(Sankaralingam et al., 2012)**, dont leurs production est une poursuite centrale au domaine de l'industrie et en biotechnologie. Le marché des enzymes industriel actuel continue à croître de plus en plus avec une demande accrue sur l'avancement des procédés biotechnologiques qui restent en déficit face à la demande en augmentant de nombre de biocatalyseurs **(Fossi et al., 2005)**.

Les enzymes peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les microorganismes **(Headon et Walsh , 1994)**

II-2 Source d'enzyme

L'étape initiale de la production de toute enzyme concerne le choix de la source. Dans certains cas où l'activité catalytique souhaitée n'est disponible que dans une source unique, bien que dans la plupart des cas où l'activité souhaitée peut être obtenue à partir de plusieurs sources **(Walsh et Headon, 1994)**.

a - Source microbienne

De nombreuses protéines sont obtenues à partir de microorganismes. Un nombre limité de microorganismes sont considérés comme des producteurs appropriés des protéines destinées à

des fins appliquées. Les microorganismes les plus fréquemment utilisés comme producteurs d'enzyme comprennent des bactéries et des champignons, Les microorganismes représentent une source attrayante d'enzymes car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un délai relativement court selon les méthodes de fermentation **(Walsh et Headon, 1994)**.

b- Source Végétal

Les plantes ne sont généralement pas considérées comme des sources attrayantes d'enzymes d'importance industrielle. La nature saisonnière et la géographie de la croissance des plantes et le fait que la plupart des protéines végétales sont intracellulaires milite également contre leur utilisation généralisée comme sources d'enzymes **(Walsh et Headon, 1994)**.

c- Source Animal

Un nombre d'enzymes d'une importance considérable ont été traditionnellement obtenus à partir des tissus d'animaux ou de leurs substances sécrétées. L'une des enzymes dérivées d'animaux les plus importantes sur le plan industriel est rennin, également connu sous le nom de Chymosine Cette protéase aspartique trouve une application industrielle Principalement dans la production de fromages, bien qu'il ait également été utilisé thérapie en tant que aide digestive **(Walsh et Headon, 1994)**.

II-3 Aperçue sur l'amylase

Les α -amylases (E.C.3.2.1.1) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques internes dans l'amidon donnent des produits à faible poids moléculaire, telles unités de glucose, maltose et maltotriose les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes et sont d'une grande importance pour la biotechnologie, constituant une classe d'enzymes industrielles ayant environ 25% du marché mondial des enzymes .

Aujourd'hui, un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles dans le commerce et ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans l'industrie du traitement de l'amidon.

Les α -amylases sont l'une des formes les plus populaires et les plus importantes d'amylases industrielles **(Souza, 2010)**.

II-4 Domaine d'application de l'amylase

La demande d'enzymes, en particulier les amylases, augmente constamment en raison de la variété des applications industrielles de ces hydrolases (**Hafsa et al., 2013**). Ces derniers sont très demandés dans plusieurs domaines surtout le secteur agroalimentaire et médical.

a-Application en agroalimentaire

Les α -amylases ont des applications potentielles dans un grand nombre de processus industriels alimentaire. En glucoserie elles sont utilisées pour la dégradation de l'amidon, et en sucrerie afin de faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon et pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (**Bhalla et al., 2000**).

L'industrie de panification et biscuiterie emploie les α -amylases pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (**Cuveillier, 1999**).

Cette enzyme intervient dans l'industrie des boissons essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits (**Kirk, 2002**).

b- Domaine médical

L'augmentation du taux des α -amylases dans le sang peut témoigner d'une pancréatite aiguë et se rencontre également dans certains cancers digestifs et dans les oreillons ; elles sont donc employées en diagnostic médical pour détecter certaines maladies (**Pandey et al., 2000**).

c- Autres domaines ...

Les α -amylases ont une application potentielle dans un grand nombre de processus industriels tels le textile, le papier, les détergents. Les amylases fongiques et bactériennes pourraient être potentiellement utiles dans les industries pharmaceutiques et chimiques fines. Cependant, avec les progrès de la biotechnologie, l'application d'amylase s'est développée dans de nombreux domaines tels que la chimie clinique, médicale et analytique (**Mc cleary et charnock, 2004**).

III- Généralité sur les *Bacillus sp*

Les membres de la famille des Bacillaceae figurent parmi les bactéries les plus abondantes sur terre, en raison de leurs capacités de former des endospores résistantes. Cette famille réunit 62 genres bactériens dont le plus grand est le genre de *Bacillus* qui en compte environ 226 espèces sur un total de 457 autres espèces qui englobent cette dernière (**Mandic et al., 2017**).

Les *Bacillus* sont des germes fréquemment isolés à partir des niches écologiques très variées (des sols, plantes, eaux douces, eaux de mers.). Le sol constitue l'habitat principal de ce genre bactérien où ils sont impliqués dans le cycle du carbone et de l'azote (**Goldman et Green, 2009**). Le genre *Bacillus* sont des hétérotrophes saprophytes capables de dégrader une large gamme de substances carbonées polymères et simples (**Mandic et al., 2017**).

Le genre *Bacillus* se différencie des autres genres de la famille par de nombreux caractères. Ce sont des bacilles à extrémités arrondies ou carrées, d'une taille qui varie de (0,5 à 1,2 μm de diamètre et de longueur de 2,5 à 10 μm), possède une coloration de Gram positive, capable de produire des endospores (forme de résistance et critère important sur le plan taxonomique du genre *Bacillus*), ce sont des germes qui se cultivent en aérobiose (bactéries aéro-anaérobies facultatifs ou aérobies strictes), mobiles grâce à une ciliature péritriche sauf *Bacillus anthracis*. Ils possèdent une catalase très active et se cultivent facilement sur milieu ordinaire car ce sont des germes non exigeants (**Garrity et al., 2004**).

Cependant, la majorité de ces espèces ne sont pas pathogènes à l'exception de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*. En raison de ce fait beaucoup d'entre elles sont exploitées pour la biotechnologie industrielle (**Rooney et al., 2009**).

Les espèces du genre *Bacillus* sont les plus dominantes pour la production d'enzyme et de métabolites secondaires, elles représentent la source du choix et le plus important producteur industriel d'enzymes alimentaires, de vitamines, et des antibiotiques, de fait de leur capacité à sécréter des grandes quantités de (20-25g/l) de ces derniers (**Schallmey et al., 2004**).

IV- Plan d'expériences

Sont définies comme étant la méthode mathématique et statistique qui permettent de modéliser et d'organiser au mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. (**Goupy et Creighton, 2006**).

Ces méthodes visent à établir et analyser les différentes interactions qui existent entre les grandeurs étudiées, et leurs sources de variation supposées. (**Vivier, 2002**).

Un plan d'expérience consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales d'une manière à révéler les effets de différents traitements.

L'objectif principal de la théorie des plans d'expériences est d'assurer la meilleure précision possible, avec un maximum d'information et un minimum d'essais sans sacrifier la qualité, après avoir fait varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs. (**Goupy et Creighton, 2006**).

Actuellement, il existe de différents types de plans d'expériences :

- Les plans factoriels complets ou fractionnaires à 2 niveaux.
- Plans factoriel, plus à 2 niveaux.
- Les plans en blocs complets ou incomplets.
- Les plans de surface de réponse.
- Les plans de mélange.
- Les plans optimaux.

(**Tinsson, 2010**) ;(**Franco, 2008**)

Les plans d'expériences sont divisés en deux grandes catégories, selon leurs propriétés et leurs capacités à répondre à une certaine problématique particulières.

- Les plans pour estimer et comparer les effets des paramètres.
- Les plans pour régler les paramètres afin d'obtenir un optimum (**Faucher, 2006**)

VI-1 Terminologie

Facteur : est un paramètre qualitatif ou quantitatif dont sa variation est susceptible de modifier le fonctionnement de ce dernier.

Niveau d'un facteur : c'est la valeur codée donnée à un facteur pour réaliser une expérience.

Réponse : c'est la grandeur d'intérêt mesurée, afin d'évaluer l'effet du facteur étudié.

Domaine d'étude : c'est l'espace expérimental dans lequel chaque point représente une combinaison possible des valeurs des facteurs étudiés.

Modélisation mathématique : est une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs qui l'influencent.

Matrice d'expérience : c'est l'ensemble des niveaux imposés aux variables, pour la réalisation des différents essais, après avoir choisi le plan expérimental (**Goupy et Creighton, 2006 ; Vivien, 2002**).

VI-2 Plans pour surfaces de réponses (RSM)

Les plans d'expérience permettent de régler les paramètres pour atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs étudiés (**Faucher, 2006**).

Le principe de toutes les méthodes d'optimisation consiste à explorer cette surface de façon à localiser un éventuel extremum dans un domaine expérimental donné.

Ces plans utilisent de modèles polynomiaux du second degré avec interaction d'ordre 2. (**Goupy et Creighton, 2006**).

Il existe de nombreux types de plans permettant de construire des surfaces de réponse tels que : les plans composites centrés, plans de Doehlert et les plans Box-Behnken (**Faucher, 2006**).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Khusro et al., 2017})$$

Où

Y= grandeur d'intérêt.

X_i, X_j : les variables.

$\beta_j, \beta_{ij}, \beta_{ii}, \beta_0$: les coefficients de polynôme.

VI-3 Plan Box-behnken (BBD)

En 1960, Box et Behnken ont proposé ces plans faciles à mettre en œuvre qui permettent d'établir des modèles du second degré dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux (-1, 0 et +1).

Le plan de Box-Behnken (Annexe II, figure1) pour trois facteurs est construit sur un cube dont les points expérimentaux sont placés au milieu des arêtes avec une répartition de tous les points expérimentaux à égale distance du centre de domaine d'étude.

Les plans Box-Behnken à trois facteurs contiennent 15 points expérimentaux (Annexe III, Tableau), dont 12 essais sont situés au milieu de chaque arête de cube avec trois essais répétés au centre de domaine prennent des coordonnées (0, 0, 0) (**Goupy et Creighton, 2006**).

VI- 4 Quelques applications du plan Box-Behnken (BBD)

- Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons de la Lavande Stoechas utilisant la Méthodologie de surface de réponse.
- Optimisation de l'électrophorèse sur papier.
- Optimisation des fermenteurs.

Matériels et Méthodes

I-Echantillonnage

I-1- Matériel végétal

Le sous-produit agricole (épluchures de pomme de terre) est choisi pour représenter le matériel végétatif de cette présente étude à raison de son faible coût et de sa grande disponibilité.

Les épluchures de pomme de terre récoltées d'un restaurant du campus universitaire en mois de février sont broyées et tamisées après lavage pour éliminer toute trace de résidus de terre, et séchées dans une étuve à 40 °C pour obtenir une poudre homogène. Cette poudre sera utilisée comme milieu de base de la fermentation pour la production de l'amylase (**Shukla et kar, 2006**).

I-2- Culture et microorganisme

Les bactéries isolées à partir d'une pomme de terre pourrie représentent le microorganisme de ce travail, dont le genre bactérien *Bacillus* était la cible (**Al-Asady, 2016**).

I-2-1- Isolement du microorganisme

L'isolement des microorganismes sont réalisés sur le milieu gélose ordinaire, une solution mère est préparée et des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-8} sont effectuées, un volume de 0.1ml de chaque dilution est ensemencé dans des boîtes de pétri sur gélose nutritif par la technique de stries puis incubé à 37°C pendant 24h (**Ghani et al., 2013**).

I-2-2-Purification du microorganisme

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**).

I-3 Mise en évidence de l'activité enzymatique et sélection des souches amylolytiques

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 boîtes 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. Ces dernières sont conservées et stockées sur milieu ordinaire à 4°C (**Fossi et al., 2005**).

I-4-Identification du microorganisme

I-4-1 Identification macroscopique et microscopique

Les colonies bien isolées ont subi une observation macroscopique. Et microscopique à l'état frais pour vérifier la mobilité de ces cellules à l'objectif $\times 40$. Suivie d'une coloration de Gram observée sous le microscope optique à l'objectif $\times 100$ dans le but vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules (Ghani *et al.*, 2013).

I-4-2- Orientation vers l'identification de la souche isolée

a- Recherche des enzymes et du type respiratoire

- **Test de catalase**

Ce test est réalisé sur des colonies pures bien isolées déposées sur une lame propre. Ces dernières sont émulsionnées avec une à deux gouttes d'eau oxygénée. La mise en évidence d'une bactérie catalase positif se manifeste par le dégagement de bulles de gaz (Delarras, 2014).

- **Test d'oxydase**

La mise en évidence est basée sur la capacité de cette enzymes à synthétiser l'indophénol par oxydation, en présence d'oxygène, du réactif N-tétraméthyle -1,4-phénylène diamine. Cette synthèse est accompagnée d'apparition d'une coloration violette (Delarras, 2014).

Un disque (Ox) imbibé avec une goutte d'eau distillée est déposé sur une lame propre, une colonie bactérienne est étalée sur ce dernier.

- **Type respiratoire**

La mise en évidence du type respiratoire s'effectue sur des bactéries purifiées, dont une suspension est ensemencée en profond de tube de la gélose inclinée viande-foie (VF) et incubée à 30°C pendant 24h.

b- Recherche de caractères cultureux

- **Recherche de la température optimale**

Afin de déterminer la température optimale de la croissance de l'isolat, une séries de boîtes de pétri contenant le milieu GN sont ensemencées avec une culture de la souche purifiée et incubées à différentes températures à savoir (25-37-55°C) pendant 18h (Delarras, 2014).

- **Recherche de pH optimale**

Des boîtes de pétri contenant le milieu GN à différents pH à savoir (5, 7, 9 et 10) sont préparées et ensemencées avec la culture bactérienne, et incubées à 37°C pendant 24h (**Ivanova et al., 1999**).

- **Croissance en NaCl**

Afin de mettre en évidence la résistance des bactéries isolées aux agents inhibiteurs de croissance, des boîtes de pétris de milieu GN additionnées à différente concentration de NaCl (5, 10, 15 et 20 %), sont ensemencées avec la culture bactérienne et incubées à 37°C pendant 24h (**Huang et al., 1999**).

I-4-3 Identification biochimique

L'identification biochimique de la souche isolée est effectuée avec les différents tests de la galerie API 20 E.

Les différents tests sont: test de nitrate réductase, test d'indole, citrate de Simmons, VP/RM, H₂S, production de gaz à partir du glucose. Autres tests pour la recherche d'enzymes complémentaires sont effectués à savoir test d'hydrolyse de la caséine, hydrolyse de la gélatine et le test d'hydrolyse de la lécithine (**Logant et Berkeley, 1984; Huang et al., 1999 ; Ivanovna et al, 1999 ; Delarras, 2014**).

II-caractérisation physique et chimique des épluchures de pomme de terre

Plusieurs méthodes physicochimiques sont réalisées afin de caractériser la poudre à base des épluchures de pomme de terre et évaluer les principaux constituants nutritifs.

II-1-Test d'humidité

Le taux d'humidité est estimé selon la méthode décrite par **Adil et al, (2007)**. Une prise d'essais d'échantillon de poudre étudié de 3g est séchée à l'étuve à 105° C ± 5° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant après 24h ; le taux d'humidité est déterminé par la formule suivante :

$$H (\%) = [(P_F - P_s) / P_s] \times 100$$

D'où

$H(\%)$: taux d'humidité en pourcentage.

P_F : le poids frais de l'échantillon avant le séchage.

P_S : le poids sec de l'échantillon après séchage.

II-2-Détermination de Matière sèche

Une fois le taux d'humidité est évalué la teneur en matière sèche est déterminé selon la méthode décrite par **Afnor, (1986)** par l'application de la formule suivante :

$$\text{Matière sèche \%} = 100 - \% \text{ Humidité}$$

II-3- déterminations du taux des cendres

La détermination de la matière sèche d'une prise d'essais de 3g de poudre des épluchures de pomme de terre est suivie par une incinération au four à moufle à 600° C pendant 5 h. La formule utilisée est la suivante (**Afnor, 1986**).

$$\text{Teneur en cendre} = (P_v + E - P_v) / \text{Prise}$$

D'où

P_v : poids des creusets vide avant l'incinération

P_v+E : poids des creusets avec l'échantillon après l'incinération

II-4- Mesure du potentiel Hydrogène

Le potentiel hydrogène est déterminé à l'aide d'un pH-mètre selon la méthode de **Afnor, (1982)** Après avoir fait dissoudre une prise d'essai de 1g de poudre de substrat étudié dans 50ml d'eau distillée neutre, et trois mesure de pH sont effectuées.

II-5- Détermination de l'acidité titrable

La méthode de dosage a eu lieu par titrimétrie à l'aide de NAOH 0.1N, en présence du phénol phtaléine comme indicateur coloré du pH (**Verma et Joshi, 2000**).

Une prise d'essais de 1g est dissoute dans 100 ml d'eau distillée, 25 ml de cette solution sont mise à décanter pendant 20 minutes, 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées à l'échantillon, puis le contenu est titré par addition de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol à l'aide d'une burette jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle Persistante la teneur en acide citrique dans 100g de poudre es calculé par la formule suivante :

$$\text{Acidité (g/100g)} = (N_b \times V_b \times M) / V_A \times P$$

D'où

M: Masse molaire de l'acide citrique (192,13 g/mol)

Va: Volume en millilitres de la prise d'essai.

Vb: Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé.

Nb: Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé (0,1 N).

P : Nombre de protons (3)

II-6- 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. (**Annexe V**).

II-7- 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 (**Annexe V**).

II-8- 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 obtenus à partir d'une gamme d'étalon réalisée avec la BSA (**Annexe V**).

II-9-Dosage de l'azote total :

L'azote total est dosé par volumétrie selon la méthode de **kjeldhal, (1889)**.

Une minéralisation de l'échantillon doit être faite avant de procéder au dosage de l'azote total. Pour cela on introduit 10 mg d'échantillon dans un matras de minéralisation puis ajouter

une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) suivi de 20 ml d'acide sulfurique concentré et faire un chauffage progressif, laisser au froid pendant 15 mn jusqu'à apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, le chauffage est rendu plus énergique pendant 4 à 5 heures ; Après décoloration complète, la solution est refroidie et complétée à 250 ml avec l'eau distillée

La distillation est réalisée en prélevant 20 ml de la solution minéralisée une solution de soude est ajoutée suivie d'une distillation ; Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré (bleu méthylène et rouge méthylène)

Doser l'excès de l'ammoniac par l'acide sulfurique à 0,05 N.

Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule suivante :

$$N = 14 \times N_A \times V_A \times d / V_0$$

N_A : Normalité de l'acide.

V_A : Volume, en ml de l'acide versé.

V_0 : Volume en ml de la prise d'essai.

d : dilution de la fraction considérée.

III- optimisation des conditions de Production de l'enzyme par fermentation submergée

Le modèle expérimental est divisé en deux parties

III-1 Etude préliminaire

Un essai préliminaire est effectué pour déterminer la concentration optimale et la période d'incubation pour la production d'amylase.

La fermentation submergée est une fermentation où le substrat est soluble, Elle permet une bonne homogénéisation des composants du milieu. Elle facilite la manipulation et permet un meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. L'utilisation d'une culture submergée a pour avantage la facilité de la stérilisation de ce processus (Sankaralingam *et al.*, 2012).

Le milieu de base est préparé à différentes concentrations de poudre d'épluchures de pommes de terre à savoir (0.5g, 1g, 2g, 3g), Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml, puis stérilisées à 120°C/20min.

Les milieux sont ensuiteensemencés par 500 µl de la suspension bactérienne âgée de 18 heures. Les flacons de fermentation sont incubés sous agitation à 150 tr/ min à 37 °C (**Khusro et al, 2017**). Des prélèvements (24h ; 48h ; 72h) quotidiens sont effectués et l'activité enzymatique est mesurée.

- **Dosage 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**, 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.

200 µl du solution amidon 1% (m/v) est additionnée avec 200 µl de tampon phosphate pH =7 à 0.1 M ou quel on ajoute 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 (**Hassan et Karim, 2015**).

III-2 L'optimisation par la méthodologie de surface de réponse (RSM)

L'optimisation des conditions de production de l'amylase par la souche amylolytique à partir de substrat étudié dans un milieu de fermentation amélioré avec 0.2g MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄ , 0.1g CaCl₂ et traces FeCl₃ comme était rapporté par **Benjamain et al.(2013)**. est effectuée selon la méthode de surface de réponse (RMS), un modèle mathématique polynomial a été développé, le type du modèle choisi est le plan Box-Behnken (**Goupy, 2006**).

III-2-1 Choix des paramètres

1. Choix de la température

La température d'incubation est l'un des paramètres qui influence sur la croissance des microorganismes et donc la production de métabolite. De ce fait le choix des températures pour une production maximale est faite en se basant sur les études réalisées par plusieurs travaux **Gangadharan et al. (2006)**, **Maity et al. (2015)** et **Singh et al. (2016)**.

2. Choix du pH

Le pH est un facteur qui influence sur le développment des bactéries ainsi sur leurs activité enzymatique comme était indiqué par **Swain et al. (2006)** et **Benjamin et al. (2013)**.

3. Choix de la source d'azote

L'augmentation ou la réduction de la production d'enzyme amylolytique dépend de la concentration de la source d'azote organique ou inorganique, ceci est rapporté par les travaux de **Dejkref et al. (2014)**. de ce fait l'optimisation de cette dernière est indispensable.

Trois facteurs (X_1 , X_2 ; X_3) à trois niveaux (- 1,0 et +1) sont appliqués pour optimiser la production de l'enzyme à savoir la température ; le Potentiel hydrogène (**Nagarajan et al., 2010**), et la concentration de peptone (**Akcan et al, 2012**)

Tableau I : niveaux des variables choisies pour les essais

Paramètres	Niveau bas (-1)	Niveau centré (0)	Niveau haut (+1)
X_1 (pH)	6	7	8
X_2 (T°)	30	40	50
X_3 (peptone mg)	70	90	110

Le plan box-behnken comprend 15 essais dont l'essai centré (0, 0, 0) est répété trois fois (**Goupy, 2006**).

Tableau II : tableau récapitulatif des expériences du plan de Box- Behnken pour trois facteurs

Essai n°	Facteur 1 pH	Facteur 2 T°C	Facteur 3 peptone %
1	7	40	90
2	8	30	90
3	8	40	110
4	8	40	70
5	6	40	110
6	8	50	90
7	7	40	70
8	7	30	110
9	6	50	90
10	6	40	70
11	7	30	70
12	7	40	90
13	7	50	110
14	7	50	70
15	6	30	90

Analyse statistique

Les résultats sont analysés par le logiciel R basé sur l'analyse de la variance (ANOVA) du test LSD (test Fisher). Tous les résultats sont exprimés en moyennes de trois valeurs $\pm$ écart types. D'autre part, les résultats expérimentaux du plan d'expérience de Box-Behnken sont traités par logiciel JMP (qui est un logiciel de statistique dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience) (Goupy, 2006).

Afin de vérifier la fiabilité des résultats obtenus au cours de cette étude, un test confirmatif est effectué, dont les conditions de fermentation sont fixés comme suit : 0.5 g de poudre d'épluchures de pomme de terre est mise en solution dans 50 ml d'eau distillée,ensemencée avec 500µl de suspension bactérienne

La fermentation est maintenue aux conditions évaluées par la solution du plan BBD, sous agitation à 150 rpm pendant 48h d'incubation.

Le développement de l'agriculture et de l'industrie alimentaire accumule de plus en plus des produits de faible qualité commerciale, ainsi que de sous-produits dont leur exploitation permet non seulement d'éviter la pollution de l'environnement, mais également de diminuer les pertes économiques imposées à ces secteurs en réduisant les dépenses mais aussi d'assurer la création des emplois domestiques (**Puértolas et Barba, 2016**).

La valorisation par les procédés de bio-fermentation a connu un large essor depuis les années 60. Il est le précurseur de l'exploitation de sous-produits par l'utilisation des bio-fermentations à l'élaboration de nouveaux produits entre autres les enzymes en se basant sur l'utilisation de microorganismes tel que *Bacillus sp*, *Aspergillus sp* et *penicillium sp* .etc.

La Pomme de terre *Solanum tuberosum* L., est la quatrième culture mondiale après le blé le riz le maïs, et l'une des cultures agricoles les plus importantes pour la consommation humaine, et se considère comme secteur prometteur qui offre de nombreux atouts (**Bentley, 2015**).

Les industries de pomme de terre génèrent des quantités énormes en déchets, qui sont une matière destinée à l'abandon, et la nécessité de trouver des dynamismes s'impose plus que obligatoire, ce qui explique l'objectif de la présente étude qui se focalise sur l'essai de valorisation par biofermentation des épluchures de cette culture par l'utilisation de microorganisme pour l'élaboration des amylases.

Dans la présente étude, deux souches sont isolées et testées de leur activité amylasique. Les techniques microbiologiques ont permis de sélectionner la souche S2 grâce à sa forte performance pour la dégradation d'amidon.

L'analyse morphologique et les tests biochimiques révèlent que la souche appartient à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens*.

Dans la présente étude, la caractérisation physico-chimique des épluchures de pomme de terre a révélé un substrat de fermentation à pH de 6.01, pauvre en sucres facilement fermentescibles $0.81 \% \pm 0.001$, un taux d'azote de $2.36 \% \pm 0.12$, dont la matière sèche, représente environ $90.25\% \pm 0.08$. et le taux en éléments minéraux contenus dans le milieu représentent $13.01\% \pm 0.3$ du poids totale.

Les résultats des tests préliminaires pour la production de l'enzyme par fermentation submergée ont permis de fixer la concentration du substrat (épluchures de pomme de terre) à 0.5g et le temps d'incubation de la fermentation à 48h.

L'optimisation, pour la production de l'amylase par *Bacillus amyloliquefaciens* grâce à l'analyse statistique (modélisation à régression linéaire) de l'ensemble des résultats obtenus avec la matrice de Box-Behnken a permis de sélectionner, parmi les facteurs nutritionnels et environnementaux testés, un facteurs à effet significatif sur la production de l'enzyme qui est la température .

L'utilisation du plan d'expérience Box-Behnken pour optimiser la production des amylases a révélé que les conditions optimales sont la température de 50°C, le pH de 6 et la concentration en peptone de (90 mg /50ml) pour une période d'incubation de 48 heures. Ces conditions ont permis d'obtenir une activité amylasique maximale de 228.271 UI/min.

En terme de perspective et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- D'élargir l'application du modèle Box-Behnken afin d'étudier l'effet d'autres paramètres sur la production d'enzymes ;
- D'élargir l'étude sur d'autres sous-produits afin d'élaborer de nouveaux produits à valeur économique;
- De rechercher d'autres microorganismes capables de produire de nouvelles molécules.

Références bibliographiques

A

- Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F., & Abou-Taleb, K. A.** Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, (2015); 60(2), 193-202.
- Abdullah, R., Shaheen, N., Iqtedar, M., Naz, S., & Iftikhar, T.** Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus niger* (BTM-26) in solid state fermentation. *Pak. J. Bot.* (2014) ; 46(3), 1071-1078.
- Adil, I. H., Cetin, H., Yener, M., & Bayındırlı, A.** Subcritical (carbon dioxide+ ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The journal of supercritical fluids*, (2007) ;43(1), 55-63.
- Afnor** .Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. **Afnor**.(1982) ; 325 .
- Afnor**.Les dossiers de la normalisation ISSN, (2), 1986 ; 8297-4827.
- Akcan, N., et al.** "Production and optimization parameters of amylases from *Bacillus subtilis* RSKK96 under solid state fermentation." *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* , (2012);26(3): 233-239.
- Al-Asady, A.** Optimization of α -Amylase Production from a Local Isolate of *Bacillus licheniformis* and Characterization of Purified Enzyme. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*,2016; 1(6), 301-312.
- Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A., & Israilides, C. Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management*, (2010); 30(10), 1898-1902.
- Aryal S.** Biochemical Test and Identification of *Bacillus subtilis*, (2016) . Accessed from: <http://www.microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-bacillus-subtilis/>

B

Benjamin, S., Smitha, R., Jisha, V., Pradeep, S., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K., & Josh, M. S.A monograph on amylases from *Bacillus* spp. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, (2013) 4(2), 227.

Benkeblia, N. FOOD IRRADIATION OF AGRICULTURAL PRODUCTS IN ALGERIA. PRESENT. *Int. Agrophysics*, (2000); 14, 259-261.

Bentley, J. World History of the Potato. *Revista Latinoamericana de la Papa*, (2016); 19(2), 76-81.

Bhalla T, C., et Chatanta D, K. Application of enzymes in food processing biotechnological applications. Asitech publishers Inc, (2000). 121-141.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, (1976);72(1-2), 248-254.

Bukhari, D. A., & Rehman, A Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Local Environment. *Pakistan J. Zool*, (2015); 47(4), 905-911.



Calder, B. L., Skonberg, D. I., Davis-Dentici, K., Hughes, B. H., & Bolton, J. C. The Effectiveness of Ozone and Acidulant Treatments in Extending the Refrigerated Shelf Life of Fresh-Cut Potatoes. *Journal of food science*, (2011); 76(8), S492-S498.

Camire, M. E., Violette, D., Dougherty, M. P., & McLaughlin, M. A. Potato peel dietary fiber composition: effects of peeling and extrusion cooking processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1997); 45(4), 1404-1408.

Christian N., Alain R. Déchets et pollution. 1^{éd}. Dunod, Paris, (2004) ; 134.

Choubane, S., Khelil, O., & Cheba, B. A. *Bacillus* sp. R2 α -amylase production optimization: Pasta cooking water as medium of amylase production. *African Journal of Biotechnology*, (2015); 14(47), 3184-3189.

Cuveillier G. F. Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) *Biotechnologie*. Ed. Lavoisier, . (1999). 401-425



Delaplace, P., & Fauconnier, M.-L. Valorisation industrielle de la pomme de terre. *Troupeaux et Cultures des Tropiques*, (2004); 51-56.

Delaras, C. Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyses ou le contrôle sanitaire. (Ed). Médicales internationales. Paris, (2007); 476.

Delaras, C. Pratique de microbiologie de laboratoire. Recherches de bactéries et de levures - moisissures. (Ed). Céline, Poitiers - Paris, (2014); 772p.

Demirkan, E. Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, (2011); 35(6), 705-712.

Decruyenaere, V., e, Froidmont, P, Saive, P, Rondia, N, Bartiaux-Thill, D, Stilmant. valorisation des co-produits de la pomme de terre en production animale. Journée d'étude Pomme de terre, (2005) .67-87.

Djekrif, D. Optimization of Thermophilic Pullulanase and α -amylase Production by Amylolytic Yeast. *International Journal of Microbiology Research*, (2014); ISSN, 0975-5276.

Dominique, M. Les productions légumières. 3^{ed}. Educagri, France, 2010 ;93-98.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, (1956); 28(3), 350-356.

Dutta, P., Deb, A., & Majumdar, S. Optimization of the Medium for the Production of Extracellular Amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from Municipal Solid Waste. *International Journal of Microbiology*, 2016.



Erem, F., Certel, M., & Karakas, B. Identification of *Bacillus* species isolated from ropey breads both with classical methods and API identification kits. *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, (2009); 22(2), 201-210.



Faucher, J. *Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue*. Institut National Polytechnique de Toulouse, (2006).

Fossi, B. T., Tavea, F., & Ndjouenkeu, R. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, (2005); 4(1), 14.

Franco, J. *Planification d'expériences numériques en phase exploratoire pour la simulation des phénomènes complexes*. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, (2008).

Fritze, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, (2004);94(11), 1245-1248.



Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. α -Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* Using Agro Wastes as Feed Stock. *Food Technology and Biotechnology*, (2011);49(3),36-340.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology and Biotechnology*, (2006);44(2), 269-274.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource technology*, (2008); 99(11), 4597-4602.

Garrrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*, (2004).

Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci*, (2013); 26(4), 691-697.

Goldman, E., & Green, L. H. Practical Handbook of, (2009).

Goupy J & Creighton. Introduction aux plans d'expérience.3ème édition.*technique et ingénierie :serie gestion industrielle*.Donod ,(2006) -324p. Paris.

Guech-Lamari, F., & Kirane-Gacemi, D. Les bactéries sporulées dans les conserves de légumes (petits pois): Recherche et caractérisation phénotypique. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, (2012); 25(1), 131-139.



Hafsa, C. Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp.* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Université Ferhat Abbas de Sétif 1, (2014).

Hassan, H., & Karim, K. A. Optimization of alpha amylase production from rice straw using solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *International Journal of Science, Environment and Technology*, (2015); 4, 1-16.

Headon, D., & Walsh, G. The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances*, (1994);12(4), 635-646.

Huang, M., Oppermann-Sanio, F. B., & Steinbüchel, A. Biochemical and Molecular Characterization of the *Bacillus subtilis* Acetoin Catabolic Pathway. *Journal of bacteriology*, (1999); 181(12), 3837-3841.

I

Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T., & Yoshikawa, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International microbiology*, (2010); 2(4), 267-271.

K

Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G., & Oumèma, N.-E. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, (2014); 52, 144-149.

Khusro, A., Barathikannan, K., Aarti, C., & Agastian, P. Optimization of Thermo-Alkali Stable Amylase Production and Biomass Yield from *Bacillus* sp. Under Submerged Cultivation. *Fermentation*, (2017); 3(1), 7.

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, (2002); 13(4), 345-351.

Kjeldahl, J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, (1883);22(1), 366-382.

L

Lagzouli, M., Charouf, R., El-Yachoui, O., Berny, M., & Jadal, M. Optimisation de la croissance et de la production de gluco amylase extra cellulaire par *Candida guilliermondii*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, (2007);146, 251-270.

Leyral, G., Joffin, J.-N., & Boineau, F. *Microbiologie technique: Documentation technique*: Centre Régional de Documentation Pédagogique,(1998).

Liang, S., & McDonald, A. G. Chemical and thermal characterization of potato peel waste and its fermentation residue as potential resources for biofuel and bioproducts production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2014); 62(33), 8421-8429.

Liang, S., McDonald, A. G., & Coats, E. R. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. *Waste Management*, (2014); 34(11), 2022-2027.

Logan, N., & Berkeley, R. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Microbiology*, (1984); 130(7), 1871-1882.

M

Mahmood, A., Greenman, J., & Scragg, A. Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and microbial technology*, (1998); 22(2), 130-137.

Maity, S., Mallik, S., Basuthakur, R., & Gupta, S. Optimization of solid state fermentation conditions and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, (2015); 5(4), 1.

Maloney, K. P., Truong, V. D., & Allen, J. C. Susceptibility of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peel proteins to digestive enzymes. *Food science & nutrition*, (2014); 2(4), 351-360.

Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. Ecology of bacillaceae. *Microbiology spectrum*, (2015); 3(2).

Mcclevery & charnock. les enzymes: application industrielles et analytique. *Revue Des Œnologues*, (2005); 116.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, (1959); 31(3), 426-428.

Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, (2014); 65, 28-41.

Mukherjee, A. K., Adhikari, H., & Rai, S. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, K, (2008); 39(2), 353-361.

N

Nagarajan, M., Deborah Paripuranam, T., & Umamaheswari, S. Efficient production of Alpha-amylase from agro residues using *Bacillus subtilis*. *J Chem and Pharm Res*, (2010); 2(4), 442-448

Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D.-D., & Leila, B. Purification and characterization of the-amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, (2010); 4(6), 155-162.

O

Olayinka, O. H. Assessment of Sweet Potato Peel as a Potential Raw Material for Bioethanol Fuel. *Assessment*, (2015); 2(12).

P

Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol U. T., Singh D. et Mohan R. Advances in microbial analyses. *Biotechnol. appl. Biochem*, (2000). 31(2) : 135-152.

Pant, G., Prakash, A., Pavani, J., Bera, S., Deviram, G., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, (2015). 9(1), 50-55.

Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., & Villani, F. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, (2003);69(4), 2321-2329.

Pierre, A., Glaude, E D., Jean-Pierre R. L'évaluation des impacts sur l'environnement. 3 éd. Lavoisier, Canada,(2010) ; 42

Prameela, G., Dharshini, K. P., & Kamala, M. C. K. isolation and characterization of amylase producing bacteria from orange and pomegranate peel. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, (2016);6(11), 7111-7118.

Priest, F. G., Goodfellow, M., & Todd, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology*, (1988);134(7), 1847-1882.

Puértolas, E., & Barba, F. J. Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization. *Food and Bioproducts Processing*, (2016); 100, 172-184.

Puttongsiri, T., Choosakul, N., & Sakulwilaingam, D. Moisture content and physical properties of instant mashed potato. In *International Conference on Nutrition and Food Science*, (2012);39 92-95.



Rabier, F. *Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire.* INSA de Rouen,(2007).

Ramoul, A. And E. H. Sedkaoui .Present Status Of Potato Production In Algeria. International Seminar On The Cultivation Of Potato. Izmir, Turkey,. International Potato Center, 1978.

Réne -R., & Moyse, H. *Précis de matière médicale: Pharmacognosie Spéciale: Schizophytes (Bactéries)-Actinomycétales-Thallophytes (Champignons, Algues, Lichens)-Ptéridophytes (Fougères)-Spermaphytes (Gymnospermes).* *Pharmacognosie générale:* Masson. Paris,(1976).

Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2009); 59(10), 2429-2436.

Rousselle, P., Robert, Y., & Crosnier, J.-C. *La pomme de terre: production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations:* Editions Quae,(1996).



- Sankaralingam, S., Shankar, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., & Kumar, C.** Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, (2012); 12(11), 1507-1513.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P.** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, (2004); 50(1), 1-17.
- Scheherazed, D.-D., Leila, B., Amel, A. K., Kenza, L., Tahar, N., Zoubida, G.-A., & Zahia, M.** An Optimization Study of α -Amylase Production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 Grown on Orange Waste Powder. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, (2016);7(03), 123.
- Schieber, A., & Saldaña, M. D. A.** Potato peels: a source of nutritionally and pharmacologically interesting compounds-a review. *Food*, (2009);3(2), 23-29.
- Senanayake, S. A., Ranaweera, K., Gunaratne, A., & Bamunuarachchi, A.** A Comparative analysis of nutritional quality of five different cultivars of sweet potatoes (*Ipomea batatas* (L) Lam) in Sri Lanka. *Food science & nutrition*, (2013); 1(4), 284-291.
- Sepelev, I., & Galoburda, R.** Industrial potato peels waste application in food production: a review. In *Research for Rural Development. International Scientific Conference Proceedings (Latvia)*: Latvia University of Agriculture, (2015).
- Shukla, J., & Kar, R.** Potato peel as a solid state substrate for thermostable α -amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2006); 22(5), 417-422.
- Siddiqui, A., Salahuddin, T., Riaz, A., Zohra, R. R., & Naheed, S.** PRODUCTION OF AMYLASE FROM *BACILLUS* SP. AY3 USING FRUIT PEELS AS SUBSTRATE. *FUUAST Journal of Biology*, (2014); 4(2), 213.
- Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C..** Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*, (2017).
- Singh, R. N., Bahuguna, A., Chauhan, P., Sharma, V. K., Kaur, S., Singh, S. K., & Khan, A.** Production, purification and characterization of thermostable α -amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. *Journal of BioScience & Biotechnology*, (2016); 5(1).
- Slepecky, R. A., & Hemphill, H. E.** The genus *Bacillus*—nonmedical. In *The prokaryotes*, (2006) ;530-562
- Souza, P. M. d.** Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, (2010); 41(4), 850-861.

Swain, M. R., Kar, S., Padmaja, G., & Ray, R. C. Partial Characterization and Optimization of Production of Extracellular"-amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Culturable Cow Dung Microflora. *Polish Journal of Microbiology*, (2006); 55(4), 289-296.

T

Taher, I. B., Bennour, H., Fickers, P., & Hassouna, M. Valorization of Potato Peels Residues on Cellulase Production Using a Mixed Culture of *Aspergillusniger* ATCC 16404 and *Trichodermareesei* DSMZ 970. *Waste and Biomass Valorization*, (2017); 8(1), 183-192.

Tinsson, W. *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* .Science & Business Media, (2010); (67).

Toma, R., Orr, P., D'appolonia, B., DINTZIS, F., & Tabekhia, M. Physical and chemical properties of potato peel as a source of dietary fiber in bread. *Journal of food science*, (1979); 44(5), 1403-1407.

V

Verma, L., & Joshi, V. *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables.General concepts and principles*: Indus Publishing, (2000); (1).

Vivier, S. *Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis*. Ecole Centrale de Lille,(2002).

W

Wu, D. Recycle technology for potato peel waste processing: A review. *Procedia Environmental Sciences*, (2016); 31, 103-107.

Références numériques

<http://geoconfluences.ens-lyon.fr/doc/territ/FranceMut/FranceMutDoc15.htm>. Consulté le 22/04/2017.

<http://geocohttps://research.cip.cgiar.org/confluence/display/wpa/Algeria>. Consulté le 20/04/2017.

Annexe I

Tableau I: Principaux pays producteurs de pomme de terre en 2014

Pays	Production en tonnes
Chine	859 954 496
Inde	395 474 900
Fédération de Russie	353 586 240
UK raine	230 152 950
Etats Unis d'Amérique	217 104 392
Allemagne	123 310 328
Pologne	106 340 017
Belarus	85 114 710
France	76 976 133
Pays –Bas	76 098 118

Tableau II : évaluation de la pomme de terre de consommation (2010-2015) MADR

Année de production	production quintal	Surface cultivé ha
2010	33 003 115	121 993
2011	38 621 936	131 903
2012	42 194 758	138 666
2013	48 865 380	161 156
2014	46 735 155	156 176
2015	45 395 767	153 313

Annexe II :

Tableau III Matrice d'expériences (unité codées) du plan de Box-Behnken à 3 facteurs

Essai N°	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

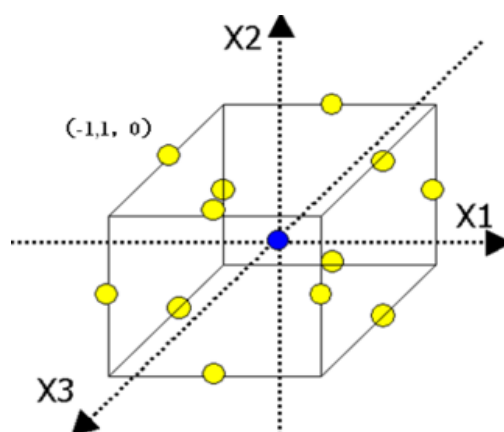


Figure 1 Le model Box-Behnken pour trois facteurs

Annexe III : Préparation des milieux de culture.

➤ Gélose nutritif

• Composition du milieu :

- Extrait De Viande : 1,0g/L
- Extrait De Levure : 2,5g/L
- Peptone :5,0g/L
- Chlorure De Sodium :5,0 g/L
- Agar :15,0 g/L

• Préparation

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

- Répartir en flacons.

- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

➤ Bouillon nutritif

• Composition du milieu :

- Peptone : 10,0 g/L.
- Chlorure de sodium :5,0 g/L.
- Extrait de bœuf :10,0 g/L.

• Préparation

- Mettre en solution Le milieu de base déshydraté dans un litre d'eau

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

- Répartir en tubes ou en flacons.

- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

➤ Gélose à 1% d'amidon

• Composition du milieu :

- Amidon soluble10g
- KNO₃.....0.5g
- K₂HPO₄.....1g
- MgSO₄.7H₂O.....0.2g
- CaCl₂.....0.1g
- FeCl₃.....traces
- Agar.....15g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

• Préparation

- mettre en solution tous les composés du milieu dans un litre d'eau distillée
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

-Répartir en flacons, à raison de 110 ml par flacon.

- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

Annexe IV: les réactifs utilisés

➤ Bleu de coomassie

• Composition de réactif :

- BBC G-250 :.....100 mg.
- Ethanol Absolu:.....50 ml.
- Acide phosphorique à 85% :.....100 ml.
- Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

➤ Sels de CARAZ I

• Composition de réactif :

- Acétate de zinc Tri hydraté23.8g
- Acide acétique glaciale.....3g

- Eau distillée100g

➤ **Sels de CARAZ II**

- **Composition de réactif :**

- Ferrocyanure de potassium.....10.6g
- Eau distillée.....100ml

➤ **DNS**

- **Composition de réactif :**

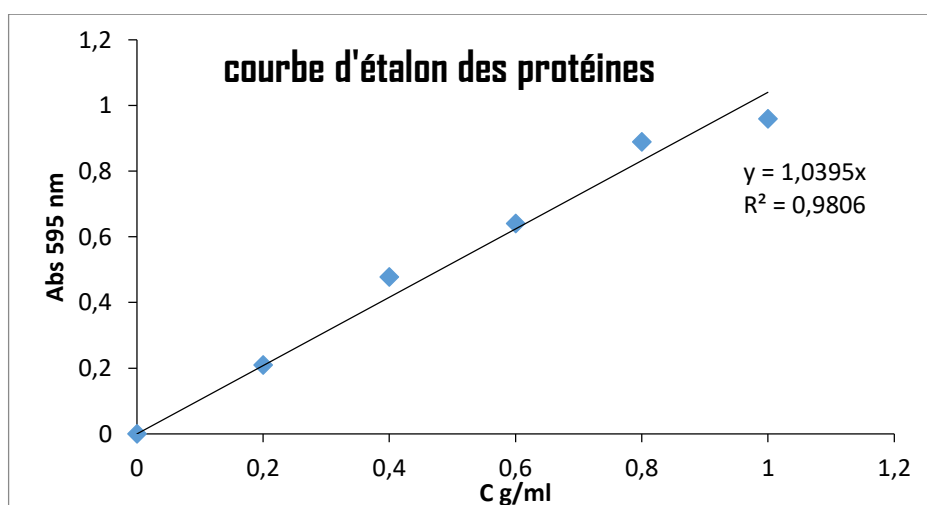
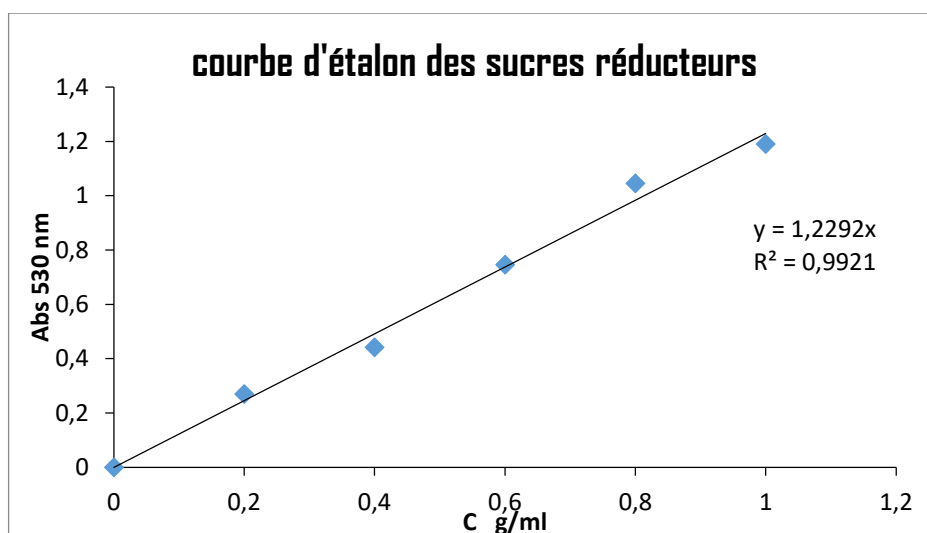
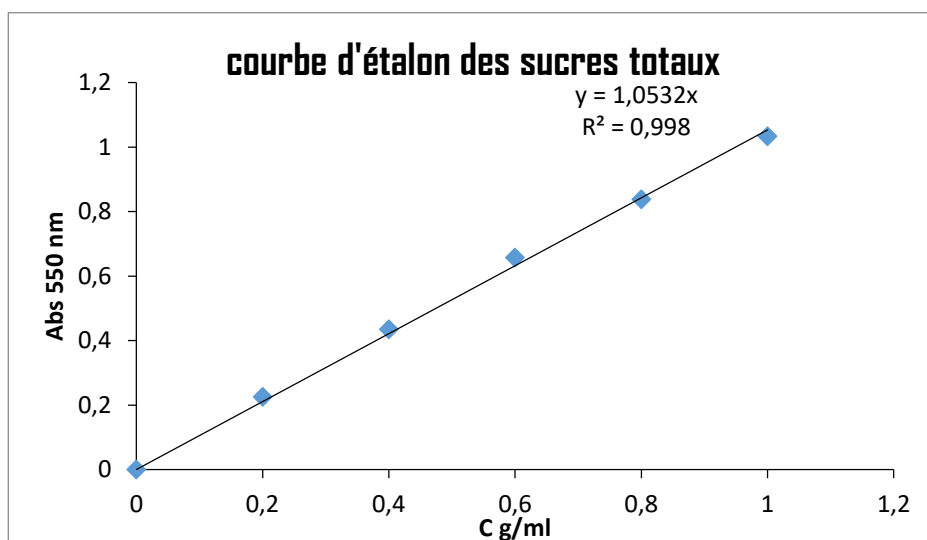
- DNS1g
- Soude..... 1,5 g
- Tartrate double de sodium-potassium.....30g

Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

➤ **tampon phosphate pH =7**

- **Préparation du Tampon phosphate (0.1) M à pH =7**

- K_2HPO_4 5,2 g
- KH_2PO_4 10,7 g
- d'eau distillée..... 1L

Annexe V : Les Courbes D'étalonnage

Résumé

En Algérie, des quantités importantes de déchets de pommes de terre sont générées à chaque campagne, ces déchets peuvent être transformés par divers procédés biotechnologiques ; 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'amylase par une souche amylolytique isolée d'une pomme de terre pourrie. La première partie de l'étude consiste à la sélection et l'identification de la souche ayant une activité amylolytiques. *Bacillus amyloliquefaciens* a été sélectionnée pour la fermentation. Le milieu de fermentation a été préparé à base de poudre des épluchures de pomme de terre après une caractérisation physique et chimique de ce substrat. Une étude préliminaire est menée afin d'optimiser la concentration du substrat et le temps d'incubation qui aboutissent à une meilleur activité amylasique. L'optimisation par la méthodologie de surface de réponse et model Box-Behnken des facteurs influencent sur la production à savoir la température, pH et la concentration de peptone, nous a permis d'améliorer le rendement de production d'enzyme par la fermentation submergée de 37.864 UI/ml à 228.227 UI /ml.

Mots clés : L'amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, épluchures de pomme de terre, Fermentation submergée, optimisation, plan Box-Behnken .

Abstract

In Algeria, large quantities of potato waste are generated for each companion, these waste can be processed by various biotechnological processes; Fermentation is a technique that transforms agro-industrial waste into many high value-added products such as enzymes. This work focuses on the production of amylase by an amylolytic strain isolated from a potato Rotten. The first part of the study involves the selection and identification of the strain having amylolytic activity. *Bacillus amyloliquefaciens* was selected for fermentation. The fermentation medium was prepared from potato peels after a physical and chemical characterization of this substrate. A preliminary study is carried out in order to optimize the substrate concentration and incubation time which lead to a better amylase activity. Optimization by the response surface methodology and Box-Behnken design of the factors influencing the production, temperature, pH, and peptone concentration allowed us to improve the yield of enzyme production by submerged fermentation from 37,864 IU/ml to 228,227 IU/ml.

Keywords: Amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, Potato peel, submerged fermentation, optimization, Box-Behnken design