

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF-
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté par

MOUFFOK ABDENACER

En vue d'obtenir le Diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Microbiologie
Option : Microbiologie Appliquée

Production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte : optimisation du milieu de culture et effet des sucres purs et mixtes

Soutenu le devant le jury d'examen

Président :	Pr. A. GUECHI	Université de Sétif
Rapporteur :	Pr. N. NANCIB	Université de Sétif
Examineurs :	Pr. S. BENALLAOUA	Université de Béjaia
	Pr. D. MEZIANE-CHERIF	Université de Sétif

Avant – Propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Génie fermentaire » groupe du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Sétif. Je tiens à remercier toute l'équipe de Microbiologie de m'avoir accueilli dans ce laboratoire et pour tous les efforts qu'ils ont déployés afin d'assurer de meilleures conditions de travail aussi bien scientifiques que matériels, grâce à leur bonne humeur et à leur qualité d'écoute.

Je tiens à remercier très vivement monsieur Nabil NANCIB, Professeur (Université de Sétif), responsable de ce travail pour sa grande modestie et pour son accueil chaleureux. Je lui suis reconnaissant pour ses compétences scientifiques et pédagogiques ainsi que pour l'aide précieuse qu'il m'a apportées et pour le temps qu'il m'a consacré afin de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur A. GUECHI, Professeur (Université de Sétif), d'avoir accepté d'être président de ce jury.

Je remercie Monsieur S. BENALLAOUA, Professeur (Université de Béjaia), d'avoir bien voulu me faire le grand honneur de juger ce travail.

Je remercie Monsieur D. MEZIANE-CHERIF, Professeur (Université de Sétif), d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Je remercie également tous les enseignants et tous les étudiants de ma promotion.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1. LA PRODUCTION D'ACIDE GLUTAMIQUE.....	4
I.1.1. Fermentation glutamique	4
I.1.1.1. Historique et importance industrielle de la fermentation glutamique	4
I.1.1.1.1. Historique de la production de glutamate	4
I.1.1.1.2. Principaux producteurs de glutamate	4
I.1.1.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour la production de glutamate.....	4
I.1.1.1.4. Utilisations du glutamate.....	5
I.1.1.2. Procédés de production d'acide glutamique	5
I.1.1.2.1. Limitation en biotine	6
I.1.1.2.2. Ajout de pénicilline	6
I.1.1.2.3. Ajout de tensioactif.....	7
I.1.1.2.4. Choc de température.....	7
I.1.1.2.5. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides.....	7
I.1.1.3. Paramètres importants de la fermentation glutamique	8
I.1.1.3.1. Température	8
I.1.1.3.2. pH	8
I.1.1.3.3. Oxygène	8
I.1.1.3.4. Composition du milieu	9
I.1.1.3.4.1. Glycine bêtaïne.....	9
I.1.1.3.4.2. Pression osmotique.....	9
I.1.1.3.4.3. Chélateur de fer	
I.1.2. Métabolisme central des corynébactéries	9
I.1.2.1. Entrée des sucres.....	11
I.1.2.2. La glycolyse	13
I.1.2.3. Voies des pentoses phosphates	15
I.1.2.4. Voies anaplérotiques chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	16
I.1.2.5. Voie de biosynthèse du glutamate	17
I.1.3. Excrétion des acides aminés chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>.....	19
I.1.3.1. Système d'export des acides aminés	19
I.1.3.1.1. Excrétion de glutamate.....	20
I.1.3.1.1.1. Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate	20
I.1.3.1.1.2. Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate.....	21
I.1.3.1.1.3. Energie cellulaire.....	22
I.1.3.1.1.4. Composition de la membrane plasmique.....	22
I.1.3.1.1.5. Réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane.....	23

I.2. LA DATTE	24
I.2.1. Description botanique	24
I.2.1.1. Stades de maturité	24
I.2.2. Répartition des palmiers dattiers	25
I.2.3. Production de dattes	25
I.2.4. Le palmier dattier en Algérie	25
I.2.4.1. Les variétés de dattes	26
I.2.4.2. Les déchets de dattes	26
I.2.4.2.1. Les dattes non appréciées.....	26
I.2.5. Composition de la datte	27
I.2.5.1. Les sucres de pulpe de datte.....	28
I.2.5.2. Teneur en eau	29
I.2.5.3. Les protéines	30
I.2.5.4. Les sels minéraux.....	31
I.2.5.5. Les lipides.....	33
I.2.5.6. Les acides organiques.....	33
I.2.5.7. Les vitamines	33
I.2.5.8. Autres constituants.....	34
I.2.6. Valorisation de la datte	35
I.2.6.1. Valorisation directe	35
I.2.6.1.1. La pâte de dattes	35
I.2.6.1.2. La farine de dattes.....	35
I.2.6.1.3. Le sirop de dattes	35
I.2.6.1.4. Le jus de dattes	35
I.2.6.1.5. Le miel de dattes.....	36
I.2.6.2. Valorisation indirecte.....	36
I.2.6.2.1. Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires)	36
I.2.6.2.2. Production d'oxytétracycline.....	36
I.2.6.2.3. Production d'acide citrique.....	37
I.2.6.2.4. Production d'alcool	37
I.2.6.2.5. Production de vitamine B12.....	37
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES	38
II.1. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES	38
II.1.1. Appareils	38
II.1.2. Produits chimiques	38

II.2. MICRO-ORGANISME UTILISE	39
II.2.1. Caractéristiques de la souche <i>Corynebacterium glutamicum</i>	40
II.3. MILIEUX DE CULTURES	40
II.3.1. Milieu de MCGC (Milieu de <i>Corynebacterium glutamicum</i> enrichi en Citrate).....	40
II.3.2. Milieu à base de jus de datte.....	41
II.3.2.1. Extraction du jus de datte.....	41
II.3.3. Stérilisation.....	42
II. 4. PROCEDE DE CULTURE	42
II.4.1. Conservation de la souche.....	42
II.4.2. Propagation de la souche.....	42
II.4.3. Cultures.....	43
II.4.3.1. Culture en Erlenmeyer.....	43
II.4.3.2. Culture en fermenteur.....	43
II.4.3.2.1. Description du fermenteur.....	43
II.4.3.2.2. Protocole des fermentations discontinues.....	44
II.5. METHODES D'ANALYSES	46
II.5.1. Prélèvement et traitement des échantillons.....	46
II.5.2. Estimation de la biomasse.....	46
II.5.3. Dosage du glutamate.....	46
II.5.4. Dosage du lactate.....	46
II.5.5. Dosage du glucose.....	47
II.5.6. Dosage du glucose / fructose.....	47
II.5.7. Dosage du glucose / saccharose.....	48
II.6. EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES	49
II.6.1. Calcul des paramètres cinétiques en réacteur discontinu.....	49
II.6.1.1. Vitesses de réaction.....	49
II.6.1.2. Vitesses spécifiques.....	49
II.6.1.3. Productivité volumétrique:.....	50
II.6.1.4. Evaluation de la vitesse spécifique maximale de croissance.....	50
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	51
III.1. Mise au point et optimisation d'un milieu de culture à base de jus de dattes	51
III.1.1. Etude de l'effet de la concentration initiale des sucres totaux (glucose, fructose et saccharose) de jus de datte sur la croissance et la production d'acide glutamique.....	52
III.1.2. Effet de la supplémentation des sources azotées sur la croissance et la production d'acide glutamique.....	53
III.1.2.1. Jus de datte supplémenté avec le sulfate d'ammonium.....	53
III.1.2.2. Jus de datte supplémenté avec de l'urée.....	54
III.1.3. Effet de la supplémentation en sels sur la croissance et la production d'acide glutamique..	56

III.1.4. Effet de la supplémentation en vitamines sur la croissance et la production d'acide glutamique	57
III.2. Effets des sources de carbones seules et mélangées sur la production d'acide glutamique à partir de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262	59
III.2.1. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de datte	60
III.2.2. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur sucres seuls.....	61
III.2.3. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur sucres mélangés	63
III.2.4. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de datte hydrolysé par l'invertase.	65
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69

INDEX DES FIGURES

Figure I.1. Schéma global de la fermentation glutamique.	5
Figure I.2. Représentation schématique du métabolisme centrale de carbone chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	10
Figure I.3. Entrée des sucres chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
Figure I.4. Assimilation du glucose, du fructose et du saccharose par le système phosphotransférase chez les Corynébactéries	12
Figure I.5. Voies de glycolyse chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	14
Figure I.6. Voies des pentoses phosphates chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	15
Figure I.7. Voies anapérotiques chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	16
Figure I.8. Voies de biosynthèse du glutamate	18
Figure I.9. Mécanisme de transport des acides aminés	19
Figure I.10. Flux des acides aminés via la paroi cellulaire de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	19
Figure II.1. Propagation de la souche (<i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262).....	42
Figure II.1. Description d'un fermenteur (BIOLAFITTE & MORITZ) avec ses capteurs.....	45
Figure III.1 (a,b). Effet des sources azotées sur les cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de datte.	55
Figure III.2 (a,b,c). Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur sucres seuls en culture discontinue.....	62
Figure III.3. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur sucres mélangés (glucose + fructose + saccharose) en culture discontinue.....	63
Figure III.4. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de datte hydrolysé par l'invertase en culture discontinue.	65

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I.1. Constituants de cinq variétés de dattes.....	28
Tableau I.2. Composition en sucres de quelques variétés de dattes d'Égypte.....	29
Tableau I.3. Evolution de la teneur en eau en fonction de leur qualité et de leur stade de maturité.....	30
Tableau I.4. Proportion en acides aminés de différentes variétés de dattes (g/100g de protéines).....	31
Tableau I.5. Proportion des sels minéraux de cinq variétés de dattes.....	32
Tableau I.6. Composition en acide gras du noyau de dattes.....	33
Tableau I.7. Teneur en vitamines des dattes cultivées en Arizona.....	34
Tableau I.8. Teneur en vitamines A et C des dattes Saoudiennes.....	34
Tableau II.1. Caractéristiques générales de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	40
Tableau II.2. Composition des milieux de culture.....	41
Tableau III.1. Effet de la concentration initiale des sucres totaux (glucose, fructose et saccharose) du jus de dattes sur la croissance et la production d'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	52
Tableau III.2. Effet de la concentration initiale de sulfate d'ammonium sur la croissance et la production d'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	53
Tableau III.3. Comparaison entre les sources azotées (sulfate d'ammonium et urée) supplémentées au jus de dattes en culture discontinue à partir de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	56
Tableau III.4. Effet de la supplémentation du jus de dattes en sels sur la croissance et la production de l'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	57
Tableau III.5. Effet de la supplémentation du jus de dattes en vitamines (biotine et thiamine) sur la croissance et la production de l'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	58
Tableau III.6. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de dattes en culture discontinue.....	60
Tableau III.7. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur sucres seuls (glucose, fructose, saccharose) en culture discontinues.....	61
Tableau III.8. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sucres mélangés (glucose + fructose + saccharose) en culture discontinue.....	64
Tableau III.9. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de dattes hydrolysés par l'invertase en culture discontinue.....	65

INTRODUCTION

Les activités agricoles et agro-industrielles génèrent des quantités importantes de déchets qui constituent une nuisance certaine pour l'environnement et un gaspillage de matière organique utile. De nombreuses études ont démontré que ces déchets, riches en matière organique étaient des produits nobles et constituaient de nouvelles matières premières pour de nombreuses industries.

Par ailleurs, leur valorisation par les procédés biotechnologiques représente une solution de choix dans la mesure où elle constitue à l'élimination de la pollution que subit l'environnement, permet de produire des substances à forte valeur ajoutée et contribue enfin au développement industriel et agricole du pays.

A la lumière de tout cela, une attention particulière doit être accordée à une meilleure gestion des déchets organiques et en particulier les sous-produits provenant de l'agriculture ou des industries y afférentes.

En Algérie, la phoeniciculture constitue le pivot de l'agriculture saharienne avec une prédominance du palmier dattier d'environ 22 % de la superficie totale de plantations. Cependant, des milliers de tonnes de dattes restent non utilisées et peuvent dépasser les 30 % de la production, soit environ 60.000 tonnes qui pourraient être valorisées.

Par ailleurs, le secteur phoenicicole, malgré les richesses qu'il procure dans les zones désertiques très difficiles, accuse un retard technologique. En effet, dans le domaine de la technologie de la datte et sa valorisation, les systèmes pratiqués sont restés archaïques.

Aujourd'hui, la bioconversion des sous-produits générés par la palmeraie et les industries de conditionnement des dattes : écarts de tri, dattes ratatinées, véreuses, dattes communes qui d'écoulent difficilement sur le marché, pourrait constituer un programme d'avenir pour le développement de l'agriculture saharienne. Cependant, grâce aux procédés biotechnologiques, il serait possible de mettre sur le marché national une nouvelle génération de produit dont l'impact socio-économique est considérable. Cela permet également de créer de nombreuses PME/PMI spécialisées génératrices de revenus supplémentaires tant pour les agriculteurs que pour industriels.

Les déchets de dattes sont dotés de teneurs élevées en sucres 73-83 % (glucose, fructose et saccharose). Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des

vitamines. Ils représentent par conséquent un substrat de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée entre autre l'acide glutamique qui est l'acide aminé le plus produit dans le monde, sa production mondiale a fortement augmenté pour atteindre aujourd'hui une production annuelle dépasse un million (1.200.000) de tonnes. Il est utilisé dans de nombreuses industries (pharmaceutique, chimique, cosmétique). Mais son utilisation principale est l'alimentation humaine. Il est employé comme exhausteur de goût dans de nombreux aliments déshydratés (soupes, bouillons ...) qui ont perdu de leur saveur lors de leur fabrication. Il est particulièrement utilisé en Asie comme condiment au même titre que le sel de table en Europe. Le glutamate est produit par fermentation. Les principaux producteurs mondiaux sont asiatiques. En Europe, le leader est incontestablement la société ORSAN dont la part sur le marché mondial est d'environ 10 %.

Notre travail s'insère dans cette préoccupation porte sur la valorisation de déchets de dattes pour la production d'acide glutamique à partir de *Corynebacterium glutamicum*.

Nous commencerons dans le chapitre I par une revue bibliographique présentant l'essentiel des connaissances sur d'une part, l'acide glutamique tels que son utilisation, les souches microbiennes productrices d'acide glutamique, les métabolismes ainsi que les différents procédés de production d'acide glutamique et d'autre part, la datte, sa composition et les différentes voies développées pour sa valorisation.

Le Matériel et Méthodes de ce mémoire seront décrits dans le chapitre II.

Le chapitre III Résultats et discussion, représente les objectifs de notre travail qui sont résumés en deux parties :

- Une première partie est consacrée à l'utilisation des sucres de jus de datte en tant que source de carbone pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262. Afin de diminuer les coûts liés à l'ajout de co-substrat, différentes sources azotées économiques seront testées, puis déterminer si une supplémentation en sels et en vitamines est nécessaire pour améliorer les performances de la fermentation.
- Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons à la production de l'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* sur sucres seuls et mélangés. Ceci nous permettra de nous renseigner sur le comportement de la souche sur les sucres de jus de datte. L'hydrolyse du saccharose du jus de datte par voie enzymatique sera également testée afin d'améliorer les performances de la fermentation glutamique.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale concernant l'ensemble de ce travail et permettant de le placer dans la problématique à laquelle il se raccroche et en laissant entrevoir les perspectives aux quelles il pourrait donner lieu.

CHAPITRE I.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. LA PRODUCTION D'ACIDE GLUTAMIQUE

I.1.1. Fermentation glutamique

I.1.1.1. Historique et importance industrielle de la fermentation glutamique

I.1.1.1.1. Historique de la production de glutamate

Depuis la découverte de la propriété de renforcement du goût UMAMI par le glutamate, le besoin de glutamate dans le domaine agroalimentaire a rapidement augmenté. La production de glutamate par hydrolyse de protéines végétales, a débuté en 1909 vint ensuite, la découverte de la production de glutamate par fermentation en utilisant du sucre et des sels d'ammonium (Kinoshita et *al.*, 1957). Depuis lors, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des performances de la fermentation glutamique par modification génétique de la souche bactérienne ou du procédé de fermentation.

I.1.1.1.2. Principaux producteurs de glutamate

Les principales sociétés productrices de glutamate sont les sociétés japonaises Ajinomoto, Kyowa Hakko Kogyo, Asahi Chemical, Takeda et Tanabe Seiyaku, la société coréenne Cheiljedang, la société américaine Stauffer Chemical et la société franco-belge ORSAN-Amylum (Burkovski et Kršmer, 2002 ; Eggeling et Sahm, 1999 ; Crueger et Crueger, 1984). La société ORSAN-Amylum représente environ 10 % de la production mondiale annuelle d'environ un million de tonnes.

I.1.1.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour la production de glutamate

Les Corynébactéries sont classées dans l'ordre des Actinomycétales. Les souches de corynébactéries utilisées industriellement ont généralement été isolées du sol et sont auxotrophes pour la biotine. Ce sont des souches aérobies, mésophiles puisque la température maximale de croissance se situe vers 35°C. Ces souches sont capables d'utiliser de nombreux substrats carbonés dont le lactate, l'acétate, le méthanol, le glucose, le fructose et le saccharose. Les souches industrielles présentent une faible activité α -cétoglutarate déshydrogénase mais présentent une activité glutamate déshydrogénase importante (Kinoshita et Nakayama, 1978). Les souches industrielles utilisées sont les suivantes : *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* et *Brevibacterium divaricatum*. Les différences entre les génomes de ces bactéries pouvant être considérées comme minimales, il a été proposé par certains auteurs de les réunir dans une seule et même espèce *Corynebacterium glutamicum* (Liebl et *al.*, 1991). La membrane externe de *Corynebacterium glutamicum* contient des acides mycoliques qui servent de barrière contre des agents externes aux cellules (Eggeling et Sahm, 2001 ; Marienfeld et *al.*, 1997 ; Collin et *al.*, 1982).

I.1.1.1.4. Utilisations du glutamate

L'acide glutamique est un acide aminé non essentiel utilisé principalement comme additif alimentaire sous forme Mono-Sodique Glutamate (MSG, E621). Il est employé comme exhausteur de goût et est considéré par les japonais comme étant à l'origine d'un 5^{ème} goût : le goût UMAMI. En Europe, la dose journalière admissible est de 0-120 mg / kg de poids corporel, alors que cette molécule est considérée comme additif non toxique au Japon, et son utilisation industrielle n'est pas donc régulée. L'acide glutamique est également utilisé, en beaucoup plus faible quantité, par les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

I.1.1.2. Procédés de production d'acide glutamique

Actuellement, la production de glutamate se fait industriellement par fermentation de type semi-continue. La quantité importante de sucre nécessaire à la synthèse de l'acide glutamique ne peut pas être ajoutée en début de culture car elle provoquerait à la fois une inhibition de la production par excès de substrat, et une production de tréhalose. Le procédé semi-continu permet donc de maintenir une concentration faible et non-limitante de glucose dans le réacteur.

Dans un premier temps, la source carbonée est utilisée pour la synthèse de la biomasse. Puis, et parce que l'acide glutamique n'est pas produit spontanément par les cellules, une contrainte est appliquée aux cellules de façon à leur faire excréter du glutamate (Figure I.1).

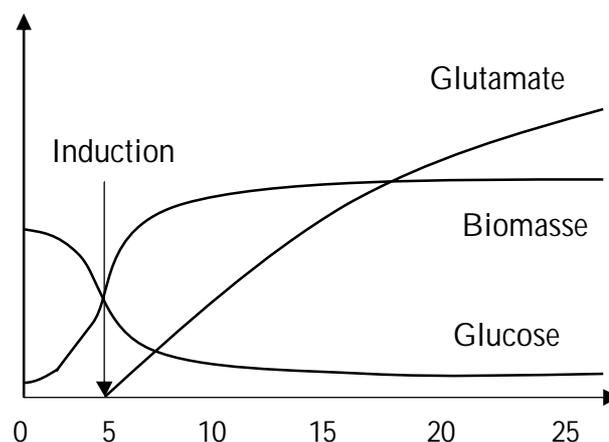


Figure I.1. Schéma global de la fermentation glutamique.

Les contraintes capables d'induire une production de glutamate par différents corynébactéries sont les suivantes :

I.1.1.2.1. Limitation en biotine

Chez *Corynebacterium glutamicum* la biotine intervient dans la synthèse des enzymes acétyl-CoA carboxylase et pyruvate carboxylase (Jšger et *al.*, 1996). La limitation en biotine pendant la fermentation glutamique provoque une réduction de la synthèse des phospholipides et une augmentation du rapport acide gras saturés/insaturés. Cette modification métabolique a donc été proposée pour permettre un basculement de la croissance vers la production de glutamate (Clément et Lanéelle, 1986 ; Clément et *al.*, 1984 ; Demain et Birnbaum, 1968 ; Shibukawa et Ohsawa, 1966). La limitation en biotine provoque également une inhibition de l'activité pyruvate carboxylase enzyme anaplérotique principale chez *Corynebacterium glutamicum* (Delaunay et *al.*, 1999b ; Peters-Wendisch et *al.*, 1997). La concentration optimale de biotine pour produire du glutamate par ce procédé se situe entre 2 et 5 µg/l (Tanaka et *al.*, 1960). En utilisant le glucose comme source de carbone, la concentration de glutamate en fin de fermentation par ce procédé est entre 10 et 70 g/l (Bona et Moser, 1997 ; Das et *al.*, 1995 ; Hoischen et *al.*, 1989 ; Kanzaki et *al.*, 1967 ; Takinami et *al.*, 1966). Ce procédé est limité par les matières premières contenant une concentration élevée en biotine comme les mélasses de canne ou de betterave.

I.1.1.2.2. Ajout de pénicilline

L'ajout de pénicilline ne modifie ni la teneur en acides gras ni la teneur en phospholipides membranaires, mais permet de produire du glutamate (Shibukawa et *al.*, 1968). L'agrandissement de la taille cellulaire a été observé pendant la production de glutamate par ce procédé (Shibukawa et *al.*, 1968). La pénicilline modifie l'enveloppe de *Corynebacterium glutamicum* en empêchant la synthèse du peptidoglycane qui détermine la forme de la bactérie (Wijayarathna et *al.*, 2001). Ce procédé a été proposé pour produire du glutamate tout en utilisant des matières premières riches en biotine (Sommerson et Philips, 1962). Des titres de glutamate en fin de fermentation de 20 à 40 g/l ont été obtenus par *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara et *al.*, 1997 ; Nunheimer et *al.*, 1970). En utilisant une souche productrice de lysine, *Brevibacterium lactofermentum* une concentration de 57 g/l de glutamate et de 75 g/l de lysine ont pu être produits simultanément en fermentation semi-continue (Shiratsuchi et *al.*, 1995).

I.1.1.2.3. Ajout de tensioactif

Dans un milieu riche en biotine, l'ajout de tensioactifs comme des acides gras saturés et des dérivés d'acides gras saturés permet d'excréter du glutamate (Duperray et *al.*, 1992 ; Takinami et *al.*, 1968 ; Takinami et *al.*, 1965). Une diminution des phospholipides cellulaires d'environ 50 % et l'augmentation du rapport acides gras saturés/insaturés ont été observées suivant l'ajout de tensioactif (Hucheq et *al.*, 1984). Il a été montré que l'ajout de tensioactif réprime l'expression d'un gène *dtsR* codant pour une protéine qui peut être une sous-unité du complexe participant à la synthèse des acides gras, ce qui provoque par la suite la modification de la synthèse de phospholipides (Kimura et *al.*, 1996). Utilisant la mélasse de betterave dans le milieu de culture, l'ajout de la polyéthyléneglycol stéarate, polyéthyléneglycol palmitate, ou laurylamine permet d'obtenir un titre de glutamate entre 80 et 100 g/l en fin de fermentation (Marquet et *al.*, 1986). Une production de 80 g/l de glutamate a également été atteinte en utilisant du polyoxyéthylénesorbitane mono palmitate comme tensioactif et en augmentant la température de culture de 34 à 39°C (Goergen et *al.*, 1997).

I.1.1.2.4. Choc de température

Un choc de température entraîne une modification de la composition de la membrane chez *Corynebacterium glutamicum* par activation de la biosynthèse des acides gras saturés et inactivation de la biosynthèse des acides insaturés (Gourdon, 1999 ; Stuible et *al.*, 1997 ; Stuible et *al.*, 1996 ; Kawaguchi et *al.*, 1979). Un mutant sensible à la température a été obtenu par l'inactivation du gène *ltsA*, dont le rôle reste encore inconnu (Hirasawa et *al.*, 2001 ; Hirasawa et *al.*, 2000). L'agrandissement de la taille cellulaire de ce mutant a été observé lors de ce choc de température (Hirasawa et *al.*, 2001). Ceci suggère que la température affecte le réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane qui détermine la morphologie cellulaire. Chez *Escherichia coli*, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la fluidité membranaire (Mejia et *al.*, 1999), mais aucune donnée n'est disponible concernant la modification de la fluidité chez *Corynebacterium glutamicum* après le choc de température. Un titre de 20 à 85 g/l de glutamate a été produit par l'utilisation de ce procédé et d'un milieu riche en biotine (Delaunay et *al.*, 1999a ; Sun et *al.*, 1989 ; Momose et *al.*, 1978).

I.1.1.2.5. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides

Le glutamate peut être produit en utilisant un mutant auxotrophe pour l'acide oléique dans un milieu riche en biotine quant l'acide oléique dans le milieu devient limitant (Kitano et *al.*, 1972 ; Kanzaki et *al.*, 1967). Une concentration de 100 g/l a été atteinte avec du glucose comme source carbonée (Miesscher et *al.*, 1975). L'ajout de cérulenine permet de produire du glutamate car la cérulenine inhibe

l'activité de l'enzyme de condensation nécessaire pour la synthèse d'acide gras (Hoischen et Kršmer, 1990 ; Funabashi et *al.*, 1989). Il a été montré que l'inhibition totale de l'expression du gène *dtoR*, codant probablement une sous-unité du complexe responsable de la synthèse des acides gras, permettait de produire du glutamate (Kimura et *al.*, 1999). Basé sur ce concept, Nampoothiri et *al.* (2002) ont modifié des voies de biosynthèse des phospholipides de *Corynebacterium glutamicum* : les mutants obtenus montrent des sensibilités différentes vis-à-vis des agents inducteurs de la production de glutamate comparé à la souche parentale.

I.1.1.3. Paramètres importants de la fermentation glutamique

I.1.1.3.1. Température

La température optimale de culture se situe entre 28 et 39°C pour la phase de croissance et la phase de d'excrétion pour la plupart des souches productrices de glutamate (Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978). Cependant, l'augmentation de la température à 39°C pendant la phase de production de glutamate permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et de maintenir l'excrétion d'acide glutamique (Delaunay et *al.*, 2002 ; Goergen et *al.*, 1997).

I.1.1.3.2. pH

La valeur optimale du pH du milieu de culture lors de la croissance et la phase de production de glutamate se situe entre 7 et 8 (Kinoshita et Nakayama, 1978). L'ajout d'ammoniaque ou d'urée permet de corriger le pH et supplémenter la culture en source d'azote pendant la phase de production de glutamate.

I.1.1.3.3. Oxygène

L'oxygène représente un élément essentiel lors des procédés aérobies. La limitation en oxygène pendant la croissance provoque l'accumulation de lactate, de succinate et d'acétate (Dominguez et *al.*, 1993). Pendant la phase de production de glutamate, la limitation en oxygène chez *Corynebacterium glutamicum* provoque une perte du rendement de conversion de glucose en glutamate en produisant du lactate et succinate (Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978). Par contre, trop d'oxygène provoque également une perte de ce rendement en produisant de l'•-cétoglutarate (Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978) : l'intervalle optimum pour la production de glutamate se situe entre 0,007 et 7 mg/l (Hirose et Okada, 1979).

I.1.1.3.4. Composition du milieu

I.1.1.3.4.1. Glycine bétaine

La glycine bétaine est un composé présent en grande quantité dans la mélasse de betterave utilisée pour la production industrielle de glutamate. Elle joue un rôle osmoprotecteur pour les bactéries cultivées sur des milieux à forte pression osmotique. En effet, en présence de pressions osmotiques élevées, les cellules accumulent cet osmoprotecteur (Kawahara et *al.*, 1990).

I.1.1.3.4.2. Pression osmotique

Les mélasses de betterave utilisées pour la production du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* présentent une forte concentration en sels. Lors de la fermentation, l'alimentation en mélasse, la synthèse du glutamate et l'accumulation des ions ammonium utilisés pour régler le pH contribuent à l'augmentation de la pression osmotique. Il a été montré que la pression osmotique avait un impact négatif sur la production de glutamate (Lapujade, 2000). Cependant, une valeur de pression osmotique de 1,2 osmol/kg au début de la phase de production de glutamate est nécessaire pour atteindre la production optimale de glutamate (Debay, 1997 ; Goergen et *al.*, 1997).

I.1.1.3.4.3. Chélateur de fer

Les corynébactéries nécessitent un chélateur de fer afin de transporter à l'intérieur des cellules les ions ferriques nécessaires à la croissance. Ce composant peut être remplacé par le produit dégradé du glucose par autoclavage (Nakayama et *al.*, 1964), l'ajout de citrate (Von der Osten et *al.*, 1989b) ou par l'ajout de certains hydroxyphénols comme le catéchol et le protocatéchuate (Liebl et *al.*, 1989).

I.1.2. Métabolisme central des corynébactéries

Le métabolisme cellulaire forme un réseau de quelques deux milles réactions biochimiques. Il peut être subdivisé en voies métaboliques, présentant chacune une grande fonction de catabolisme ou de synthèse pour la cellule : production d'énergie, synthèse de protéines, d'acides gras ... Ce réseau, très dense, possède de nombreux points de connexion entre les différents voies et de nombreux sites de régulation afin d'optimiser le métabolisme cellulaire. Une partie de ce réseau biochimique, appelé métabolisme central, est commun à toutes les cellules microbiennes et constitue le point de départ de toutes les autres voies de biosynthèse. Seules la nature même des enzymes ou les régulations intervenant dans ce métabolisme commun peuvent différer d'un organisme à l'autre, voire d'une souche à l'autre. Un schéma simplifié du métabolisme central à partir du glucose, fructose et saccharose est présenté (Figure I.2), avec deux objectifs principaux :

- Faire le point sur les connaissances relatives au métabolisme central, en particulier chez les Corynébactéries.
- Mettre l'accent sur les points de controverse, en particulier les modes d'entrées du glucose, du fructose et du saccharose dans la cellule, l'existence *in vivo* de certaines voies métaboliques (voies anaplérotiques).

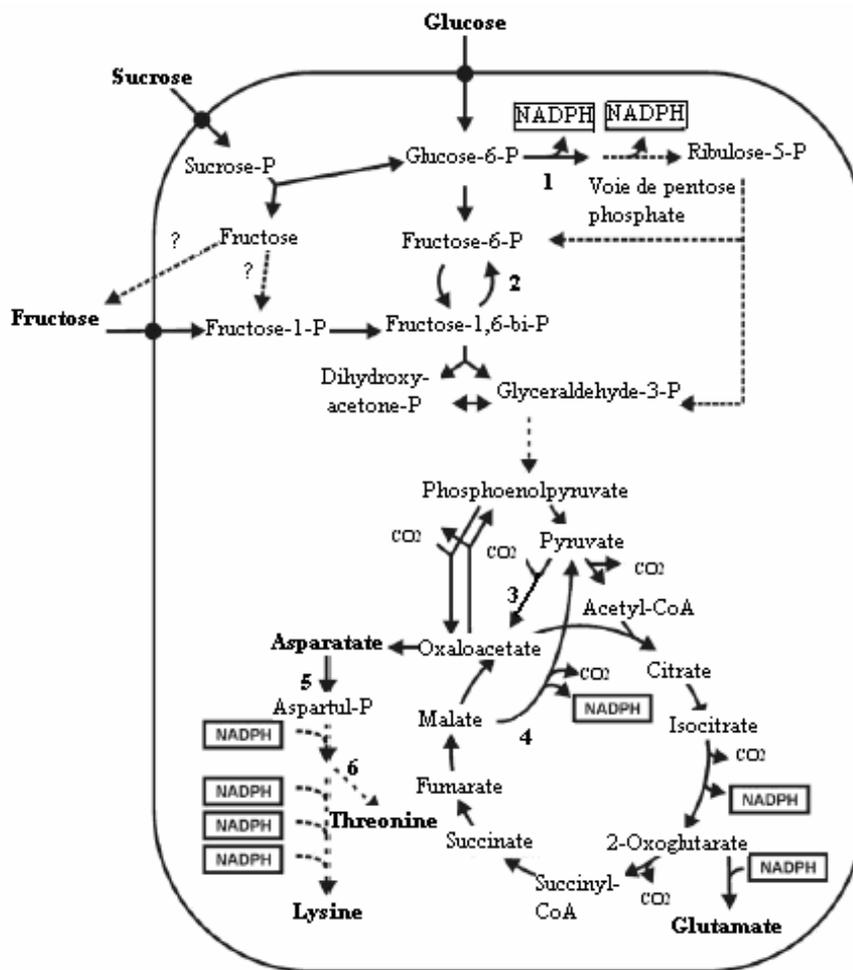


Figure I.2. Représentation schématique du métabolisme central de carbone chez *Corynebacterium glutamicum*. Les voies et les réactions enzymatiques sont indiquées pour le glucose, le fructose et le saccharose, pour la glycolyse, voie de pentose phosphate et cycle de krebs et pour la synthèse de glutamate et la lysine. Enzymes : glucose-6-phosphatase (1), fructose-1,6-biphosphatase (2), pyruvate carboxylase (3), enzyme malique (4), aspartokinase (5), homoserine déshydrogénase (6) (Tobias et *al.*, 2005).

I.1.2.1. Entrée des sucres

Deux mécanismes d'entrée des sucres ont été mis en évidence chez *Brevibacterium flavum* et *Corynebacterium glutamicum* : entrée par le système phosphotransférasique (PTS) et entrée par le système perméase (SP) (Figure I.3) (Mori et Shii, 1987).

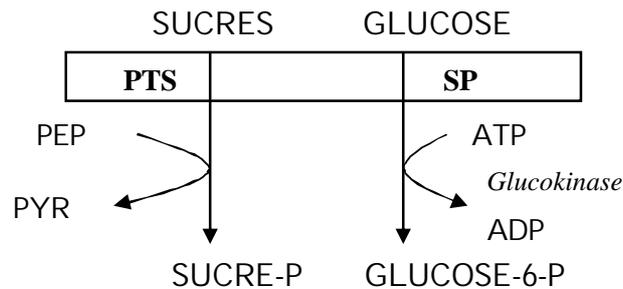


Figure I.3. Entrée des sucres chez *Corynebacterium glutamicum* (Mori et Shii, 1987). Phosphoénolpyruvate (PEP) ; Pyruvate (PYR).

Il existe différents types de système PTS, en fonction de leur structure multienzymatique, mais surtout de leur spécificité vis-à-vis de substrat (Korberg, 1992) :

- un PTS-glucose ou PTS-manose, constitutif, qui présente également une forte affinité pour le glucose, la glucosamine et le 2-déoxyglucose.
- un PTS-fructose, inducible par le fructose, réprimé par le glucose, utilisé également pour le xylitol. Il présente par ailleurs une faible affinité pour le glucose,
- un PTS spécifique pour le saccharose.

Ces PTS permettent d'assimiler différents sucres en consommant une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) ; cette réaction génère du sucre-phosphate et du pyruvate.

Chez les corynébactéries, les études ont principalement été menées chez *Brevibacterium flavum* (Figure I.4). L'existence d'un PTS-glucose phosphorylant le glucose en position 6 a été montrée par Mori et Shii (1987). Ces auteurs ont également mis en évidence un PTS-fructose avec phosphorylation en position 1 (Sugimoto et Shii, 1989a). Le fructose 1-phosphate rejoint ensuite la glycolyse via le fructose 1,6-bisphosphate. Shii et *al.* (1990) ont finalement montré la présence d'un PTS-saccharose phosphorylant le saccharose en position 6 du glucose. L'hydrolyse qui suit libère ainsi du glucose-6-phosphate et du fructose. Le fructose peut être phosphorylé par le PTS-fructose puis dégradé via la glycolyse. Des études cinétiques menées sur le PTS-glucose chez *Brevibacterium flavum* montrent, entre autres, une vitesse spécifique maximale d'entrée du glucose dans la cellule de 29 à 41 mmol.min⁻¹.mg⁻¹ de cellules (Sugimoto et Shii, 1989a).

Certains SP telle que le glucose perméase et la maltose perméase sont présents, alors que le fructose perméase est absent (Sugimoto et Shii, 1989a ; Mori et Shii, 1987). Le SP peut représenter 15 % du

flux total d'entrée des sucres en croissance rapide, mais en faible croissance le PTS seul peut suffisamment maintenir l'entrée de glucose (Cocaign *et al.*, 1996). Le mutant SP-négatif se multiplie plus lentement par rapport à la souche parentale. Par contre, le mutant SP-amplifié ne montre aucune différence de croissance de souche sauvage car la souche sauvage présente une activité suffisante de la SP (Park *et al.*, 2000). Ceci signifie que l'activité SP est nécessaire pour une croissance rapide des bactéries.

L'entrée de sucre n'est donc pas limitante pendant la croissance. Une production de tréhalose en fin de production de glutamate a été mise en évidence en procédé semi-continu (Delaunay *et al.*, 1999).

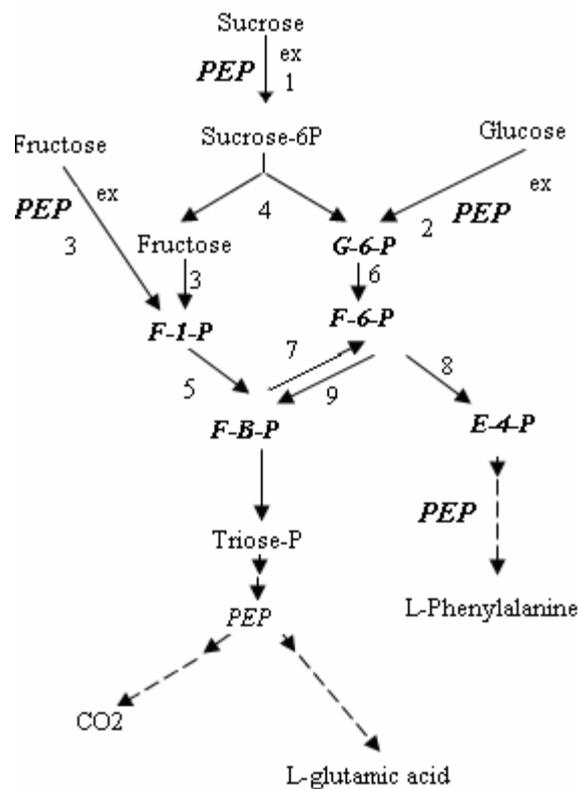


Figure 1.4. Assimilation du glucose, du fructose et du saccharose par le système phosphotransférase chez les Corynébactéries (Mori et Shii. 1987b).

1, PTS-saccharose ; 2, PTS-glucose ; 3, PTS-fructose; 4, Hydrolase ; 5, 1-Phosphofruktokinase (1-PFK); 6, Phosphoglucoisomérase (PGI) ; 7, Fructose 1,6 bisphosphatase (FBP) ; 8, Transcétolase ; 9, 6-Phosphofruktokinase (6PFK) ; E-4-P, érythrose-4-phosphate ; ex, extracellulaire.

I.1.2.2. La glycolyse

La glycolyse est la voie énergétique qui catabolise le glucose-6-phosphate (G-6-P) en pyruvate, libérant ATP et de NADH. Elle est schématisée sur la Figure I.5, avec les enzymes qui s'y rapportent. Les points de communication majeurs avec le reste du métabolisme sont également indiqués. Il s'agit en particulier du G-6-P qui marque le départ de la voie des pentoses phosphates (synthèse des nucléotides et des acides aminés aromatiques), le fructose-6-phosphate (F-6-P) est le GAP qui en sont la sortie, le PEP, point de départ de la voie anaplérotique de la PEP carboxylase et de l'enzyme malique. La glycolyse permet donc l'acheminement du glucose vers les voies de synthèse et vers la production d'énergie. Elle doit être strictement régulée, ce qui est possible en particulier au niveau des deux réactions irréversibles de la phosphofructokinase et de la pyruvate kinase.

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer la répartition du flux carboné entre la voie de la glycolyse et la voie des hexoses monophosphates pendant la croissance et la production de glutamate. Pendant la croissance des corynébactéries, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse est d'environ 50 %, le reste passant par la voie des hexoses monophosphates (Wendisch et *al.*, 2000 ; Gourdon, 1999 ; Dominguez et *al.*, 1998 ; Rollin et *al.*, 1995). Cependant, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse augmente rapidement lorsque les cellules sont en condition de production de glutamate (Gourdon, 1999 ; Sonntag et *al.*, 1995). Cette modification peut être expliquée par la diminution du besoin en NADPH, érythrose-4-phosphate et ribose-5-phosphate nécessaire pour la synthèse des acides aminés aromatiques et des nucléotides, conséquence d'une croissance ralentie pendant la phase de production de glutamate. En revanche, une proportion élevée du flux carboné est dirigée vers la voie de l'hexose monophosphate pendant la production de lysine, car la synthèse de la lysine nécessite également une quantité importante de NADPH.

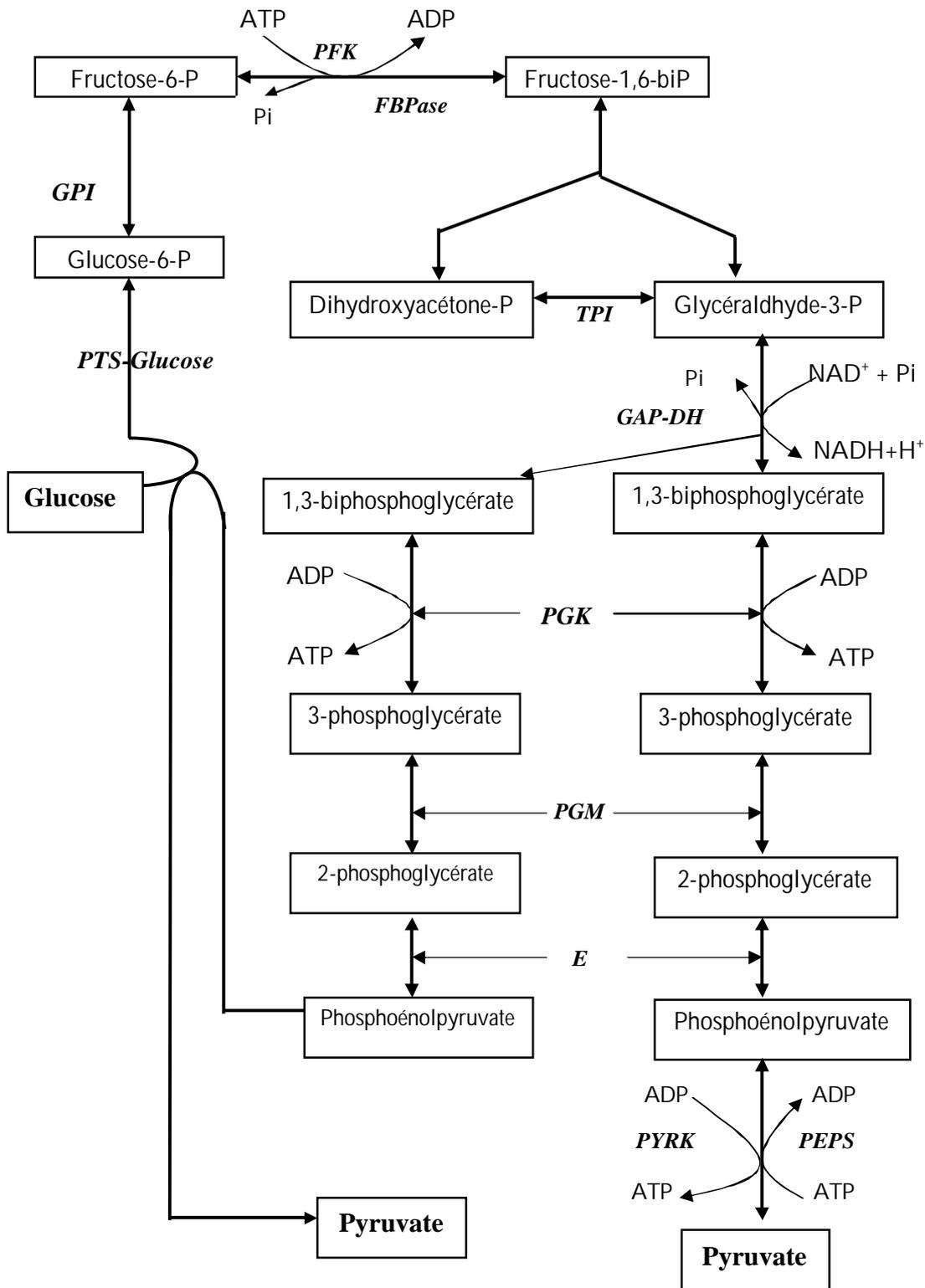


Figure I.5. Voies de glycolyse chez *Corynebacterium glutamicum* : glucose-6-phosphate isomérase (*GPI*), fructose biphosphatase (*FBPase*), 6-phosphofructokinase (*PFK*), fructose-1,6-biphosphatase (*FBPA*), triose phosphate isomérase (*TPI*), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAP-DH*), 3-phosphoglycérate kinase (*PGK*), phosphoglycérate mutase (*PGM*), enolase (*E*), pyruvate kinase (*PYRK*) et PEP synthétase (*PEPS*) (Dominguez et al., 1998).

La glucose-6-phosphate isomérase (GPI), qui catalyse de façon réversible la transformation du G-6-P en F-6-P, a été partiellement purifiée et caractérisée chez *Brevibacterium flavum* (Sugimoto et Shio, 1989b). Elle présente une constante de Monod (k_m) de 1,4 mM pour le glucose-6-phosphate et de 0,54 mM pour le fructose-6-phosphate. Elle est inhibée par l'érythrose-4-phosphate. La 6-phosphofructokinase qui catalyse de façon irréversible la transformation du fructose-1,6-biphosphate à partir de F-6-P, possède un (k_m) de 2,4 mM et de 0,15 mM pour respectivement le F-6-P et l'ATP chez *Brevibacterium flavum*. Elle est inhibée par l'ADP ($K_i = 0,45$ mM) (Sugimoto et Shio, 1989a). La fructose biphosphatase (FBPase) qui catalyse la réaction irréversible inverse de la PFK, a été partiellement purifiée (Shio et *al.*, 1990 ; Sugimoto et Shio, 1989b). Elle est inhibée par l'AMP. Le gène de la fructose-1,6-biphosphate aldolase (FBPA) de *Corynebacterium glutamicum* a été séquencé (Von der Osten et *al.*, 1989a), il présente une homologie avec la FBPA de *Escherichia coli*.

I.1.2.3. Voies des pentoses phosphates

La voie de pentoses phosphates, encore appelée voie de l'hexose monophosphate, est une série de réactions biochimiques interagissant avec la glycolyse à trois niveaux : G-6-P, F-6-P et GAP.

La voie de pentoses phosphates a été mise en évidence chez *Brevibacterium flavum* (Shio et *al.*, 1960) (Figure I.6). Cette voie permet de synthétiser des précurseurs (NADPH, ribose-5-phosphate, érythrose-4-phosphate, fructose-6-phosphate, glycéraldhyde-3-phosphate et CO_2) nécessaires à la synthèse de l'histidine, des lipides, des acides nucléiques et acides aminés aromatiques.

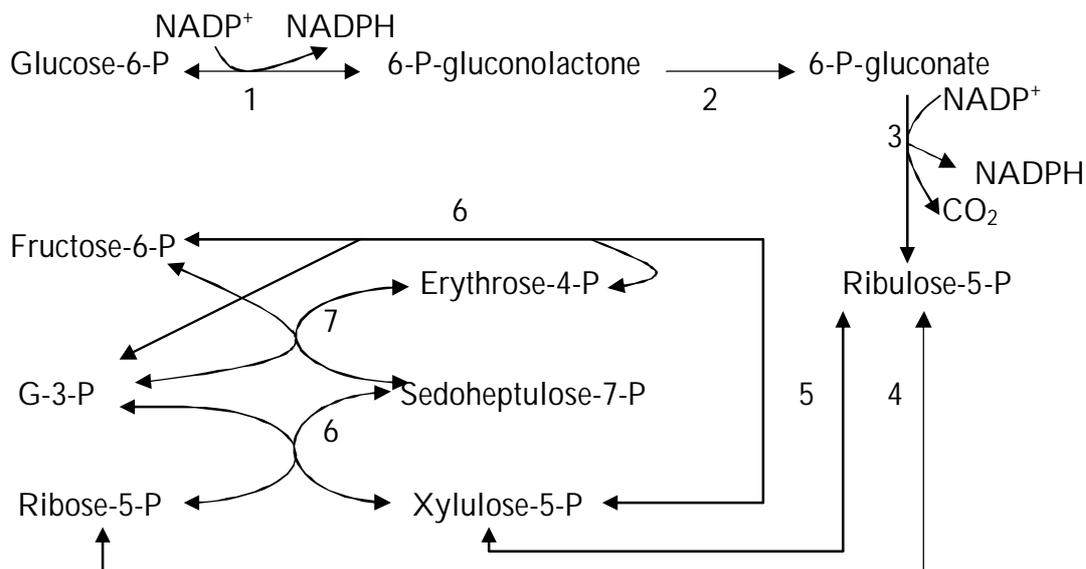


Figure I.6. Voies des pentoses phosphates chez *Corynebacterium glutamicum* : glucose-6-phosphate déshydrogénase (1), lactonase (2), 6-phosphogluconate déshydrogénase (3), ribose-5P isomérase (4), ribose-5P épimérase (5), transacétolase (6) et transaldolase (7) (Shio et *al.*, 1960).

I.1.2.4. Voies anaplérotiques chez *Corynebacterium glutamicum*

Les voies anaplérotiques sont très nombreuses chez les corynébactéries : la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), la pyruvate carboxylase, l'enzyme malique, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPK), l'oxaloacétate décarboxylase et le shunt glyoxylique. Les voies anaplérotiques permettent soit d'alimenter le cycle de krebs avec l'oxaloacétate soit d'apporter le pyruvate ou le PEP pendant la néoglucogenèse (Figure I.7).

La PEPC est une enzyme qui catalyse la conversion irréversible du phosphoénolpyruvate en oxaloacétate avec fixation d'un CO₂ et libération d'un Pi. Son rôle est de fournir de l'oxaloacétate au cycle de krebs.

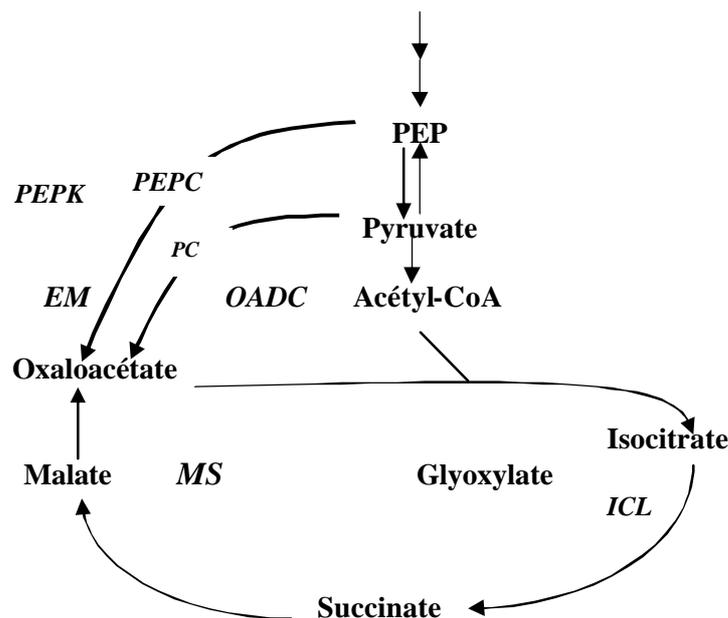


Figure I.7. Voies anaplérotiques chez *Corynebacterium glutamicum* : **PEPC** : phosphoénolpyruvate carboxylase, **PEPK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase, **PC** : pyruvate carboxylase, **EM** : enzyme malique, **OADC** : oxaloacétate décarboxylase, **ICL** : isocitrate lyase **MS** : malate synthase.

Chez *Corynebacterium glutamicum* cette enzyme est activée par l'acétyl-CoA, le fructose 1,6-biphosphate et les ions divalents Mn²⁺ et Mg²⁺. Le pH optimum de cette enzyme est entre 7,2 et 8 (Mori et Shii, 1985a et 1985b). L'acétyl-CoA et le fructose 1,6-biphosphate activent la PEPC en diminuant le (Km) pour le PEP (Jetten et *al.*, 1994). Elle est inhibée par des intermédiaires du cycle de krebs tel que le citrate, l'isocitrate, le succinate le fumarate et le malate (Ozaki et Shii, 1969). L'aspartate et le glutamate répriment la PEPC (Shii et Ujigawa, 1978). Chez *Corynebacterium glutamicum*, l'amplification de la PEPC n'augmente pas la production de glutamate (Delaunay, 1999).

Ceci suggère donc que cette enzyme présente un rôle mineur pour approvisionner le cycle de krebs (Delaunay, 1999).

La PEPK catalyse la conversion réversible du PEP en oxaloacétate. La pyruvate carboxylase (PC) est une enzyme catalysant la conversion réversible du pyruvate en oxaloacétate avec fixation d'un CO₂ et libération d'un Pi. L'enzyme malique (EM) catalyse la décarboxylation réversible du malate en pyruvate avec une libération d'un coenzyme réduit NADP. L'oxaloacétate décarboxylase (OADC) est responsable de la décarboxylation irréversible de l'oxaloacétate en pyruvate. Le shunt glyoxylique permet de remplir le cycle de krebs avec des molécules à 4 atomes de carbone à partir de d'acétyl-CoA grâce à l'isocitrate lyase (ICL) et la malate synthase (MS).

I.1.2.5. Voie de biosynthèse du glutamate

Le glutamate est un acide aminé clé du métabolisme cellulaire. Il peut être incorporé dans les protéines, mais il sert également de substrat à la synthèse d'autres acides aminés (glutamine, proline) et de donneur de groupement ammonium (aspartate, lysine ...). La biosynthèse du glutamate à partir du glucose s'effectue via la glycolyse puis le cycle de krebs jusqu'à l'•-cétoglutarate. Ce dernier peut ensuite être utilisé par différentes enzymes pour former le glutamate. Chez les microorganismes, cinq réactions biochimiques peuvent conduire au glutamate:

1- La glutamate déshydrogénase (GDH):



Le glutamate réprime et inhibe la glutamate déshydrogénase dans la réaction de la formation de glutamate, or le NADP⁺ inhibe légèrement l'enzyme (Ertan, 1992 ; Shiio et Ujigawa, 1978).

2- La glutamine amide 2-oxoglutarate amino- transférase (GOGAT) ou glutamate synthase:



Or la synthèse de glutamate via la GOGAT requiert la participation d'une activité glutamine synthétase (GS): $\text{glutamate} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{glutamine} + \text{ADP} + \text{Pi}$.

Le bilan des activités GS/GOGAT conduit donc à:



La GS est inhibée par la glycine, l'alanine, la sérine, l'aspartate, l'ADP, l'AMP (Sung et al., 1984). La GOGAT n'est pas inhibée par le glutamate, mais elle est légèrement inhibée par le NADP⁺ (Ertan, 1992). Une diminution de la synthèse de la GS/GOGAT a été mise en évidence chez *Corynebacterium glutamicum* lorsque la concentration d'ammonium augmente dans le milieu de culture (Schulz et al., 2001 ; Tesch et al., 1998). En conséquence, en fermentation glutamique en présence de forte concentration en ions NH₄⁺, l'activité GDH est l'activité majoritairement responsable de la synthèse de glutamate. Ces trois enzymes ont été mises en évidence et partiellement caractérisées chez

Corynebacterium glutamicum et *Brevibacterium flavum* et *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992 ; Sung et al., 1984) (Figure I.8).

3- Les transaminases :

- cétoglutarate + acide aminé à glutamate + acide cétonique.

4- La glutaminase : glutamine à glutamate + NH_4^+ .

5- Diverses activités enzymatiques de dégradation des acides aminés (proline, arginine, histidine).

Les trois premières activités enzymatiques sont plus ou moins importantes selon les espèces bactériennes, et les deux dernières sont généralement considérées comme voies de sauvetage qui ne sont pas utilisées par la cellule dans des conditions normales. Chez *Bacillus megaterium*, seul la GOGAT semble intervenir dans la synthèse du glutamate (Meers et al., 1970), mais la plupart des microorganismes semblent posséder à la fois les activités GDH et GOGAT. C'est le cas de *Escherichia coli* (Ankri, 1991), mais aussi de *Brevibacterium flavum* (Sung et al., 1984) et de *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992). Sung et al., (1984) ont mesuré les trois activités enzymatiques GDH, GS/GOGAT et transaminases à partir d'extraits bruts de *Brevibacterium flavum* et il apparaît que la GS est largement plus active que la GOGAT et GDH.

L'étude des flux carboné a montré que 72 % du glutamate est synthétisé à l'aide de la GDH et 28 % avec la GS/GOGAT chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC-12032 (Tesh et al., 1999).

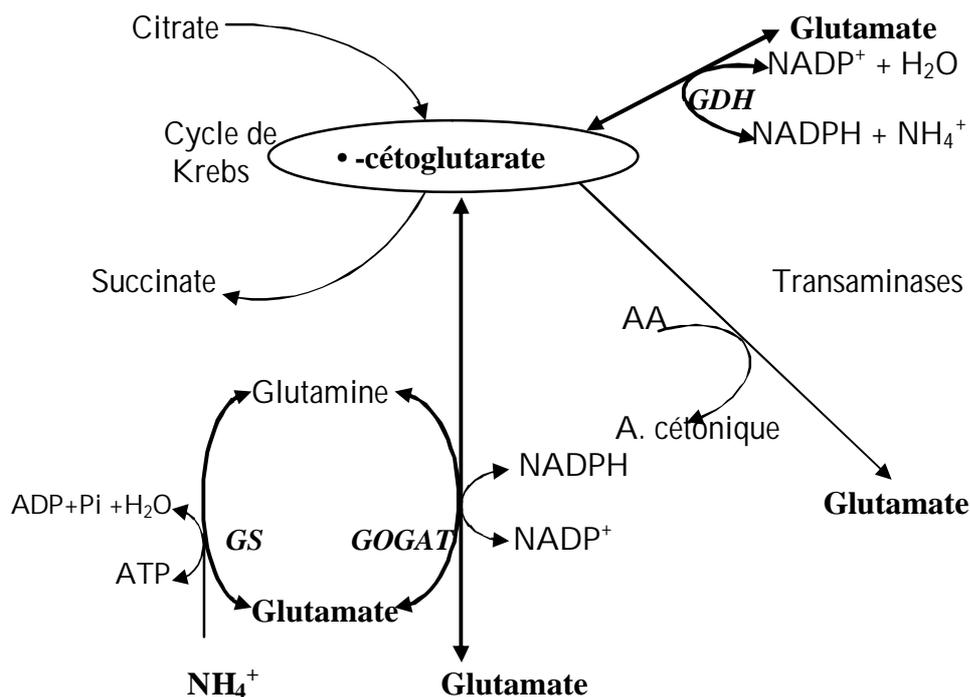


Figure I.8. Voies de biosynthèse du glutamate: AA: acide aminé, **GDH**: glutamate déshydrogénase, **GS**: glutamine synthétase, **GOGAT**: glutamine amide •-cétoglutarate amino transférase (Ertan, 1992).

I.1.3. Excrétion des acides aminés chez *Corynebacterium glutamicum*

I.1.3.1. Système d'export des acides aminés

Le système d'export et d'import des acides aminés est différent chez les cellules étudiées. Nous allons donc aborder ici uniquement l'excrétion des acides aminés par *Corynebacterium glutamicum*. De nombreux systèmes d'excrétion des acides aminés ont été identifiés ces dernières années (Figure I.9) (Karšmer, 1994) ; (Figure I.10) (Eggeling et Sahm, 2003).

Système de transport	Mécanisme	Force motrice	Réversibilité
Diffusion	Simple	← S	Gradient chimique (soluté neutre)
	Par port	← S	
Transport Secondaire	Uniport	← S	Somme des gradients électriques et chimiques des solutés
	Symport	← S ← X	
	Antiport	← S → S	
Transport primaire	X ATP ADP	← S	•nergie libre de la réaction chimique

Figure I.9. Mécanisme de transport des acides aminés (Karšmer, 1994).

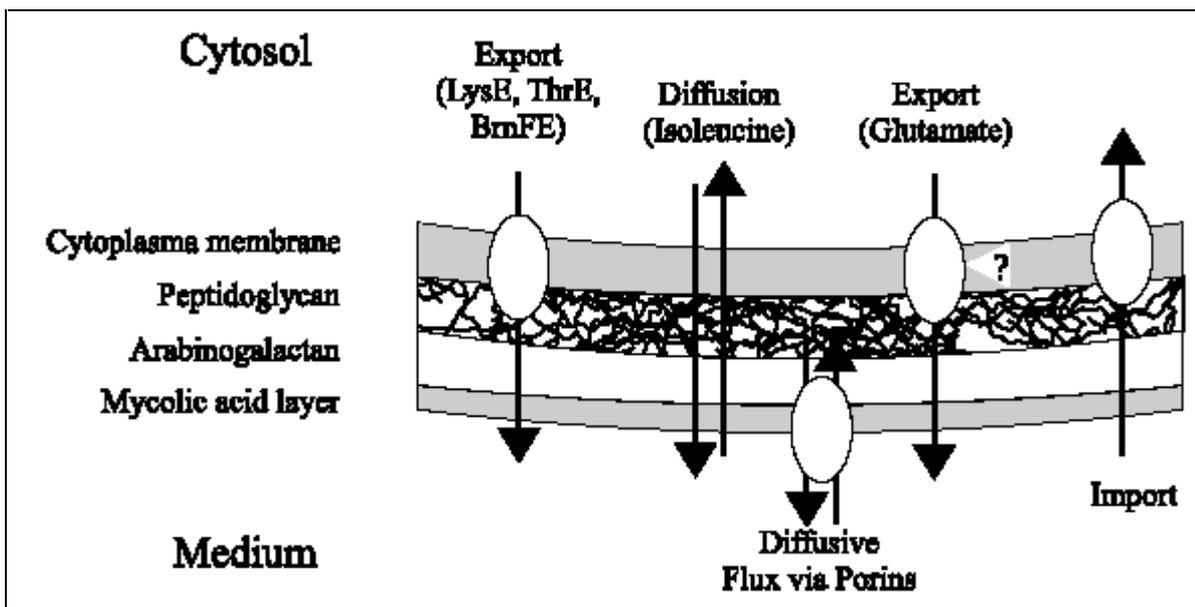


Figure I.10. Flux des acides aminés via la paroi cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* (Eggeling et Sahm, 2003).

Les acides aminés sont sécrétés par la diffusion simple ou/et par un transporteur spécifique (Karšmer, 1994; Bršer et Karšmer, 1991a). L'activation de l'excrétion par diffusion est dépendante du gradient de la concentration entre les compartiments intérieur et extérieur de la cellule, les propriétés physico-chimiques du soluté telles que la taille, l'hydrophobicité et la charge aussi que des propriétés de la membrane (la composition et la fluidité). Dans le cas de transport actif, une source d'énergie (ATP, force protomotrice) est nécessaire et ce d'autant plus que le soluté est chargé.

Afin d'activer l'excrétion d'une molécule, il peut être préalablement nécessaire d'augmenter sa concentration à l'intérieur des cellules. Ceci peut être réalisé par génie métabolique, par augmentation des voies de biosynthèse, par l'altération du système de régulation et par l'arrêt ou l'atténuation des voies de dégradation de la molécule. Une autre possibilité consiste à limiter la croissance cellulaire de façon à favoriser l'utilisation de la source carbonée pour la synthèse de la molécule et non pour la croissance.

Il est, des fois, nécessaire de modifier la propriété de la membrane pour que le soluté puisse la traverser. Cette modification peut concerner les propriétés physico-chimiques de la membrane, la force protomotrice au travers de cette membrane et le transporteur s'il existe.

Certains acides aminés sont excrétés par un transporteur qui nécessite de l'énergie. Ceci permet aux cellules d'excréter cet acide aminé contre le gradient de concentration. Dans ces conditions, il est nécessaire d'augmenter la capacité de biosynthèse de l'énergie.

I.1.3.1.1. Excrétion de glutamate

Le glutamate est un acide aminé à chaîne courte, il est chargé négativement lorsqu'il se trouve dans le milieu intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum*. Sa chaîne montre une faible hydrophobicité, se qui ne lui permet pas de diffuser facilement dans un milieu lipidique comme les membranes. Des études ont montré que l'étape d'excrétion du glutamate est limitante dans le processus de production du glutamate (Lapujade et *al.*, 1999).

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des facteurs déclenchant et modulant l'excrétion de glutamate. Afin de comprendre le mécanisme de l'excrétion de glutamate, les paramètres ci-dessous ont été étudiés pendant la croissance et la production de glutamate induite par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif ou de pénicilline ou un choc de température.

I.1.3.1.1.1. Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate

La concentration de glutamate intracellulaire diminue pendant la phase de production de glutamate et l'excrétion de glutamate a lieu, bien que la concentration de glutamate intracellulaire soit inférieure à celle du milieu de culture (Lapujade et *al.*, 1999 ; Hoischen et Kršmer, 1989). Ce résultat exclut donc

l'hypothèse de Domain et Bimbaum (1968) qui suggérait que l'excrétion de glutamate soit réalisée par diffusion.

I.1.3.1.1.2. Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate

Lorsque l'excrétion de glutamate est faite contre son gradient, il est donc nécessaire de déterminer la force protomotrice ou force électrochimique. La force protomotrice ($\dot{Y}P$) dépend du potentiel membranaire et du gradient de pH et est calculée par la formule suivant:

$$\dot{Y}P = \dot{Y}^a - (2.3 R.T/F).\dot{Y}pH$$

Où (\dot{Y}^a) est le potentiel membranaire, $\dot{Y}pH = pH_{in} - pH_{ext}$ gradient du pH entre le compartiment intracellulaire et le milieu de culture, (R) la constante des gaz parfait, (T) la température absolue (°K) et (F) la constante de Faraday.

Cependant, le $\dot{Y}pH$ ne semble pas des facteurs importants pour l'excrétion de glutamate (Daran-Lapujade et *al.*, 2003 ; Debay, 1996 ; Duperray et *al.*, 1992). Le potentiel membranaire est le gradient du potentiel électrique entre le milieu intérieur et extérieur des cellules. Il dépend principalement du gradient de concentration des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Ce gradient est dépendant des pompes ioniques membranaires mises en route par l'activité métabolique. La mesure du potentiel membranaire peut être réalisée à l'aide du partage de part et d'autre de la membrane de molécules chargées. A partir des concentrations extracellulaires et intracellulaires de cette molécule chargée, le potentiel membranaire peut être calculé par l'équation de Nernst :

$$C_{int} / C_{ext} = e^{-n. \dot{Y}^a . F/R.T}$$

Où (\dot{Y}^a) est le potentiel membranaire, (F) la constante de Faraday, (C_{int}) la concentration intracellulaire de la molécule, (R) la constante des gaz parfaits, (C_{ext}) la concentration extracellulaire de la molécule et (T) la température absolue (°K).

Les molécules chargées utilisées pour mesurer le potentiel membranaire peuvent être des ions organiques synthétiques lipophiles, radioactifs. La mesure du potentiel membranaire est réalisée par la détermination de la concentration intracellulaire de la sonde. Plus récemment, des sondes fluorescentes également lipophiles cationiques (rhodamine 123 ou cyanines) et anionique (oxonols) ont été utilisées pour une mesure par cytométrie en flux du potentiel membranaire.

Lors de mesure pendant la croissance et la production du glutamate, le potentiel membranaire atteint sa valeur maximale lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance et diminue fortement pendant la phase de production du glutamate (Lapujade, 1999 ; Debay, 1997 ; Duperray et *al.*, 1992). Lorsque la production du glutamate est induite par la température, le potentiel membranaire diminue avec l'augmentation de la température de culture comprise entre 33 et 41°C, alors que la vitesse spécifique de la production de glutamate augmente avec l'augmentation de la température (Lapujade,

1999). Ceci favorise l'hypothèse que la chute de potentiel membranaire est impliquée dans la production de glutamate. Toutefois, quand le potentiel membranaire des cellules productrices est artificiellement modifié, la production de glutamate n'est pas affectée (Duperray et *al.*, 1992 ; Gutmann et *al.*, 1992). Ceci signifie que le potentiel membranaire n'est pas un paramètre important lors de l'excrétion de glutamate, sa modification au cours de la phase de production serait due qu'une détérioration de l'état physiologie cellulaire.

I.1.3.1.1.3. Energie cellulaire

L'importance de l'énergie cellulaire a été étudiée pendant la phase de production du glutamate par *Corynebacterium glutamicum*. Il est apparu que l'exporteur de glutamate requiert de l'ATP puisque lorsque le pool d'ATP diminue, l'excrétion de glutamate est arrêtée (Sekine et *al.*, 2001 ; Gutmann et *al.*, 1992).

I.1.3.1.1.4. Composition de la membrane plasmique

Des études anciennes ont proposé que l'excrétion de glutamate, lors du procédé de production de glutamate induite par une limitation en biotine, soit due à la modification de la composition en acides gras des phospholipides (augmentation du rapport acides gras saturés/acides gras insaturés) (Demain et Birnbaum, 1968 ; Kanzaki et *al.*, 1967). Plus récemment, il a été observé qu'une baisse de la teneur en phospholipides de la membrane intervient lors de la phase de production de glutamate au cours du procédé limité par la biotine ou avec ajout des surfactants (Clément et Lanéelle, 1986 ; Clément et *al.*, 1984).

Cependant, la production de glutamate par ajout de pénicilline n'est pas liée à la modification de la composition de la membrane cytoplasmique (Shibuvkawa et *al.*, 1968). De plus le suivi de la composition en acides gras et phospholipides des cellules excrétrices de glutamate au début de la phase de la production (Hoischen et Kršmer, 1990), a montré que l'excrétion de glutamate intervient alors que la teneur en phospholipides et la composition en acide gras ne sont pas encore modifiés lors du procédé "biotine".

Enfin, Nampoothiri et *al.*, (2002) ont montré que des mutants des voies de biosynthèse des phospholipides présentent des productivités de glutamate plus élevées. Toutefois, ces mutants requièrent encore un stress pour excréter le glutamate.

A la lumière de ces données, il apparaît que la composition de la membrane semble influencer l'excrétion de glutamate mais que ce paramètre n'est pas suffisant pour déclencher l'excrétion de glutamate.

I.1.3.1.1.5. Réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane

Au cours de la production du glutamate par ajout de pénicilline, un gonflement des cellules apparaît pendant la phase de production (Shibukawa et *al.*, 1968). Ce phénomène est due à un affaiblissement du réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane (Kijima et *al.*, 1998), probablement par une inhibition de l'activité septum-peptidoglycane synthase (Wijayarathna et *al.*, 2001). Cependant, le même phénomène de modification de taille cellulaire a été observé au cours de la production de glutamate par limitation de biotine (Kinoshita, 1985) et par le choc de température (Hirasawa et *al.*, 2000). Bien que, la corrélation entre la limitation de biotine ou le choc de température et la modification du réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane ne soit pas encore identifiée, un mutant *alr* négative (gène codant pour D-alanine racémase qui synthétise la D-alanine pour la synthèse de l'arabinogalactone-peptidoglycane) excretion du glutamate en absence de D-alanine (Tauch, 2002 ; Eggeling et *al.*, 2001).

En bref, nous pouvons conclure que l'excrétion de glutamate est un phénomène actif très probablement catalysé par un transporteur. Ce transporteur nécessite de l'énergie cellulaire (ATP) et semble indépendant de la force protomotrice. Il semblerait l'exporteur de glutamate soit différent de l'importeur puisque un mutant amplifié pour le gène codant pour la protéine de l'import de glutamate ne change en rien la productivité de glutamate (Eggeling et *al.*, 1996). L'activation de l'exporteur de glutamate n'est pas due à l'accumulation du glutamate intracellulaire mais serait plutôt due à la modification de l'enveloppe cellulaire. Alors que la modification de la membrane plasmique semble ne pas être prépondérante pour de l'exporteur de glutamate la couche d'arabinogalactone-peptidoglycane semble jouer un rôle important.

I.2. LA DATTE

I.2.1. Description botanique

Le nom scientifique du palmier-dattier est *Phoenix dactylifera*. C'est une espèce dioïque, monocotylédone, appartenant à la famille des *Palmaceae*, et à la sous famille des *Coryphineae*. La famille des *Plamaceae* compte environ 235 genres et 4000 espèces (Munier, 1973). La datte est une baie, la fleur à trois carpelles dont un seul se développe au moment de la pollinisation. Le fruit est généralement de forme plus ou moins ellipsoïdale. La graine, appelée aussi noyau, est ligneuse et sa couleur va du gris au brun et elle porte un petit embryon. Le palmier dattier est l'arbre des zones arides et semi-arides, il est originaire des pays chauds et humides, mais il a de larges possibilités d'adaptation.

I.2.1.1. Stades de maturité

Chaque étape de la maturation a été identifiée nominalement, ce qui permet de suivre l'évolution du fruit au cours de son développement. Les expressions utilisées sont celles de la nomenclature irakienne (Munier, 1973; Dowson et Aten, 1973) :

- **Stade Kimri**

Le développement de la datte au stade vert ou Kimri se décompose en deux phases : la première est caractérisée par un accroissement rapide du poids et du volume, une accumulation de sucres réducteurs, une augmentation lente mais croissante du total des sucres et des matières solides, une très forte acidité réelle et un taux d'humidité élevé. Les caractéristiques de la seconde phase sont un accroissement moins rapide du poids et du volume, une baisse importante du taux d'accumulation des sucres réducteurs, un ralentissement considérable de la formation des sucres totaux, une légère diminution de l'acidité réelle et un taux d'humidité élevé.

- **Stade Kalâl**

Le passage au stade suivant, ou Kalâl, est marqué par un changement de couleur de la peau du fruit qui vire du vert au jaune. A ce stade, l'accroissement du poids est de plus en plus lent, l'accumulation de sucres réducteurs est faible, la proportion de saccharose, de sucres totaux et de matières solides augmente rapidement, l'acidité réelle et le taux d'humidité vont en décroissant. Il convient de noter que c'est au stade Kalâl que les dattes, sont plus à saccharose qu'à sucres réducteurs.

- **Stade Routab**

La datte devient plus ou moins translucide, sa peau passe du jaune au brun. Ce stade est souvent appelé stade de maturation et la datte est considérée comme mûre lorsqu'elle est complètement molle et le saccharose accumulé au stade précédent s'invertit.

- **Stade Tamar**

Le stade final de la maturation de la datte est appelé Tamar. Le fruit a alors perdu beaucoup d'eau et le rapport entre le sucre et l'eau restante est assez élevé pour empêcher la fermentation. Il s'agit d'un stade, comparable à celui du raisin sec ou du pruneau. Dans les variétés dites molles, la pulpe est d'abord molle, puis devient de plus en plus ferme tout en demeurant souple. Dans la plupart des variétés, la peau adhère à la pulpe et se ride à mesure que celle-ci diminue de volume.

La teneur en eau des fruits varie donc avec le degré de maturité (Hussein et *al.*, 1974), mais dépend également du caractère variétal.

I.2.2. Répartition des palmiers dattiers

Quatre milles ans avant Jésus Christ, les dattes étaient déjà connues et cultivées à des fins commerciales dans la zone qui constitue aujourd'hui le sud de l'Irak. Le palmier dattier est très exploité dans l'Afrique méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Asie de l'ouest et les États-Unis. C'est la principale source de revenus d'une vingtaine de pays de ces régions.

I.2.3. Production de dattes

Les principaux pays producteurs du monde sont l'Irak, l'Arabie saoudite, l'Iran, la République arabe unie, l'Algérie et le Pakistan.

La production mondiale dépasse 2200.000 tonnes et le nombre des palmiers dattiers compte plus de 93 millions.

I.2.4. Le palmier dattier en Algérie

Le patrimoine phoenicicole algérien est estimé à plus de 8 millions de palmiers dattiers. Le potentiel productif en 1987 a été estimé à 183.600 tonnes et en 2006 à 500.000 tonnes. Les palmiers sont essentiellement localisés dans les zones de la partie Sud-Est et Centre sud du pays qui offrent des conditions écologiques nonobstant les ressources en eau favorable à une exploitation phoenicicole à grande valeur ajoutée grâce à la variété Deglet Nour.

I.2.4.1. Les variétés de dattes

En Algérie les principales variétés cultivées sont représentées par :

- Deglet Nour : qui est la variété de premier choix, elle représente 47 % de la production. C'est une datte excellente au goût exquis, très appréciée sur le marché national et international du fait de son aspect, de sa saveur et de son onctuosité.

- Les dattes communes : la production est estimée à 53 % représentées par trois variétés : Ghars, Degla Beida et Mech Degla.
- Les variétés secondaires : elles comptent plus de 150 variétés dont la majorité sont très peu appréciées (Maatalah, 1970). Les plus répandues sont : Hamra, Tinnaceur, Tegaza, Tezerzait, et Takerbouchet (qui présente un intérêt par sa résistance au bayoudh) (Boughnou, 1988).

I.2.4.2. Les déchets de dattes

Les dattes qualifiées de perdues sont les dattes qui ne sont pas consommées, soit du fait de leurs faibles qualités gustatives, soit du fait de leur texture rébarbative, soit tout simplement parce qu'elles sont altérées. A ceux-ci s'ajoutent les problèmes de conditionnement et de stockage (c'est particulièrement au cours de l'entreposage que se produisent et se poursuivent les altérations occasionnées par toute sorte de parasites) et les problèmes agro-écologiques qui concernent surtout les techniques culturales d'irrigation, et de traitement et les intempéries. A certaines campagnes de récolte, les tonnages de dattes détériorées dépassent les 30 % de la production soit 60.000 tonnes (Estanove, 1990).

I.2.4.2.1. Les dattes non appréciées

- **Les dattes non mûres**

Martoubah : c'est une datte humide avec une teneur en eau qui dépasse 35 % ce qui la rend très sensible à l'éclatement.

Achef : dattes vertes ratatinées. Cette altération est due à un manque d'eau ou à une lésion de la hampe et du pedicelle. Sa coloration est claire, la peau étirée avec un aspect de caoutchouc.

- **Les dattes déformées**

Dattes parthénocarpiques

Dattes desséchées

Dattes ridées

Dattes pleines

- **Les dattes acariées**

Le palmier dattier et sa production subissent des attaques et dépréciations dues principalement aux ravageurs suivants :

- Les oiseaux qui blessent les fruits, favorisant ainsi les attaques par les parasites
- La cochenille blanche (*Barlatoria blanchardi*) : les dattes se dessèchent sans atteindre la complète maturité. La maladie est appelée Djarab (Gale).

- Le ver de la datte (*Myelois ceratonia*) : sur les fruits mûrs la chenille est localisée entre le noyau et la pulpe à partir de laquelle elle se nourrit. A l'intérieur du fruit, on observe un tissage soyeux très fin où s'accroche des excréments.
- Le boufaroua (*Oligonychus afrasiaticus*) Détruit rapidement l'épiderme des fruits et provoque leur déshydratation. La présence de réseaux soyeux caractérise la présence de ce ravageur.

Des mortalités dues à une fusariose vasculaire (Bayoudh) causée par un champignon (*Fusarium oxysporum* fsp *albedinis*) : la maladie se caractérise par un dessèchement progressif des palmes qui revêtent une coloration blanchâtre.

Un autre champignon (*Aspergillus phoenicis*) provoque la maladie du charbon. L'épiderme de la datte présente une cavité tapissée d'un feutrage mycélien blanchâtre rempli d'une masse noire pulvérulente.

I.2.5. Composition de la datte

La datte est constituée de deux parties :

- Une partie comestible représentée par la pulpe (mésocarpe).
- Une partie non comestible qui est le noyau ayant une consistance dure. Le noyau représente 10 à 30 % de poids de la datte, il est constitué d'un albumen protégé par une enveloppe cellulosique.

L'analyse de cinq variétés de dattes (pulpes et noyaux de dattes rapportés à 100 g de matière sèche) (Tableau I.1) a montré qu'ils sont constitués d'eau, de sucres de protéines, de matière grasse, de fibres et de cendres (Abou-Zeid et *al.*, 1991). Les sucres représentent les constituants majeurs. Le pourcentage en sucres totaux dans la pulpe de la datte représente environ 67,5 à 80 %.

Tableau I.1. Constituants de cinq variétés de dattes (Abou-Zeid et *al.*, 1991).

(A) : Pulpe de datte

(B) : Cendres de noyau de datte

Constituants	Variétés									
	Lobanah		Moshaxik		Motalabin		Khalas		Barni	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Eau	7,5	7,2	12,1	10,3	10,8	10,4	13,2	11,2	10,2	10,5
Sucres	79,2	36,3	68,4	35,7	67,5	36,4	80,8	38,2	74,4	39,73
Protéines	2,0	3,7	2,1	3,9	2,2	4,1	2,4	4,2	2,4	4,5
Lipides	0,8	9,3	0,7	10,2	0,9	9,7	1,2	8,9	1,1	10,4
Fibres	3,0	-	3,2	-	3,3	-	3,0	-	2,0	-
Cendres	1,9	0,9	1,8	0,9	2,1	0,9	2,0	0,9	2,0	1,1

I.2.5.1. Les sucres de pulpe de datte

On distingue deux catégories de dattes : celles à saccharose (sucre non réducteur) et celles à sucres réducteurs, et on peut les classer d'après leur consistance, en molles, demi-molles et sèches.

- Les dattes molles (taux d'humidité supérieur ou égale à 30 %).
- Les dattes demi-molles (de 20 à 30 % d'humidité).
- Les dattes sèches (moins de 20 % d'humidité).

La persistance du saccharose après le stade kalâl est manifestement liée au durcissement de la datte. Les dattes molles sont à sucres inverti (fructose, glucose) alors que les dattes sèches sont à saccharose, les dattes demi-molles occupant une position intermédiaire (Tableau I.2).

Tableau I.2. Composition en sucres de quelques variétés de dattes d'Égypte (Hussein, 1974).

Variétés	Pourcentage du poids à l'état sec		
	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
Dattes molles			
Amhat	79,85	75,72	4,13
Bint Aischa	78,74	77,35	1,39
Hayany	80,66	80,66	0,00
Saidy	75,47	73,32	2,15
Samany	81,57	77,62	3,95
Zaghloul	80,74	79,54	1,20
Dattes demi-molles			
Aglany	71,83	44,22	27,61
Amri	78,08	35,56	43,42
Dattes sèches			
Bartamuda	77,84	32,43	45,50
Balady	72,37	28,22	44,15
Gondeila	79,55	15,55	63,88
Malakabi	74,87	27,39	47,48
Sakkoti	78,73	14,42	64,31

I.2.5.2. Teneur en eau

Des analyses de la teneur en eau de 5 cultivars de dattes (Bou Skri, Deglet Nour, Mejhool, Thoory et Zahidi) ont été effectuées à différents stades de la maturation des fruits (Booij et *al.*, 1992). Les cultivars étudiés ont montré que la teneur en eau des dattes évolue en fonction de leur stade de maturité : l'humidité décroît des stades verts aux stades mûrs (Tableau I.3). Le pourcentage en composés solides totaux augmente donc plus rapidement à l'approche de la maturité des fruits.

Tableau I.3. •volution de la teneur en eau en fonction de leur qualité et de leur stade de maturité.

Variétés	Catégorie des dattes	Humidité	
		Stade Kalâl	Stade Mûr
Bou Skri	Molles	58 % \pm 12 %	34 % \pm 14 %
Mejhool	Molles	58 % \pm 12 %	34 % \pm 14 %
Deglet Nour	Demi-molles	55 % \pm 9 %	25 % \pm 1 %
Zahidi	Demi-molles	67 % \pm 12 %	22 % \pm 13 %
Thoory	Sèches	60 % \pm 8 %	17 % \pm 14 %

I.2.5.3. Les protéines

Parmi les constituants intéressants de la datte, on peut mentionner encore les protéines, mais la pulpe de la datte n'en renferme qu'une faible quantité. Le taux diffère selon les variétés et surtout selon le stade de maturité, il est en général de l'ordre de 1,75% du poids de la pulpe.

De même, il a été montré que le pourcentage de protéines présent dans les noyaux de datte est plus important que celui de la pulpe (Abou-Zeid et *al.*, 1991). Cependant plusieurs auteurs ont montré l'existence de 16 à 17 acides aminés dans la pulpe et l'hydrolysate de noyaux de datte (Booij et *al.*, 1993; Abou-Zeid et *al.*, 1991 ; Auda et *al.*, 1976). Les proportions en acides aminés contenus dans les dattes d'Oman sont représentées dans le (Tableau I.4) par Ahmed et *al.* (1995).

Tableau I.4. Proportion en acides aminés de différentes variétés de datte (g/100g de protéines)
(Ahmed et *al.*, 1995)

Acides aminés	Variétés								
	<i>Bunaringa</i>	<i>Handhal</i>	<i>Hilali</i>	<i>Khalas</i>	<i>Fardh</i>	<i>Khasab</i>	<i>Barneh</i>	<i>Khuneizy</i>	<i>Zabad</i>
Acides aminés essentiels									
Ile	5,19	4,19	5,16	5,03	5,35	5,33	5,45	5,67	4,85
Leu	8,63	8,70	8,66	8,68	8,74	8,80	8,84	9,32	8,32
Lys	4,19	3,40	3,93	3,76	3,95	3,68	3,55	3,90	3,88
Met	1,61	1,81	1,81	2,09	1,71	2,00	1,50	1,87	1,78
Cys	3,75	3,57	2,62	3,43	3,67	1,98	3,03	3,11	3,60
Phe	5,05	5,05	5,11	5,19	5,01	5,27	5,08	5,46	5,07
Tyr	5,54	5,54	5,60	5,69	5,50	5,78	5,55	5,99	5,54
Thr	5,10	5,36	5,35	5,10	5,30	5,02	5,11	5,23	4,59
Val	6,82	8,16	6,90	6,64	7,00	7,17	7,18	6,28	6,45
Acides amines non essentiels									
Arg	3,28	3,30	2,97	4,70	2,90	4,36	3,45	3,30	3,53
His	2,35	1,95	2,07	2,37	2,20	2,44	2,08	2,20	2,10
Ala	5,94	5,86	6,02	5,72	6,00	5,77	5,95	6,67	6,47
Asp	10,67	11,03	11,69	11,11	11,44	11,36	11,13	10,74	11,25
Glu	14,12	13,73	14,26	13,05	13,63	13,25	14,37	12,97	14,09
Gly	6,74	6,77	6,68	6,33	6,50	6,48	6,71	5,89	6,75
Pro	5,94	6,39	6,39	5,79	6,03	6,34	5,84	6,20	6,34
Ser	5,08	5,19	5,42	5,34	5,09	4,95	5,18	5,19	5,41

I.2.5.4. Les sels minéraux

La teneur en cendres de dattes varie de 1,9 à 4,2 % au stade Kalâl et 1,5 à 3,0 % au stade Mûr (Sawaya et *al.*, 1983). Le calcium et le phosphore, souvent en déficit dans les aliments, ont été trouvés en quantités relativement importantes dans les dattes, ce qui avait déjà été rapporté par Youssif et *al.* (1982) et Sawaya et *al.* (1983).

Les dattes se caractérisent principalement par une forte teneur en potassium, conférant une prédominance alcaline aux cendres (Booij, 1992). Ces observations confirment celles de Cleveland et Fellers (1932) sur les dattes irakiennes, et de Hass et Bliss (1935) sur le cultivar Deglet Nour.

Abou-Zeid et *al.* (1991), ont montré que l'analyse des cendres de pulpe et noyau de datte contiennent plusieurs sels minéraux (Ca, Mg, Sr, Si, Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, P, Na, et K) (Tableau 2.5).

Tableau I.5. Proportion des sels minéraux de cinq variétés de dattes (Abou-Zeid et *al.*, 1991)

(A) : pulpe de datte

(B) : cendres de noyau de datte

Eléments minéraux	Variétés									
	<i>Lobanah</i>		<i>Moshawik</i>		<i>Motalabin</i>		<i>Khalas</i>		<i>Barni</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ca	66,7	22,0	38,2	23,5	29,2	17,5	70,5	25,5	46,7	22,9
Mg	52,3	57,3	10,6	48,8	23,3	51,1	50,3	74,8	48,0	63,5
Sr	1,6	0,7	0,8	0,6	0,9	0,4	1,3	0,5	1,3	0,2
Si	0,7	0	0,1	0	0,4	0	1,4	0	15,2	0,9
Co	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Al	3,9	5,1	2,2	5,2	2,8	4,2	3,0	5,2	1,2	0,3
Ni	0,5	0,5	0,3	0,5	0,4	1,7	0,1	0,5	0	0
Fe	5,2	6,1	2,5	5,5	3,7	4,7	3,8	5,5	1,1	0,9
Zn	0,2	1,7	0,2	1,7	0,1	1,5	0,1	1,6	0,3	0,8
Cu	0,3	1,7	0,1	1,6	0,1	1,3	0,2	1,1	0,2	0,4
Cr	1,3	1,3	0,6	1,3	0,9	0,9	0,3	1,3	0	0
Pb	0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0
Mn	0,4	0,8	0	0,6	0,1	0,6	0,3	0,9	0,3	0,6
P	48,1	98,7	8,5	70,2	18,1	82,2	46,9	107,5	50,0	10,8
Li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2
Na	2,3	4,0	0,9	3,7	1,3	3,7	4,6	5,4	8,3	10,9
K	922,0	280,5	149,0	236,5	305,1	236,5	330,9	255,5	470,1	412,3

I.2.5.5. Les lipides

En général les dattes contiennent une faible quantité de lipides qui sont présents dans la pulpe (0,7 à 1,1 %) et le noyau mais en proportion plus élevée dans le noyau (8,9 % à 10,4 %) (Abou-Zeid et *al.*, 1991).

Des données analytiques sur la composition chimique du noyau de datte montrent qu'il renferme plusieurs acides gras avec une proportion plus importante d'acide oléique et laurique (Tableau I.6) (Devshony et *al.*, 1992).

Tableau I.6. Composition en acide gras du noyaux de datte (Devshony et *al.*, 1992)

Acides gras	% d'acides gras totaux
Acide caprique	0,3
Acide laurique	21,8
Acide myristique	10,9
Acide palmitique	9,6
Acide stéarique	1,5
Acide oléique	42,3
Acide linoléique	13,7

I.2.5.6. Les acides organiques

Le jus de datte est légèrement acide. Rygg et *al.* (1948 ; 1953) rapportent que les dattes mûres se caractérisent par une acidité moins importante avec un pH de 5, mais ils ne se prononcent pas formellement sur le rôle de l'acidité dans les dattes, ils avancent cependant l'idée qu'une forte acidité est associée à une mauvaise qualité. Youssef et *al.* (1992) ont analysé deux variétés de dattes égyptiennes et ont montré l'existence de 3 acides organiques : malate, citrate, et oxaloacétate avec une proportion importante de malate (0,116 à 0,183 %) suivie d'une très faible quantité de citrate et d'oxaloacétate.

I.2.5.7. Les vitamines

Les dattes renferment d'une façon générale des quantités appréciables de vitamines du groupe B, particulièrement B1 et B2 (Tableau I.7) (Patron et *al.*, 1954), et d'acide nicotinique ainsi que de faible quantité de vitamine C (El Baradi, 1968).

Abou-Zeid et *al.*, (1991), ont montré que les dattes contiennent essentiellement les vitamines A et C (Tableau I.8).

Tableau I.7. Teneur en vitamines des dattes cultivées en Arizona (Patron et *al.*, 1954)

	Béta carotène (mg/100 g)	Caroténoïdes totaux (mg/100 g)	Thiamine (B1) (mg/100 g)	Riboflavine (B2) (mg/100 g)
Maximum	0,035	0,45	0,14	0,15
Minimum	0,01	0,12	0,08	0,07
Moyenne de 15 variétés	0,02	0,32	0,10	0,10

Tableau I.8. Teneur en vitamines A et C des dattes Saoudienne (Abou-Zeid et *al.*, 1991)

Variétés	Vitamine A (UI/100 g de poids frais)	Vitamine C (mg/100 g de poids frais)
Lobanah	18	2,75
Moshawick	41	2,60
Motalabin	46	2,90
Khalas	33	3,20
Barni	69	2,84

I.2.5.8. Autres constituants

- **Cellulose**

Dowson et Aten (1963) ont analysé 32 échantillons de dattes de diverses variétés à différents stades de développement et ont montré qu'il existe un résidu solide absolument insoluble et qui se compose principalement de cellulose, la proportion variant de 4,09 à 11,97 % avec une moyenne d'environ 7 % (poids du fruit à l'état sec).

- **Tanin**

Presque toutes les dattes sont astringentes au stade Kimri en raison de la présence d'une couche de tanin au niveau de la peau. Le tanin et les substances tannoïdes ont été dosés par Turell et *al.* (1940) qui ont trouvé 6 % (du poids à l'état frais).

- **Pectine**

Rygg (1950) a constaté que du stade Kimri au stade Routab, la proportion de pectine soluble passe de 2 à 1 %, celle de protopectine de 4,5 à environ 1 % et celle des substances pectiques totales de 6,5 à 2 %.

I.2.6. Valorisation de la datte

La datte peut se prêter à toutes sortes de préparations industrielles ou artisanales qui permettent d'en étendre sa consommation.

I.2.6.1. Valorisation directe

I.2.6.1.1. La pâte de dattes

Elle se prépare à partir de la pulpe de dattes molles et demi molles. Une fois dénoyautées les dattes sont broyées et pétris jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Cette dernière peut être enrichie en protéines et matières grasses afin de constituer un aliment équilibré pour les populations male nourries. La pâte de datte, se prête bien au fourrage en couche épaisse entre deux biscuits. Elle peut être également utilisée dans la fabrication des confitures et des gelées (Khatchadourian et *al.*, 1982 ; Mustapha et *al.*, 1982 ; Sawaya et *al.*, 1982 ; Nur et *al.*, 1981 ; Mikki et *al.*, 1978).

I.2.6.1.2. La farine de dattes

Après une légère torréfaction les dattes sont séchées et broyées. On obtient ainsi une farine de couleur claire, d'odeur agréable. Cette poudre nourrissante est une base possible pour toutes sortes d'utilisations, puisqu'elle est facile à transporter et à conserver. Elle est utilisée essentiellement en biscuiterie et en pâtisserie (Sawaya et *al.*, 1982). De même la poudre de noyaux de dattes est un excellent aliment de bétail.

I.2.6.1.3. Le sirop de dattes

Les dattes de qualité secondaire, trop molles ou écrasées, peuvent être utilisées pour la fabrication du sirop (Benjamin et *al.*, 1975). Les dattes découpées sont chauffées dans l'eau. On obtient un sirop riche qui peut être filtré et concentré sous vide jusqu'à obtention d'un produit à 65-70 % de matière sèche. Ce produit, bien que d'aspect sombre, est stable et est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme base à la production de boissons gazeuses (Hamed et *al.*, 1982).

I.2.6.1.4. Le jus de dattes

Le jus de dattes est connu depuis longtemps dans la plupart des pays producteurs de dattes. Ce jus est appelé "Roub" en Algérie et "Debs" en Irak. Seul l'Iraq s'est orientée vers une production industrielle (Dhaia et Passat, 1979). L'extrait est obtenu après épuisement des dattes par l'eau chaude (90°C), pendant une heure. Ce jus peut être acidifié avec quelques grammes d'acide citrique.

I.2.6.1.5. Le miel de dattes

Sa préparation nécessite des variétés de dattes molles. L'extraction du miel se fait par pressage de la pulpe complètement ramollie dans l'eau. Le produit obtenu présente une viscosité identique à celle du miel d'abeilles ; sa conservation est assurée en lui ajoutant de l'acide ascorbique (0,03 %) et de l'acide citrique (0,2 %) (Boughnou, 1988).

I.2.6.2. Valorisation indirecte

I.2.6.2.1. Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires)

Les dattes peuvent servir comme support à la production de protéines d'organismes unicellulaires. Kamel (1979) a essayé d'explorer le jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus ont montré que les sucres de jus de datte constituent une matière première de base pour la production de protéines d'organismes unicellulaires. La concentration optimale en sucres totaux de jus de datte est de 40 g/l. A cette concentration, 55 % de sucres de jus de datte ont été utilisés et la masse cellulaire obtenue après 12 heures de culture est de 4,86 g/l. Cependant, la meilleure production est obtenue lorsque le jus de datte est supplémenté avec 0,25 % en $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ et 0,1 % en $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$. Pour Jalaluddin et *al.* (1995). La concentration optimale en sucre de jus de datte est de 50 g/l.

Des travaux ont été entrepris par Nancib et *al.* (1997), et ont montré que le jus de datte enrichi en hydrolysats et en cendres de noyaux de datte, constitue un bon milieu de culture pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*.

I.2.6.2.2. Production d'oxytétracycline

Différentes souches productrices d'oxytétracycline ont été utilisées. Les résultats obtenus ont montré que *Streptomyces rimosus* NRRL B-2243 est la plus performante, et que les sucres de pulpe de datte en tant que source de carbone donnent des résultats meilleurs que ceux obtenus avec le glucose. La concentration optimale est de 25 g/l.

L'ajout de 1,5 g/l d'urée en tant que source d'azote et les cendres de noyaux de datte en tant que source minérale permettent d'améliorer la production de l'antibiotique (Abou-Zeid et *al.*, 1993).

I.2.6.2.3. Production d'acide citrique

Le jus de dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique. Abou-Zeid et Khoja (1993), montrent que l'enrichissement du jus de dattes avec l'hydrolysats de noyaux de dattes permet d'améliorer la production à partir de *Yarrowia lipolytica*. Al Obaidi et Berry (1979) obtiennent un rendement de 62 % en utilisant un milieu à base de jus de datte déionisé et une culture d'*Aspergillus*.

I.2.6.2.4. Production d'alcool

La production d'éthanol à partir de jus de datte repose principalement sur l'utilisation de levures. Al Bassam (2001) a utilisé des cellules libres et immobilisées de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis* en culture batch. Les meilleures performances sont obtenues avec *Saccharomyces cerevisiae*. Un maximum de rendement de 12,8 % (p/v) est obtenu avec les cellules libres et 13,4 % (p/v) avec les cellules immobilisées sur l'alginate de sodium.

I.2.6.2.5. Production de vitamine B12

Le jus de dattes est utilisé comme source de carbone pour la production de la vitamine B12 par *Streptomyces albidoflavus* et *Streptomyces Antibioticus*. Les rendements obtenus sont similaires à ceux obtenus sur d'autres substrats tel que les mélasses (El-Akidi-Hassen, 1982).

CHAPITRE II.

MATERIELS ET METHODES

II.1. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES

II.1.1. Appareils

- Fermenteur, BIOLAFITTE & MORITZ avec son système d'agitation, de régulation d'oxygène, de la température et du pH
- Sonde de pH
- Sonde d'oxygène
- Incubateur, LMS (cooled/incubator)
- Table d'agitation, INFORS AG
- Autoclave, SELETA.
- Autoclave, WEBECO
- Bain-marie agité, Bioblock Scientific
- Bain-marie agité, Memmert
- •tuve bactériologique, Kottermann
- •tuve bactériologique, Memmert
- pH mètre, Prolabo
- Spectrophotomètre, Spectronic 20 Genesys
- Spectrophotomètre Multiskan ELx 800
- Agitateur magnétique, Bioblock
- Vortex, Jonke et Kunbel
- Balance, Sartorius
- Balance de précision, Kern ALJ 220-4M
- Centrifugeuse, Adogio EBA 12
- Centrifugeuse, Hittich

II.1.2. Produits chimiques

- Na_2HPO_4 , Fluka
- KH_2PO_4 , Rectapur
- NaCl , Prolabo
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac
- FeCl_3 , Panreac
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Riedel-deHaen

- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Prolabo
- CaCl_2 , Fluka
- HCl , 37.5 % Cheminova
- NH_4OH 34 % Cheminova
- NaOH, Prolabo
- KOH, Prolabo
- Urée, Panreac
- Acétate de sodium, Panreac
- Glycérol, Gifrer Barbazat
- Biotine, Sigma
- Thiamine, Sigma
- Bétaine, Sigma
- Glucose, Prolabo
- Fructose, Fluka
- Saccharose, Prolabo
- Polypropylène glycol (antimousse), Sigma

Réactifs

- Kit enzymatique pour le dosage du glucose, Sigma
- Kit enzymatique pour le dosage du Fructose, Biopharm, Roche
- Kit enzymatique pour le dosage du saccharose, Biopharm, Roche
- Kit enzymatique pour le dosage du glutamate, Biopharm, Roche
- Kit enzymatique pour le dosage du lactate, Sigma
- Invertase, Sigma

II.2. MICRO-ORGANISME UTILISE

Le micro-organisme utilisé, *Corynébactérium glutamicum* 2262, chez lequel la production de glutamate est thermo-inductible, a été fourni par le laboratoire de Génie des Procédés biotechnologique, (Institut National Polytechnique de Lorraine Nancy - France).

II.2.1. Caractéristiques de la souche *Corynebacterium glutamicum*

Les caractéristiques générales de l'espèce bactérienne *Corynebacterium glutamicum* sont présentées dans le (Tableau II.1) (Pons et *al.*, 1993). La composition élémentaire générales de *Corynebacterium glutamicum* est $\text{C}_{4.5}\text{H}_8\text{O}_{2.2}\text{N}$ avec 9 % de cendre (Cocaign, 1992).

Tableau II.1. Caractéristiques générales de *Corynebacterium glutamicum* (Pons et *al.*, 1993).

Caractères principaux	Substrats utilisés	Autres caractères
- Bactéries à Gram positif.	- Glucose +	- Uréase +
- Bacille court, droit ou légèrement incurvé souvent par paire.	- Fructose +	- Hydrolyse gélatine -
- Dimension: 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm.	- Saccharose +	- Hydrolyse caséine -
- Aspect sur gélose: colonies jaune pâle à jaune, régulières et lisses.	- Maltose +	- Réduction de nitrate en nitrite +
- Non-sporulant, non-mobile.	- Tréhalose +	- Esculine -
- Aérobie facultative.	- Mannose +	- Hippurate +
- Auxotrophe pour la biotine.	- Rhamnose -	
- Production d'acide glutamique.	- Galactose -	
- Température optimale de croissance 25 à 37°C.	- Raffinose -	
- pH optimal de croissance: 7,3 à 7,4.	- Arabinose -	
- ADN: C + G = 55 à 57,7 %.	- Lactose -	
- Paroi : présence d'acide méso diaminopimélique et d'arabinogalactane.	- Xylose -	
	- Dextrine -	
	- Salicine -	
	- Amidon -	

II.3. MILIEUX DE CULTURES

II.3.1. Milieu de MCGC (Milieu de *Corynebacterium Glutamicum* enrichi en Citrate)

La composition des milieux de culture est basée sur le milieu MCGC (Von der Osten et *al.*, 1989b). Les milieux sont supplémentés en déféroxamine pour faciliter l'assimilation des ions ferriques. La composition des différents milieux utilisés pour les cultures en fioles d'erlenmeyer, en bioréacteur en mode discontinu est présentée dans le (Tableau II.2).

Tableau II.2. Composition du milieu MCGC en erlenmeyer et en fermenteur

Substances	Culture en fiole d'erlenmeyer	Culture en discontinue
Glucose	34 g/l	60 g/l
Na ₂ HPO ₄	15 g/l	3 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l	6 g/l
NaCl	1 g/l	2 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g/l	8 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	400 mg/l	400 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	40 mg/l	40 mg/l
FeCl ₃	4 mg/l	4 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg/l	1 mg/l
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.4 mg/l	0.4 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	4 mg/l	4 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.2 mg/l	0.2 mg/l
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0.4 mg/l	0.4 mg/l
CaCl ₂	84 mg/l	84 mg/l
Biotine	2 mg/l	2 mg/l
Thiamine	20 mg/l	20 mg/l
Bétaine	-	2 g/l
Urée	4 g/l	-

II.3.2. Milieu à base de jus de datte

Le milieu MCGC a été complètement remplacé par un milieu de fermentation naturel contenant initialement que l'extrait sucré de pulpe de datte (Jus de datte).

Il faut noter que les dattes utilisées dans ce travail sont des dattes demi-molles provenant du même lot et sont à faible coût d'achat.

II.3.2.1. Extraction du jus de datte

Les dattes sont d'abord lavées puis dénoyautées. L'eau est rajoutée à raison de deux litres par kilogramme de pulpes de dattes. Le mélange est chauffé à 90°C pendant deux heures. L'extrait de jus obtenu est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulosesques. Le surnageant recueilli est utilisé essentiellement en tant que source de carbone après avoir été dilué aux proportions convenables.

Après stérilisation, l'extrait de jus de datte est enrichi en sources azotées, en sels et en vitamines.

II.3.3. Stérilisation

La stérilisation des milieux et des solutions est réalisée par autoclavage ou par filtration. Le fermenteur est stérilisé à l'autoclave avec tous ses accessoires et le milieu de production. La stérilisation est effectuée à 121°C pendant 20 minutes. Pour éviter les réactions de brunissement non enzymatique, le jus de datte et les solutions supplémentées (urée et sels minéraux) sont stérilisés séparément. Les solutions de vitamines sont stérilisées par filtration sur filtres Minisart (0,2 µm).

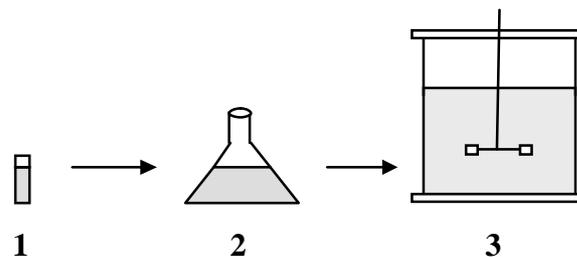
II. 4. PROCEDE DE CULTURE

II.4.1. Conservation de la souche

La conservation des souches à moyen terme est réalisée sur milieu à base de glycérol (glycérol stock). Une culture de la souche *Corynebacterium glutamicum* 2262 est effectuée en milieu liquide MCGC. Après croissance des bactéries jusqu'en phase exponentielle, un volume de glycérol stérile est ajouté à quatre volumes de la culture. La suspension bactérienne à 20 % de glycérol est ensuite répartie dans des tubes stériles (1 ml) puis congelée à -20°C.

II.4.2. Propagation de la souche

Les cultures stocks ont été décongelées au fur et à mesure des besoins, puis utilisées. Le tube de conservation sert à inoculer le milieu de préculture. Cette dernière est prise à l'ensemencement en phase de croissance exponentielle (14 heures). Puis le fermenteur est inoculé à raison de 10 % (v/v) de manière stérile.



- 1- Tube de conservation à -20°C
- 2- Préculture (milieu MCGC) (33°C, 14 heures)
- 3- Culture en fermenteur (milieu de production)

Figure II.1. Propagation de la souche (*Corynebacterium glutamicum* 2262).

II.4.3. Cultures

Les Erlenmeyers ou fermenteur sont ensemencés avec des précultures dont les bactéries sont en phase exponentielle de croissance.

II.4.3.1. Culture en Erlenmeyer

Après avoir ajusté le pH à 7,3, le milieu de culture est réparti à une proportion de 100 ml dans des Erlenmeyers de capacité de 250 ml. Ils sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Le milieu de culture est inoculé à l'aide de préculture à raison de 10 % v/v, puis incubé à 33°C sous agitation de 400 rpm.

II.4.3.2. Culture en fermenteur

II.4.3.2.1. Description du fermenteur

Un fermenteur BIOLAFITTE de 2 litres est utilisé lors de ce travail. Ce fermenteur est équipé d'un système de contrôle de température, de pH, d'oxygène et d'agitation (Figure II.2) :

- Régulation de l'agitation

L'agitation est assurée par des turbines réglables en hauteur montées sur un axe unique. L'axe d'agitation est entraîné par un moteur et la vitesse d'agitation est commandable par la console d'alimentation et peut varier de 0 à 1400 tours/minutes. Dans notre cas, la vitesse a été fixée à 900 tours/minutes.

- Régulation du pH

Le pH est régulé à 7,6 par un système PID couplé à une sonde à pH stérilisable (Ingold). L'étalonnage de la sonde est effectué avant stérilisation. La régulation du pH se fait par injection à l'aide d'une pompe péristaltique d'une solution d'ammoniaque (2 N).

- Régulation de la mousse

La régulation de mousse, qui risque de colmater les circuits d'aération est atténuée par ajout d'anti-mousse chimique (polypropylène glycol).

- Régulation de la température

Les cultures sont débutées à 33°C afin d'atteindre la phase d'exponentielle de croissance (d'environ 4h) et est changée à 39°C pour la production et la sécrétion de l'acide glutamique par choc thermique.

La régulation de la température est obtenue par une circulation de l'eau dans un circuit propre (double enveloppe) et par chauffage de la sonde de température en contact avec le volume réactionnel. L'eau de refroidissement ou de chauffage ne circule que si la température s'éloigne de valeur de consigne.

II.4.3.2.2. Protocole des fermentations discontinues

Le volume réactionnel est fixé à 1 litre. L'inoculum est de 10 %. Les conditions de culture sont les suivantes :

- pH maintenu à 7,6
- Température 33°C
- Agitation 900 rpm

Les prélèvements sont effectués en cours de fermentation. La densité optique est lue immédiatement et le reste de l'échantillon est centrifugé. Les surnageants sont récupérés et congelés, les différents dosages étant réalisés ultérieurement.

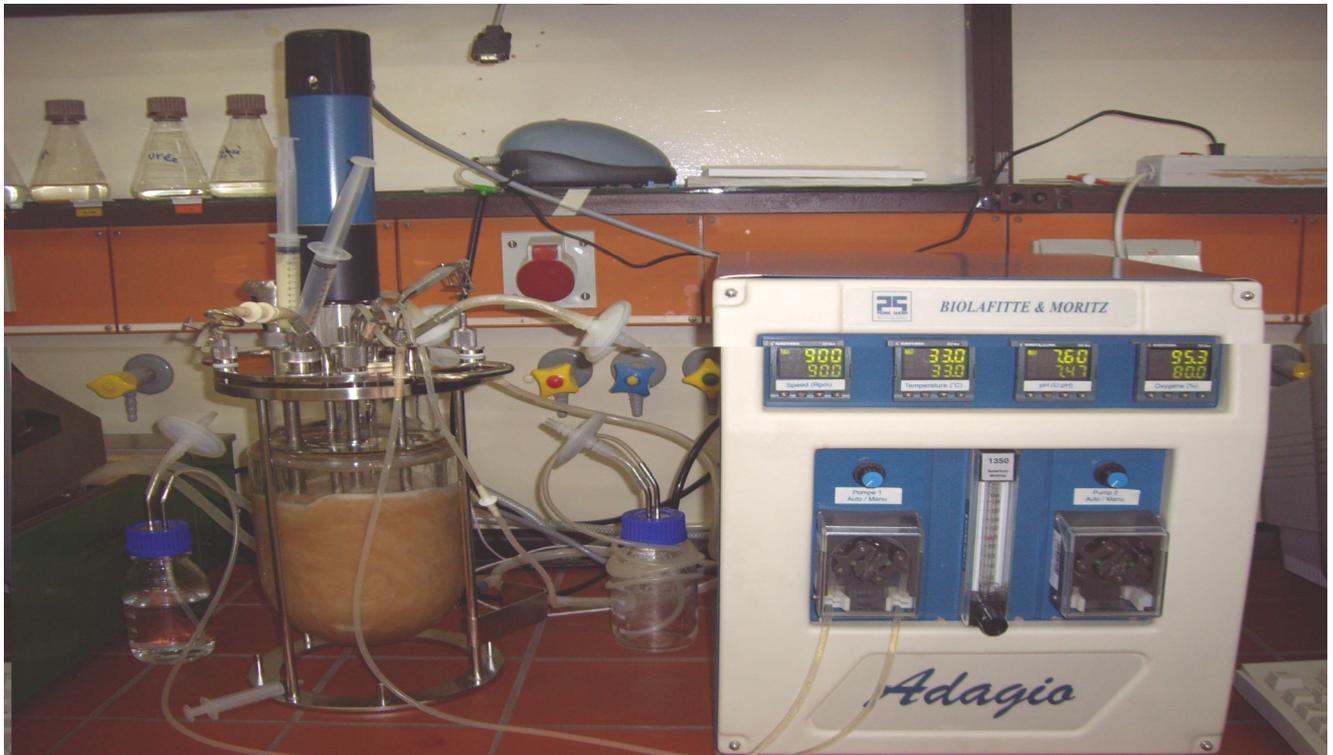


Figure II.2. Description d'un fermenteur (BIOLAFITTE & MORITZ) avec ses capteurs.

- | | |
|---|---|
| 1 : Sonde à pH | 11 : Pompe de l'acide |
| 2 : Sonde à oxygène | 12 : Lecture et enregistrement de température |
| 3 : Sonde à température | 13 : Moteur d'agitation |
| 4 : Diffuseur d'air | 14 : Vanne régulation du débit d'eau |
| 5 : Filtre stérile pour l'entrée d'air | 15 : Lecture et enregistrement d'oxygène |
| 6 : Agitateur | 16 : Seringue d'entrée de l'antimousse |
| 7 : Entrée d'air stérile (débitmètre) | 17 : Seringue de prélèvement |
| 8 : Filtre stérile pour la sortie d'air | |
| 9 : Lecteur et régulation de pH | |
| 10 : Pompe de la base | |

II.5. METHODES D'ANALYSES

II.5.1. Prélèvement et traitement des échantillons

Pour suivre l'évolution des fermentations au cours du temps, les paramètres caractéristiques suivants ont été suivis :

- La croissance (biomasse)
- La consommation des substrats (glucose, fructose, saccharose).
- La production du métabolite (l'acide glutamique).

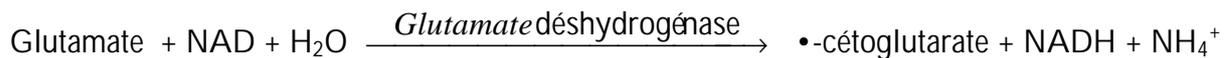
II.5.2. Estimation de la biomasse

La biomasse est évaluée par spectrophotométrie à 570 nm. Une corrélation entre les unités DO mesurées et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec est établie pour le spectrophotomètre utilisé. Lorsque cela est nécessaire les échantillons sont dilués de façon à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé.

Le coefficient de conversion de DO en concentration de biomasse (g/l) est de 0,4.

II.5.3. Dosage du glutamate

Le glutamate est dosé par un kit enzymatique (Biopharm). Le principe de la réaction colorimétrique est la suivante:

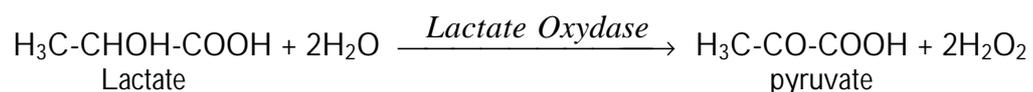


L'apparition de formazan est détectée à 492 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en glutamate. Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,07 g/l de glutamate permet de déterminer la concentration en glutamate des échantillons. Au-delà de cet intervalle une dilution est nécessaire.

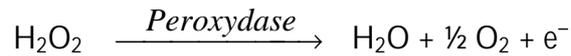
II.5.4. Dosage du lactate

Le lactate est dosé par un kit enzymatique (Sigma). Le procédé de dosage est basé sur les réactions enzymatiques suivantes:

Le lactate est transformé en pyruvate et en peroxyde d'hydrogène par le lactate oxydase :



En présence de H₂O₂, la peroxydase catalyse l'oxydation du précurseur chromogène pour produire une coloration bleue ayant son maximum d'absorption à 540 nm.

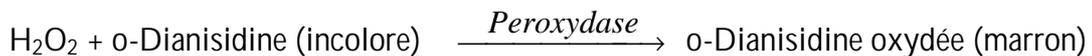
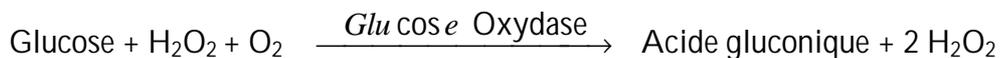


L'augmentation de l'absorption mesurée à 540 nm est proportionnelle à la concentration en lactate.

Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,20 g/l de lactate permet de déterminer la concentration en lactate des échantillons. Pour les concentrations supérieures, une dilution est nécessaire.

II.5.5. Dosage du glucose

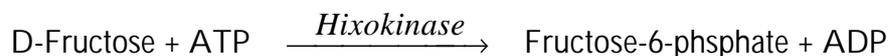
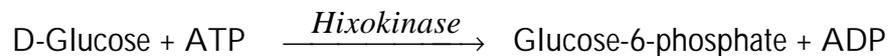
La concentration du glucose est dosée à l'aide kit enzymatique (Sigma). Le procédé de dosage est basé sur les réactions enzymatiques suivantes:



L'intensité de la couleur marron est mesurée à 450 nm. Cette coloration est proportionnelle à la concentration de glucose. Une gamme étalon est effectuée de 0 à 0,4 g/l de glucose pour déterminer la concentration en glucose des échantillons. Pour les concentrations supérieures, une dilution est nécessaire.

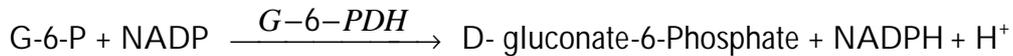
II.5.6. Dosage du glucose / fructose

La concentration du fructose est dosée à l'aide d'un kit enzymatique (Biopharm). Le procédé de dosage est basé sur les réactions enzymatiques suivantes:



La formation du NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à la concentration de glucose.





La formation du NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à la concentration de fructose.

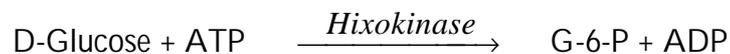
Une gamme étalon est effectuée de 0 à 0,4 g/l de glucose pour déterminer la concentration en fructose et en glucose des échantillons. Pour les concentrations supérieures, une dilution est nécessaire.

II.5.7. Dosage du glucose / saccharose

La concentration du saccharose est dosée à l'aide kit enzymatique (Biopharm). Le procédé de dosage est basé sur les étapes suivantes :

- Détermination du glucose avant l'inversion enzymatique

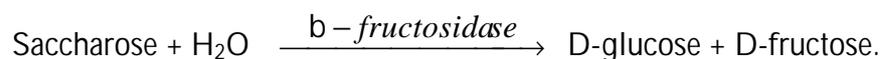
Le dosage est basé sur les réactions enzymatiques suivantes:



La formation du NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à la concentration de glucose initiale.

- Inversion enzymatique

À pH 4,6 le saccharose est hydrolyse par l'enzyme β -fructosidase en glucose et en fructose.



La détermination de la concentration du glucose après l'inversion enzymatique (glucose total). La formation du NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à la concentration de glucose totale.

La concentration du saccharose est calculée par la différence de la concentration du glucose avant et après l'inversion enzymatique. Une gamme étalon est effectuée de 0 à 0,4 g/l de glucose. Pour les concentrations supérieures, une dilution est nécessaire.

II.6. EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES

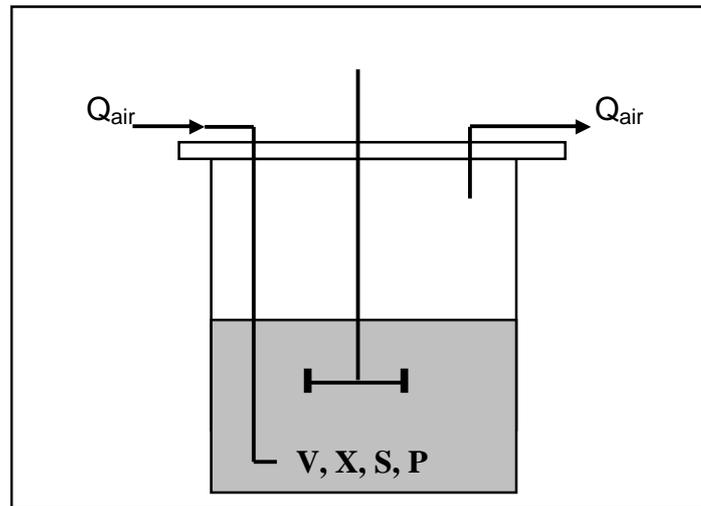
II.6.1. Calcul des paramètres cinétiques en réacteur discontinu

V : Volume du milieu (l)

X : Concentration en biomasse (g/l)

S : Concentration en substrat (glucose, fructose, saccharose) (g/l)

P : Concentration en produit (l'acide glutamique) (g/l).



Culture discontinue

II.6.1.1. Vitesses de réaction

A partir des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de formation de produits, il est possible de calculer les différentes vitesses à chaque instant (t) en déterminant la dérivée de la variable considérée par rapport au temps.

$$r_X''' = \frac{dX}{dt} \qquad r_S''' = -\frac{dS}{dt} \qquad r_P''' = \frac{dP}{dt}$$

II.6.1.2. Vitesses spécifiques

La vitesse spécifique instantanée de chaque variable (X, S, P) est définie par le rapport entre la dérivée de la variable considérée par rapport au temps et la valeur de la biomasse X à cet instant.

Les bilans matières de la biomasse X, du substrat S et du produit P, donnent :

$$\mu = \frac{r_X'''}{X} \qquad q_S = \frac{r_S'''}{X} \qquad q_P = \frac{r_P'''}{X}$$

Avec :

r_x''' : vitesse de croissance (g/l.h)

r_s''' : vitesse de consommation du substrat (g/l.h)

r_p''' : vitesse de production d'un produit (g/l.h)

μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})

q_s : vitesse spécifique de consommation du substrat (g/g.h)

q_p : vitesse spécifique de production d'un produit (g/g.h)

II.6.1.3. Productivité volumétrique:

La productivité volumétrique est la quantité de produit par unité de temps et de volume du fermenteur

$$d = \frac{P - P_0}{V} \cdot \frac{1}{t}$$

Avec :

t : durée de la fermentation (h)

d : productivité volumétrique (g/l.h)

II.6.1.4. Evaluation de la vitesse spécifique maximale de croissance

La vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) est déterminée graphiquement pendant la phase de croissance exponentielle (c'est la période pendant laquelle (μ) est maximale et constante) en traçant ($\ln X/X_0$) en fonction du temps.

CHAPITRE III.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Mise au point et optimisation d'un milieu de culture à base de jus de dattes

Cette partie consiste à optimiser la composition du milieu de culture et étudier les besoins nutritionnels de *Corynebacterium glutamicum* 2262. Cette étude a pour but de décrire les effets de la source carbonée, les sources azotées, les sels minéraux et les vitamines sur la croissance et la production d'acide glutamique. Les objectifs fixés sont :

- Explorer le potentiel de jus de datte en tant que source de carbone pour la production d'acide glutamique.
- Enrichir le milieu de jus de datte par une source d'azote de faible coût.
- Déterminer si une supplémentation en sels et en vitamines est nécessaire à la croissance et à la production d'acide glutamique.

Les expériences réalisées ci-dessous consistent en l'utilisation du jus de datte en tant que source de carbone pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262. Ce milieu est suivi d'un enrichissement en sources azotées, en sels et en vitamines.

III.1.1. Etude de l'effet de la concentration initiale des sucres totaux (glucose, fructose et saccharose) de jus de datte sur la croissance et la production d'acide glutamique

Quatre concentrations initiales en sucres totaux de jus de dattes ont été testées (20, 30, 50 et 80 g/l) en cultures discontinues. Le milieu est composé uniquement de jus de datte. Tous les essais ont été effectués dans les mêmes conditions opératoires : pH 7,6 régulé par $\text{NH}_4(\text{OH})$ 2M ; température 33°C ; agitation 900 rpm ; débit d'air 100 l/h ; inoculum 10 % (v/v). L'inoculation du fermenteur a été faite à partir d'une préculture préparée en Erlenmeyer de 250 ml et âgée de 14 heures de culture, le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle. Le choc thermique (39°C) est réalisé après 4 heures de culture pendant la phase exponentielle.

Plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1. Effet de la concentration initiale des sucres totaux (glucose, fructose et saccharose) du jus de datte sur la croissance et la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262.

Concentrations initiales en sucres totaux de jus de datte (g/l)	Biomasse max (g/l)	μ_{max} (h^{-1})	Glutamate max (g/l)	Productivité volumétrique de glutamate (g/l.h).
20	4,10	0,32	4,53	0,32
30	3,58	0,37	9,20	0,40
50	5,44	0,38	2,75	0,19
80	2,72	0,32	0,34	0,07

Ces résultats montrent que le jus de datte est favorable à la croissance et à la production d'acide glutamique à partir de *Corynebacterium glutamicum*.

Ils montrent également que la concentration maximale en acide glutamique et la productivité volumétrique ont un optimum lorsque la concentration initiale en sucres totaux est de 30 g/l. Les valeurs optimales sont respectivement 9,2 g/l et 0,4 g/l.h.

Par ailleurs, il ressort de ces résultats que la croissance n'est pas liée à la production d'acide glutamique. En effet, avec une concentration initiale en sucres totaux de 50 g/l, la biomasse est de 5,44 g/l mais avec une production maximale d'acide glutamique de 2,75 g/l inférieure à celle obtenue avec

30 g/l de sucres totaux. Ceci pourrait être expliqué par le fait que lorsque la souche se trouve dans des conditions optimales, elle a plutôt tendance à produire de l'acide glutamique que de former de la biomasse.

L'ensemble des résultats nous a mené à retenir une concentration initiale de 30 g/l de sucres totaux de jus de dattes pour la suite des essais.

Cependant, plusieurs auteurs ont montré que le jus de datte est pauvre en source azotée (2 %) (Abou-Zeid *et al.*, 1991). Pour pallier à ces limitations, d'autres sources azotées doivent être rajoutées dans le milieu à base de jus de datte afin de supporter la croissance de *Corynebacterium glutamicum* et la production d'acide glutamique.

III.1.2. Effet de la supplémentation des sources azotées sur la croissance et la production d'acide glutamique

Corynebacterium glutamicum est très exigeant du point de vue nutritionnel comme la plupart des corynébactéries, il faut donc démontrer d'une part, que la supplémentation azotée est nécessaire pour améliorer les performances de la fermentation, et d'autre part, essayer de trouver une source d'azote efficace et de faible coût.

Deux sources azotées de faibles coûts sont à notre disposition pour la réalisation de ce travail : l'urée et le sulfate d'ammonium.

III.1.2.1. Jus de datte supplémenté avec le sulfate d'ammonium

Plusieurs fermentations en mode discontinu ont été mises en œuvres en Erlenmeyers dans les mêmes conditions de température et de pH. Quatre concentrations initiales en sulfate d'ammonium (5, 8, 10, 15 g/l) ont été testées en parallèles. Les fermentations ont été réalisées dans un milieu contenant 30 g/l de sucres totaux de jus de datte.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III.2. Ils montrent que la production optimale en acide glutamique (2,95 g/l) est obtenue avec 8 g/l de sulfate d'ammonium. Cette concentration a été retenue pour la suite des travaux.

Tableau III.2. Effet de la concentration initiale de sulfate d'ammonium sur la croissance et la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262.

Sulfate d'ammonium (g/l)	Biomasse max (g/l)	Acide glutamique max (g/l)
5	3,86	2,10
8	3,44	2,95
10	3,10	2,70
15	3,32	2,50

III.1.2.2. Jus de datte supplémenté avec l'urée

Des travaux antérieurs (Davin, 2003) ont utilisé l'urée en tant que source d'azote pour la production d'acide glutamique à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu MCGC. Ils ont montré qu'il existe une concentration optimale en urée de 4 g/l. Sur la base de ces résultats, nous avons essayé de tester cette concentration sur un milieu à base de jus de datte. Pour cela, une fermentation en culture discontinue a été réalisée dans un milieu contenant 30 g/l de sucres totaux de jus de datte.

Les concentrations optimales en urée et en sulfate d'ammonium ont été testées en fermenteur pour suivre les cinétiques de croissance et de production d'acide glutamique. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III.1 (a,b).

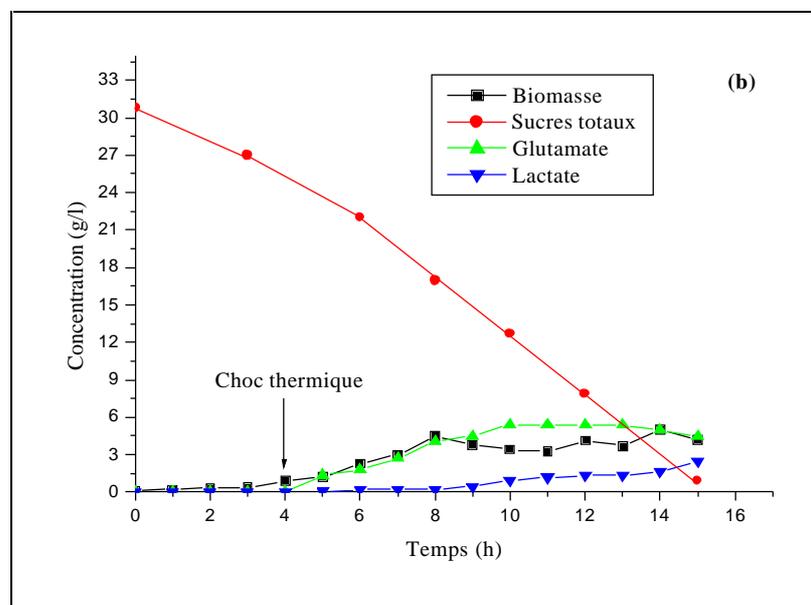
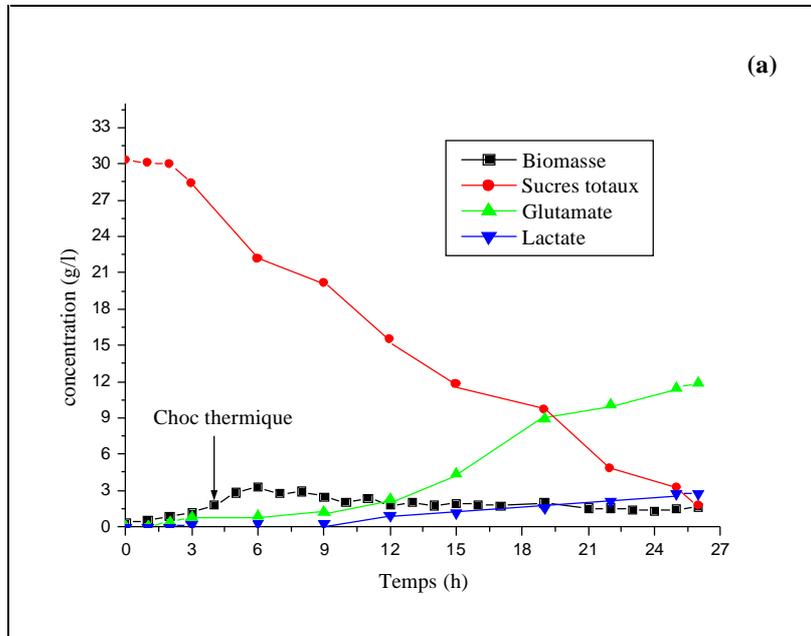


Figure III.1. (a,b) Effet des sources azotées sur les cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* sur jus de dattes (30 g/l de sucres totaux)
(a) Jus de dattes supplémenté avec du sulfate d'ammonium (8 g/l)
(b) Jus de dattes supplémenté avec l'urée (4 g/l)

A partir de ces courbes, plusieurs paramètres ont été calculés pour comparer l'efficacité des deux sources azotées.

Les résultats obtenus (Tableau III.3) montrent que les paramètres cinétiques sont affectés par la qualité nutritionnelle de la source azotée employée.

Tableau III.3. Comparaison entre les sources azotées (sulfate d'ammonium et urée) supplémentées au jus de datte en culture discontinue à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262

	Biomasse max (g/l)	Glutamate max (g/l)	•_{max} (h⁻¹)	Productivité volumétrique de glutamate (g/L.h)
Jus de datte non supplémenté (30 g/l)	3,6	9,20	0,37	0,40
Jus de datte (30 g/l) + Urée (4 g/l)	4,5	5,40	0,46	0,38
Jus de datte (30 g/l) + Sulfate d'ammonium (8 g/l)	2,92	11,91	0,39	0,46

L'urée a un effet positif sur la croissance mais pas sur la production d'acide glutamique, ce qui limite la possibilité d'utiliser cette source d'azote.

Cependant, le sulfate d'ammonium semble la meilleure alternative économique, ce composé permet d'améliorer les performances de la fermentation. En effet, on obtient une meilleure productivité volumétrique de production d'acide glutamique (0,46 g/l.h), et une meilleure production de glutamate (11,91 g/l).

Ceci pourrait être expliqué probablement par la présence des ions NH_4^+ qui activent l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) responsable de la synthèse d'acide glutamique. En effet, Tesch et *al.* (1999) ont montré chez *Corynebacterium glutamicum* que 72 % du glutamate est synthétisé à l'aide de l'enzyme (GDH) et 28 % avec l'enzyme glutamine synthétase et glutamate synthase (GS/GOGAT).

De plus, la présence d'ammonium inhibe la réaction inversée de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) ce qui limite la consommation du glutamate au cours de fermentation (Ertan, 1992).

III.1.3. Effet de la supplémentation en sels sur la croissance et la production d'acide glutamique

L'analyse bibliographique a montré que certains ions (Mn^{+2} , Mg^{+2}) sont utilisés comme cofacteurs de certaines enzymes du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* (Debay, 1997 ; Georgen et *al.*, 1997). Pour cela, tous les sels du milieu MCGC (Na_2HPO_4 3 g/l ; KH_2PO_4 6 g/l ; NaCl 2 g/l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400 mg/l ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg/l ; FeCl_3 4 mg/l ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg/l ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 mg/l ; CaCl_2 84 mg/l) ont été testés sur un milieu de fermentation contenant 30 g/l de sucres totaux et 8 g/l de sulfate d'ammonium.

Les résultats obtenus sont indiqués sur le Tableau III.4. Ils montrent que l'ajout des sels dans le milieu de fermentation présente un effet positif sur la croissance et la productivité volumétrique de production d'acide glutamique. Cependant, l'ajout des sels ne favorise pas la production d'acide glutamique. Il

serait donc intéressant d'étudier l'effet des sels séparément puis sélectionner ceux qui favorisent la production d'acide glutamique.

Néanmoins, il est nécessaire de supplémenter le milieu de fermentation en sels, car les exigences en ions pour la croissance des corynébactéries et la production de glutamate ne sont pas à négliger.

Tableau III.4. Effet de la supplémentation du jus de datte en sels sur la croissance et la production de l'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262.

	Biomasse max (g/l)	Glutamate max (g/l)	μ_{\max} (h⁻¹)	Productivité volumétrique de glutamate (g/l.h).
Jus de datte non supplémenté (30 g/l)	3,6	9,20	0,37	0,40
Jus de datte (30 g/l) + sels*	7,04	4,95	0,47	0,55

* Sels : Na₂HPO₄ 3 g/l ; KH₂PO₄ 6 g/l ; NaCl 2 g/l ; MgSO₄.7H₂O 400 mg/l ; FeSO₄.7H₂O 40 mg/l ; FeCl₃ 4 mg/l ; ZnSO₄.7H₂O 1 mg/l ; CuCl₂.2H₂O 0,4 mg/l ; MnSO₄.H₂O 4 mg/l ; CaCl₂ 84 mg/l.

III.1.4. Effet de la supplémentation en vitamines sur la croissance et la production d'acide glutamique

Vu que le milieu MCGC contient la biotine et la thiamine et sachant que *Corynebacterium glutamicum* 2262 est auxotrophe à la biotine et que la thiamine stimule la production d'acide glutamique, nous avons pensé qu'il était intéressant de les supplémenter au milieu de jus de datte.

Pour cela, ces vitamines ont été testées sur milieu contenant 30 g/l de sucres totaux de jus de datte et 8 g/l de sulfate d'ammonium. Les concentrations en biotine et en thiamine sont respectivement 2 mg/l et 20 mg/l.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau III.5. Ils montrent que l'ajout des vitamines présente un effet positif sur la croissance par rapport au jus de datte non supplémenté. La production d'acide glutamique n'est pas favorisée. Cependant, la concentration initiale en biotine doit être optimisée. En effet, Joji et al. (1965) ont montré que *Corynebacterium glutamicum* est très sensible à la biotine et peut présenter un effet inhibiteur de la production d'acide glutamique.

Tableau III.5. Effet de la supplémentation du jus de datte en vitamines (biotine et thiamine) sur la croissance et la production de l'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262.

	Biomasse max (g/l)	Glutamate max (g/l)	•_{max} (h⁻¹)	Productivité volumétrique de glutamate (g/l.h)
Jus de datte non supplémenté (30 g/l)	3,6	9,20	0,37	0,40
Jus de datte (30 g/l) + vitamines (Biotine, 2 mg/l; Thiamine, 20 mg/l)	6,12	3,16	0,43	0,26

A partir de ces résultats, la formulation du milieu à base de jus de datte est la suivante :

- Sucres totaux de jus de datte : 30 g/l
- Sulfate d'ammonium : 8 g/l
- Sels minéraux : Na₂HPO₄ 3 g/l; KH₂PO₄ 6 g/l; NaCl 2 g/l ; MgSO₄.7H₂O 400 mg/l ; FeSO₄.7H₂O 40 mg/l; FeCl₃ 4 mg/l; ZnSO₄.7H₂O 1 mg/l; CuCl₂.2H₂O 0,4 mg/l; MnSO₄.H₂O 4 mg/l ; CaCl₂ 84 mg/l
- Vitamines : Biotine, 2 mg/l; Thiamine, 20 mg/l

III.2. Effets des sources de carbones seules et mélangées sur la production d'acide glutamique à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262

Le jus de datte contient un mélange de sucres (glucose, fructose et saccharose). Pour cela, nous avons essayé dans cette deuxième partie de ce travail d'étudier l'effet des sucres seuls et mélangés sur la production d'acide glutamique. Les objectifs fixés sont :

- Effet des sucres de jus de datte sur la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262.
- Effet des sucres seuls (glucose, fructose et saccharose) sur la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262.
- Effet des sucres mélangés (glucose + fructose + saccharose) sur la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262.
- Effet de l'hydrolyse du saccharose de jus de datte par l'invertase dans le but d'améliorer les performances de la fermentation glutamique.

III.2.1. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte

Une fermentation en culture discontinue a été réalisée sur jus de datte contenant une concentration initiale en sucres totaux de 20 g/l. Cette concentration correspond aux proportions suivantes :

- Glucose (29,22 %) équivalente à 5,84 g/l
- Fructose (23,37 %) équivalente à 4,67 g/l
- Saccharose (47,40 %) équivalente à 9,48 g/l

Plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les principaux paramètres sont illustrés dans le Tableau III. 6.

Tableau III.6. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_s) : vitesse spécifique de consommation du substrat, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat (\check{S}) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

Jus de datte (20 g/l)	X max (g/l)	Glutamate max (g/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	q_s (g/g.h)	Taux de consommation du substrat (%)	\check{S} (g/g.h)
Glucose (5.85 g/l) + Fructose (4.67 g/l) + Saccharose (9.48 g/l)	4,10	4,53	0,32	Glucose : 1,64 Fructose : 0,33 Saccharose : 0,27	97,54	0,40

Les résultats obtenus ont montré que les trois sucres sont consommés simultanément mais avec des vitesses de consommation différentes. En effet, la vitesse de consommation du fructose (0,33 g/g.h) est plus faible que celle obtenue avec le glucose (1,64 g/g.h). Cependant, la vitesse de consommation du saccharose est la plus faible (0,27 g/g.h).

Du fait que le jus de datte contient un mélange de sucres (glucose, fructose et saccharose) et que les vitesses de consommation correspondantes sont différentes, il serait intéressant d'étudier les cinétiques de consommation des différents sucres par *Corynebacterium glutamicum* dans deux conditions différentes : quand ils sont seuls en solution et quand ils sont mélangés. Ceci pourrait nous renseigner sur le comportement de la souche sur jus de datte.

III.2.2. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur sucres seules

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide glutamique durant les cultures discontinues sur milieu contenant soit du glucose, soit du fructose ou du saccharose en tant que source de carbone sont montrées sur la Figure III.2. (a,b,c).

Tout d'abord, les résultats obtenus ont montré que les trois sucres sont favorables à la croissance de la souche et à la production d'acide glutamique.

A partir des résultats décrits sur la Figure III.2 (a,b,c), plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés afin de comparer les performances de fermentation sur chaque sucre : la croissance, le taux de consommation des sucres, la vitesse maximale de croissance et la productivité volumétrique de production d'acide glutamique. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau III.7.

Tableau III.7. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur sucres purs (glucose, fructose, saccharose) en culture discontinues. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_s) : vitesse spécifique de consommation du substrat, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat, (\check{S}) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

Source de carbone	X max (g/l)	Glutamate maximal (g/l)	μ_{\max} (h^{-1})	q_s (g/g.h)	Taux de consommation du substrat (%)	\check{S} (g/l.h)
Glucose (20 g/l)	5,28	1,80	0,48	3,09	100	0,13
Fructose (20 g/l)	2,68	2,44	0,30	1,66	94,72	0,17
Saccharose (20 g/l)	7,12	4,30	0,74	0,94	100	0,54

Les meilleurs résultats sont obtenus sur un milieu contenant du saccharose. Dans ce cas, la croissance, la concentration maximale en acide glutamique, le pourcentage d'utilisation du saccharose, la vitesse maximale de croissance et la productivité d'acide glutamique sont respectivement 7,12 (g/l), 4,3 (g/l), 100 %, 0,74 (h^{-1}), et 0,54 (g/l.h).

Le glucose et le fructose sont également des sources de carbone raisonnables. Par ailleurs, les vitesses de consommation des sucres sont différentes et que celle obtenue sur saccharose est la plus faible. En général, chez les bactéries les métabolismes des sucres sont différents. En effet, il a été montré chez *Corynebacterium glutamicum* que l'utilisation de chaque sucre est directement liée au mécanisme de transport du sucre correspondant (Dominguez et al., 1997).

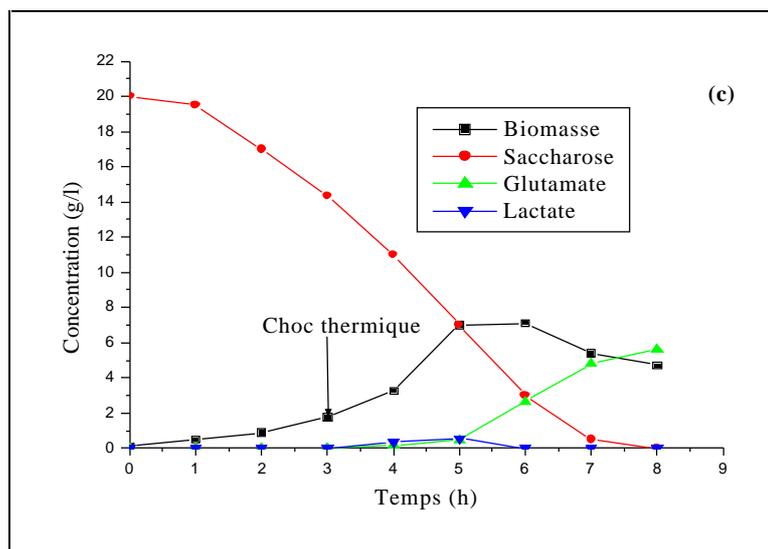
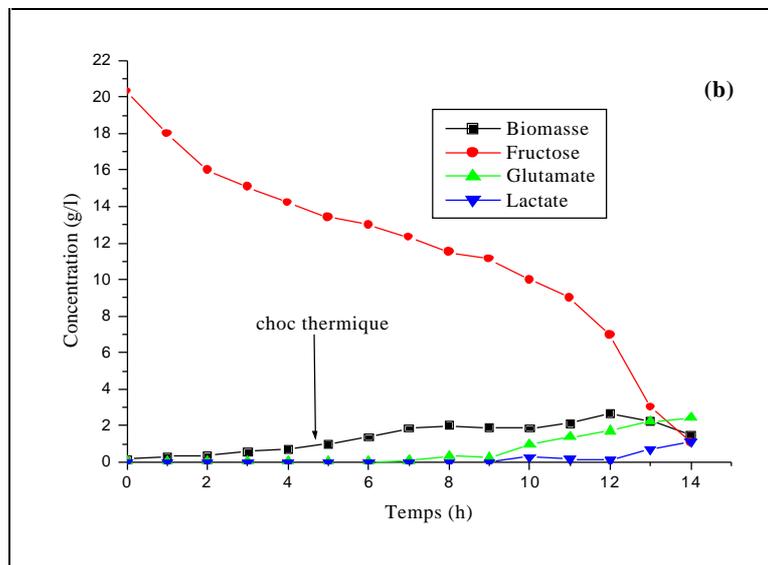
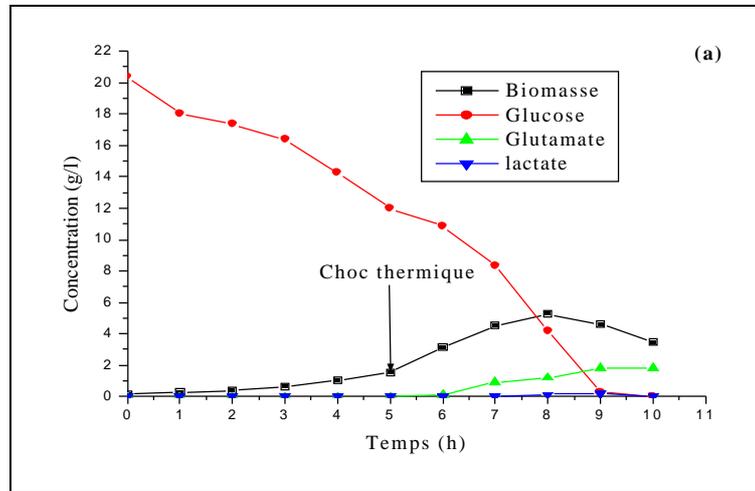


Figure III.2 (a,b,c). Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur sucres seuls en culture discontinue.
 (a) : glucose (20 g/l) ; (b) : fructose (20 g/l) ; (c) : saccharose (20 g/l).

III.2.3. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* sur sucres mélangés

Après l'analyse des résultats obtenus sur jus de datte et sur sucres seuls, il était nécessaire d'étudier le comportement de *Corynebacterium glutamicum* sur le mélange des trois sucres (glucose + fructose + saccharose) avec les mêmes proportions des sucres de jus de datte.

Ceci a été réalisé sur la base d'une concentration initiale de 20 g/l en sucres totaux.

Pour cela, une fermentation en culture discontinue a été réalisée sur un mélange de trois sucres (glucose + fructose + saccharose) avec les proportions suivantes :

- Glucose (29,22 %) équivalente à 5,84 g/l
- Fructose (23,37 %) équivalente à 4,67 g/l
- Saccharose (47,40 %) équivalente à 9,48 g/l

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III.3.

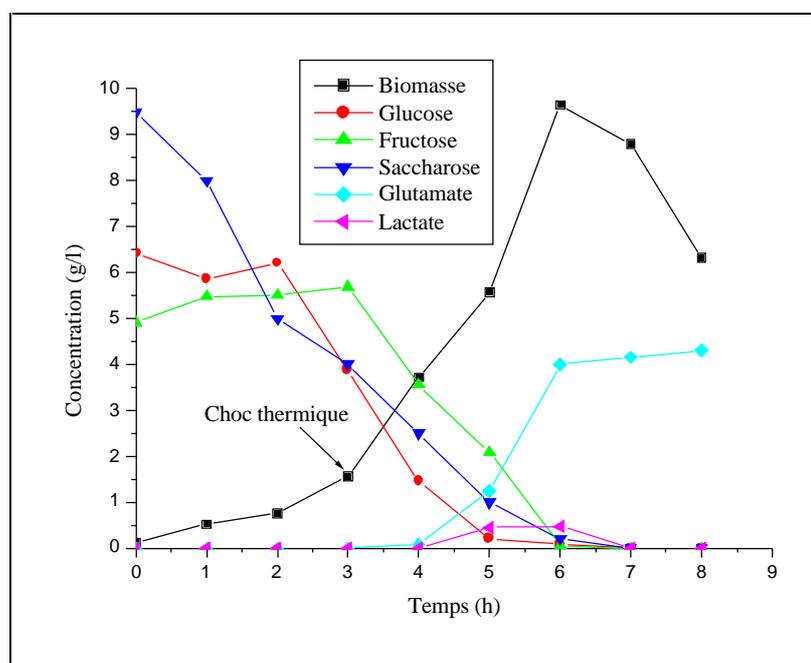


Figure III.3. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur sucres mélangés (glucose + fructose + saccharose) en culture discontinue.

En présence d'un mélange de glucose, de fructose et de saccharose, *Corynebacterium glutamicum* consomme les trois sucres de façon simultanée. Afin de mieux interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau III.8.

Tableau III.8. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sucres mélangés (glucose + fructose + saccharose) en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_s) : vitesse spécifique de consommation du substrat, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat (\check{S}) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

Source de carbone	X max (g/l)	Glutamate max (g/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	q_s (g/g.h)	Taux de consommation du substrat (%)	\check{S} (g/l.h)
Glucose (5.84 g/l) + Fructose (4.67 g/l) + Saccharose (9.48 g/l)	9,64	4,81	0,70	Glu : 1,49	100	0,60
				Fru : 0,57		
				Sacch : 0,21		

Il ressort de ces résultats que la biomasse (9,64 g/l), la concentration maximale en acide glutamique (4,8 g/l) et la productivité volumétrique d'acide glutamique (0,6 g/l.h) sont supérieures à celles obtenues sur sucres seuls.

Nos résultats sont en concordances avec ceux obtenus par Yun et *al.* (2001) et Dominguez et *al.* (1997). En effet, lorsque *Corynebacterium glutamicum* ou *Enterococcus faecalis* poussent sur un mélange de sucres, la consommation de ces sucres est simultanée et les résultats sont meilleures que ceux obtenus sur sucres seuls.

Cependant, il a été montré aussi que la vitesse de consommation du saccharose reste la plus faible. Cela veut dire que le taux d'utilisation de chaque sucre à partir du mélange est toujours dépendant de leurs capacités de transport (Yun et *al.*, 2001).

Cependant, les meilleures vitesses de consommation sont obtenues avec le glucose (1,49 g/g.h). Alors que ceux obtenus avec le fructose et le saccharose sont respectivement (0,57 g/g.h) et (0,21 g/g.h). Ceci est du probablement à la double entrée du glucose par le système phosphotransférase (PTS) et le système perméase (Mori et Shiio, 1987). Alors que le fructose et le saccharose possèdent un seul mécanisme d'entrée (PTS) (Sugimoto et Shiio, 1989a).

Dans tous les cas, la vitesse de consommation du saccharose reste la plus faible, ce qui peut causer une étape limitante de la fermentation.

Dans ce cas, nous avons pensé qu'il serait intéressant de procéder à une hydrolyse enzymatique (invertase) du saccharose du jus de datte.

III.2.4. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte hydrolysé par l'invertase

Une fermentation en culture discontinue a été réalisée sur jus de datte hydrolysée par l'invertase. Les conditions d'hydrolyse du saccharose du jus de datte sont les suivantes : 4 mg d'invertase dissoute dans 1 ml de tampon d'acétate de sodium 0,1 M, pH 8. La réaction est réalisée à pH 4,5, à une température de 55°C et à une agitation de 200 rpm pendant 20 minute (Rebros et *al.*, 2007). Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III.4.

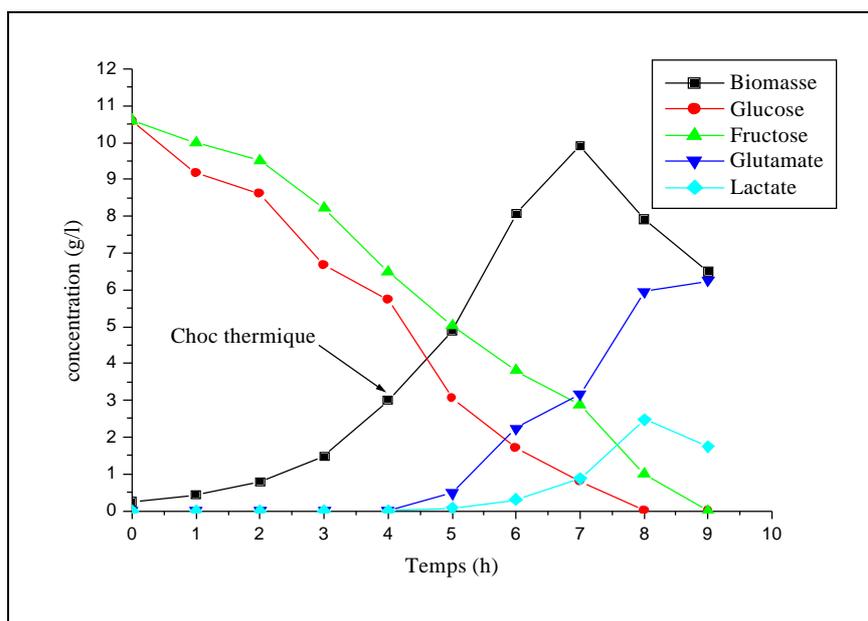


Figure III.4. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte hydrolysé par l'invertase en culture discontinue.

Afin d'interpréter les résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les principaux paramètres sont résumés dans le Tableau III.9.

Tableau III.9. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte hydrolysé par l'invertase en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_s) : vitesse spécifique de consommation du substrat, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat (\check{S}) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

	X max (g/l)	Glutamate max (g/l)	\check{S}_{max} (h ⁻¹)	q_s (g/g.h)	Taux de consommation du substrat (%)	\check{S} (g/g.h)
Jus de datte (30 g/l) sans invertase	4,10	4,53	0,32	Glu : 1,64 Fru : 0,33	97,54	0,33
Jus de datte (30 g/l) + Invertase	9,92	6,02	0,64	Glu : 2,00 Fru : 1,07	100	0,67

Dans ces conditions, les meilleures performances de la production glutamique ont été obtenues, soit 6,4 g/l. Donc, l'hydrolyse du saccharose du jus de datte par voie enzymatique permet une consommation rapide des sucres et une amélioration du procédé de production de l'acide glutamique.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était la mise au point et l'optimisation d'un milieu de culture à base de jus de datte pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture discontinue. Puis étudier les effets des sources de carbones (glucose, fructose et saccharose) quand ils sont seuls en solution et quand ils sont mélangés sur la croissance et la production d'acide glutamique.

Nous avons résumé les principaux résultats obtenus, en reprenant les différentes parties développées au cours de notre travail. Finalement, nous terminerons par les perspectives envisageables à ce travail.

La première partie du travail a essentiellement été basée sur une étude de la mise au point et l'optimisation du milieu de culture à base de jus de dattes.

Nous avons montré tout d'abord que le jus de datte est favorable à la croissance et à la production d'acide glutamique. Nous avons montré également qu'il existe une concentration optimale de sucres totaux de jus de datte égale à 30 g/l. Par ailleurs, le jus de datte seul n'était pas suffisant pour la production de biomasse et qu'il est donc nécessaire de le compléter avec d'autres sources azotées afin d'améliorer les performances de la fermentation.

L'ajout de l'urée (4 g/l) a permis d'améliorer la croissance de *Corynebacterium glutamicum* mais pas la production d'acide glutamique. Cependant, l'ajout du sulfate d'ammonium (8 g/l) a permis d'améliorer la production de glutamate ainsi que la productivité volumétrique de production d'acide glutamique. Cette dernière semble la source d'azote la plus prometteuse.

Une supplémentation en sels est nécessaire au milieu de fermentation à base de jus de datte. En effet, l'ajout des sels contenu dans le milieu MCGC a présenté un effet positif aussi bien sur la croissance que sur la productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

L'ajout de vitamines (biotine et thiamine) au milieu de culture à base de jus de dattes a permis d'améliorer la croissance de *Corynebacterium glutamicum* et non pas la production d'acide glutamique.

La deuxième partie de ce travail consiste à étudier les effets des sources de carbone (glucose, fructose et saccharose) seules et mélangées sur la croissance et la production d'acide glutamique.

Les résultats obtenus ont montré que les trois sucres sont consommés simultanément avec des vitesses de consommation différentes. En effet, la vitesse de consommation du saccharose est plus faible que celle obtenue sur glucose et fructose.

Vu que les vitesses de consommation des sucres de jus de datte sont différentes, nous avons étudié les cinétiques de consommation des différents sucres par *Corynebacterium glutamicum* en solution pure et mélangée.

Sur sucres seuls, les résultats obtenus ont montré que la meilleure production d'acide glutamique est obtenue sur saccharose (4,3 g/l) alors que sur fructose et sur glucose les concentrations en acide glutamique sont respectivement (2,44 g/l) et (1,80 g/l). Ces résultats ont montré également que la vitesse de consommation du saccharose reste la plus faible.

Sur le mélange des trois sucres (glucose + fructose + saccharose) avec les mêmes proportions des sucres contenus dans le jus de datte. Les résultats obtenus ont montré que la production d'acide glutamique est supérieure à celle obtenue sur sucres seuls. Ces résultats ont montré également que la consommation des trois sucres est simultanée et que la vitesse de consommation du saccharose reste toujours faible par rapport à celle du glucose et du fructose.

Après l'analyse de ces résultats, il ressort que la vitesse de consommation du saccharose est la plus faible dans tous les cas ce qui limite les performances de la fermentation glutamique.

L'hydrolyse du saccharose du jus de datte par l'invertase a permis une consommation rapide des sucres et une amélioration du procédé de production de l'acide glutamique.

Finalement, l'objectif du travail est atteint. Néanmoins, le sujet est loin d'être épuisé. En effet, à la suite de ce travail, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales perspectives sont les suivantes:

- Déterminer la concentration optimale en vitamines (biotine et thiamine) pour améliorer la croissance et la production d'acide glutamique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 thermo-inductible.
- Tester la supplémentation en sels du milieu MCGC seuls et mélangés et déterminer la concentration optimale de chaque sel.
- Utiliser le mode de culture semi-continue pour éviter le problème d'inhibition par excès de substrat et le mode de culture continue pour la production continue du glutamate.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abou-Zeid A., Nabeih A. Baghlaf O. (1991). The formation of oxytetracycline in a date coat medium. *Bioresource Technology*, **37**, 179-184.

Abou-Zeid A.A., Kodja S.M. (1993). Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Zentrabl. Microbiol*, **148**, 213-221.

Abou-Zeid A.A., Baeskin N.A., Baghlaf A.O. (1993). Utilization of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, **58**, 77-79.

Ahmed I.S.A., El-Gharibi K.N., Daar A.S., Kabir S. (1995). The composition and properties of date proteins. *Food Chemistry*, **53**, 441-446.

Al-Obaidi Z.S., Berry D.R. (1979). The use of deionised date syrup as a substrate for citric acid fermentation. *Biotechnology Letters*, **1**, 153-158.

Auda H., El-wandawi, Al Adhami L. (1976). Protein and amino acid composition of three varieties of Iraqi dates at different stages of development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **24**, 365-367.

Bona R., Moser A. (1997). Modelling of L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Bioproc. Eng*, **17**, 139-142.

Booij I., Piombo G., Risterucci J.M., Coupe M., Thomas D., Ferry M. (1992). Étude de la composition chimique de la datte à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits*, **47** (6), 667-677.

Booij I., Piombo G., Risterucci J.M., Thomas D., Ferry M. (1993). Sugar and free amino acid composition of five cultivars of dates from offshoots or vitroplants in open field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1553-1557.

Boughnou N. (1988). Essai de production de vinaigre à partir de déchets de dates. Thèse de Magister (INA), El-Harrach-Alger.

Burkovski A., Krömer R. (2002). Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **58**, 265-274.

Burkovski A., Krömer R. (2002). Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **58**, 265-274.

Clément Y., Escoffier B., Trombe M.C., Lanéelle G. (1984). Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. General Microbiol*, **130**, 2589-2594.

Clément Y., Lanéelle G. (1986). Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. General Microbiol*, **132**, 925-929.

Cleveland M.M., Fellers C.R. (1932). Mineral composition of dates. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition*, **4**, 267-268

Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A., Lindley N.D. (1996). Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *appl. Environ. Microbiol*, **62**, 429-436.

Cocaign-Bousquet M., Monnet C., Lindley N.D. (1993). Bath kinetic of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrates mixtures to localize bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **40**, 526-530.

Collin M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E. (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid containing coryneform bacteria. *J. general Microbiol*, **128**, 2503-2509.

Crueger W. Creuger A. (1984). Amino acid. In Brock T.D. (ed), *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Madison : Science Tech, Inc. pp. 127-147.

Daran-Lapujade P., Leyval D., Debay F., Georgen J.L., Engasser J.M. (2003). Flow cytometric monitoring of the physiological response of *Corynebacterium glutamicum* during glutamate producing processes, **48**, 551-555.

Das K., Anis M., Mohd-Azemi B.M.N., Ismail N. (1995). Fermentation and recovery of glutamic acid from palm wast hydrolysate by ion-exchange resin column. *Biotechnol. Bioeng*, **48**, 551-555.

Davin UY. (2003). • tude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la formation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit. Thèse de Doctorat, Thèse INPL, Nancy.

Debay F. (1997). • tude cinétique de la fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation physiologique par cytométrie en flux. Thèse INPL, Nancy.

Delaunay S. (1999). • tude et modification du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate. Thèse INPL, Nancy.

Delaunay S., Lapujade P., Engasser J.M., Georgen J.L. (2002). Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *J. Ind. Microbial. Biotechnol*, **28**, 333-337.

Delaunay S., Lapujade P., Mailly E., Oriol E., Engasser J.M., Lindley N.D., Georgen J.L. (1999a). An proved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microbial. Technol*, **25**, 762-768.

Delaunay S., Uy D., Baucher M.F., Engasser J.M., Guyonvarch A., Georgen J.L. (1999b). Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. *Metab. Eng*, **1**, 334-343.

Demain H., Brinbaum J. (1968). Alteration of permeability for the release of metabolites from microbial cell. *Current Topics Microbiol. Immunol*, **46**, 1-25.

Devshony S., Eteshola E., Shani A. (1992). Characteristics and some potential applications of date palm (*Phoenix dactilifera* L.) seeds and seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, **69**, 595-597.

Dhaia, J. H., Passat J. (1979). Production de sirop de datte (Debs). Projet régional de recherche sur les palmiers dattiers et les dattes dans le proche Orient et l'Afrique du Nord, FAO., Baghdad, 2-8.

Dominguez H., Nezondet C., Lindley N.D. Coccain M. (1993). Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. Biotechnol. Lett, **15**, 449-454.

Dominguez H., Rollin C., Guyonvarch A., Guerin-Kern J.L., Coccain-Bousquet Lindley N.D. (1998). Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. Eur. J. Biochem, **254**, 96-102.

Dowson V. H. W., Aten A. (1963). Récolte et conditionnement des dattes, collection FAO., 70-80.

Dowson V.H.W, Aten A. (1973). Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO. **72**: 16-51.

Duperray F., Jezequel D., Ghazi A., Letellier L., Shechter E. (1992). Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. Biochim. Biophys. Acta, **1303**, 250-258.

Eggeling L., Sahn H. (1999). L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. Appl. Microbiol. Biotechnol, **52**, 146-153.

Eggeling L., Sahn H. (2001). The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. J. Biosci. Bioeng, **92**, 201-213.

Eggeling L., Sahn H. (2003). New ubiquitous translocators: Amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and Escherichia coli. Arch. Microbiol, **180**, 155-160.

Eggeling L., Kramer R., Vrljic M., Kronenmeyer H., Sahn H. (1996). Transport mutants and transport genes of *Corynebacterium glutamicum*. Ann. NY Acad. Sciences: **782**, 191-201.

El-Akidi Hassen H. (1982). Les sucres de dattes, les fermentations et les domaines d'application dans le monde Arabe. Séminaire sur les sucres de dattes, 4-9 Décembre, 100-111.

El Baradi T.A. (1968). Processing and by-products of dates. Tropical Abstracts, **23**, 9, 541-546.

Ertan H. (1992). Some property of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. Arch. Microbiol, **158**, 35-41.

Estanove P. (1990). Note Technique: Valorisation de la datte. Options Méditerranéennes. Sér. A/N°11, 302-318.

Funabashi H., Kawaguchi A., Tomada H., Omura S., Okuda S., Iwasaki S. (1989). Binding site of cerulenine in fatty acid synthetase. J. Biochem, **105**, 751-755.

Goergen J.L., Debay F., Engasser J.M. (1997). Contraintes physiologiques favorables à la surproduction d'acide glutamique par corynébactéries. In physiologie microbienne et procédés industrielles, Société Française de Microbiologie, Paris, 105-114.

- Gourdon P. (1999).** • tude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Thèse INSA, Toulouse.
- Gutmann M., Hoischen C., Kr•mer R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochem. Biophys. Acta*, **1112**, 115-123.
- Hamad A., Mustafa A.L., El Kahtani M.S. (1982).** Possibility of utilising dates syrups as sweetening and flavouring agent in ice cream making. Proceeding of the first symposium on the Date Palm in Saudi Arabia, 23-25 mars, 544-549
- Haas A.R.C, Bliss D.E. (1935).** Growth and composition of Deglet Noor dates in relation to water injury. *Hilgardia*, **9**, 295-344
- Hirasawa T., Wachi M., Nagai K. (2000).** A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *itsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol*, **182**, 2696-2701.
- Hirasawa T., Wachi M., Nagai K. (2001).** L-glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* *itsA* mutant strains. *BMC Biotechnol*, **1**, 9-13.
- Hirose Y., Okada H. (1979).** Microbial production of amino acids. In Peppler H.J., Perlman D. (eds). *Microbial Technol.* New York, Academic Press, pp. 211-240.
- Hoichen C., Kr•mer R. (1989).** Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol*, **151**, 342-347.
- Hoichen C., Kr•mer R. (1990).** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol*, **172**, 3409-3416.
- Huchengq A., Marquet M., Welby M., Montrozier H., Goma G., Lanéelle G. (1984).** Glutamate excretion triggering mechanism : a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol*, **135**, 53-67.
- Hussein F., Moustafa S., ElKahtani M., El-Samiraie F., El-Zeid A. (1974).** Studies on physical and chemical characteristics of eighteen date cultivars grown in Saoudi Arabia. Kingdom of Saoudi Arabia Ministry of Agriculture, Research bulletin, **4**, 5-18.
- J•ger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. and Pühler A. (1996).** A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch. Microbiol*, **166**, 76-82.
- Jalaluddin A.K., Abulnaja K.O., Kumosani T.A., Abou Zeid A. (1995).** Utilisation of Saudi date sugars in production of baker's yeast. *Bioresource Technology*, **53**, 63-66
- Jetten M.S.M., Pitoc G.A., Folletie M.T., Sinskey A.J. (1994).** Regulation of phosphoenolpyruvate and oxaloacetate-converting enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **41**, 47-52.
- Joji T., Kaetsu K., Yukio I., Koichi Y. (1965).** Effects of Corn Steep Liquor and Thiamine on L-glutamic acid fermentation of hydrocarbons. *Appl. Microbiologie. A.S.M.* Vol, **13**(1).

Kamel B.S., (1979). Dates as a potential substrate for single cell protein production. *Enzyme. Microb. Technol.*, **1**, 180-182.

Kanzaki T., Okazaki H., Sugawara A., Fukuda H. (1967). L-glutamic acid fermentation. Part IV. The relation between the cellular fatty acid contents and the productivity of L-glutamic acid. *Agri. Biol. Chem.*, **31**, 1416-1420.

Kawaguchi A., Seyama Y., Sasaki K., Okuda S., Yamakamwa T. (1979). Thermal regulation of fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biochem.*, **85**, 865-869.

Kawahara Y., Takahashi-Fuke K., Shimizu E., Nakamatsu T., Nakamori S. (1997). Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1109-1112.

Kawahara Y., Yoshihara Y., Ikeda S., Hirose Y. (1990). Effect of glycine bétaine, an Osmoprotective compound on the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 574-577.

Khatchadourian H.A., Sawaya W.N., Khalil J.K., Safi W.M., Mashadi A.A. (1982). Utilisation of dates (*Phoenix dactylifera* L.), grown in the kingdom of Saudi Arabia in various date products. Proceeding of the first Symposium on the date palm in Saudi Arabia, 23-25 mars, 504-517

Kijima N., Goyal., Takada A., Washi M., Nagai K. (1998). Introduction of only limited elongation instead of filamentation by inhibition of cell division in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 227-232.

Kimura E., Abe C., Kawahara Y., Nakamatsu T. (1996). Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which recues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium Lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1565-1570.

Kimura E., Yogoshi C., Kawahara Y., Ohsumi T., Nakamatsu T., Tokuda H. (1999). Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1274-1278.

Kinoshita S. (1985). Glutamic acid bacteria. In: Demain, A.L., Solomon N.A., (Eds), *Biology of Industrial Microorganisms*. London: Benjamin / Cummings. pp. 115-142.

Kinoshita S., Nakayama K. (1978). Amino acid. In: Rose A. H.(ed.), *primary products of metabolism*. London, Academic Press. 209-261.

Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. (1957). Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193-205.

Kitano K., Sugiyama Y., Kanaki T. (1972). L-glutamate fermentation with acetic acid by an oleic requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *J. ferment. Technol.*, **50**, 183-191.

Kr•mer R. (1994). Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 75–94.

Lambert C., Erdmann A., Eikmanns M., Kr•mer R. (1995). Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4334-4342.

Lapujade P, Goergen J, and Engasser J-M. (1999). Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metabol. Eng.*, **1**, 255–261.

Lapujade P. (2000). • tude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate : importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thesis, institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K.H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA restriction patterns. *International J. System. Bacteriol.*, **41**, 255-260.

Liebl W., Klamer R., Schleifer K.H. (1989). Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 205-210.

Marienfeld S. Uhlemann E.M., Schmid R., Kr•mer R., Burkoveski A. (1997). Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **72**, 291-297.

Market M., Uribe Larrea J.L., Huchénq A., Lanéelle G., Goma G. (1986). Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 220-223.

Meers J.L., Tempest D.W., Brown C.M. (1970). Glutamine (amide)-2-oxoglutarate-amidotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. *J. Gen/ Microbiol.*, **64**, 187-194.

Mejià R., Gšmez-Eichelmann M.C., Fernández M.S. (1999). *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by excimerization of dipyrénylpropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**, 156-160.

Miescher G.M. (1975). U.S. patent 3 929 575. Mikki M.S., Al TAI W.F., Jaafar T.T. (1978). Studies on date jams1-suitability of different Commercial Date Cultivars for Jam Making. Palm and dates Res. Center, Baghdad, Iraq. *Tech. Bull.*, **6**, 10.

Momose H., Takagi T. (1978). Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1911-1917.

Mori M., Shiio I. (1985b). Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, **98**, 1621-1630.

Mori M., Shiio I. (1985a). Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.*, **97**, 1119-1128.

Mori M., Shiio I. (1987). Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2671-2678.

- Munier P. (1973).** La datte. In : le palmier dattier. Paris : G.- P. Maison neuve et la rose. 141-150.
- Mustafa A.I., Hamad A.M., Kahtani M.S. (1982).** Date varieties for jam production. Proceeding of the first Symposium on the Date palm Saudi Arabia, 23-25 March, 496-501.
- Nakayama K., Sato Z., Tanaka H., Kinoshita S. (1964).** Growth of glutamic acid producing bacterium and related bacteria. II Effect of chelating agent and its relation to inorganic salt. J. Gen. Appl. Microbiol, **10**, 181-199.
- Nampoothiri K.M., Hoischen C., Bathe B., Mückel B., Pfefferle W., Krumbach K., Sahn H., Eggeling L. (2002).** Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol, **58**, 89-96.
- Nancib N., Nancib A. Boudrant J. (1997).** Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. Biores. Technol, **60**, 67-71.
- Nemroud, D. (1982).** Le laboratoire pilote d'extraction et de commercialisation des sucres de dattes. Séminaire sur les sucres de dattes, 4-9 Decembre, Baghdad, 211-219.
- Ning He, Yin Li, Jian Chen. (2004).** Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. Bioresource Technology, **94**, 99-105.
- Nunheimer T.D., Birnbaum J., Ihnen E.D., Demain A.L. (1970).** Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol, **20**, 215-217.
- Nur A., Zin A.M., Ahmed A.R. (1981).** Physico-chemical composition of common Sudanese date cultivars and their suitability for Jam making. The Date Palm Journal, **1**, 99-106
- Park S.K., Kim H.K., Yoo S.K., Oh T.K., Lee J.K. (2000).** Characterization of glk, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett, **188**, 209-215.
- Patron A., Patron S., Swinzow H. (1954).** La composition chimique des dattes marocaines considérées du point de vue de leur valeur alimentaire. Fruits, **9**, 443-449
- Peters-Wendish P.G., Wendisch V.F., Paul S., Eikmanns B.J. and Sahn H. (1997).** Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology, **143**, 1095-1103.
- Pons B.J., Duchiron F., Duperray F., Guyonvarch A., Melaouene S., More J. (1993).** Les corynébactéries. In Leveau J.Y., Bouix M. (Eds). Microbiologie industrielle. Paris: Tec & Doc-Lavoisier et Apria, pp. 393-421.
- Rebros M., Rosenberg M., Mlichov^a Z., Krištofík^a L. (2007).** Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. Food Chemistry, **102**, 784-787.
- Rollin C., Morgant V., Guyonvarch A. (1995).** ¹³C NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways. Eur. J. Biochem. Sc, **227**, 488-493.
- Rygg G.L. (1948).** Acidity in relation to quality in the date fruit. Annual report. Date Growers Institute, **25**, 32-33.

Rygg G.L. (1950). Investigations of harvesting Deglet Noor dates, including bunch cutting and delayed packing. Annu. Rep. Date Growers' Inst, **27**, 22-25.

Rygg G.L. (1953). Factors affecting the spoilage of dates at room temperature. Annual report. Date Growers Institute, **30**, 10-14.

Sawaya, W. N., Khatchadourian H.A., Khalil J.K., Safi W.M., Al-Shalhat A. (1982). Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. J. Food Sci, **47**, 1489-1497.

Sawaya W.N., Miski A.M., Khalil J.K., Khachadourian H.A., Mashadi A.S. (1983). Physical and chemical characterization of the major date varieties grown in Saudi Arabia. I. Morphological measurements, proximate and mineral analyses. Date Palm Journal, **2** (1), 1-25.

Schulz A.A., Collett H.J., Reid S.J. (2001). Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. FEMS Microbiol. Lett, **205**, 361-367.

Sekine H., Shimada T., Hayashi C., Ishiguro A., Tomita F., Yokota A. (2001). H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolished glutamic acid production with enhancement of glucose production rate. Appl. Microbiol. Biotechnol, **57**, 534-540.

Shibikawa M., Kurima M., Okabe S., Ohsawa T. (1968). L-glutamic acid fermentation with melasses. Part X. On the difference in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate between fatty acid derivative and penicillin. Agric. Biol. Chem, **32**, 641-645.

Shibikawa M., Ohsawa T. (1966). L-glutamic acid fermentation with melasses. Part VI. Effect of the saturated-unsaturated fatty acid ration in the cell membrane fraction on the extracellular accumulation of L-glutamate. Agric. Biol. Chem, **30**, 750-758.

Shibukawa M., Kurima M., Okabe S., Ohsawa T. (1968). L-glutamic acid fermentation with melasses. Part X. On the difference in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate between fatty acid derivative and penicillin. Agric. Biol. Chem, **32**, 641-645.

Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T. (1960). Glutamic acid formation from glucose by bacteria. III. On the pathway of pyruvate formation in *Brevibacterium flavum* N° 2247. J. Biochem, **47**, 414-421.

Shiio I., Sugimoto S., Kawamura K. (1990). Effect of carbon source of the yield of amino acid production and sucrose metabolism in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem, **54**, 1513-1519.

Shiio I., Ujigawa K. (1978). Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. J. Biochem, **84**, 647-657.

Shiratsuchi M., Kunonuma H., Kawahara Y., Yoshihara Y., Miwa H., Nakamori S. (1995). Simultaneous and high fermentative production of L-lysine and L-glutamic acid using a strain of *Brevibacterium lactofermentum*. Biosci. Biotechnol. Biochem, **59**, 83-86.

Sommerson N.L., Phillips T. (1962). U.S. Patent, 3080 297.

- Sonntag K., Schwinde J., Graaf A.A.de, Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W., Sahn H. (1995).** ¹³C NMR Studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **44**, 489-495.
- Stuible H.P., Meier S., Schweizer E. (1997).** Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine: protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *J Biochem*, **248**, 481-487.
- Stuible H.P., Wagner C., Andreou I., Huter G., Haselmann J., Schweizer E. (1996).** Identification and functional differentiation of the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *J Biochem*, **178**, 4787-4793.
- Sugimoto S.I., Shio I. (1987).** Relation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem*, **51**, 101-108.
- Sugimoto S.I., Shio I. (1989a).** Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructose kinase and 6-phosphofructose kinase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem*, **53**, 1261-1268.
- Sugimoto S.I., Shio I. (1989b).** Regulation of enzymes for erythrose-4-phosphate synthesis in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem*, **53**, 2080-2087.
- Sun Z., Yu Z., Yang Y., Jin H., Yan. (1989).** Fermentation production of L-glutamic acid from rice hydrolysate by temperature-sensitive mutant *Corynebacterium crenatum* N 1. *Gongye Weishengwu*, **19**, 9-14.
- Sung H.C., Tachiki T., Kumagai H., Toshikura T. (1984).** Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*. *J. ferment. Technol*, **62**, 371-376.
- Takinami k., Yamada Y., Odaka H. (1966).** Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. *Agri. Biol. Chem*, **30**, 674-682.
- Takinami K., Yoshii H., Tsuru H., Okada H. (1965).** Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. III. Biotin- tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium Lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem*, **29**, 351-359.
- Tauch A., G tke S., P hler A., Kalinowski J., Thierbach G. (2002).** The alanine racemase gene *alr* in an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. *J. Biotechnol*, **99**, 79-91.
- Tesch M., Eikmanns. B.J., De Graaf A.A., Sahn H. (1998).** Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and glutamate dehydrogenase-deficient mutant. *Biotechnol. Lett.* **20**: 953-957.
- Tobias G., Doris R., Volker F.W. (2005).** Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metabolic Engineering*, **7**, 291-301.
- Turrel F. (1940).** Structural and chemical factors in relation to fungus spoilage of dates. *Ann. Rep. Date Growers' Inst*, **17**, 5-11.

Umerie S.C., Ekwealor I.A., Nwagbo I.O. (2000). Lysine production by *Bacillus laterosporus* from various carbohydrates and seed meals. *Bioresource Technology*, **75**, 249-252.

Von der Osten C.H., Gioannetti C., Sinskey A.J. (1989b). Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol. Lett*, **11**, 11-16.

Von der Osten C.H., Barbas C.F., Wong C.H., Sinskey A.J. (1989a). Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol/Microbiol*, **3**, 1625-1637.

Wendisch V.F., Graaf A.A.D., Sahn H., Eikmanns B.J. (2000). Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol*, **182**, 3088-3096.

Wijayarathna C.D., Wachi M., Nagai K. (2001). Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycane synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **55**, 466-470.

Yousif A.K., Benjamin N.D., Kado A., Mehie Addin S., Ali S.M. (1982). Chemical composition of four Iraq date cultivars. *Date Palm Journal*, **1**, 285-294.

Youssef M.K.E., El-Geddawy M.A.H., El-Rify M.N., Ramadan B.R. (1992). Study of amino acid, organic acid and free sugar composition of new valley dates and certain date products. *Acta Alimentaria*, **21**, 3, 325-335