

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## Thèse

Présentée par

**Mouffok Abdenacer**

Pour obtenir le diplôme de

**Doctorat en Sciences**

*Filière : Biologie*

*Spécialité : Microbiologie*

Thème

**Étude de la production d'acide glutamique à partir de jus de datte  
par *Corynebacterium glutamicum* 2262 thermo-inductible**

Soutenue publiquement le : 18/04/2017

Devant le Jury

Président : Guechi Abdelhadi

Pr. UFA Sétif 1

Directeur : Nancib Nabil

Pr. ATRBSA Constantine

Examineurs : Karam Noureddine

Pr. U. Oran

Benallaoua Said

Pr. U. Béjaia

Daba Hocine

Pr. UFA Sétif 1

Boulahrouf Abderrahmane

Pr. U. Constantine 1

### Liste des publications dans des revues:

- **MOUFFOK A.**, BEDAIDA I., NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2012). Sequential optimization approach for enhanced production of glutamic acid from *Corynebacterium glutamicum* 2262 using date juice. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **17**, 795-803.

### Liste des communications:

- **MOUFFOK A.**, NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2009). Effets des sources de carbones seules et mélangées (de jus de datte) sur la production d'acide glutamique à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262. XV<sup>ème</sup> journées nationales de microbiologie (15 et 16 Novembre), Université de Bejaia.
- **MOUFFOK A.**, BEDAIDA I., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2010). Application des modèles statistiques pour l'optimisation des constituants du milieu pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte. XVI<sup>ème</sup> journées nationales de microbiologie (10 et 11 Novembre), Université de Chlef.
- **MOUFFOK A.**, TAMINE M., KANOUNI L., NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2011). Production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte : optimisation des paramètres physiques en utilisant le modèle Box-Behnken. XVII<sup>ème</sup> journées nationales de microbiologie (20 et 21 Novembre), Université de Sétif.
- DALI N., CHOUAL W., **MOUFFOK A.**, NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2012). Application du modèle Box-Behnken pour l'optimisation de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte. XVII<sup>ème</sup> journées nationales de microbiologie (26 et 27 Novembre), Université de Tizi-Ouzou.
- Nancib A., Nancib N., **MOUFFOK A.** et BOUDRANT J. (2013). Application of Box-Behnken design in optimisation for glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* 2262. *SFGP - XIV<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés*.
- Nancib A., Nancib N., **MOUFFOK A.** et BOUDRANT J. (2013). Fed-batch production of glutamic acid from date juice by *Corynebacterium glutamicum* 2262. *SFGP - XIV<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés*.
- Nancib A., Nancib N., CHOUAL W., **MOUFFOK A.** et BOUDRANT J. (2014). Optimisation de la production d'acide glutamique par la méthode de surfaces de réponse. 9<sup>ème</sup> congrée francophone de génie des procédés. Agadir. Maroc.

### Liste des publications dans des actes de proceedings:

- DALI N., CHOUAL W., **MOUFFOK A.**, NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2012). Application du modèle Box-Behnken pour l'optimisation de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte. XVII<sup>ème</sup> journées nationales de microbiologie (26 et 27 Novembre), Université de Tizi-Ouzou.
- **MOUFFOK A.**, TAMINE M., KANOUNI L., NANCIB A., NANCIB N., GOERGEN J-L. et BOUDRANT J. (2011). Production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte : optimisation des paramètres physiques en utilisant le modèle Box-Behnken. Les XVI<sup>èmes</sup> journées nationales de microbiologie (20 et 21 Novembre), Université de Sétif.

## **REMERCIEMENTS**

*Louanges à Dieu le tout puissant et le miséricordieux qui a guidé mes pas vers cette issue et qui m'a donné la volonté, la force et la foi pour réaliser ce modeste travail.*

*Je remercie mon directeur de thèse le professeur **Pr. NANCIB Nabil** qui a accepté avec toute modestie de m'encadrer, malgré ses multiples charges, tout le long de ces années d'études. Je le remercie pour son aide, sa patience, ses conseils précieux qui ont conduit à l'achèvement ce travail.*

*Je remercie également madame NANCIB Aicha pour m'avoir aidé et m'avoir fait partager ses remarques.*

*Ma vive reconnaissance va au **Pr. Guechi Abdelhadi** professeur à l'université de Sétif-1 d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'aux **Pr. Benallaoua Said** de l'université de Béjaia, **Pr. Karam Noureddine** de l'université de Oran, **Pr. Daba Hocine** de l'université de Sétif-1 et de **Pr. Boulahrouf Abderrahmane** de l'université de Constantine-1 d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Ma gratitude va aussi au **Dr. Yacine Benguerba** de l'Université Sétif-1 pour leur aide précieuse et leurs encouragements.*

*Je remercie également ma femme, mes enfants qui ont montré une solidarité, attentive et encourageante à la fois.*

*Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail et que je ne l'ai pas mentionné par son nom, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.*

## الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج حمض الغلوتاميك من طرف *Corynebacterium glutamicum* 2262 باستعمال وسط غذائي يحتوي على عصير التمر.

تم اختبار فعالية هذه البكتيريا في عدة تجارب زرع غير المستمر، يهدف هذا الجزء إلى تحسين عملية إنتاج حمض الغلوتاميك وتحديد الشروط المثلى للزرع غير المستمر، وذلك باستعمال نموذج احصائي Box-Behnken. والنتائج المتحصل عليها أثبتت فعالية هذا النموذج الإحصائي في تحسين تركيز حمض الغلوتاميك (58,57 غال).

تم في الجزء الثاني تحديد استراتيجية لتغذية المخمر في الزرع النصف مستمر لتحسين مردود عملية التخمر. العاملان اللذان يؤثران على حسن سير عملية التخمر هما: استراتيجية التغذية ومكونات الوسط الغذائي. كمية حمض الغلوتاميك المنتجة أثناء الزرع النصف مستمر تحسنت مقارنة بتلك المحصل عليها أثناء الزرع غير المستمر بتركيز (137,92 غال)، وإنتاجية الغولتومات تقدر بـ 4,3 غال. سا. وتحسن إنتاج الغلوتامات عند تغذية المخمر باستمرار بـ 1,7 مرة مقارنة مع تغذيته بدفعات متقطعة، و 2,35 مرة مقارنة بالزرع غير المستمر.

وتم في الجزء الثالث دراسة فعالية البكتيريا في مخمر الزرع مستمر. فقمنا بدراسة تأثير معدل التخفيف ومكونات الوسط الغذائي على نمو البكتيريا وإنتاج الغلوتامات. وتم الحصول على أحسن النتائج (99,04 غال) عند استعمال معدل تخفيف:  $0,05 \text{ h}^{-1}$ ، ووسط تغذية مكون من عصير التمر والملح كبريتات الأمونيوم. ثم تمت مقارنة حركية البكتيريا في وسط زرع مستمر والنصف مستمر.

**الكلمات المفتاحية:** التمر، النموذج Box-Behken، *Corynebacterium glutamicum*، حمض الغلوتاميك، الزرع غير المستمر، النصف مستمر والمستمر.

## RESUME

Ce travail concerne l'amélioration du procédé de production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur un milieu à base de jus de dattes en mode discontinu, semi-continu et continu.

Dans une première partie, les performances de la souche en culture discontinue ont été testées. Le but de cette partie est de déterminer les conditions optimales de fermentation afin d'obtenir une concentration finale en acide glutamique la plus élevée possible. Afin d'optimiser les conditions de culture, des cultures en mode discontinu ont été réalisées en utilisant un modèle statistique de type Box-Behnken. Ce modèle nous a permis de déterminer la bonne combinaison et l'optimisation de plusieurs paramètres pour une meilleure production de glutamate. Les résultats obtenus ont montré que les performances de la production d'acide glutamique ont été nettement améliorées. En effet, Ce modèle a permis l'obtention d'une concentration finale en glutamate de  $58,57 \text{ g.l}^{-1}$ .

Par la suite, nous avons défini et mis en œuvre, une stratégie d'alimentation en culture semi-continue permettant d'améliorer les performances de la fermentation en culture semi-continue. Deux stratégies d'alimentation ont été préconisées: la première consiste à alimenter la culture par des ajouts pulsés et la deuxième consiste à alimenter la culture de façon continue. Les résultats obtenus ont montré que la stratégie d'alimentation continue donne les meilleurs résultats. En effet, la concentration maximale en glutamate est de  $137,92 \text{ g.l}^{-1}$  et la productivité volumétrique de glutamate est de  $4,3 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Ce mode d'alimentation a permis d'améliorer la production d'acide glutamique de 1,17 fois que celle obtenue en culture alimentée par pulses et environ de 2,35 fois que celle obtenue en culture discontinue.

Enfin, dans une dernière partie, les performances de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 ont été testées en mode continu. L'étude a porté sur les effets de différents composants du milieu d'alimentation et du taux de dilution sur la production du glutamate. Plusieurs fermentations ont été réalisées en utilisant différents composants de la solution d'alimentation à des taux de dilution variables. Dans ce mode de culture, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un taux de dilution de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  et une solution d'alimentation composée de jus de datte et du sulfate d'ammonium permettant d'atteindre une concentration finale en acide glutamique de  $99,04 \text{ g.l}^{-1}$ . Le comportement cinétique de cette bactérie en culture continue a été comparé avec celui identifié en culture semi-continue.

**Mots clés :** Dattes ; *Corynebacterium glutamicum*; acide glutamique ; modèle Box-Behnken ; cultures discontinues, semi-continues et continues.

## SUMMARY

This work concerns the improvement of the process for the production of glutamate by *Corynebacterium glutamicum* 2262 on a juice of date medium in batch, fed batch and continuous mode.

In the first part, the performance of the strain in the batch culture was tested. The aim of this section was to determine the optimum fermentation conditions to obtain the highest possible glutamic acid concentration. To optimize the culture conditions, batch cultures were carried out using a statistical model Box-Behnken. This model allowed us to determine the right combination of several parameters and their optimization for a better glutamate production. The obtained results showed that the performance of glutamic acid production was significantly improved. Indeed, this model gave a final glutamate concentration of  $58.57\text{g.l}^{-1}$ .

In the second part, we defined and implemented a fed batch culture strategy to improve the performance. Two feeding strategies were recommended: the first was to feed the culture by pulsed additions and the second was to feed the culture continuously. The best results were obtained with the continuous feeding strategy. The maximum glutamate concentration was  $137.92\text{g.l}^{-1}$  and the volumetric productivity of glutamate was  $4.3\text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ . In this feeding mode, the glutamic acid production was improved by 1.17 times that obtained in the pulses fed culture and about 2.35 times that obtained in batch culture.

In the last part, the performances of the glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 were tested continuously. The study examined the effects of various components of the feeding medium and the dilution rate on the growth and glutamate production. Several fermentations were carried out using different components of the feed solution at varying dilution rates. In this culture mode, the best results were obtained with a dilution rate of  $0.05\text{h}^{-1}$  and a feed solution composed of date juice and ammonium sulfate to achieve a final glutamic acid concentration of  $99.04\text{g.l}^{-1}$ . The kinetic behavior of this strain in continuous culture was compared with that identified in the semi-continuous culture.

**Keywords:** Dates; *Corynebacterium glutamicum*; glutamic acid; Box-Behnken model; batch, fed batch and continuous cultures.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
<b>I.1. ACIDE GLUTAMIQUE ET MICROORGANISMES PRODUCTEURS .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.1. Historique .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.2. Acide glutamique .....</b>	<b>7</b>
I.1.2.1. Présentation du L-glutamate et du monosodium glutamate.....	7
I.1.2.1.1. Le L-Glutamate.....	7
I.1.2.1.2. Le monosodium glutamate .....	8
I.1.2.2. Utilisations de l'acide glutamique.....	9
<b>I.1.3. Les microorganismes producteurs de glutamate : Corynébactéries.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1.4. Procédés de production du glutamate par fermentation.....</b>	<b>10</b>
I.1.4.1. Amélioration du procédé de production du glutamate.....	10
I.1.4.2. Milieux de culture .....	12
I.1.4.2.1. La composition du milieu de culture .....	12
I.1.4.2.2. Paramètres physico-chimiques .....	14
I.1.4.2.3. Mode culture.....	15
<b>I.1.5. Métabolisme central des Corynébactéries .....</b>	<b>17</b>
I.1.5.1. La Biosynthèse du glutamate.....	17
I.1.5.2. Entrée des sucres dans la cellule.....	18
I.1.5.3. Glycolyse et voie des pentoses phosphates .....	20
I.1.5.4. Cycle de Krebs et voies anapérotyques .....	22
I.1.5.5. Sécrétion de l'acide glutamique .....	24
<b>I.2. LA DATTE .....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.1. Définition de la datte.....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.2. Répartition géographique du palmier dattier .....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.3. Les variétés de dattes .....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.3. Production des dattes.....</b>	<b>27</b>
<b>I.2.4. Valeur nutritionnelle de la datte.....</b>	<b>27</b>
<b>I.2.5. Valorisation des sous-produits de datte en substances à forte valeur ajoutée .....</b>	<b>28</b>
I.2.5.1. Acides organiques .....	30
I.2.5.2. Exo-polysaccharides.....	32
I.2.5.3. Autres substances à haute valeur ajoutée.....	35

<b>I.3. PLANS D'EXPÉRIENCES .....</b>	<b>39</b>
<b>I.3.1. Définition et domaine d'application des plans d'expériences .....</b>	<b>39</b>
<b>I.3.2. Différents types des plans d'expériences .....</b>	<b>40</b>
I.3.2.1. Plans de criblage.....	41
I.3.2.1.1. Plans factoriels complets à 2 niveaux .....	41
I.3.2.1.2. Plans fractionnaires à deux niveaux $2^{k-p}$ .....	42
I.3.2.1.3. Plans de Plackett-Burman .....	43
I.3.2.2. Plans de modélisation .....	44
I.3.2.2.1. Plan composite centrale .....	44
I.3.2.2.2. Modèle de Box-Behnken .....	45
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>47</b>
<b>II.1. MATERIEL ET PRODUITS CHIMIQUES .....</b>	<b>48</b>
<b>II.1.1. Matériel .....</b>	<b>48</b>
<b>II.1.2. Produits .....</b>	<b>48</b>
<b>II.2. PRESENTATION DE LA SOUCHE .....</b>	<b>50</b>
II.2.1. Caractéristiques de l'espèce bactérienne <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	50
<b>II.3. MILIEUX DE CULTURES.....</b>	<b>51</b>
II.3.1. Milieu de préculture .....	51
II.3.2. Milieu de fermentation.....	52
II.3.3. Milieu d'alimentation .....	52
<b>II.4. STERILISATION .....</b>	<b>52</b>
<b>II.5. CONDUITE DES FERMENTATIONS .....</b>	<b>52</b>
II.5.1. Conservation de la souche.....	52
II.5.2. Préparation de l'inoculum .....	53
II.5.3. Cultures .....	53
II.5.3.1. Culture en fioles d'Erlenmeyer .....	53
II.5.3.2. Culture en fermenteur .....	54
II.5.4. Régulations des conditions physico-chimiques .....	54
II.5.4.1. Protocole des fermentations discontinues .....	55
II.5.4.2. Protocole des fermentations semi-continues .....	56
II.5.4.3. Protocole des fermentations continues .....	56
<b>II.6. MÉTHODES ANALYTIQUES.....</b>	<b>56</b>

<b>II.6.1. Biomasse</b> .....	<b>56</b>
<b>II.6.2. analyse enzymatiques</b> .....	<b>57</b>
II.6.2.1. Principe du dosage de L-Glutamate .....	57
II.6.2.2. principe du dosage du L-Lactate .....	57
<b>II.6.3. Dosage du saccharose /D- glucose /D-fructose</b> .....	<b>58</b>
II.6.3.1. Principe du dosage du D-Glucose .....	58
II.6.3.2. Principe du dosage du D-Fructose .....	58
II.6.3.3. Principe du dosage du Saccharose .....	59
<b>II.7. INTERPRETATION DES DONNEES CINETIQUES</b> .....	<b>59</b>
<b>II.7.1. Calcul en réacteur discontinu (batch)</b> .....	<b>59</b>
<b>II.7.2. Calcul en réacteur semi-continu (fed-batch)</b> .....	<b>61</b>
<b>II.7.3. Calcul en réacteur continu</b> .....	<b>63</b>
<b>II.8. LES PLANS D'EXPÉRIENCES</b> .....	<b>66</b>
<b>II.8.1. Plans de Box-Behnken</b> .....	<b>66</b>
<b>III. RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>68</b>
<b>III.1. MISE AU POINT ET OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE DE</b> <b><i>CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM</i> A BASE DE JUS DE DATTE</b> .....	<b>69</b>
<b>III.1.1. Optimisation de la température d'induction, le temps d'induction et le ratio C/N) par le modèle de</b> <b>Box-Behnken</b> .....	<b>71</b>
III.1.1.1. Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu optimisé en Erlenmeyer .....	76
<b>III.1.2. Optimisation de l'agitation, l'âge de l'inoculum et le débit d'air par le modèle Box-Behnken en</b> <b>fermenteur</b> .....	<b>77</b>
III.1.2.1. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 dans les conditions de culture optimales .....	82
<b>III.1.3. Optimisation de la biotine, la source de carbone et la source d'azote par le modèle Box-Behnken en</b> <b>Erlenmeyers</b> .....	<b>84</b>
III.1.3.1. Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé en Erlenmeyer ...	89
<b>III.1.4. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur le milieu de culture optimisé en fermenteur</b> .	<b>92</b>
<b>III.2. CINETIQUE DE <i>CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM</i> 2262 EN CULTURE</b> <b>SEMI-CONTINUE</b> .....	<b>95</b>
<b>III.2.1. Etude cinétique de la fermentation discontinue</b> .....	<b>95</b>
<b>III.2.2. Étude cinétique des fermentations semi-continues</b> .....	<b>96</b>

III.2.2.1. Fermentation semi-continue alimentée par pulses .....	97
III.2.2.2. Culture semi-continue avec alimentation continue .....	99
III.2.2.2.1. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte .....	100
III.2.2.2.2. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte et en sulfate d'ammonium .....	101
III.2.2.2.3. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte, en sulfate d'ammonium et en sels minéraux .....	103
<b>III.3. CINETIQUE DE <i>CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM</i> 2262 EN CULTURE</b>	
<b>CONTINUE.....</b>	<b>107</b>
<b>III.3.1. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul .....</b>	<b>108</b>
<b>III.3.2. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes et le sulfate d'ammonium .....</b>	<b>110</b>
<b>III.3.3. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux .....</b>	<b>112</b>
<b>III.3.4. Comparaison des trois techniques d'alimentation .....</b>	<b>115</b>
<b>III.3.5. Comparaison des cinétiques en culture continue et semi-continue.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b><i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>.....</b>	<b>121</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>126</b>

## Liste des figures

<b>Figure I.1.</b> Présentation du glutamate de sodium sous forme de poudre cristalline blanche.....	8
<b>Figure I.2.</b> Formule de la molécule de glutamate de sodium .....	8
<b>Figure I.3.</b> Morphologie des cellules de <i>Corynebacterium glutamicum</i> observées au microscope électronique (Wieschalka, 2012).....	10
<b>Figure I.4.</b> Modèle d'induction de la production du glutamate chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Yasueda, 2014).....	12
<b>Figure I.5.</b> La biomasse en fonction du temps dans un processus semi-continu (Eyer k. et al., 2008).....	16
<b>Figure I. 6.</b> Schéma d'un processus de culture continue.....	17
<b>Figure I.7.</b> Voies de biosynthèse du glutamate (Kumar et al., 2014).....	18
<b>Figure I.8.</b> Systèmes de transport des sucres chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Eggeling et Bott, 2005).....	19
<b>Figure I.9.</b> Voie de la glycolyse chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Dandekar et al., 1999) .....	21
<b>Figure I.10.</b> Voie des pentoses phosphate (Serge, 2004).....	22
<b>Figure I.11.</b> Schéma du cycle de Krebs et des voies anapérotyques chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Wada, 2015).....	23
<b>Figure I.12.</b> Représentation schématique d'un mécanisme (possible) de la production de L-glutamate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Wachi, 2013).....	25
<b>Figure I.13.</b> Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006). .....	40
<b>Figure I.14.</b> Plan factoriel complet à deux facteurs .....	42
<b>Figure I.15.</b> Plan composite pour deux facteurs (Goupy, 2006).....	45
<b>Figure I.16.</b> Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs. ....	45
<b>Figure II.1.</b> Propagation de la souche ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262). ....	53
<b>Figure II.2.</b> Description d'un fermenteur (BIOLAFITTE & MORITZ) avec ses capteurs. ....	54
<b>Figure III.1.</b> Représentation graphique des réponses mesurées en fonction des réponses théoriques.....	72

<b>Figure III.2 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) montrant l'effet d'interaction entre le temps de l'induction et le ratio C/N .....	74
<b>Figure III.3 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate montrant l'effet de l'interaction entre la température et le temps d'induction .....	75
<b>Figure III.4 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate montrant l'effet de l'interaction entre la température d'induction et le ratio C/N.....	75
<b>Figure III.5.</b> Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé .....	77
<b>Figure III.6.</b> Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévues .....	78
<b>Figure III.7 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par <i>C. glutamicum</i> 2262 montrant l'effet de l'interaction entre le débit d'air et l'âge d'inoculum .....	80
<b>Figure III.8 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par <i>C. glutamicum</i> 2262 montrant l'interaction entre le débit d'air et l'agitation.....	81
<b>Figure III.9 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par <i>C. glutamicum</i> 2262 montrant l'interaction entre l'âge d'inoculum et l'agitation.....	81
<b>Figure III.10.</b> Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 dans les conditions de culture optimales.....	83
<b>Figure III.11.</b> Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévues .....	86
<b>Figure III.12 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de l'azote total et la biotine sur la production du glutamate .....	88
<b>Figure III.13 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de sucres de dattes et la biotine sur la production du glutamate .....	88
<b>Figure III.14 (a,b).</b> Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de sucres de dattes et l'azote total sur la production du glutamate .....	89
<b>Figure III.15 (a,b).</b> Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu optimisé .....	91
<b>Figure III.16.</b> Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en fermenteur dans les conditions optimales.	93
<b>Figure III.17.</b> Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres et en glutamate durant une culture discontinue.....	95
<b>Figure III.18.</b> Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue .....	98

<b>Figure III.19.</b> Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue .....	101
<b>Figure III .20.</b> Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue .....	103
<b>Figure III .21.</b> Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue .....	104
<b>Figure III.22.</b> Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue (avec une solution d'alimentation de jus de dattes seul) à des taux de dilutions différents ( $0,05\text{ h}^{-1}$ , $0,13\text{ h}^{-1}$ et $0,41\text{ h}^{-1}$ ) .....	108
<b>Figure III .23.</b> Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue (alimentation: jus de dattes et sulfate d'ammonium) à des taux de dilutions différents ( $0,05\text{ h}^{-1}$ , $0,13\text{ h}^{-1}$ et $0,41\text{ h}^{-1}$ ) .....	111
<b>Figure III.24.</b> Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue (solution d'alimentation: le jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux) à des taux de dilutions différents ( $0,05\text{ h}^{-1}$ , $0,13\text{ h}^{-1}$ et $0,41\text{ h}^{-1}$ ) .....	113
<b>Figure III.25.</b> Comparaison des cinétiques de la culture continue (à $D=0,05\text{h}^{-1}$ ) et semi-continue. ....	119

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Production de substances à haute valeur à partir de sous-produits de dattes .....	29
<b>Tableau I.2.</b> Classification des plans d'expériences (Bouabidi, 2013) .....	40
<b>Tableau II.1.</b> Caractéristiques de l'espèce bactérienne <i>Corynebacterium glutamicum</i> (D'après Collins et Cummins, 1986).....	50
<b>Tableau II.2.</b> Composition du milieu BMCG modifié .....	51
<b>Tableau III.1.</b> Niveaux des facteurs (température d'induction, temps d'induction et ratio C/N) choisis pour l'optimisation en Erlenmeyers .....	72
<b>Tableau III.2.</b> Matrice expérimentale de trois facteurs du modèle factoriel Box-Behnken.....	73
<b>Tableau III.3.</b> Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box Behnken.....	74
<b>Tableau III.4.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 dans des conditions optimales de production de glutamate.....	76
<b>Tableau III.5.</b> Niveaux des facteurs (débit d'air, agitation et âge d'inoculum) choisis pour l'optimisation en fermenteur .....	78
<b>Tableau III.6.</b> Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken.....	79
<b>Tableau III.7.</b> Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken.....	80
<b>Tableau III.8.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 dans les conditions de culture optimales .....	82
<b>Tableau III.9.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur le milieu de culture optimisé contenant le sulfate d'ammonium comme source d'azote.....	84
<b>Tableau III.10.</b> Niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs (biotine, sucres de dattes et source d'azote total) en Erlenmeyers .....	85
<b>Tableau III.11.</b> Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken.....	85
<b>Tableau III.12.</b> Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken.....	87
<b>Tableau III.13.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur le milieu de culture optimisé.....	90

<b>Tableau III.14.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de datte en culture discontinue .....	93
<b>Tableau III.15.</b> Comparaison des performances des fermentations semi-continues et discontinues. ....	99
<b>Tableau III.16.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul .....	109
<b>Tableau III.17.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue (solution d'alimentation: jus de dattes et sulfate d'ammonium) .....	111
<b>Tableau III.18.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en culture continue (solution d'alimentation: jus de dattes, sulfate d'ammonium et sels minéraux).....	114
<b>Tableau III.19.</b> Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de dattes en culture continue des trois expériences au taux de dilution de $0,05\text{ h}^{-1}$ .....	116

# **Introduction générale**

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), un arbre tropical et subtropical, appartenant à la famille Palmae (Arecaceae) est l'une des plantes les plus anciennes cultivées de l'humanité, et dans la péninsule arabique, il a joué un rôle important dans la vie du peuple de jour après jour pour les 7000 dernières années (Chandrasekaran et Bahkali, 2013 ; Ahmed et *al.*, 1995).

Aujourd'hui, la production mondiale, l'utilisation et l'industrialisation des dattes ne cessent d'augmenter et selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (FAO STAT, 2010) la production a triplé de 2,2 millions de tonnes en 1974 à 7,2 millions de tonnes en 2009. L'Algérie, est le premier producteur du Maghreb Arabe (Boudries et *al.*, 2007 ; Guennouni, 2010). Et est le sixième producteur mondial avec 724000 tonnes en 2010, dont 30% sont des dattes communes à faibles valeurs marchandes (Guennouni, 2010 ; Bensalem, 2011 ; Ulrich, 2013). Les principaux pays producteurs de datte comme l'Égypte (1.352.950 tonnes), Arabie Saoudite (1.078.300 tonnes), Iran (1.023.130 tonnes), Émirats Arabes Unis (775.000) et l'Algérie (724.000 en tonnes).

La datte est commercialisée partout dans le monde comme une confiserie de haute valeur, et comme un fruit frais, elle reste une récolte importante de subsistance dans la plupart des zones désertiques. Elle est produite en grande partie dans les régions chaudes et arides du monde, en particulier au sein du Conseil de Coopération du Golfe (CCG), l'Afrique du nord à l'ouest jusqu'en Inde à l'est, Asie de l'ouest et aux États-Unis d'Amérique. L'Algérie produit plus de 400 variétés différentes de dattes (FAO, 2010).

Les déchets de dattes subissent un tri sélectif et la majeure partie (90%) est traitée en vue de la transformation, le plus souvent en pâte de datte (Ghars). Les 10% restant sont destinés à l'alimentation de bétail dans le but de compenser le déficit et le déséquilibre des régimes alimentaires (FAO, 2007). La croissance des taux globaux de production de palmier dattier est malheureusement souvent raccourcie par des pertes substantielles de fruits qui se produisent pendant la cueillette, le stockage, le marketing et le processus de traitement.

La richesse de la datte en sucres et en éléments minéraux offre à celle-ci, la possibilité d'être valorisé par des procédés technologiques en divers produits. En effet, elle peut servir de matière première de fermentation pour la production de divers métabolites tels que l'acide citrique (Abou-Zeid et Khoja, 1993), l'oxytétracycline (Abou-Zeid et *al.*, 1993), l'éthanol (Al Bassam, 2001), les levures de type *Saccharomyces cerevisiae* (Nancib et *al.*, 1997), l'acide lactique (Nancib et *al.*, 2009), l'acide glutamique (Mouffok et *al.*, 2012).

Le marché de l'acide glutamique (précurseur du glutamate de sodium) est vaste. Les deux tiers de la production mondiale sont destinés à l'alimentation humaine. Le glutamate monosodique est le plus largement utilisé par les industries agroalimentaires en tant qu'exhausteur de goût dans les plats préparés (soupes, assaisonnements, pizzas,...) dans le monde entier. On le retrouve en grande quantité dans la cuisine asiatique. Le glutamate est également utilisé dans de nombreuses industries pharmaceutiques, chimiques et cosmétiques. A l'échelle mondiale, cette molécule a atteint plus de 400 000 tonnes par an, dans les années 90. Actuellement, environ 2,2 millions de tonnes d'acide glutamique est produit par an dont le tiers par le groupe japonais AJINOMOTO (Khan *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2011 ; Stefen *et al.*, 2011). En effet, ce groupe est le leader de la production mondiale d'acides aminés par fermentation. D'autres pays produisent du glutamate monosodique comme la Thaïlande. En France, le glutamate de sodium n'est pas produit, il est juste distribué par des entreprises telles que ORSAN et UNIVAR.

La production d'acide glutamique par des microorganismes s'est très bien développée depuis plus d'une dizaine d'année et souvent ce sont des procédés qui utilisent des substrats relativement coûteux comme le glucose. Actuellement, différentes matières premières peu coûteuses servent de sources de carbone pour la production d'acide glutamique: Les mélasses, le lactosérum, les hydrolysats d'amidon, du blé et de la betterave. En effet, le milieu de culture constitue une part importante dans le coût de production de la biomasse, des métabolites et donc de l'acide glutamique. Il est cependant essentiel de trouver un bon équilibre entre les quantités nutritionnelles et technologiques des matières premières, leur prix et leur disponibilité sur le marché. A cet effet, la valorisation des dattes de faible valeur marchande par les procédés biotechnologique représente une solution de choix dans la mesure où elle permet de produire des substances à haute valeur ajoutée en occurrence l'acide glutamique.

Dans toute recherche expérimentale, on essaye toujours de trouver la meilleure stratégie pour conduire les expériences. La démarche expérimentale conventionnelle qui consiste à faire varier successivement un seul facteur en maintenant les autres constants, est longue et coûteuse. De plus, lorsqu'un grand nombre de variables est considéré, elle est incapable de détecter l'optimum réel et ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs (Liu et Tzeng, 1998; Weuster-Botz, 2000). Les plans d'expériences sont une méthodologie de choix pour répondre à cette préoccupation. En effet, avec la méthodologie des plans d'expérience, on obtient les informations les plus fiables en un minimum d'essais. Les effets des différents

facteurs intervenant dans le processus étudié, sont alors quantifiés et les conditions optimales définies. Avec le développement de l'outil informatique et l'apparition de logiciels performants, cette tâche est rendue encore plus facile. Ces plans sont applicables à toutes les disciplines expérimentales (Weuster-Botz, 2000 ; Viswanathan et Surlikar, 2001; Ahuja et al., 2004; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006). Les plans d'expériences les plus utilisés sont les modèles de Plackett-Burman et le modèle Box-Behnken.

Par ailleurs, de nombreuses améliorations ont été apportées aux procédés de production d'acide glutamique, afin d'obtenir des concentrations finales élevées, des productivités ou des rendements maximaux ou encore des coûts minimaux. Pour arriver à améliorer la production d'un acide aminé par voie microbienne, deux approches peuvent être considérées : modifier soit le procédé, soit le biocatalyseur c'est à dire le microorganisme utilisé.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte et consiste à étudier l'amélioration du procédé de production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu à base de jus de datte. L'amélioration du procédé consiste à optimiser la composition du milieu de culture, les paramètres physico-chimiques et le mode de culture discontinu, semi-continu et continu.

Ce document de thèse se divise en cinq chapitres.

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, dans laquelle on présentera une vue d'ensemble de l'acide glutamique, de la datte et des modèles statistiques utilisés.

Le deuxième chapitre décrit les méthodes de culture du micro-organisme, l'appareillage et les méthodes d'analyse qui ont permis de suivre au mieux les différentes fermentations.

Le troisième chapitre présente l'étude cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture discontinue. L'objectif de ce chapitre, est d'optimiser les conditions de culture par des méthodes statistiques. Cette étude vise à acquérir une meilleure connaissance cinétique du procédé et à définir des conditions favorables à la production d'acide glutamique par notre souche permettant d'obtenir le meilleur rendement de conversion du substrat, une concentration finale en produit la plus élevée possible et une productivité importante.

Le quatrième chapitre est consacré à la mise en œuvre d'une stratégie d'alimentation permettant d'améliorer les performances du procédé de production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture semi-continue. Deux stratégies d'alimentation

ont été préconisées lors de la production d'acide glutamique en cultures semi-continues. La première consiste à alimenter la culture par des pulses instantanées. La deuxième consiste à alimenter la culture de façon continue. Nous avons également comparé les performances de toutes les cultures en semi-continu réalisées et celle d'une expérience en discontinu sous des conditions de culture optimales.

Le dernier chapitre porte sur l'étude des effets de différents composants du milieu d'alimentation et du taux de dilution en culture continue sur la production du glutamate. Ceci nous permettra d'étudier le comportement de la souche dans ce mode de culture puis de déterminer la composition du milieu d'alimentation et le taux de dilution optimale permettant d'obtenir une production d'acide glutamique importante. Le comportement cinétique de cette bactérie en culture continue est comparé avec celui identifié en culture semi-continue.

Enfin, ce document se termine par un rappel des principaux résultats obtenus et les perspectives qui en découlent.

# **I. Étude bibliographique**

## **I.1. ACIDE GLUTAMIQUE ET MICROORGANISMES PRODUCTEURS**

### **I.1.1. Historique**

Les asiatiques utilisaient les algues comme le Kombu dans leurs préparations culinaires afin de rehausser le goût des aliments. En effet, c'est en 1908, que le professeur japonais Kikunae Ikeda a montré que les propriétés gustatives des algues de la famille des laminaires étaient dues à leur forte teneur en L-glutamate de sodium (Khan et *al.*, 2013 ; Wachi, 2013). Cette découverte a été à l'origine de la fabrication de ce produit, par extraction de protéines végétales, dès le début du siècle. Depuis 1957, les acides aminés sont produits par des microorganismes : les Corynébactéries. Kinoshita et *al.* (1957), suivis de peu par Asahi et *al.* (1957) décrivent des souches productrices d'acide glutamique à partir de glucose et de sels d'ammonium. Cette découverte eut pour conséquence un développement rapide de la production industrielle d'acides aminés par fermentation, en particulier par les firmes japonaises Kyowa Hakko et Ajinomoto (Jensen et *al.*, 2015; Toyoda et Inui, 2016). Sur le plan mondial, l'industrie de la production d'acides aminés par fermentation représente une part importante soit 2,2 millions de tonnes par an (Stefen et *al.*, 2011 ; Khan et *al.*, 2013).

Actuellement, *Corynebacterium glutamicum* est la souche la plus utilisée dans l'industrie pour produire des acides aminés tels que le glutamate, la lysine, l'arginine, l'histidine et la valine, et une grande variété de métabolites, tels que les acides organiques, les dérivés d'acides aminés, alcools et bioplastiques (Becker et Wittmann 2012; Wieschalka et *al.* 2013 ; Kind et *al.*, 2014 ; Wendisch 2014 ; Jojima et *al.*, 2015; Toyoda et Inui, 2016).

### **I.1.2. Acide glutamique**

#### **I.1.2.1. Présentation du L-glutamate et du monosodium glutamate**

##### **I.1.2.1.1. Le L-Glutamate**

Le L-glutamate, la forme anionique de l'acide glutamique, est l'un des acides aminés aliphatiques naturels. Sa chaîne latérale contient un résidu carboxyle, ce qui en fait un acide aminé acide, dicarboxylique et polaire. Sa formule chimique est la suivante :  $C_5H_9NO_4$ . Il existe de deux stéréoisomères (L) et (D), seule la forme (L) existant dans les protéines. Il est présent dans de nombreux aliments à la fois sous forme libre et sous forme liée dans les protéines ou les peptides.

### I.1.2.1.2. Le monosodium glutamate

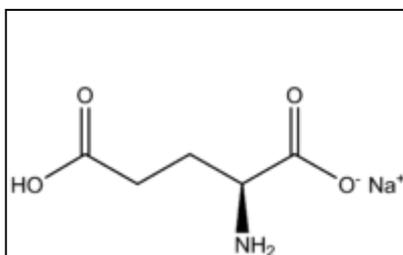
IL existe différents sels de l'acide glutamique : le glutamate monosodique ou monosodium glutamate, le glutamate monopotassique, le diglutamate de calcium, le glutamate d'ammonium et le diglutamate de magnésium. Ce sont tous des additifs alimentaires, mais le monosodium glutamate est le plus largement utilisé par les industries agroalimentaires. Le monosodium glutamate se présente sous forme de cristaux ou de poudre cristalline blanche (Figure I.1). Il est inodore. C'est un sel monosodique de l'acide glutamique monohydraté. Il a pour formule brute :  $C_5H_8NO_4Na$  (Figure I.2).

Ses caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- Point de fusion:  $205^{\circ}C$ .
- Stable, incompatible avec les oxydants forts
- Très soluble dans l'eau
- Légèrement soluble dans l'éthanol
- Pratiquement insoluble dans l'éther
- Le pH d'une solution saturée est de 6,7-7,2
- Au pH physiologique, l'acide glutamique existe sous forme anionique.



**Figure I.1.** Présentation du glutamate de sodium sous forme de poudre cristalline blanche



**Figure I.2.** Formule de la molécule de glutamate de sodium

### I.1.2.2. Utilisations de l'acide glutamique

Il est trouvé comme condiment et comme additif entrant dans la composition de nombreux aliments. Il est employé principalement dans les aliments assaisonnés et dans une large variété de produits orientaux :

- les sauces de soja industrielles,
- les potages et les soupes en sachets ou en conserves,
- les biscuits secs,
- les plats cuisinés, les préparations toutes faites en général et les aliments congelés,
- la nourriture en conserve, comme les conserves de légumes,
- les charcuteries, les viandes, les volailles,
- le sel de table (jusqu'à 20%),
- les boissons.

Actuellement, il est fabriqué pour l'usage comme agent thérapeutique contre des maladies gastroentérologiques ; comme agent stimulateur de l'immunité, pour l'amélioration des fonctions de foie et de cerveau, et contre l'ulcère gastrique et l'alcoolisme. Une récente étude montre que l'acide glutamique, employé conjugué aux agents anticancéreux, augmente l'efficacité de ces derniers et diminue leur toxicité vers les cellules saines. L'acide polyglutamique est biodégradable, comestible et non-toxique pour les humains (Hermann, 2003 ; Wittmann, 2010 ; Dutta et al. ,2013).

### I.1.3. Les microorganismes producteurs de glutamate : Corynébactéries

Il existe un grand nombre de souches et certaines présentent un intérêt industriel dont *Corynebacterium glutamicum*.

La classification hiérarchique de *Corynebacterium glutamicum* selon Madigan et Martinko (2007) est comme suit :

<b>Règne :</b>	Bacteria
<b>Embranchement :</b>	Actinobacteria
<b>Ordre :</b>	Actinomycetales
<b>Famille :</b>	<i>Corynebacteriaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Corynebacterium</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>

Les souches capable d'excréter du glutamate telles que *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* et *Brevibacterium divaricatum* ont été classées par certains auteurs dans le genre *Corynebacterium* et regroupées au sein de l'espèce *Corynebacterium glutamicum*. Ceci fait suite à des études qui ont montré des différences mineures entre les génomes de ces bactéries (Liebl et al., 1991).

Les souches de corynébactéries sont rencontrées notamment dans le sol et dans les matières végétales. Ce sont des bacilles effilés, courts, souvent incurvés et que l'on retrouve en fuseaux plus ou moins longs rangés en palissades ou en lettres V, non sporulé, immobiles. Elles forment de fines colonies grises ou blanches (Figure I.3). Elles produisent naturellement le L-glutamate et la L-lysine. Ce sont des souches aéro-anaérobies et leur métabolisme est respiratoire ou fermentatif. Elles sont mésophiles, la température maximale de croissance se situe vers 35°C et leur pH de croissance est entre 6 et 9 avec un optimum entre 7 et 8. La biotine est nécessaire à leur croissance (auxotrophe pour la biotine). Elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats carbonés (Sawada et al., 2015 ; Tayoda et Inui, 2016).



**Figure I.3.** Morphologie des cellules de *Corynebacterium glutamicum* observées au microscope électronique (Wieschalka, 2012)

#### **1.1.4. Procédés de production du glutamate par fermentation**

Après l'identification du *Corynebacterium glutamicum* comme bactérie productrice de glutamate, plusieurs études se sont intéressées à l'étude du mécanisme de production et de sécrétion de glutamate. La production d'acide aminé par voie microbienne peut être améliorée soit en jouant sur le procédé de culture soit en modifiant le métabolisme du micro-organisme producteur.

##### **1.1.4.1. Amélioration du procédé de production du glutamate**

Dans le cas particulier de la production d'acide glutamique, l'induction de l'excrétion de l'acide aminé, dans le milieu de culture, a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, les

souches du genre *Corynebacterium* n'excrètent pas naturellement l'acide glutamique ; par conséquent, pour induire le processus d'excrétion, un stress doit leur être appliqué.

Plusieurs méthodes d'induction ont été testées :

**a. La limitation en biotine**

La biotine intervient dans le mécanisme de synthèse des acides gras. C'est pourquoi, une souche ayant besoin de biotine pour sa croissance et cultivée dans un milieu pauvre en biotine, peut développer une membrane défectueuse et permettra une excrétion d'acide glutamique intracellulaire (Figure I.4). Une concentration faible en biotine engendre une croissance bactérienne réduite, une membrane pauvre en phospholipides et une excrétion du glutamate. Au contraire, une forte concentration en biotine entraîne une croissance optimale des bactéries, une membrane riche en phospholipides. Ainsi, l'acide glutamique n'est plus excrété (Clément et Lanéelle, 1986 ; Clément et *al.*, 1984).

**b. L'ajout de tensioactif**

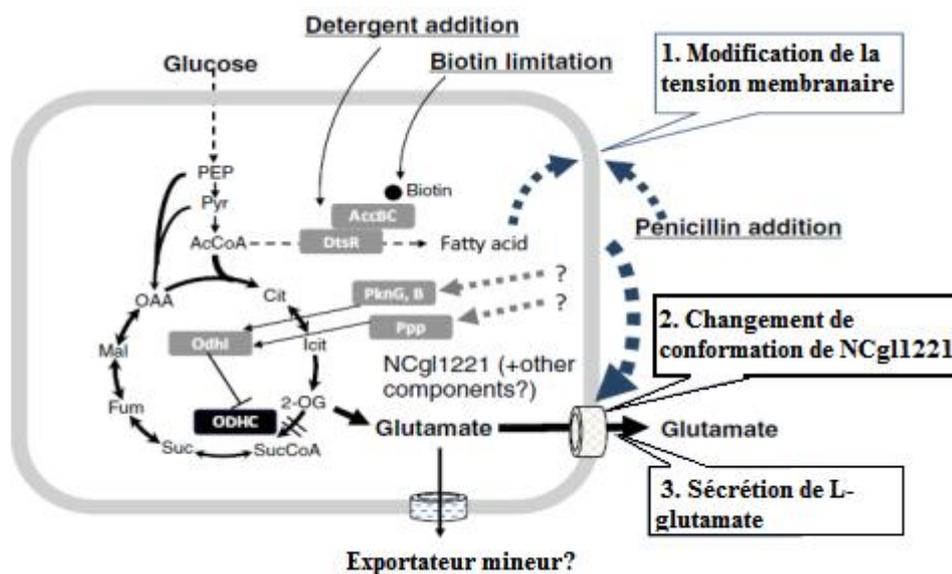
L'ajout de tensioactifs tels que les acides gras saturés et les dérivés d'acides gras saturés (Tween 40) dans le milieu provoque instantanément le début de l'excrétion de l'acide glutamique (Figure I.4). Ceci permet de diminuer la quantité de phospholipides cellulaires de plus de 50% et en augmentant le rapport acides gras saturés/acides gras insaturés (Takinami et *al.*, 1965 ; Huchenq et *al.*, 1984 ; Duperray et *al.*, 1992; Yasueda, 2014).

**c. L'ajout de pénicilline**

L'ajout de pénicilline inhibe la synthèse de la paroi bactérienne et favorise ainsi la perméabilité au glutamate en diminuant le peptidoglycane de la paroi cellulaire (Figure I.4). Par conséquent, le glutamate passe à travers la membrane cellulaire en raison de la perméabilité accrue de la membrane et s'accumule dans le milieu (Wijayarathna et *al.*, 2001; Alexander et *al.*, 2007 ; Yasueda, 2014).

**d. Choc de température**

La température du milieu qui initialement fixée à 33°C, est portée à 39° lorsque la concentration en biomasse atteint 5 g.l<sup>-1</sup>. Cela se traduit par une excrétion immédiate d'acide glutamique. Pendant la phase de production du glutamate, le choc de température permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et une déviation du flux de carbone vers la production du glutamate (Goergen et *al.*, 1997 ; Delaunay et *al.*, 2002).



**Figure I.4.** Modèle d'induction de la production du glutamate chez *Corynebacterium glutamicum* (Yasueda, 2014)

#### I.1.4.2. Milieux de culture

Différents paramètres rentrent en jeu comme la composition du milieu de culture, les paramètres physico-chimiques (pH, agitation, pression osmotique ...), le mode de culture (discontinu, semi-continu, continu) ou encore le profil d'alimentation en substrat.

##### I.1.4.2.1. La composition du milieu de culture

Quand une souche a été sélectionnée, elle doit être cultivée dans des conditions permettant une productivité maximale en métabolite ou en biomasse.

##### a. La source de carbone

Elle constitue la source d'énergie des cellules et intervient dans la synthèse de toutes les molécules organiques. *Corynebacterium glutamicum* est capable d'assimiler de nombreuses sources de carbone. Les plus utilisées sont des sucres raffinés tels que le saccharose et le glucose (Patil et al., 2009). D'autres matières premières peu coûteuses servent de sources de carbone pour la production du glutamate : c'est le cas des mélasses de canne (Amin et Al-Talhi, 2007), l'hydrolysate de déchets de dattes. L'utilisation de ce type de substrat s'explique par leur coût moins élevé que celui des molécules organiques ou inorganiques purs. Les produits ont également comme avantage d'apporter aux micro-organismes des mélanges en vitamines, acides aminés et sels minéraux. On obtient ainsi des croissances rapides (Das et al.,

1995 ; Nampoothiri et Pandey, 1999 ; Davati et *al.*, 2007), l'hydrolysate d'amidon de manioc (Jyothi et *al.*, 2005).

#### **b. La source d'azote**

L'influence est très importante sur la productivité des métabolites secondaires. Comme pour les sucres, la synthèse de certaines molécules ne débute que si la totalité de la source d'azote facilement assimilable a été consommée ( $\text{NH}_4$ ). Un apport exogène d'acides aminés et de peptides a un effet stimulant sur la croissance et la production des métabolites. L'ammoniaque et l'urée sont les sources d'azote les plus courantes. Néanmoins, l'ammoniaque reste la source d'azote préférée car non seulement il sert pour la régulation du pH du milieu de fermentation mais également pour la régulation de la synthèse de glutamate déshydrogénase (GDH) chez de nombreux microorganismes. Il est clair que la nature de la source carbonée ainsi que celle de la source azotée représentent un facteur important dans la performance du procédé de fermentation. Les sources d'azote organique sont riches en protéines et en acides aminés ce qui favorise la croissance. L'effet du carbone et de l'azote sur la production de métabolites peut être traduit en un rapport C/N. Xu *et al.* (2010) en étudiant la production d'exopolysaccharide (EPS) par *Lactobacillus paracasei* HCT, ont montré que la croissance est favorisée par un rapport C/N (8,6) plus faible comparée à la production qui nécessite un rapport (9,09) plus élevé permettant d'obtenir un meilleur rendement. Yugandhar *et al.* (2008) ont étudié la production de pectinase en utilisant *Aspergillus niger* NCIM548. Le rapport C/N de 5,9 a permis d'obtenir le maximum de pectinase ( $22,8 \text{ U.ml}^{-1}$ ). Concernant la fermentation glutamique, Zamani et Roostaazad (2001) ont montré qu'un rapport de 3,2 permet d'obtenir le maximum de productivité à partir des mélasses, en utilisant comme source d'azote de l'extrait de levure et du sulfate d'ammonium.

#### **c. Les sels minéraux**

Certains sels minéraux sont très importants comme le sulfate de magnésium indispensable à la croissance de la membrane cellulaire ou le carbonate de calcium qui maintient le pH. Les substrats naturels complexes apportent aux microorganismes des sels minéraux.

#### **d. Les oligo-éléments**

De nombreux métaux sont indispensables à la croissance cellulaire et à la production de métabolites. Ce sont en général des cofacteurs d'enzymes.

#### **I.1.4.2.2. Paramètres physico-chimiques**

##### **a. pH**

La croissance bactérienne provoque un changement du pH du milieu. Broer et *al.*, (1993) ont montré que le pH optimum qui assure une vélocité maximale de transport du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* est de 7,4 à 7,8 (Shah et *al.*, 2002). Ce qui est légèrement inférieur au pH intracellulaire qui se situe 7,7 et 8,3 (Leyval et *al.*, 1997). En fermenteur, l'ajout d'ammoniaque ou d'urée permet de régler le pH et supplémenter la culture en source d'azote pendant la phase de production du glutamate.

##### **b. Pression osmotique**

L'accumulation du glutamate extracellulaire provoque une augmentation progressive de l'osmolarité durant la fermentation glutamique. Cette dernière peut être accentuée par l'ajout de l'ammoniaque lors de la régulation du pH de milieu de culture (Gourdon et *al.*, 2003). Il a été montré que l'osmolarité avait un impact négatif sur la production du glutamate (Lapujade, 2000). L'augmentation de la pression osmotique peut contribuer à la diminution progressive de la productivité de biomasse, et cela est dû probablement à la réorientation du flux carboné vers les mécanismes de réponse au stress osmotique (Gourdon et *al.*, 2003). Ceci étant, la valeur optimale de la pression osmotique, qui donne la meilleure production du glutamate, est de 1,2 osmol/kg au début de la phase de production du glutamate (Goergen et *al.*, 1997).

##### **c. Agitation**

L'agitation est un facteur important et influant dans la culture des microorganismes. En effet, l'agitation met en contact direct, les matériaux se trouvant dans le milieu de culture avec les microorganismes. Elle favorise aussi leur répartition régulière dans le fermenteur en les empêchant de précipiter dans le fond, ce qui facilite les échanges thermiques. L'opération de mélange consiste à réaliser une suspension, qui doit être la plus homogène possible, tout en préservant l'intégrité des cellules.

L'agitation est également combinée avec l'aération, elle interfère avec cette dernière dans la mesure où elle aide à multiplier les bulles d'air dans le milieu, et donc à accroître leur surface. Il faut noter que malgré son importance pratique très peu d'informations sont disponibles dans ce domaine.

#### **d. Oxygène**

L'oxygène joue un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie producteur d'énergie, comme accepteur final des électrons et des protons produits par les réactions d'oxydation. Il intervient dans certains mécanismes de régulation du métabolisme de façon directe, comme inducteur ou répresseur de la synthèse d'enzymes respiratoires, mais de façon indirecte du fait de son rôle dans le métabolisme énergétique (Scriban, 1999).

Dans un fermenteur, il faut considérer une valeur moyenne de transfert d'oxygène, car la bulle d'air change de composition au cours de son déplacement au sein du liquide. L'aération est également combinée avec l'agitation. Elle interfère avec l'agitation dans la mesure où elle aide à diviser les bulles d'air, donc à accroître leur surface et à augmenter les turbulences (Rivière, 1975). Le taux de l'oxygène est un facteur important dans des procédés de fermentation. Pour une culture microbienne aérobie, une quantité suffisante d'oxygène doit être fournie pendant la croissance pour accomplir les besoins de l'organisme. La demande en oxygène est satisfaite par aération et agitation du milieu de fermentation. La plus grande disponibilité de l'oxygène dissous stimule la consommation des sucres et l'utilisation du phosphate. Chez *Corynebacterium glutamicum*, lorsque l'oxygène devient limitant, la cellule produit de l'acide lactique et de l'acide acétique (Yao et al., 2001). D'après Wendisch et al. (2006), une limitation en oxygène dissout entraîne une production d'éthanol avec des rendements élevés, et une production des métabolites secondaires tels que l'acétate, le lactate et le succinate.

#### **e. Température**

Chez *Corynebacterium glutamicum*, la température du milieu de culture passe de 33 à 39°C en phase de production lors de la synthèse du glutamate par choc thermique. Le fait d'augmenter cette température permet de ralentir la croissance bactérienne et ainsi favoriser l'utilisation de la source carbonée pour la synthèse du glutamate. La température optimale de culture se situe entre 28 et 39°C pour les phases de croissance et d'excrétion et ce pour la plupart des souches productrices du glutamate (Crueger et Crueger, 1984).

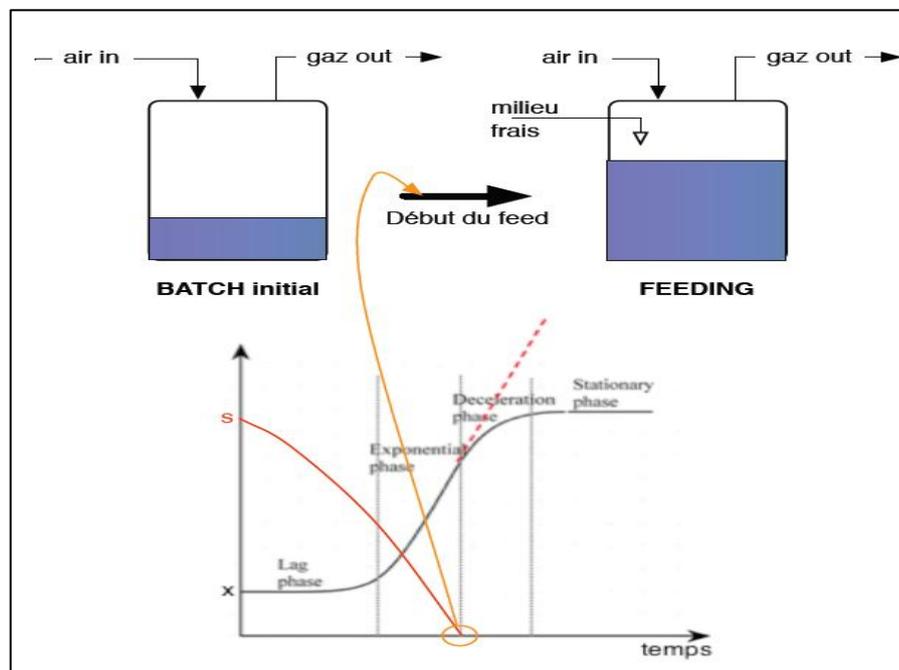
### **I.1.4.2.3. Mode culture**

#### **a. Les procédés de fermentations discontinus**

Une grande partie est parfois même la totalité des composants d'un milieu sont en présence des micro-organismes, dès le début des fermentations ; la quantité de nutriments est donc limitée.

### b. Les procédés de fermentations semi-continus

Industriellement parlant, la production du glutamate se fait 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 au risque de provoquer 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 du glucose dans le réacteur. Ceci est nécessaire pour atteindre un taux de production élevé. Le principal avantage d'un procédé en semi-continu est le pouvoir de contrôler la concentration des nutriments dans le milieu de culture en faisant varier les débits d'alimentation. Cette technique est particulièrement intéressante pour les procédés au cours desquels l'inhibition du métabolisme par le(s) substrat(s) est importante (Figure I.5) (Castan et Enfors, 2000).



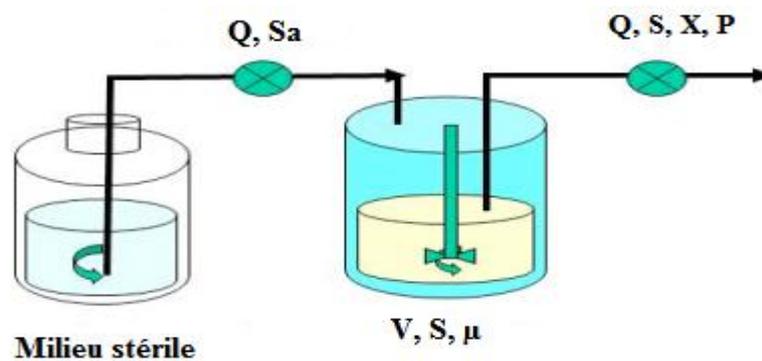
**Figure I.5.** La biomasse en fonction du temps dans un processus semi-continu (Eyer k. et *al.*, 2008)

### c. Les procédés de fermentations continus

Le procédé de fermentation continue est un système ouvert, dans lequel le milieu de fermentation est alimenté en continu par un milieu stérile. Un soutirage en continu de milieu culture contenant les microorganismes, le substrat et les métabolites produits, avec un débit égal au débit d'alimentation, la culture continue est donc caractérisée par un volume réactionnel constant (Figure I.6).

La culture continue a fait progresser la connaissance de la physiologie microbienne de façon considérable en permettant d'éliminer l'effet de l'inhibition par excès de substrat et de choisir la vitesse de croissance optimale pour la production. A l'échelle industrielle, la fermentation continue est limitée par une faible concentration cellulaire et une faible production ainsi que par le problème de contamination lors de cultures de longue durée. La culture continue permet de maintenir les microorganismes dans un état stable et de découpler la croissance vis à vis de l'évolution du milieu (Hoskisson et Hobbs, 2005 ; Bull, 2010).

De nombreuses études ont contribué à la compréhension du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* pendant la croissance et la production des acides aminés (Guillouet et Engasser, 1996 ; Coello et al., 2001; Zhao et Lin, 2001; Zhao et Lin, 2002). Ces études ont permis de déterminer des valeurs du taux de croissance correspondants à une production maximale en acide aminé.



**Figure I. 6.** Schéma d'un processus de culture continue

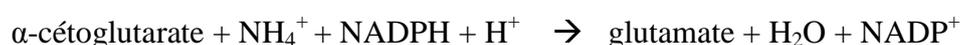
$Q$  : débit d'alimentation et de soutirage ;  $S_a$  : concentration en substrat dans la solution d'alimentation ;  $V$  : volume du milieu ;  $X$  : concentration en biomasse ;  $S$  : concentration en substrat dans le milieu de fermentation ;  $P$  : concentration en produit ;  $\mu$  : taux de croissance spécifique des bactéries.

## I.1.5. Métabolisme central des Corynébactéries

### I.1.5.1. La Biosynthèse du glutamate

Le glutamate est synthétisé directement à partir de l' $\alpha$ -cétooglutarate grâce à la glutamate déshydrogénase (GDH) (Figure). La plupart des bactéries synthétisent le glutamate de deux manières, soit par le glutamate déshydrogénase (1) soit par l'action combinée de la glutamine synthétase (2) et le glutamate synthase (3) :

(1) La glutamate déshydrogénase (GDH):



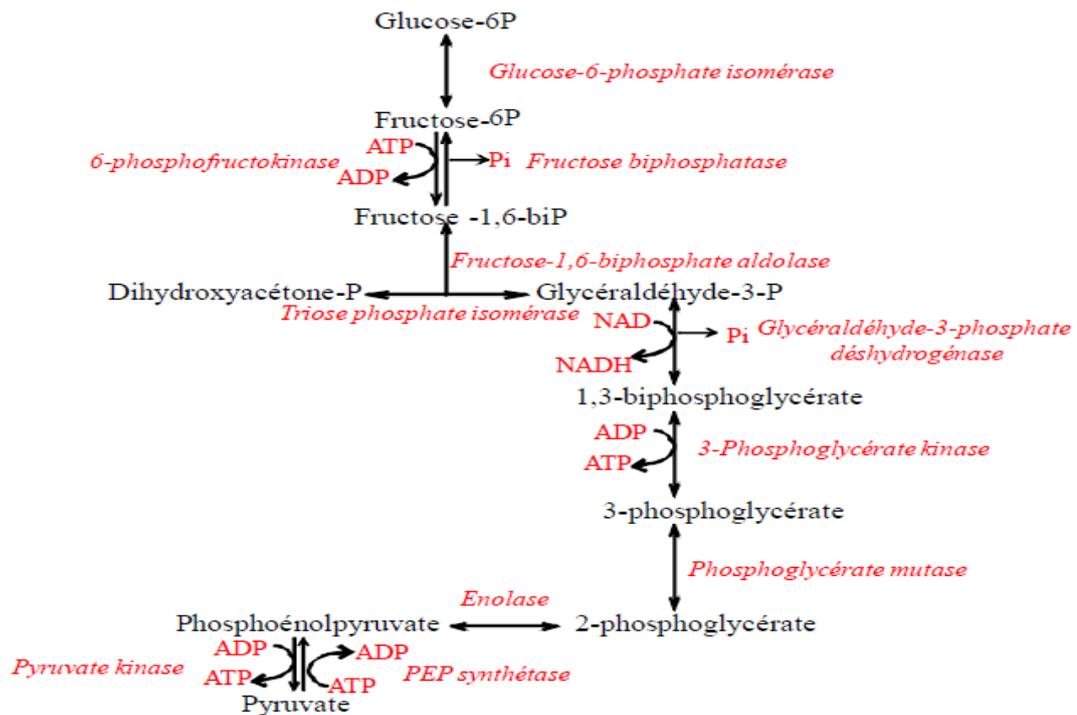




### I.1.5.3. Glycolyse et voie des pentoses phosphates

La glycolyse est voie énergétique qui évolue jusqu'à la formation de pyruvate en dix réactions qu'on peut répartir en trois étapes fonctionnelles : conversion du glucose en fructose 1,6-bisphosphate, clivage de cet hexose en deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate, puis oxydation de ce triose en pyruvate. La glycolyse produit du NADH et de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat lors de la dernière étape. Au total, deux molécules d'ATP et deux NADH<sub>2</sub> sont synthétisées par molécule de glucose métabolisée. Elle est schématisée sur la Figure I.9. La régulation de la glycolyse semble s'effectuer essentiellement au niveau du couple phosphofructokinase-fructose bisphosphatase et du pyruvate kinase. La 6-phosphofructo-kinase (PFK), dépendante de l'ATP, catalyse le passage du fructose-6-P au fructose 1,6 biP alors que la fructose biphosphatase (FBP) catalyse la réaction inverse. Pour sa part, la pyruvate kinase (PK) permet la métabolisation du phosphoénolpyruvate en pyruvate (Serge, 2004).

La régulation de la glycolyse se fait au niveau du couple phosphofructokinase-Fructose biphosphatase et du pyruvate kinase. La 6-phosphofructokinase est inhibé par l'ADP chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 (Shiio et al., 1990). Le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse augmente rapidement lorsque les cellules sont en conditions de production du glutamate (Sonntag et al., 1995). Chez *Corynebatreium melassecola*, la glycolyse apparait comme la voie majoritaire dans la synthèse du pyruvate, avec une contribution à la synthèse de ce métabolite estimée à 55% en phase exponentielle de croissance sur glucose (Rollin et al., 1995).



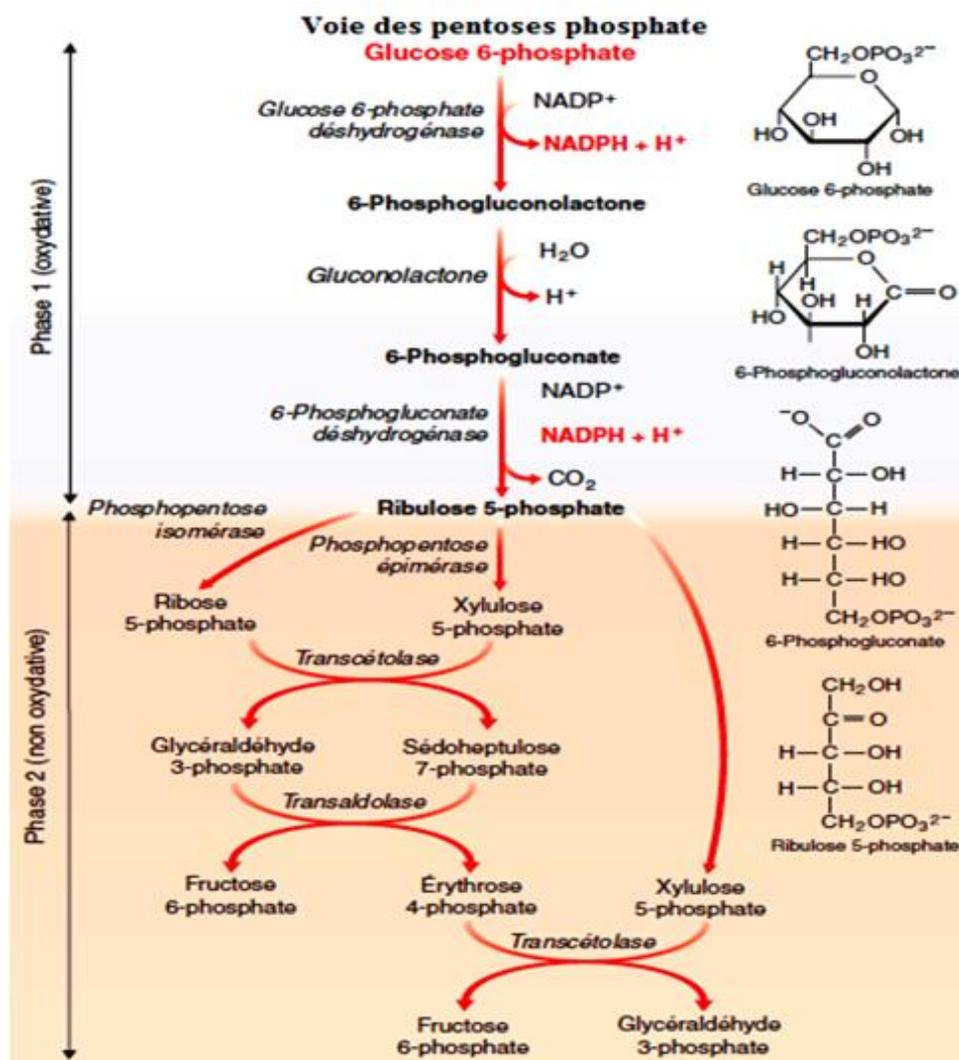
**Figure I.9.** Voie de la glycolyse chez *Corynebacterium glutamicum* (Dandekar *et al.*, 1999)

La deuxième voie importante dans le métabolisme du glucose chez les bactéries corynéformes est la voie des pentoses phosphates encore appelée voie de l'hexose monophosphate, est une série de réactions interagissant avec la glycolyse à trois niveaux : G6P, F6P et GAP. Cette voie est schématisée sur la Figure I.10. Elle produit des précurseurs essentiels : ribose-5-phosphate, qui sert à la synthèse des nucléotides (unités de base des acides nucléiques), fructose-6-phosphate, glycaldéhyde-3-phosphate, CO<sub>2</sub> et le NADPH (un donneur d'électrons). Ces intermédiaires sont nécessaires pour d'autres synthèses telles que la synthèse de l'histidine, des lipides, et des acides aminés aromatiques. Cette voie est caractérisée par deux phases :

- Une phase oxydative : lors des réactions de cette phase, le glucose-6-phosphate est déshydrogéné en C-1 par la glucose 6-phosphate déshydrogénase avec formation de 6-phosphogluconolactone et d'une molécule de NADPH<sub>2</sub>. Cette réaction, essentiellement irréversible *in vivo*, est un site de contrôle de la voie qui est régulée par le taux de NADP<sup>+</sup>.
- Une phase non oxydative : le ribulose 5-phosphate est le premier substrat des réactions de la phase dite non oxydative ; ces réactions, catalysées par la transcétolase et la transaldolase, permettent l'interconversion d'oses à trois, quatre, cinq, six ou sept

carbones. Parmi ces derniers, le glycéraldéhyde 3-phosphate et le fructose 6-phosphate créent un lien réversible entre la voie des pentoses phosphate et la glycolyse (Serge, 2004).

De nombreuses études ont été menées pour comprendre et quantifier la répartition du flux carboné au niveau du G6P entre la glycolyse et la voie des pentoses. Les résultats sont très variables en fonction de différents paramètres, tels la phase de croissance, le type de métabolite produit, la souche ou encore la source de carbone utilisée (Rollin *et al.*, 1995).



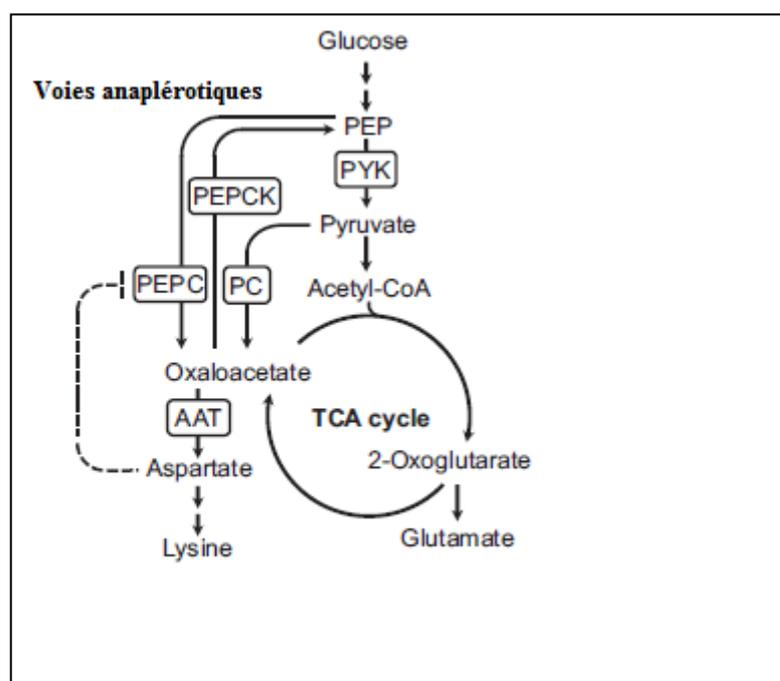
**Figure I.10.** Voie des pentoses phosphate (Serge, 2004)

#### I.1.5.4. Cycle de Krebs et voies anapérotyques

Le cycle de Krebs est une séquence de réactions d'oxydations de l'acétyl-CoA en  $\text{CO}_2$  à partir du pyruvate. Afin de répondre de façon précise aux besoins énergétiques de la cellule, la vitesse du cycle de l'acide citrique doit être contrôlée et certaines réactions clé du cycle de

l'acide citrique sont précisément régulées. L'entrée du pyruvate dans le cycle de l'acide citrique nécessite sa décarboxylation oxydative préalable par le complexe multi-enzymatique du pyruvate déshydrogénase (PDH) constitué de 3 enzymes principales (E1, E2, E3) en acétyl CoA qui est, elle aussi, étroitement régulée. Le cycle commence par la condensation de l'acétyl CoA avec l'oxaloacétate pour former le citrate qui est ensuite isomérisé en isocitrate. L'isocitrate déshydrogénase catalyse irréversiblement la décarboxylation de l'isocitrate en formant de l' $\alpha$ -cétoglutarate, du  $\text{CO}_2$  et de NADPH.

Pour les voies anapérotiques, au lieu d'être décarboxylé, l'isocitrate est clivé par l'isocitrate lyase en succinate et glyoxylate (shunt glyoxylique). Le succinate est disponible pour des processus biosynthétiques ; en particulier, il peut être converti en glucides grâce à une combinaison du cycle de l'acide citrique et de la gluconéogenèse. Le glyoxylate se condense avec une molécule d'acétyl CoA par une malate synthase pour donner le malate, précurseur de la gluconéogenèse, qui est ensuite oxydé en oxaloacétate. Donc les réactions anapérotiques (Figure I.11) permettent soit d'alimenter le cycle de Krebs avec l'oxaloacétate soit d'apporter le pyruvate ou le PEP pendant la gluconéogenèse (Serge, 2004 ; Sato *et al.*, 2008).



**Figure I.11.** Schéma du cycle de Krebs et des voies anapérotiques chez *Corynebacterium glutamicum* (Wada, 2015)

Abréviations: PEP, phosphoénolpyruvate; PYK, pyruvate kinase; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PC, pyruvate carboxylase; AAT, aspartate aminotransférase. La ligne pointillée dénote la rétro-inhibition.

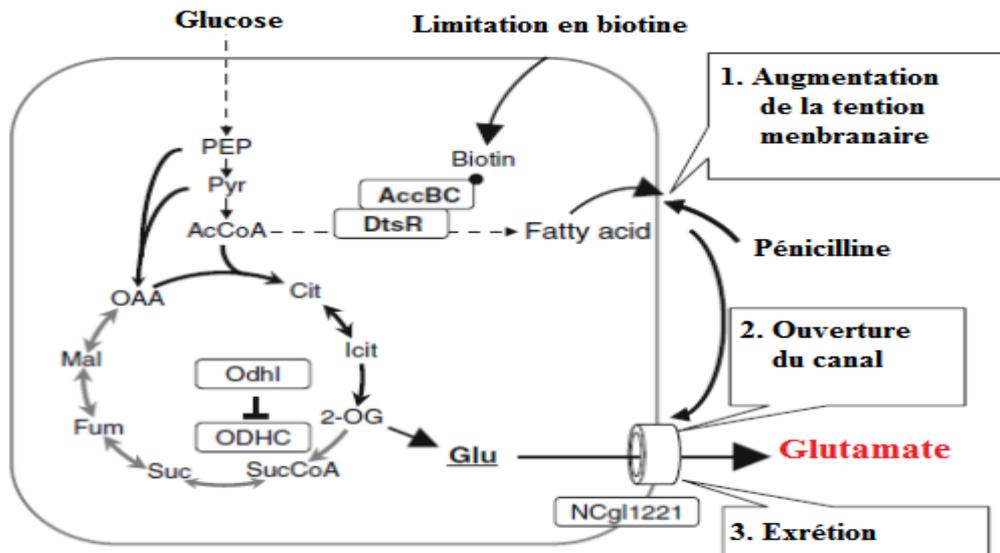
### I.1.5.5. Sécrétion de l'acide glutamique

Il était généralement admis que l'excrétion des acides aminés avait lieu par diffusion à travers la membrane, mais des études de plus en plus nombreuses remettent en cause ces idées préconçues. En particulier, des systèmes d'excrétion spécifiques ont été identifiés chez les *Corynebactéries* pour le glutamate (Kramer, 1994).

Dans des conditions normales de fermentation, *Corynebacterium glutamicum* n'excrète pas de glutamate. La sécrétion doit être induite par des procédés qui semblent affecter l'intégrité membranaire. Parmi ces procédés, on trouve une limitation en biotine, l'addition de surfactants, l'addition de pénicilline ou encore la limitation de la synthèse des phospholipides. Le mode de sécrétion a donc été supposé de type passif par altération de la membrane. Cependant, il a été démontré que la membrane conservait ses propriétés vis à vis d'autres composés ( $H^+$ ,  $K^+$ , acides aminés, acides carboxyliques) en particulier sous limitation biotine. De plus, l'excrétion pouvait avoir lieu à l'encontre du gradient glutamate, remettant en cause une diffusion passive et indiquant plutôt l'existence d'un transporteur spécifique. L'inversion du transporteur utilisé pour l'entrée du glutamate dans la cellule a parfois été invoquée, mais jamais réellement démontrée. D'autres auteurs proposent un troisième modèle avec l'existence d'un transporteur spécifique à l'excrétion du glutamate. Enfin, des études sur l'effet des surfactants sur des liposomes renforcent les hypothèses d'un transporteur spécifique et/ou d'une diffusion passive sans apporter de réponse définitive. Il apparaît donc que le ou les mécanismes de sécrétion du glutamate ne sont pas encore bien connus. Deux facteurs semblent indispensables : une surproduction de glutamate et une altération de la membrane plasmique (Kramer, 1994).

Wachi (2013), a proposé un modèle pour la production de L-glutamate de *Corynebacterium glutamicum* qui est synthétisé sur la Figure I.12:

- (1) Les traitements d'induction provoquent des changements de la tension membranaire en inhibant la synthèse des lipides ou de la paroi cellulaire,
- (2) Ouverture du canal codé par le gène NCgl1221 sensible au changement de la tension membranaire,
- (3) Excrétion du glutamate dans le milieu sous forme de soluté compatible (osmoprotecteur) pour éviter la perturbation de la cellule.



**Figure I.12.** Représentation schématique d'un mécanisme (possible) de la production de L-glutamate par *Corynebacterium glutamicum* (Wachi, 2013)

## **I.2. LA DATTE**

### **I.2.1. Définition de la datte**

La datte, fruit comestible sucré du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constitué de :

- Un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau ;
- Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre ;
- Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (Espiard, 2002).

La forme, la consistance, la couleur à maturité de la partie comestible sont variables selon les variétés.

### **I.2.2. Répartition géographique du palmier dattier**

Le potentiel phoenicicole algérien enregistre un accroissement important avec un effectif qui avoisine 15 millions de palmiers dattiers. En général les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas pour une superficie de 350.000 hectares. Cependant quatre principales wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar 22%, El-oued 21% et Ouargla 15% (Anonyme, 2002).

### **I.2.3. Les variétés de dattes**

On distingue trois catégories de dattes : Les dattes molles, demi-molles et sèches. Les variétés de dattes sont très nombreuses, seulement quelques-unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur et les dimensions (Belguedj, 2002).

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes. Les principales variétés cultivées sont :

- Deglet-Nour : Variété commerciale par excellence. C'est une datte demi-molle, considérée comme étant la meilleure variété de datte du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur.
- Les variétés communes : Ces variétés sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour. Les variétés les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla (Belguedj, 2002).

### **I.2.3. Production des dattes**

Pour une campagne déterminée, la production nationale peut atteindre 500.000 tonnes, dont 240.000 tonnes représentent environ 47% de Deglet-Nour, considérée comme étant la meilleure variété de dattes commerciales permettant à l'Algérie de se hisser au premier rang mondial du point de vue qualitatif, alors que près 30 à 40% sont constitués de déchets de dattes de qualité commerciale médiocre, soit environ 140.000 tonnes qui pourraient être valorisées (Touzi, 2005).

### **I.2.4. Valeur nutritionnelle de la datte**

La datte est composée essentiellement d'eau, de sucres réducteurs (glucose et fructose) et de sucres non réducteurs (saccharose). Les constituants non glucidiques représentent les protides, les lipides, la cellulose, les cendres (sels minéraux), et les vitamines. La teneur de ces composés est en fonction des variétés et du stade de maturation (Estanove, 1990). La teneur en eau est en fonction des variétés et du stade de maturation de la datte. D'après leur consistance, les dattes sont classées en trois catégories : les dattes molles, demi-molles et sèches. Les teneurs en eau sont respectivement 25,4, 22,6 et 13,7% (Noui, 2007).

Les sucres sont considérés comme les composants majeurs de la datte. De nombreuses analyses faites par différents auteurs et dans différents pays ont montré que la datte contient trois types de sucres, le saccharose, le glucose et le fructose. La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du stade de maturation de la datte. Elle varie entre 65 et 80% du poids de la matière sèche. De façon générale, les dattes molles sont caractérisées par une teneur élevée en sucres réducteurs (glucose, fructose), et les dattes sèches par une teneur élevée en saccharose (Estanove, 1990).

La pulpe de la datte ne contient qu'une faible quantité de protéines. 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. Aussi, il a été montré que le pourcentage de protéines présent dans les noyaux des dattes est plus important que celui de la pulpe (Abou-Zeid et *al.*, 1991). Selon Al-Shahib et Marshall (2003), Les protéines de la datte contiennent 23 acides aminés dont certains ne sont pas présents dans certains fruits comme la banane, la pomme et l'orange. La constitution des acides aminés est la suivante : Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Cystéine, Phénylalanine, Tyrosine, Thréonine, Tryptophane, Valine, Arginine, Histidine, Alanine, Acide aspartique, Acide glutamique, Glycocolle, Proline, Sérine.

Le profil vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs tout à fait appréciables et variables selon les types de dattes et leur provenance. En général, la pulpe de datte contient

essentiellement des vitamines de groupe B (Thiamine B1, Riboflavine B2, Niacine B3, Acide pantothénique B5, Vitamine B6 et les Folates B9 et très peu de vitamine C (Munier, 1973).

Les dattes peuvent être considérées comme des fruits riches en éléments minéraux et constitue de ce fait un aliment plus intéressant, la teneur en éléments minéraux est de 2 et 3,8% du poids sec de datte sans noyau. Les éléments majeurs sont : le potassium, le chlore, le calcium, le magnésium, le sodium et le fer. Le cuivre, le zinc et le manganèse sont également présents à des niveaux intéressants (Jamil et *al.*, 2010).

La pulpe de datte renferme une faible quantité de lipides. Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. Leur taux varie entre 0,7 et 1,1% du poids frais, mais en proportion plus élevée dans le noyau de datte (8,9% à 10,4%) (Abou-Zeid et *al.*, 1991). En effet, 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, et avec une proportion moins importante d'acide myristique, stéarique, linoléique et palmitique (Devshony et *al.*, 1992).

Enfin, d'autres études ont montré que la consommation des dattes réduit le risque de diverses maladies chroniques. Elles ont aussi une activité antioxydant due à la présence de composés hydrosolubles ayant un effet d'élimination des radicaux libres telle que les composés phénoliques (principalement les acides cinnamiques) et les flavonoïdes (Al-Humaid et *al.*, 2001 ; Boudries, 2007).

### **I.2.5. Valorisation des sous-produits de datte en substances à forte valeur ajoutée**

Le processus de production de la datte implique une perte substantielle qui se produit au cours du processus de la cueillette, du stockage, de la commercialisation et du conditionnement. En effet, chaque année, plus de 2.000.000 tonnes de dattes de faible valeur marchande sont perdues (Besbes et *al.* 2005, 2006). Ces déchets peuvent constituer de nouvelles matières premières pour de nombreuses industries du fait de leur richesse en sucres et en d'autres éléments nutritifs. A cet effet, leurs valorisations par des procédés biotechnologiques représentent une solution de choix dans la mesure où elles permettent de produire des substances à haute valeur ajoutée.

Cette partie consiste à faire une synthèse bibliographique sur l'utilisation des sous-produits de datte pour la production de plusieurs substances à forte valeur ajoutée (Tableau I.1).

**Tableau I.1.** Production de substances à haute valeur à partir de sous-produits de dattes

<b>Produits de fermentation</b>	<b>Souches</b>	<b>Références</b>
Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>	Mehyar et al. (2005), Mostafa et Alamri (2012)
Acide lactique	<i>Lactobacillus</i> sp. KCP01 <i>Lactobacillus casei</i> subsp. Rhamnosus	Chauhan et al. (2007) Nancib et al. (2005)
Cellulose bactérienne	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Moosavi-Nasab et Yousefi (2011)
Curdlane	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 6466	Salah et al. (2011)
Gomme de xanthane	<i>Xanthomonas campestris</i>	Moosavi-Nasab et al. (2009), Salah et al. (2010), Salah et al. (2011)
Bléomycine	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Radwan et al. (2010)
Produit laitier fermenté	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12, <i>B. longum</i> Bb- 46 et <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Al-Otaibi et Saleh (2010)
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nancib et al. (1997), Al-Jasass et al. (2010)
Caroténoïdes	<i>Lactobacillus plantarum</i> QS3	Elsanhoty et al. (2012)
Acide glutamique	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT690 et <i>C. glutamicum</i> 2262	Tavakkoli et al. (2012) et Davati et al. (2007) Mouffok et al. (2012)
Polyhydroxyalcanoates	<i>Bacillus</i> spp	Khiyami et al. (2011)
Acétone-butanol-éthanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 et <i>Bacillus subtilis</i> DSM 4451	Abd-Alla et Ei-Enany (2012)
Le vin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	Shi et al. (2005)
Protéine d'origine unicellulaire	<i>Candida utilis</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aleid et al. (2010)
Nisine	Bactéries lactiques	Khiyami et al. (2008)

### I.2.5.1. Acides organiques

- **Acide citrique**

L'acide citrique a été largement utilisé dans les aliments, les industries pharmaceutiques et chimiques en raison de sa faible toxicité (Drysdale et McKay 1995; Radwan et *al.*, 2010). En 2008, la production d'acide citrique a atteint plus de 1,6 millions de tonnes et on s'attendait à une augmentation de cette tendance (Husseiny et *al.*, 2010). En raison de sa large utilisation, bonne qualité et faible coût de production, l'acide citrique est d'un grand intérêt pour les industries. Afin de minimiser le coût de la production, l'intérêt pour l'utilisation des déchets agro-industriels et de sous-produits a augmenté.

Mehyar et *al.* (2005), ont étudié l'habilité de *Aspergillus niger* à produire de l'acide citrique à partir de sous-produits de dattes. Deux souches de *Aspergillus niger* ont été cultivées dans les milieux contenant différentes concentrations d'extrait de datte enrichi par le lactosérum, le méthanol et le phosphate tricalcique. Les résultats ont montré que l'ajout du lactosérum, du méthanol et de phosphate tricalcique dans le milieu améliore la production d'acide citrique. Les concentrations d'acide citrique obtenues sont respectivement 38,4 et 42,4 g.l<sup>-1</sup> dans un milieu de datte enrichi par le méthanol et le phosphate tricalcique.

Acourene et *al.* (2011), ont étudié le potentiel des déchets de datte en tant que substrats pour la production de l'acide citrique en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102 et *Aspergillus niger* ATCC 16404. Les résultats ont montré que les conditions optimales de fermentation sont obtenus avec un temps de fermentation de 144 heures, un pH de 3,5 et une température de 30°C, en utilisant, respectivement, un milieu contenant 150 (g.l<sup>-1</sup>) du sucre, 2,5 (g.l<sup>-1</sup>) du nitrate d'ammonium et 2,5 (g.l<sup>-1</sup>) de phosphate de potassium. Sous ces conditions optimales, une concentration maximale d'acide citrique a été obtenue (126,4 g.l<sup>-1</sup>).

Mostafa et Alamri (2012), ont utilisé des cellules immobilisées de *Aspergillus niger* pour produire de l'acide citrique. L'un des avantages les plus importants de cellules immobilisées est leur capacité et leur stabilité de produire l'acide citrique en culture discontinue répétée. Plus de quatre cultures discontinues répétées, la production d'acide citrique a été maintenue pendant 24 jours. Les résultats ont également montré que la présence appropriée d'azote, de phosphate et de magnésium semble être important pour la production d'acide citrique. Tous les résultats obtenus ci-dessus ont confirmé que la datte et ses sous-produits peuvent être utilisés comme substrats pour la production d'acide citrique.

- **Acide lactique**

L'acide lactique est un produit chimique industriel important qui est utilisé comme conservateur dans les industries alimentaires et de boissons. Malgré que la majorité des études sur la fermentation de l'acide lactique se sont concentrés sur l'utilisation de substrats tels que le glucose (Ishida et *al.*, 2006; Yadav et *al.*, 2009), ou de l'hydrolysate d'amidon (Tanaka et *al.*, 2006), il a été constaté que le coût du milieu seul représente 60 à 80% du coût total de production, rendant ainsi impératif d'utiliser d'autres matières plus économiques tels que les déchets agricoles et les sous-produits.

Chauhan et *al.* (2007), ont obtenu une production d'acide lactique par *Lactobacillus* sp. KCP01 de 2,6 g.l<sup>-1</sup> dans un milieu contenant seulement du jus de dattes à une concentration en sucre de 5%. Lorsque des sels et des sources d'azote organiques ont été supplémentés dans le milieu, une amélioration de la concentration d'acide lactique a été obtenue (15,1 g.l<sup>-1</sup>).

Nancib et *al.* (2005), ont étudié la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. L'ajout de cinq vitamines du groupe B à moins de 25 mg.l<sup>-1</sup> au jus de datte pourrait améliorer la production d'acide lactique.

Yadav et *al.* (2011), ont obtenu une meilleure productivité de l'acide lactique en utilisant *L. delbruckii*, dans un milieu de production optimale contenant 10% de jus de datte, 1% d'extrait de levure, 0,6% d'acétate de sodium, 0,5% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 0,5% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

- **Acide acétique**

L'acide acétique est un produit chimique important et a été largement utilisé dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. En raison de l'épuisement des ressources naturelles, la production d'acide acétique par voie microbienne a suscité beaucoup d'intérêt.

La production d'acide acétique à partir des dattes implique principalement deux étapes. Dans la première étape, le sucre de jus de datte est transformé en alcool par *Saccharomyces* sp. Dans la deuxième étape, l'alcool est converti en acide acétique par *Acetobacter* sp. Les micro-organismes couramment utilisés pour la production d'acide acétique sont *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *Acetobacter xylinum* et *A. cycendens* (Sokollek et *al.*, 1998; Manickavasagan 2012).

### I.2.5.2. Exo-polysaccharides

- **Cellulose bactérienne**

La cellulose bactérienne est un exo-polysaccharide produit par diverses espèces bactériennes, ayant de bonnes propriétés : sans composants indésirables (lignine et hémicelluloses), une cristallinité élevée de polymère et un degré de polymérisation important (Chawla et *al.*, 2009). En raison de ses propriétés et structures uniques, la cellulose bactérienne a de nombreuses applications dans une variété de formulations alimentaires (Khan et *al.*, 2007).

Moosavi-Nasab et Yousefi (2011), ont utilisé un jus de datte de faible qualité marchande pour la production de la cellulose bactérienne en utilisant *Gluconacetobacter xylinus* et ont obtenu 4,35 g par 100 ml de jus de dattes après 336 heures de fermentation. La diffractométrie des rayons X a montré que le niveau de cristallinité de la cellulose standard (83,61%) est supérieur à celui de la cellulose bactérienne (60,73%). Ceci a montré que le jus de datte pourrait être utilisé comme substrat pour la production de la cellulose bactérienne.

- **Curdlane**

Le curdlane est un polysaccharide neutre et insoluble dans l'eau, qui est principalement composé de D-glucose unis par des liaisons osidiques  $\beta$ -(1-3) (Delattre et *al.*, 2009; West 2009). Le curdlane est utilisé comme additif utile pour une variété de produits alimentaires, tels que les nouilles, les sauces, et les viandes congelés (Zhang et Nishinari, 2009).

Le curdlane actuellement commercialisé est relativement coûteux. Cela est dû principalement à l'utilisation de sources de carbone coûteuses, à savoir le glucose et le saccharose. Ainsi, afin d'accroître son attractivité économique, son coût de production devrait être réduit (Funami et Nishinari, 2007 ; Zhang et Nishinari, 2009).

Salah et *al.* (2011), ont étudié la possibilité d'utiliser les sous-produits de datte pour la production de curdlane par *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466. Dans des conditions optimales d'un milieu contenant 2 g.l<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium, une concentration de glucose du jus de datte de 120 g.l<sup>-1</sup>, un pH de 7, une température 30°C, une vitesse d'agitation 180 rpm et un temps de fermentation de 51 heures, la production de curdlane obtenue est de 22,83 g.l<sup>-1</sup>.

- **La gomme xanthane**

La gomme de xanthane est la gomme industrielle la plus commercialement produite (Kalogiannis et *al.*, 2003). Elle a été largement utilisée comme épaississant ou stabilisant dans les industries alimentaires pharmaceutiques et de récupération de pétrole.

Moosavi-Nasab *et al.* (2009), ont utilisé *Xanthomonas campestris* pour la production de gomme de xanthane en utilisant le jus de datte en tant que substrat. Les résultats ont montré que la concentration de gomme augmente avec une augmentation du temps de fermentation avec un rendement maximal de 0,89 g/100 ml après 96 heures de culture. Le xanthane obtenu présente une composition chimique très similaire à celle du xanthane commercial.

Salah *et al.* (2010, 2011), ont étudié et optimisé la production de gomme xanthane par *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Les résultats ont montré que cette souche avait une forte capacité à métaboliser les sous-produits de datte avec une production de 43,35 g.l<sup>-1</sup> de curdlane dans un milieu optimal contenant 84,68 g.l<sup>-1</sup> de source de carbone, 2,7 g.l<sup>-1</sup> de source d'azote et une température de 30,1°C.

- **Antibiotiques**

L'oxytétracycline est un antibiotique à large spectre produit par différentes espèces de *Streptomyces*. L'antibiotique est actif sur les bactéries à Gram-positives et Gram-négatives.

Abou-Zeid *et al.* (1993), ont utilisé les constituants de la datte comme milieu nutritif pour la production d'oxytétracycline. Les résultats ont montré que l'ajout de 1 g.l<sup>-1</sup> d'urée et de lipides de noyaux de dattes dans le milieu augmente l'efficacité de la formation de l'antibiotique. Lorsque les composants du milieu (MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> et ZnSO<sub>4</sub>) ont été remplacés par 0,5 g.l<sup>-1</sup> de cendre de noyaux de dattes, la production des antibiotiques a également été améliorée. La bléomycine est une famille d'antibiotiques de type dérivé glycopeptidique (Troost *et al.*, 2009). La bléomycine a une forte activité anti-tumorale et par conséquent il a été largement utilisé pour le traitement de plusieurs tumeurs malignes (Aras et Dilsizian 2008; Evens *et al.*, 2008).

Radwan *et al.* (2010), ont optimisé la composition et la concentration d'un milieu de fermentation pour la production de bléomycine par *Streptomyces mobaraensis*. Lorsque le jus de datte a été utilisé comme source de carbone supplémentaire, une quantité plus élevée de bléomycine a été obtenue par rapport au glucose. Sous les conditions optimales, un rendement de la bléomycine de 138 mg.l<sup>-1</sup> est obtenu. Le milieu complexe contenant 40g.l<sup>-1</sup> de jus de datte comme source de carbone supplémentaire a amélioré la production de la bléomycine de 73%.

- **Les probiotiques**

Les produits laitiers fermentés sont bénéfiques pour la santé (Parodi, 1999). Hashim (2001), a étudié les caractéristiques et l'acceptabilité du yogourt contenant des dattes. Les résultats ont montré que l'ajout de 10-20% de pâte de dattes n'affecte ni l'acidité du yogourt, ni les protéines ni les matières grasses, mais augmente de manière significative le taux de matières solides. De plus, l'ajout de 15% de pâte de dattes avec 5% de jus de dattes donne un yogourt avec une qualité sensorielle souhaitée.

Gad *et al.* (2010), ont utilisé des dattes en reconstituant le lait écrémé en poudre dans le traitement de yogourt avec 14% du total des matières solides. Les résultats obtenus ont montré que le yogourt enrichi avec 10% de dattes avait une douceur significative, des valeurs antioxydantes plus élevées, riche en minéraux solubles et une concentration de folate plus élevée par rapport à du yogourt nature. L'ajout de jus de datte au yogourt probiotique permet d'améliorer le nombre de bifidobactéries et leurs survies pendant la période de conservation jusqu'à 10 jours. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le jus de datte contient certains éléments tels que les vitamines et les minéraux, ce qui augmenterait la croissance des bifidobactéries.

Al-Otaibi et Saleh (2010), ont incorporés les microorganismes probiotiques à savoir *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Bifidobacterium longum* Bb-46 et *L. acidophilus* La-5 dans les pâtes de datte. Toutes les bactéries probiotiques étaient capables de survivre dans le milieu à base de dattes. Le nombre de *L. acidophilus* est resté supérieure à  $6 \log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> jusqu'à la troisième semaine de stockage. Le nombre de *B. lactis* et *B. longum* est resté supérieure à  $6 \log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> jusqu'à la huitième et la dixième semaine de stockage.

Afin d'obtenir des informations sur l'utilisation de sucres dans la fermentation du lait, Hartati *et al.*, (2012) ont ajouté les dattes dans la boisson du yogourt avec différents pourcentages. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de la datte de 3,19 à 3,32%, augmente les sucres réducteurs de 2,15 à 2,99%, et la valeur du pH diminue de 3,8 à 3,76. Cependant, l'ajout de la datte dans la boisson du yogourt n'a eu aucun effet sur l'acidité. Cette étude a indiqué que le lactose et la concentration en sucres réducteurs et la valeur de pH du lait fermenté pourraient être affectés par des bactéries lactiques en raison de l'utilisation des dattes.

- **Les levures**

Les dattes constituent un bon substrat potentiel pour la production de la levure de boulangerie.

Khan et *al.* (1995), ont utilisé les dattes saoudiennes pour la production de la levure boulangère. Ils ont utilisé six souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* dans un milieu de fermentation contenant de l'extrait sucré de pulpe de datte (avec 60% de sucres), en plus de 2 g.l<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium et 50 mg.l<sup>-1</sup> de biotine. Les rendements obtenus sont environ de 42,8%.

Nancib et *al.* (1997) ont utilisé des sous-produits de datte pour la production de levure de boulangerie provenant de *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que ce milieu soit satisfaisant pour la production de la levure, les rendements obtenus sont très faibles (avec une concentration maximale de biomasse de 0,60 g.l<sup>-1</sup> dans le milieu de fermentation) par rapport à l'optimum d'environ 40 g.l<sup>-1</sup> prévue pour une production économique.

Al-Jasass et *al.* (2010), ont utilisé le jus de datte et les mélasses pour la production de la levure de boulangerie à partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus ont montré que le rendement global de la biomasse à partir du substrat du jus de datte était significativement plus faible que celui obtenu à partir des mélasses. Ceci est du probablement aux fortes concentrations des acides organiques toxiques contenus dans le jus de datte.

El-Sharnouby et *al.* (2010), ont étudié les performances de la levure de boulangerie sur la qualité du pain saoudien. Leurs résultats obtenus ont montré que la levure produite à partir du jus de datte était comparable à celle de la levure produite à partir des mélasses. Il y avait des différences insignifiantes en ce qui concerne la production de gaz (CO<sub>2</sub>) entre les levures produites à partir du sirop de datte et celle de mélasses. Ainsi, il a été conclu qu'une levure performante peut être obtenue en utilisant le jus de datte comme substrat de fermentation.

### **I.2.5.3. Autres substances à haute valeur ajoutée**

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des pigments naturels responsables des couleurs de nombreux aliments. Certains caroténoïdes sont les précurseurs de la vitamine A, qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine, y compris l'amélioration du système immunitaire et la réduction du risque de maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et la cataracte (Krinsky 2001; Garrido-Fernández et *al.*, 2010). L'utilisation commerciale des microorganismes pour produire des caroténoïdes est actuellement limitée par le coût de production élevé. Cependant, le coût de la production de caroténoïdes par fermentation pourrait être minimisé par l'utilisation industrielle des sous-produits de faible coût (Aksu et Tugba, 2005).

Elsanhoty et al. (2012), ont utilisé les déchets de dattes pour la production de caroténoïdes. *Lactobacillus plantarum* QS3 a donné la meilleure production. Lorsqu'il est utilisé seul, le jus de datte à une concentration en sucre de 5% a permis de produire 16,21 mg.kg<sup>-1</sup> de cellules sèches de caroténoïdes. Le modèle de Plackett-Burman a montré que la peptone, le K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, l'acétate de sodium et le jus de datte ont affecté la production de caroténoïdes. Un rendement de caroténoïdes de 54,89 mg.kg<sup>-1</sup> de cellules sèches a été obtenu dans des conditions optimales.

- **Acides aminés**

Le glutamate est principalement utilisé comme agent aromatisant (Nandakumar et al., 2003, Jyothi et al., 2005). Selon Shimizu et Hirasawa (2006), la production de glutamate est de plus de 1,5 millions de tonnes par an. Plusieurs études ont été menées pour améliorer le processus de fermentation de glutamate, en adoptant des alternatives plus économiques.

Tavakoli et al. (2012), ont utilisé le modèle méthodologie de surface de réponse pour évaluer l'effet des paramètres de fermentation pour la production de glutamate en utilisant comme substrat les déchets de datte. Les conditions optimales de fermentation sont à un taux d'inoculum de 2% (v/v), une concentration du substrat de 25% (w/v), une concentration en pénicilline de 1 U/ml, une concentration en phosphate de 4 g.l<sup>-1</sup>, un âge d'inoculum de 10 heures, pour une production maximale d'acide glutamique de 39,32 mg.ml<sup>-1</sup>.

Davati et al. (2007), ont utilisé deux mutants *Corynebacterium glutamicum* CECT690 et CECT77 pour étudier la possibilité de produire des acides aminés à partir des déchets de datte. Selon les résultats obtenus, les facteurs les plus efficaces sur la production d'acide glutamique étaient la quantité de déchets de datte, le temps d'ajout de pénicilline, la quantité de phosphate et le type de microorganisme. Les résultats ont montré que le jus de datte utilisé en tant que substrat de fermentation constitue un bon potentiel de production du glutamate.

- **Polyhydroxyalcanoates (PHAs)**

Les polyhydroxyalcanoates sont un groupe de biopolymères renouvelables et biodégradables qui ont des propriétés thermoplastiques. Le coût de production de biopolymères est un paramètre crucial par rapport à celui des matières plastiques non-biodégradables synthétisées chimiquement (Bengtsson et al., 2010). Jusqu'à présent, les matières premières à faible coût, tels que le jus de datte, les déchets industriels et municipaux, pourraient être considérées comme des paramètres importants pour réduire le coût de production.

Khiyami et *al.* (2011), ont testé la capacité d'accumulation des PHAs chez *Bacillus* spp en utilisant le jus de datte comme substrat et ont obtenu 8,3 g.l<sup>-1</sup> de matières sèches cellulaires avec une teneur en PHAs d'environ 70,5%. La gamme moyenne de poids moléculaire se situe entre 3,7 à 4.1x10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>. Cette étude a montré que le jus de datte pourrait être considéré comme étant un milieu complexe contenant tous les éléments nécessaires à la production des PHAs.

- **Biocarburant**

Les biocarburants les plus couramment utilisés sont l'Acétone, le Butanol et de l'Ethanol (ABE). Ces produits sont des solvants utilisés dans de nombreuses industries importantes et ont un fort potentiel pour remplacer l'énergie dérivée pétrochimique. Les coûts de substrat peuvent représenter environ 63% du coût total de la production d'ABE (Kumar et *al.*, 2011). Ainsi, des substrats tels que les déchets agricoles offrent des alternatives potentielles (Qureshi et *al.*, 2010 a, b, c). Abd-Alla et El Enany (2012), ont utilisé les déchets de datte comme substrat de fermentation pour la production de l'ABE par une culture mixte de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 et *Bacillus subtilis* DSM 4451, et dont les résultats ont donné 21,56 g.l<sup>-1</sup> d'ABE à partir de 75 g.l<sup>-1</sup> de sucres de jus de dattes. L'ajout d'extrait de levure (5 g.l<sup>-1</sup>), ou du nitrate d'ammonium (1,6 g.l<sup>-1</sup>) a considérablement amélioré la production d'ABE. Ces résultats suggèrent que les déchets de datte pourraient être efficacement utilisés pour la production commerciale d'ABE.

- **Le vin**

Le vin est une boisson provenant des fruits et parfois des légumes. Etant riche en sucres fermentescibles, le jus de datte serait une bonne matière première pour la fabrication du vin. En effet, Un vin de datte de bonne qualité (12% d'éthanol, 0,35 à 0,54% d'acidité, et le pH de 4-4,2) a été obtenu en utilisant une souche *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Shi et *al.*, 2005).

- **Protéines d'origine unicellulaires (P.O.U.)**

Les POU, comme source de protéines, sont utilisés pour remplacer les protéines concentrées dans l'alimentation animale. Les POU peuvent être produits à partir de bactéries, de levures, de moisissures et d'algues en utilisant différents substrats comme source de carbone.

Aleid et *al.* (2010), ont utilisé *Candida utilis* et *S. cerevisiae* pour la production des POU à partir de jus de dattes en tant que substrat de fermentation. Les rendements en biomasse

pourraient atteindre plus de 90% de la valeur théorique, et la teneur en protéines de la biomasse était d'environ 50%. La composition en acides aminés des protéines était de haute qualité contenant la plupart des acides aminés essentiels, en particulier la lysine et les acides aminés soufrés.

- **Nisine**

La nisine est une bactériocine produite par certains types de bactéries lactiques. Khiyami et *al.* (2008), ont étudié le potentiel de l'utilisation de déchets d'une variété de dattes comme milieu complexe pour la production de la nisine. Une faible concentration de jus de datte de 5% a permis une amélioration du rendement en nisine. La production de nisine commence après 2 heures de culture et atteint le maximum après 12 heures de culture.

### **Conclusion**

De nombreuses études ont montré que les sous-produits de dattes constituent un bon substrat pour la production de différentes substances à haute valeur ajoutée. En effet, l'utilisation des sous-produits de datte dans le domaine de la biotechnologie industrielle pourrait offrir plusieurs avantages économiques, sociaux et environnementaux. Des efforts devraient être fournis pour explorer de nouveaux microorganismes pouvant convertir les sous-produits de dattes en produits finis et en nouveaux composés bioactifs.

## **I.3. PLANS D'EXPÉRIENCES**

### **I.3.1. Définition et domaine d'application des plans d'expériences**

Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement (Pierre, 2005 ; Pierre, 2008). Leur but est d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé.

Les plans d'expériences sont appliqués dans différents domaines des sciences : agronomie, biologie, calcul numérique, chimie, électronique, marketing, mécanique, physique... et cela, à tous les niveaux, depuis la recherche fondamentale jusqu'à la satisfaction du client (Pierre, 2005).

La méthode des plans d'expériences a été mise au point au début du siècle dernier, dans les années 1920, par Fisher (statisticien anglais). Elle a pris un essor considérable avec le développement de l'informatique et la puissance de calcul qui l'accompagne. Elle repose essentiellement sur des expérimentations multifacteurs et sur un traitement des résultats à l'aide de régressions multiples et d'analyse de variance. Les plans d'expériences ont d'abord été utilisés en agronomie. Puis, peu à peu, ils ont été utilisés dans d'autres domaines techniques. L'universalité de ces méthodes fait que ces dernières sont employées dans de nombreux domaines : en recherche fondamentale, en recherche appliquée, en développement industriel et même en fabrication.

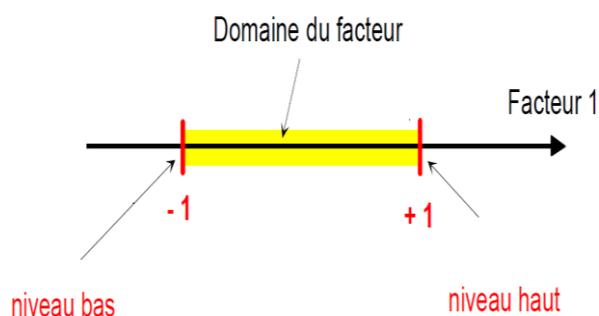
Les principaux avantages de cette méthode sont :

- Diminution du nombre d'essais
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- Détection des interactions entre les facteurs
- Modélisation des réponses étudiées
- Une précision optimum des résultats

Il s'agit donc de tracer un plan expérimental détaillé avant de faire l'expérience dont l'objectif principal est l'obtention de maximum de renseignements avec le minimum d'expériences (Tinsson, 2010).

L'utilisation des plans d'expériences ressemble à une boîte noire qu'on analyse afin de comprendre son fonctionnement. Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une

grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables (facteurs). La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté. La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut. L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine du facteur (Figure I.13).



**Figure I.13.** Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

### I.3.2. Différents types des plans d'expériences

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences et sont décrits dans la littérature (Chandran et Singh, 2007). Cependant, pour le choix d'un plan adéquat, il y a un certain nombre de prérequis, tels que l'objectif poursuivi par l'analyste, le type et le nombre de facteurs à étudier, les informations à recueillir, et même les exigences de l'expérimentateur (Bouabidi, 2013). Le Tableau I.9 donne une classification des plans d'expériences.

**Tableau I.2.** Classification des plans d'expériences (Bouabidi, 2013)

Classe	Type de plan sélectionné
Détection des facteurs influents	Plans de Plackett-Burman Plans Factoriels Plans de Taguchi ...
Optimisation d'un processus (procédures)	Plans Central composite Plans de Box-Behnken ... Plans de Doehlert
Comparer un grand nombre de produit	Blocs incomplets équilibrés...

Il existe trois grandes familles de plans d'expériences, plans de mélange, plans de criblage et plans de modélisation ou surfaces de réponses. Nous nous contenterons ici d'expliquer brièvement ces plans d'expériences les plus utilisées.

Les plans de mélange sont des plans particuliers adaptés à l'étude des facteurs dépendants. Ils sont principalement utilisés pour l'étude de l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée (Goupy, 2006).

### **I.3.2.1. Plans de criblage**

L'objectif de ces plans est de découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse donnée. Aucune relation précise entre les variations des facteurs et celle de la réponse n'est établie. Parmi les plans proposés: plans factoriels complets à deux niveaux, plans factoriels fractionnaires et plans de Plackett-Burman (Angellier, 2005)

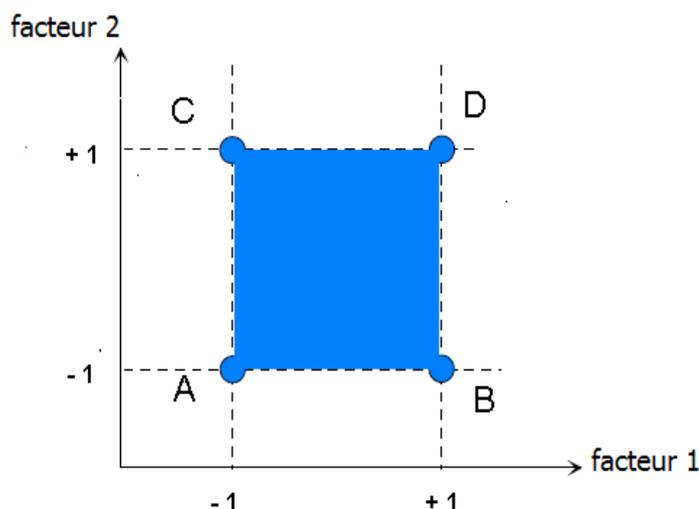
#### **I.3.2.1.1. Plans factoriels complets à 2 niveaux**

Ces plans consistent à tester toutes les combinaisons possibles, en faisant varier tous les facteurs à tous leurs niveaux de manière exhaustive, d'où leur nom de plans factoriels complets, ils servent à faire le criblage et la modélisation. Ils peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes (Goupy, 2006).

Chaque facteur a 2 niveaux. On aura donc  $2^k$  ( $k$  est le nombre de facteurs) essais au total. Les plans factoriels complets à deux niveaux sont les plus simples et permettent d'établir une base pour tout début d'expérimentation. Le principe de ce type de plan consiste en l'utilisation d'un niveau haut (+1) et d'un niveau bas (-1) pour un facteur afin d'étudier son influence.

La Figure I.14 représente un plan factoriel complet à deux facteurs. Le carré représente le domaine d'étude auquel l'expérimentateur s'intéresse. Chaque point de ce carré peut être l'objet d'une expérience. Afin de limiter le nombre d'expérience, l'expérimentateur établit une loi du premier degré, permettant de se limiter à deux essais par facteurs, et exprimant l'évolution de la réponse en fonction des facteurs :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2$$



**Figure I.14.** Plan factoriel complet à deux facteurs

Les avantages des plans factoriels complets sont nombreux et nous n'en citerons que les principaux:

- Comme chaque facteur ne prend que deux niveaux les essais sont faciles à contrôler et les risques d'erreurs sont minimisés.
- Les plans factoriels complets sont des plans d'expériences optimaux qui étudient toutes les combinaisons possibles des niveaux des facteurs traités et qui nous garantissent les meilleurs résultats.
- La modélisation mathématique est immédiate.
- Les résultats obtenus avec un premier plan peuvent être utilisés en partie ou en totalité soit, pour explorer une zone du domaine expérimental soit, pour établir un modèle mathématique de degré plus élevé.

Le seul inconvénient de ces plans est qu'ils obligent rapidement à faire beaucoup d'essais. Par exemple, pour étudier simplement sept facteurs il faut réaliser 128 expériences. Cependant, de nombreuses interactions sont nulles et certains facteurs sont sans influence. C'est pourquoi les plans factoriels fractionnaires ont été développés.

### **I.3.2.1.2. Plans fractionnaires à deux niveaux $2^{k-p}$**

En pratique, les plans complets ne sont utilisables que sur des systèmes avec très peu de facteurs, ou lorsque chaque essai prend très peu de temps. Lorsque  $n$  est plus grand ou égal à 3 alors les coûts des expériences peut très vite devenir onéreux. Les plans factoriels fractionnaires consistant à sélectionner certaines combinaisons c'est à dire, on n'effectue dans

l'expérimentation qu'une fraction des essais du plan complet (Goupy, 2006). Ceci permet de réduire les coûts mais diminuent également l'information disponible sur le comportement du système. Le modèle Taguchi, Plackett-Burman, la conception des composites centrales et le modèle de Box-Behnken sont des modèles factoriels fractionnaires qui ont été utilisés dans différentes types de fermentations telles que la production d'hydrogène (Lin et Lay, 2004; Box et Behnken, 1960).

Lorsque le nombre de facteurs augmente, la solution proposée par les plans fractionnaires, consiste à utiliser pour l'étude de  $k$  facteurs les matrices des effets des plans complets  $2^{k-1}$ , ou  $2^{k-2}$ , ..., ou  $2^{k-p}$ . Les plans fractionnaires sont appelés pour cette raison plans  $2^{k-p}$  (Goupy, 1990). Les plans fractionnaires sont alors indispensables pour réduire le nombre d'essais.

### **I.3.2.1.3. Plans de Plackett-Burman**

Parmi un ensemble de facteur donné par l'expérimentateur, tous ne sont pas obligatoirement réellement influents sur les variations de la réponse. C'est la technique de screening qui permettra de déterminer ceux ayant une influence avérée, en utilisant des plans dits «plans de criblage» qui permettent de quantifier et de classer les effets de chacun des facteurs. Parmi ces plans, citons le plan de Plackett-Burman qui est basée sur la matrice d'Hadamard où chaque facteur peut prendre deux niveaux (-1 ou +1) pour la concentration minimale et maximale respectivement (Deming et Morgan, 1988; Taguchi et Konishi, 1987). Ces matrices permettent d'évaluer l'influence de  $k$  facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences  $N$ , tel que  $N = K+1$ , donc avec un minimum d'essais.

Le modèle mathématique résultant est un polynôme d'ordre 1 :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

où :

$Y$  : la réponse

$\beta_0$  : représente la valeur moyenne théorique de la réponse

$\beta_i$  : les effets principaux des facteurs  $X_i$

Parmi les principaux avantages, le plan Plackett-Burman est particulièrement économique pour détecter les effets principaux. Il est orthogonal, permettant ainsi d'estimer les paramètres du modèle avec une précision optimale. Pour les inconvénients, ce plan n'utilise que 2 niveaux uniquement, ne peut donc effectuer les effets non linéaires. Les propriétés du plan du

Plackett-Burman sont basées sur celles des matrices d'Hadamard, cela contraint toutefois l'expérimentateur à un nombre d'essais  $n$  égale à un multiple de 4 (Goupy, 1990).

### I.3.2.2. Plans de modélisation

L'objectif de ce plan est de trouver la relation mathématique du second degré qui lie les réponses mesurées aux facteurs elle est du type:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_{ik} + \sum \sum \beta_{ij} x_{ik} x_{jk} + \sum \beta_{ik} x_{ik}^2 + \zeta_k$$

L'intérêt de ces plans est de faciliter le développement séquentiel d'une étude. On peut commencer par un plan factoriel et poursuivre l'expérimentation par un plan étoile. On aboutit alors à un plan composite interprétable à l'aide d'un modèle du deuxième degré (Angellier, 2005).

Il existe plusieurs types de plans du second degré, les plus employés étant le plan composite central et le modèle Box-Behnken.

#### I.3.2.2.1. Plan composite centrale

Les plans composites centraux sont constitués de trois parties, ce qui permet une démarche séquentielle (Benoist et *al.*, 1994 ; Embadi et *al.*, 2009 ; Ruchir et *al.*, 2010).

1. Un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux (-1, +1) du plan factoriel complet,  $2^f$  expériences ( $f$ , nombre de facteurs)..
2. Au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude.
3. Des points axiaux en étoile ( $-\alpha$ ,  $+\alpha$ ). Ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

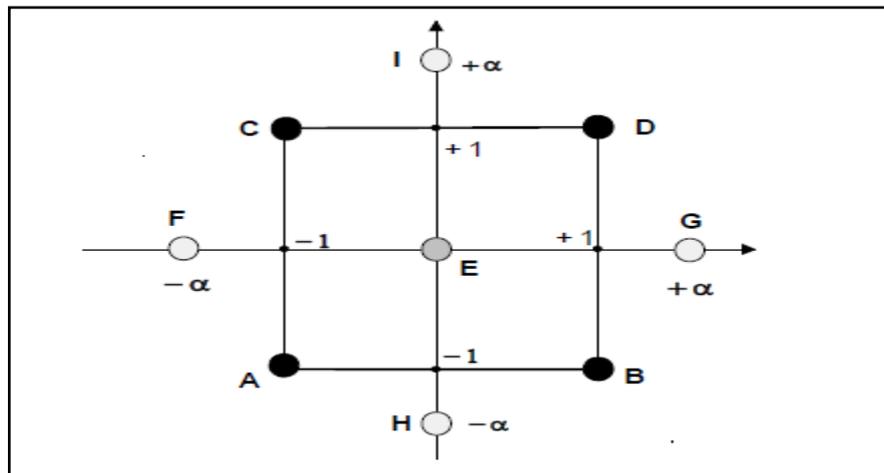
Le nombre total de  $N$  essais à réaliser pour  $f$  facteur est donné par la relation suivante :

$$N = 2^f + 2f + 1 \text{ (Dejaegher et Vander Heyden, 2009 ; Lewis, et al., 1999)}$$

Les Plans Composites Centraux sont un bon complément des plans orthogonaux, de par leurs propriétés statistiques, mais aussi parce qu'ils sont meilleurs que les plans orthogonaux pour certains problèmes. Ils sont développés, en particulier, dans la Méthodologie des Surfaces de Réponse, et ils permettent l'étude d'un modèle quadratique, dans la plupart des cas des phénomènes non linéaires. Tous les facteurs pour lesquels on souhaite tester l'influence quadratique auront 5 niveaux (Goupy, 2006).

Il est possible de générer différents plans de ce type en faisant varier la distance entre le point central et les points aux bords du domaine. Ils ne testent que 3 ou 5 niveaux par paramètres (Benois et *al.*, 1994 ; Embadi et *al.*, 2009 ; Panasuriya et *al.*, 2010).

La Figure I.15 représente un plan composite pour deux facteurs. Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan  $2^2$ . Le point E est le point central. Ce point peut avoir été répliqué une ou plusieurs fois. Les points F, G, H et I sont les points axiaux. Ces quatre derniers points forment ce que l'on appelle le plan en étoile. On réalise 9 essais et 6 coefficients doivent être déterminés. Il faut donc résoudre un système de 9 équations à 6 inconnues.

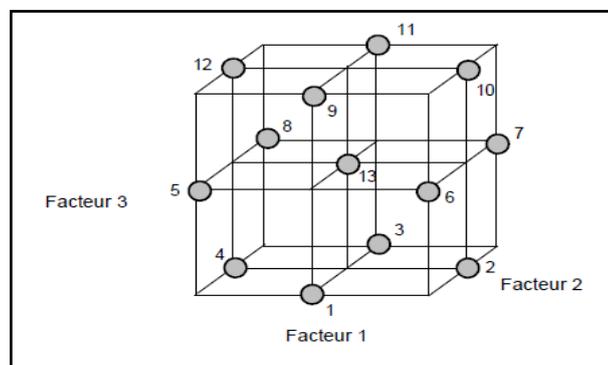


**Figure I.15.** Plan composite pour deux facteurs (Goupy, 2006).

### I.3.2.2.2. Modèle de Box-Behnken

Box et Behnken ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Ce sont des plans dont les variables ne prennent que 3 niveaux (-1, 0 et +1). Ces plans d'expérience sont composés d'une matrice factorielle à 2 niveaux et de bloc incomplets équilibrés en suivant un arrangement particulier. Ces matrices sont ensuite complétées d'un point au centre du domaine (Chagnon, 2005).

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure I.16). Ces plans comportent douze essais auxquels on peut ajouter un ou plusieurs points centraux.



**Figure I.16.** Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.

Les plans de Box-Behnken répondent à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère (ou une hyper sphère) centrée à l'origine du domaine expérimental. C'est le critère d'isovariance par rotation (Goupy, 2006).

Ce modèle est un moyen important pour la détermination des interactions présentes entre les différents facteurs ainsi que la détermination de leurs concentrations optimales. Les plans de Box-Behnken sont une alternative aux plans composites parce qu'ils requièrent seulement 3 niveaux pour chaque facteur et permettent aussi de modéliser une surface de réponse de degré 2 (Benoist et *al.*, 1994).

Afin de prédire le point optimal, une fonction polynomiale de second ordre est proposée. Elle permet d'étudier la relation entre les variables indépendantes et la réponse. La forme générale de l'équation polynomiale du second ordre est la suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

$Y_i$  : la réponse ;

$\beta_0$  : la constante du modèle ;

$X_i, X_j$  : les variables indépendantes ;

$\beta_i$  : le coefficient linéaire ;

$\beta_{ii}$  : le coefficient quadratique ;

$\beta_{ij}$  : le coefficient d'interaction.

## **II. Matériel et Méthodes**

## **II.1. MATERIEL ET PRODUITS CHIMIQUES**

### **II.1.1. Matériel**

#### Matériel pour cultures

- Fermenteur 2 litres, Biolafitte avec son système d'agitation, de régulation de la température, de l'oxygène dissous et du pH.
- Sonde pH, Ingold
- Sonde oxygène, Ingold
- Bain-marie, Bioblock Scientific
- Étuve bactériologique, Memmert
- Incubateur avec son système d'agitation et de régulation de température, New Brunswick scientific

#### Matériel pour mesure analytique

- Spectrophotomètre, Multiskan, EL x 800 + Imprimante Epson
- Spectrophotomètre, Spectronic 20 Genesys
- pH-mètre, Prolabo

#### Autres

- Autoclave, SELECTA
- Balance de précision, Kern ALJ 220-4M
- Balance, Sartorius
- Centrifugeuse réfrigérée, Sigma 3-16PK ; Sigma 1-4 ; Adagio EBA 12
- Hotte à flux laminaire, Plastec
- Pipettes automatiques, Gilson
- Pompes péristaltiques, Ismatec Bioblock et Gilson
- Vortex, Janke & Kunkel

### **II.1.2. Produits**

#### Produits chimiques pour les cultures

- Corn Steep liquor, Sigma
- Extrait de levure, Panreac

- Glucose, Prolabo
- Peptone, Sigma
- Urée, Panreac
- Glycérol, Gifrer Barbazat
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Sigma
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Fluka
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Rectapur
- $\text{NaCl}$ , Prolabo
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Panreac
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Prolabo
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Prolabo
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , Fluka
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Merck
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Riedel-deHaen
- $\text{FeCl}_3$ , Panreac
- $\text{CaCl}_2$ , Fluka
- $\text{NH}_4\text{OH}$  33%, Sigma
- $\text{HCl}$  37,5%, Cheminova

#### Vitamines

- Biotine, Sigma
- Thiamine, Sigma
- Déféroxamine
- Bétaine, Sigma

#### Produits chimiques pour les analyses

- Kit enzymatique pour le dosage du L-glutamate, Biopharm, Roche
- Kit enzymatique pour le dosage du saccharose/D-glucose/D-fructose, Biopharm, Roche
- Kit enzymatique pour le dosage du L-lactate, Sigma

## II.2. PRESENTATION DE LA SOUCHE

La souche utilisée au cours de ce travail provient du laboratoire de Génie des Procédés Biotechnologiques, (Institut National Polytechnique de Lorraine Nancy-France). La souche utilisée est *Corynebacterium glutamicum* 2262 modifiée génétiquement, chez lequel la production de glutamate est thermo-inductible. L'excrétion du glutamate commence au début de la phase exponentielle après le choc thermique en augmentant la température de 33 à 39°C. La souche passe de la phase de croissance à la phase de production.

### II.2.1. Caractéristiques de l'espèce bactérienne *Corynebacterium glutamicum*

Les principales caractéristiques de la souche sauvage sont données dans le Tableau II.1.

**Tableau II.1.** Caractéristiques de l'espèce bactérienne *Corynebacterium glutamicum* (D'après Collins et Cummins, 1986)

Caractères principaux	Production d'acides à partir de
Bactérie à Gram positif	Saccharose +
Bacilles courts, droits ou légèrement incurvé ou par paire	Glucose +
Dimensions : 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm	Fructose +
Aspect sur gélose : colonies jaune pâle à jaune, réguliers et lisses	Maltose +
Non sporulant	Tréhalose +
Non mobile	Mannose +
Aérobie facultative	Rhamnose -
Auxotrophe pour la biotine	Galactose -
Production d'acide glutamique	Raffinose -
Température optimale de croissance : 25-37°C	Lactose -
pH optimal de croissance : 7,3-7,4	Xylose -
G+C : 55 à 57,7%	Dextrine -
Paroi : arabinose et galactose. Présence de courtes chaînes d'acides mycoliques	Salicine -
	Amidon -

## II.3. MILIEUX DE CULTURES

### II.3.1. Milieu de préculture

Le Milieu liquide BMCG (Basal Medium *Corynebacterium* Growth) modifié est le milieu de base pour la croissance de *Corynebacterium*. Ce milieu résulte d'une combinaison de plusieurs vitamines et d'un composé chélatant du fer, la déféroxamine, additionnée au milieu minéral décrit par Liebl *et al.* (1989).

**Tableau II.2.** Composition du milieu BMCG modifié

Composant	Concentration
<b>Glucose</b>	34 g.l <sup>-1</sup>
<b>(BMCG base) :</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15 g.l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g.l <sup>-1</sup>
NaCl	1 g.l <sup>-1</sup>
<b>(BMCG sels) :</b>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	400 mg.l <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	40 mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	4 mg.l <sup>-1</sup>
<b>(BMCG éléments) :</b>	
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	0,4 mg.l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,2 mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 mg.l <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4 mg.l <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub>	4 mg.l <sup>-1</sup>
Urée	4 g.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	84 mg.l <sup>-1</sup>
<b>(BMCG vitamines) :</b>	
Biotine	2 mg.l <sup>-1</sup>
Thiamine	20 mg.l <sup>-1</sup>
Déféroxamine	3 mg.l <sup>-1</sup>
Bétaine	2 g.l <sup>-1</sup>

### **II.3.2. Milieu de fermentation**

Le milieu de fermentation utilisé est à base de sucres de jus de datte en tant que source de carbone. Ce milieu a servi de point de départ aux expérimentations, car il ne s'agit en aucun cas d'un milieu optimal pour la souche de *Corynebacterium glutamicum*. En effet, ce milieu a été enrichi en azote, en vitamines et en sels. La composition de ce milieu a été établie et optimisée par nos soins après plusieurs séries de manipulations. Ce milieu regroupe les exigences de la souche en sources carbonée, azotée, minérale et vitaminée. Sa composition variera en fonction des expériences réalisées : sources carbonées, azotées, de vitamines ou de sels.

### **II.3.3. Milieu d'alimentation**

Le milieu d'alimentation utilisé pour les fermentations semi-continues et continues est variable d'une fermentation à l'autre. En effet, la solution d'alimentation contient soit du substrat carboné seul, soit du substrat carboné enrichi en source azotée en en sels minéraux.

## **II.4. STERILISATION**

La stérilisation s'effectue à 121°C durant 20 minutes. Pour éviter les réactions de brunissement, on sépare les sucres des autres constituants. Les vitamines et la bêtaïne sont stérilisés par filtration sur des filtres de porosité (0,2 µm).

## **II.5. CONDUITE DES FERMENTATIONS**

### **II.5.1. Conservation de la souche**

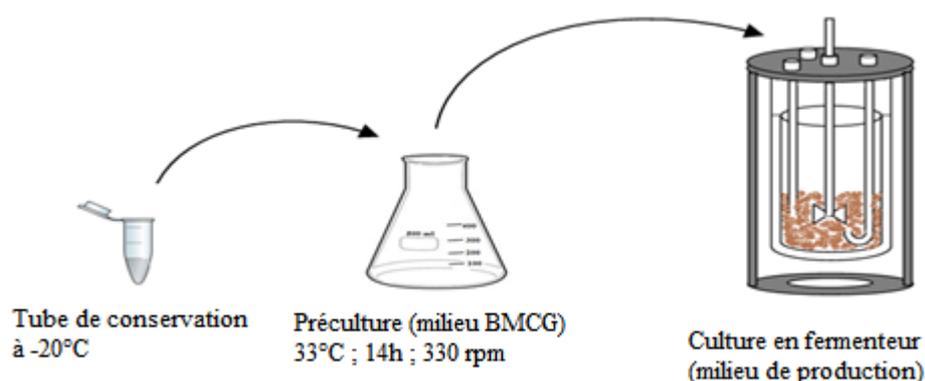
Les souches sont tout d'abord mises sur un milieu liquide BMCG et mises en culture dans une fiole d'Erlenmeyer pendant 14 heures à 33°C pour arriver à la phase exponentielle de croissance. Ensuite, du glycérol à 20% est ajouté à cette culture. Ce mélange est réparti dans des tubes stériles (1,5 ml) puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Un tube sera utilisé pour chaque série de manipulation.

L'objectif de cette étape est de permet également d'utiliser des bactéries dans un même état physiologique initial tout au long de ce travail.

## II.5.2. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum est décrite en détail dans la Figure II.1. Les principales étapes sont résumées ci-dessous :

- Les cellules d'un glycérol stock conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  sont mises en cultures dans une fiole de 500 ml contenant 100 ml du milieu de préculture (BMCG) pendant 14 heures de culture (phase exponentielle) à  $33^{\circ}\text{C}$  sous une agitation de 330 rpm.
- Les cellules sont ensuite utilisées pour l'ensemencement du fermenteur ou de la fiole d'Erlenmeyer à 10% du volume utile.



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

## II.5.3. Cultures

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

### II.5.3.1. Culture en fioles d'Erlenmeyer

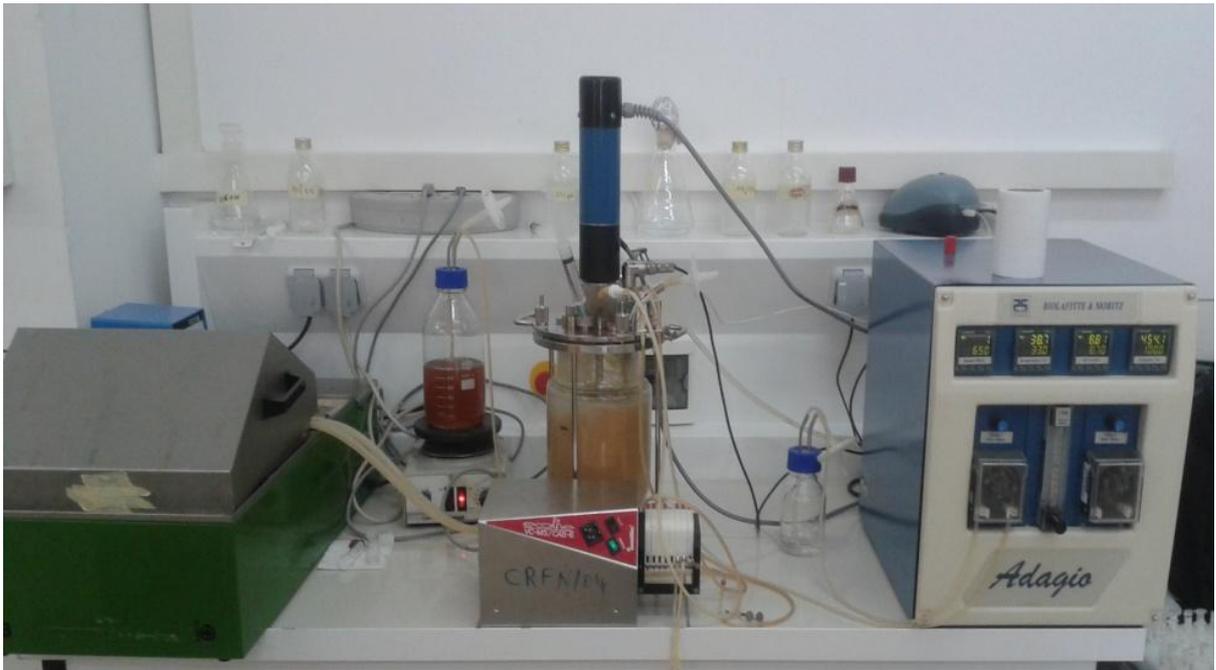
Les cultures en fioles d'Erlenmeyer sont réalisées à une température de  $33^{\circ}\text{C}$  durant 12h. L'agitation des fioles se fait grâce à un agitateur de fioles à vitesse variable. Le pH est maintenu constant grâce à un tampon phosphate. Sa valeur optimale est de 7,6. L'oxygène dissous n'est pas mesuré, et il est très mal contrôlé dans le cas des cultures en fioles. L'air entre et sort à travers le coton bouchant la fiole, où il est stérilisé, et occupe un grand volume mort ( $4/5^{\text{ème}}$  du volume de la fiole). L'agitation améliore le transfert d'oxygène.

Les fioles ont l'avantage de pouvoir mener plusieurs dizaines de fermentations, en même temps, à un coût plus faible, et avec une mise en œuvre plus aisée. La stérilisation des fioles se fait à l'autoclave.

### II.5.3.2. Culture en fermenteur

#### - Description du fermenteur

Un fermenteur Biolafitte de 2 litres est utilisé au cours de ce travail. La Figure II.2 décrit le modèle Biolafitte. Ce fermenteur est équipé d'une sonde pH (Ingold), d'une sonde à oxygène dissous polarographique (Ingold) avec son système de régulation, d'un équipement permettant de prélever du milieu de culture, d'ajouter du milieu, ainsi qu'un système d'aération du milieu.



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

### II.5.4. Régulations des conditions physico-chimiques

#### a. Régulation du pH

La mesure du pH est effectuée en continu, à l'aide d'une électrode à pH stérilisable (Ingold), est envoyée à un module de régulation et visualisée. En fonction de la différence entre la valeur réelle du pH, et la valeur de consigne choisie, le régulateur commande l'action d'une des 2 pompes péristaltiques, permettant l'alimentation en ammoniacque (4N) ou en acide chlorydrique (2N), suivant le cas.

### **b. Agitation**

L'agitation du fermenteur se fait grâce à un moteur, à vitesse variable de 0 à 1400 tours/min., solidaire d'un agitateur à palettes, à 2 turbines réglables en hauteur. L'agitation en fonction de la vitesse permet une bonne homogénéisation du milieu de culture et une bonne aération.

### **c. Régulation de la température**

L'eau préalablement chauffée dans un bain-marie circule dans une enceinte intégrée dans la cuve en verre du fermenteur. Une sonde de température en contact avec le milieu réactionnel reliée à un thermomètre permet le contrôle de la température. Ceci nous permettra d'ajuster la température de l'eau du bain-marie au point de consigne.

### **d. Aération**

Le dispositif d'aération est composé d'un débitmètre à air, deux filtres à air stérilisables (entrée et sortie), un diffuseur situé dans la partie inférieure de la cuve, un condenseur d'eau situé à la sortie du gaz pour éviter la perte de milieu par évaporation. Le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu est mesuré par une sonde polarographique (Ingold). La mesure se fait en pourcentage par rapport à la saturation (0% à 100%). L'étalonnage se réalise en faisant passer soit de l'azote pour (0%), soit de l'air (100%) après stérilisation et avant le démarrage de la fermentation en tenant compte des conditions de culture (pH, agitation, aération).

### **e. Régulation de la mousse**

Pour éviter les inconvénients provoqués par la mousse qui risque de colmater les circuits d'aération, nous avons utilisé un anti-mousse chimique à base de silicone (polypropylène glycol) que nous avons introduit manuellement dans le milieu de culture avant stérilisation à raison de 2 gouttes par litre du milieu.

#### **II.5.4.1. Protocole des fermentations discontinues**

Le volume initial de milieu de production est fixé à 1 litre. Le milieu de production est stérilisé dans le fermenteur de 2 litres par autoclavage (20 minutes à 121°C). L'ensemencement est effectué à partir de préculture en phase exponentielle de croissance (14h). Le volume de l'inoculum est de 100 ml (10% du volume utile).

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une seringue. Le volume prélevé est d'environ 1 ml. La densité optique est immédiatement mesurée au spectrophotomètre et le restant de l'échantillon est centrifugé puis destiné au dosage des sucres, de lactate et de glutamate.

#### **II.5.4.2. Protocole des fermentations semi-continues**

Les fermentations débutent de la même manière que les cultures discontinues. Les conditions opératoires sont identiques. L'alimentation débute après environ 10 heures de culture lorsque la concentration résiduelle en sucres totaux du jus de dattes se situe dans un intervalle de 0 à 5 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> dans le milieu de fermentation. Les fermentations ont été réalisées selon deux stratégies d'alimentation différentes. Dans la première stratégie (fed-batch par une alimentation en pulse), les sucres totaux de jus de dattes de la solution d'alimentation (210 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) ont été introduits dans le fermenteur à différents pulses et ceci à 10, 20 et 30 h de culture. Dans la deuxième stratégie (fed-batch par une alimentation en continu), la solution de sucres de jus de dattes (210 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) a été introduite dans le fermenteur en continu à raison de 10, 20 et 30 ml.h<sup>-1</sup> pendant 10, 20 et 30 h de culture, respectivement.

#### **II.5.4.3. Protocole des fermentations continues**

Les cultures continues débutent par une phase discontinue dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent. Lorsque la culture atteint la fin de la phase exponentielle de croissance, la phase continue débute en alimentant le fermenteur en milieu. Le volume du milieu dans le fermenteur reste constant à 1 litre. Le débit d'alimentation et de soutirage fixe le taux de dilution de travail par la relation :  $D = Q/V$ . Ainsi le taux de dilution et la composition de la solution d'alimentation peuvent varier d'une expérience à l'autre.

## **II.6. MÉTHODES ANALYTIQUES**

### **II.6.1. Biomasse**

La concentration cellulaire est estimée par la lecture de la densité optique à 570 nm. Cette méthode rapide et pratique permet de suivre l'évolution de la biomasse dans le fermenteur. La mesure est effectuée immédiatement après le prélèvement pour éviter toute dénaturation cellulaire. Il est nécessaire d'établir une relation entre la densité optique et la masse des cellules. Or, la relation DO-poids sec n'est linéaire qu'aux faibles valeurs, il faut donc diluer les échantillons afin de se trouver dans le domaine de linéarité. Les dilutions s'opèrent dans

de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) pour éviter tout phénomène d'éclatement des cellules par différence de pression osmotique.

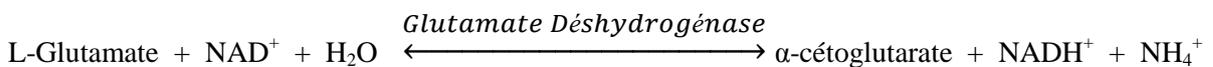
L'étalonnage s'effectue de la façon suivante : un échantillon est dilué un certain nombre de fois, pour chaque dilution la densité optique est mesurée à 570 nm, tandis que le poids sec de l'échantillon est déterminé par filtration sous vide sur membrane de 0,2  $\mu$  préalablement séchée 24h à 105°C et tarées. Après filtration, les membranes sont séchées également 24h à 105°C ; le poids de cellules sur la membrane rapporté au volume de l'échantillon donne la concentration cellulaire dans le fermenteur. Le coefficient de conversion de DO en biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ ) est de 0,4 ( $\text{DO} * 0,4 = \text{biomasse (g.l}^{-1}\text{)}$ ).

## II.6.2. Dosage enzymatiques

Les dosages sont réalisés à partir de kits enzymatiques

### II.6.2.1. Principe du dosage de L-Glutamate

En présence de Glutamate Déshydrogénase le L-Glutamate est désaminé oxydativement par le NAD en  $\alpha$ -cétoglutarate.



Dans la réaction catalysée par la Diaphorase, le NADH formé convertit l'iodonitrotétrazolium en formazan lequel est mesuré à son maximum dans le visible à 492 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en glutamate.



### II.6.2.2. principe du dosage du L-Lactate

Le dosage du L-Lactate est réalisé par une procédure en une étape. L'enzyme L-Lactate Oxydase catalyse l'oxydation du L-Lactate en pyruvate :

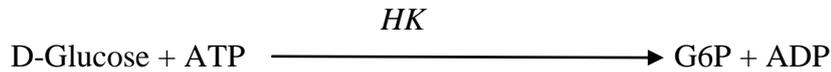


En présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la peroxydase catalyse l'oxydation du précurseur chromogène pour produire une coloration bleu ayant son maximum d'absorption à 540 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en lactate.

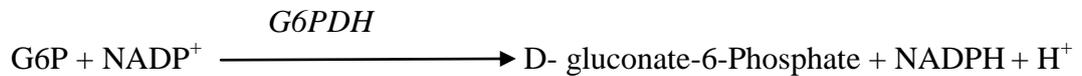
### II.6.3. Dosage du saccharose /D- glucose /D-fructose

#### II.6.3.1. Principe du dosage du D-Glucose

En présence d'Hexokinase (HK) et d'Adénosine-5-Triphosphate (ATP), le D-Glucose est phosphorylé en Glucose-6-Phosphate (G6P) :



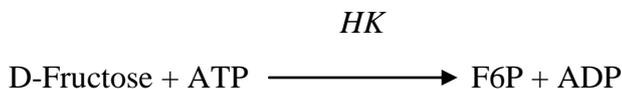
Le G6P est oxydé par le Nicotamide-Adénosine-Dinucléotide (NADP<sup>+</sup>) en présence de Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PDH) :



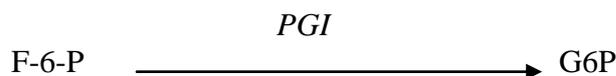
La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à celle du D-Glucose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH.

#### II.6.3.2. Principe du dosage du D-Fructose

En présence d'Hexokinase (HK) et d'Adénosine-5-Triphosphate (ATP), le D-Fructose est phosphorylé en Fructose-6-Phosphate (F6P) :



Le F6P est transformé en G6P par la Phospho-Glucose-Isomérase (PGI):



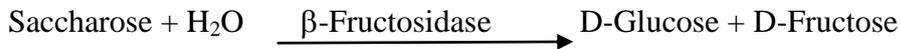
Le G6P est oxydé par le Nicotamide-Adénosine-Dinucléotide (NADP<sup>+</sup>) en présence de Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PDH) :



La quantité de NADPH formé au cours de la réaction est proportionnelle à celle du D-Fructose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.

### II.6.3.3. Principe du dosage du Saccharose

Le saccharose est hydrolysé par la  $\beta$ -Fructosidase (ou invertase) en D-Glucose et D-Fructose selon la réaction suivante :



Il s'agit de doser le glucose.

La quantité de NAPH formée est proportionnelle à celle du D-Glucose formée qui elle-même proportionnelle à la quantité de saccharose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NAPH.

Les méthodes de dosage (glucose, fructose, saccharose) et acides (acide glutamique et acide lactique) sont validées sur un spectrophotomètre avec lecteur de microplaques.

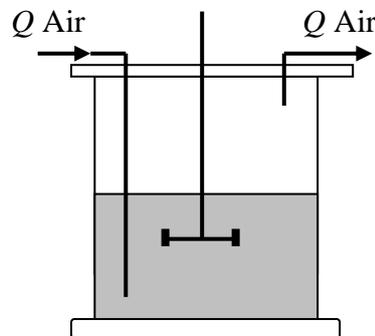
## II.7. INTERPRETATION DES DONNEES CINETIQUES

Pour chaque essai, on suit au cours du temps :

- L'évolution de la biomasse formée
- La disparition de substrat carboné
- L'évolution de produit formé

A partir de ces données de base, on calcule l'ensemble des paramètres cinétiques relatifs à la croissance, à l'utilisation des substrats et à la formation du produit.

### II.7.1. Calcul en réacteur discontinu (batch)



**Réacteur discontinu**

$Q$  : débit d'air ( $\text{l.h}^{-1}$ )

$V$  : volume du milieu (l)

$X$  : concentration en biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$S$  : concentration en substrat (glucose, fructose, saccharose) ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$P$  : concentration en produit (l'acide glutamique) ( $\text{g.l}^{-1}$ )

A partir des courbes de croissance ( $X = f(\text{temps})$ ), d'assimilation du substrat ( $S = f(\text{temps})$ ) et de formation du produit ( $P = f(\text{temps})$ ), il est possible de calculer les vitesses  $r_X'''$ ,  $r_S'''$  et  $r_P'''$  à différents temps (t) en déterminant les tangentes à ces courbes à l'instant t.

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

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

Les vitesses spécifiques à ce même instant sont données par les expressions suivantes :

- Vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )  $\mu = \frac{r_X'''}{X}$
- Vitesse spécifique d'utilisation de substrat ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )  $q_S = \frac{r_S'''}{X}$
- Vitesse spécifique de production ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )  $q_P = \frac{r_P'''}{X}$

Où X biomasse à l'instant t dans le réacteur en ( $\text{g.l}^{-1}$ ).

Les rendements globaux expriment la part de substrat transformé en biomasse (ou en produit) depuis le début de la fermentation. Ils sont calculés de la façon suivante :

$$Y_{X/S} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \qquad Y_{P/S} = \frac{P-P_0}{S_0-S}$$

Le rendement  $Y_{X/S}$  est défini comme le poids de biomasse formé par gramme de substrat utilisé et le rendement  $Y_{P/S}$  comme la quantité de produit formé par gramme de substrat consommé.

Avec :

$S_0$  : substrat initial ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$P_0$  : produit initial ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$X_0$  : biomasse initiale ( $\text{g.l}^{-1}$ )

La productivité volumétrique : c'est la quantité de produit (acide glutamique) par unité de temps et de volume du fermenteur.

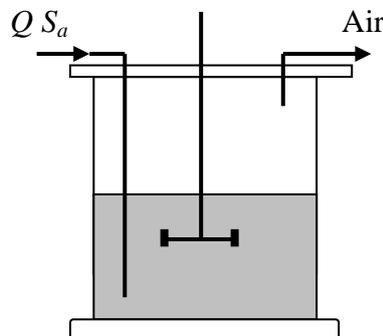
$$\delta = \frac{P - P_0}{V} \cdot \frac{1}{d}$$

Avec :

$d$  : durée de la fermentation (h)

$\delta$  : productivité volumétrique ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

### II.7.2. Calcul en réacteur semi-continu (fed-batch)



**Réacteur semi-continu**

$Q$  : débit d'alimentation ( $\text{l.h}^{-1}$ )

$S_a$  : concentration en substrat dans la solution d'alimentation ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$V$  : volume du milieu (l)

$X$  : concentration en biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$S$  : concentration en substrat dans le milieu de fermentation ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$P$  : concentration en produit ( $\text{g.l}^{-1}$ )

Nous pouvons établir les bilans massiques suivants :

Alimentation + réaction = soutirage + variation interne

Pour la biomasse :

$$r_X'''V = \frac{d(XV)}{dt} = X \frac{dV}{dt} + V \frac{dX}{dt}$$

Dans ce cas, le volume du fermenteur V (en litre) varie au cours du temps. Le débit d'alimentation en substrat Q (en l.h<sup>-1</sup>) est exprimé par :

$$Q = \frac{dV}{dt}$$

$$r_X''' = \frac{Q}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

Pour le substrat :

$$S_a Q - r_S'''V = \frac{d(VS)}{dt} = V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt}$$

$$r_S''' = \frac{Q}{V} \cdot (S_a - S) - \frac{dS}{dt}$$

Pour le produit :

$$r_P'''V = \frac{d(PV)}{dt} = P \frac{dV}{dt} + V \frac{dP}{dt}$$

$$r_P''' = \frac{Q}{V} \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

Les rendements :  $Y_{X/S}$  et  $Y_{P/S}$  sont donnés par les expressions suivantes :

$$Y_{X/S} = \frac{X_t V_t - X_0 V_0}{S_0 V_0 - S_t V_t + (V_t - V_0) S_a}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t V_t - P_0 V_0}{S_0 V_0 - S_t V_t + (V_t - V_0) S_a}$$

Avec :

$Y_{X/S}$  : rendement apparent de production de biomasse à partir de substrat

$Y_{P/S}$  : rendement apparent de production de produit à partir de substrat

$S_0$  : concentration initiale du substrat

$P_0$  : concentration en produit initiale

$X_0$  : concentration initiale de la biomasse

$V_0$  : volume initial du fermenteur (l)

$S_t$  : concentration du substrat au temps t

$P_t$  : concentration de produit au temps t

$X_t$  : concentration de biomasse au temps t

$V_t$  : volume du fermenteur au temps t

La productivité volumétrique : elle est donnée par l'expression suivante :

$$\delta = \frac{P_t V_t - P_0 V_0}{(t_f - t_0) V_t}$$

Avec :

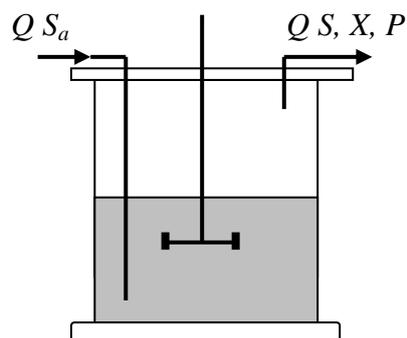
$P_t$  : concentration du produit au temps t

$V_t$  : volume du fermenteur au temps t

$P_0$  : concentration en produit initiale

$V_0$  : volume initial du fermenteur

### II.7.3. Calcul en réacteur continu



**Réacteur Continu**

$Q$  : débit d'alimentation en substrat ( $\text{l.h}^{-1}$ )

$S_a$  : substrat d'alimentation à l'entrée du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$V$  : volume utile du fermenteur (l)

$X$  : biomasse à la sortie du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$S$  : substrat à la sortie du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$P$  : produit à la sortie du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

En phase stationnaire, les paramètres cinétiques sont déterminés à partir des bilans massiques de formation de biomasse, d'utilisation de substrats et de production de métabolites.

A partir du bilan matière sur la biomasse :

Alimentation + réaction = soutirage + variation interne

$$0 + V \cdot r_X''' = Q \cdot X + V \cdot \frac{dX}{dt}$$

Le taux de dilution est donné par  $D = Q/V$ , donc

$$r_X''' = D \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

$$\frac{dX}{dt} = 0 \text{ et } r_X''' = \mu \cdot X$$

$$D = \mu$$

Pour le substrat, le même raisonnement donne :

$$r_S''' = D \cdot (S_a - S) - \frac{dS}{dt}$$

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

$$r_S''' = D \cdot (S_a - S)$$

Pour l'acide glutamique :

$$r_P''' = D \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

$$\frac{dP}{dt} = 0$$

$$r_P''' = D \cdot P$$

Rendements : A un taux de dilution donné et en phase stationnaire, les rendements sont déterminés de la façon suivante :

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S_a - S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_a - S}$$

$X$  : biomasse à la sortie du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$S_a$  : substrat d'alimentation à l'entrée du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$S$  : substrat à la sortie du fermenteur ( $\text{g.l}^{-1}$ )

Productivité volumétrique : c'est la quantité de produit par unité de temps et de volume du fermenteur. D'où en réacteur continu :

$$\delta = \frac{P}{V} \cdot D$$

Avec :

$\delta$  : productivité volumétrique ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$D$  : taux de dilution ( $\text{h}^{-1}$ )

Productivité spécifique : c'est la quantité de produit par unité de temps, de volume du fermenteur et par gramme par litre de biomasse.

$$\Delta = \frac{P}{X} \cdot D$$

Avec :

$D$  : taux de dilution ( $\text{h}^{-1}$ )

$\Delta$  : productivité spécifique ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

## II.8. Les plans d'expériences

Dans le cas de notre travail, il était primordial d'optimiser les facteurs nutritionnels du milieu de culture qui agissent sur la production de l'acide glutamique. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons procédé par l'application des techniques statistiques telle que le plan d'expérience :

### II.8.1. Plans de Box-Behnken

Durant la deuxième phase, c'est-à-dire après identification des facteurs influant la production d'acide glutamique, on essaie de déterminer les optima de ces facteurs et de représenter, le plus précisément possible, la relation qui lie les facteurs réellement influents aux réponses en utilisant le modèle Box-Behnken (1951). Dans cette étude, les facteurs qui ont été optimisés sont les suivants : (urée, source de carbone, bétaine et peptone), (température d'induction, temps d'induction et ratio C/N), (pH, taux d'inoculum et agitation en Erlenmeyers), (âge d'inoculum, débit d'air et agitation en fermenteur) et enfin (biotine, source d'azote et sucres de jus de datte). Ces facteurs sont représentés en trois niveaux codés par 1, 0 et +1 pour le minimum, moyenne et le maximum respectivement.

Afin de prédire le point optimal, une fonction polynomiale de second ordre a été élaborée. Elle permet d'étudier la relation entre les variables indépendantes et la réponse (production d'acide glutamique). La forme générale de l'équation polynomiale du second ordre est la suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

$Y_i$  : la réponse (glutamate) ;

$\beta_0$  : la constante du modèle ;

$X_i, X_j$  : les formes codées des variables explicatives ;

$\beta_i$  : coefficient linéaire ;

$\beta_{ij}$  : coefficient d'interaction ;

$\beta_{ii}$  : coefficient quadratique.

---

Le logiciel utilisé est disponible sur le site internet JMP (<http://www.jampdiscovery.com>). Ce logiciel est programmé pour calculer des réponses, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles.

L'analyse statistique du modèle est exécutée en analysant la variance (ANOVA). Cette analyse inclut le test de Fisher (Signification du modèle globale), sa probabilité associée  $p(F)$ , le coefficient de corrélation  $R$  et le coefficient de détermination  $R^2$  qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés par les courbes d'isoréponse et de la surface de réponse (3D).

L'analyse de la variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance est basé sur le calcul de l'écart total entre les différences mesures  $Y_i$  du plan d'expérience et la moyenne de ces mesures.

La statistique la plus importante dans l'analyse de la variance est la valeur  $P$ . Cette valeur peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0,05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0,01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

Le  $R^2$  est donc une mesure de la qualité du modèle qui prend des valeurs comprises entre 0 et 1. S'il est proche de 1, le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'explique rien.

L'exploitation du modèle validé est aussi réalisée graphiquement en traçant en 3D les courbes.

## **III. Résultats et discussion**

### **III.1. MISE AU POINT ET OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* A BASE DE JUS DE DATTE**

Le contenu de ce chapitre est une suite des travaux antérieurs qu'on a réalisé au laboratoire (Mouffok et *al.*, 2012).

La première étude, est consacrée à l'optimisation de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu à base de jus de datte. Ce travail a montré tout d'abord que le jus de datte est favorable à la croissance et la production d'acide glutamique. Il a montré également qu'il existe une concentration optimale de sucres de jus de datte égale à 30 g.l<sup>-1</sup>. Par ailleurs, le jus de datte seul n'était pas suffisant pour la production de glutamate et qu'il était donc nécessaire de le compléter avec d'autres sources azotées afin d'améliorer les performances de la fermentation. L'ajout de l'urée (4g.l<sup>-1</sup>) a permis d'améliorer la croissance de *Corynebacterium glutamicum* 2262 mais pas la production d'acide glutamique. Cependant, l'ajout de sulfate d'ammonium (8g.l<sup>-1</sup>) a permis d'améliorer la production de glutamate ainsi que la productivité volumétrique de production d'acide glutamique. De plus l'ajout d'une solution de sels minéraux au milieu de fermentation à base de jus de datte a présenté un effet positif aussi bien que sur la croissance que sur la productivité volumétrique de production d'acide glutamique. Enfin, l'ajout de vitamines (biotine et thiamine) au milieu de culture a permis d'améliorer la croissance de *Corynebacterium glutamicum* et non pas la production d'acide glutamique. Ainsi, l'optimisation du milieu de culture par la méthode d'optimisation conventionnelle a permis une production d'acide glutamique de 11,9 g.l<sup>-1</sup>.

La deuxième étude, est consacrée à l'optimisation de la production du glutamate à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte en utilisant des modèles statistiques. Dans cette étude, l'utilisation du modèle Plackett-Burman a permis tout d'abord de faire le criblage des facteurs nutritionnels qui ont un effet positif sur la production d'acide glutamique. Ainsi, ce modèle a permis de montrer que l'urée, le jus de datte, la bétaine et la peptone ont des effets significatifs sur la production de glutamate. Cependant, ce modèle ne tient pas compte des interactions présentes entre les différents facteurs nutritionnels testés. Afin de compléter cette étude et d'acquérir le maximum d'informations sur ces facteurs, un concept d'optimisation par Méthodologie de Surface de Réponse (MSR) basé sur le modèle Box-Behnken a été appliqué. En effet, la combinaison optimale obtenue implique une concentration de sucres de datte de 45 g/l; une concentration d'urée de 16,9 g/l ; une concentration de peptone de 15 g/l et une concentration de bétaine de 12 g/l. Dans ces

conditions, la concentration en glutamate obtenu (33,2 g/l) est proche de celle prédite par le modèle (37g/l). Après avoir optimisé le milieu nutritionnel de production d'acide glutamique, certains facteurs physiques (agitation, pH et taux d'inoculum) ont été également optimisés en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Les résultats obtenus ont permis d'améliorer la production d'acide glutamique (39,16 g/l) après l'application des valeurs optimales du taux d'inoculum (11,5%) (v/v), du pH 7,78 et de l'agitation (377 rpm) issues de l'équation du modèle.

Sur la base des résultats obtenus précédemment, nous nous sommes penché à étudier l'optimisation d'autres facteurs qui n'ont pas été étudiés. L'objectif principal est d'étudier les effets de ces facteurs sur la production d'acide glutamique en utilisant le modèle Box-Behnken. Notre travail s'est articulé autour des parties suivantes :

- Dans une première partie, la mise en œuvre d'un plan d'expérience de type Box-Behnken a été appliqué afin d'optimiser les conditions de culture sur procédé discontinu. Ce modèle consiste à évaluer les effets de trois paramètres (la température d'induction, le ratio C/N, et le temps d'induction) sur la production d'acide glutamique en Erlenmeyers.
- Dans la deuxième partie, une étude en culture discontinu sera effectuée en utilisant le modèle Box-Behnken. Cette étude nous permettra d'étudier l'influence de certains paramètres tels que l'agitation, l'âge de l'inoculum et le débit d'air sur la production d'acide glutamique en fermenteur.
- La troisième partie est consacrée à l'étude de l'optimisation de paramètres nutritionnels (biotine, source de carbone et source d'azote) pour acquérir le maximum d'informations sur les paramètres les plus influençant sur la production d'acide glutamique. Un concept d'optimisation par le modèle Box-Behnken a été réalisé en culture discontinu.
- Enfin la dernière partie aborde l'étude du comportement de la souche en fermenteur face aux valeurs optimales des paramètres obtenus par le modèle Box-Behnken. Les performances de production d'acide glutamique seront comparées à celles obtenus dans les travaux antérieurs.

### III.1.1. Optimisation de la température d'induction, le temps d'induction et le ratio C/N par le modèle de Box-Behnken

Dans cette partie, un modèle statistique appelé le modèle de Box-Behnken, un modèle de régression polynomiale d'ordre 2, a été appliqué. L'intérêt de cette acquisition de données est double : elle permet d'identifier les paramètres clés régissant la synthèse du glutamate et de définir les conditions favorables à la production de cet acide aminé ; à établir un schéma global des interactions entre les facteurs influents d'une part et de déterminer les relations existantes entre les cellules et leur environnement de l'autre part.

Suite à l'optimisation du milieu nutritionnel de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262, le modèle Box-Behnken a été appliqué pour déterminer les valeurs optimales de trois facteurs (la température d'induction, le temps d'induction et le ratio C/N) à trois niveaux ont été évalués (Tableau III.1). La matrice du modèle et les résultats des expériences sont représentés dans le Tableau III.2. L'analyse de la régression polynomiale a été réalisée par le logiciel JMP 11 Discovery. L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression est la suivante:

$$Y (\text{Glutamate } \text{g.l}^{-1}) = 20,71 - 1,1(\text{Température d'induction}) - 0,13(\text{Temps d'induction}) - 2,57(\text{Ratio C/N}) - 0,44(\text{Température d'induction})^2 - 3,64(\text{Temps d'induction})^2 - 2,89(\text{Ratio C/N})^2 + 2,03(\text{Température d'induction} * \text{Temps d'induction}) - 2,67(\text{Température d'induction} * \text{Ratio C/N}) - 2,59(\text{Temps d'induction} * \text{Ratio C/N}) \quad (1)$$

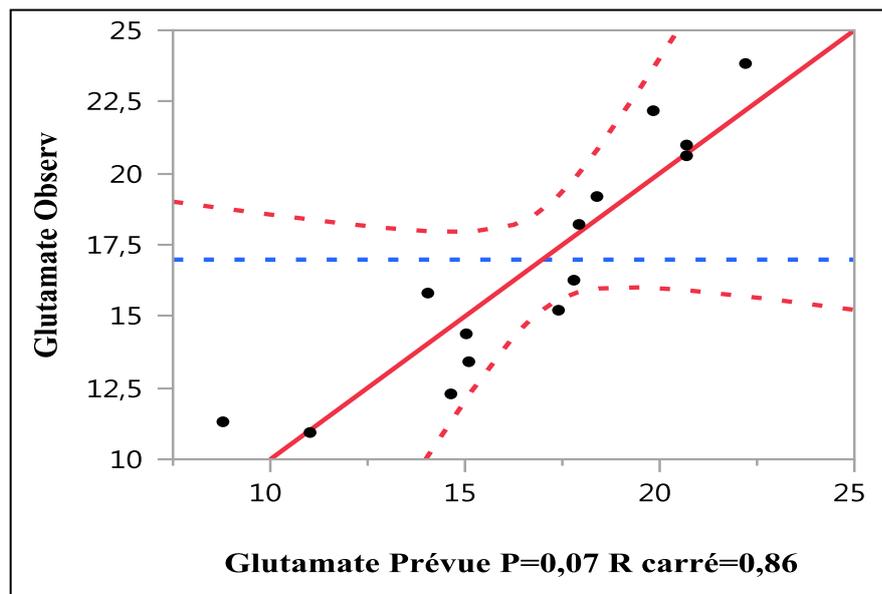
Le glutamate est la réponse, la température d'induction, le temps d'induction et le Ratio C/N sont des variables indépendantes.

La production d'acide glutamique a montré une grande hétérogénéité des résultats, ce qui indique l'influence de ces facteurs sur le procédé de fermentation. En effet, la production du glutamate varie suivant les niveaux des facteurs dans une gamme de 10,91 g.l<sup>-1</sup> à 23,83 g.l<sup>-1</sup> (Tableau III.2). Cette variation reflète l'importance de l'optimisation de ces facteurs pour atteindre une meilleure production du glutamate. Les résultats obtenus ont montré également qu'il existe une interaction entre la température d'induction, le temps d'induction et le ratio C/N. L'écart de réponse du modèle par rapport aux résultats expérimentaux est représenté par les variations résiduelles. Ces dernières montrent qu'en moyenne, la différence entre le glutamate mesuré et celui simulé est inférieur à 2. Ceci prouve que le modèle estimé est proche de la réalité expérimentale (Figure III.1). A un temps d'induction de 5 heures et à de températures élevées (39°C et 41°C) et un ratio C/N de 1,03 ou 1,23, on obtient des productions du glutamate plus importantes (20,36 à 23,83 g.l<sup>-1</sup>) par rapport à celle obtenue à

une température de 37°C (16,23 g.l<sup>-1</sup>). Il semble que cette température a une influence significative sur l'excrétion du glutamate. Ceci est en accord avec les travaux de Delaunay et al. (1999a), qui ont montré qu'à partir de 39°C une forte augmentation du rendement glutamate sur biomasse est observée sur un milieu synthétique à base de glucose. Ceci indique que le métabolisme des bactéries est davantage orienté vers la synthèse du glutamate.

**Tableau III.1.** Niveaux des facteurs (température d'induction, temps d'induction et ratio C/N) choisis pour l'optimisation en Erlenmeyers

Variables	Niveaux des variables		
	bas	moyen	Haut
Température d'induction (°C)	37	39	41
Temps d'induction (h)	2	5	8
Ratio C/N	1,03	1,23	1,43



**Figure III.1.** Représentation graphique des réponses mesurées en fonction des réponses théoriques

**Tableau III.2.** Matrice expérimentale de trois facteurs du modèle factoriel Box-Behnken

Expériences	Température d'induction	Temps d'induction	Ratio C/N	Glutamate mesuré	Glutamate Simulé	Variation résiduelle
01	39	8	1,43	10,91	8,86	2,05
02	37	5	1,43	16,25	18,56	-2,31
03	39	2	1,43	14,36	14,32	0,04
04	37	2	1,23	22,16	19,89	2,27
05	41	8	1,23	15,14	17,41	-2,27
06	39	2	1,03	18,15	18,37	-0,22
07	37	8	1,23	15,81	15,55	0,26
08	39	8	1,03	19,15	19,19	-0,04
09	39	2	1,03	12,24	14,29	-2,05
10	39	5	1,23	20,94	20,71	0,23
11	41	2	1,23	13,36	13,62	-0,26
12	39	5	1,23	20,60	20,71	-0,11
<b>13</b>	<b>41</b>	<b>5</b>	<b>1,03</b>	<b>23,83</b>	<b>21,52</b>	<b>2,31</b>
14	41	5	1,43	11,24	11,02	0,22
15	39	5	1,23	20,60	20,71	-0,11

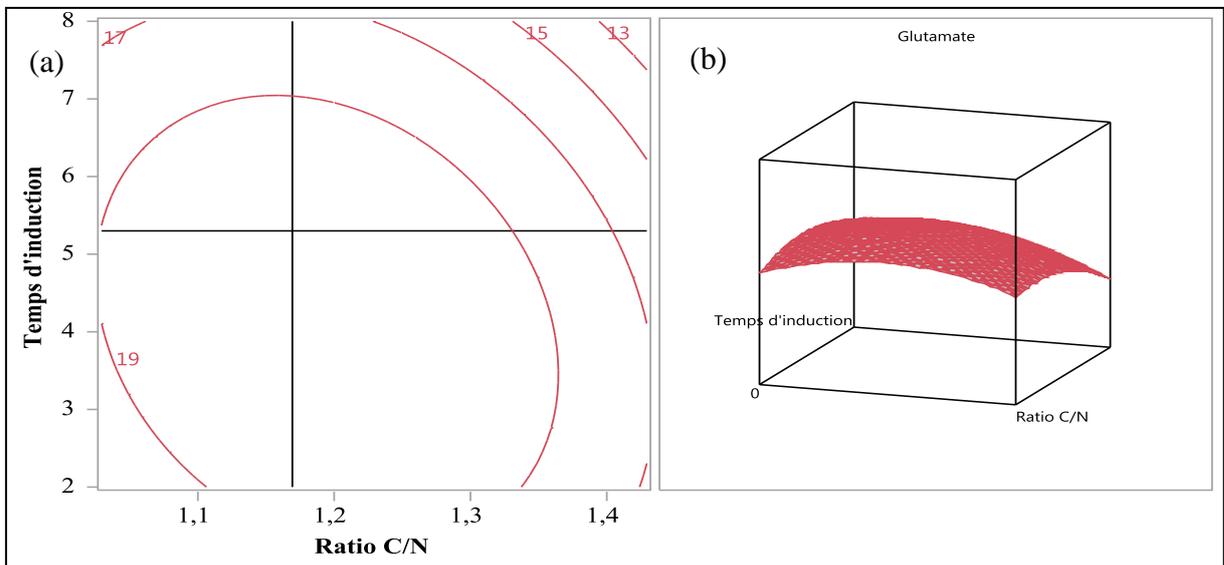
Les résultats expérimentaux ont été modélisés par l'équation polynomiale du second degré pour expliquer la dépendance de la production glutamique de différents facteurs étudiés. Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité correspondantes ( $P$ ) sont donnés dans le Tableau III.3. Dans notre cas la valeur de  $P$  du modèle est de 7% avec un intervalle de confiance de 93%.

A partir des données du Tableau III.3, on peut montrer que le coefficient linéaire de (Ratio C/N) et le coefficient quadratique (Temps d'induction  $\times$  Temps d'induction) sont très significatifs avec une valeur de  $P$  de 3%. Les coefficients d'interaction (Température d'induction  $\times$  Ratio C/N), (Temps d'induction  $\times$  Ratio C/N) et le coefficient quadratique (Ratio C/N  $\times$  Ratio C/N) sont significatifs à une probabilité  $P$  de 10%. Le coefficient d'interaction (Température  $\times$  Temps d'induction) a un effet positif sur la production du glutamate avec une valeur de  $P$  non significative. Les coefficients linéaires (Température d'induction), (Temps d'induction) et le coefficient quadratique (Température d'induction  $\times$  Température d'induction) ont un effet négatif sur la production du glutamate avec des valeurs de  $P$  non significatives.

**Tableau III.3.** Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box Behnken

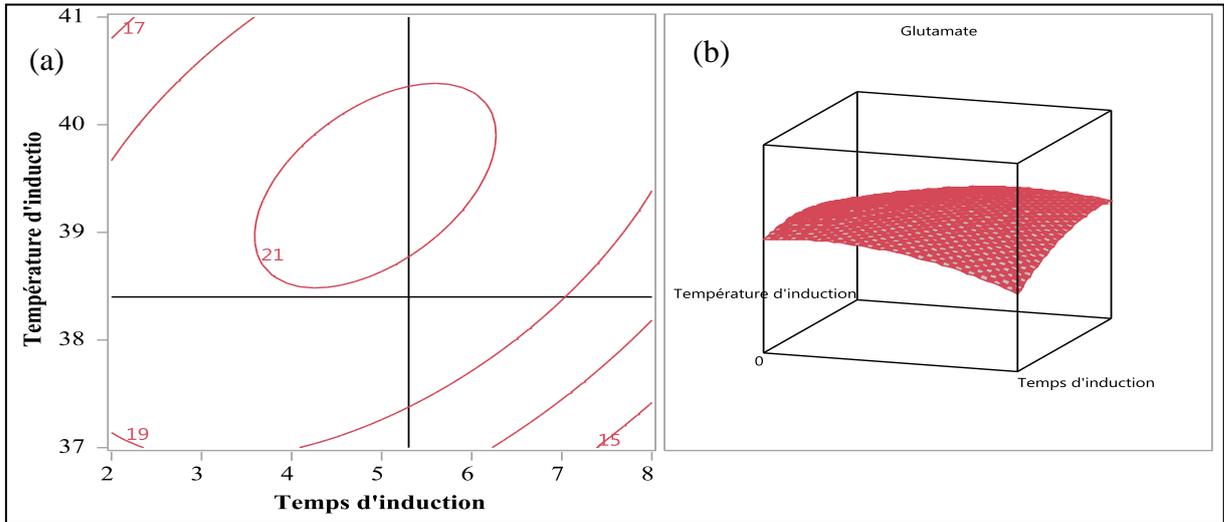
Variable	Effet	Erreur standard	<i>t Ratio</i>	<i>P</i>
Constante	20,71	1,40	14,71	<0,0001
T°C d'induction	- 1,10	0,86	- 1,28	0,25
Temps d'induction	- 0,13	0,86	- 0,16	0,87
Ratio C/N	- 2,57	0,86	- 2,99	0,03
T°C d'induction × Temps d'induction	2,03	1,21	1,67	0,15
T°C d'induction × Ratio C/N	- 2,67	1,21	- 2,19	0,08
Temps d'induction × Ratio C/N	- 2,59	1,21	- 2,12	0,08
T°C d'induction × T°C d'induction	- 0,44	1,26	- 0,35	0,73
Temps d'induction × Temps d'induction	- 3,64	1,26	- 2,87	0,03
Ratio C/N × Ratio C/N	- 2,89	1,26	- 2,28	0,07

La Figure III.2 (a,b) représente l'isoréponse (a) et la surface de réponse (b) montrant l'effet d'interaction entre le temps d'induction et le ratio C/N sur la production du glutamate. Les conditions optimales pour une production maximale du glutamate ( $> 18,75 \text{ g.l}^{-1}$ ) sont : de 1,1 à 1,2 pour le ratio C/N et de 4 à 6 heures pour le temps d'induction.

**Figure III.2 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) montrant l'effet d'interaction entre le temps de l'induction et le ratio C/N

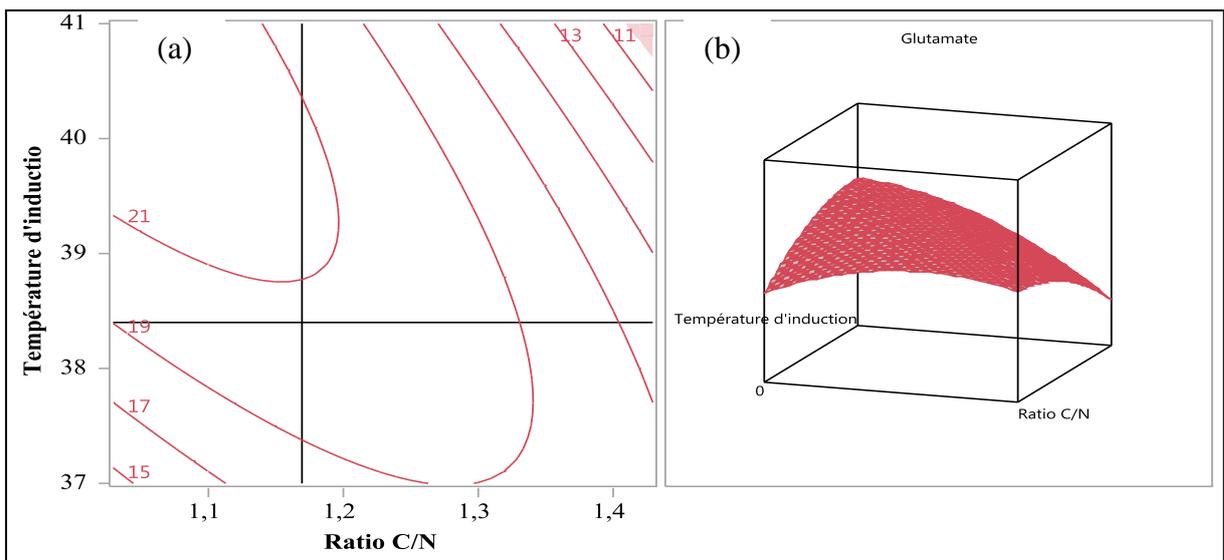
La Figure III.3 (a,b) montre l'effet d'interaction entre la température d'induction et le temps d'induction sur la production du glutamate. Les conditions optimales pour une production maximale du glutamate ( $> 21 \text{ g.l}^{-1}$ ) sont respectivement de 37 à 37,4 (°C) et de

38,4 à 39,2°C pour la température d'induction et de 4h 42 min à 5h 18 min pour le temps d'induction.



**Figure III.3 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate montrant l'effet de l'interaction entre la température et le temps d'induction

La Figure III.4 (a,b) montre l'effet d'interaction entre la température d'induction et le ratio C/N sur la production du glutamate. Les conditions optimales pour une production maximale du glutamate ( $> 21,25 \text{ g.l}^{-1}$ ) sont : de 38,4 à 39,2°C pour la température d'induction et de 1,1 à 1,2 pour le ratio C/N.



**Figure III.4 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate montrant l'effet de l'interaction entre la température d'induction et le ratio C/N

- **Validation du modèle**

Les conditions optimales de la production d'acide glutamique sont les suivantes : une température d'induction de 38,4°C, un temps d'induction de 5 h 18 min et un ratio C/N de 1,17. Dans ces conditions, la concentration du glutamate obtenue est de 23,87 g.l<sup>-1</sup>. Cette dernière est en corrélation avec la concentration prédite par le modèle (21,27 g.l<sup>-1</sup>). Ces résultats confirment la fiabilité du modèle postulé.

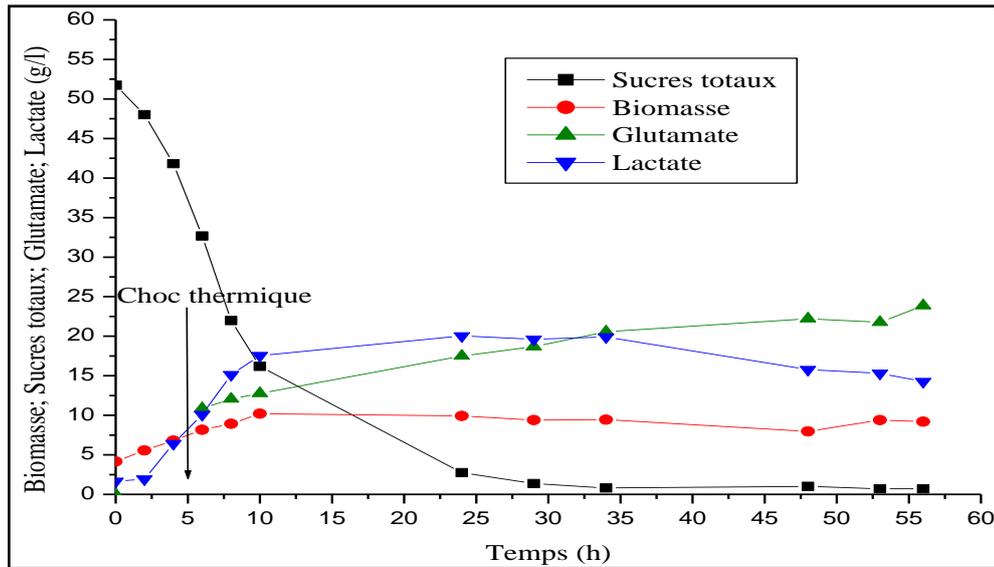
### III.1.1.1. Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu optimisé en Erlenmeyer

Les cinétiques de croissance, de consommation et de production de glutamate sont examinées. Les résultats sont illustrés sur la figure III.5. En effet pendant la croissance à 33°C, les sucres sont métabolisés pour être transformés principalement en biomasse. Après un choc thermique de 38,4°C la biomasse augmente légèrement pour atteindre une concentration de 10 g/l et se stabilise par la suite au bout de 10 h. Les sucres sont presque totalement consommés après 35 h de fermentation avec un résidu de 0,7 g/l, ce qui représente un taux de consommation de sucres de 98,64 %. La production de glutamate passe de 10,87 g/l à 20,56 g/l. Par la suite on assiste à une légère augmentation de production qui passe à 23,87 g/l de glutamate liée probablement à la consommation du lactate qui est le co-métabolite majeur obtenu. Ce qui explique un rendement de bioconversion des sucres en glutamate (47%), une vitesse spécifique de production (0,042 g/g.h) ainsi qu'une productivité volumétrique (0,43 g/l.h) faibles (Tableau III.4). Ceci est dû à un manque d'oxygène qui est un paramètre clé de la fermentation glutamique. En effet une limitation en oxygène provoque une diminution de 55% de la synthèse de glutamate et favorise l'accumulation principalement de lactate mais également de succinate et d'acétate dans le milieu de culture (Yao et al., 2001 ; Wendisch et al., 2006).

**Tableau III.4.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 dans des conditions optimales de production de glutamate.

X (g/l)	Glu (g/l)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_p$ (g/g.h)	$\delta$ (g/l.h)	Taux de consommation des sucres (%)
10,2	23,87	0,11	0,042	0,43	98,64

X: biomasse maximale ; Glu : concentration maximale de glutamate ;  $\mu_{\max}$  : vitesse spécifique maximale de croissance ;  $q_p$  : vitesse spécifique de production du substrat ;  $\delta$  : productivité volumétrique de production de glutamate



**Figure III.5.** Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé

### III.1.2. Optimisation de l'agitation, l'âge de l'inoculum et le débit d'air par le modèle Box-Behnken en fermenteur

Après avoir optimiser le milieu de production d'acide glutamique (paramètres nutritionnels et physiques) par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant les modèles statistiques Plackett-Burman et Box-Behnken pour les fermentations discontinue en Erlenmeyers. Nous avons appliqué le modèle statistique Box-Behnken sur trois paramètres à savoir le débit d'air, l'âge de l'inoculum et l'agitation. Ces expériences ont été réalisées en fermenteur pour vérifier le comportement de la souche dans de telles conditions.

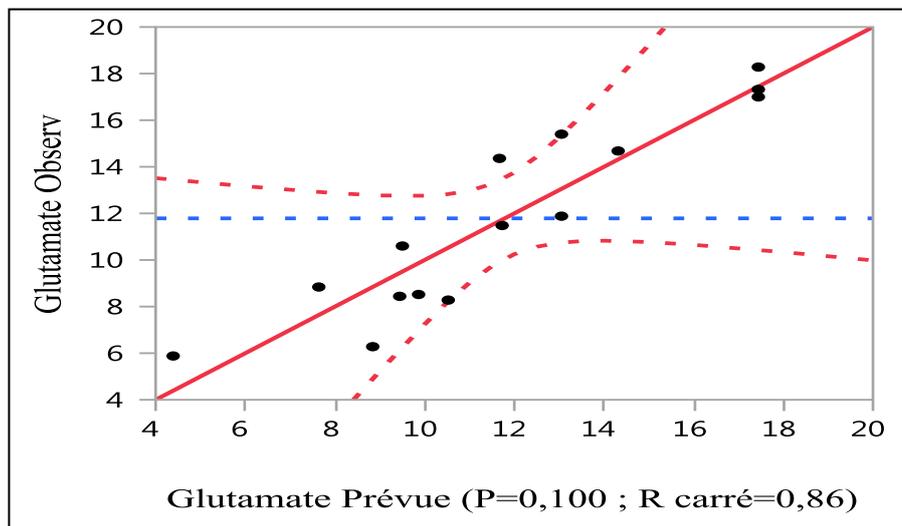
La biosynthèse de l'acide glutamique est un processus aérobique qui nécessite de l'oxygène. En effet, Tavakkoli et *al.* (2009) ont montré que la variation du débit d'air peut affecter la production du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* CECT690. Les concentrations d'acide glutamique obtenues sont de 118,75, 142,25 et 95,83 (g.l<sup>-1</sup>) avec des débits d'air de 0,6, 1,2 et 1,6 vvm respectivement. Un faible transfert d'oxygène favorise la production d'acide pyruvique et l'acide lactique, alors qu'avec un niveau d'oxygène important, la production d'acide succinique et de l' $\alpha$ -cétoglutarique est favorisée (Çalik et *al.*, 2001).

L'inoculum est un facteur important dans la fermentation (Perego et *al.*, 2003). Cependant l'âge d'inoculum constitue un facteur très important dans la production d'acide glutamique. Tavakkoli et *al.* (2009), ont montré qu'un maximum de production est obtenu avec un inoculum après 10 heures de croissance.

**Tableau III.5.** Niveaux des facteurs (débit d'air, agitation et âge d'inoculum) choisis pour l'optimisation en fermenteur

Variables	Niveaux des variables		
	bas	Moyen	Haut
Débit d'air ( $\text{l.h}^{-1}$ )	60	100	140
Age d'inoculum (h)	12	14	16
Agitation (rpm)	400	600	800

La réponse pour la production d'acide glutamique a montré une grande hétérogénéité des résultats, qui prouve l'importance de ces facteurs sur le procédé de fermentation. En effet, la production du glutamate varie suivant les niveaux des facteurs dans une gamme de 5,85 à 18,22  $\text{g.l}^{-1}$ . La matrice du modèle et les résultats des expériences sont représentés dans le Tableau III.6. Ces résultats ont montré également qu'il existe une interaction entre le débit d'air, la vitesse d'agitation et l'âge de l'inoculum. Les meilleures performances de production d'acide glutamique (18,22  $\text{g.l}^{-1}$ ) sont obtenues avec un débit d'air de 100  $\text{l.h}^{-1}$ , une vitesse d'agitation de 600 rpm et une souche âgée de 14 heures de culture. L'écart de réponse du modèle par rapport aux résultats obtenus est inférieur à 2, ce qui montre que le modèle estimé est proche des résultats expérimentaux (Figure III.6).

**Figure III.6.** Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévues

**Tableau III.6.** Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken

Expériences	Débit d'air (l.h <sup>-1</sup> )	Age d'inoculum	Agitation	Glutamate mesuré	Glutamate simulé	Variation résiduelle
1	140	16	600	8,4	9,48	-1,08
2	100	16	800	15,37	13,1	2,27
3	60	16	600	6,26	8,86	-2,6
4	60	14	400	8,84	7,65	1,19
<b>5</b>	<b>100</b>	<b>14</b>	<b>600</b>	<b>18,22</b>	<b>17,49</b>	<b>0,73</b>
6	140	14	800	11,87	13,06	-1,19
7	60	14	800	14,66	14,34	0,33
8	60	12	600	10,59	9,51	1,08
9	100	14	600	17,29	17,49	-0,2
10	140	14	400	11,44	11,77	-0,33
11	140	12	600	14,32	11,72	2,6
12	100	16	400	5,85	4,44	1,41
13	100	12	400	8,28	10,55	-2,27
14	100	14	600	16,95	17,49	-0,54
15	100	12	800	8,47	9,88	-1,41

L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression (2) est la suivante :

$$Y (\text{Glutamate } g.l^{-1}) = 17,48 + 0,71 (\text{Débit d'air}) - 0,72 (\text{Age d'inoculum}) + 1,99(\text{Agitation}) - 2,69 (\text{Débit d'air})^2 - 4,90 (\text{Age d'inoculum})^2 - 3,09 (\text{Agitation})^2 - 0,39 (\text{Débit d'air} * \text{Age d'inoculum}) - 1,34 (\text{Débit d'air} * \text{Agitation}) + 2,33 (\text{Age d'inoculum} * \text{Agitation}) \quad (2)$$

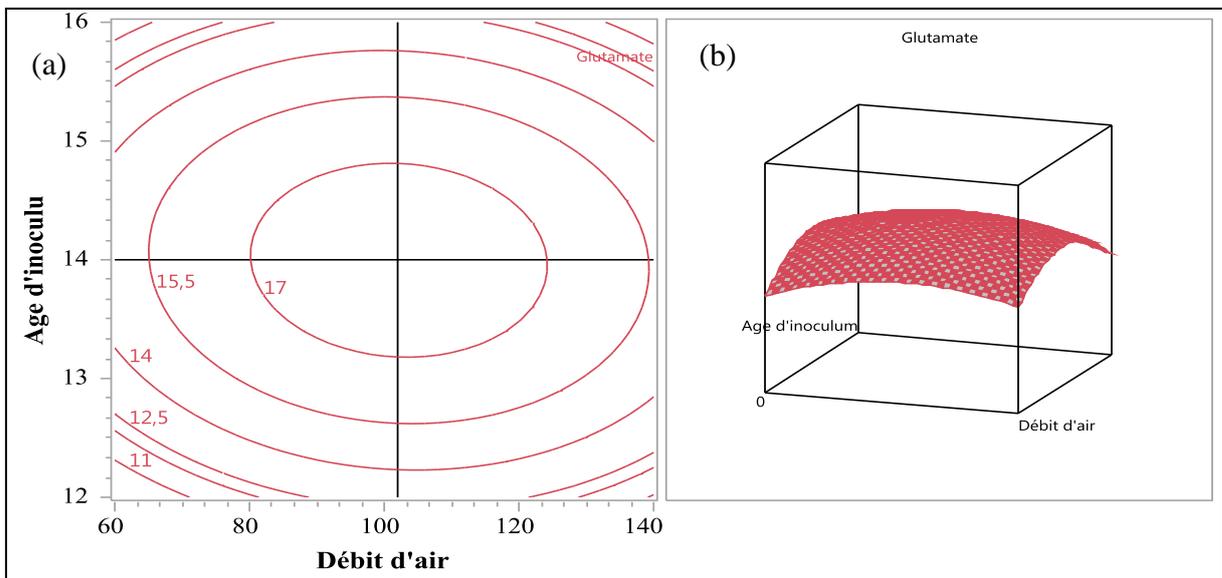
Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité correspondantes ( $P$ ) sont donnés dans le Tableau III.7. Ces résultats montrent que le coefficient quadratique (âge d'inoculum  $\times$  âge d'inoculum) est très significatif avec une valeur de  $P$  de 0,1 ; les coefficients quadratiques (débit d'air  $\times$  débit d'air) et (agitation  $\times$  agitation) ont un effet significatif dans un intervalle de confiance de 90%. Les coefficients d'interaction entre (débit d'air  $\times$  agitation) et (débit d'air  $\times$  âge d'inoculum) ont un effet négatif.

Les coefficients linéaires de l'agitation et du débit d'air ont un effet positif, par contre le coefficient linéaire de l'âge d'inoculum a un effet négatif (Tableau III.7).

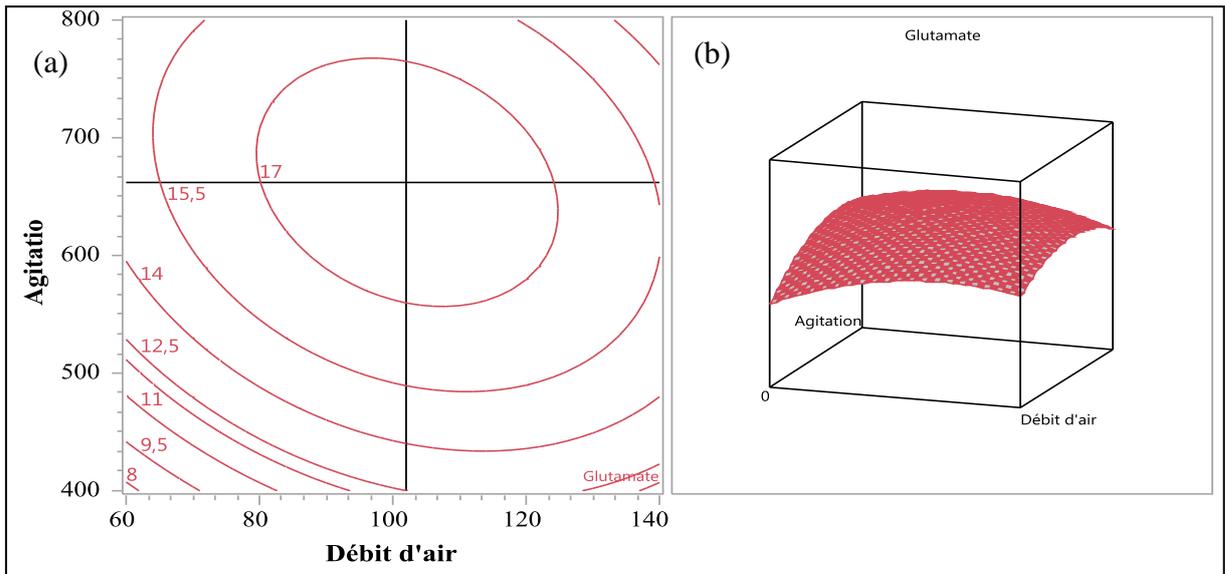
**Tableau III.7.** Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken

Variabes	Effets	Erreur standard	<i>t Ratio</i>	<i>P</i>
Constante	17,48	1,50	11,61	<0,0001
Débit d'air	0,71	0,92	0,77	0,47
Age d'inoculum	- 0,72	0,92	- 0,78	0,46
Agitation	1,99	0,92	2,16	0,08
Débit d'air × Age d'inoculum	- 0,40	1,30	- 0,30	0,77
Débit d'air × Agitation	- 1,34	1,30	- 1,03	0,34
Age d'inoculum × Agitation	2,33	1,30	1,79	0,13
Débit d'air × Débit d'air	- 2,69	1,30	- 1,98	0,10
Age d'inoculum × Age d'inoculum	- 4,90	1,30	- 3,61	0,01
Agitation × Agitation	- 3,09	1,30	- 2,28	0,07

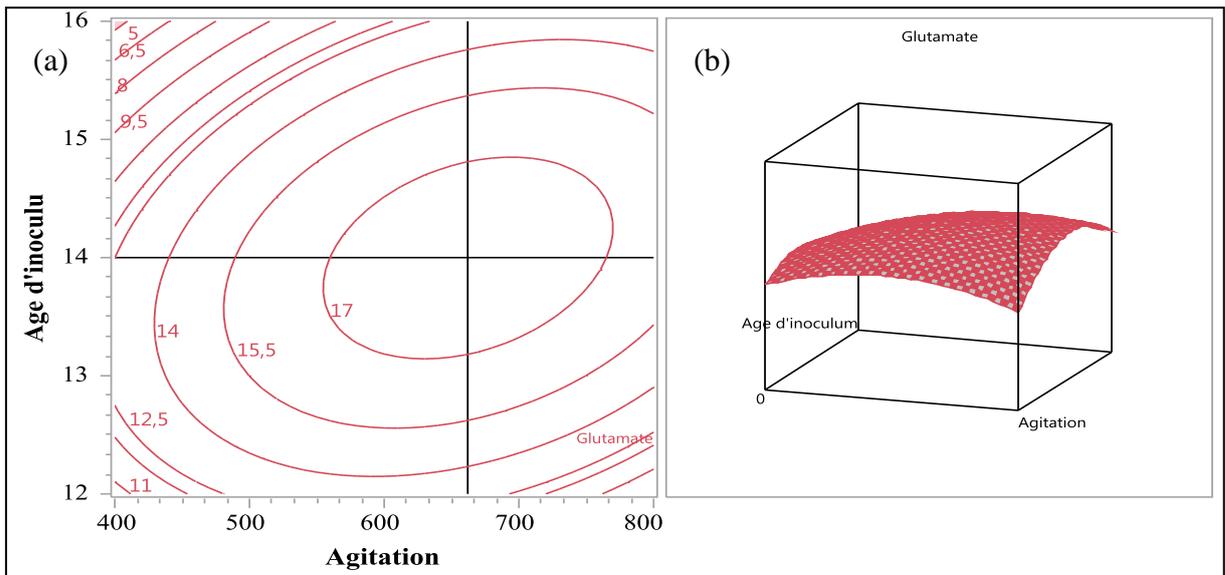
Les Figures III.7, 8 et 9 représentent respectivement l'effet de l'âge d'inoculum et le débit d'air, l'effet du débit d'air et de l'agitation et l'effet de l'âge d'inoculum et de l'agitation, ainsi que leurs interactions réciproques sur la production du glutamate. La concentration maximale du glutamate se situe dans l'intervalle de 13 heures et 30 minutes à 14 heures et 30 minutes pour l'âge d'inoculum, de 80 à 120 l.h<sup>-1</sup> pour le débit d'air et de 600 à 720 rpm pour l'agitation.



**Figure III.7 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par *C. glutamicum* 2262 montrant l'effet de l'interaction entre le débit d'air et l'âge d'inoculum



**Figure III.8 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par *C. glutamicum* 2262 montrant l'interaction entre le débit d'air et l'agitation



**Figure III.9 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) de la production du glutamate par *C. glutamicum* 2262 montrant l'interaction entre l'âge d'inoculum et l'agitation

- **Validation du modèle**

L'ajustement du modèle a été vérifié par le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) qui était de 0,86, indiquant que 86% de la variabilité de la réponse pourrait être estimée par le modèle.

Les conditions optimales de la production d'acide glutamique déterminées par l'équation du modèle sont les suivantes : un débit d'air de  $102 \text{ l.h}^{-1}$ , un âge d'inoculum de 14 heures et une agitation de 662 rpm. La concentration théorique d'acide glutamique simulée sous ces

conditions est de 17,81 g.l<sup>-1</sup>. Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. Sous ces conditions, la concentration d'acide glutamique obtenue sous ces conditions est de 17,91g.l<sup>-1</sup>. Ceci montre une bonne corrélation entre la concentration du glutamate obtenue et la concentration du glutamate prédite par le modèle, avec une différence de 0,1 g.l<sup>-1</sup>. Les résultats obtenus confirment la validité du modèle Box-Behnken, et montrent que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

### III.1.2.1. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 dans les conditions de culture optimales

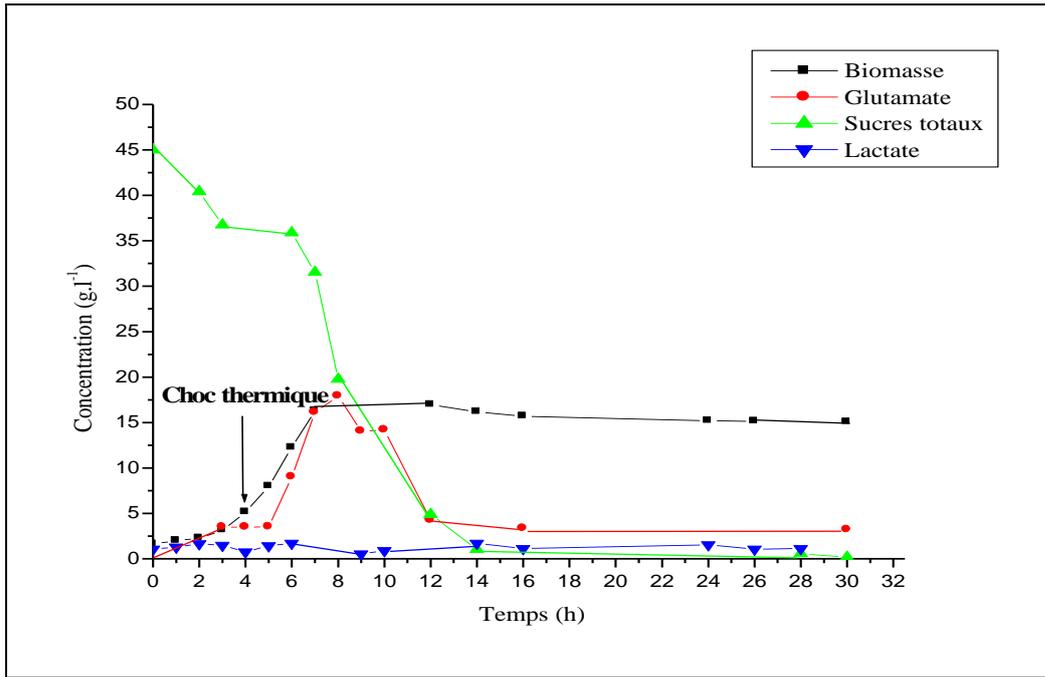
Pour ce qui est étude cinétique de l'expérience de l'optimisation, l'interprétation des résultats obtenus est réalisée par le calcul des paramètres cinétiques (Tableau III.8).

**Tableau III.8.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 dans les conditions de culture optimales

X <sub>max</sub> (g.l <sup>-1</sup> )	Glutamate max (g.l <sup>-1</sup> )	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	q <sub>p</sub> (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Δ (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Taux de consommation des sucres (%)	Y <sub>P/S</sub> (%)
16,96	17,91	0,46	0,10	2,13	99,73	40

(\*). X: biomasse, le glutamate, μ<sub>max</sub>: vitesse spécifique maximale de croissance ; q<sub>p</sub>: vitesse spécifique de production du substrat ; δ: productivité volumétrique de production d'acide glutamique ; Y<sub>P/S</sub>: le rendement de bioconversion.

Le comportement cinétique de la souche est illustré sur la Figure III.10. Après un choc thermique de 33 à 38,4°C, la biomasse augmente jusqu'à une concentration de 16 g.l<sup>-1</sup> et se stabilise par la suite au bout de 7 heures. Les sucres sont presque totalement consommés après 14 heures de fermentation. La production du glutamate est induite, elle passe de 0,4 à 17,91 g.l<sup>-1</sup> après 8 heures de fermentation, puis diminue jusqu'à une concentration de 3,2 g.l<sup>-1</sup> ce qui explique un faible rendement de bioconversion des sucres en glutamate (40%). Ceci est du probablement d'une part, à une forte pression osmotique engendrée par l'accumulation de substances fortement chargées. Ceci est due principalement au fait que le milieu de culture soit très riche en matière azotée (corn steep liquor, peptone, sulfate d'ammonium et urée). En effet, des études ont montré qu'au cours de la phase de croissance sous une forte osmolarité, *Corynebacterium glutamicum* accumule de manière importante de la proline (Guillouet, 1995). Un excès d'oxygénation provoqué par le couple agitation et débit d'air provoque une accumulation d'α-cétoglutarate et de succinate (Inui et al., 2004).



**Figure III.10.** Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 dans les conditions de culture optimales

Après avoir testé les conditions de production du glutamate dans le fermenteur, on remarque que le rendement de bioconversion des sucres en glutamate est faible (40%), et la quantité d'acide glutamique produite est inférieure ( $17,91 \text{ g.l}^{-1}$ ) à celle obtenue en Erlenmeyers ( $39,16 \text{ g.l}^{-1}$ ). Ceci est du probablement d'une part, à une forte pression osmotique engendrée par l'accumulation de substances azotées (corn steep liquor  $20 \text{ g.l}^{-1}$ , urée  $16,9 \text{ g.l}^{-1}$ , sulfate d'ammonium  $15 \text{ g.l}^{-1}$  et peptone  $15 \text{ g.l}^{-1}$ ), et d'autre part, par une limitation en sucres de datte vu que leur consommation est presque totale après 12 heures de culture (Figure III.10).

Pour réduire la charge en sources azotées et remédier au problème de stress osmotique, une autre source azotée (sulfate d'ammonium) moins coûteuse a été testée. Pour cela, des fermentations en culture discontinue ont été réalisées en Erlenmeyers à différentes concentrations en sulfate d'ammonium ( $6, 8, 10, 12, 16$  et  $20 \text{ g.l}^{-1}$ ). Les résultats obtenus ont montré que les meilleurs résultats de production d'acide glutamique sont obtenus avec une concentration de sulfate d'ammonium de  $8 \text{ g.l}^{-1}$ .

Les différents paramètres cinétiques calculés sont résumés dans le Tableau III.9.

**Tableau III.9.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur le milieu de culture optimisé contenant le sulfate d'ammonium comme source d'azote

$X_{\max}$ (g.l <sup>-1</sup> )	Glutamate max (g.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_p$ (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\delta$ (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Taux de consommation du substrat (%)
4,8	8,40	0,11	0,072	0,33	67,24

(\*). X: biomasse, le glutamate,  $\mu_{\max}$ : vitesse spécifique maximale de croissance ;  $q_p$ : vitesse spécifique de production du substrat ;  $\delta$ : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

L'utilisation de sulfate d'ammonium seul comme source d'azote permet d'obtenir une productivité de 0,33 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, une concentration d'acide glutamique de 8,40 g.l<sup>-1</sup>, un taux de consommation des sucres de datte 67,24% et une vitesse spécifique de production d'acide glutamique de 0,072 g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Il ressort de ces résultats que le sulfate d'ammonium en tant que source d'azote n'est pas suffisant pour améliorer la production d'acide glutamique.

Par ailleurs, Davin, (2003) a utilisé l'urée en tant que source d'azote pour la production d'acide glutamique sur milieu MCGC. Il a montré qu'il existe une concentration optimale en urée de 4 g.l<sup>-1</sup>. Suite à ces résultats, nous avons essayé de tester la combinaison de ces deux sources azotées de faibles coûts à savoir l'urée et le sulfate d'ammonium.

### III.1.3. Optimisation de la biotine, la source de carbone et la source d'azote par le modèle Box-Behnken en Erlenmeyers

Comme mentionné précédemment, la concentration d'acide glutamique produite dans le fermenteur est faible par rapport à celle obtenue en Erlenmeyers. Ceci est dû probablement à la concentration élevée des sources azotées. Dans le but de remédier ce problème, une optimisation des conditions nutritionnelles a été réalisée. La source de carbone, l'azote totale (combinaison entre le sulfate d'ammonium et l'urée) et la biotine sont considérés comme étant les paramètres nutritionnelles qui contrôlent le plus la production du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262. Le modèle Box-Behnken a été utilisé pour déterminer les conditions optimales de production du glutamate.

Pour cela, nous avons réalisé quinze essais avec trois facteurs et trois niveaux. Les niveaux de ces trois paramètres sont illustrés dans le Tableau III.10.

**Tableau III.10.** Niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs (biotine, sucres de dattes et source d'azote total) en Erlenmeyers

Variables	Niveaux des variables		
	bas	moyen	Haut
Biotine ( $\mu\text{g/l}$ )	1	1001	2001
Sucres de dattes ( $\text{g/l}$ )	50	100	150
Azote total $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{urée} (\text{g.l}^{-1})]$	2,19 <sup>a</sup>	2,7 <sup>b</sup>	3,21 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ 6 g/l (75\%)} + \text{Urée 2 g/l (25\%)}]$ ; <sup>b</sup>  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ 4 g/l (50\%)} + \text{Urée 4 g/l (50\%)}]$ ;

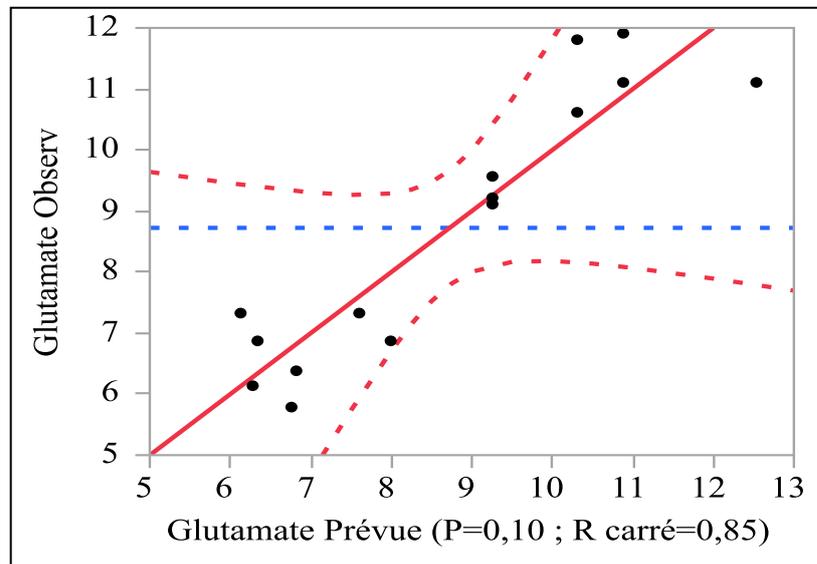
<sup>c</sup>  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ 2 g/l (25\%)} + \text{Urée 6 g/l (75\%)}]$

Dans le Tableau III.11, on note des variations considérables dans le rendement du glutamate pour différentes conditions opératoires. La réponse pour la production d'acide glutamique a montré une grande hétérogénéité des résultats. Ceci montre l'importance de ces facteurs pour le procédé de fermentation. En effet, la production du glutamate varie suivant les niveaux des facteurs dans une gamme de 5,77 à 11,91  $\text{g.l}^{-1}$ . Cette variation reflète l'importance de l'optimisation pour atteindre une meilleure production. Avec ces conditions, la meilleure performance de production de glutamate est obtenue (11,91  $\text{g.l}^{-1}$ ). L'écart de réponse du modèle par rapport aux résultats expérimentaux est représenté par les variations résiduelles.

**Tableau III.11.** Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken

Expériences	Biotine ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Sucres de dattes ( $\text{g.l}^{-1}$ )	Azote total ( $\text{g.l}^{-1}$ )	Glutamate mesuré ( $\text{g.l}^{-1}$ )	Glutamate simulé ( $\text{g.l}^{-1}$ )	Variation résiduelle ( $\text{g.l}^{-1}$ )
1	1	50	2,7	11,79	10,31	1,47
2	1001	50	3,21	07,31	07,60	-0,29
3	2001	100	3,21	06,84	06,37	0,47
4	1	100	3,21	06,84	08,02	-1,18
5	2001	150	2,7	11,08	12,56	-1,47
6	1	150	2,7	11,08	10,90	0,17
7	1001	100	2,7	09,20	09,27	-0,07
8	2001	50	2,7	06,13	06,30	-0,17
9	1001	100	2,7	09,55	09,27	0,27
10	1001	150	3,21	<b>11,91</b>	10,90	1,00
11	1001	50	2,19	05,77	06,77	-1,00
12	1001	150	2,19	10,61	10,31	0,29
13	1001	100	2,7	09,08	09,27	-0,19
14	1	100	2,19	06,36	6,83	-0,47
15	2001	100	2,19	07,31	6,13	1,18

On constate, qu'en moyenne la différence entre le glutamate mesuré et celui simulé est inférieure à 1, ce qui indique une très bonne estimation du modèle proposé par rapport aux résultats expérimentaux (Figure III.12).



**Figure III.11.** Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévues

L'analyse de régression polynomiale réalisée par le logiciel JMP6 11 Discovery a permis de confirmer la fiabilité du modèle quadratique. La valeur de la probabilité  $P$  a été utilisée pour vérifier la signification de chaque coefficient et les effets de l'interaction entre les variables. Plus la valeur de  $P$  est faible, plus l'effet du paramètre étudié est significatif. Dans notre cas la valeur de  $P$  du modèle est de 10% avec un intervalle de confiance de 90 %.

L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression (3) est la suivante :

$$Y (\text{Glutamate } g.l^{-1}) = 9,27 - 0,59 (\text{Biotine}) + 1,71 (\text{Sucres de datte}) + 0,35 (\text{Azote total}) + 1,41 (\text{Biotine} * \text{Sucres de datte}) - 0,06 (\text{Sucres de datte} * \text{Azote total}) - 0,24 (\text{Biotine} * \text{Azote total}) - 0,66 (\text{Biotine})^2 + 1,40 (\text{Sucres de datte})^2 - 1,78 (\text{Azote total})^2 \quad (3)$$

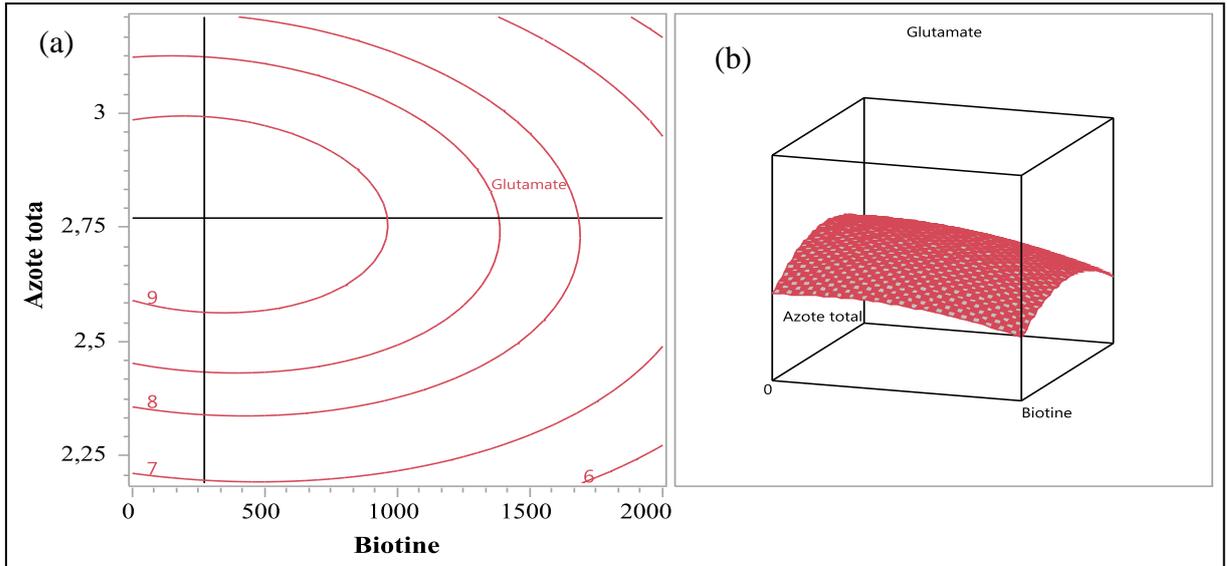
Dans le Tableau III.12, on donne les coefficients de régression, pour le modèle de la production du glutamate, avec les valeurs de la probabilité  $P$  correspondantes. Après analyse de ces résultats, il ressort que : le coefficient linéaire (sucres de dattes) est significatif avec une valeur de  $P$  de 1% ; le coefficient d'interaction (biotine  $\times$  sucres de dattes) est significatif avec un  $P$  de 10% ; Le coefficient quadratique (azote total  $\times$  azote total) a un effet significatif avec un  $P$  de 5% ; Les coefficients d'interaction (sucres totaux  $\times$  azote total) et (biotine  $\times$  azote total) ont un effet négatif sur la production du glutamate et de même pour l'effet quadratique (biotine  $\times$  biotine) ; Le coefficient quadratique (sucres de dattes  $\times$  sucres de

dattes) et le coefficient linéaire (azote total) ont un effet positif sur la production du glutamate avec un  $P$  non significatif ; Le coefficient linéaire (biotine) a un effet négatif sur la production du glutamate avec un  $P$  non significatif.

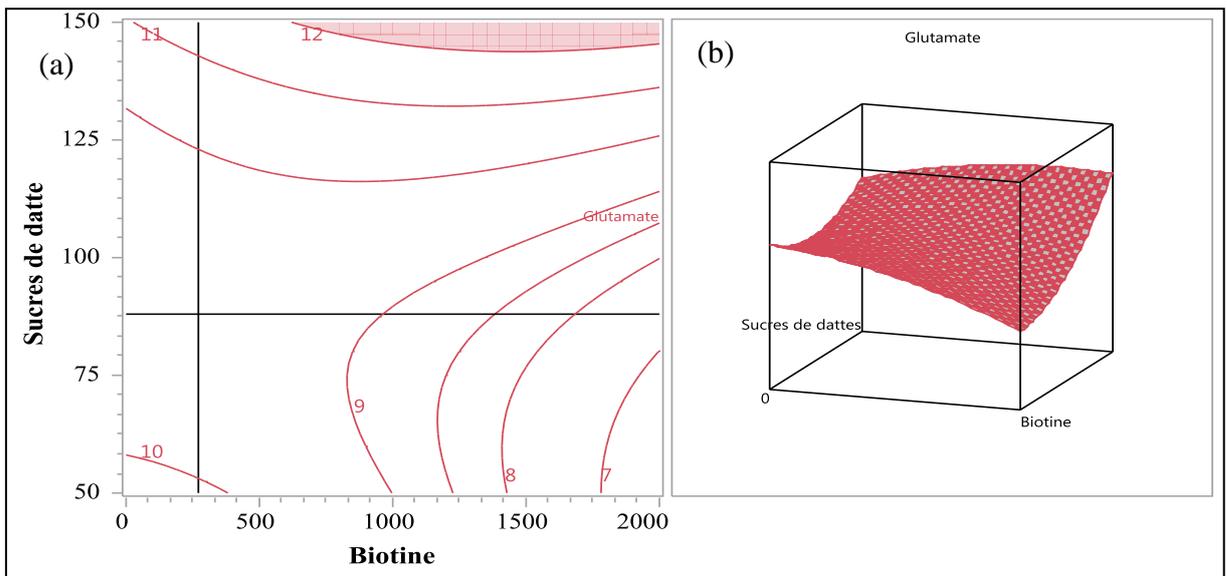
**Tableau III.12.** Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken

Variables	Effet	Erreur standard	$t$ Ratio	$P$
Constante	9,27	0,81	11,38	0,001
Biotine	-0,58	0,50	-1,18	0,29
Sucres de dattes	1,71	0,50	3,43	0,01*
Azote total	0,36	0,50	0,71	0,50
Biotine $\times$ Sucres de dattes	1,41	0,71	2,00	0,10
Biotine $\times$ Azote total	-0,24	0,71	-0,34	0,75
Sucres de dattes $\times$ Azote total	-0,06	0,71	-0,09	0,94
Biotine $\times$ Biotine	-0,66	0,73	-0,90	0,41
Sucres de dattes $\times$ Sucres de dattes	1,40	0,73	1,91	0,11
Azote total $\times$ Azote total	-1,78	0,73	-2,42	0,05

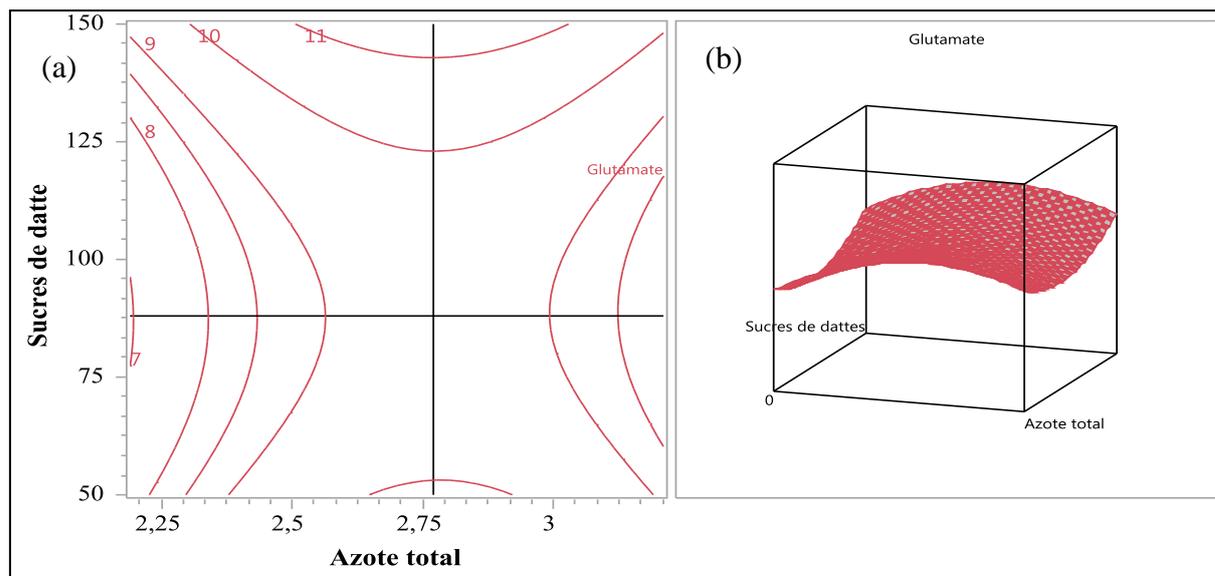
Les Figures III.12, 13 et 14 représentent respectivement l'effet de l'azote total et la biotine, l'effet de l'azote total et les sucres de dattes et l'effet des sucres de dattes et la biotine ainsi que leurs interactions réciproques sur la production du glutamate. La concentration maximale du glutamate se situe dans l'intervalle de 2,60 g.l<sup>-1</sup> (4,4 g.l<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium et 3,6g.l<sup>-1</sup> d'urée) et 3g.l<sup>-1</sup> (2,88 g.l<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium et 5,12 g.l<sup>-1</sup> d'urée) pour l'azote total, et de 100 µg.l<sup>-1</sup> à 402 µg.l<sup>-1</sup> pour la biotine et de 75 à 100 g.l<sup>-1</sup> pour les sucres de dattes.



**Figure III.12 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de l'azote total et la biotine sur la production du glutamate



**Figure III.13 (a,b).** Courbes d'isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de sucres de dattes et la biotine sur la production du glutamate



**Figure III.14 (a,b).** Courbes d'isoreponse (a) et surface de réponse (b) pour les effets interactifs de sucres de dattes et l'azote total sur la production du glutamate

- **Validation du modèle**

L'ajustement du modèle a été vérifié par le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) qui est de 0,85, indiquant que 85% de la variabilité dans la réponse pourraient être estimés par le modèle. Les conditions optimales de la production d'acide glutamique estimées par l'équation du modèle sont les suivantes : 272  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de biotine, 88  $\text{g.l}^{-1}$  de sucres de dattes, 2,77  $\text{g.l}^{-1}$  d'azote total (3,73  $\text{g.l}^{-1}$  de sulfate d'ammonium et 4,27  $\text{g.l}^{-1}$  d'urée). Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. La concentration d'acide glutamique obtenue sous ces conditions est de 8,55  $\text{g.l}^{-1}$ . Cette concentration est proche de celle prédite par le modèle (9,31  $\text{g.l}^{-1}$ ). On peut conclure que ce modèle a réussi à faire des prédictions assez fiables.

### III.1.3.1. Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé en Erlenmeyer

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production du glutamate sur le milieu optimisé sont montrées sur la Figure III.15(a). Après un choc thermique de 33 à 38,4°C la biomasse augmente et atteint un maximum de 6  $\text{g.l}^{-1}$ , ensuite elle diminue à une concentration de 4  $\text{g.l}^{-1}$  pour se stabiliser au bout de 30 heures de fermentation. Les sucres ne sont pas totalement consommés. Le saccharose est consommé à un taux de 87,3%. Le glucose et le fructose sont consommés à des taux de 42,3% et 48,9% respectivement après 56 heures de fermentation.

La Figure III.15(b) montre les cinétiques de croissance et de production du glutamate et de lactate. Une concentration maximale en glutamate de  $8,55 \text{ g.l}^{-1}$  est obtenue après 29 heures de fermentation avec un faible rendement (17%) de bioconversion des sucres en glutamate. En effet, une production de lactate avec une concentration de  $9,15 \text{ g.l}^{-1}$  est obtenue après 10 heures de fermentation. Ceci est du probablement à une limitation en oxygène qui entraîne une déviation du flux carboné vers la production d'autres métabolites tels que l'acétate le lactate et le succinate (Dominguez et *al.*, 1993 ; Wendisch et *al.*, 2006).

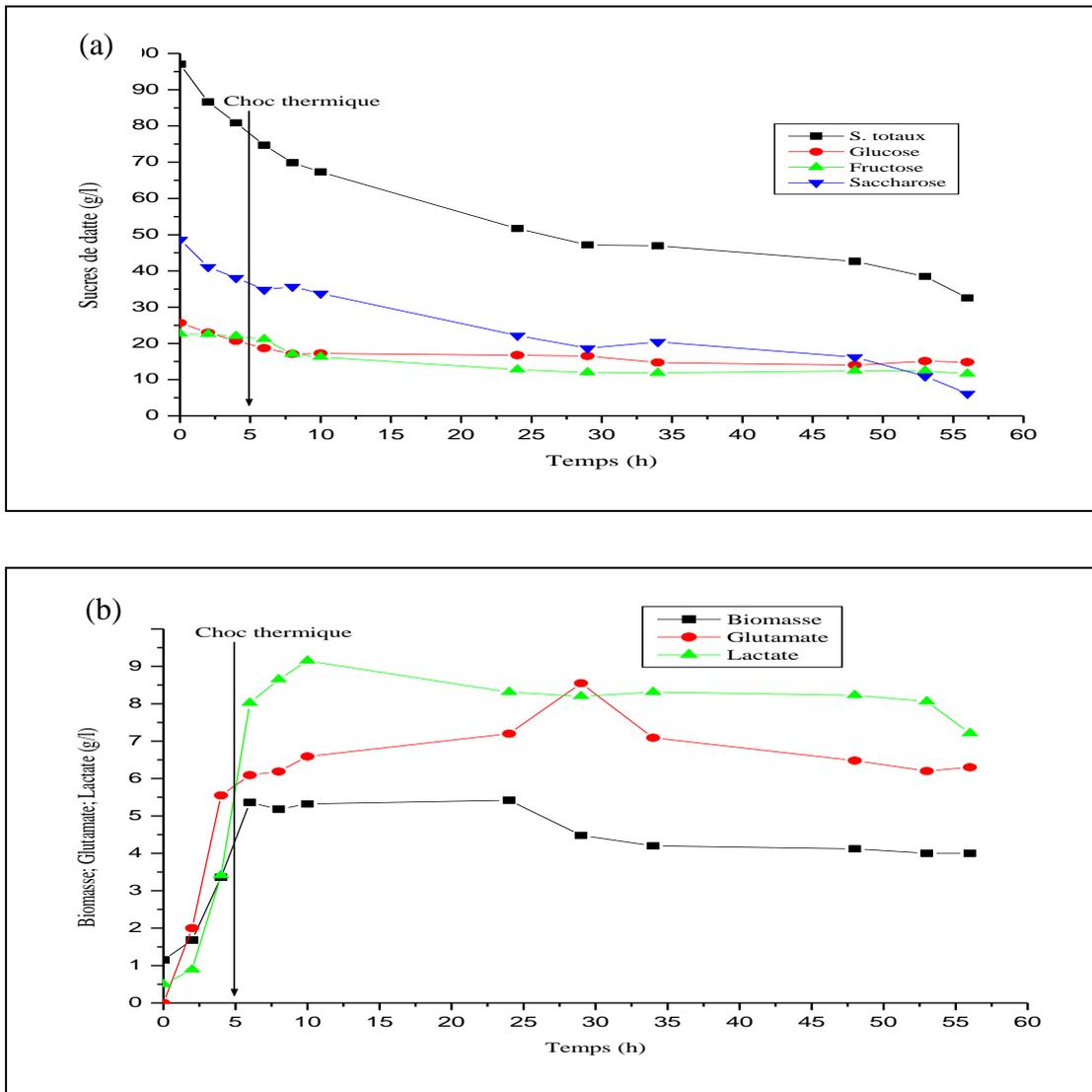
A partir de ces courbes, plusieurs paramètres ont été calculés. Les principaux paramètres cinétiques sont illustrés dans le Tableau III.13.

**Tableau III.13.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur le milieu de culture optimisé

$X_{\max}$ ( $\text{g.l}^{-1}$ )	Glutamate max ( $\text{g.l}^{-1}$ )	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$q_p$ ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	$\delta$ ( $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Taux de consommation du substrat (%)
6,12	8,55	0,27	0,07	0,30	66,42

(\*) X: biomasse ;  $\mu_{\max}$ : vitesse spécifique maximale de croissance ;  $q_s$ : vitesse spécifique de consommation du substrat ;  $\delta$ : productivité volumétrique de production d'acide glutamique.

D'autre part, l'utilisation du sulfate d'ammonium seul comme source d'azote (concentration en azote totale est de  $1,69 \text{ g.l}^{-1}$ ) donne presque les mêmes résultats que ceux obtenus en utilisant une combinaison de sulfate d'ammonium et d'urée avec une concentration en azote totale de  $2,77 \text{ g.l}^{-1}$ . Le sulfate d'ammonium est une meilleure alternative économique qui peut être expliqué probablement par la présence des ions  $\text{NH}_4^+$ . Ces ions activent l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) responsable de la synthèse de l'acide glutamique. De plus, la présence d'ammonium inhibe la réaction inverse de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) ce qui limite la consommation du glutamate au cours de la fermentation (Ertan, 1992). Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé le sulfate d'ammonium comme source d'azote pour la suite du travail.



**Figure III.15 (a,b).** Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu optimisé (a) : Consommation des sucres (b) : Croissance et production du glutamate et de lactate.

### III.1.4. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur le milieu de culture optimisé en fermenteur

Après avoir optimisé les conditions de culture en Erlenmeyers, nous avons appliqué ces conditions optimales en fermenteur, pour étudier le comportement cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en présence du sulfate d'ammonium en culture discontinue, dans les conditions suivantes :

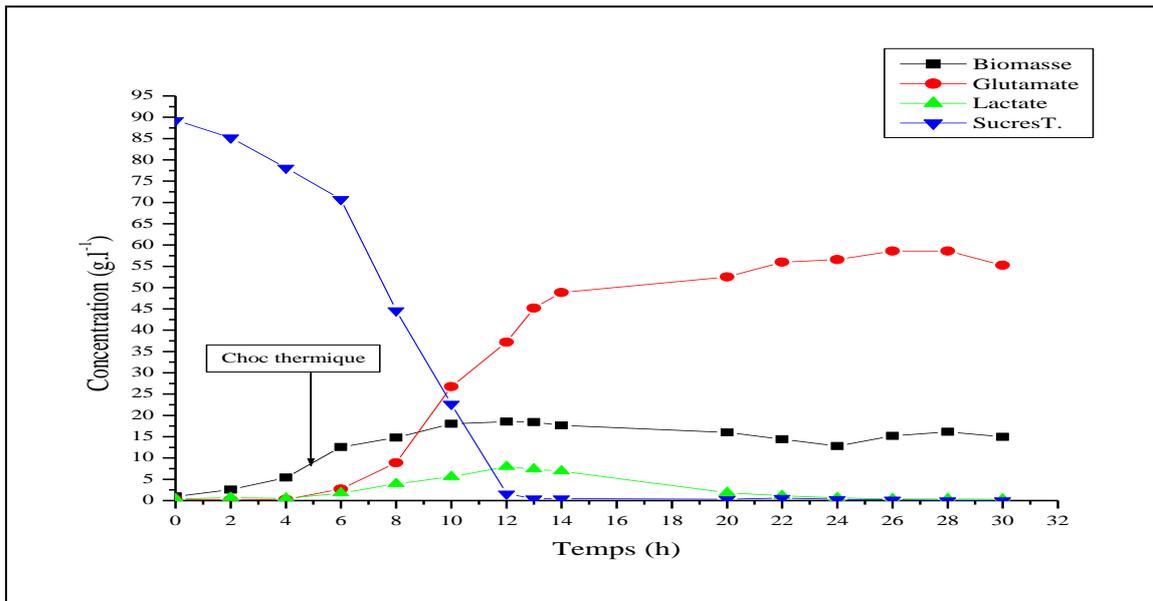
Conditions nutritionnels:

- Sucres du jus de datte : 88 g.l<sup>-1</sup>
- Source d'azote (sulfate d'ammonium) : 8 g.l<sup>-1</sup>
- Vitamines (biotine : 272 µg.l<sup>-1</sup> et thiamine 0,01 g.l<sup>-1</sup>)
- Bétaine 12 g.l<sup>-1</sup>.
- Sels minéraux (CaCl<sub>2</sub> 0,01g.l<sup>-1</sup> ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g.l<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0,6 g.l<sup>-1</sup> ; MnSO<sub>2</sub> 2,5 mg.l<sup>-1</sup>)

Conditions physiques :

- Taux d'inoculum 11,5 %
- Age d'inoculum 14 h
- Agitation 662 rpm
- Débit d'air 102 l.h<sup>-1</sup>
- pH 7,78
- Temps d'induction de 5h 18min
- Température 33°C suivie par un choc thermique de 38,4°C

La Figure III.15, montre l'évolution des concentrations en sucres totaux de jus de datte, en biomasse, en lactate et en glutamate par rapport au temps.



**Figure III.16.** Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en fermenteur dans les conditions optimales

A partir de ces courbes, plusieurs paramètres ont été calculés. Les principaux paramètres cinétiques sont illustrés dans le Tableau III.14.

**Tableau III.14.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte en culture discontinue

$X_{\max}$ (g.l <sup>-1</sup> )	Glutamate max (g.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	Taux de consommation du substrat (%)	$\delta$ (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
18,52	58,57	0,42	0,59	4,76	100	2,25

X: biomasse, le glutamate ;  $\mu_{\max}$ : vitesse spécifique maximale de croissance ;  $q_s$ : vitesse spécifique de consommation du substrat ; (%): pourcentage d'utilisation du substrat ;  $\delta$ : productivité volumétrique de production d'acide glutamique ; ( $Y_{P/S}$  et  $Y_{P/X}$ ): rendements globaux.

Le comportement cinétique de la souche est illustré sur la Figure III.17. Après un choc thermique de 33°C à 38,4°C; la biomasse augmente jusqu'à une concentration de 18 g.l<sup>-1</sup>. Les sucres sont totalement consommés après 12 heures de fermentation, la production du glutamate est induite et passe de 3 à 58,57 g.l<sup>-1</sup> après 26 heures de fermentation.

Par ailleurs, Les travaux de Bona et Moser (1997) ont obtenu une concentration de 30g.l<sup>-1</sup> d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* en utilisant le procédé de limitation en biotine pour l'excrétion de l'acide glutamique.

Das et al. (1995) ont obtenu sur un hydrolysats de déchets de datte, une concentration maximale du glutamate de 88 g.l<sup>-1</sup> en utilisant *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869

alors que Nampoothiri et Pandey (1999) ont obtenu seulement 21 g.l<sup>-1</sup> par *Brevibacterium* sp. Cependant, une concentration en acide glutamique finale plus élevée (93 g.l<sup>-1</sup>) a été obtenue par Amin Al-Talhi (2007) à partir des sucres de mélasse de canne à l'aide de *Corynebacterium glutamicum* immobilisée.

Les meilleurs résultats de production de l'acide glutamique en fermenteur (142,25 g.l<sup>-1</sup>) ont été obtenus par Tavakkoli et al. (2009) sur jus de datte en utilisant la méthodologie de surface de réponse.

### **Conclusion**

Les techniques d'optimisation conventionnelles sont longues et incapables de déterminer le point optimum dû aux interactions entre les différents facteurs. En effet, Elles impliquent le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables. Dans ces conditions, la concentration maximale en glutamate obtenue est de 11,9 g.l<sup>-1</sup> (Magister Mouffok, 2008).

Les techniques statistiques offrent plusieurs avantages, elles sont rapides, fiables et permettent de réduire le nombre d'expériences. En appliquant ces techniques statistiques en particulier le modèle Plackett-Burman et le modèle Box-Behnken dans le cadre de l'optimisation de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur un milieu de culture à base de jus de datte, on obtient une concentration maximale en glutamate de 39,2 g.l<sup>-1</sup> (Mouffok et al., 2012).

L'optimisation d'autres facteurs ayant une influence sur la fermentation glutamique par le modèle Box-Behnken a été également appliquée pour améliorer davantage la production d'acide glutamique. Les résultats obtenus ont montré que les performances de la production d'acide glutamique ont été nettement améliorées. En effet, Ce modèle a permis l'obtention d'une concentration finale en glutamate de 58,57 g.l<sup>-1</sup>.

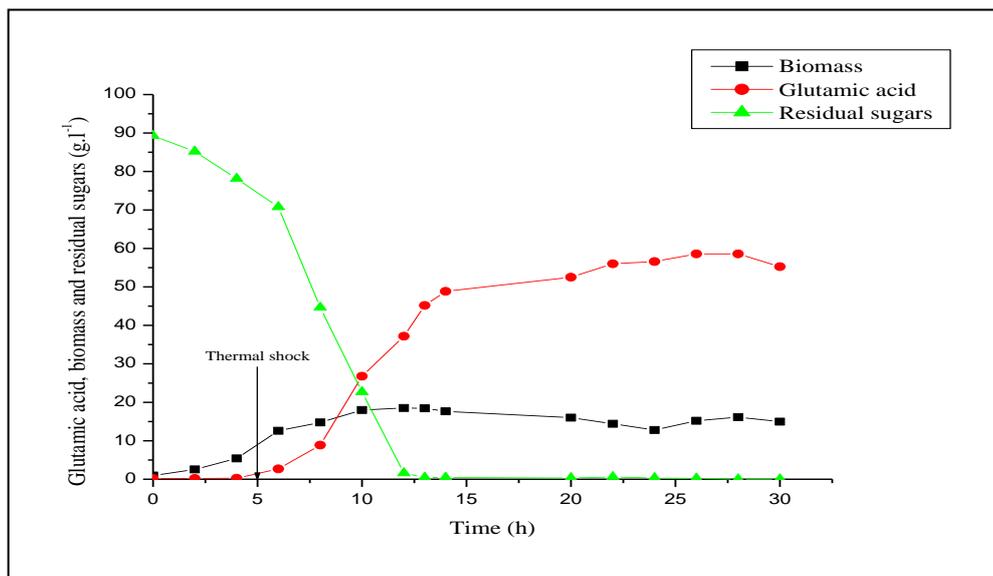
## III.2. CINÉTIQUE DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* 2262 EN CULTURE SEMI-CONTINUE

Dans un premier temps, nous présentons une étude antérieure sur la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture discontinue sur milieu à base de jus de datte. Puis nous développerons l'étude cinétique de la culture semi-continue avec comparaison des résultats des deux cinétiques.

### III.2.1. Étude cinétique de la fermentation discontinue

L'étude cinétique de la fermentation discontinue a été déjà entreprise dans le chapitre précédent. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III.17.

La Figure III.17 montre l'évolution de la concentration de la biomasse, des sucres totaux de jus de datte et de l'acide glutamique en culture discontinue dans les conditions optimales (Cf. Matériel et méthodes).



**Figure III.17.** Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres et en glutamate durant une culture discontinue.

Nous constatons que les sucres totaux de jus de datte sont complètement consommés durant les 12 premières heures de la fermentation. La croissance est caractérisée par une phase de latence d'environ 2 heures, une phase exponentielle, une phase de ralentissement et enfin une phase stationnaire.

Nous distinguons une phase de forte production d'acide glutamique qui correspond à l'induction du glutamate par choc thermique durant la phase exponentielle et qui se poursuit jusqu'au début de la phase de ralentissement. Puis dans un deuxième temps, la production est ralentie et reste stable jusqu'à la fin de la fermentation.

Les résultats des paramètres cinétiques obtenus lors de la culture discontinue ont montré que la concentration maximale en biomasse est de 18,52 g.l<sup>-1</sup> et la production d'acide glutamique est de 58,57 g.l<sup>-1</sup>. Comme le montre le Tableau III.14, les valeurs de rendement  $Y_{X/S}$  et la productivité volumique du glutamate obtenues à la fin de la fermentation sont respectivement 59% et 2,25 g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

### III.2.2. Étude cinétique des fermentations semi-continues

Lors des expériences en culture discontinue réalisées dans le chapitre précédent, nous avons constaté que les concentrations maximales en biomasse et en glutamate, ainsi que la productivité volumique, restent faibles. Pour augmenter la production de glutamate dans ce mode de culture, il faudrait dès le début de la fermentation des quantités importantes en substrats. Or, les données cinétiques ont montré que les concentrations élevées en substrat ont un effet inhibiteur sur la production du glutamate (Ruebenhagen et *al.*, 2001 ; Morbach et *al.*, 2002).

Le système de fermentation semi-continue appelé fermentation «fed-batch» ou batch alimenté permet d'éviter ce type d'inhibition dans la mesure où il est possible de contrôler volontairement l'apport des nutriments dans le milieu de fermentation. L'alimentation dans ce mode de culture peut être constante, intermittente ou exponentielle. Ainsi, lorsque la stratégie d'alimentation est adaptée, ce mode de culture permet d'augmenter la production de glutamate. Le choix de la stratégie d'alimentation qui permet l'optimisation économique de procédé dépend essentiellement des caractéristiques du microorganisme producteur, du milieu de fermentation et de l'équipement dont on dispose.

L'objectif principal de ce chapitre est de mettre en œuvre une stratégie d'alimentation permettant d'atteindre une concentration finale et une productivité volumique en glutamate élevées par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture semi-continue.

Dans ces conditions, nous nous sommes intéressés à deux stratégies :

- La première est la mise en œuvre d'une culture semi-continue en alimentant le milieu de culture par pulses c'est à dire par des ajouts ou injections instantanés au cours de la fermentation.
- La deuxième stratégie est la mise en œuvre d'une culture semi-continue en alimentant le milieu de culture d'une façon continue à différents débits d'alimentation.

Plusieurs cultures semi-continues ont été réalisées de façon à améliorer les performances des fermentations. Nous avons commencé par réaliser des ajouts ponctuels de sucres de jus de datte. Ensuite, nous avons étudié l'influence d'une alimentation continue à différents débits.

Pour toutes ces fermentations semi-continues, nous utiliserons les mêmes conditions de culture et le même milieu initial de production.

Conditions de culture :

- Taux d'inoculum 11,5 %
- Age d'inoculum 14 h
- Agitation 662 rpm
- Débit d'air  $102 \text{ l.h}^{-1}$
- Volume initial en réacteur 700 ml
- pH 7,78
- Temps d'induction de 5 h 18 min
- Température  $33^{\circ}\text{C}$  suivie par un choc thermique de  $38,4^{\circ}\text{C}$

Milieu initial de production :

- Source de carbone : sucres du jus de datte (glucose, fructose et saccharose) :  $88 \text{ g.l}^{-1}$
- Sulfate d'ammonium :  $8 \text{ g.l}^{-1}$
- Biotine :  $272 \mu\text{g.l}^{-1}$  et Thiamine  $0,01 \text{ g.l}^{-1}$
- Bétaine :  $12 \text{ g.l}^{-1}$ .
- Sels minéraux ( $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ g.l}^{-1}$  ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $2,5 \text{ g.l}^{-1}$  ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $2,5 \text{ g.l}^{-1}$  ;  $\text{MgSO}_4$   $0,6 \text{ g.l}^{-1}$  ;  $\text{MnSO}_2$   $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ )

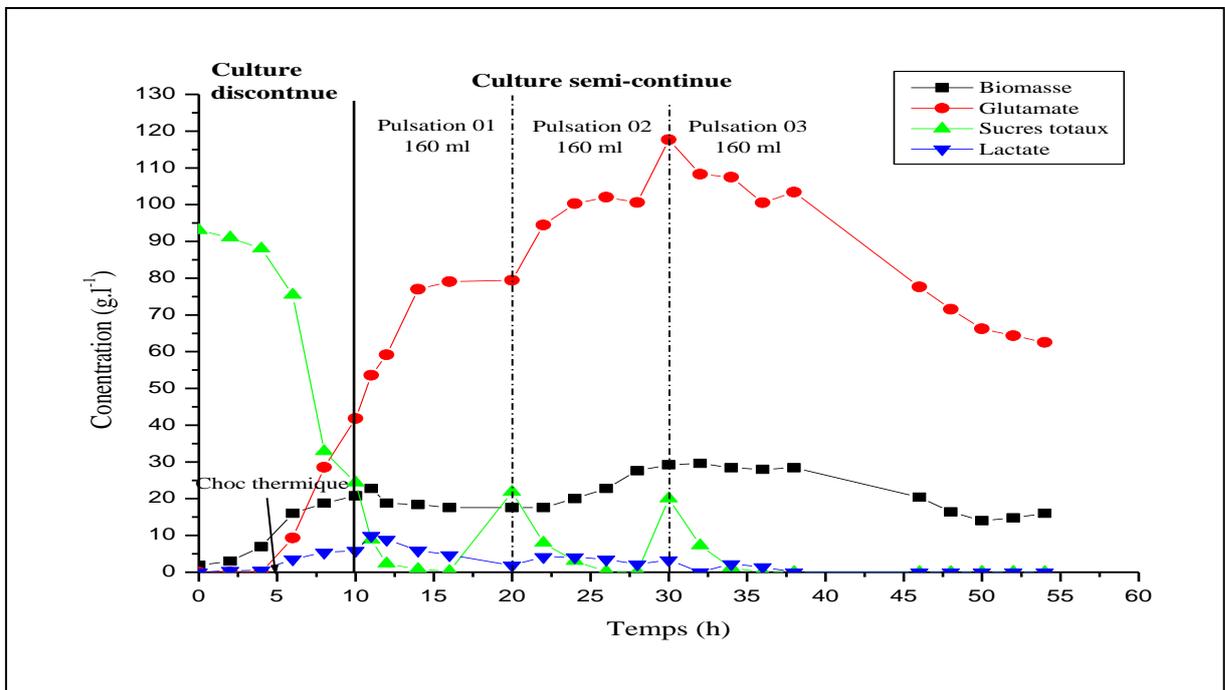
Nous allons décrire successivement pour chaque fermentation semi-continue les conditions d'alimentation et analyser les différentes cinétiques et les performances atteintes.

### III.2.2.1. Fermentation semi-continue alimentée par pulses

Pour ce faire, nous avons réalisé une culture en semi-continu en faisant des ajouts intermittents d'une solution contenant une source de carbone (sucres de jus de datte). Tout

d'abord une fermentation en discontinu est lancée sur milieu de production contenant  $88 \text{ g.l}^{-1}$  de sucres de jus de datte (Cf. Matériel et méthodes). La solution d'alimentation contient des sucres de jus de datte à une concentration de  $210 \text{ g.l}^{-1}$ . Les ajouts instantanés commencent après 10 heures de culture discontinu lorsque la concentration en sucres de jus de datte dans le milieu est comprise entre 0 et  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Les injections (160 ml/ajout) se font toutes les 10 heures ( $10^{\text{ème}}$ ,  $20^{\text{ème}}$  et  $30^{\text{ème}}$  heure de culture). Les points d'ajout de la solution d'alimentation sont indiqués par des flèches sur le graphe.

La Figure III.18, rend compte de l'évolution des concentrations en sucres totaux de jus de datte, biomasse, glutamate et lactate au cours du temps.



**Figure III.18.** Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue

- Stratégie d'alimentation : alimentation par pulses
- Composition de la solution d'alimentation : sucres de jus de datte ( $210 \text{ g.l}^{-1}$ )

On observe une forte reprise de la croissance et la production d'acide glutamique qui se poursuit jusqu'à la  $30^{\text{ème}}$  heure de culture. Entre la  $10^{\text{ème}}$  et la  $30^{\text{ème}}$  heure de culture, les sucres de jus de datte sont complètement consommés. Par contre, après l'injection de la solution d'alimentation à la  $30^{\text{ème}}$  heure de culture, nous observons une diminution de la biomasse et de la production du glutamate. Les concentrations maximales en biomasse et en glutamate sont respectivement de  $29,6 \text{ g.l}^{-1}$  et  $117,7 \text{ g.l}^{-1}$  après 30 heures de culture. Sous ces conditions, le

rendement  $Y_{X/S}$  et la productivité volumique du glutamate sont considérablement améliorés. Les valeurs obtenues sont respectivement 71% et  $2,8 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Tableau III.15).

Comparativement à la culture discontinue, la stratégie d'alimentation par des injections ponctuelles permet une amélioration de la production maximale de biomasse, de glutamate et de la productivité volumique du glutamate.

Le Tableau III.15 compare les performances de toutes les cultures semi-continues et celle d'une expérience en discontinu sous des conditions de culture optimale.

**Tableau III.15.** Comparaison des performances des fermentations semi-continues et discontinues.

Paramètres	Culture Batch	Culture Fed-batch Alimentation par pulses	Culture Fed-batch Alimentation Continue		
			Solution d'alimentation I	Solution d'alimentation II	Solution d'alimentation III
Glutamate max ( $\text{g.l}^{-1}$ )	58,57	117,7	120	<b>137,92</b>	109,7
Productivité ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	2,25	2,8	2,5	<b>4,3</b>	3,5
$Y_{X/S}$ (%)	0,59	0,71	0,57	<b>0,81</b>	0,57
Taux de consommation des sucres (%)	100	100	100	98,58	99,17
Biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ )	18,52	29,6	33,3	<b>25,76</b>	26,56

I : Solution d'alimentation contenant seulement les sucres de jus de datte.

II : Solution d'alimentation contenant les sucres de jus de datte et le sulfate d'ammonium.

III : Solution d'alimentation contenant les sucres de jus de datte, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux.

### III.2.2.2. Culture semi-continue avec alimentation continue

Dans cette partie, les cultures semi-continues ont été étudiées en utilisant la stratégie d'alimentation continue. Nous avons réalisé trois cultures semi-continues en modifiant la composition de la solution d'alimentation ainsi que le débit d'alimentation de façon à améliorer les performances des fermentations :

- (I): La première fermentation est alimentée en continu avec une solution d'alimentation content seulement les sucres de jus de datte.

- (II): La deuxième fermentation est alimentée en continu avec une solution d'alimentation contenant les sucres de jus de datte et le sulfate d'ammonium.
- (III): La troisième fermentation est alimentée en continu avec une solution d'alimentation contenant les sucres de jus de datte, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux.

#### **III.2.2.2.1. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte**

Nous avons commencé par réaliser une culture semi-continue avec une alimentation continue contenant seulement les sucres de jus de datte. Tout d'abord, une culture en discontinu est lancée sur le milieu de production contenant initialement  $88 \text{ g.l}^{-1}$  de sucres totaux de jus de datte. L'alimentation commence après 10 heures de fermentation, lorsque la concentration des sucres totaux de jus de datte dans le milieu est comprise entre 0 et  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Le débit est fixé à  $10 \text{ ml.h}^{-1}$ . A la 20<sup>ème</sup> et à la 30<sup>ème</sup> heure de culture, le débit est augmenté respectivement à  $20 \text{ ml.h}^{-1}$  et à  $30 \text{ ml.h}^{-1}$ .

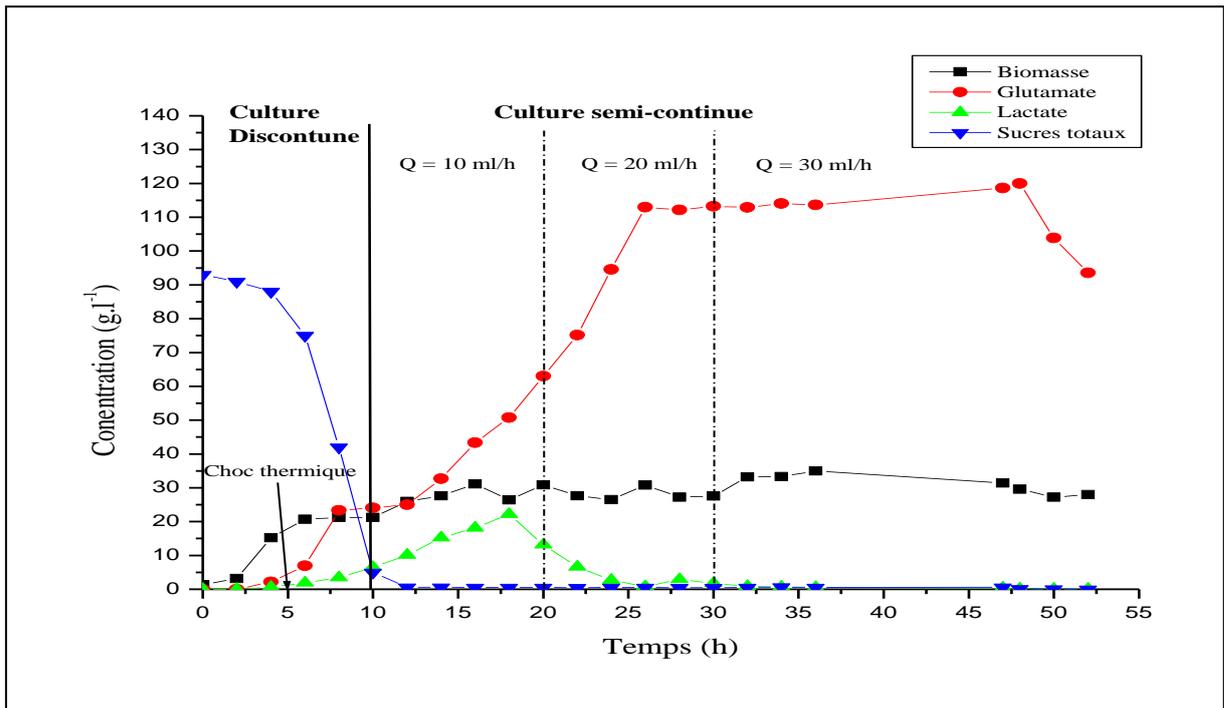
Pour cette culture, la solution d'alimentation contient uniquement les sucres de jus de datte à une concentration de  $210 \text{ g.l}^{-1}$ .

La Figure III.19 permet de suivre les cinétiques de croissance, de production de glutamate et de consommation des sucres de jus de datte au cours du temps.

D'après la Figure III.19, à la 20<sup>ème</sup> heure de culture, nous constatons que l'alimentation continue d'une solution contenant seulement les sucres de jus de datte avec un débit de  $20 \text{ ml.h}^{-1}$ , permet d'améliorer la biomasse et la production d'acide glutamique. Nous obtenons en 30 heures de culture  $33,3 \text{ g.l}^{-1}$  de biomasse et  $120 \text{ g.l}^{-1}$  d'acide glutamique. Pour cette fermentation, les performances concernant la production de biomasse et de glutamate sont meilleures que celles obtenues en culture discontinu et en culture semi-continue alimentée par pulses.

Cependant, les valeurs de rendement et de la productivité volumique obtenues en mode d'alimentation continu sont respectivement 57% et  $2,5 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$  et sont inférieures à celles obtenues en culture semi-continue avec une alimentation par pulses (71% et  $2,8 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

Il semble que la stratégie d'alimentation en continu permet d'améliorer la production de biomasse et du glutamate par rapport à la culture discontinu. Mais, il est à noter qu'une baisse de rendement et de productivité est obtenue en comparaison avec la stratégie d'alimentation par pulses.



**Figure III.19.** Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue

- Stratégie d'alimentation : alimentation en continu avec des débits (Q) différents
- Composition de la solution d'alimentation : sucres de jus de datte ( $210 \text{ g.l}^{-1}$ )

#### III.2.2.2.2. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte et en sulfate d'ammonium

Afin d'améliorer les résultats obtenus au cours du premier semi-continu, nous avons testé l'effet de la source d'azote sur la production d'acide glutamique. Pour cela, nous avons réalisé une deuxième culture en réacteur semi-continu en alimentant d'une façon continue, une solution contenant des sucres de jus dette et du sulfate d'ammonium comme source d'azote.

La solution d'alimentation contenant les sucres de jus da datte ( $210 \text{ g.l}^{-1}$ ) a été enrichie avec du sulfate d'ammonium ( $16 \text{ g.l}^{-1}$ ).

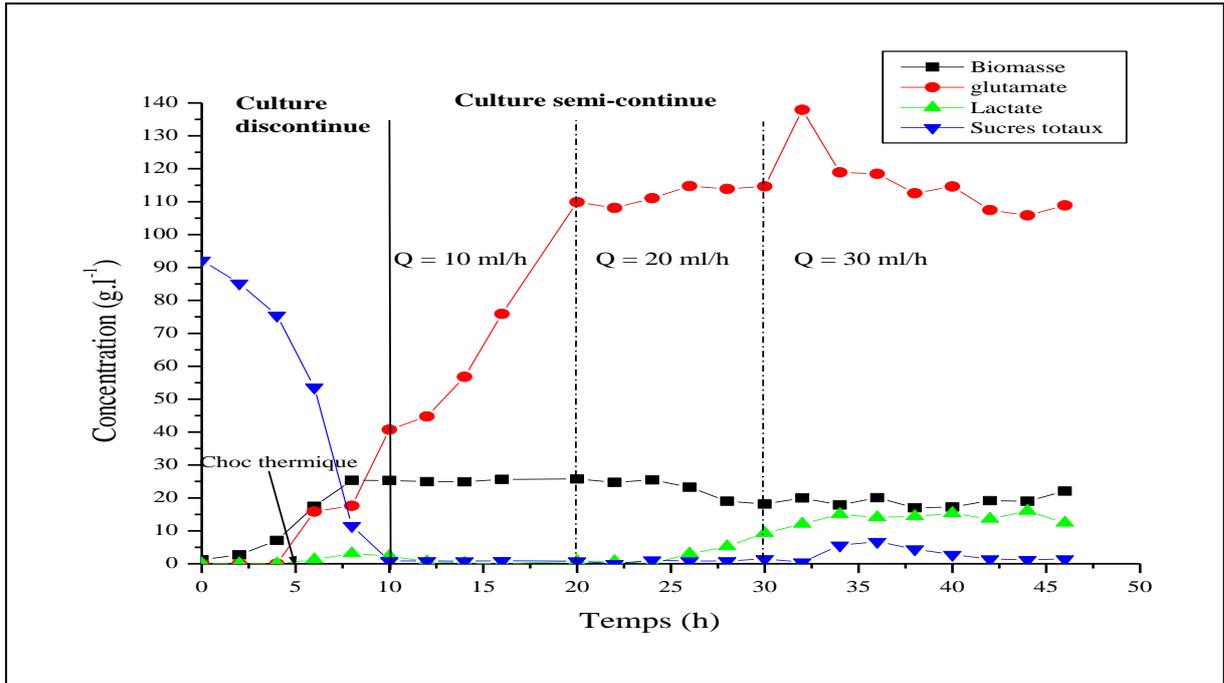
Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'alimentation du réacteur débute à la 10<sup>ème</sup> heure de culture avec un débit est de  $10 \text{ ml.h}^{-1}$ . Après 20 et 30 heures de culture, le débit d'alimentation a été augmenté respectivement à 20 et  $30 \text{ ml.h}^{-1}$ .

Les cinétiques de croissance, de production de glutamate et de consommation des sucres de jus de datte sont reportées sur la Figure III.20.

La culture fed-batch alimentée en continue avec les sucres de jus de datte et le sulfate d'ammonium a permis l'obtention d'une concentration maximale d'acide glutamique à 30 heures de culture égale à 137 (g.l<sup>-1</sup>) et des valeurs de rendement et de productivité volumique qui sont respectivement 81% et 4,3 (g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) qui sont supérieures à celles obtenues en mode discontinu (59% et 2,25 g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) et en mode semi-continu alimenté par pulses (70% et 2,8 g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) (Tableau III.15). Ceci pourrait être expliqué probablement par l'ajout de sulfate d'ammonium (ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) qui activent l'enzyme glutamate déshydrogénase responsable de la synthèse d'acide glutamique. En effet, Tesch et *al.* (1998), ont montré que chez *Corynebacterium glutamicum* 72% du glutamate est synthétisé à l'aide de l'enzyme glutamate déshydrogénase et 28% avec l'enzyme glutamine synthétase et glutamate synthase.

Nous constatons au cours de cette fermentation que la production de lactate est pratiquement nulle et que les sucres de jus de datte sont complètement consommés jusqu'à pratiquement 30 heures de culture. Ceci a permis de favoriser la production du glutamate. La concentration maximale en biomasse après 10 heures de culture est de 25,76 g.l<sup>-1</sup> puis se stabilise jusqu'à 30 heures de culture.

De plus, en comparaison avec l'expérience précédente, où la solution d'alimentation contenant seulement les sucres de jus de date, l'ajout du sulfate d'ammonium a montré une amélioration de (14,93%) de l'acide glutamique, de (42,10%) du rendement et de (72%) de la productivité volumique. Ainsi, les performances du procédé ont été améliorées par rapport aux autres fermentations réalisées précédemment.



**Figure III .20.** Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue

- Stratégie d'alimentation : alimentation en continu avec des débits ( $Q$ ) différents
- Composition de la solution d'alimentation : Sucres de jus de datte ( $210 \text{ g.l}^{-1}$ ) et sulfate d'ammonium ( $16 \text{ g.l}^{-1}$ )

### III.2.2.2.3. Culture semi-continue avec une alimentation continue en sucres de jus de datte, en sulfate d'ammonium et en sels minéraux

L'objectif de cette troisième expérience est d'étudier l'effet de l'ajout de sels sur la production d'acide glutamique de façon à améliorer davantage les résultats obtenus au cours de la deuxième culture semi-continue.

Pour cela, nous avons réalisé une troisième fermentation semi-continue en alimentant avec le même milieu que la précédente culture semi-continue mais en rajoutant une solution de sels minéraux.

Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. La solution d'alimentation contient  $210 \text{ g.l}^{-1}$  de sucres totaux de jus de datte,  $16 \text{ g.l}^{-1}$  de sulfate d'ammonium et des sels minéraux ( $\text{MgSO}_4$ ,  $1,2 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $5 \text{ g.l}^{-1}$ ; et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $5 \text{ g.l}^{-1}$ ).

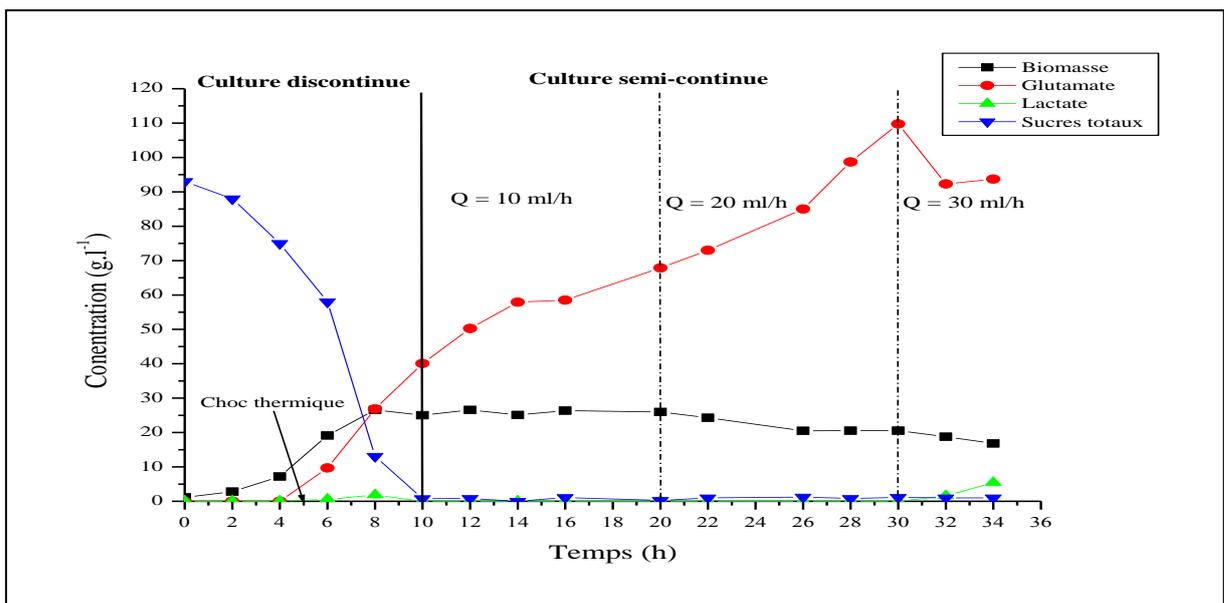
Dans un premier temps, une culture en discontinue est mise en œuvre sous les mêmes conditions que celles de l'expérience précédente. Après 10 heures de fermentation, lorsque la

concentration en sucres de jus de datte dans le milieu est faible (entre 0 et 5 g.l<sup>-1</sup>), on démarre l'alimentation du milieu contenant les sucres de jus de datte, le sulfate d'ammonium et des sels minéraux et ceci à différents débits d'alimentation.

Les cinétiques obtenues au cours de cette culture sont reportées sur la Figure III.21.

Les résultats obtenus montrent que la complémentation de la solution d'alimentation en sels minéraux n'améliore pas les performances de ce mode de culture. En effet, l'ajout de la solution des sels minéraux, ne semble pas avoir d'effet positif sur la production d'acide glutamique. La concentration maximale de glutamate obtenue après 30 heures de culture et avec un débit de 30 ml.h<sup>-1</sup> est de 109,74 g.l<sup>-1</sup>. Elle est inférieure à celle obtenue dans l'expérience précédente en culture semi-continue en utilisant une solution d'alimentation contenant les sucres de jus de datte et le sulfate d'ammonium.

Comparée à l'expérience précédente, nous constatons également une baisse des valeurs de rendement et de la productivité volumique du glutamate. Les valeurs obtenus sont respectivement 57% et 3,5 g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> après 30 heures de culture (Tableau III.15).



**Figure III .21.** Évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, en sucres, en lactate et en glutamate durant une culture semi-continue

- Stratégie d'alimentation : alimentation en continu avec des débits (Q) différents
- Composition de la solution d'alimentation : sucres de jus de datte (210 g.l<sup>-1</sup>), sulfate d'ammonium (16 g.l<sup>-1</sup>) et sels minéraux (MgSO<sub>4</sub>, 1,2 g.l<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 5 mg.l<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g.l<sup>-1</sup>; et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g.l<sup>-1</sup>).

Par ailleurs, peu de travaux ont été développés sur la production d'acide glutamique en culture semi-continue. Das et *al.* (1995) ont étudié la production d'acide glutamique sur milieu à base d'hydrolysats de palme à partir de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 en culture semi-continue. Les résultats obtenus ont montré que la concentration maximale en glutamate est de 88 g.l<sup>-1</sup>.

Nampoothiri et Pandey (1999) ont utilisé l'hydrolysats d'amidon de manioc pour la production d'acide glutamique à partir d'une souche de *Brevibacterium* Sp DSM 20411 et ont obtenu 25 g.l<sup>-1</sup> d'acide glutamique lors d'une culture semi-continue.

Delaunay et *al.* (2002) ont montré que lorsque la souche *Corynebacterium glutamicum* 2262 est soumise à plusieurs chocs de température de 33°C à 37°C, 38°C, 39°C, 40°C et 41°C provoque une production de 80 g.l<sup>-1</sup> de glutamate sur milieu à base de glucose en culture semi-continue.

## Conclusion

L'objectif principal de ce chapitre était la mise en œuvre d'une stratégie d'alimentation permettant d'améliorer les performances du procédé de production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture semi-continue. Les critères utilisés pour évaluer les résultats étaient d'une part, la productivité volumique en glutamate et d'autre part, la concentration finale atteinte. Deux stratégies d'alimentation ont été préconisées lors de la production d'acide glutamique en cultures semi-continues. La première consiste à alimenter la culture par des pulses instantanées. La deuxième consiste à alimenter la culture en continu. Nous avons également comparé les performances de toutes les cultures en semi-continu réalisées et celle d'une expérience en discontinu sous des conditions de culture optimales.

Nous constatons que la stratégie d'alimentation continue de la culture contenant les sucres de jus de datte et le sulfate d'ammonium permet d'améliorer de façon considérable la productivité volumique en glutamate et d'atteindre une concentration finale élevée.

Dans le cas de ce travail, nos résultats sont meilleurs que ceux obtenus par Das et *al.* (1995), Nampoothiri et Pandey (1999) et Delaunay et *al.* (2002). En effet, dans ce mode d'alimentation, les meilleures performances sur l'ensemble de nos expériences ont été obtenues. La concentration maximale en glutamate est de 137,92 g.l<sup>-1</sup> et la productivité volumique de glutamate est de 4,3 g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Ce mode d'alimentation a permis d'améliorer la production d'acide glutamique de 1,17 fois que celle obtenue en culture alimentée par pulses

et environ de 2,35 fois que celle obtenue en culture discontinue. Le mode fermentation semi-continue avec une alimentation continue contenant des sucres de jus de datte et du sulfate d'ammonium s'avère appropriée car elle a permis de produire l'acide glutamique en grande concentration et avec des bonnes valeurs de rendement et de productivité volumique.

### III.3. CINÉTIQUE DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* 2262 EN CULTURE CONTINUE

Après avoir étudié le procédé de production d'acide glutamique en mode discontinu et semi-continu, nous avons effectué une étude cinétique de *Corynebacterium glutamicum* en mode continu en essayant d'optimiser les conditions de culture.

Les objectifs fixés sont :

- d'une part en étudiant l'influence du taux de dilution sur la performance de la fermentation,
- d'autre part, d'évaluer les effets de différents composants du milieu d'alimentation sur la croissance et la production du glutamate,
- et enfin, de comparer le comportement cinétique de la souche en culture continue avec celui observé en culture semi-continue.

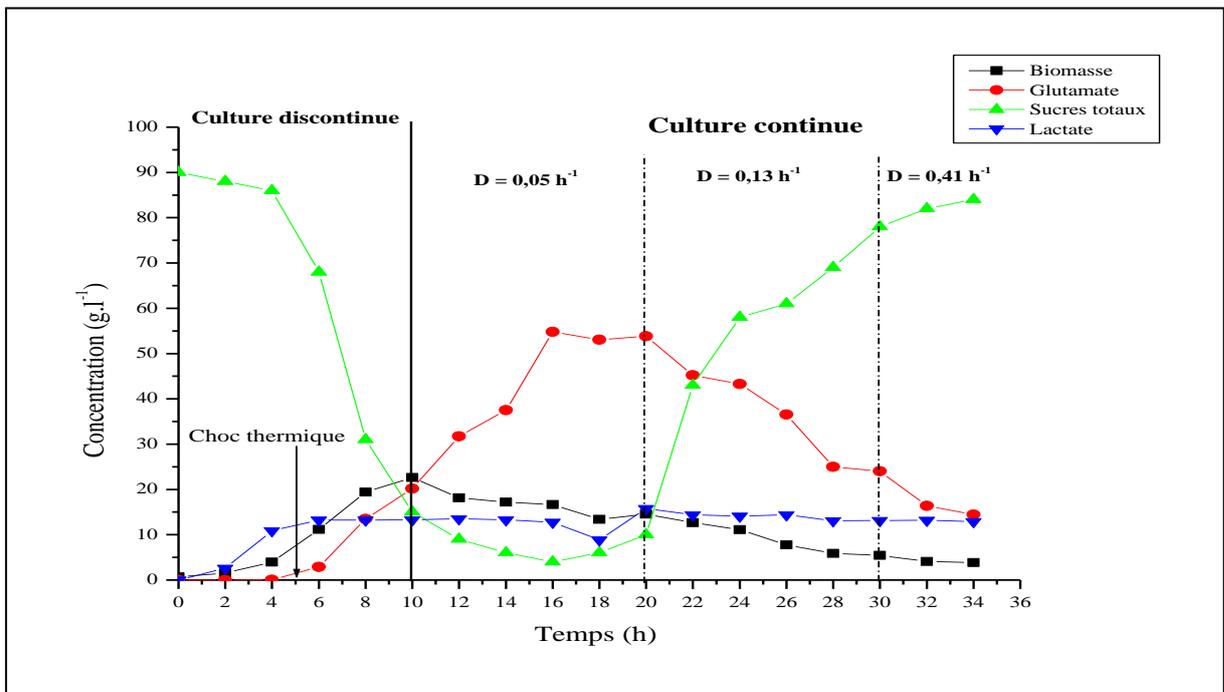
Pour cela, plusieurs fermentations en mode continu ont été réalisées. L'évaluation de la composition du milieu d'alimentation a été testée à différents taux de dilution de façon à améliorer les performances de production d'acide glutamique : Une première fermentation, alimentée avec une solution d'alimentation contient seulement les sucres de jus de dattes. Une deuxième fermentation, alimentée avec une solution d'alimentation contient les sucres de jus de dattes et le sulfate d'ammonium et enfin une troisième fermentation, alimentée avec une solution d'alimentation contient les sucres de jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux. Différents taux de dilution ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,13 \text{ h}^{-1}$  et  $0,41 \text{ h}^{-1}$ ) ont été appliqués lors de ces fermentations.

Ces fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions de culture et avec le même milieu initial de production.

### III.3.1. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul

Une culture en mode continu avec une alimentation contenant seulement les sucres de jus de dattes a été réalisée. La fermentation est démarrée par une culture discontinue sur un milieu de production contenant initialement 88 g.l<sup>-1</sup> de sucres totaux de jus de dattes. Après 10 h de culture, lorsque la concentration résiduelle des sucres devient faible (0 et 5 g.l<sup>-1</sup>), le fermenteur est alimenté par une solution d'alimentation contenant 88 g.l<sup>-1</sup> de sucres de jus de dattes à un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup>. Le taux de dilution est successivement augmenté à 0,13 h<sup>-1</sup> après 20 h, puis à 0,41 h<sup>-1</sup> à 30 h.

La Figure III.22 montre l'évolution des concentrations en sucres totaux de jus de dattes, en biomasse, en glutamate et en lactate en fonction du temps de culture.



**Figure III.22.** Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue (avec une solution d'alimentation de jus de dattes seul) à des taux de dilutions différents (0,05 h<sup>-1</sup>, 0,13 h<sup>-1</sup> et 0,41 h<sup>-1</sup>)

A partir de ces courbes, plusieurs paramètres ont été calculés. Les principaux paramètres cinétiques sont illustrés dans le Tableau III.16.

**Tableau III.16.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul

Paramètres cinétiques	Taux de dilution D (h <sup>-1</sup> )		
	<b>0,05</b>	<b>0,13</b>	<b>0,41</b>
X <sub>max</sub> (g.l <sup>-1</sup> )	22,64	12,68	4,08
Glutamate max (g.l <sup>-1</sup> )	54,80	45,19	16,35
Lactate max (g.l <sup>-1</sup> )	15,79	14,41	13,20
r <sub>P</sub> <sup>'''</sup> (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,54	0,90	0,49
r <sub>S</sub> <sup>'''</sup> (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,78	0,46	0,24
δ <sub>P</sub> (g.l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,54	0,90	0,49
Δ (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,39	0,61	0,34
Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,69	1,02	3,61
Y <sub>X/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,23	0,54	0,96

X: concentration maximale de biomasse; r<sub>P</sub><sup>'''</sup>: vitesse spécifique maximale de production du glutamate (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); r<sub>S</sub><sup>'''</sup>: vitesse spécifique maximale de consommation des sucres (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); δ<sub>P</sub>: productivité volumétrique du glutamate (g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); δ<sub>X</sub>: productivité volumétrique de biomasse (g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); Δ: productivité spécifique du glutamate (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); Y<sub>P/S</sub>: rendement du glutamate (g.g<sup>-1</sup>); Y<sub>X/S</sub>: rendement de biomasse (g.g<sup>-1</sup>)

Le suivi des cinétiques de croissance, de consommation des sucres, de production de lactate et de production du glutamate sont représentées sur la Figure III.22. Elle montre qu'après une période de 5h de culture, l'excrétion du glutamate est induite par une élévation de la température de 33 à 38,4°C. On constate que la biomasse atteint une concentration de 22,64 g.l<sup>-1</sup> après 10h de culture, puis diminue progressivement jusqu'à 3,84 g.l<sup>-1</sup> à la fin de la fermentation.

La production du glutamate est de 54.8 g.l<sup>-1</sup>, 45,19 et 16,35 g.l<sup>-1</sup> pour chaque taux de dilution respectifs 0,05, 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup>. Les productivités volumétriques de production du glutamate sont 0,54, 0,90 et 0,49g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour les taux de dilution 0,05, 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup> respectivement. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup> où la concentration maximale en glutamate est de 54,8 g.l<sup>-1</sup> (Tableau III.21).

Les sucres sont consommés presque totalement après 10h pendant la phase de culture discontinue, puis la concentration résiduelle des sucres de jus de datte reste faible au cours de

la fermentation continue au taux de dilution  $0,05\text{h}^{-1}$ , puis une augmentation progressive par rapport au temps aux taux de dilutions  $0,13$  et  $0,41\text{h}^{-1}$ .

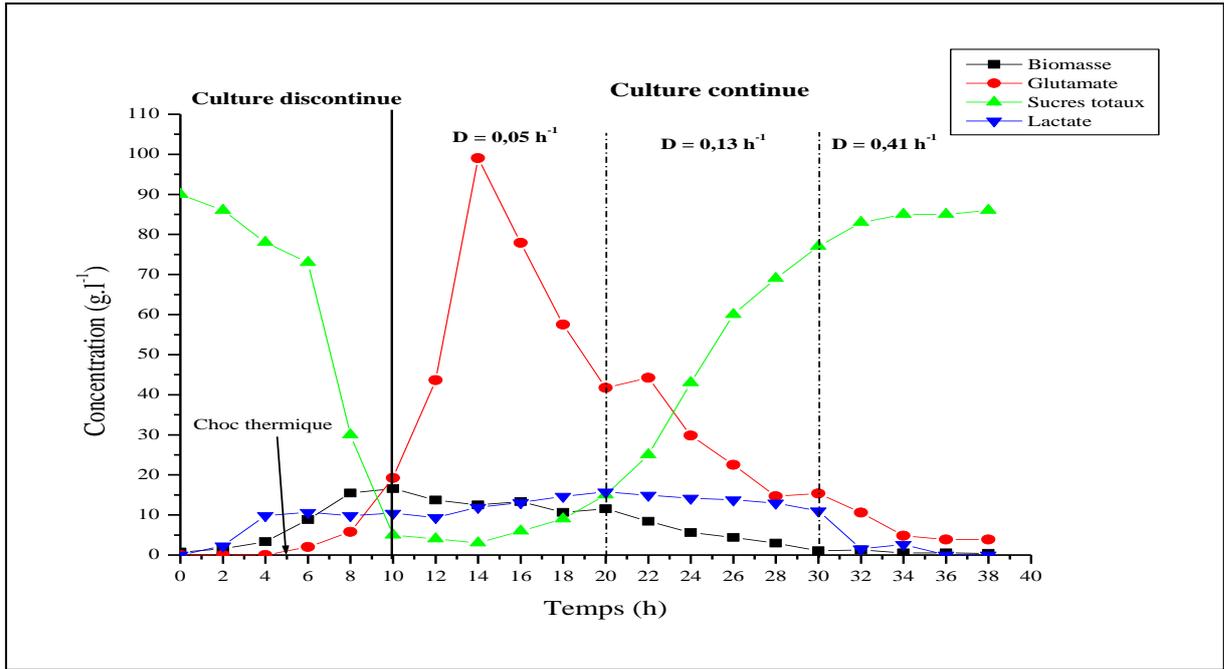
Les rendements de conversion des sucres en glutamate sont de  $0,69\text{ g.g}^{-1}$ ,  $1,02\text{ g.g}^{-1}$  et  $3,61\text{ g.g}^{-1}$  à des taux de dilution respectifs de  $0,05$ ,  $0,13$  et  $0,41\text{h}^{-1}$ . Ils sont supérieurs aux rendements de conversion des sucres en biomasse qui sont de  $0,23$ ,  $0,54$  et  $0,96\text{ g.g}^{-1}$ , ce qui explique que la production du glutamate est favorisée par rapport à la croissance. Cependant, on obtient une production de lactate de  $15,79$ ,  $14,41$  et  $13,2\text{ g.l}^{-1}$  avec des taux de dilution respectifs de  $0,05$ ,  $0,13$  et  $0,41\text{h}^{-1}$ .

### **III.3.2. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes et le sulfate d'ammonium**

Comme on l'a mentionné auparavant, la souche de *Corynebacterium glutamicum* est très exigeante du point de vue nutritionnel comme la plupart des corynébactéries. Afin d'améliorer les résultats obtenus au cours de l'expérience précédente, une deuxième fermentation en mode discontinu a été réalisée avec une solution d'alimentation contenant les sucres de jus de dattes ( $88\text{ g.l}^{-1}$ ) et le sulfate d'ammonium ( $8\text{ g.l}^{-1}$ ) en tant que source d'azote.

Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'alimentation commence lorsque les sucres résiduels atteignent une concentration entre  $0$  et  $5\text{ g.l}^{-1}$  après  $10\text{h}$  de culture. Le taux de dilution est fixé à  $0,05\text{h}^{-1}$ . Après  $20$  et  $30$  heures de culture, le taux de dilution est augmenté respectivement à  $0,13$  et  $0,41\text{h}^{-1}$ .

La Figure III.23 montre l'évolution des concentrations en sucres totaux de jus de dattes, en biomasse, en glutamate et en lactate en fonction du temps de culture.



**Figure III.23.** Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue (alimentation: jus de dattes et sulfate d'ammonium) à des taux de dilutions différents ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,13 \text{ h}^{-1}$  et  $0,41 \text{ h}^{-1}$ )

A partir de ces courbes, plusieurs paramètres ont été calculés. Les principaux paramètres cinétiques sont mentionnés dans le Tableau III.17.

**Tableau III.17.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue (solution d'alimentation: jus de dattes et sulfate d'ammonium)

Paramètres cinétiques	Taux de dilution D ( $\text{h}^{-1}$ )		
	0,05	0,13	0,41
Xmax ( $\text{g.l}^{-1}$ )	13,72	8,40	1,28
Glutamate max ( $\text{g.l}^{-1}$ )	99,04	44,23	10,58
Lactate max ( $\text{g.l}^{-1}$ )	15,74	14,91	2,66
$r_P^m$ ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,99	0,88	0,33
$\delta_X$ ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,68	1,09	0,52
$\delta_P$ ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,99	0,88	0,33
$\Delta$ ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,84	0,68	0,27
$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	1,35	0,72	2,12
$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,20	0,16	0,26

X: concentration maximale de biomasse;  $r_P^m$ : vitesse spécifique maximale de production du glutamate ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ );  $\delta_P$ : productivité volumétrique du glutamate ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ );  $\delta_X$ : productivité volumétrique de biomasse ( $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ );  $\Delta$ : productivité spécifique du glutamate ( $\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ );  $Y_{P/S}$ : rendement du glutamate ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $Y_{X/S}$ : rendement de biomasse ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

Les résultats obtenus relatifs à la production d'acide glutamique (99,04, 44,23 et 10,58 g.l<sup>-1</sup>) pour les taux de dilution 0,05, 0,13 et 0,41 h<sup>-1</sup> respectivement sont meilleurs que ceux obtenus en fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul (Tableau III.17). Ceci pourrait être expliqué par l'ajout de sulfate d'ammonium (ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et son effet sur l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH), responsable de la synthèse d'acide glutamique (Tesch et *al.*, 1999).

Les sucres sont consommés presque totalement au bout de 10h de culture discontinue, puis lorsque le taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup> est appliqué, la concentration résiduelle en sucres reste relativement faible. Cependant, on observe une accumulation importante des sucres résiduels de jus de dattes à des taux de dilution de 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup>. Il est probable que le taux de dilution est supérieur à la vitesse maximale de croissance ce qui provoque un lessivage des cellules à la sortie du fermenteur.

Les rendements de conversion des sucres en glutamate qui sont de 1,35 g.g<sup>-1</sup>, 0,72 g.g<sup>-1</sup> et 2,12 g.g<sup>-1</sup> (à des taux de dilution de 0,05, 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup>) sont supérieurs aux rendements de conversion des sucres en biomasse qui sont de 0,20, 0,16 et 0,26 g.g<sup>-1</sup>. Ceci pourrait être expliqué par la déviation du flux de carbone vers la production du glutamate par rapport à la croissance. En effet, Delaunay et *al.* (1999b) ont montré que 13% du flux de carbone est utilisé pour la biomasse, 25% pour la production du CO<sub>2</sub>, 45% pour la production du glutamate, le pourcentage restant est partagé entre les acides organiques, le lactate et le tréhalose.

Par ailleurs, la production de lactate est de 15,74, 14,91 et 2,66 g.l<sup>-1</sup> pour les taux de dilution de 0,05, 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup> respectivement.

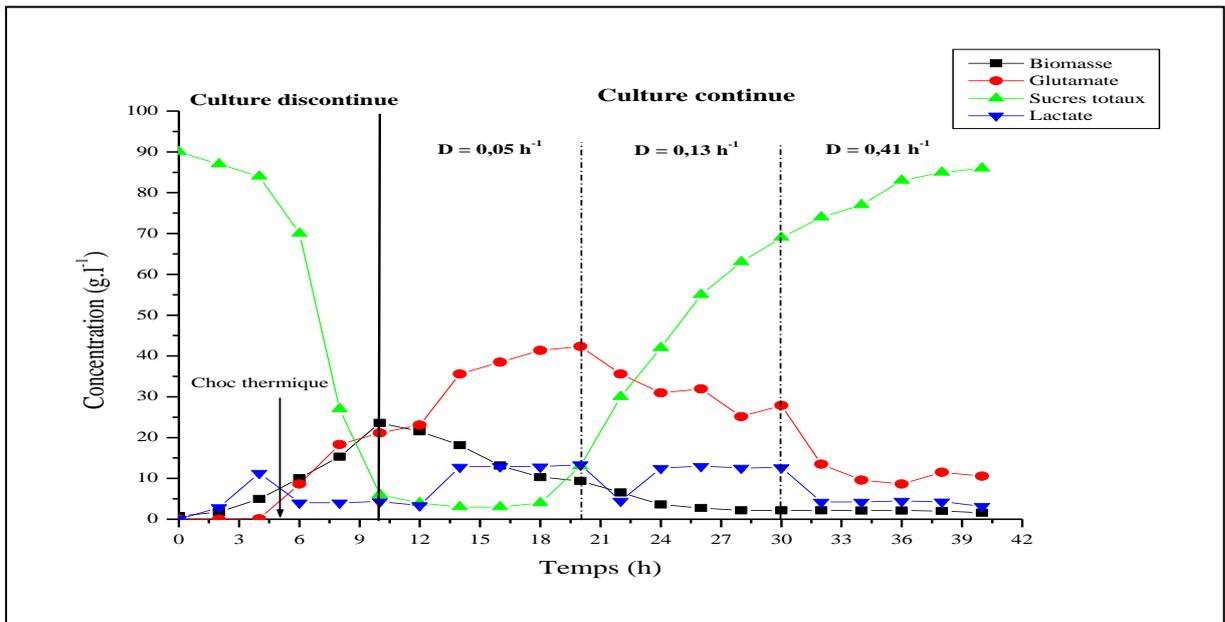
### **III.3.3. Fermentation continue avec une solution d'alimentation contenant le jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux**

Certains sels minéraux sont très importants comme le MgSO<sub>4</sub> et le MnSO<sub>4</sub> indispensables à la croissance cellulaire et à la production de métabolites. Ce sont en général des cofacteurs d'enzymes du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* (Debay, 1997 ; Georgen et *al.*, 1997). Pour cela, nous avons pensé dans une troisième expérience d'étudier l'effet de l'ajout de sels sur la production d'acide glutamique.

Nous avons donc réalisé une troisième fermentation en mode continu en alimentant avec une solution d'alimentation contenant les sucres de jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les

sels minéraux. Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que celle décrite précédemment. Après 10h de culture en discontinu, l'alimentation commence lorsque les sucres résiduels atteignent une concentration entre 0 et 5 g.l<sup>-1</sup>. Le taux de dilution est fixé à 0,05h<sup>-1</sup>. Après 20 et 30 heures de culture, le taux de dilution est augmenté respectivement à 0,13 et 0,41h<sup>-1</sup>.

La Figure III.24 montre l'évolution des concentrations en sucres totaux de jus de dattes, en biomasse, en glutamate et en lactate en fonction du temps de culture.



**Figure III.24.** Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue (solution d'alimentation: le jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux) à des taux de dilutions différents (0,05 h<sup>-1</sup>, 0,13 h<sup>-1</sup> et 0,41 h<sup>-1</sup>)

Afin d'interpréter les résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les principaux paramètres sont regroupés dans le Tableau III.18.

**Tableau III.18.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue (solution d'alimentation: jus de dattes, sulfate d'ammonium et sels minéraux)

Paramètres cinétiques	Taux de dilution D (h <sup>-1</sup> )		
	<b>0,05</b>	<b>0,13</b>	<b>0,41</b>
X <sub>max</sub> (g.l <sup>-1</sup> )	23,6	6,59	2,18
Glutamate max (g.l <sup>-1</sup> )	42,32	35,56	13,48
Lactate max (g.l <sup>-1</sup> )	13,38	12,99	4,47
r <sub>P</sub> <sup>m</sup> (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,42	0,71	0,40
r <sub>S</sub> <sup>m</sup> (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,83	1,16	0,54
δ <sub>P</sub> (g.l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,42	0,72	0,40
δ <sub>X</sub> (g.l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1,08	0,85	0,89
Δ (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,08	0,10	0,13
Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,56	0,61	0,72
Y <sub>X/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,26	0,13	0,05

X: concentration maximale de biomasse; r<sub>P</sub><sup>m</sup> : vitesse spécifique maximale de production du glutamate (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); r<sub>S</sub><sup>m</sup> : vitesse spécifique maximale de consommation des sucres (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); δ<sub>P</sub> : productivité volumétrique du glutamate (g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); δ<sub>X</sub> : productivité volumétrique de biomasse (g.l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); Δ: productivité spécifique du glutamate (g.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>); Y<sub>P/S</sub> : rendement du glutamate (g.g<sup>-1</sup>); Y<sub>X/S</sub> : rendement de biomasse (g.g<sup>-1</sup>).

Les résultats obtenus ont montré que la meilleure concentration maximale en glutamate (42,32 g.l<sup>-1</sup>) est obtenue avec un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup> (Tableau III.18). Cette concentration est plus faible que celle obtenue par rapport à la fermentation précédente avec le même taux de dilution. Ceci est probablement dû à l'ajout des sels dans le milieu d'alimentation. Cela peut aussi être dû à la déviation du flux carboné vers la synthèse de tréhalose suite à l'augmentation du flux des sucres entrant dans la cellule (en conditions de forte osmolarité), et à un excès d'oxygénation provoqué par le couple agitation-débit d'air qui provoque une accumulation d'α-cétoglutarate et de succinate (Inui et al., 2004 ; Çalik et al., 2001).

En effet, des études ont montré qu'au cours de la fermentation sous une forte osmolarité, *Corynebacterium glutamicum* accumule de manière importante la proline à partir du glutamate (Guillouet et Engasser, 1995).

La production maximale de glutamate obtenue après 20 h de culture est de 42.32 g.l<sup>-1</sup> correspondant à un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup>, puis diminue jusqu'à une concentration de 10,56 g.l<sup>-1</sup> aux taux de dilution de 0,13 h<sup>-1</sup> et 0,41 h<sup>-1</sup>. Ceci est probablement dû à une forte pression osmotique engendrée par l'accumulation de substances fortement chargées (une

alimentation en milieu riche en sels, une synthèse du glutamate et une accumulation des ions ammonium utilisés pour régler le pH contribuent à l'augmentation de la pression osmotique). En effet, Lapujade (2000), a montré que la pression osmotique a un impact négatif sur la production du glutamate. Cependant, une valeur de pression osmotique de 1,2 osmol/kg au début de la phase de production du glutamate est nécessaire pour atteindre la production optimale du glutamate (Debay, 1997 ; Goergen *et al.*, 1997).

En réponse à un stress hyper-osmotique, *Corynebacterium glutamicum* est capable de synthétiser deux osmoprotecteurs: le tréhalose et la proline. L'analyse du contenu cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* dans différentes conditions de culture révèle que ces voies de biosynthèse sont régulées par l'osmolarité du milieu extérieur (Bremer et Krämer, 2000). D'autres études menées sur un mutant de *E. coli*, incapable de synthétiser de la proline, ont permis d'isoler les gènes codant les composants de la voie de biosynthèse de la proline chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 (Ankri *et al.*, 1996).

Les sucres sont consommés presque totalement au bout de 10 h de culture discontinue, puis la quantité des sucres reste faible et presque constante au cours de 10 h de culture continue au taux de dilution  $0,05 \text{ h}^{-1}$ , puis augmente au cours du temps aux taux de dilution  $0,13 \text{ h}^{-1}$  et  $0,41 \text{ h}^{-1}$ .

Les rendements de conversion des sucres en glutamate qui sont de  $0,56 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $0,61 \text{ g.g}^{-1}$  et  $0,72 \text{ g.g}^{-1}$ , sont supérieurs aux rendements de conversion des sucres en biomasse qui sont de  $0,26$ ,  $0,13$  et  $0,53 \text{ g.g}^{-1}$  (Tableau III.18). Ceci peut être expliqué par une croissance réduite qui favorise la production du glutamate.

#### III.3.4. Comparaison des trois techniques d'alimentation

La production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue a été réalisée avec différentes solutions d'alimentation. Les résultats obtenus des trois expériences au taux de dilution de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  sont résumés dans le Tableau III.19.

**Tableau III.19.** Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de dattes en culture continue des trois expériences au taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup>

	X	Glutamate	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Δ	δ <sub>X</sub>	δ <sub>P</sub>
	(g.l <sup>-1</sup> )	(g.l <sup>-1</sup> )	(g.g <sup>-1</sup> )	(g.g <sup>-1</sup> )	(g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	(g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	(g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
Exp 01	22,64	54,8	0,23	0,69	0,39	1,13	0,54
Exp 02	<b>13,72</b>	<b>99,04</b>	<b>0,20</b>	<b>1,35</b>	<b>0,84</b>	<b>0,68</b>	<b>0,99</b>
Exp 03	23,60	42,32	0,26	0,56	0,08	1,08	0,42

(X) : biomasse, (δ) : productivité volumétrique du glutamate ou biomasse, (Δ) : productivité spécifique du glutamate, Y<sub>P/S</sub> : rendement de glutamate, et Y<sub>X/S</sub> : rendements de production de biomasse.

- Expérience 01: la solution d'alimentation contenant le jus de dattes seul
- Expérience 02: la solution d'alimentation contenant le jus de dattes et le sulfate d'ammonium
- Expérience 03: la solution d'alimentation contenant le jus de dattes, le sulfate d'ammonium et les sels minéraux

L'analyse de ces résultats indique que l'expérience numéro deux, où la solution d'alimentation contient les sucres de jus de dattes (88 g.l<sup>-1</sup>) et le sulfate d'ammonium (8 g.l<sup>-1</sup>), donne les meilleures performances de la fermentation glutamique en procédé continu à un taux de dilution de 0,05h<sup>-1</sup>. En effet, on obtient une meilleure productivité volumétrique du glutamate (0,99 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), une meilleure productivité spécifique de production d'acide glutamique (0,84 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), une meilleure production du glutamate (99,04 g.l<sup>-1</sup>) et un meilleur rendement de conversion des sucres en glutamate (1,35 g.g<sup>-1</sup>).

Par contre, une faible concentration en biomasse (13,72 g.l<sup>-1</sup>), un faible rendement de production de biomasse (0,20 g.g<sup>-1</sup>) et une faible productivité volumétrique de biomasse (0,68 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), ce qui est expliqué la déviation du flux de carbone vers la production du glutamate par rapport à la biomasse.

Par ailleurs, les travaux de Davin (2003) par *Corynebacterium glutamicum* 2262 induite par un choc thermique montrent que la concentration du glutamate augmente jusqu'à 6 g.l<sup>-1</sup> sur la période de 10 à 35 h, puis diminue à 4 g.l<sup>-1</sup> à 95 h de culture. De 100 à 120 h de culture, la concentration du glutamate remonte à 6 g.l<sup>-1</sup>, puis retombe définitivement pour le reste de la culture.

D'après les cinétiques des expériences, le taux de dilution D<sub>1</sub> (0,05h<sup>-1</sup>) donne la meilleure performance de production de l'acide glutamique, ensuite le taux de dilution D<sub>2</sub> (0,13h<sup>-1</sup>) et le

taux de dilution  $D_3$  ( $0,41h^{-1}$ ). Cette différence est probablement dû, d'une part à l'accumulation du substrat dans le milieu réactionnel et d'autre part, au soutirage des cellules bactériennes au cours de la fermentation, ce qui réduit la production du glutamate.

A partir de ces résultats la formulation du milieu à base de jus de datte et les conditions de culture pour les fermentations continues sont les suivantes :

- **Conditions nutritionnelles**

- Sucres totaux du jus de dattes:  $88 g.l^{-1}$
- Source d'azote (sulfate d'ammonium) :  $8 g.l^{-1}$
- Biotine :  $272 \mu g.l^{-1}$  et Thiamine :  $0,01 g.l^{-1}$
- Bétaine :  $12 g.l^{-1}$
- Sels minéraux : ( $CaCl_2$   $0,01 g.l^{-1}$  ;  $KH_2PO_4$   $2,5 g.l^{-1}$  ;  $K_2HPO_4$   $2,5 g.l^{-1}$  ;  $MgSO_4$   $0,6 g.l^{-1}$  ;  $MnSO_2$   $2,5 mg.l^{-1}$ )

- **Composition de la solution d'alimentation**

- Sucres de jus de dattes :  $88 g.l^{-1}$
- Sulfate d'ammonium :  $8 g.l^{-1}$

- **Taux de dilution**

- Un taux de dilution  $D = 0,05 h^{-1}$

- **Conditions physico-chimiques**

- Taux d'inoculum 11,5 %
- Age d'inoculum 14 h
- Agitation 662 rpm
- Débit d'air  $102 l.h^{-1}$
- pH 7,78
- Température d'induction  $38,4^\circ C$
- Température  $33^\circ C$  suivie par un choc thermique de  $38,4^\circ C$

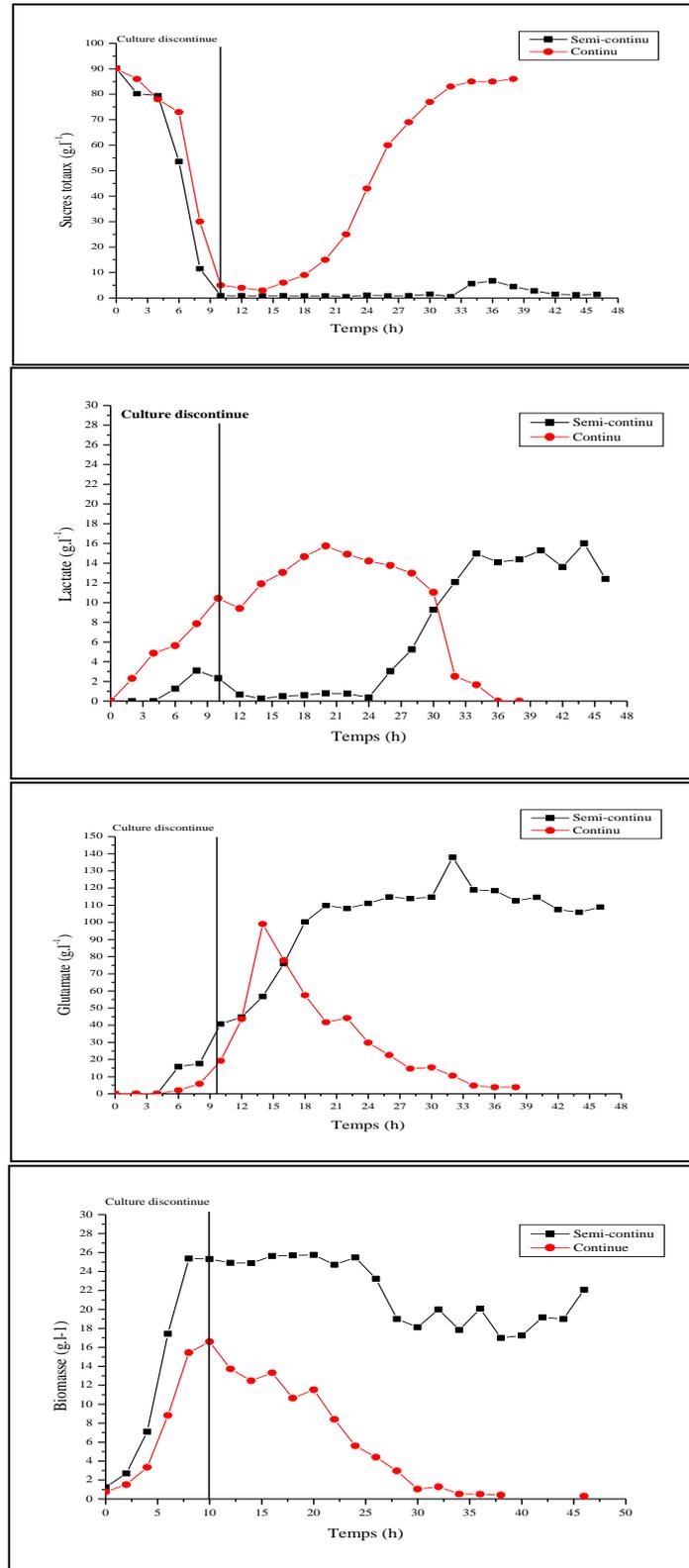
### III.3.5. Comparaison des cinétiques en culture continue et semi-continue

Nous avons comparé la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture semi-continue (dans des conditions de production maximales du glutamate) à la cinétique de la même souche en culture continue au taux de dilution de  $0,05 \text{ h}^{-1}$ . Les deux fermentations sont démarrées en culture discontinue à  $33^\circ\text{C}$ . Après 5 h de culture, la température est portée à  $38,4^\circ\text{C}$  et l'alimentation du milieu est mise en route.

Par rapport à la culture continue, le fonctionnement de la fermentation semi-continue se caractérise par deux différences :

- une absence de soutirage de milieu, ce qui élimine les phénomènes de lessivage cellulaire et résulte en une accumulation du glutamate,
- une concentration de sucres dans la solution d'alimentation plus élevée ( $210 \text{ g.l}^{-1}$  au lieu de  $88 \text{ g.l}^{-1}$ ) et une concentration de sulfate d'ammonium doublée ( $16 \text{ g.l}^{-1}$  au lieu de  $8 \text{ g.l}^{-1}$ ), et une alimentation en sucres plus lente.

La Figure III.25 présente la comparaison des données cinétiques au cours des deux fermentations.



**Figure III.25.** Comparaison des cinétiques de la culture continue (à  $D = 0,05h^{-1}$ ) et semi-continue.

- ***Croissance cellulaire***

Pour les deux fermentations, l'élévation de la température de 33 à 38,4 °C provoque un ralentissement puis un arrêt de la croissance. En absence de soutirage des cellules, La croissance augmente au cours du semi-continu, alors qu'elle diminue au cours du continu. Par contre les évolutions du rendement de conversion des sucres en biomasse sont proches pour les deux fermentations (0,20 et 0,17g.g<sup>-1</sup>) respectivement.

- ***Consommation des sucres***

Les sucres sont consommés presque totalement en culture semi-continue du fait de la concentration élevé en biomasse et en glutamate durant toute la fermentation. Par contre en culture continue, la concentration des sucres résiduelle remonte au cours du temps puisque la concentration de biomasse et de glutamate deviennent plus faibles.

- ***Production du glutamate***

Pour les deux fermentations la montée de température de 33 à 38,4°C provoque la production du glutamate. Le rendement de conversion des sucres en glutamate est élevé en culture continue (1,35 et 0,81 g.g<sup>-1</sup>) respectivement. Pour la fermentation semi-continue, une différence majeure est l'accumulation du glutamate excrété dans le milieu, qui atteint (137,92 g.l<sup>-1</sup>) après 32 h. Pour la fermentation continue, au contraire, la concentration en glutamate à 14h est de 99,04 g.l<sup>-1</sup> puis diminue progressivement pour atteindre une concentration de 3,85 g.l<sup>-1</sup> à la fin de la fermentation.

- ***Production de lactate***

En semi-continu le lactate n'est produit qu'en fin de fermentation, lorsque la croissance cellulaire est suffisamment ralentie, pour atteindre une concentration de 15,3 g.l<sup>-1</sup>. En continu, le lactate chute rapidement au cours de la fermentation et atteint une concentration très faible environ 1 g.l<sup>-1</sup> dû à l'accumulation des sucres dans le milieu réactionnel.

## ***Conclusion et perspectives***

Le but de ce travail était de mettre au point un procédé performant de production d'acide glutamique à partir d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* thermo-inductible sur un milieu à base de jus de dattes en culture discontinue, semi-continue et continue.

Les contributions principales apportées par cette étude sont résumées ici.

La première partie du travail a essentiellement été basée à l'optimisation des conditions de culture de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en mode discontinu. Un plan d'expériences de type Box-Behnken a été utilisé pour évaluer l'influence de plusieurs paramètres sur la production d'acide glutamique.

Le premier volet a été consacré à l'optimisation de la température d'induction, du temps d'induction et le ratio C/N par le modèle statistique Box-Behnken. Les conditions optimales de production d'acide glutamique estimées par l'équation de régression sont les suivantes : une température d'induction de 38,4°C, un temps d'induction de 5 h 18 min et un ratio C/N de 1,17. Dans ces conditions, la concentration du glutamate obtenue est de 23,87 g.l<sup>-1</sup>.

Le deuxième volet a été consacré à l'étude de l'effet d'autres facteurs présentant un effet positif sur la production du glutamate tels que le débit d'air, l'âge de l'inoculum et l'agitation. Le modèle statistique Box-Behnken a été appliqué sur ces trois paramètres. Ces expériences ont été réalisées en fermenteur pour vérifier le comportement de la souche dans de telles conditions. Les valeurs optimales obtenues par l'équation du modèle sont les suivantes: un débit d'air de 102 l.h<sup>-1</sup>, un âge d'inoculum de 14 heures et une agitation de 662 rpm. Sous ces conditions, la concentration d'acide glutamique obtenue sous ces conditions est de 17,91g.l<sup>-1</sup>. Cette concentration est inférieure à celle obtenue en Erlenmeyers. Cela est probablement dû à une forte pression osmotique exercée par une forte concentration en sources azotées.

Pour réduire la charge en sources azotées et remédier au problème de stress osmotique, une autre source azotée (sulfate d'ammonium) a été testée. Les résultats obtenus ont montré que les meilleurs résultats de production d'acide glutamique sont obtenus avec une concentration de sulfate d'ammonium de 8 g.l<sup>-1</sup>.

Par la suite, en prenant en compte la source azotée, trois paramètres ont été choisis pour l'optimisation du milieu de culture: la source de carbone, la source d'azote totale (combinaison

entre le sulfate d'ammonium et l'urée) et la biotine. Le modèle Box-Behnken a été utilisé pour déterminer les conditions optimales de ces paramètres. Les valeurs optimales obtenues sont : 272  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de biotine, 88 $\text{g.l}^{-1}$  de sucres de dattes, 2,77 $\text{g.l}^{-1}$  d'azote total (3,73  $\text{g.l}^{-1}$  de sulfate d'ammonium et 4,27 $\text{g.l}^{-1}$  d'urée). Finalement, la combinaison de 46,63% de sulfate d'ammonium et 53,37% d'urée donne les mêmes résultats en termes de concentration en acide glutamique que ceux obtenus avec 8  $\text{g.l}^{-1}$  de sulfate d'ammonium. Cette dernière a été retenue pour les prochaines expériences.

Après avoir optimisé les conditions de culture en Erlenmeyers, ces conditions ont été appliquées en fermenteur en mode discontinu. Les performances de la fermentation glutamique ont été nettement améliorées avec une production de glutamate de 58,57  $\text{g.l}^{-1}$ , qui représente trois fois la concentration obtenue (17,91  $\text{g.l}^{-1}$ ) en fermenteur en présence d'une charge élevée de sources azotée.

La deuxième partie de l'étude a été consacrée à l'amélioration des performances du procédé de production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* en mode semi-continu. L'objectif principal de cette étude est la mise en œuvre d'une stratégie d'alimentation permettant d'améliorer les performances du procédé de production d'acide glutamique en culture semi-continue en termes de productivité volumique et de concentration finale atteinte. Deux stratégies d'alimentation ont été adoptées : une alimentation par des ajouts instantanés au cours de la fermentation et une alimentation continue à débits variables. Les performances de toutes les cultures en semi-continu réalisées et celle d'une expérience en discontinu sous des conditions de culture optimales ont été comparées.

La stratégie d'alimentation par pulses permet une amélioration de la production maximale de du glutamate (117,7  $\text{g.l}^{-1}$ ) par rapport à la culture discontinue (58,57  $\text{g.l}^{-1}$ ).

Dans le cas de la stratégie alimentée de façon continue à des débits variables, il ressort ce qui suit :

- Lorsque la solution contient seulement les sucres de jus de dattes les performances concernant la production de glutamate sont meilleures (120  $\text{g.l}^{-1}$ ) que celles obtenues en culture discontinue (58,57  $\text{g.l}^{-1}$ ) et en culture semi-continue alimentée par pulses (117,7  $\text{g.l}^{-1}$ ).

- Par ailleurs, les meilleures performances ont été obtenues avec une alimentation enrichie en sulfate d'ammonium. La concentration en glutamate obtenue est de 137,92 g.l<sup>-1</sup>. Elle est supérieure à celle obtenue en mode discontinu (58,57 g.l<sup>-1</sup>) et en mode semi-continu alimenté par pulses (117,77 g.l<sup>-1</sup>).
- Enfin, l'enrichissement de la solution d'alimentation en sels a un effet négatif sur la production du glutamate. On note une diminution de la production d'acide glutamique (109,74 g.l<sup>-1</sup>).

Lors d'une dernière partie, nous nous sommes intéressés à tester les performances de production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* en mode continu. L'objet de cette partie, était d'étudier les effets de différents composants du milieu d'alimentation à différents taux de dilution sur le procédé de production de l'acide glutamique.

En mode continu, les résultats obtenus ont montré que, le taux de dilution (0,05 h<sup>-1</sup>) ainsi que la solution d'alimentation contenant les sucres de jus de dattes (88 g.l<sup>-1</sup>) et le sulfate d'ammonium (8 g.l<sup>-1</sup>), donnent les meilleures performances de la fermentation glutamique. En effet, une productivité spécifique de production d'acide glutamique de 0,84 g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, une production de glutamate de 99,04 g.l<sup>-1</sup> et un rendement de conversion des sucres en glutamate de 1,35 g.g<sup>-1</sup> ont été obtenus.

Ensuite, nous avons comparé la cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture semi-continue dans des conditions de production maximales du glutamate, par rapport à la cinétique de la même souche en culture continue à un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup>. Il en résulte ce qui suit :

En absence de soutirage des cellules, la concentration en biomasse augmente au cours du semi-continu, alors qu'elle diminue au cours du continu. Par contre les évolutions du rendement de conversion des sucres en biomasse sont proches pour les deux fermentations: 0,20 et 0,17 g.g<sup>-1</sup> respectivement.

La consommation des sucres en culture semi-continue est plus élevée que celle en culture continue. Une différence majeure est l'accumulation du glutamate excrété dans le milieu en mode semi-continue qu'en mode continu : 137,92 et 99,04 g.l<sup>-1</sup> respectivement. Par contre, le rendement de conversion des sucres en glutamate est plus élevé en culture continue 1,35 contre 0,81 g.g<sup>-1</sup>.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives d'investigation pour améliorer la maîtrise et la mise en œuvre de la fermentation glutamique.

Lors de notre étude cinétique en continu, nous avons remarqué que la production d'acide glutamique à des taux de dilution élevés n'était importante. De plus il y avait un risque de lessivage des cellules bactériennes à la sortie du fermenteur. Il serait donc intéressant de tester les performances de la fermentation en mode continu, en travaillant à des taux de dilution faibles.

Il serait également intéressant d'approfondir les études des cultures en mode discontinu en testant des concentrations plus importantes en sucres de jus de dattes afin d'éviter la limitation en substrats.

Afin d'éclaircir les voies métaboliques qui pourraient être empruntées par la souche, il serait souhaitable de compléter cette étude par une analyse complémentaire concernant les métabolites secondaires produits lors de la fermentation tels que le tréhalose, le succinate, l'acétate et la proline.

Enfin, l'immobilisation de *Corynebacterium glutamicum* sur des supports de différents types doit être envisagée pour essayer d'améliorer davantage la production d'acide glutamique.

## **Références bibliographiques**

- Abd-Alla M.H. et Ei-Enany A.E.** (2012). Production of acetonebutanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass Bioenergy*, **42**: 172-178.
- Abou-Zeid A., Nabeih A. et Baghlaf O.** (1991). The formation of oxytetracycline in a date coat medium. *Biores Technol*, **37**: 179-184.
- Abou-Zeid A.A. et 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., Baeshin N.A., Baghlaf A.O.** (1993). Utilization of date products in production of oxytetracycline by *streptomyces rimosus*. *J Chem Technol Biotechnol*. **58**: 77-79.
- Acourene S., Djafri K., Ammouche A., Djidda A., Tama M. et Taleb B.** (2011). Utilisation of the date wastes as substrate for the production of baker's yeast and citric acid. *Biotechnol*. **10**: 488-497.
- Ahmed I.S.A. et El-gharibi K.N.** (1995). The composition and properties of date proteins. *Food Chemistry*. **53**: 441-446.
- Ahuja S.K., Ferreira G.M. et Morreira A.R.** (2004). Application of Plackett and Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth of aggregated shipworm bacterium. *Biotechnol. Bioeng*. **85**: 666-675.
- Aksu Z. et Tugba A.T.** (2005). Carotenoid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem*. **40**: 2985- 2991.
- Al Bassam, R.** (2001). Industrial ethanol production using juice of dates in a fixed cell process. Second International Conference on Date Palms, Al Ain. U.A.E March 25-27, 850-860.
- Aleid S.M., Al-jasass F.M. et Hamad S.H.** (2010). Second annual report of Project # APR-27-96, Production of single cell protein from surplus dates and its use as a protein source in the diets of poultry and fish. King Abdulaziz City for Science and Technology, Riyadh,.
- Alexander N.G. et Hiroshi N.** (2007). Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. *Cambridge University Press*, p 301.

- Al-Jasass F.M., Aleid S.M. et Ali SHH A.** (2010). comparative study on date syrup (dips) as substrate for the production of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Food Agric Environ.* **8**: 314-316.
- Al-Otaibi M.M. et Saleh F.A.** (2010). Annual report of Project No.110003, Fortification of some dates with probiotic fermented milk, King Faisal University, Al- Hassa.
- Amin G.A. et Al-Talhi A.** (2007). Production of L-glutamic Acid by Immobilized Cell Reactor of the Bacterium *Corynebacterium glutamicum* Entrapped into Carrageenan Gel Beads. *J. Appl Scienc.* **2**: 62-67.
- Angellier H.** (2005). Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications aux composites. Thèse doctorat Université Grenoble.
- Ankri, S., Serebrijski I., Reyes O. et Leblon G.** (1996). Mutation in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the pro A step. *J. Bacterial.* **178** (15): 4412-9
- Aras O. et Dilsizian V.** (2008). Targeting tissue angiotensin converting enzyme for imaging cardiopulmonary fibrosis. *Curr Cardiol Rep.* **10**: 128-134.
- Becker J. et Wittmann C.** (2012). Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotechnol.* **23**: 631-640.
- Belguedj M.** (2002). Caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du sud-est algérien. *3D Dossiers - Documents - Débats. INRA Algérie. Revue annuelle n° 01*: p 289.
- Bengtsson S., Pisco A.R, Reis M.A.M. et Lemos P.C.** (2010). Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. *J Biotechnol.* **145**: 253-263.
- Benoist D., Tourbier Y. et Germain-Tourbier S.** (1994). Plans d'expériences: construction et analyse. Paris: *Tec et Doc*, 700.
- Bensalem H.** (2011). La production des agrumes de l'Algerie .Selon un bilan du ministere de l'agriculture et de developpement rural.

- Besbes S., Cheikh Rouhou S., Blecker C., Derouanne C., Lognay G. et Drira N.E.** (2006). Voies de valorisation des sous produits de dattes: Valorisation de la pulpe. *Microbiologie Hygiène Alimentaire*. **18**: 3-7.
- Besbes S., Hentati B., Blecker C., Derouanne C., Lognay G., et Drira N.E.** (2005). Voies de valorisation des sous produits de dattes: Valorisation du noyau. *Microbiologie Hygiène Alimentaire*. **18**: 3-11.
- Bona R. et Moser A.** (1997). Modelling of L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Bioproc. Eng.* **17**: 139-142.
- Bouabidi A.** (2013). Étude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Thèse de doctorat. Ben M'Sik Casablanca Maroc.
- Boudries H., Kefalas P. et Hornero-Méndez D.** (2007). Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera*) at different edible maturation stages. *Food Chemistry*. **101**: 1372-1377.
- Box G.E.P. et Behnken D.W.** (1960). Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. **2**: 455-75.
- Box G.E.P. et Wilson K.B.** (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy Stat Soc B*. **13**: 1-45.
- Bull, A.T.** (2010). The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *J. industrial Microbiol Biotechnol.* **37**: 993-1021.
- Çalik G., Unlutabak F. et Ozdamar T.H.** (2001). Product and byproduct distributions in glutamic acid fermentation by *Brevibacterium flavum*: effects of the oxygen transfer. *Biochem Engin.* **9**: 91-101.
- Castan A. et Enfors S.O.** (2000). Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engin, Springer-Verlag*. **22**: 509-515.
- Chagnon P.** (2005). Les plans d'experiences. Avis d'expert statistique, pp 97-100.
- Chandran S. et Singh R.S.** (2007) Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharm.* **62(1)**: 4-14.

- Chandrasekaran M. et Bahkali Ali H.** (2013). Valorization of Date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology- Review. *Saudi J. Biological Sci.* **20**: 105–120.
- Chauhan K., Trivedi U. et Patel K.C.** (2007). Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technol.* **98**: 98-103.
- Chawla P.R., Bajaj I.B., Shrikant A.S. et Singhal R.S.** (2009). Fermentative production of microbial cellulose. *Food Technol Biotechnol.* **47**: 107-124.
- Clément Y. et Lanéelle G.** (1986). Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. General Microbiol.* **132**: 925-929.
- Clément Y., Escoffier B., Trombe M. C. et Lancelle G.** (1984). Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum* ? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2589-2594.
- Coello M.N., Hadjsassi A. et Lebeault J.M.** (2001). Effect of the growth rate on the enzymatic activities of L-lysine-producing cells of *Corynebacterium glutamicum*. *World j. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 337-341.
- Crueger W. et Crueger A.** (1984). Amino acid. In Brock T.D. (ed), *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Madison : Science Tech, Inc, 127-147.
- Dandekar T., Schuster S., Snel B., Huynen M. et Bork P. (1999). Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**: 115-124
- Das K., Anis M., Mohd Azemi B. M. N., et Ismail N.** (1995). Fermentation and recovery of glutamic acid from palm waste hydrolysate by ion-exchange resin column. *Biotechnol. Bioeng.* **48**: 551-555.
- Davati N., Hamidi E.Z. et Shoja A.S.A.** (2007). Study on producing possibility of amino acids from date palm wastes by two mutant *corynebacterium glutamicum* CECT 690 and CECT77. *Iran J Food Sci Tech.* **4**: 55-64.
- Davati N., Hamidi-Esfahani Z. et Shoja Alsadati S. A.** (2007). Study on producing possibility of amino acids from date palm wastes by two mutants *Corynebacterium glutamicum* CECT690 & CECT77. *Iran J. Food Sci. Technol.* **4**: 55-64.

- 
- Davati N., Hamidi-Esfahani Z. et Shoja Alsadati S.A.** (2007). Study on producing possibility of amino acids from date palm wastes by two mutants *Corynebacterium glutamicum* CECT690 & CECT77. *Iran J. Food Sci. Technol.* **4**: 55-64.
- Davin UY.** (2003). Étude 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). Étude cinétique de la fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation physiologique par cytométrie en flux. Thèse INPL, Nancy.
- Dejaegher B., Vander Heyden Y.** (2009). *Acta Chromatogr.* **2**: 161–201.
- Delattre C., Rios L., Laroche C., Le N.H., Lecerf D. et Picton L.** (2009). Production and characterization of new families of polyglucuronic acids from TEMPO-NaOCl oxidation of curdlan. *Int J Biol Macromolc.* **45**: 458-462.
- Delaunay S., Lapujade P., Engasser J.M. et Goergen J.L.** (2002). Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 333-337.
- Delaunay S., Lapujade P., Maily E., Oriol E., Engasser J.M., Lindley N.D. et Goergen 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. et Goergen J.L.** (1999b). Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. *Metab. Eng.* **1**: 334-343.
- Deming S.N. et Morgan S.L.** (1988). *Experimental Design: A Chemometrix Approach*, Elsevier, New York, USA.
- Devshony S., Eteshola E. et Shani A.** (1992). Caractéristiques and some potential applications of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds and seed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society (JAOCS)*. **69**: 595-597.

- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. et Bennamoun L.** (2006). Application of a statistical design to the optimisation of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* **73** (2): 190-197.
- Dominguez H. et Lindley N.D.** (1996). Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3878-3880.
- Dominguez H., Nezondet C., Lindley N.D. et Coccagn M.** (1993). Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnol. Lett.* **15**: 449-454.
- Drysdale C.R. et McKay A.M.** (1995). Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. *Lett Appl Microbiol.* **20**: 252-254.
- Duperray F., Jezequel D., Ghazi A., Letellier L. et Shechter E.** (1992). Excretion of glutamate from *Cotynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1303**: 250-258.
- Dutta S., Ray S. et Nagarajan K.** (2013). Glutamic acid as anticancer agent: An overview. *Saudi Pharmaceutical J.* **21**: 337–343.
- Eggeling L. et Bott M.** (2005). Handbook of *C. glutamicum*, Florida: CRC press.
- EI-Sharnouby G.A., Aleid S.M. et Al-otaibi M.M.** (2010). Utilization of enzymes in the production of liquid sugar from dates, *Afr J Biochem Res.* **3**: 41-47.
- Elsanhoty R.M., Al-Turki I.A., Ramadan M.F.** (2012). Screening of medium components by Plackett–Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes. *Ind. Crops Prod.* **36**: 313–320
- Embadi L., Nasernajad B., Shokrgozar T., Mehranian M. et Vahabzadeh F.** (2009). Optimization of withering time and fermentation conditions during the manufacture of black tea using a response surface methodology. **16**: 61-68.
- Ertan H.** (1992). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* **158** : 35-41.

- Espiard E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc. Lavoisier, Paris, 147-155.
- Estanove P.** (1990). Note Technique: Valorisation de la datte. Options Méditerranéennes. Sér. A/N°11, 302-318. Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1109-22.
- Evens A.M., Hutchings M. et Diehl V.** (2008). Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future. *Nat Clin Pract Oncol.* **5**: 543-556.
- Eyer K. et Dubuis P.** (2008). Development of an Industrial Biotechnology Process : Nutritional strategies , HES-SO Valais. Sion.
- Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T. et Rachiq S.** (2014). The application of Plackett and Burman design in screening the parameters acting on the hydrodistillation process of Moroccan thyme (*Thymus vulgaris L.*). *International Journal of Innovation and Applied Studies.* Vol. **6**: pp 530-540.
- FAO,** (2007). Updated June 2, 2012. Available from Statistical Databases; <http://faostat.fao.org>.
- FAO,** (2010). Updated June 2, 2012. Available from Statistical Databases; <http://faostat.fao.org>.
- Funami T., Nishinari K.** (2007). Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. *Food Hydrocolloids.* **21**: 59-65.
- Gad A.S., Kholif A.M. et Sayed A.F.** (2010). Evaluation of the nutritional value of functional yogurt resulting from combination of date palm syrup and skim milk. *Am J Food Technol,* **5**: 250-259.
- Garrido-Fernández J., Maldonado-Barragán A., Caballero- Guerrero B., Hornero-Méndez D. et Ruiz-Barba J.L.** (2010). Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *Int J. Food Microbiol.* **140**: 34-39.
- Goergen J.L., Debay F. et Engasser J.M.** (1997). Contrains physiologiques favorables à la surproduction d'acide glutamique par corynébactéries. In physiologie microbienne et procédés industrielles, Société Française de Microbiologie, Paris, 105-114.
- Goupy J.** (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad.* **34**: 74-114.

- Goupy J.**, (1990). Modélisation par les plans d'expériences, *Techniques de l'ingénieur, mesures et contrôles*. R 275, 1-23. Sels minéraux
- Gourdon P., Raherimandimby M., Dominguez H., Cocaign-Bousquet M. et Lindley N.D.** (2003). Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 77-85.
- Guennouni A.** (2010). Palmier dattier, La filière se dynamise .*Agriculture du Maghreb* N°47, p 115.
- Guillouet S. et Engasser J.M.** (1995). Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol.* **44**: 496-500.
- Guillouet S. et Engasser J.M.** (1996). Kinetics of volume variation of *Corynebacterium glutamicum* following saline osmotic upshifts. *Biotechnol. Lett.* **18**: 145-148.
- Hartati A.I., Pramono Y.B., Legowo A.M.** (2012). Lactose and reduction sugar concentrations, pH and the sourness of date flavored yogurt drink as probiotic beverage. *J. Appl Food Technol.* **1**: 1-3.
- Hashim IB.** (2001). Characteristics and acceptance of yoghurt containing date palm products. In: Second international conference on date palms, Al-Ain, United Arab Emirates, p 842-849.
- Hermann T.** (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G.** (2005). Continuous culture-making a comeback? *Microbiol.* **151**: 3153–3159.
- Huchenq A., Marquet M., Welby M., Montrozier H., Goma G. et Lanéelle G.** (1984). Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol.* **135**: 53-67.
- Husseiny S.M., Helemish F.A., Younis N.A. et Farag S.S.** (2010). Selection of most potent *A. niger* isolates growing on different carbohydrate by-products for citric acid production. *J Am Sci.* **6**: 1222-1229.

- Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertes, A.A., et Yukawa, H.** (2004). Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 182-196.
- Ishida N., Saitoh S., Ohnishi T., Tokuhiko K., Nagamori E. et Kitamoto K.** (2006). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Biochem Biotechnol.* **131**: 795-807.
- Jamil, M.S., Nadeem R., Hanif M.A., Ali M.A. et Akhtar K.** (2010). Proximate composition and mineral profile of eight different unstudied date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties from Pakistan. *African J. of Biotechnol.* **9**: 3252-3259.
- Jensen J.V.K., Eberhardt D. et Wendisch V.F.** (2015). Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the glutamate-derived compounds ornithine, proline, putrescine, citrulline, and arginine. *J. Biotechnol.* **214**: 85–94.
- Jojima T., Noburyu R., Sasaki M., Tajima T., Suda M., Yukawa H. et Inui M.** (2015) Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**: 1165-1172.
- Jyothi, A.N., Sasikiran K., Nambisan B. et Balagopalan C.** (2005). Optimization of glutamic acid production from starch factory residue using *Brevibacterium divaricatum*. *Process Biochem.* **40**: 3576-3579.
- Kalogiannis S., Iakovidou G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A. et Skaracis G.N.** (2003). Optimization of xanthane gum production by *Xantomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochem.* **39**: 249-256.
- Khan J.A., Abulnaja K.O., Kumosani T.A. et Abou-Zaid A.A.** (1995). Utilization of Saudi date sugars in production of baker's yeast. *Bioresource Technol.* **53**: 63-66.
- Khan N. S., Singh R.P. et Prasad B.** (2013). Modeling the fermentative production of l-glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* in a batch bioreactor. *J. Engin Scien Technol.* **5**: 192-199.
- Khan T., Park J.K. et Kwon J.H.** (2007). Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean J Chem Eng.* **24**: 816-826.

- Khiyami M., Aboseide B. et Pometto A.** (2008). Influence of complex nutrient sources: dates syrup and dates pits on *Lactococcus lactis* growth and nisin production, *J Biotechnol.* S736.
- Khiyami M., Aboseide B. et Pometto A.** (2008). Influence of complex nutrient sources: dates syrup and dates pits on *Lactococcus lactis* growth and nisin production, *J Biotechnol.* S736.
- Khiyami M.A., Al-Fadual S.M. et Bahklia A.H.** (2011). Polyhydroxyalkanoates production via Bacillus plastic composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. *J. Med Plants Res.* **5**: 3312-3320.
- Khiyami M.A., Al-Fadual S.M. et Bahklia A.H.** (2011). Polyhydroxyalkanoates production via Bacillus plastic composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. *J. Med Plants Res.* **5**: 3312-3320.
- Kind S., Neubauer S., Becker J., Yamamoto M., Volkert M., Abendroth G., Zelder O. et Wittmann C.** (2014). From zero to hero-production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng.* **25**:113-123.
- Kinoshita S., Udaka S. et Shimono M.** (1957). Studies of amino acid fermentation, part I. Production of L- glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Krämer R.** (1994). Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75–94.
- Krinsky N.I.** (2001). Carotenoid antioxidants. *Nutr.* **17**: 815- 817.
- Kumar M. et Gayen K.** (2011). Developments in biobutanol production: New insights. *Appl Energy.* **88**: 1999- 2012.
- Kumar R., Vikramachakravarthi D., et Pal P.** (2014). Production and purification of glutamic acid: A critical reviewtowards process intensification. *Chemical Engineering and Processing.* **81**: 59-71.
- Lapujade P.** (2000). Étude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate : importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thèse, institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Lewis G. A., Mathieu D. et Phan-Tan-Luu R.** (1999). *Pharmaceutical Experimental Design*, Edition Marcel Dekker, New York, **1999**.

- Leyval D., Debay F., Engasser J.M. et Goergen J.L.** (1997). Flow cytometry for the intracellular pH measurement of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiological Methods*. **29**: 121–127.
- Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W. et 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., Klammer R. et Schleifer K.H.** (1989). Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 205-210.
- Lin C.Y. et Lay C.H.** (2004). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. **29**: 275–281.
- Liu B.L. et Tzeng Y.M.** (1998). Optimization of growth medium for production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess. Eng.* **18**: 413-418.
- Liu C.B., Li b Y., Pan F. et Shi Z.P.** (2011). Generalised additive modelling approach to the fermentation process of glutamate. *Bioresource Technol.* **102** : 4184-4190.
- Madigan M., et Martinko J.** (2007). Biologie des microorganismes. Paris: Pearson Education.
- Manickavasagan A., Mohamed Esa M. et Sukumar E.** (2012). Dates: production, processing, food and medicinal values. New York: CRC Process;
- Mehyar G.F., Delaimy K.S. et Ibrahim S.A.** (2005). Citric acid production by *Aspergillus niger* using date-based medium fortified with whey and additives. *Food Biotechnol.* **19**: 137-144.
- Moosavi-Nasab M. et Yousefi A.** (2011). Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste, *Iran J Biotechnol.* **9**: 94- 101.
- Moosavi-Nasab M., Shekaripour F. et Alipoor M.** (2009). Use of date syrup as agricultural waste for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Iran Agric Res.* **28**: 89- 97.
- Morbach S., Sahn H. et Eggeling L.** (1996). L-Isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: further flux increase and limitation of export. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 4345-4351.

- Morbach W. et Kramer R.** (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chem. Bio. Chem.* **3**: 384-397.
- Mori M. et Shiio I.** (1987). Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2671-2678.
- Mostafa Y.S. et Alamri S.A.** (2012). Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Saudi J Biol Sci*, **19**: 241-246.
- Mouffok A., Bedaida I.K., Nancib A., Nancib N., Goergen J.L. et Boudrant J.** (2012). Sequential optimization approach for enhanced production of glutamic acid from *Corynebacterium glutamicum* 2262 using date juice. *J. Biotechnol. Bioprocess Engineering.* **17**: 795-803.
- Munier P.** (1973). Le palmier dattier. Ed. Maison Neuve et La rose, Paris. pp 25-28-31-32, 221.
- Nampoothiri, K. M. et A. Pandey** (1999) Fermentation and recovery of L-glutamic acid from cassava starch hydrolysate by ion-exchange resin column. *Rev. Microbiol.* **3**: 258-264.
- Nampoothiri, K. M., Hoischen, C., Bath, B., Mockel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H. et 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 A. et Nancib N.** (2009). Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World J. Microbiol. Biotech.* **25**: 1423-1429.
- Nancib A., Nancib N., Meziane-Cherif D., Boubendir A., Fick M. et Boudrant J.** (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*, *Bioresource Technol.* **96**: 63-67.
- Nancib N., Ghoul M., Larous L., Nancib A., Adimi L., Remmal M. et Boudrant J.** (1999). Use of date products in production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*. *Biores. Technol.* **67**: 291-295.
- Nancib N., Nancib A. et Boudrant J.** (1997). Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.* **60**: 67-71.

- Nandakumar R., Yoshimune K., Wakayama M. et Moriguchi M.** (2003). Review: microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *J Mol Catal B: Enzymatic*. **23**: 87-100.
- Noui Y.** (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. *Mémoire de Magister, Option : Technologie Alimentaire, Université de Boumerdes*. 60.
- Panasuriya CR. et Singhal R.S.** (2010). Response surface methodology for optimisation of lovastatin production by solid state fermentation. *Brazilian J. Microbiol.* **41**: 164-72.
- Parodi P.W.** (1999). The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Aust J Dairy Tech.* **54**: 103–121.
- Perego P., Converti A. et Del Borgh M.** (2003). Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolysate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioressour. Technol.* **89**: 125-131.
- Pierre C.** (2005). Les plans d'expériences partie 1: Principes généraux, *Revue: Contrôles- Essais-Mesures*. 69-72.
- Pierre D.** (2008). Le plan d'expérience évolue, *Revue MODULAD*, N° 38.
- Plackett R.L. et Burman J.P.** (1946). The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*. **33**: 305–325.
- Qureshi N., Saha B.C., Dien B., Hector R.E. et Cotta M.A.** (2010b) Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part I- use of barley straw hydrolysate. *Biomass Bioenergy.*; **34**: 559-565.
- Qureshi N., Saha B.C., Hector R.E., Dien B., Hughes S.R. et Liu S.,** (2010a). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II e use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass Bioenergy.* **34**: 566-571.
- Qureshi N.** (2010c). Agricultural residues and energy crops as potentially economical and novel substrates for microbial production of butanol (a biofuel). *CAB Reviews.* **5**: 1-8.

- Radwan H., Alanazi F.K., Taha E.I., Dardir H.A. et Moussa I.M.** (2010). Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 using response surface methodology. *Afr J Biotechnol*, **9** : 5450-5459.
- Rivière J.** (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Edition Mason et Cie. Paris, pp 65-69.
- Rollin C., Morgant V. et Guyonvarch A.** (1995).  $C^{13}$  NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways. *Eur. J. Biochem. Sc.* **227**: 488-493.
- Ruchir C., Pansuriya Rekha S. et Singhal T.** (2010). Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. *Brazilian J. biotechnol.* **41**: 164-172.
- Ruebenhagen, R., Morbach, S. and Kraemer, R.** (2001). The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic  $K^+$  *EMBO J.* **20(19)**: 5412-5420.
- Salah R.B., Chaari K., Besbes S., Ktari N., Blecker C. et Deroanne C.** (2010). Optimization of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chem*, **12**: 627-633.
- Salah R.B., Chaari K., Besbes S., Ktari N., Blecker C. et Deroanne C.** (2011). Production of xanthan gum from *Xanthomanas Campestris* NRRL B-1459 by fermentation of date juice palm by-products (*Phoenix dactylifera* L.). *J Food Process Eng*, **34**: 457-474.
- Salah R.B., Jaouadi B., Bouaziz A., Chaari K., Blecker C. et Derrouane C.** (2011). Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466TM: purification, rheological and physicochemical characterization. *LWT-Food Sci Technol*, **44**: 1026-1034.
- Sato H., Orishimo K., Shirai T., Hirasawa T., Nagahisa K., Shimizu H. et Wachi M.** (2008). Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci Bioeng.* **106(1)**: 51-58.
- Sawada K., Wada M., Hagiwara T., Zen-in S., Imai K. et Yokota A.** (2015). Effect of pyruvate kinase gene deletion on the physiology of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 under biotin-sufficient non-glutamate-producing conditions: Enhanced biomass production. *Elsevier B.V. Metabol Eng Society.* **2**: 67-75.

- Scriban R.** (1999). *Biotechnologie*. 5<sup>ème</sup> édition. Paris: TEC et DOC, pp 261-303.
- Serge W. et Pierre M.** (2004). *Toute la biochimie*. Dunod, Paris. 160-234.
- Shah A. H., Abdul Hameed A. S et Madjid K. G.** (2002). Optimisation of culture conditions for L-Lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. Online, *J. Biological Sci.* **2(3)**: 151-156.
- Shi J., Ho C. et Shahidi F.** (2005). *Asian functional foods*. New York: CRC Press.
- Shiio I., Sugimoto S. et 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.
- Shimizu H. et Hirasawa T.** (2006). Production of glutamate and glutamate-related amino acids: molecular mechanism analysis and metabolic engineering. *Microb Monogr*, **5** : 1-38.
- Sokollek S.J., Hertel C. et Hammes W.P.** (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J Biotechnol*, **60**:195–206.
- Sonntag K.,Schwinde J., Graaf A.A., Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W. et Sahm H.** (1995). <sup>13</sup>C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbio. Biothechnol*, **44**: 489-495.
- Steffen N. L., Gerd M. S., Alexander H., Reinhard K. et Volker F. W.** (2011). Phosphotransferase System-Independent Glucose Utilization in *Corynebacterium glutamicum* by Inositol Permeases and Glucokinases. *Applied and Environmental Microbiology*. **77(11)**: 3571–3581.
- Sung H. C.,Tachild T., Kumagai H. et Tochikura T.** (1984). Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 371-376.
- Taguchi G. et Konishi S.** (1987). *Taguchi Methods, Orthogonal Arrays and Linear Graphics*, American Supplier Institute, Dearborn, USA.
- Takinami K., Yoshii H., Tsuru H. et 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.
- Tanaka T., Hoshima M., Tanabe S., Sakai K., Ohtsubo S. et Taniuchi M.** (2006). Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technol*, **97** : 211-217.

- Tavakkoli M., Hamidi-esfahani Z. et Hossein azizi M.** (2009). Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology. *Food Bioprocess Technol*, **10**: 7-9.
- Teramoto H., Inui M. et Yukawa H.** (2011). Transcriptional regulators of multiple genes involved in carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **154**: 114–125.
- Tesch M., Eikmanns. B.J., De Graaf A.A. et Sahn H.** (1998). Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and glutamate dehydrogenase-deficient mutant. *Biotechnol. Lett.* **20** : 953-957.
- Tinsson W.** (2010). Plans d'expérience : constructions et analyse statistiques. *Springer.* **67** : 151-194, 532.
- Touzi A.** (1997). Valorisation des produits et sous-produits de la datte par les procédés biotechnologiques. Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la datte", CIHEAM - Options Méditerranéennes. 214.
- Touzi A.** (2005). Production de substances à forte valeur ajoutée à partir des produits de la palmeraie algérienne. Journées d'étude sur la transformation des produits du palmier dattier, Biskra, les 6 et 7 décembre, 6-7.
- Toyoda K. et Inui M.** (2016). Regulons of global transcription factors in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **100**: 45-60.
- Troost M.M., Sternberg C.N. et De Wit R.** (2009). Management of good risk germ-cell tumours. *British J Urol Int.* **104**: 1387-1391.
- Ulrich M.** (2013). Valorisation des dattes non comestibles en Algérie, coopération allemande
- Viswanathan P. et Surlikar N.P** (2001). Production of  $\alpha$ -amylase with *Aspergillus flavus* on amaranthus grains grains by solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol*, **41** (1): 57-64.
- Wachi M.** (2013). Amino Acid Exporters in *Corynebacterium glutamicum*, biology and biotechnology. Ed. *Munster: springer.* **23**: 336-346.

- Wada M., Sawada K., Ogura K., Shimono Y., Hagiwara T., Sugimoto M., Onuki A., et Yokota A.** (2015). Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *J. Biosci Bioengine.* **121**(2): 172-177.
- Wendisch V.F.** (2014). Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. *Curr Opin Biotechnol.* **30**: 51-58.
- Wendisch V.F., Bott M. et Eikmanns B.J.** (2006). Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Current Opinion in Microbiology.* **9**: 268–274.
- West T.P.** (2009). Elevated curdlan production by a mutant of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. *J Basic Microbiol.* **49**: 589-592.
- Weuster-Botz D.** (2000). Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? *J. Biosci. Bioeng.* **90**(5): 473-483.
- Wieschalka S., Blombach B. et Eikmanns B.J.** (2012). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl Microbiol Biotechnol.* **11**: 3843-9.
- Wijayarathna C.D., Wachi M. et Nagai K.** (2001). Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycane synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 466-470.
- Wittmann C.** (2010). Analysis and Engineering of Metabolic Pathway Fluxes in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv. Biochem. Engin.* **10**(58): 21-49.
- Xu R., Shimin M., Yang W., Lisha L. et Pinglan L.** (2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research* Vol. **4** (9): 783-795.
- Yadav A.K., Bipinraj N.K., Chaudhari A.B. et Kothari R.M.** (2011). Production of L(+)lactic acid from sweet sorghum, date palm, and golden syrup as alternative carbon sources, *Starch*, **63**: 632-636.
- Yadav A.K., Chaudhari A.B. et Kothari R.M.** (2009). Enhanced viability of *Bacillus coagulans* after spray drying with calcium lactate, storage and re-hydration. *Indian J Chem Tech*, **16**: 519-522.

**Yao H.M., Tian Y.C., Tade´ M.O. et Ang H.M.** (2001). Variations and modelling of oxygen demand in amino acid production. *Chemic Engin Proces.* **40**: 401-409.

**Yasueda H.**, (2014). Overproduction of l-Glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. Springer, Japan, 165-175.

**Yugandhar N. M., Ravi Kumar D.V. R., Prasanthi V., Kiran Kumar N., Sri Rami Reddy D.** (2008). Optimization of Pectinase Production from *Manihot utilissima* by *Aspergillus niger* NCIM 548 Using Statistical Experimental Design. *J. Microbiol.* **3**: 9-16.

**Zamani J and Roostaazad R.** (2001). An efficient strategy to overproduce glutamic acid in *Corynebacterium glutamicum* fermentation. *Scientia Iranica.* **8(3)**: 203-206.

**Zhang H. et Nishinari K.** (2009). Characterization of the conformation and comparison of shear and extensional properties of curdlan in DMSO. *Food Hydrocolloids*, **23**: 1570-1571.

**Zhao Y. et Lin Y.H.** (2001). The effect of growth rate on the recovery of amino acids. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1043-1046.

**Zhao Y. et Lin Y.H.** (2002). Flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* growth at different specific growth rates. *Process Biotechnol.* **176**: 6892-6899.