

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

جامعة فرحات عباس سطيف

UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

Département de Microbiologie

En vue d'obtenir le Diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Microbiologie

Option : Génie microbiologique

Par :

BEDAIDA IBTISSAM KAHINA

THEME

Optimisation séquentielle de production du glutamate à partir de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de datte : utilisation de deux modèles statistiques (Plackett-Burman et Box-Behnken)

Soutenu le

Devant le jury :

Président :	Professeur H. DABA	Prof	Université de Sétif
Rapporteur :	Professeur N. NANCIB	Prof	Université de Sétif
Examineurs :	Professeur M. Kacem	Prof	Université d'Oran
	Maitre de conférences (A) S. Habi	M.C	Université de Setif

Avant – Propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Génie fermentaire » groupe du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Sétif.

J'adresse mes plus vifs remerciements à DIEU tout puissant qui m'a donné la volonté, la force et la foi pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier toute l'équipe de Microbiologie de m'avoir accueilli dans ce laboratoire et pour tous les efforts qu'ils ont déployés afin d'assurer de meilleures conditions de travail aussi bien scientifiques que matériels, grâce à leur bonne humeur et à leur qualité d'écoute.

J'exprime mes plus vifs remerciements, ma profonde gratitude et mon respect au Pr. Nabil NANCIB. Votre professionnalisme, votre imagination pour la préparation des différentes phases de ce mémoire pas seulement par ce que vous avez pris en charge les très nombreux problèmes mais que dans la majorité des cas, vous avez su les corriger avec conscience et compréhension.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Pr. Hocine DABA d'avoir accepté d'être président de ce jury.

Je remercie Messieurs Pr. Mourad KACEM et Mc. Salah HABI, d'avoir bien voulu me faire le grand honneur de juger ce travail.

A Mr A. Mouffok Maître assistant à l'université Ferhat Abbas, j'exprime ma profonde gratitude pour sa spontanéité, sa disponibilité lors de la réalisation de ce travail, tout ce qu'il a fait pour me faciliter l'avancement de mon travail.

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

Ces remerciements seraient incomplets si j'oubliais ma famille que je remercie toute entière. Je ne peux pas citer tout le monde mais j'ai une pensée plus particulière. Je remercie mes parents et mes sœurs pour leur soutien sans faille et leur affection. C'est difficile de transcrire en quelques mots tout l'amour que je leur porte.

Je remercie également mon mari Adel qui a non seulement su s'en accommoder avec patience et se montrer solidaire, attentif et encourageant à la fois.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I.1. Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région Fliache (Biskra).....	22
Tableau I.2. Teneur en sucres des dattes provenant de différentes régions.....	23
Tableau I.3. Composition moyenne en acides aminés de la datte sèche.....	24
Tableau I.4. Composition minérale de quelques variétés de datte molles algériennes de la partie comestible.....	25
Tableau I.5. Composition vitaminique moyenne de la datte sèche.....	25
Tableau II.1. Caractéristiques générales de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	37
Tableau II.2. Composition du milieu MCGC (Milieu de <i>Corynebacterium Glutamicum</i> enrichi en Citrate) en erlenmeyer.....	38
Tableau II.3. Les éléments nutritionnels utilisés dans le modèle de Plackett-Burman ainsi que leurs concentrations.....	46
Tableau II.4. Les niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs physiques.....	48
Tableau III.1. Le modèle expérimental du Plackett-Burman évaluant les facteurs qui influencent la production d'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	52
Tableau III.2. Analyse statistique des résultats obtenus à partir du modèle Plackett-Burman.....	53
Tableau III.3. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 des vingt expériences du modèle Plackett-Burman en culture discontinue.....	56
Tableau III.4. Tableau représentatif de l'analyse des résultats obtenus suite à l'application du modèle Plackett-Burman.....	58
Tableau III.5. Les niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs nutritionnels.....	61
Tableau III.6. Les éléments nutritionnels utilisés par le modèle de Box-Behnken ainsi que leurs concentrations.....	61

Tableau III.7. Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet des différentes concentrations du jus de date, urée, peptone et bétaine sur la production d'acide glutamique.....	62
Tableau III.8. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken	63
Tableau III.9. Le milieu nutritionnel optimal de production d'acide glutamique par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	66
Tableau III.10. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 des 27 expériences du modèle Box-Behnken en culture discontinue.....	67
Tableau III.11. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue.....	69
Tableau III.12. Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet d'agitation, pH et taux d'inoculum sur la production d'acide glutamique.....	72
Tableau III.13. Coefficients de régression du modèle quadratique et leurs significations.....	73
Tableau III.14. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 des 27 expériences du modèle Box-Behnken en culture discontinue.....	74
Tableau III.15. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue.....	76

INDEX DES FIGURES

Figure I.1. Les mécanismes moléculaires de la surproduction de glutamate par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
Figure I.2. Entrée des sucres chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	9
Figure I.3. La glycolyse chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
Figure I.4. Schéma métabolique simplifié de la voie des pentoses phosphates chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	12
Figure I.5. Voies de biosynthèse du glutamate.....	14
Figure I.6. Schéma de la paroi de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	15
Figure I.7. Formation et maturation de la datte.....	19
Figure I.8. Schéma du processus boîte noire.....	29
Figure I.9. a,b (a) : Surface plot, (b) : Contour plot d'une réponse.....	34
Figure II.1. Propagation de la souche (<i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262).....	40
Figure II.2. Photo représentative de l'incubateur	41
Figure III.1. Effet des différents facteurs nutritionnels sur la production du glutamate (g.l^{-1}) par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262.....	54
Figure III.2. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Plackett-Burman en culture discontinue.....	57
Figure III.3 a,b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la production de glutamate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 montrant l'interaction entre l'urée et le jus de datte.....	64
Figure III.4. a,b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la production de glutamate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 montrant l'interaction entre l'urée et la peptone.....	65
Figure III.5. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue.....	68
Figure III.6. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sous les conditions de cultures physiques optimisées par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue.....	75

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I : Etude bibliographique

I.1. ACIDE GLUTAMIQUE.....	4
I.1.1. Fermentation glutamique.....	4
I.1.1.1. Historique de la production de glutamate... ..	4
I.1.1.1.1. Présentation de la molécule.....	4
I.1.1.1.2. Principaux producteurs.....	4
I.1.1.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour la production de glutamate.....	4
I.1.1.1.4. Utilisation du glutamate.....	5
I.1.1.2. Procédés de production d'acide glutamique	5
A. Limitation en biotine.....	5
B. Ajout de la pénicilline.....	6
C. Ajout de tensioactif.....	6
D. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides.....	7
E. Choc de température.....	7
I.1.1.3. Paramètres physiques de la fermentation glutamique.....	8
A. Température.....	8
B. pH	8
C. Oxygène.....	8
I.1.2. Métabolisme central des corynébactéries.....	9
I.1.2.1. Entrée des sucres.....	9
I.1.2.2. La glycolyse	10
I.1.2.3. Voies des pentoses phosphates.....	12
I.1.2.4. Le cycle d'acide tricarboxylique (CAT)	12

I.1.2.5. Voies anaplérotiques chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	13
I.1.2.6. Voie de biosynthèse du glutamate.....	13
I.1.3. Modification de l'enveloppe cellulaire et excrétion de glutamate.....	14
I.1.3.1. Membrane de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	14
I.1.3.2. Excrétion du glutamate.....	15
I.1.3.2.1. Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate.....	15
I.1.3.2.2. Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate.....	15
I.1.3.2.3. Énergie cellulaire.....	16
I.1.3.2.4. Composition de la membrane plasmique.....	16
I.1.3.2.5. Réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane.....	17
I.2. LE PALMIER DATTIER.....	18
I.2.1. Classification du palmier dattier.....	18
I.2.2. Morphologie	18
I.2.3. Répartition des palmiers dattiers	18
I.3. LA DATTE.....	19
I.3.1. Définition.....	19
I.3.2. Développement.....	19
I.3.3. Les déchets de dattes.....	21
I.3.4. Composition de la datte	22
I.3.4.1. Teneur en eau	22
I.3.4.2. Sucres.....	22
I.3.4.3. Les acides aminés	23
I.3.4.4. Les éléments minéraux	24
I.3.4.5. Vitamines	25
I.3.4.6. Fibres brutes.....	26
I.3.5. Valorisation de la datte.....	26
I.3.5.1. Valorisation directe.....	26

• Pâte de dattes	26
• Farine de dattes	26
• Sirop de dattes.....	26
• Jus de dattes.....	27
I.3.5.2. Valorisation indirecte.....	27
• Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires).....	27
• Production d'oxytétracycline.....	27
• Production d'acide citrique.....	28
• Production d'alcool.....	28
• Production de vitamine B ₁₂	28
I.4. MODELE EXPERIMENTALE.....	29
I.4.1. Définition	29
I.4.2. Stratégie de test	30
I.4.2.1. Définition des facteurs à tester	30
I.4.2.2. Sélection du modèle expérimental	30
I.4.2.2.1. Modèle conventionnel.....	31
I.4.2.2.2. Modèle factoriel	31
• Modèle factoriel complet	31
• Modèle factoriel fractionnaire	32
A. Modèle Taguchi	32
B. Modèle Plackett-Burman	32
C. Modèle de Box-Behnken et de composite centrale	33
 CHAPITRE II : Matériels et méthodes	
II.1. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES.....	35
II.1.1. Appareils	35
II.1.2. Produits chimiques	35
II.1.3. Réactifs	36
 II.2. MICRO-ORGANISME UTILISE	36

II.2.1. Caractéristiques de la souche <i>Corynebacterium glutamicum</i>	36
II.3. MILIEUX DE CULTURES	37
II.3.1. Milieu de préculture	37
II.3.2. Milieu de production	38
II.3.2.1. Préparation de l'extrait du jus de datte	39
II.3.3. Stérilisation	39
II.4. PROCEDE DE CULTURE	39
II.4.1. Conservation de la souche	39
II.4.2. Propagation de la souche	39
II.4.3. Culture en Erlenmeyer	40
II.4.4. Protocole des fermentations discontinues	40
II.5. METHODES D'ANALYSES	41
II.5.1. Prélèvement et traitement des échantillons	41
II.5.2. Estimation de la biomasse	42
II.5.3. Dosage du glutamate	42
II.5.4. Dosage du lactate	42
II.5.5. Dosage du saccharose / D- glucose / D-fructose	43
II.6. EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES	44
II.6.1. Calcul des paramètres cinétiques en réacteur discontinu	44
II.6.1.1. Vitesses de réaction	44
II.6.1.2. Vitesses spécifiques	44
II.6.1.3. Productivité volumétrique	45
II.6.1.4. Evaluation de la vitesse spécifique maximale de croissance	45
II.7. MODELES UTILISES	46

II.7.1. Le modèle de Plackett-Burman	45
II.7.2. Le modèle de Box-Behnken	47

CHAPITRE III : Résultats et discussions

III.1. Evaluation de l'effet des différents facteurs nutritionnels sur la production de glutamate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 en utilisant le modèle statistique Plackett-Burman	49
--	-----------

III.1.1. Évaluation des facteurs qui affectent la production du glutamate	50
---	----

III.1.1.2. Étude de l'effet des différents paramètres nutritionnels sur la croissance et la production d'acide glutamique	55
---	----

III.2. Mise au point et optimisation d'un milieu de culture à base de jus de dattes par le modèle de Box-Behnken	59
---	-----------

III.2.1. Optimisation des conditions de culture par le modèle de Box-Behnken	60
--	----

III.2.2. Validation du modèle	66
-------------------------------------	----

III.2.3. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken	67
--	----

III.3. Mise au point et optimisation des paramètres physiques.....	70
---	-----------

III.3.1. Optimisation des paramètres physiques	71
--	----

III.3.2. Validation du modèle	73
-------------------------------------	----

III.3.3. Cinétique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken	74
--	----

Conclusion générale	77
----------------------------------	-----------

INTRODUCTION

La palmeraie algérienne, qui représente le pivot de l'écosystème oasien à travers l'importance de sa production, génère des quantités importantes de déchets. En effet, selon les statistiques du Ministère de l'agriculture, la production nationale a atteint 387 313 tonnes en 1998 dont 30 à 50 % sont constitués de déchets de dattes.

Ces déchets de dattes sont très riches en sucres allant de 60 à 80% du poids de la pulpe fraîche (Siboukeur, 1997), une teneur en eau qui varie entre 15 et 20% selon les variétés (Noui, 2007). Elles sont en revanche pauvres en protéines et en matières grasses (0,43 et 1,9% du poids frais) (Djouab, 2007). Le fruit des dattes contient pratiquement la plupart des éléments minéraux (potassium, calcium, phosphore, magnésium, fer, soufre etc.). Il est riche en fibres (8,1 à 12,7% du poids sec) (Al-Shahib et Marshall, 2002).

Afin de leur trouver un débouché plus rémunérateur, il est nécessaire de les valoriser pour la production des substances à fortes valeurs ajoutées. En effet, plusieurs produits ont été obtenus à partir de ces déchets tel que l'acide citrique (Roukas et Kotzekidou, 1991) l'alcool (Mehaia et Cheryan, 1991) oxytétracycline (Abou-Zeid et *al.*, 1993) la biomasse tel que les levures (Nancib et *al.*, 1997, 1999; Khan et *al.*, 1995; Kamel, 1979) et l'acide lactique (Nancib et *al.*, 2009). glutamique; l'acide aminé le plus produit dans le monde, sa production mondiale a fortement augmenté pour atteindre aujourd'hui une production annuelle dépassant un million (1.500.000) de tonnes (Shimizu et Hirasawa, 2006). Il est utilisé dans de nombreuses industries (pharmaceutiques, chimiques, cosmétiques) mais son utilisation principale est l'alimentation humaine. Il est employé comme exhausteur de goût dans de nombreux aliments déshydratés (soupes, bouillons...) qui ont perdu leurs saveurs lors de leurs fabrications. Il est particulièrement utilisé en Asie comme condiment au même titre que le sel de table en Europe. L'acide glutamique est produit par fermentation. Les principaux producteurs mondiaux sont asiatiques. En Europe, le leader est incontestablement la société ORSAN dont la part sur le marché mondial est d'environ 10%.

Dans chaque processus de fermentation, l'optimisation des paramètres physiques et chimiques est d'une grande importance due à son impact économique. Le développement d'un milieu économique nécessite une bonne sélection des conditions nutritionnelles et physiques. Cependant, l'optimisation de ces conditions de fermentation peut être réalisée par des techniques conventionnelles ou statistiques. Les techniques conventionnelles impliquent le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables; elles sont longues et incapables de déterminer le point optimale due aux interactions entre les différents facteurs

Introduction

(Weuster-Botz, 2000; Liu et Tzeng, 1998). Alors que, les techniques statistiques offrent plusieurs avantages, elles sont rapides, fiables et permettent de réduire le nombre des expériences. Ces techniques statistiques ont été utilisées dans l'optimisation de nombreux processus de fermentation : pour les cultures bactériennes (Ahuja et *al.*, 2004; Weuster-Botz, 2000), les cellules animales (Ganne et Mignot, 1991) et pour les cultures des champignons (Djekrif-Dakhmouche et *al.*, 2006; Viswanathan et Surlikar, 2001).

Notre travail s'insère dans cette préoccupation et porte sur la stratégie d'optimisation séquentielle de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant le jus de datte comme milieu de base. La composition des constituants ayant un effet positif est définie en utilisant le modèle statistique Plackett-Burman. Par la suite, les concentrations optimales de ces éléments sont obtenues en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Enfin, les valeurs des paramètres physiques (agitation, pH et taux d'inoculum) ont été également sélectionnées en utilisant le modèle statistique Box-Behnken.

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

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

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

- La première partie est consacrée à l'utilisation du modèle statistique Plackett-Burman afin d'étudier les besoins nutritionnels de *Corynebacterium glutamicum* 2262. Elle a pour but de décrire les effets de la source carbonée, les sources azotées, les sels minéraux et les vitamines sur la croissance et la production d'acide glutamique. Cependant, ce modèle ne permet pas l'étude des interactions présentes entre les différents éléments testés.

- Dans la deuxième partie, après avoir révélé les principaux facteurs nutritionnels qui ont un effet positif sur la production d'acide glutamique, nous nous sommes intéressés à appliquer un deuxième modèle statistique appelé le modèle de Box-Behnken. Ceci nous

Introduction

permettra de déterminer les points optimaux des facteurs critiques et l'étude des différentes interactions possibles entre les différents constituants du milieu.

- Dans la troisième partie, après avoir optimiser le milieu nutritionnel de production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant les modèles statistiques Plackett-Burman et Box-Behnken, il était nécessaire aussi d'optimiser les facteurs physiques en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Ceci nous permettra de déterminer les différentes interactions possibles entre les facteurs physiques et de déterminer leurs valeurs optimales.

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

CHAPITRE I.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. ACIDE GLUTAMIQUE

I.1.1. Fermentation glutamique

I.1.1.1. Historique de la production de glutamate

Kikunae Ikeda (1908) a montré que les propriétés gustatives des algues étaient dues à leurs fortes teneurs en glutamate de sodium. Cette découverte était à l'origine de la fabrication de ce produit par extraction de protéines végétales. Dès le début du siècle et juste après la découverte par Kinoshita (1957), la production du glutamate monosodique par fermentation a commencée en utilisant le *Micrococcus glutamicus* qui s'est ensuite appelé *Corynebacterium glutamicum* (Kumagai, 2000).

I.1.1.1.1. Présentation de la molécule

Le glutamate monosodique a l'apparence dans sa forme pure, d'une poudre blanche et cristalline. Le glutamate monosodique est l'un des sels de l'acide glutamique, un acide aminé naturel. Quand il est dissous dans l'eau, ou dans la salive, il se décompose rapidement en ion sodium et ion glutamate (le glutamate est la forme anionique de l'acide glutamique).

I.1.1.1.2. Principaux producteurs

Les principales sociétés productrices de glutamate sont les sociétés japonaises Miwon, Kyowa-Hakko et Cheil-Jedang (Hermann, 2003), la société coréenne Cheiljedang, la société américaine Stauffer Chemical et la société franco-belge ORSAN-Amylum (Burkovski et Kršmer, 2002; Eggeling et Sahn, 1999; Crueger et Crueger, 1984). Cette dernière représente environ 10% de la production mondiale annuelle d'environ un million de tonnes.

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

Les Corynébactéries sont classées dans l'ordre des Actinomycétales. Les souches de corynébactéries utilisées industriellement sont généralement isolées du sol. Ce sont des Gram positive (Stackebrandt et *al.*, 1997) à morphologie irrégulière (corynéforme). Elles sont auxotrophes pour la biotine, aérobies, mésophiles puisque la température maximale de croissance se situe vers 35°C. Ces souches sont capables d'utiliser de nombreux substrats carbonés, dont le lactate, l'acétate, le méthanol, le glucose, le fructose et le saccharose. Les souches industrielles présentent une faible activité α -cétoglutarate déshydrogénase mais présentent une activité glutamate déshydrogénase importante (Kinoshita et Nakayama, 1978). Les souches industrielles utilisées sont les suivantes : *Corynebacterium glutamicum*,

Brevibacterium flavum, *Brevibacterium lactofermentum* et *Brevibacterium divaricatum*. Aucune de ces souches n'est un vrai membre du genre *Brevibacterium*. Plusieurs études indiquent leurs étroites relations si ce n'est pas leurs homologies avec *Corynebacterium glutamicum* (Liebl et al., 1991; Suzuki et al., 1981; Minnikin et al., 1978; Abe et al., 1967). En effet, les souches *Brevibacterium divaricatum* et *Corynebacterium lilium* et certaines souches représentatives du *Brevibacterium flavum* et *Brevibacterium lactofermentum* ont été transférées au *Corynebacterium glutamicum* (Wolfgang, 2006; Liebl et al., 1991).

I.1.1.1.4. Utilisation du glutamate

Environ 1,5 million de tonnes d'acide glutamique sont produites annuellement en utilisant les corynébactéries (Shimizu et Hirasawa, 2006). La forme monosodique du glutamate est principalement utilisée comme additif alimentaire. Le glutamate utilisé aussi comme exhausteur de goût et est considéré par les japonais comme étant à l'origine d'un 5^{ème} goût : le goût UMAMI. Au Japon, les aliments préparés contiennent de 0,1 à 0,8% de glutamate monosodique. L'acide glutamique est également utilisé en beaucoup plus faible quantité par les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Hermann, 2003).

I.1.1.2. Procédés de production d'acide glutamique

Après l'identification du *Corynebacterium glutamicum* comme bactérie productrice de glutamate (Udaka, 1960; Kinoshita et al., 1957), plusieurs études se sont intéressées à l'étude du mécanisme de production et de sécrétion de glutamate.

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

A. Limitation en biotine

Il a été démontré que la capacité d'excréter l'acide glutamique est liée au besoin des souches en biotine (Shiio et al., 1962). En effet, l'activité spécifique du complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase (ODHC) décroît sous des conditions limitantes en biotine ce qui conduit à une surproduction de glutamate (Shimizu et al., 2003). En plus, la limitation en biotine conduit à une décroissance de la concentration cellulaire de la sous unité DtsR1 de l'acétyl-CoA carboxylase (AccBC) (Figure I.1) ce qui réduit l'activité du complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase conduisant à une surproduction de glutamate (Kimura, 2002). La biotine est capable de dévier le flux de carbone de l'acétyl-CoA vers soit la biosynthèse de glutamate ou

bien la biosynthèse des acides gras (Jo *et al.*, 2009). La limitation en biotine provoque une diminution de 53% du contenu totale des phospholipides (Hoischen et Krämer, 1989).

B. Ajout de la pénicilline

Le site d'action de la pénicilline est localisé au niveau de la couche des acides mycoliques (Figure I.1). Cependant, l'ajout de la pénicilline ne modifie ni la teneur en acides gras ni la teneur en phospholipides membranaires, mais permet de produire du glutamate (Shibukawa *et al.*, 1968). En effet, elle influe sur la structure du peptidoglycane empêchant l'empilement des acides mycoliques dans la molécule de mycolyl-arabino-galactan-peptidoglycane. Par conséquent, un affaiblissement du peptidoglycane se produit. Lorsqu'un mutant auxotrophe au D-alanine est transféré dans un milieu qui contient une concentration limitée en alanine, une accumulation en glutamate a été observée. Cela apporte la preuve moléculaire que la structure de la couche des acides mycoliques est influencée par la macromolécule mycolyl-arabino-galactane-peptidoglycane (Hirasawa *et al.*, 2000). Kimura *et al.* (1999) ont montré que l'addition de pénicilline conduit à l'accumulation d'environ un tiers de glutamate par rapport à celui produit par limitation en biotine.

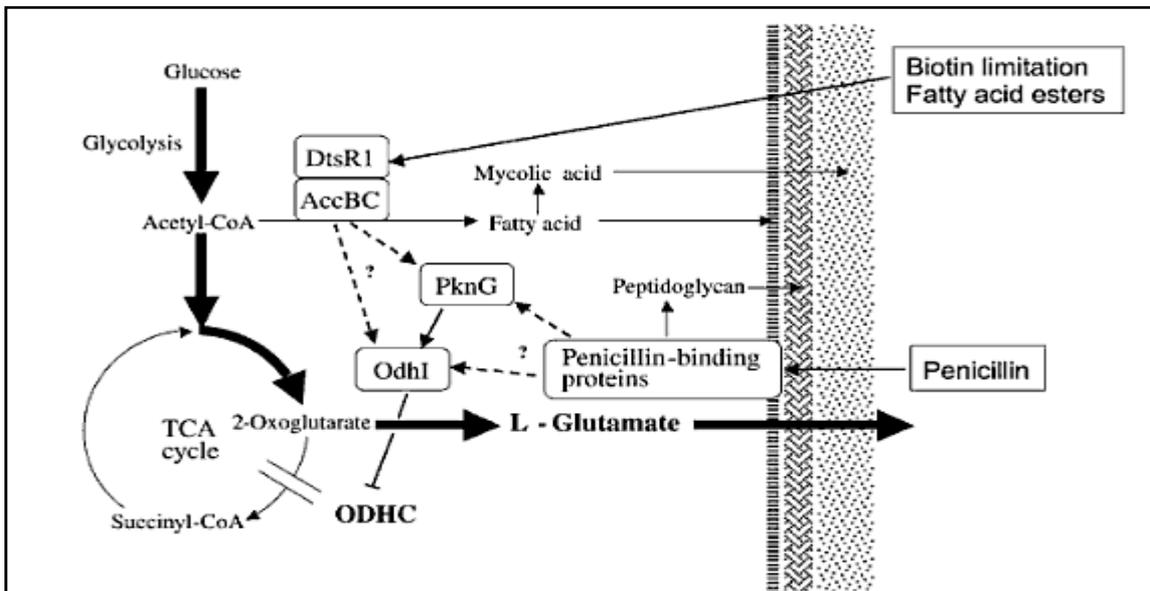


Figure I.1. Les mécanismes moléculaires de la surproduction de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* (Volker, 2007).

C. Ajout de tensioactifs

Dans un milieu riche en biotine, l'ajout des tensioactifs comme les acides gras saturés et les dérivés d'acides gras saturés permet d'excréter le glutamate (Duperray *et al.*, 1992; Takinami *et al.*, 1968; Takinami *et al.*, 1965). En effet, une diminution des phospholipides

cellulaires d'environ 50% et l'augmentation du rapport acides gras saturés/insaturés ont été observées suite à l'ajout de tensioactif (Huchenq et *al.*, 1984). Il a été montré que l'ajout de tensioactif réprime l'expression d'un gène *dtsR* codant pour une protéine qui peut être une sous-unité du complexe participant à la synthèse des acides gras, ce qui provoque par la suite la modification de la synthèse des phospholipides (Kimura et *al.*, 1996).

Marquet et *al.* (1986) ont montré que l'utilisation de la mélasse de betterave dans le milieu de culture couplé par l'ajout de la polyéthyléneglycol stéarate, polyéthyléneglycol palmitate, ou laurylamine permet d'obtenir un titre de glutamate entre 80 et 100 g/l. Une production de 80 g/l de glutamate a également été atteinte en utilisant du poly-oxyéthylène-sorbitane mono palmitate comme tensioactif et en augmentant la température de culture de 34 à 39°C (Goergen et *al.*, 1997).

D. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides

Nampoothiri et *al.* (2002) ont étudié l'effet de la surexpression ou de la délétion des gènes liés à la biosynthèse des acides gras ou des lipides sur la surproduction du glutamate par *Corynebacterium glutamicum*. Le changement de l'expression de ces gènes entraîne des altérations sévères non seulement dans la composition des phospholipides et de la température de croissance mais aussi dans l'excrétion de glutamate.

Kimura et *al.* (1999) ont montré que l'inhibition totale de l'expression du gène *dtsR*, codant probablement une sous-unité du complexe responsable de la synthèse des acides gras, permet de produire du glutamate. Les traitements manipulant la synthèse des acides gras, agissent sur la composition en acide gras de la membrane plasmique et sont capables d'altérer la composition de la couche mycolique puisque les acides gras sont nécessaires pour la synthèse des mycolates. Cette hypothèse a été supporté par l'inactivation des deux acides gras synthase FAS-IA et FAS-IB chez *Corynebacterium glutamicum*. Les mutants *fasA* et *fasB* excrètent le glutamate sans traitement spécial, ces mutants montrent une membrane plasmique altérée et une quantité réduite en acides mycoliques (Radmacher et *al.*, 2005).

E. Choc de température

L'analyse de la composition lipidique de la membrane cellulaire à indiqué que le degré de la fluidité dépend de la composition en lipide et de la température. Un choc de température entraîne une modification de la composition de la membrane chez *Corynebacterium glutamicum* par activation de la biosynthèse des acides gras saturés et inactivation de la biosynthèse des acides gras insaturés (Gourdon, 1999; Stuible et *al.*, 1997; Stuible et *al.*,

1996; Kawaguchi et *al.*, 1979). La production d'acide glutamique par *Brevibacterium sp.* a été induite par un choc thermique allant (39°C).

I.1.1.3. Paramètres physiques de la fermentation glutamique

A. Température

La température peut être modifiée selon les exigences de l'organisme. Son augmentation est utilisée afin d'induire la production d'acide glutamique chez certaines souches (Delaunay et *al.*, 2002; Goudron et Lindley, 1999). La plupart des manuels mentionnent 30-34°C comme température optimale pour la culture des bactéries corynéformes. Par ailleurs, l'augmentation de la température à 39°C pendant la phase de production de glutamate permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et de maintenir l'excrétion d'acide glutamique (Delaunay et *al.*, 2002; Goergen et *al.*, 1997).

B. pH

La croissance est généralement très sensible aux variations de pH. En effet, la croissance provoque un changement du pH du milieu. Broer et *al.* (1993) ont montré que le pH optimum qui assure une vélocité maximale de transport de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* est de 7,4 à 7,8 (Shah et *al.*, 2002).

C. Oxygène

L'oxygène représente un élément essentiel pour la production d'acide glutamique par le *Corynebacterium glutamicum*. En effet, sous des conditions insuffisantes en oxygène, une quantité importante de lactate, de pyruvate et de succinate sont accumulés (Çalik et *al.*, 2001; Dominguez et *al.*, 1993). Par contre, en présence d'excès d'oxygène le métabolisme sera orienté vers la production de l' α -cétoglutarate (Çalik et *al.*, 2001; Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978). Pour cela, plusieurs études ont été consacrées à l'étude de l'effet de l'oxygène sur la production de glutamate. Tavakkoli et *al.* (2009) ont montré que le contrôle du débit d'air à son optimum est essentiel pour une production maximale de glutamate.

I.1.2. Métabolisme central des corynébactéries

I.1.2.1. Entrée des sucres

Plusieurs études réalisées sur *Corynebacterium glutamicum* ont montré que le système de transport phosphotransférase (PTS) (Figure I.2) est l'unique système de transport de glucose (Marx et al., 1997; Muriel et al., 1996; Vallino et Stephanopoulos, 1993). Cependant, avec des taux de croissance élevés, le taux d'activité de PTS est inférieur au taux de consommation du glucose. En plus, des quantités appréciables de glucose sont accumulées dans le milieu. Ces évidences ont été interprétées comme indicatrices de la présence d'un autre système de transport de glucose qui pourrait être une perméase (Figure I.2). En effet, la contribution d'une perméase avec le système phosphotransférase peut avoir une conséquence importante sur la distribution du flux au niveau PEP dont le taux limite la production des acides aminés synthétisés à partir des intermédiaires du cycle tricarboxylique (TCA).

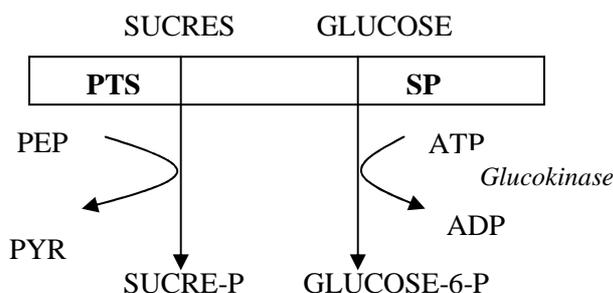


Figure I.2. Entrée des sucres chez *Corynebacterium glutamicum* (Mori et Shiio, 1987). (PEP) : Phosphoénolpyruvate; (PYR) : Pyruvate.

Il existe plusieurs types de phosphotransférase de sucres chez *Corynebacterium glutamicum* :

- Une PTS saccharose, pour laquelle le saccharose est transporté via une phosphoenolpyruvate (PEP)-saccharose dépendante phosphotransférase (PTS^{suc}). Chez la plupart des espèces ce type de transport est généralement couplé par la libération du fructose et du glucose-6-phosphate par l'intermédiaire d'une invertase, cependant il a été montré que le fructose est ensuite phosphorylé via une PEP-fructose dépendante PTS (PTS^{fruc}) (Dominguez et Lindley, 1996).
- Une PTS mannose (PTS^{man}) qui présente une forte affinité pour le glucose qui phosphoryle le sucre transporté conduisant à l'hexose 6-phosphate.
- Une PTS Fructose (PTS^{fruc}) avec une faible affinité pour le glucose (Mori et Shiio, 1987), une proportion significative de l'activité du PTS^{fruc} peut être attribuée au PTS^{man} qui possède une certaine capacité de transport du fructose (Dominguez et al., 1998).

I.1.2.2. La glycolyse

La plupart des activités impliquées dans la glycolyse (Figure I.3) n'ont pas été caractérisées chez *Corynebacterium glutamicum*. Cependant, à partir de l'analyse du génome, les gènes codant les différentes enzymes sont présents (Kalinowski et al., 2003). De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer la répartition du flux carboné entre la voie de la glycolyse et la voie des hexoses monophosphates pendant la croissance et la production de glutamate. Pendant la croissance des corynébactéries, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse est d'environ 50%, le reste passe par la voie des hexoses monophosphates (Wendisch et al., 2000; Gourdon, 1999; Dominguez et al., 1998; Rollin et al., 1995). Cependant, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse augmente rapidement lorsque les cellules sont en phase de production de glutamate (Gourdon, 1999; Sonntag et al., 1995). Cette modification peut être expliquée par la diminution du besoin en NADPH, érythrose-4-phosphate et ribose-5-phosphate nécessaire pour la synthèse des acides aminés aromatiques et des nucléotides, conséquence d'une croissance ralentie pendant la phase de production de glutamate. En revanche, une proportion élevée du flux carboné est dirigée vers la voie d'hexose monophosphate pendant la production de lysine, car la synthèse de la lysine nécessite également une quantité importante de NADPH.

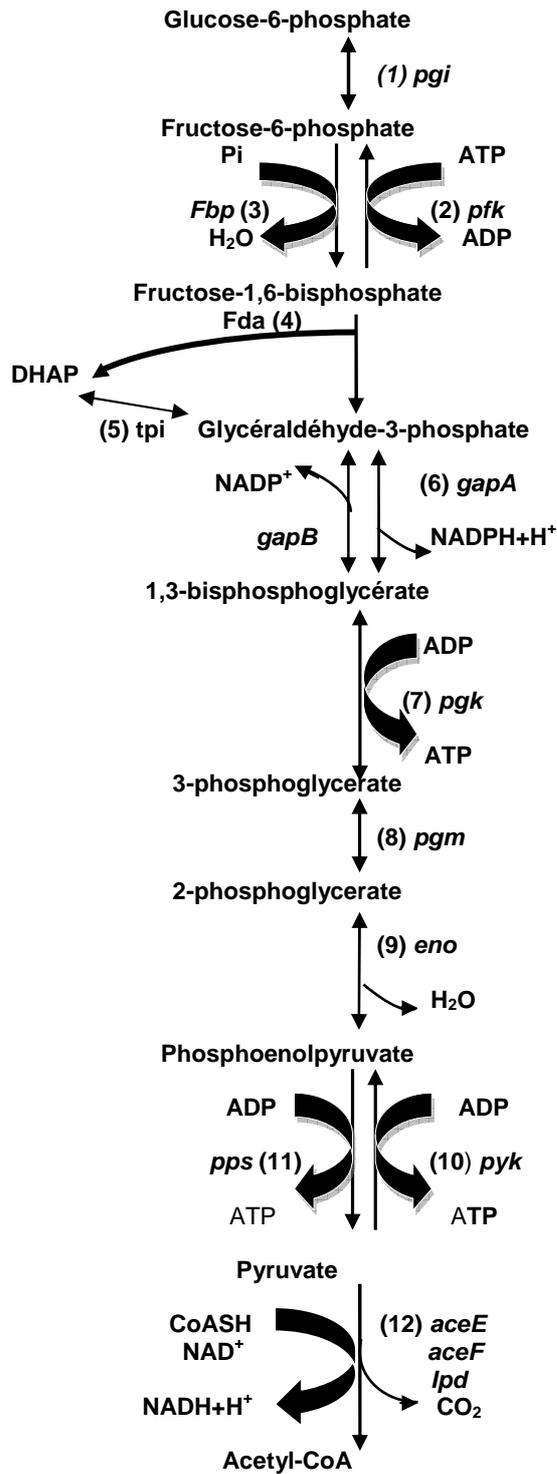


Figure I.3. La glycolyse chez *Corynebacterium glutamicum*: glucose phosphate isomérase (1), 6-phosphofructokinase (2), fructose-1,6-bisphosphatase (3), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (4), glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (5), triose phosphate isomérase (6), 3-phosphoglycérate kinase (7), phosphoglycérate mutase (8), éno-lase (9), pyruvate kinase (10), phosphoenolpyruvate synthétase (11) et la pyruvate déhydrogénase (12)

I.1.2.3. Voies des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates a été mise en évidence chez *Brevibacterium flavum* (Shiio et al., 1960) (Figure I.4). Cette voie permet de synthétiser des précurseurs (NADPH, ribose-5-phosphate, érythro- 4-phosphate, fructose-6-phosphate, glycéraldéhyde-3-phosphate et CO₂ nécessaires à la synthèse de l'histidine, des lipides, des acides nucléiques et des acides aminés aromatiques (Gourdon et al., 2000). Dans les réactions oxydatives irréversibles de la voie des pentoses phosphates, 2 NADPH et une molécule de CO₂ sont formés. Alors que les réactions oxydatives réversibles catalysent l'interconversion des sucres phosphates. Elle rejoint la glycolyse au niveau du fructose-6-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate.

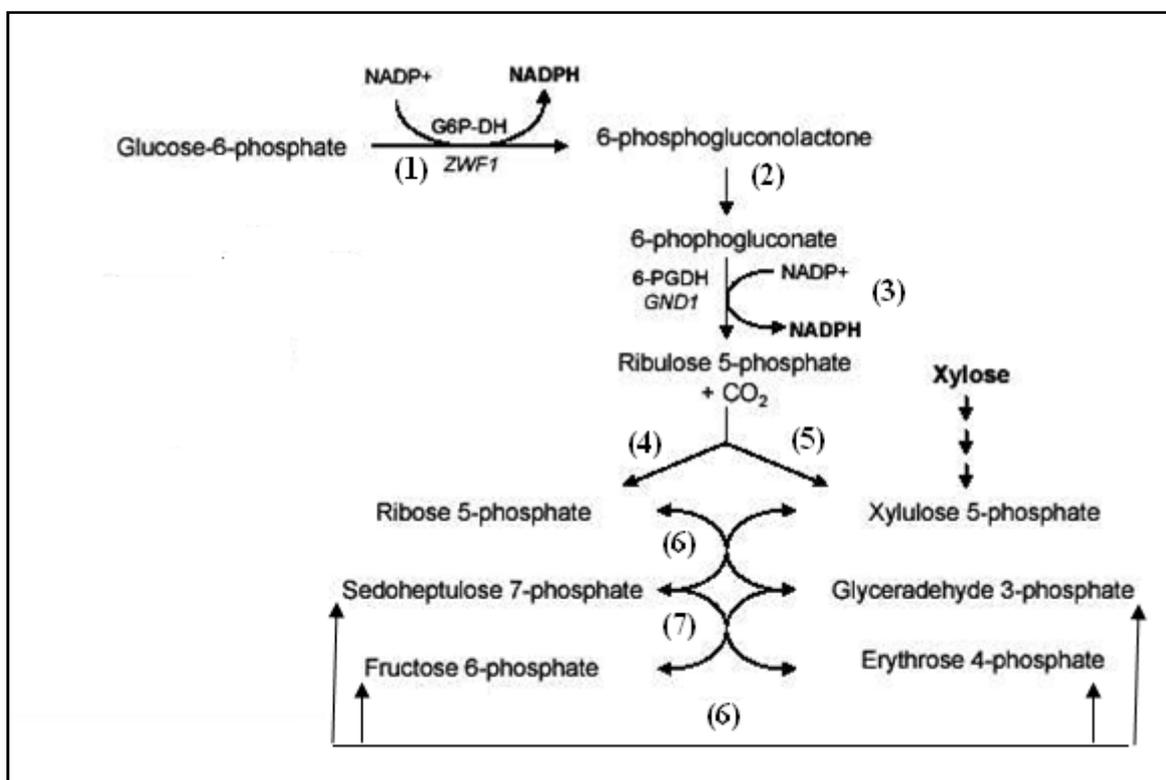


Figure I.4. Schéma métabolique simplifié de la voie des pentoses phosphates chez *Corynebacterium glutamicum*: glucose-6-phosphate déhydrogénase (1), lactonase (2), 6-phosphogluconate déhydrogénase (3), ribose-5-phosphate isomérase (4), ribulose-5-phosphate epimérase (5), transcétolase (6) et transaldolase (7).

I.1.2.4. Le cycle acide tricarboxylique (CAT) :

Le cycle acide tricarboxylique est responsable de la dégradation complète de l'acétyl- CoA et de l'apport des précurseurs nécessaires pour la synthèse des acides aminés. Durant la production des acides aminés, le cycle acide tricarboxylique à besoin d'être alimenté afin de

maintenir la molécule d'oxaloacétate à une quantité suffisante. L'alimentation est réalisée par la carboxylation du phosphoenolpyruvate (PEP) ou du pyruvate pour atteindre l'oxaloacétate (Peters-Wendisch et al., 2001, 1998, 1997).

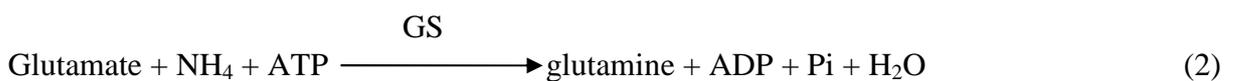
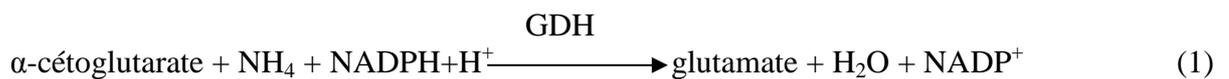
I.1.2.5. Voies anaplérotiques chez *Corynebacterium glutamicum*

Plusieurs enzymes responsables pour les réactions de carboxylation et décarboxylation pour *Corynebacterium glutamicum* ont été décrites : La phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (PPC), le pyruvate carboxylase, l'enzyme malique, la PEP carboxykinase, l'oxaloacétate décarboxylase et le shunt glyoxylique (Mouffok, 2007).

Des études ont montré que la phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC) ne joue pas un rôle important dans l'alimentation du cycle acide tricarboxylique pendant la croissance, mais par contre peut avoir un rôle important pendant la production des acides aminés à des taux de croissance réduits. La plupart des investigations ont montré que (PPC) est la seule réaction anaplérotique de carboxylation qui joue un rôle important dans l'alimentation du cycle d'acide tricarboxylique (Muriel et al., 1996).

I.1.2.6. Voie de biosynthèse du glutamate

Chez les microorganismes, le glutamate peut être formé soit par le glutamate déshydrogénase (GDH) (1) ou par l'action combinée de la glutamine synthase (GS) et le glutamate synthase (GOGAT; glutamine-2-oxoglutarate amino-transférase) (2 et 3) (Figure I.5).



Ces trois enzymes ont été détectées chez les bactéries productrices d'acide glutamique, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae* et *Brevibacterium Flavum* (Ertan, 1992; Tochikura, 1987; Sung et al., 1984; Oshima et al., 1964).

Le glutamate déshydrogénase intervient dans la synthèse du glutamate nécessaire pour la croissance. Le potentiel de sécrétion du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* est indépendant de l'activité du glutamate déshydrogénase. Cependant la réaction catalysée par le glutamate déshydrogénase est considérée comme la première voie de biosynthèse du glutamate lorsque le glutamate déshydrogénase est présent chez *Corynebacterium glutamicum*. Le

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

Le système GS/GOGAT est régulé selon la présence ou l'absence du glutamate déhydrogénase (Elke et *al.*, 1993). La synthèse du GS/GOGAT chez *Corynebacterium glutamicum* est induite lorsque la concentration d'ammonium diminue dans le milieu de culture (Tesch et *al.*, 1998; Elke et *al.*, 1993; Börmann et *al.*, 1992). L'activité du glutamate synthase est inactivée à une température supérieure à 50°C . L'enzyme est activée par les ions Mn^{2+} et Zn^{2+} , alors qu'elle est inhibée par les ions Cd^{2+} et Hg^{2+} (Mee-sun et *al.*, 1989), par la glycine, l'alanine, la sérine, l'aspartate, l'ADP et l'AMP (Sung et *al.*, 1984).

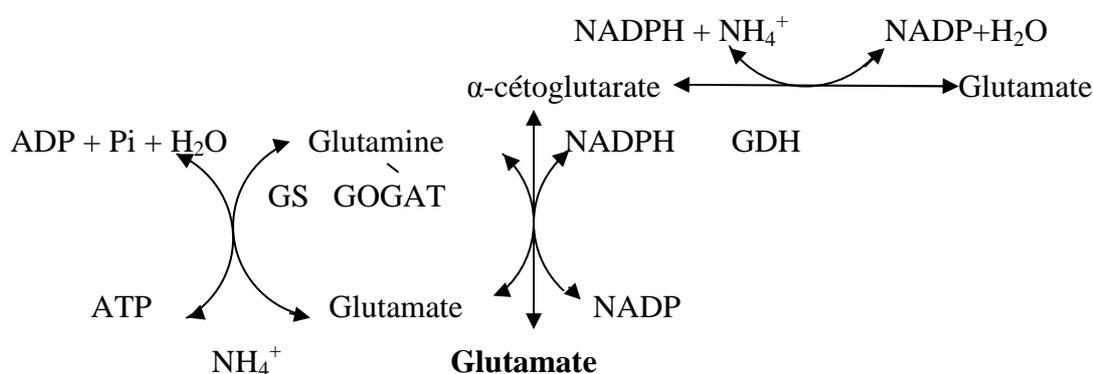


Figure I.5. Voies de biosynthèse du glutamate. GDH : glutamate déhydrogénase, GS : glutamine synthétase, GOGAT : glutamine amide α -cétoglutarate amino-transférase

I.1.3. Modification de l'enveloppe cellulaire et excrétion de glutamate

I.1.3.1. Membrane de *Corynebacterium glutamicum*

La nature des principaux constituants chimiques de l'enveloppe cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* a fait l'objet de nombreuses études (Daffe et Draper, 1998; Minnikin et O'Donnell, 1984; Collins et *al.*, 1982; Minnikin et *al.*, 1978). L'analyse par microscope électronique de cette enveloppe (Puech et *al.*, 2001; Marienfeld et *al.*, 1997) a révélée la présence de 4 couches principales, de l'intérieur à l'extérieur : la couche de phospholipides, la couche de peptidoglycane-arabinogalactane, la couche des acides mycoliques et la couche de polysaccharides (Figure I.6).

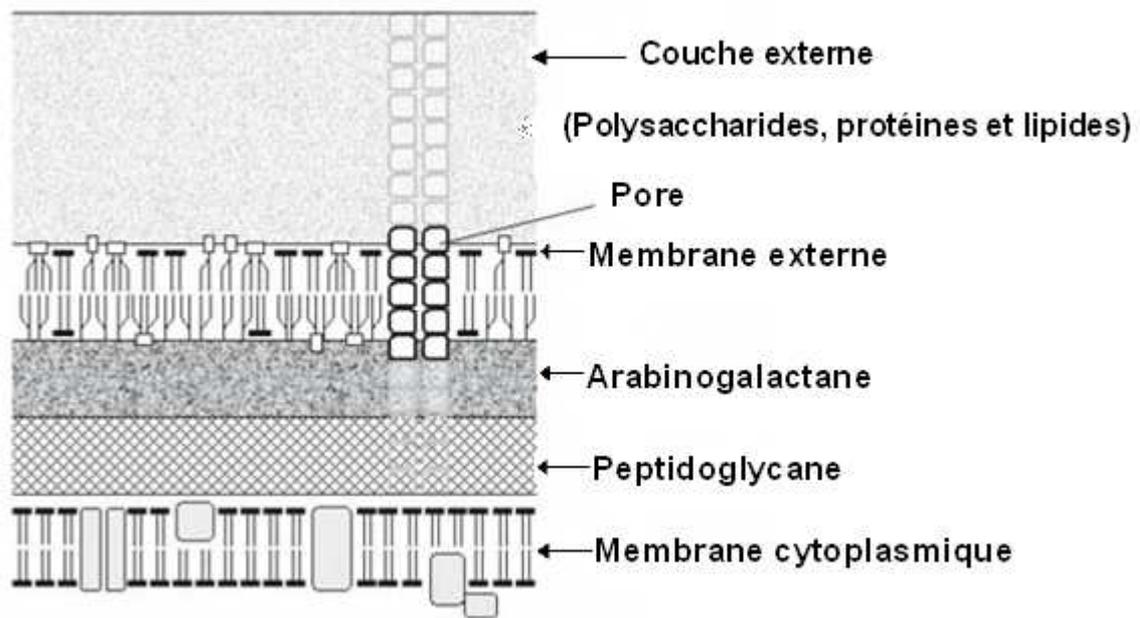


Figure I.6. Schéma de la paroi de *Corynebacterium glutamicum* (Puech et *al.*, 2001)

I.1.3.2. Excrétion du glutamate

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des facteurs déclenchant et modulant l'excrétion de glutamate (Davin, 2003). Afin de comprendre le mécanisme de l'excrétion de glutamate, les paramètres ci-dessous ont été étudiés pendant la croissance et la production de glutamate induite par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif, de pénicilline ou un choc de température.

I.1.3.2.1. Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate

La concentration de glutamate intracellulaire diminue pendant la phase de production de glutamate et l'excrétion de glutamate a lieu, bien que la concentration de glutamate intracellulaire soit inférieure à celle du milieu de culture (Lapujade et *al.*, 1999; Hoischen et Krämer, 1989). Ce résultat exclut donc l'hypothèse de Demain et Bimbaum (1968) qui suggéraient que l'excrétion de glutamate était réalisée par diffusion.

I.1.3.2.2. Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate

Lorsque l'excrétion de glutamate est faite contre son gradient, il est donc nécessaire de déterminer la force protomotrice (ΔP) ou force électrochimique. Cependant, le ΔpH ne semble pas être un facteur important pour l'excrétion de glutamate (Daran-Lapujade et *al.*, 2003; Debay, 1997; Duperray et *al.*, 1992). Le potentiel membranaire est le gradient du potentiel

électrique entre le milieu intérieur et extérieur des cellules. Il dépend principalement du gradient de concentration des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Ce gradient est dépendant des pompes ioniques membranaires mises en route par l'activité métabolique.

Les molécules chargées utilisées pour mesurer le potentiel membranaire peuvent être des ions organiques synthétiques lipophiles, radioactifs. La mesure du potentiel membranaire est réalisée par la détermination de la concentration intracellulaire de la sonde. Lors de mesure pendant la croissance et la production du glutamate, le potentiel membranaire atteint sa valeur maximale lorsque les cellules sont en phase exponentielle et diminue fortement pendant la phase de production du glutamate (Lapujade, 1999; Debay, 1997; Duperray et *al.*, 1992). Lorsque la production du glutamate est induite par le choc de température, le potentiel membranaire diminue avec l'augmentation de la température entre 33 et 41°C, alors que la vitesse spécifique de la production de glutamate augmente avec l'augmentation de la température (Lapujade, 1999). Ceci favorise l'hypothèse que la chute de potentiel membranaire est impliquée dans la production de glutamate. Toutefois, quand le potentiel membranaire des cellules productrices est modifié, la production de glutamate n'est pas affectée (Duperray et *al.*, 1992; Gutmann et *al.*, 1992). Ceci signifie que le potentiel membranaire n'est pas un paramètre important lors de l'excrétion de glutamate, sa modification au cours de la phase de production serait due à une détérioration de l'état physiologie cellulaire.

I.1.3.2.3. Énergie cellulaire

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

I.1.3.2.4. Composition de la membrane plasmique

Des études ont montré qu'une baisse de la teneur en phospholipides de la membrane intervient lors de la phase de production de glutamate avec limitation en biotine ou avec ajout des surfactants (Clément et Lanéelle, 1986; Clément et *al.*, 1984). Cependant, la production de glutamate par ajout de pénicilline n'est pas liée à la modification de la composition de la membrane cytoplasmique (Shibuvkawa et *al.*, 1968). De plus, le suivi de la composition en acides gras et en phospholipides des cellules excrétrices de glutamate au début de la phase de la production (Hoischen et Krämer, 1990), a montré que l'excrétion de glutamate se produit. Alors que la teneur en phospholipides et la composition en acide gras ne sont pas encore

modifiés lors de la limitation en biotine. Nampoothiri et *al.*, (2002) ont montré que des mutants des voies de biosynthèse des phospholipides présentent des productivités de glutamate élevées. Toutefois, ces mutants requièrent encore un stress pour excréter le glutamate.

Il ressort de ces études que la composition de la membrane semble influencer l'excrétion de glutamate mais que ce paramètre n'est pas suffisant pour la déclencher.

I.1.3.2.5. Réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane

Au cours de la production du glutamate par ajout de pénicilline, un gonflement des cellules apparaît pendant la phase de production (Shibukawa et *al.*, 1968). Ce phénomène est due à un affaiblissement du réseau d'arabinogalactone-peptidoglycane (Kijima et *al.*, 1998), probablement par une inhibition de l'activité septum-peptidoglycane synthase (Wijayarathna et *al.*, 2001). Cependant, le même phénomène de modification de taille cellulaire a été observé au cours de la production de glutamate par limitation en biotine (Kinoshita, 1985) et par le choc de température (Hirasawa et *al.*, 2000).

En conclusion, l'excrétion de glutamate est un phénomène actif très probablement catalysé par un transporteur. Ce transporteur nécessite de l'énergie cellulaire (ATP) et semble indépendant de la force protomotrice. Il semblerait que l'exporteur de glutamate soit différent de l'importeur puisque un mutant amplifié pour le gène codant pour la protéine de l'import de glutamate ne change en rien la productivité de glutamate (Eggeling et *al.*, 1996). L'activation de l'exporteur de glutamate n'est pas due à l'accumulation du glutamate intracellulaire mais serait plutôt due à la modification de l'enveloppe cellulaire.

I.2. LE PALMIER DATTIER

I.2.1. Classification du palmier dattier

Phoenix dactylifera L. « phœnix » dérive de phœnix nom grec du dattier, et « dactylifera » vient du latin dactylus dérivant du Grec « daktylos », signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Djerbi, 1994).

Le palmier dattier comporte 200 genres et 1500 espèces. Phœnix (*Coryphoideae Phœniceae*) est l'un des genres comportant douze espèces; ces espèces incluent *phœnix dactylifera* L. (Munier, 1973).

La classification du dattier a été proposée par Dransfield et *al.* (1986) :

Groupe : Spadiciflora

Ordre : Palmae

Famille : Palmaceae

Sous-famille : Coryphoideae

Tribu : Phœniceae

Genre : Phœnix

Espèce : *Dactylifera* L.

I.2.2. Morphologie

La datte est une baie, la fleur à trois carpelles dont un seul se développe au moment de la pollinisation. Le fruit est généralement de forme plus ou moins ellipsoïdale. La graine, appelée aussi noyau, est ligneuse et sa couleur va du gris au brun et elle porte un petit embryon. Le palmier dattier est l'arbre des zones arides et semi-arides, il est originaire des pays chauds et humides, mais il a de larges possibilités d'adaptation.

I.2.3. Répartition des palmiers dattiers

Le palmier dattier était primitivement cultivé dans les régions arides et semi-arides chaudes. Il fut propagé par la suite, en dehors de son axe d'extension et de culture, non seulement comme arbre fruité mais aussi comme essence ornementale (Munier, 1973). Le palmier dattier est très exploité dans l'Afrique méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Asie de l'ouest et les états unis. En Algérie, le patrimoine phœnicicole est estimé à plus 8 millions de

palmeiers dattiers. Le potentiel productif en 1987 a été estimé à 183 600 tonnes et en 2006 à 500 000 tonnes. Les palmiers sont essentiellement localisés dans les zones de la partie Sud-Est et Centre sud du pays. Près de 58,14% de la production nationale des dattes est réalisée par les deux wilayas, El-Oued (29,54%) et Biskra (28,6%). La variété Deglet-Nour, occupe la première place et représente 52,87% de la production totale des dattes (Amellal, 2008).

I.3. LA DATTE

I.3.1. Définition

La datte est une baie contenant une seule graine, elle est constituée d'un mésocarpe charnu, protégé par un fin péricarpe et entouré d'un endocarpe parcheminé (Barreveld, 1993).

I.3.2. Développement

Afin d'atteindre sa complète maturation (stade tamr), la datte passe à travers plusieurs phases distinctes, chacune d'entre eux se distingue par une ou plusieurs caractéristiques représentées dans la Figure I.7.

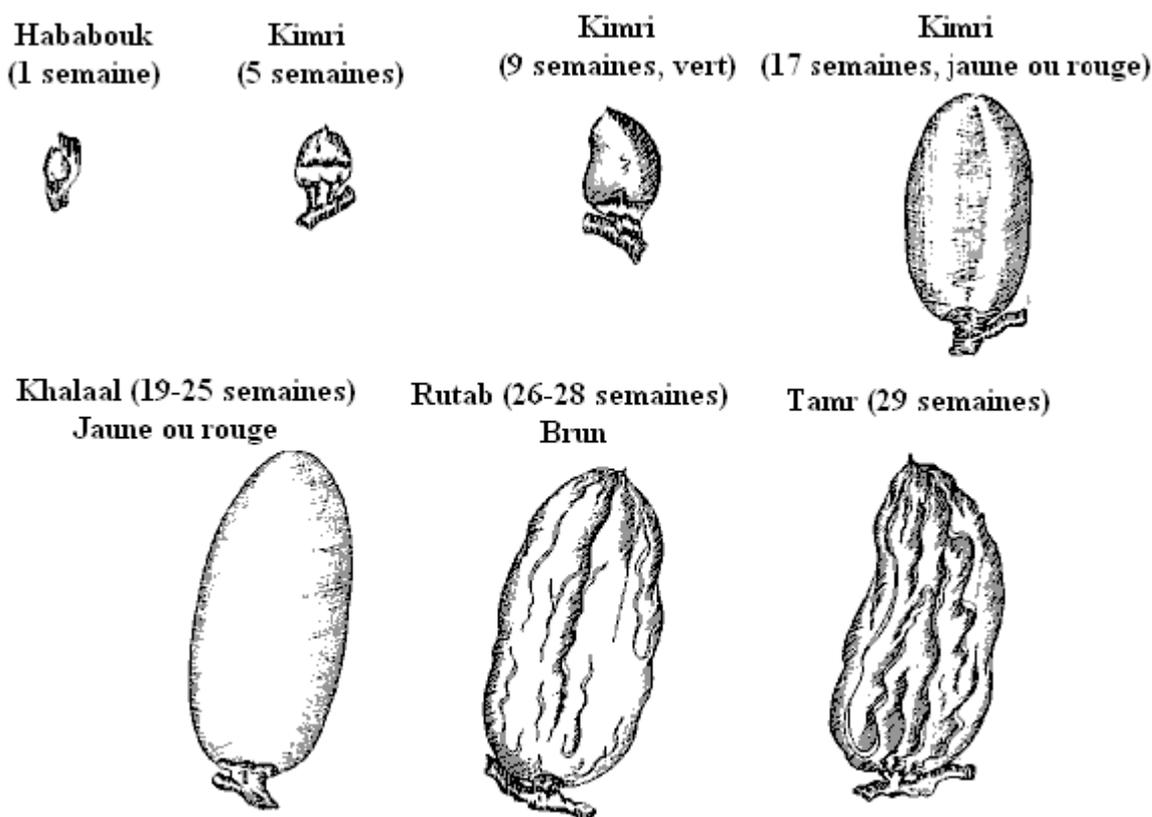


Figure I.7. Formation et maturation de la datte (Bousdira, 2007).

Ces modèles aident mieux à comprendre le développement de la datte selon 4 stades nommés par leurs dénominations arabes: kimri, khalaal, rutab et tamr, le terme hababauk est utilisé pour la fleur femelle et la période juste avant la pollinisation ou le fruit est encore crémeux.

- **Stade Kimri**

On distingue un accroissement rapide de la taille, du poids et de la teneur en sucres réducteurs. On note aussi une augmentation de l'acidité et du degré d'humidité (> 85%). A la fin de ce stade le fruit prend une couleur jaune (ou rouge selon les variétés) (Barreveld, 1993) du à la teneur en protéines et en pigments (chlorophylle %) (Sahaheen et Al-Qurashi, 2007).

- **Stade Khalaal**

Ce stade est marqué par un changement de couleur de la peau du fruit qui vire du vert au jaune. Dans ce stade le gain du poids devient lent, la teneur en saccharose augmente et elle est plus importante qu'aux sucres réducteurs alors que celle en humidité diminue. On distingue aussi une précipitation des tanins qui perdent leurs astringences.

- **Stade rutab**

Ce stade est caractérisé par une perte du poids due à une diminution du degré d'humidité (35%). Il est caractérisé aussi par l'inversion du saccharose en sucres réducteurs. La datte devient translucide, sa peau passe du jaune, orange à un brun presque noir ou au vert selon les variétés. Ce stade est souvent appelé stade de maturation. La datte est considérée comme mûre lorsqu'elle est complètement molle (Barreveld, 1993). Les tanins précipitent entièrement, sous forme insoluble; le goût amer et astringent disparaît et la datte devient sucrée (Bousdira, 2007).

- **Stade Tamr**

C'est le stade final de la maturation de la datte. La consistance du fruit à ce stade est comparable à celle du raisin et des prunes. Dans les variétés dites molles, la pulpe est d'abord molle, puis devient de plus en plus ferme tout en demeurant souple. Dans la plupart des variétés, la peau s'adhère à la pulpe et se ride à mesure que celle-ci diminue de volume. Le fruit perd beaucoup d'eau. Le rapport sucre/eau reste assez élevé empêchant la fermentation et l'acidification (oxydation).

I.3.3. Les déchets de dattes

Les déchets de dattes qualifiées de « perdues » sont des dattes qui ne sont pas consommées par les humains, soit du fait de leurs faibles qualités gustatives, soit du fait de leurs textures « rébarbatives » (trop dures), soit tout simplement parce qu'elles sont négligées au profit d'aliments plus attractifs (Estanove, 1990).

Les dattes non appréciées

- **Les dattes non mûres**

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

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

- **Les dattes déformées**

Dattes parthénocarpiques

Dattes desséchées

Dattes ridées

Dattes pleines

- **Les dattes acariées**

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

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

- Le ver de la datte (*Myelois ceratonia*) : sur les fruits mûrs la chenille est localisée entre le noyau et la pulpe à partir de laquelle elle se nourrit. A l'intérieur du fruit, on observe un tissage soyeux très fin où s'accrochent des excréments.

- Le boufaroua (*Oligonychus afrasiaticus*) détruit rapidement l'épiderme des fruits et provoque leurs déshydratations. La présence de réseaux soyeux caractérise la présence de ce ravageur.

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

(*Aspergillus phoenicis*) provoque la maladie du charbon. L'épiderme de la datte présente une cavité tapissée d'un feutrage mycélien blanchâtre rempli d'une masse noire pulvérulente (Mouffok, 2007).

I.3.4. Composition de la datte

La datte est constituée de deux parties :

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

I.3.4.1. Teneur en eau

La teneur en eau des dattes varie selon leurs stades de maturation de la plus forte teneur (85% au stade Kimri) jusqu'à la plus faible teneur (5-10% pour les dattes sèches). La plupart des dattes commercialisées présente une teneur en eau de 20% ce qui facilite leurs conservations et rend leurs textures appréciables.

Tableau I.1. Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région Fliache (Biskra), en % (Noui, 2007)

Variétés	Consistance	Teneur en eau (%)
Deglet-Nour	Demi-molle	22,60
Mech-Degla	Sèche	13,70
Ghars	Molle	25,40

I.3.4.2. Sucres

Le sucre constitue le composant le plus important qui entre dans la composition de la datte. On distingue deux catégories de dattes: celles à saccharose (sucre non réducteur) et celles à sucres réducteurs. On peut les classer d'après leurs consistances, en molles, demi-molles et sèches.

- Les dattes molles (taux d'humidité supérieur ou égale à 30%) à sucres inverti (fructose, glucose).
- Les dattes demi-molles (de 20 à 30% d'humidité) occupant une position intermédiaire.
- Les dattes sèches (moins de 20% d'humidité) à saccharose.

La teneur en sucres totaux (stade tamr) pour les différentes variétés du monde est presque la même (Tableau I.2).

Tableau I.2. Teneur en sucres totaux des dattes provenant de différentes régions et différentes variétés

	Sucres totaux %	
	Moyenne	Intervalle
USA (Cook et Furr, 1952), 21 variétés	78	67-85
Iraq (Mohammed et <i>al.</i> , 1983), 5 variétés.	73,8	45-86
Arabie Saudi (Sawaya, 1986), 15 variétés.	77	67-83

La plupart des dattes appartiennent aux dattes à sucres réducteurs au moment de leurs consommations. Une exception est la variété de Deglet Nour de l'est d'Afrique et de la Californie dont l'inversion se réalise partiellement au moment de la maturité.

I.3.4.3. Les acides aminés

Les dattes sont caractérisées par une faible teneur en protéines (Tableau I.3). Ces derniers varient entre 0,38 et 2,5% du poids sec. Malgré cette faible teneur, les protéines de la datte sont équilibrées qualitativement (Yahiaoui, 1998).

Tableau I.3. Composition moyenne en acides aminés de la datte sèche (Favier et *al.*, 1993)

Acides aminés	Teneur de la pulpe, en mg/100g
Isoleucine	64
Leucine	103
Lysine	72
Méthionine	25
Cystéine	51
Phénylalanine	70
Tyrosine	26
Thréonine	69
Tryptophane	66
Valine	88
Arginine	68
Histidine	36
Alanine	130
Acide aspartique	174
Acide glutamique	258
Glycocolle	130
Proline	144
Sérine	88

Les acides aminés jouent un rôle primordial dans les réactions de brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) qui intervient lors de la conservation. Les protéines contribuent à la précipitation des tanins au cours de la maturation. Ainsi, les fortes teneurs influents de façon très sensible sur l'évolution de la couleur du fruit. Ils provoquent également un brunissement rapide de la datte durant le stockage (Alais, 1997).

I.3.4.4. Les éléments minéraux

L'étude de 58 variétés de dattes cultivées dans la région de Zibans faite par Acourene et *al.*, (2001) a montré que le taux de cendres est compris entre 1,10 et 3,69% du poids sec. La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium (Tableau I.4).

Tableau I.4. Composition minérale de quelques variétés de datte molles algériennes, en mg/100g de la partie comestible (Siboukeur, 1997)

Eléments minéraux	Variétés		
	Chars	Tanslit	Litm
Potassium (K)	664	435	452
Chlore (Cl)	256	176	157
Calcium (Ca)	80,50	60,10	61,20
Magnésium (Mg)	17,38	20,61	20,20
Fer (Fe)	2,03	0,83	1,30
Sodium (Na)	2,03	0,83	1,30
Cuivre (Cu)	1,92	0,99	1,10
Manganèse (Mn)	2,10	1,20	1,50

I.3.4.5. Vitamines

La datte ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables de vitamines du groupe B (Tableau I.5). Se sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial (Vilkas, 1993).

Tableau I.5. Composition vitaminique moyenne de la datte sèche (Favier et *al.*, 1995)

Vitamines	Teneur moyenne pour 100g
Vitamine C	2,00 mg
Thiamine (B1)	0,06 mg
Riboflavine (B2)	0,10 mg
Niacine (B3)	1,70 mg
Acide pantothénique (B5)	0,80 mg
Vitamine (B6)	0,15 mg
Folates (B9)	28,00 µg

I.3.4.6. Fibres

Ce sont des substances insolubles, non nutritifs. Elles sont composées de cellulose, d'hémicellulose, lignines, ligno-cellulose et de protéines insolubles. Durant le processus de maturation, ces substances sont graduellement dégradées par les enzymes en composés plus solubles ce qui rend le fruit plus molle. Ces fibres constituent 2-6% du poids de la datte (Barreveld, 1993). Selon des études réalisées par Benchabane et *al.* (1995) sur les composés pariétaux de deux variétés de dattes algériennes Ghars et Deglet Nour, les composés de la paroi végétale sont à leurs minimums au stade mur (Tamr). La paroi cellulaire de la datte mure est pauvre en pectines (3%) mais riche en fibres (6 à 8%), plus particulièrement en hémicelluloses.

I.3.5. Valorisation de la datte

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

I.3.5.1. Valorisation directe

- **Pâte de dattes**

Les dattes sont généralement cuites à la vapeur, dénoyautés, macérés, et converti en une forme semi-solide connus sous le nom de patte avec une teneur en humidité d'environ 20-23% et une activité d'eau inférieur à 0,6 (Ahmed et *al.*, 2005). La pâte des dattes a été utilisée comme comme substituant de sucre dans de nombreux aliments. Dans les industries de confiserie, la pate de datte est utilisée comme une des ingrédients majeurs (Alhamdan et Hassan, 1999).

- **Farine de dattes**

Les dattes macérées sont séchées à moins de 5% d'humidité (Barreveld, 1993). On obtient ainsi une farine de couleur claire, d'odeur agréable (Sawaya et *al.*, 1982). Elle est utilisée essentiellement en biscuiterie et en pâtisserie (Barreveld, 1993; Sawaya et *al.*, 1982).

- **Sirop de dattes**

Le sirop de datte, également appelé miel de datte, est un sirop sucré foncé (mélasse de fruit) obtenu à partir d'extrait des dattes et typique de la cuisine arabe. Il est appelé *Rub Al-Tamr* dans le monde arabe (Mohamed et Ahmed, 2006).

Le sirop est préparé à base des dattes cuites dans l'eau, puis filtrées. Le jus extrait est concentré par cuisson à feu doux jusqu'à l'obtention d'un liquide coloré et sirupeux. Le sirop contient principalement des sucres dont le saccharose, le glucose et le fructose (Mohamed et Ahmed, 2006; Patzold et Bruckner, 2005). Les mélanoidines et les complexes de fer-polyphénol sont responsables de la couleur foncée du sirop (Mohamed et Ahmed, 2006).

- **Jus de dattes**

Rouhou et *al.* (2006) ont montré que la solution brute extraite des dattes après broyage, dilution et filtration a une forte teneur en sucre. Le couplage des traitements enzymatiques et de microfiltration a conduit à l'élaboration d'une boisson clarifiée, modérément acide, présentant une viscosité et une turbidité relativement faible et ayant des caractéristiques d'écoulement comparables à celles des boissons et jus de fruits connus. Le jus de datte est appelé « Tassabount » ou « el mriiss » (Fezouata, Maroc), « Takerwet » à Ghardaïa (Algérie) (Zirari et *al.*, 2003).

I.3.5.2. Valorisation indirecte

- **Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires)**

Plusieurs procédés de production de 'P.O.U.' sont opérationnels dans de nombreux pays (U.S.A., Europe de l'Est, Australie, France, Russie, Suède) et les premières expériences concernant la culture à grande échelle de ces micro-organismes eurent lieu pendant la première guerre mondiale en raison des problèmes de disette alimentaire. Kamel (1979) et Bessah et Touzi (2001) ont essayé d'explorer le jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus ont montré que les sucres de jus de dattes constituent une matière première de base pour la production de protéines d'organismes unicellulaires.

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

- **Production d'oxytétracycline**

Différentes souches productrices d'oxytétracycline ont été utilisées dans un milieu à base de datte. Les résultats obtenus ont montré que *Streptomyces rimosus* est la plus performante. En effet, Baeshin et *al.* (1993) ont montré que l'induction de *Streptomyces rimosus* par la chaleur sèche est plus efficace que la chaleur humide comme un agent

mutagène physique. La température optimale pour induire des mutants auxotrophes de spores de *Streptomyces rimosus* est de 55°C dans des conditions de traitements sèches.

- **Production d'acide citrique**

Le jus de dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique. Siboukeur et al. (2001), ont montré que l'utilisation du jus de datte non enrichie améliore la production de l'acide citrique à partir de *Aspergillus niger*. De même Abou-Zeid et Khoja (1993) ont montré que l'enrichissement du jus de dattes avec l'hydrolysat des noyaux de dattes permet d'améliorer la production de l'acide citrique à partir de *Yarrowia lipolytica*. Al Obaidi et Berry (1979) ont obtenu un rendement de 62% en utilisant un milieu à base de jus de datte déionisé et une culture de *Aspergillus niger*.

- **Production d'alcool**

La production d'éthanol à partir de jus de datte repose principalement sur l'utilisation de levures. Kaidi et Touzi (2001) ont utilisé des cellules libres et immobilisées de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont utilisés les deux souches : *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum* pour la production d'éthanol. Les meilleures performances ont été obtenues avec *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Production de vitamine B12**

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

I.4. MODELE EXPERIMENTALE

I.4.1. Définition

Dans une expérience, on modifiant une ou plusieurs variables du processus (ou facteurs), on peut observer l'effet de ces modifications sur une ou plusieurs variables de réponse. La conception statistique des expériences est une procédure efficace pour la planification des expériences afin que les données obtenues puissent être analysées pour tirer des conclusions valables et objectives. La conception des expériences commence par la détermination des objectifs de l'expérience et la sélection des facteurs d'étude. Il s'agit de tracer un plan expérimental détaillé avant de faire l'expérience.

Il est fréquent de commencer par un modèle de type « boîte noire », avec plusieurs facteurs discrets ou continus contrôlés avec une ou plusieurs réponses mesurées. Les réponses de la production sont supposés continus. Les données expérimentales sont utilisées pour obtenir une analyse empirique du modèle reliant les entrées et les sorties. Ces modèles empiriques contiennent généralement des termes du premier et du second ordre. Souvent, l'expérience présente un certain nombre de facteurs non contrôlés qui peuvent être discrets, comme les matériels ou différents expérimentateurs, et/ou continus comme la température ambiante ou l'humidité. La Figure I.8 illustre cette situation.

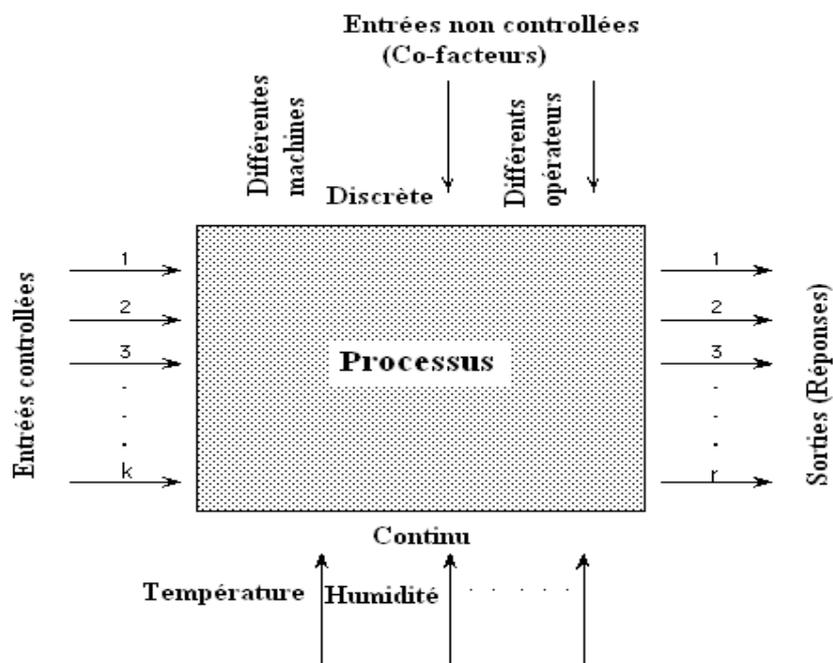


Figure I.8. Schéma du processus boîte noire.

Les modèles empiriques les plus couramment utilisées prennent soit une forme linéaire ou une forme quadratique.

Un modèle linéaire avec deux facteurs X_1 , X_2 est écrit comme suit :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Y est la réponse, le terme $X_1 X_2$ tient compte d'un effet d'interaction possible entre X_1 et X_2 , β_0 est la constante, β_1 , β_2 des coefficients linéaires, β_{12} et le coefficient d'interaction, X_1 , X_2 représentent les niveaux de la variable indépendante.

Un modèle d'ordre secondaire (quadratique) ne comprend pas le terme d'interaction à trois voies, mais ajoute trois termes au modèle linéaire, à savoir :

$$\beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

I.4.2. Stratégie de test

La fiabilité d'une méthode d'analyse peut être décrite comme la capacité à reproduire la méthode dans des circonstances différentes (différents jours, différents techniciens, différents laboratoires) sans l'apparition de différences inattendues dans les résultats obtenus. Un test de robustesse est une partie de validation de la méthode qui est de plus en plus importante. L'exécution d'un test de robustesse en général, implique la réalisation d'une conception expérimentale. Par conséquent, après avoir examiné la littérature (Vander Heyden et *al.*, 1996) et après avoir effectué plusieurs études de cas (Vander Heyden et *al.*, 1995; Vander Heyden et *al.*, 1997) une stratégie sera choisie pour déterminer la robustesse d'une méthode analytique. Dans un test de robustesse on peut identifier les étapes suivantes: (a) l'identification des facteurs à tester; (b) la définition des différents niveaux pour les facteurs; (c) la sélection du modèle expérimentale mis en place; (d) la réalisation des expériences décrites dans le dispositif expérimental et la détermination de la réponse de la méthode; (e) le calcul des effets; (f) l'analyse statistique et/ou graphique des effets; et enfin (g) tirer des conclusions pertinentes chimiquement de l'analyse statistique et, si nécessaire donner des conseils pour améliorer la performance de la méthode.

I.4.2.1. Définition des facteurs à tester

Les facteurs à examiner sont principalement sélectionnés de la procédure telle qu'elle est décrite dans la procédure standard d'exploitation. Les facteurs peuvent être quantitatifs ou qualitatifs. Les facteurs quantitatifs sont des facteurs qui varient sur une échelle continue, tandis que les facteurs qualitatifs peuvent prendre des niveaux discrets.

I.4.2.2. Sélection du modèle expérimentale

Les influences des facteurs sont examinées dans un modèle expérimentale, qui est choisi en fonction du nombre des facteurs à étudier. Les modèles appliqués sont nombreux :

I.4.2.2.1. Modèle conventionnel

Le modèle conventionnel est une conception traditionnelle, qui enquête sur un facteur-à-un-temps donné, tout en conservant le niveau des autres facteurs constants. Le niveau du facteur à étudier est alors modifié sur une plage souhaitée afin d'étudier ses effets sur une réponse. Après avoir obtenu des résultats, certains graphiques sont construits en montrant comment une réponse est affectée par le seul facteur étudié. Ce type de modèle est facile à utiliser et à analyser, il a été largement utilisé pour étudier les effets de divers facteurs sur les processus de fermentation. Cependant, le modèle conventionnel a deux principaux inconvénients. D'une part, il ne prend pas en considération les interactions entre les différents facteurs. Donc, il ne peut pas garantir les conditions optimales identifiées surtout lorsque les interactions entre différents facteurs sont significatives. En effet, Kim et *al.* (2007) ont étudié l'effet d'un seul facteur, à savoir la concentration du saccharose sur la production d'hydrogène en utilisant la technique conventionnelle. Ils ont ignorés les interactions entre la concentration du saccharose et d'autres facteurs comme la température. D'autre part, le modèle implique un nombre relativement important d'expériences, qui sont laborieuses et prennent beaucoup du temps pour effectuer les expériences, en particulier lorsque le nombre des facteurs est important (Kennedy et Krouse, 1999).

I.4.2.2.2. Modèle factoriel

Le modèle factoriel est en mesure d'étudier les effets de plus d'un facteur à deux ou à plusieurs niveaux. Le dispositif expérimental comprend généralement diverses combinaisons de différents taux du facteur, ce qui lui permet de décrire les interactions entre les différents facteurs et d'être plus efficace pour faire face à un grand nombre de facteurs, comparativement au modèle conventionnel. Le modèle factoriel peut être classé en deux catégories: le modèle factoriel complet et le modèle factoriel fractionnaire (Kennedy et Krouse, 1999).

- **Modèle factoriel complet**

Dans un modèle factoriel complet, toutes les combinaisons du facteur sont testées. Par exemple, le nombre de rangés pour un modèle factoriel complet à trois facteurs est a, b et c, ce qui indique que, le premier facteur est testé aux niveaux « a », le deuxième facteur est testé

aux niveaux « b », tandis que le troisième facteur est testé aux niveaux « c ». Le nombre des expériences dans un modèle factoriel complet croît géométriquement avec le nombre des facteurs. Par exemple, Espinoza-Escalante et *al.* (2008) ont étudiés les effets de l'alcalinisation, du traitement thermique et de la sonication (chacun à 2 niveaux) sur la production d'hydrogène en utilisant un modèle factoriel complet. S'ils ont examinés l'effet de deux facteurs seulement sur la production d'hydrogène; 22 expériences seront été nécessaires. Dans de nombreux cas, lorsque les effets d'un grand nombre de facteurs doivent être étudiés simultanément, un grand nombre d'expériences sont nécessaires. En général, cela constituera une procédure vaste qui n'est pas économique et réalisable sur le plan pratique (Luftig et Jordan, 1998).

- **Modèle factoriel fractionnaire**

Le modèle factoriel fractionnaire fournit une alternative lorsque le nombre des expériences du modèle factoriel complet est trop volumineux pour être réalisable. Avec un modèle factoriel fractionné, les effets de certains facteurs sur une réponse peuvent être étudiés en vertu d'une condition économique et pratique (Luftig et Jordan, 1998). 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 différents types de fermentations telles que la production d'hydrogène (Lin et Lay, 2004; Box et Behnken, 1960).

A. Modèle Taguchi

Le modèle Taguchi, est un modèle factoriel fractionné, il permet l'étude de l'effet de nombreux facteurs à deux ou plusieurs niveaux sur une réponse dans un nombre d'expériences relativement petit. En outre, le tableau orthogonal facilite l'analyse du modèle. Lorsqu'il est utilisé correctement, le modèle Taguchi peut fournir une méthode efficace pour trouver une combinaison optimale des niveaux des facteurs qui peut atteindre son optimum. Habituellement, avec l'analyse de variance, les facteurs clés qui ont des effets significatifs sur la réaction ainsi que leurs niveaux peuvent être déterminés. Cependant, le niveau optimal réel du facteur ne peut être assuré en utilisant le modèle Taguchi, parce que le niveau optimal réel peut être différent du niveau pré-déterminée correspondant du facteur (Antony, 2006).

B. Modèle Plackett-Burman

En réalité, plusieurs facteurs peuvent influencer un processus donné, mais cela ne signifie pas que tous ces facteurs ont des effets significatifs entre elles. Les facteurs qui ont plus d'effet sur le processus sont plus considérés que ceux qui influent légèrement, car les premiers sont essentiels au bon fonctionnement du processus. La première étape pour optimiser un

procédé consiste à identifier les facteurs qui ont des effets significatifs sur le processus. Le modèle Plackett-Burman, qui est un modèle factoriel fractionnaire à deux niveaux a été largement utilisé pour l'évaluation de l'effet des différents facteurs dans de nombreux processus de fermentation (Kennedy et *al.*, 1999). Le modèle est utilisé pour démarrer l'optimisation par un dépistage d'un grand nombre de facteurs X_i qui peuvent être susceptibles d'influencer la réponse Y (Lewis et *al.*, 1999). Chaque facteur peut prendre deux niveaux (-1 ou +1) pour la concentration minimale et maximale respectivement (Deming et Morgan, 1988; Taguchi et Konishi, 1987). Afin de déterminer si les facteurs ont un effet significatif ou non; une simple forme polynomiale du premier degré est proposée:

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

Il est nécessaire de déterminer si elles sont statistiquement significatives. L'effet β_i ayant la plus grande valeur absolue correspond à l'élément le plus significatif X_i .

C. Modèle de Box-Behnken et de composite centrale

Le modèle composite centrale est un modèle factoriel fractionnaire à cinq niveaux développé par Box et Wilson (1951). Le modèle se compose généralement d'une conception factorielle complète 2^n (Kuehl, 2000). Le modèle Box-Behnken est un modèle factoriel fractionnaire à trois niveaux développée par Box et Behnken (Box et Behnken, 1960). Le modèle peut être considéré comme une combinaison entre un modèle factoriel à deux niveaux et un modèle à blocs incomplets. Dans chaque bloc, certains facteurs sont soumis à toutes les combinaisons du modèle factoriel, tandis que les autres facteurs sont maintenus à leurs niveaux centraux. Le modèle Box-Behnken offre une alternative économique par rapport au modèle composite centrale, car le nombre des niveaux des facteurs est inférieur à celui de la composite centrale et ne contient pas des niveaux extrêmement hauts ou des niveaux extrêmement bas. Pan et *al.* (2008) ont étudié l'effet de 3 facteurs, à savoir le glucose, un tampon phosphate et une solution de vitamines (chacun à 3 niveaux), sur la production d'hydrogène en utilisant le modèle de Box-Behnken à 15 expériences, tandis que Thong et *al.* (2008) ont étudié l'effet de trois facteurs, à savoir la concentration Fe^{+2} , C/N ratio et le rapport C/P (chacun à 5 niveaux), sur la production d'hydrogène en utilisant le modèle composite centrale en 20 expériences. Pour la méthodologie « response surface », un modèle polynomiale du second ordre (1) est habituellement proposé pour décrire l'effet de divers facteurs sur une réponse basée sur les résultats expérimentaux obtenue à partir du modèle composite central ou du modèle Box-Behnken.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Y est la réponse, β_0 est la constante, β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique, β_{ij} est le coefficient d'interaction et X_i est le niveau du facteur codé.

Dans la Figure I.9, le modèle polynomial du second ordre peut être affiché comme une parcelle de surface ou un tracé de contours en variant seulement deux niveaux de facteurs, tout en gardant les autres niveaux de facteur constants.

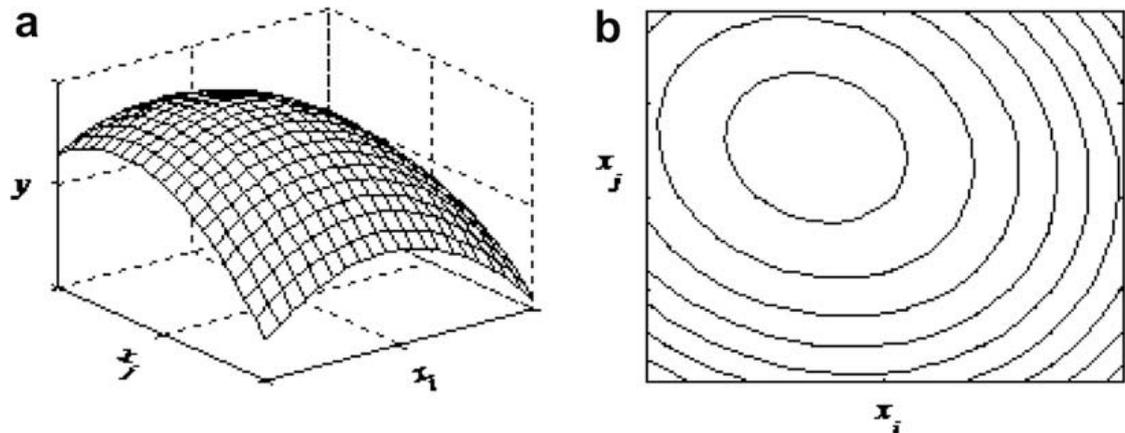


Figure I.9. a,b (a) : Surface plot, (b) : Contour plot d'une réponse (Wang and Wan, 2009)

X_i : Facteur 1.

X_j : Facteur 2.

Y : La réponse.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II.1. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES

II.1.1. Appareils

- Incubateur, avec son système d'agitation et de régulation de température, New Brunswick Scientific
- Autoclave, SELETA
- Bain-marie agité, Bioblock Scientific
- Etuve bactériologique, Memmert
- pH-mètre, Prolabo
- Spectrophotomètre AWARENESS TECHNOLOGY INC 3200
- Spectrophotomètre, Spectronic 20 Genesys
- Vortex, Jonke et Kunbel
- Balance, Sartorius
- Balance de précision, Kern ALJ 220-4M
- Centrifugeuse, Adogio EBA 12
- Centrifugeuse, Hittich

II.1.2. Produits chimiques

- Na_2HPO_4 , Fluka
- KH_2PO_4 , Rectapur
- NaCl , Prolabo
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Riedel-deHaen
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Prolabo
- CaCl_2 , Fluka
- CaCO_3 , Fluka
- HCl , 37.5 % Cheminova
- NaOH , Prolabo
- Urée, Panreac
- Glycérol, Gifrer Barbazat
- Biotine, Sigma

- Thiamine, Sigma
- Bétaine, Sigma
- Glucose, Prolabo
- Peptone, Sigma
- Extrait de levure, Panreac
- Corn Steep Liquor (C.S.L.), Sigma

II.1.3. Réactifs

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

II.2. MICRO-ORGANISME UTILISE

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

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

Les caractéristiques générales de l'espèce bactérienne *Corynebacterium glutamicum* sont présentées dans le Tableau II.1 (Pons et *al.*, 1993).

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

Caractères principaux	Substrats utilisés	Autres caractères
<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries à Gram positif. - Bacille court, droit ou légèrement incurvé souvent par paire. - Dimension: 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm. - Aspect sur gélose: colonies jaune pâle à jaune, régulières et lisses. - Non-sporulant, non-mobile. - Aérobie facultative. - Auxotrophe pour la biotine. - Production d'acide glutamique. - Température optimale de croissance 25 à 37°C. - pH optimal de croissance: 7,3 à 7,4. - ADN: C + G = 55 à 57,7 %. - Paroi: présence d'acide méso diaminopimélique et d'arabinogalactane. 	<ul style="list-style-type: none"> - Glucose + - Fructose + - Saccharose + - Maltose + - Tréhalose + - Mannose + - Rhamnose - - Galactose - - Raffinose - - Arabinose - - Lactose - - Xylose - - Dextrine - - Salicine - - Amidon - 	<ul style="list-style-type: none"> - Uréase + - Hydrolyse gélatine - - Hydrolyse caséine - - Réduction de nitrate en nitrite + - Esculine - - Hippurate +

II.3. MILIEUX DE CULTURES

II.3.1. Milieu de préculture

La composition du milieu de préculture est basée sur le milieu de *Corynebacterium Glutamicum* enrichi en Citrate (MCGC) (Von der Osten et al., 1989). Ce milieu modifié par Davin et al. (2003) est présenté dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Composition du milieu MCGC modifié en erlenmeyer.

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

II.3.2. Milieu de production

Le milieu MCGC a été complètement remplacé par un milieu de fermentation naturel contenant l'extrait sucré de pulpe de datte (Jus de datte) comme milieu de base. Le milieu est ensuite supplémenté par différentes sources d'azote (extrait de levure, urée, C.S.L., sulfate d'ammonium et peptone), de vitamines (biotine et thiamine) et des sels minéraux.

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

II.3.2.1. Préparation de l'extrait du jus de datte

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

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

II.3.3. Stérilisation

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

II.4. PROCEDE DE CULTURE

II.4.1. Conservation de la souche

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

II.4.2. Propagation de la souche

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

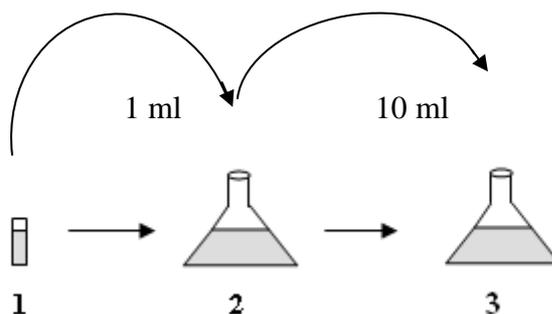


Figure II.1. Propagation de la souche (*Corynebacterium glutamicum* 2262)

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

II.4.3. Culture en Erlenmeyer

Après avoir ajusté le pH à 7,3, le milieu de culture est réparti à une proportion de 100 ml dans des Erlenmeyers de capacité de 500 ml. Ils sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Le milieu de culture est inoculé à l'aide de préculture à raison de 10 % v/v, puis incubé à 33°C sous agitation de 330 rpm dans un incubateur New Brunswick Scientific. Cet incubateur est équipé d'un système de contrôle de température et d'agitation (Figure II.2).

Les cultures sont initiées à 33°C afin d'atteindre la phase d'exponentielle de croissance (d'environ 4h) puis un choc thermique est réalisé à 39°C pour induire la sécrétion de l'acide glutamique.

II.4.4. Protocole des fermentations discontinues

Le volume réactionnel est fixé à 100 ml. L'inoculum est de 10 %. Les conditions de culture sont les suivantes :

- pH maintenu à 7, 3.
- Température 33 °C.
- Agitation 330 rpm.

Ce protocole est respecté pendant la première et la deuxième partie du travail, alors que dans la troisième partie, ces paramètres physiques vont faire l'objet d'une optimisation en utilisant le modèle du Box- Behnken.

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



Figure II.2. Photo représentative de l'incubateur.

II.5. METHODES D'ANALYSES

II.5.1. Prélèvement et traitement des échantillons

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

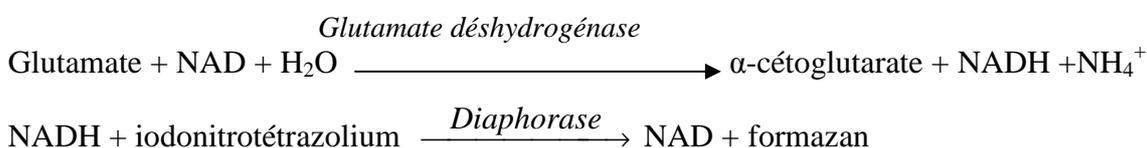
- La croissance (biomasse).
- La consommation des substrats (glucose, fructose, saccharose).
- La production du métabolite (l'acide glutamique, l'acide lactique).

II.5.2. Estimation de la biomasse

La biomasse est évaluée par spectrophotométrie à 570 nm. Une corrélation entre les unités de densité optique (D.O.) mesurées et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec est établie pour le spectrophotomètre utilisé. Lorsque cela est nécessaire les échantillons sont dilués de façon à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé. Le coefficient de conversion de (D.O.) en concentration de biomasse (g/l) est de 0,4.

II.5.3. Dosage du glutamate

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

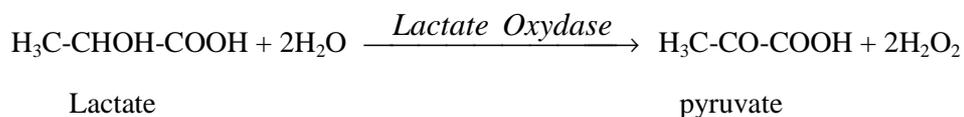


L'apparition de formazan est détectée à 492 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en glutamate. Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,07 (g.l⁻¹) de glutamate permet de déterminer la concentration en glutamate des échantillons. Au-delà de cet intervalle une dilution est nécessaire.

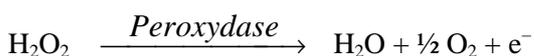
II.5.4. Dosage du lactate

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

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



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



L'augmentation de l'absorption mesurée à 540 nm est proportionnelle à la concentration en lactate. Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,20 (g.l⁻¹) de lactate permet de déterminer la concentration en lactate des échantillons. Pour les concentrations supérieures, une dilution est nécessaire.

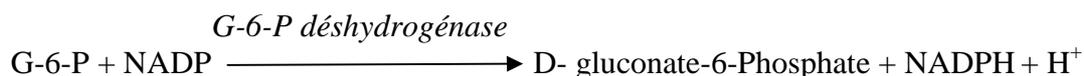
II.5.5. Dosage du saccharose / D- glucose / D-fructose

- **Détermination du glucose par inversion**

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



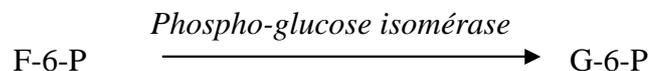
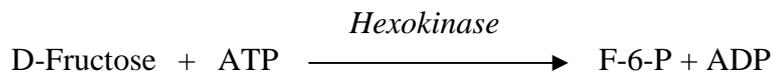
La phosphorylation du glucose par l'ATP à un pH = 7,6



La formation du NADPH mesurée à 365 nm est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon.

- **Détermination du fructose par inversion**

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



Donc on revient à l'équation:



La formation du NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à la concentration du fructose dans l'échantillon.

- **Inversion enzymatique**

Dans un pH = 4,6, le saccharose est hydrolysé par l'enzyme β -fructosidase (invertase) pour donner D-glucose et D-Fructose. La concentration du saccharose est calculée par la différence de la concentration du glucose avant et après l'inversion enzymatique.

II.6. EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES

II.6.1. Calcul des paramètres cinétiques en réacteur discontinu

V : Volume du milieu (l)

X : Concentration en biomasse (g.l⁻¹)

S : Concentration en substrat (glucose, fructose, saccharose) (g.l⁻¹)

P : Concentration en produit (l'acide glutamique) (g.l⁻¹)

II.6.1.1. Vitesses de réaction

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

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

II.6.1.2. Vitesses spécifiques

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

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

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

Avec :

r_X''' : vitesse de croissance (g.l⁻¹h⁻¹)

r_S''' : vitesse de consommation du substrat (g.l⁻¹h⁻¹)

r_P''' : vitesse de production d'un produit (g.l⁻¹h⁻¹)

μ : vitesse spécifique de croissance (h⁻¹)

q_S : vitesse spécifique de consommation du substrat (g.g⁻¹h⁻¹)

q_P : vitesse spécifique de production d'un produit (g.g⁻¹h⁻¹)

II.6.1.3. Productivité volumétrique:

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

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

Avec :

t : Durée de la fermentation (h)

δ : Productivité volumétrique (g.l⁻¹h⁻¹)

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

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

II.7. MODELES UTILISES

II.7.1. Le modèle de Plackett-Burman

Le modèle de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946) a été utilisé dans la première partie de l'étude. Ce modèle ne permet pas l'étude des interactions présentes entre les différents constituants du milieu, mais il permet une recherche des éléments qui influent la production du glutamate. Dans le cas de notre travail 19 éléments [variables, $K=19$] ont été sélectionnés. Chaque variable est représentée par deux niveaux; (+1) pour la concentration maximale et (-1) pour la concentration minimale. On appliquant le modèle et à partir de ces 19 éléments on obtient une matrice composée de 20 rangés. Le nombre des signes positifs et négatifs par expérience est $(K+1)/2$ et $(K-1)/2$, respectivement. Chaque colonne doit contenir un nombre égal de signes positifs et négatifs. Cependant, chaque rangée représente une expérience et chaque colonne représente une variable indépendante. Le Tableau II.3 montre les différents éléments nutritionnels utilisés ainsi que leurs concentrations.

Le modèle de Plackett-Burman est basé sur un modèle de premier ordre dont l'équation est la suivante:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (1)$$

Ou Y est la réponse (production du glutamate), β_0 est la constante, β_i le coefficient linéaire et X_i le niveau de la variable indépendante.

Tableau II.3. Les éléments nutritionnels utilisés dans le modèle de Plackett-Burman ainsi que leurs concentrations

Variables	Code de variable	Concentration minimale (-1)	Concentration maximale (+1)
Jus de datte (g.l ⁻¹)	X ₁	10	25
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.l ⁻¹)	X ₂	5	15
Urée (g.l ⁻¹)	X ₃	4	12
Peptone (g.l ⁻¹)	X ₄	5	15
Corn steep liquor (g.l ⁻¹)	X ₅	5	20
Extrait de levure (g.l ⁻¹)	X ₆	5	20
Biotine (mg.l ⁻¹)	X ₇	0.5	5
Thiamine (mg.l ⁻¹)	X ₈	10	30
Bétaine (g.l ⁻¹)	X ₉	0.5	5
Na ₂ HPO ₄ (g.l ⁻¹)	X ₁₀	1	10
KH ₂ PO ₄ (g.l ⁻¹)	X ₁₁	0.5	5
MgSO ₄ (g.l ⁻¹)	X ₁₂	0.2	0.6
FeSO ₄ (mg.l ⁻¹)	X ₁₃	2.5	15
ZnSO ₄ (mg.l ⁻¹)	X ₁₄	0.5	2.5
CuCl ₂ (mg.l ⁻¹)	X ₁₅	0.1	0.7
MnSO ₄ (mg.l ⁻¹)	X ₁₆	2.5	10
NaCl (g.l ⁻¹)	X ₁₇	0.5	2.5
CaCl ₂ (mg.l ⁻¹)	X ₁₈	20	100
CaCO ₃ (g.l ⁻¹)	X ₁₉	5	20

II.7.2. Le modèle de Box-Behnken

Le modèle Box-Behnken (Box et Behnken, 1960) est une classe des modèles rotatoires ou presque rotatoires du second ordre. Il est basé sur des modèles factoriels incomplets de trois niveaux. Le nombre des expériences (N) nécessaire pour le développement du modèle Box-Behnken est défini comme $N = 2k(k-1) + C_0$, (ou k est le nombre des facteurs et C_0 est le nombre des points centrales). Le Box-Behnken est un bon modèle pour la méthodologie nommée « response surface », il permet : (i) l'estimation des paramètres du modèle quadratique (ii) la détection des lacunes d'ajustement du modèle (iii) l'utilisation des blocs (Ferreira et *al.*, 2007). Cette approche a été largement utilisée dans les processus d'optimisation des conditions de fermentation. Il a été aussi utilisé pour la production des enzymes (Adinarayana et Ellaiah, 2002; Park et *al.*, 2002; Puri et *al.*, 2002), la production d'autres métabolites (Hujanen et *al.*, 2001; Sadhukan et *al.*, 1999; Sunitha et *al.*, 1998; Zhang et *al.*, 1996), la production de spores (Yu et *al.*, 1997) et la production de biomasse (Lhomme et Roux, 1991).

Après l'identification des composantes qui affectent la production d'acide glutamique, le modèle de Box-Behnken a été appliqué afin d'optimiser les principales variables, qui ont été sélectionnées par le modèle de Plackett-Burman.

Après avoir optimiser les paramètres nutritionnels, les paramètres physiques (agitation, pH et taux d'inoculum) ont été également optimisés par le modèle de Box-Behnken dans une troisième étape. Ces trois facteurs sont représentés en trois niveaux codés par -1, 0, et +1 pour la concentration minimale, moyenne et maximale respectivement. Le Tableau II.4 représente les facteurs utilisés ainsi que leurs niveaux. 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 (la production d'acide glutamique). La forme générale de l'équation polynomiale du second ordre est la suivante :

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

Y_i est la réponse, β_0 est la constante du modèle, X_i, X_j sont les variables indépendantes, β_i est le coefficient linéaire, β_{ij} est le coefficient d'interaction et β_{ii} est le coefficient quadratique. L'analyse de régression des données a été réalisée par le logiciel JMP 6 Discovery.

Tableau II.4. Les niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs physiques

Variables (g.l ⁻¹)	Code des variables	-1	0	+1
Agitation	X ₁	260	330	400
pH	X ₂	6.3	7.3	8.3
Taux d'inoculum	X ₃	5	10	15

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Evaluation de l'effet des différents facteurs nutritionnels sur la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant le modèle statistique Plackett-Burman

Cette partie consiste à l'utilisation du modèle statistique Plackett-Burman afin d'étudier les besoins nutritionnels de *Corynebacterium glutamicum* 2262. Elle a pour but de décrire les effets de la source carbonée, des sources azotées, des sels minéraux et des vitamines sur la croissance et la production d'acide glutamique. Cependant, ce modèle ne permet pas l'étude des interactions présentes entre les différents éléments. Les objectifs fixés sont :

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

III.1.1. Évaluation des facteurs nutritionnels qui affectent la production du glutamate

Le modèle Plackett-Burman a été appliqué afin de déterminer l'importance des différents facteurs. A partir des travaux antérieurs de Mouffok. (2007), 19 facteurs nutritionnels ont été choisis dans ce processus d'optimisation ou chaque facteur est représenté par deux niveaux. On appliquant le modèle sur ces 19 facteurs, on obtient une matrice de 20 expériences représentée dans le Tableau III.1. Ces expériences ont été réalisées en discontinue et pour chaque expérience la concentration en acide glutamique correspondante est calculée (Tableau III.1.). En effet, les données du Tableau III.1 montrent une grande variation, la concentration du glutamate varie de 1 à 23,90 (g.l⁻¹). Cette variation montre la nécessité de l'optimisation du milieu afin d'atteindre une production plus élevée. Suite à l'analyse des résultats obtenus en utilisant le logiciel de JMP 6 Discovery, l'intervalle de confiance ainsi que l'effet des différents facteurs sur la production d'acide glutamique ont été calculés et présentés dans le Tableau III.2. et Figure III.1.

Il faut noter que l'analyse des résultats est basée sur les points suivants :

- Lorsque l'intervalle de confiance d'un facteur est > 95% et son effet est positif; le facteur mérite une optimisation, sinon il sera utilisé à une concentration maximale.
- Lorsque l'intervalle de confiance est > 95% et son effet est négatif; le facteur mérite une optimisation, sinon il sera utilisé à une concentration minimale.
- Lorsque l'intervalle de confiance est < 95% et son effet est positif; le facteur sera utilisé à une concentration maximale.
- Lorsque l'intervalle de confiance est < 95% et son effet est négatif; le facteur sera éliminé des prochaines expériences.

Il ressort de ces résultats que l'intervalle de confiance est inférieur à 95% pour les éléments suivants : (NH₄)₂SO₄, C.S.L., biotine, thiamine, CaCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, CuCl₂, NaCl, CaCO₃. Ces éléments sont considérés comme des éléments non significatifs. Le reste des éléments, jus de datte, urée, peptone, extrait de levure, bétaine et MnSO₄ possèdent un intervalle de confiance supérieur à 95%. Ils sont considérés comme des éléments significatifs.

Parmi les facteurs qui ont un effet significatif; l'urée, l'extrait de levure, le jus de datte, la bétaine et la peptone sont considérés comme les éléments les plus significatifs et qui affectent le plus la production du glutamate avec un intervalle de confiance de 99,99%, 99,97%, 99,95%, 99,55% et 98,34% respectivement. Ils ont été pris en considération dans le prochain processus d'optimisation. Cependant, l'extrait de levure n'a pas été retenu due à son cout élevé.

KH_2PO_4 , C.S.L. CaCl_2 , biotine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et MgSO_4 ont un effet positif sur la production d'acide glutamique avec un intervalle de confiance de 78.41, 73.52%, 64.69%, 22.46%, 17.44% et 0.16% respectivement. Pour cela, leurs concentrations maximales ont été utilisées pour les prochaines expériences d'optimisation. En effet, Joji *et al.* (1965) ont montré que *Corynebacterium glutamicum* est très sensible à la biotine et peut présenter un effet inhibiteur de la production d'acide glutamique.

MnSO_4 , CaCO_3 possèdent un effet négatif sur la production d'acide glutamique avec un intervalle de confiance de 97.42% et 94.62% respectivement. Leurs concentrations minimales ont été utilisées pour les prochaines expériences d'optimisation. En effet le carbonate de calcium doit être ajouté dans le milieu de culture au début de la fermentation afin de maintenir un pH optimal (Kinoshita, 1972). L'importance du carbonate de calcium a été aussi étudiée par Wang *et al.* (1991) qui ont montré que l'ajout de quantités minimales de carbonate de calcium est nécessaire même pour les cultures en fermenteurs dont le pH est contrôlé automatiquement par l'ajout de l'ammonium. Il permet de réduire le temps de la phase de latence de fermentation. L'importance est de même pour Mn^{+2} qui est utilisé comme cofacteur pour certaines enzymes du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* (Debay, 1997; Georgen *et al.*, 1997).

Na_2HPO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuCl_2 et le NaCl et La thiamine ont un effet négatif sur la production d'acide glutamique et leur intervalle de confiance est inférieur à 95%. Ils n'ont pas été choisis pour le reste des expériences.

Tableau III.1. Le modèle expérimental du Plackett-Burman évaluant les facteurs qui influencent la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	Glutamate (g.l ⁻¹)
1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	3.15
2	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	10.80
3	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	9.26
4	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	5.35
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	23.90
6	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	7.68
7	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6.58
8	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	13.97
9	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1.06
10	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	3.31
11	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	8.28
12	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	2.04
13	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	7.85
14	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	6.71
15	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	12.04
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.34
17	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	2.84
18	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	2.14
19	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	7.5
20	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	6.81

Exp : Expérience.

X₁-X₁₉ : les facteurs nutritionnels étudiés.

Tableau III.2. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Plackett-Burman

Variabes	Coefficient	Erreur standard	Propabilité (P)	Intervalle de confiance (%)
Jus de datte	1.728125	0.4320774	0.0005	99.95
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.09486364	0.4302882	0.8256	17.44
Urée	3.297875	0.4320774	0.0001	99.99
Peptone	1.09504545	0.4302882	0.0166	98.34
Corn steep liquor	0.48613636	0.4302882	0.2648	73.52
Extrait de levure	1.77295455	0.4302882	0.0003	99.97
Biotine	0.12286364	0.4302882	0.7754	22.46
Thiamine	-0.592875	0.4320774	0.1782	82.18
CaCl ₂	0.404875	0.4320774	0.3531	64.69
Bétaine	1.33386364	0.4302882	0.0045	99.55
Na ₂ HPO ₄	-0.282875	0.4320774	0.5145	48.55
KH ₂ PO ₄	0.54113636	0.4302882	0.2159	78.41
MgSO ₄	0.000875	0.4320774	0.9984	0.16
FeSO ₄	-0.361875	0.4320774	0.4057	59.43
ZnSO ₄	-0.3200455	0.4302882	0.4596	54.04
CuCl ₂	-0.7389545	0.4302882	0.0953	90.47
MnSO ₄	-1.0111364	0.4302882	0.0258	97.42
NaCl	-0.2839545	0.4302882	0.5112	48.88
CaCO ₃	-0.8630455	0.4302882	0.0538	94.62

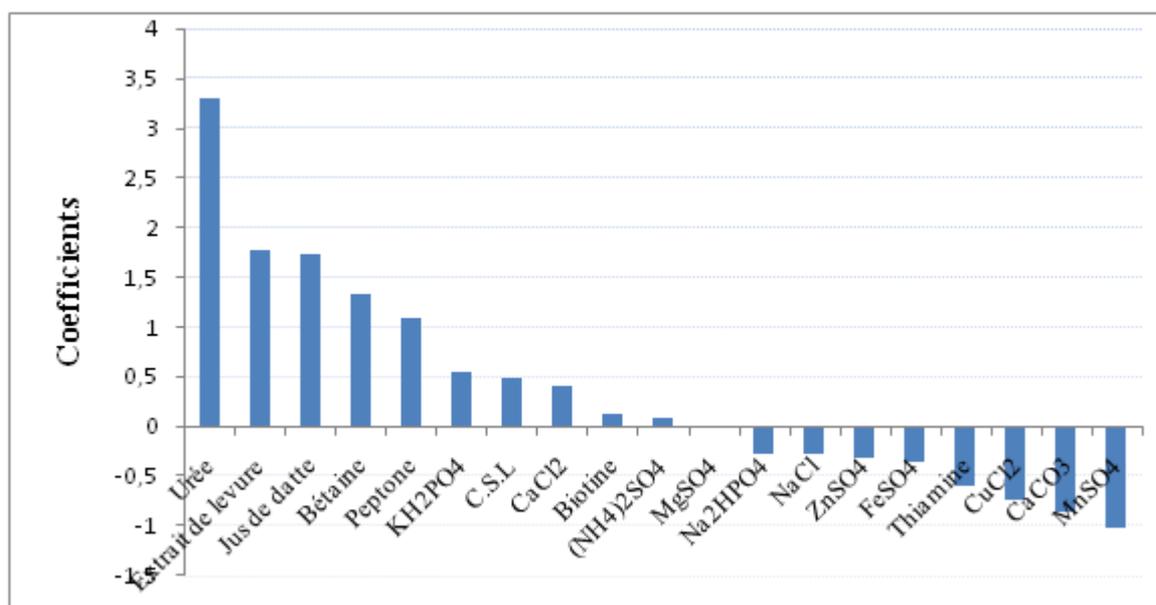


Figure III.1. Effet des différents facteurs nutritionnels sur la production du glutamate (g.l⁻¹) par *Corynebacterium glutamicum* 2262

III.1.1.2. Étude de l'effet des différents paramètres nutritionnels sur la croissance et la production d'acide glutamique

L'étude cinétique des différentes expériences a été également suivie. Vingt expériences ont été réalisées en cultures discontinues. Tous les essais ont été effectués dans les mêmes conditions opératoires: pH 7,3 régulé au début de la fermentation par le NaOH; température 33°C; agitation 330 rpm; inoculum 10 % (v/v). L'inoculation des erlenmeyers a été faite à partir d'une préculture préparée en erlenmeyer de 500 ml et âgée de 14 heures de culture, le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle. Le choc thermique (39°C) a été réalisé après 4 heures de culture pendant la phase exponentielle.

Plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III.3.

Tableau III.3. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 des vingt expériences du modèle Plackett-Burman en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate,

(μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (Q_p) : vitesse spécifique de production du substrat, (δ) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique

Expérience	X max (g.l ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Glutamate max (g.l ⁻¹)	δ (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Q_p
1	16,6	0,30	3,15	0,95	0,01
2	9,36	0,18	10,80	3,25	0,04
3	23,36	0,15	9,26	2,80	0,02
4	25,12	0,26	5,35	2,65	0,01
5	9,96	0,52	23,90	7,25	0,08
6	35,04	0,64	7,68	2,30	0,02
7	12,72	0,14	6,58	2,00	0,02
8	16,44	0,16	13,97	4,25	0,05
9	23	0,13	1,06	0,55	0,00
10	16	0,17	3,31	2,75	0,02
11	16,56	0,59	8,28	2,50	0,03
12	7	0,20	2,04	0,80	0,01
13	13,76	0,17	7,85	3,15	0,04
14	11,52	0,18	6,71	2,70	0,04
15	15,48	0,13	12,04	3,65	0,02
16	8,64	0,27	1,34	0,40	0,00
17	10,72	0,20	2,84	0,85	0,00
18	15,48	0,07	2,14	0,65	0,00
19	8,24	0,12	7,5	3,75	0,05
20	18,84	0,13	6,81	2,05	0,01

Ces résultats montrent que la concentration maximale en acide glutamique et la productivité volumétrique ont un optimum au niveau de l'expérience cinq. Les valeurs optimales sont respectivement 23,90 (g.l⁻¹) et 7,25 (g.l⁻¹.h⁻¹) (Tableau III.3. et Figure III.2.)

Par ailleurs, il ressort de ces résultats que la croissance n'est pas liée à la production d'acide glutamique. En effet, avec une biomasse de 35,04 (g.l⁻¹) la production maximale d'acide glutamique est de 7,68 (g.l⁻¹) et de l'acide lactique est de 3,91 (g.l⁻¹) inférieure à celle obtenue avec une biomasse de 9,96 (g.l⁻¹) dont la production maximale d'acide glutamique est de 23,90 (g.l⁻¹) et de l'acide lactique est de 18,96 (g.l⁻¹). Les résultats des paramètres cinétiques de l'expérience cinq sont représentés dans la Figure III.2.

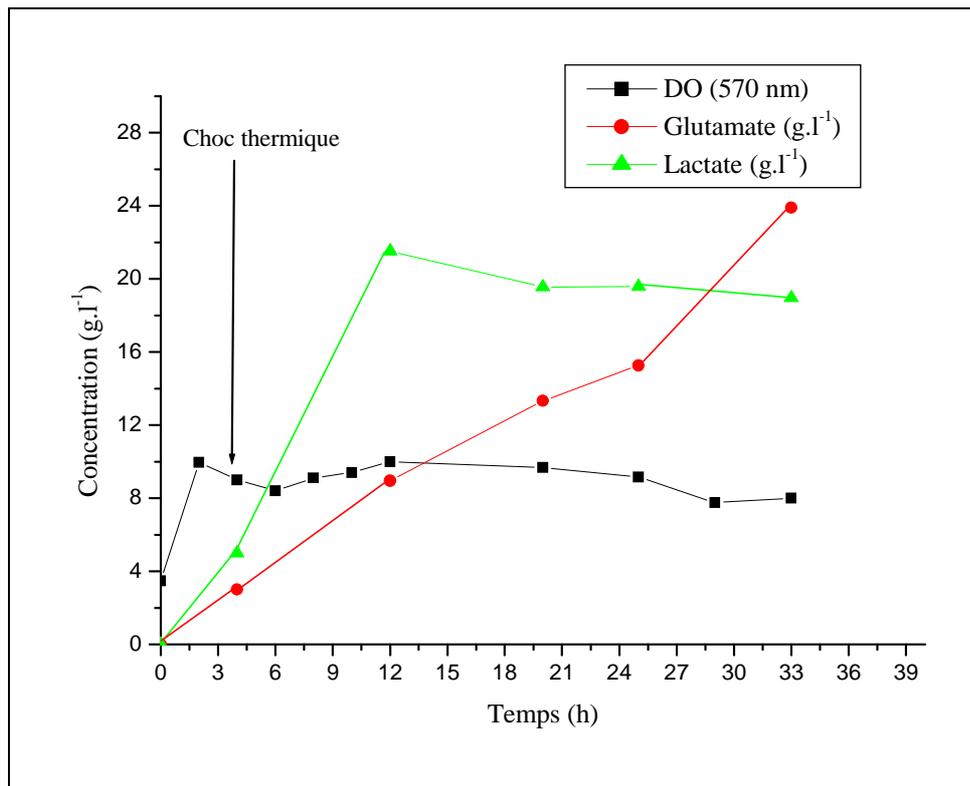


Figure III.2. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Plackett-Burman en culture discontinue

On remarque que plus la concentration de l'acide glutamique est importante moins sera la concentration de l'acide lactique.

L'analyse des résultats issus du modèle de Plackett-Burman a permis de diviser les 19 facteurs en trois types : les éléments retenus, les éléments éliminés et les éléments à optimiser. Ces trois types sont représentés dans le Tableau III.4.

Tableau III.4. Tableau représentatif de l'analyse des résultats obtenus suite à l'application du modèle Plackett-Burman

Les éléments retenus		Les éléments éliminés	Les éléments à optimiser
Concentration maximale	Concentration Minimale		
C.S.L.	MnSO ₄	Extrait de levure	Jus de datte
(NH ₄) ₂ SO ₄	CaCO ₃	Na ₂ HPO ₄	Urée
KH ₂ PO ₄		FeSO ₄	Peptone
biotine		ZnSO ₄	Bétaine
CaCl ₂		CuCl ₂	
MgSO ₄		NaCl	
		Thiamine	

III.2. Mise au point et optimisation d'un milieu de culture à base de jus de dattes par le modèle de Box-Behnken

Le modèle de Plackett-Burman utilisé a révélé les principaux facteurs nutritionnels qui ont un effet positif sur la production d'acide glutamique. Pour cela, nous avons essayé dans cette deuxième partie de ce travail d'appliquer un deuxième modèle statistique appelé le modèle de Box-Behnken sur ces principaux facteurs nutritionnels obtenus. Les objectifs fixés sont :

- Etude des interactions possibles entre les différents facteurs.
- Estimer l'effet quadratique.
- Déterminer les concentrations optimales des différents facteurs.

III.2.1. Optimisation des conditions de culture par le modèle de Box-Behnken

Le modèle de Box-Behnken est un moyen important pour la détermination des interactions présentes entre les différents facteurs ainsi que la détermination de leurs concentrations optimales. Basé sur les résultats obtenus à partir du modèle de Plackett-Burman, les éléments qui possèdent un effet significatif sur la production d'acide glutamique et qui présentent un intervalle de confiance important tel que le jus de datte, l'urée, la peptone et la bétaine ont été sélectionnés pour une optimisation en utilisant le modèle de Box-Behnken. Ces éléments sont représentés par trois niveaux (-1), (0) et (+1) pour la concentration minimale, moyenne et maximale respectivement (Tableau III.5). Les autres éléments qui ont été retenues dans le milieu de production sont donnés dans le Tableau III.6.

On appliquant le modèle sur les quatre facteurs, on obtient une matrice composée de 27 expériences. Ces expériences ont été réalisées en discontinue. Les résultats ont été analysés par l'analyse de régression et le Tableau III.7 montre les conditions expérimentales ainsi que les résultats de la production d'acide glutamique obtenue pour chaque expérience.

L'analyse de régression a été réalisée par le logiciel JMP 6 Discovery. Cette analyse a permis de confirmer la fiabilité du modèle quadratique. En effet, La valeur de la probabilité P a été obtenue afin de déterminer l'effet significatif de chaque paramètre. Plus la valeur de P est petite, plus le coefficient du paramètre est significatif (Murthy *et al.*, 2000). Dans notre cas la valeur de P du modèle est de 0,005 ce qui confirme le bon choix du modèle.

Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité correspondantes (P) sont donnés dans le Tableau III.8. À partir de ces derniers, on peut conclure que les deux coefficients linéaires (jus de datte et urée), le coefficient quadratique (urée \times urée) et les coefficients d'interaction (jus de datte \times urée) et (urée \times peptone) sont significatifs. En effet, l'équation (1) montre que la concentration du glutamate est influencée par les interactions entre les variables indépendantes du premier ordre (jus de datte), (urée), (jus de datte \times urée) et (urée \times peptone) et du second ordre polynomial (urée \times urée).

$$Y = 24.253 + 3.139X_1 + 4,303X_2 - 2,375X_3 + 2.439X_4 - 0.33X_1X_1 - 11.92X_2X_2 + 0.33X_3X_3 - 3.36X_4X_4 + 5.66X_1X_2 - 0.62X_1X_3 + 1.72X_1X_4 - 6.80X_2X_3 + 0.64X_2X_4 + 1.16X_3X_4 \quad (1)$$

Y est la réponse, X_1 , X_2 , X_3 et X_4 sont des variables indépendantes.

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

La Figure III.3 a, b représente l'effet de l'urée et du jus de datte ainsi que leurs interactions réciproques sur la production du glutamate. La concentration maximale du glutamate se situe dans l'intervalle de 35 à 45 (g.l⁻¹) pour le jus de datte et de 15 à 17 (g.l⁻¹) pour l'urée.

La Figure III.4 a, b représente l'effet de l'urée et de la peptone ainsi que leurs interactions réciproques sur la production du glutamate. La concentration maximale du glutamate se situe dans l'intervalle de 14 à 16 (g.l⁻¹) pour la peptone et de 15 à 17 (g.l⁻¹) pour l'urée.

Tableau III.5. Les niveaux choisis pour l'optimisation des facteurs nutritionnels

Variables (g.l ⁻¹)	Code des variables	-1	0	+1
Jus de datte	X ₁	25	35	45
Urée	X ₂	10	14	18
Peptone	X ₃	15	20	25
Bétaine	X ₄	5	10	15

Tableau III.6. Les éléments nutritionnels utilisés par le modèle de Box-Behnken ainsi que leurs concentrations

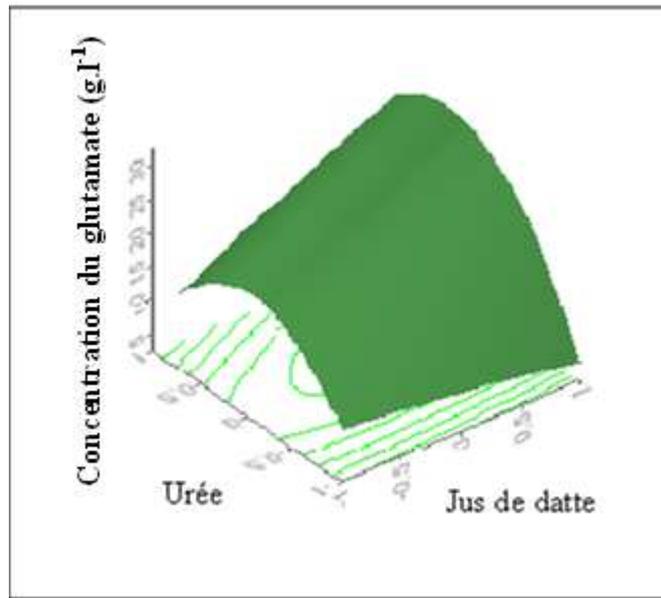
Variables	Concentration utilisée
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.l ⁻¹)	15
Corn steep liquor (g.l ⁻¹)	20
Biotine (mg.l ⁻¹)	5
KH ₂ PO ₄ (g.l ⁻¹)	5
MgSO ₄ (g.l ⁻¹)	0.6
MnSO ₄ (mg.l ⁻¹)	2.5
CaCl ₂ (mg.l ⁻¹)	100
CaCO ₃ (g.l ⁻¹)	5

Tableau III.7. Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet des différentes concentrations du jus de date, urée, peptone et bétaine sur la production d'acide glutamique

Expérience	Jus de datte	Urée	Peptone	Bétaine	Glutamate mesuré	Glutamate simulé
1	1	-1	0	0	6.57	5.479
2	-1	0	0	-1	21	18.557
3	-1	0	0	1	19.27	16.476
4	-1	1	0	0	6.57	8.104
5	1	0	-1	0	27	31.4
6	1	0	0	1	24.64	27.13
7	0	0	0	0	20.87	24.839
8	-1	0	1	0	21.17	20.21
9	1	1	0	0	29.55	24.971
10	0	-1	0	-1	7.77	2.32
11	0	0	0	0	21.97	24.591
12	0	0	-1	1	28	25.295
13	0	1	0	1	9.85	16.718
14	-1	-1	0	0	6.24	10.115
15	0	0	1	1	27	22.28
16	0	1	1	0	7.7	8.14
17	0	0	0	0	29.92	25.82
18	-1	0	-1	0	20.51	23.02
19	0	-1	-1	0	5.11	4.00
20	0	1	0	-1	7.73	9.56
21	0	1	-1	0	31.65	24.294
22	0	-1	0	1	7.33	6.176
23	0	-1	1	0	8.39	14.315
24	0	0	1	-1	12.58	16.462
25	1	0	1	0	25.18	23.471
26	1	0	0	-1	19.49	18.582
27	0	0	-1	-1	18.25	22.719

Tableau III.8. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken

Eléments	Effet	Erreur standard	<i>t</i> -Ratio	<i>P</i>
Constante	24.25	2.96	8.18	<0.0001
Jus de datte	3.13	1.48	2.12	0.0558
Urée	4.30	1.48	2.90	0.0133
Peptone	-2.37	1.48	-1.60	0.1352
Bétaine	2.43	1.48	1.65	0.1259
Jus de datte × urée	5.66	2.56	2.20	0.0477
Jus de datte × peptone	-0.62	2.56	-0.24	0.8133
Urée × peptone	-6.80	2.56	-2.65	0.0211
Jus de datte × bétaine	1.72	2.56	0.67	0.5157
Urée × bétaine	0.64	2.56	0.25	0.8074
Peptone × bétaine	1.16	2.56	0.45	0.6575
Jus de datte × Jus de datte	-0.33	2.22	-0.15	0.8831
Urée × urée	-11.92	2.22	-5.36	0.0002
Peptone × peptone	0.33	2.22	0.15	0.8829
Bétaine × bétaine	-3.36	2.22	-1.51	0.1557

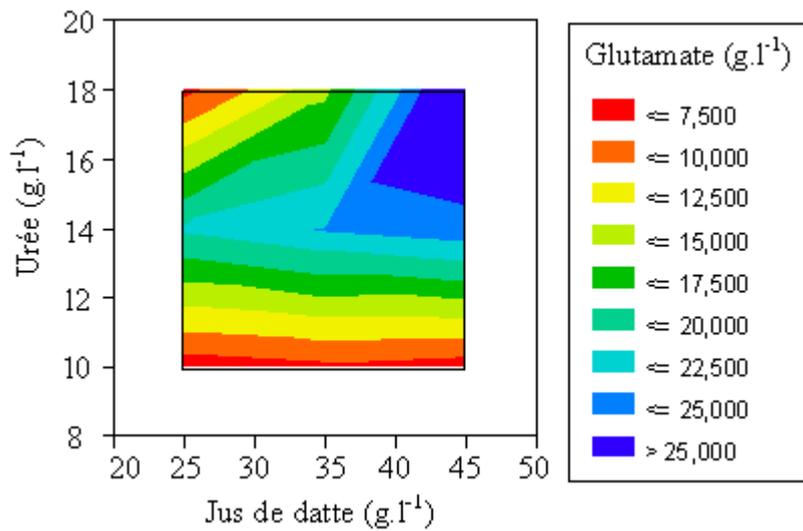


(a)

-1 : Concentration minimale.

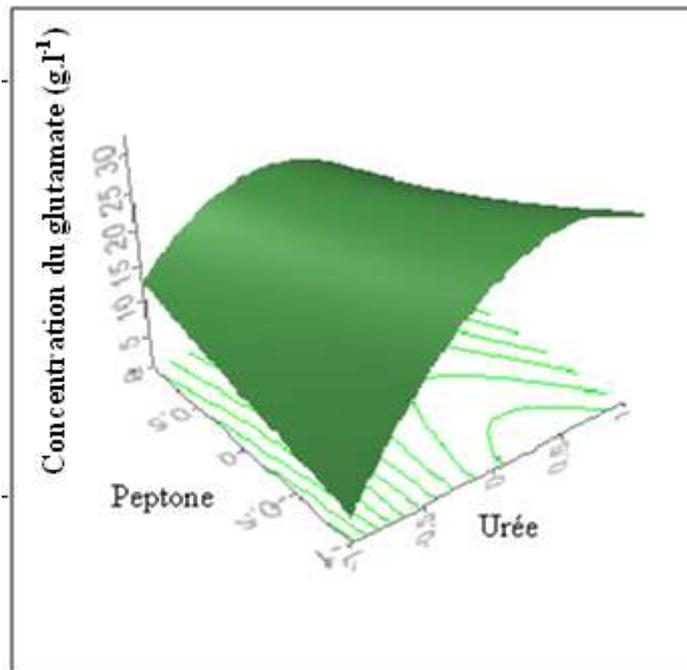
0 : Concentration moyenne.

+1 : Concentration maximale.



(b)

Figure III.3 a,b (a): Graphe tridimensionnel, (b): Contour plot de la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 montrant l'interaction entre l'urée et le jus de datte

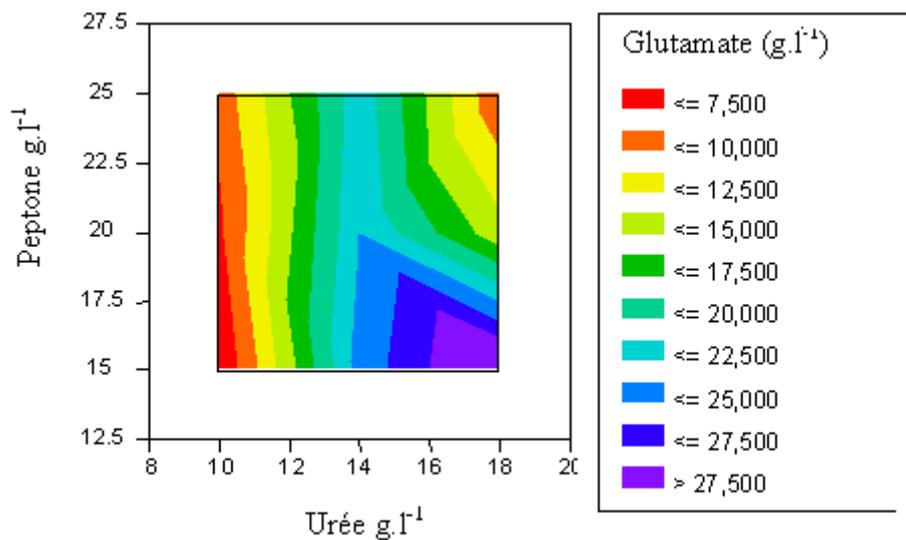


(a)

-1 : Concentration minimale.

0 : Concentration moyenne.

+1 : Concentration maximale.



(b)

Figure III.4. a,b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 montrant l'interaction entre l'urée et la peptone

III.2.2. Validation du modèle

Les valeurs optimales des différents facteurs ont été obtenues après la résolution de l'équation (1) en utilisant le logiciel JMP 6 Discovery. Les conditions optimales de la production d'acide glutamique estimées par l'équation du modèle sont les suivantes : jus de datte 45 (g.l⁻¹), urée 16.80 (g.l⁻¹), peptone 15 (g.l⁻¹) et bétaine 12 (g.l⁻¹). La concentration théorique d'acide glutamique simulé sous ces conditions est de 37 (g.l⁻¹). 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 33.2 (g.l⁻¹). Les résultats obtenus confirment la validité du modèle de Box-Behnken. Ils montrent aussi que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable. Les conditions nutritionnelles optimales obtenues suite à l'application du modèle Box-Behnken sont représentés dans le Tableau III.9.

Tableau III.9. Le milieu nutritionnel optimal de production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262

Variables	Concentrations
Jus de datte (g.l ⁻¹)	45
Urée (g.l ⁻¹)	16.80
Peptone (g.l ⁻¹)	15
Bétaine (g.l ⁻¹)	12
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.l ⁻¹)	15
Corn steep liquor (g.l ⁻¹)	20
Biotine (mg.l ⁻¹)	5
KH ₂ PO ₄ (g.l ⁻¹)	5
MgSO ₄ (g.l ⁻¹)	0.6
MnSO ₄ (mg.l ⁻¹)	2.5
CaCl ₂ (mg.l ⁻¹)	100
CaCO ₃ (g.l ⁻¹)	5

III.2.3. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken

L'étude cinétique des différentes expériences a été également suivie. Vingt sept fermentations en culture discontinue ont été réalisées. L'interprétation des résultats obtenus est réalisée par le calcul des paramètres cinétiques. Les résultats sont représentés dans le Tableau III.10.

Tableau III.10. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 des 27 expériences du modèle Box-Behnken en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (Q_p) : vitesse spécifique de production du substrat, (δ) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique

Expérience	X max (g/l)	μ_{max} (h ⁻¹)	Glutamate max (g/l)	δ (g/l.h)	Q_p (g/g.h)
1	12,12	0,15	6,57	2,00	0,01
2	10,88	0,15	21	7,25	0,11
3	15,96	0,12	19,27	9,65	0,09
4	9,68	0,17	6,57	3,30	0,04
5	9,72	0,13	27	8,20	0,10
6	11,64	0,17	24,64	7,50	0,08
7	8,56	0,15	20,87	6,30	0,07
8	10,96	0,16	21,17	6,40	0,08
9	8,92	0,13	29,55	9,00	0,10
10	16,12	0,13	7,77	2,35	0,02
11	11,68	0,09	21,97	6,65	0,08
12	13,04	0,15	28	8,50	0,11
13	12,32	0,11	9,85	4,95	0,05
14	11,16	0,14	6,24	3,10	0,02
15	11,2	0,13	27	8,20	0,09
16	10,4	0,12	7,7	3,85	0,04
17	12,32	0,11	29,92	9,05	0,12
18	9,96	0,19	20,51	6,20	0,09
19	12,92	0,13	5,11	1,55	0,01
20	12,24	0,18	7,73	2,65	0,03
21	10,88	0,12	31,65	9,60	0,12
22	10,32	0,13	7,33	2,20	0,02
23	12	0,14	8,39	2,55	0,02
24	11,68	0,13	12,58	3,80	0,04
25	12,4	0,15	25,18	7,65	0,08
26	10,32	0,13	19,49	5,90	0,06
27	10,12	0,17	18,25	5,50	0,05

Il ressort de ces résultats que la croissance n'est pas liée à la production d'acide glutamique. En effet, avec une concentration en biomasse de 16,12 (g.l⁻¹) la production maximale d'acide glutamique est de 7,77 (g.l⁻¹) inférieure à celle obtenue avec une biomasse de 10,88 (g.l⁻¹) dont la production maximale d'acide glutamique est de 31,65 (g.l⁻¹).

On remarque aussi que la concentration maximale en acide glutamique 31,65 (g.l⁻¹), la productivité volumétrique d'acide glutamique 9,60 (g.l⁻¹.h⁻¹) ainsi que la vitesse de production de glutamate 0,12 (g.g⁻¹.h⁻¹) sont supérieures à celles obtenues par le modèle Plackett-Burman.

Après l'analyse de ces résultats obtenus suite à l'application du modèle de Box-Behnken, il était nécessaire d'étudier le comportement de *Corynebacterium glutamicum* sous les conditions optimales estimées par l'équation du modèle : jus de datte 45 (g.l⁻¹), urée 16.80 (g.l⁻¹), peptone 15 (g.l⁻¹) et bétaine 12 (g.l⁻¹). Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure III.5.

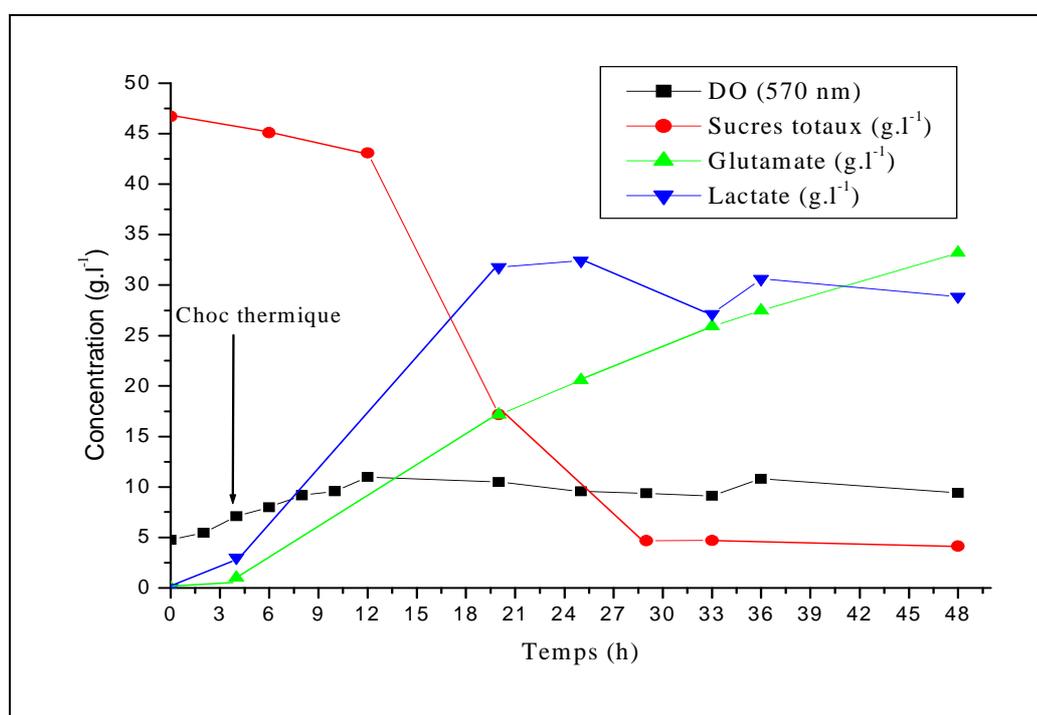


Figure III.5. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue

Afin d'interpréter les résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les principaux paramètres sont résumés dans le Tableau III.11.

Tableau III.11. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_p) : vitesse spécifique de production du substrat, (δ) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat.

X max (g.l⁻¹)	Glutamate max (g.l⁻¹)	μ_{\max} (h⁻¹)	q_p (g.g⁻¹.h⁻¹)	δ (g.l⁻¹.h⁻¹)	Taux de consommation du substrat (%)
10,97	33,20	0,10	0,10	6,90	91,13

Dans ces conditions, les meilleures performances de la production glutamique ont été obtenues, soit 33,20 (g.l⁻¹). Ceci confirme l'efficacité de la méthode statistique appliquée pour l'optimisation des conditions de culture. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que lorsque la souche se trouve dans des conditions optimales, elle a plutôt tendance à produire de l'acide glutamique que de former de la biomasse et du lactate.

III.3. Mise au point et optimisation des paramètres physiques

Après avoir optimisé le milieu nutritionnel de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant les modèles statistiques Plackett-Burman et Box-Behnken. Nous avons essayé dans la troisième partie de ce travail d'appliquer le modèle statistique Box-Behnken afin d'optimiser les principaux facteurs physiques qui affectent la production d'acide glutamique. Les objectifs fixés sont :

- Etude des différentes interactions possibles entre les facteurs physiques.
- Estimer l'effet quadratique.
- Déterminer les valeurs optimales des facteurs physiques.

III.3.1. Optimisation des paramètres physiques

Dans le but de favoriser la production d'acide glutamique, une optimisation des conditions physiques a été réalisée. Le pH, l'agitation et le taux d'inoculum sont considérés comme étant les paramètres physiques qui contrôlent le plus la production du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262. Pour cela, le modèle expérimentale de Box-Behnken a été appliqué afin d'analyser les interactions présentes entre ces paramètres et de déterminer leurs conditions optimales qui permettent une meilleure production de glutamate. Le milieu nutritionnel utilisé est celui obtenu ultérieurement suite à l'application combiné du modèle Plackett-Burman et Box-Behnken. La matrice du modèle et les résultats des expériences sont représentés dans le Tableau III.12. Ces résultats ont été analysés en utilisant le logiciel JMP 6 Discovery. Le modèle est représenté par l'équation de régression (2) :

$$Y = 30.393 + 4.3725 X_1 + 0.715 X_2 + 2.6725 X_3 - 3.641667 X_1X_1 - 1.751667 X_2X_2 - 5.571667 X_3X_3 + 1.025 X_1X_2 + 0.25 X_1X_3 + 0.915 X_2X_3 \quad (2)$$

Y est la réponse, X_1 , X_2 et X_3 sont des variables indépendantes.

Les coefficients de régression et les valeurs de probabilité (P) correspondantes sont représentés dans le Tableau III.13. À partir des valeurs de probabilités des différents termes (P), les variables qui ont plus d'effet sur la production d'acide glutamique sont les deux coefficients linéaires (agitation et taux d'inoculum) et le coefficient quadratique (taux d'inoculum²). L'importance du débit d'air pour la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 a été étudiée par Tavakkoli et al. (2009). Ils ont montré que la variation du débit d'air peut affecter la production de glutamate. En effet, le contrôle du débit d'air à son optimum est essentiel pour une production maximale de glutamate.

Le taux d'inoculum a montré un effet positif sur la production de glutamate. Cela est en accord avec les résultats obtenus par Perego et al. (2003) qui ont montré l'importance de l'inoculum comme facteur de fermentation. Parton et Willis (1990), ont montré que l'état physiologique des microorganismes affecte le taux de production de glutamate. Ces résultats ont été confirmés par Tavakkoli et al. (2009) ou ils ont obtenu une concentration de 36.64 mg.ml⁻¹ avec un inoculum de 10 heures et un taux d'inoculum de 2% (v/v).

Tableau III.12. Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet d'agitation, pH et taux d'inoculum sur la production d'acide glutamique

Expérience	Agitation	pH	Taux d'inoculum	Glutamate mesuré	Glutamate simulé
1	0	1	1	29.44	27.37
2	-1	0	1	19.88	19.23
3	0	-1	1	23.43	24.11
4	-1	-1	0	20.97	20.93
5	1	1	0	31.08	31.11
6	-1	0	-1	16.42	14.38
7	-1	1	0	17.6	20.31
8	0	1	-1	20.88	20.19
9	0	-1	-1	18.53	20.59
10	0	0	0	29.17	30.39
11	1	-1	0	30.35	27.63
12	0	0	0	28.81	30.39
13	1	0	-1	21.98	22.63
14	1	0	1	26.44	28.47
15	0	0	0	33.2	30.39

Tableau III.13. Coefficients de régression du modèle quadratique et leurs significations

Éléments	Effet	Erreur standard	<i>t Ratio</i>	<i>P</i>
Constante	30.393	1.737062	17.50	<0.0001
Agitation	4.3725	1.063729	4.11	0.0093
Ph	0.715	1.063729	0.67	0.5313
Taux d'inoculum	2.6725	1.063729	2.51	0.0537
Agitation × pH	1.025	1.50434	0.68	0.5259
Agitation × taux d'inoculum	0.25	1.50434	0.17	0.8745
pH × taux d'inoculum	0.915	1.50434	0.61	0.5696
Agitation × agitation	-3.641667	1.565767	-2.33	0.0676
pH × pH	-1.751667	1.565767	-1.12	0.3141
Taux d'inoculum × taux d'inoculum	-5.571667	1.565767	-3.56	0.0162

III.3.2. Validation du modèle

La validation du modèle a été réalisée par l'application des conditions théoriques optimales suivantes : un taux d'inoculum de 11.5% (v/v) sous un pH de 7.78 et une agitation de 377 rpm. Sous ces conditions, la concentration théorique en glutamate est de 32.44 (g.l⁻¹) alors que la concentration expérimentale en glutamate est de 39.16 (g.l⁻¹). Ces résultats confirment la validité du modèle. En effet, la valeur expérimentale est proche de la valeur théorique.

III.3.3. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken

L'étude cinétique des différentes expériences du modèle a été également suivie. Quinze fermentations en culture discontinue ont été réalisées. Les cultures ont été réalisées sous les conditions nutritionnelles obtenues suite à l'optimisation par le modèle du Box-Behnken. Les paramètres physiques font l'objet de cette nouvelle optimisation. L'interprétation des résultats obtenus est réalisée par le calcul des paramètres cinétiques. Les résultats sont représentés dans le Tableau III.14.

Tableau III.14. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 des 27 expériences du modèle Box-Behnken en cultures discontinues. (X) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (q_p) : vitesse spécifique de production du substrat, (δ) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique

Expérience	X max (g.l ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Glutamate max (g.l ⁻¹)	δ (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	q_p (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
1	13,2	0,09	29,44	6,15	0,06
2	12,88	0,12	19,88	4,15	0,04
3	13,36	0,08	23,43	4,90	0,04
4	10,84	0,10	20,97	4,35	0,04
5	13,2	0,08	31,08	6,45	0,05
6	8,72	0,12	16,42	3,40	0,04
7	10,4	0,08	17,6	3,65	0,04
8	10,68	0,08	20,88	5,80	0,05
9	9,68	0,15	18,53	7,40	0,09
10	11,2	0,12	29,17	8,10	0,07
11	12,08	0,12	30,35	6,30	0,05
12	10,96	0,09	28,81	6,00	0,06
13	10,48	0,11	21,98	4,55	0,04
14	12,28	0,11	26,44	7,35	0,06
15	11,32	0,10	33,2	6,90	0,06

Après l'analyse des résultats obtenus suite à l'application du modèle de Box-Behnken, il était nécessaire d'étudier le comportement de *Corynebacterium glutamicum* sous les conditions optimales estimées par l'équation du modèle : un taux d'inoculum de 11.5% (v/v), un pH de 7.78 et une agitation de 377 rpm. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure III.6

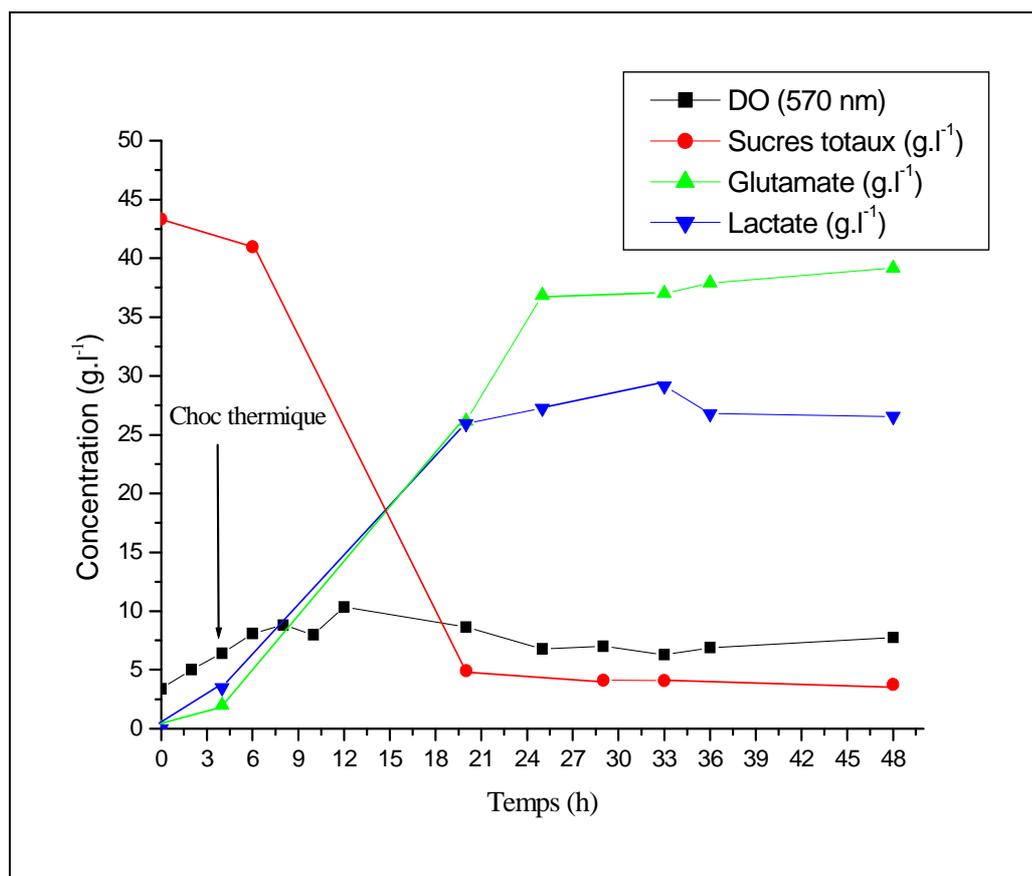


Figure III.6. Cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sous les conditions de cultures physiques optimisées par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue

Afin d'interpréter les résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Les principaux paramètres sont résumés dans le Tableau III.15.

Tableau III.15. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 milieu de culture optimisé par le modèle de Box-Behnken en culture discontinue. (**X**) : biomasse, le glutamate, (μ_{\max}) vitesse spécifique maximale de croissance, (Q_p) : vitesse spécifique de production du substrat, (δ) : productivité volumétrique de production d'acide glutamique, (%) : pourcentage d'utilisation du substrat

X max (g.l⁻¹)	Glutamate max (g.l⁻¹)	μ_{\max} (h⁻¹)	Q_p (g.g⁻¹.h⁻¹)	δ (g.l⁻¹.h⁻¹)	Taux de consommation du substrat (%)
10,36	39,16	0,14	0,07	6,91	91,34

Dans ces conditions, les meilleures performances de la production glutamique ont été obtenues, soit 39,16 (g.l⁻¹). Ceci confirme l'efficacité de la méthode statistique appliquée pour l'optimisation des conditions de culture. On remarque que la concentration d'acide glutamique 39,16 (g.l⁻¹), la productivité 6,91 (g.l⁻¹.h⁻¹) et le taux de consommation du substrat (91,34%) sont supérieures à celles obtenues suite à l'optimisation des paramètres nutritionnels par le modèle de Box-Behnken. Alors que la concentration maximale en acide lactique obtenue 29,15 (g.l⁻¹) est inférieure à celle obtenue par optimisation nutritionnelle 32,42 (g.l⁻¹).

Il ressort de tous ces résultats que les techniques statistiques appliqués pour l'optimisation de la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 ont permis de révéler l'effet des éléments nutritionnels sur la production d'acide glutamique en appliquant le modèle statistique Plackett-Burman. Ensuite l'optimisation des facteurs nutritionnels et physiques par le modèle de Box-Behnken a permis d'augmenter la production en acide glutamique (39,16 g.l⁻¹).

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

L'objectif principal de ce travail était la mise au point et l'optimisation d'un milieu de culture à base de jus de datte pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture discontinue par des techniques statistiques.

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

La première partie du travail a essentiellement été basée sur l'évaluation de l'effet des différents éléments nutritionnels sur la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant le modèle statistique Plackett-Burman. Nous avons montré que les facteurs qui exècrent le plus d'effet sur la production d'acide glutamique sont les suivants : Urée, le jus de datte, bétaine et la peptone. Ils sont considérés comme les éléments les plus significatifs avec un intervalle de confiance de 99,99%, 99,95%, 99,55% et 98,34% respectivement.

La deuxième partie de ce travail consiste à l'optimisation de la concentration des éléments issus du modèle Plackett-Burman en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Les résultats obtenus ont permis de déterminer les concentrations optimales respectives: 45; 16,86; 15 et 12,04 (g.l⁻¹) du jus de datte, urée, peptone et bétaine. Sous ces conditions la concentration expérimentale de glutamate obtenue est de 33,20 (g.l⁻¹), ce qui proche de la concentration simulée par l'équation du modèle 37 (g.l⁻¹). Ceci, confirme la validité du modèle.

La troisième partie de ce travail est consacré à l'optimisation des facteurs physiques (agitation, pH et taux d'inoculum) qui influent sur la production de glutamate par le *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Les résultats obtenus ont permis d'avoir une concentration expérimentale en glutamate de 39,16 (g.l⁻¹) après l'application de valeurs optimales suivantes : taux d'inoculum (11,5% v/v), pH (7,78) et agitation (377 rpm). L'application des méthodes statistiques à permis d'améliorer les performances de la production de glutamate (39,16 g.l⁻¹) par rapport aux techniques conventionnelles (11.90 g.l⁻¹).

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

Conclusion générale et perspectives

- L'étude de l'effet de variation du débit d'air sur la production d'acide glutamique.
- L'étude de l'effet de l'âge d'inoculum sur la production d'acide glutamique.
- Utiliser le mode de culture semi-continue pour éviter le problème d'inhibition par excès de substrat et le mode de culture continue pour la production continue du glutamate.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abe S., Takayama K. et Kinoshita S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol*, **13**, 279–301.

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. et Baghlaf A.O. (1993). Utilization of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, **58**, 77–79.

Adinarayana K. et Ellaiah P. (2002). Response surface optimization of the critical medium components for this production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, **5(3)**, 272-278.

Ahmed J., Ramaswamy H. S. et Khan A. R. (2005). Effect of water activity on glass transitions of date paste. *Journal of Food Eng*, **66**, 253–258.

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.

Alhamdan A. M. et Hassan B. H. (1999). Water sorption isotherms of date pastes as influenced by date cultivar and storage temperature. *Journal of Food Eng*, **39**, 301–306.

Alais C. et Linden G. (1997). *Biochimie alimentaire*. 4^e Edition Masson, Paris.

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

Al-Shahib W. et Marshall R.J. (2002). Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera L.* *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **54**, 247-259.

Amellal H. (2008). Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : Formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Mémoire Magister, Boumerdes, 131p.

Antony J. (2006). Taguchi or classical design of experiments: a perspective from a practitioner. *Sens Rev*, **26**, 227–230.

Baeshin N.A., Abou-Zeid A.Z.A. et Baghlaf A.O. (1993). The production of oxytetracycline in a date medium by different mutants of *Streptomyces rimosus* induced by dry and wet heat. *Biores. Technol*, **44(3)**, 259-261.

Barreveld W.H. (1993). Date palm products. *FAO Agricultural Services Bulletin No. 101*. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.

Benchabane A. (1996). Rapport de synthèse de l'atelier « Technologie et qualité de la datte ». In options méditerranéens, série A, N° 28. Séminaire méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain, 205-210.

Bessah R. et Touzi A. (2001). Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren*, 37-40.

Bormann E.R., Eikmanns B.J. et Sahm H. (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol*, **6**, 317-326.

Bousdira K. (2007). Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes des cultivars les plus connus de la région du Mزاب, classification et évaluation de la qualité. Mémoire Magister, Boumerdes, 149 p.

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.

Broer S., Eggling L. et Kramer R. (1993). Strain of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivity may have different lysine excretion systems. *App. Environ. Microbiol*, **59**, 316-321.

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

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 Eng*, **9**, 91-101.

Clement 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.

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.

Collins M.D., Goodfellow M. et Minnikin D.E. (1982). A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol*, **128**, 129-149.

Cook J.A. et Furr J.R. (1952) Sugars in the fruit of soft, semi-dry and dry commercial date varieties. *Date Growers' Institute*, Vol. **29**.

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

Daffe M. et Draper P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.*, **39**, 131–203.

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

Davin UY. (2003). Etude 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). Etude cinétique de la fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation physiologique par cytométrie en flux. Thèse INPL, Nancy.

Djerbi M. (1994). Précis de phoéniculture. FAO, 192p.

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.

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

Deming S.N. et Morgan S.L. (1988). *Experimental Design: A Chemometrix Approach*, Elsevier, New York, USA.

Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. et Bennamoun L. (2006). Application of a statistical design to the optimisation of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.*, **73** (2), 190-197.

Djouab A. (2007). Essai de formulation d'une margarine allégée à base d'un extrait de dattes Mech-Degla. Mémoire Magister, Boumerdès, 102 p.

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

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

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

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

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

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

Elke R.B., Bernhard J. E., Marcella G. et Hermann S. (1993). Glutamate Dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl & Environ Microbiol, **59** (7), 2329-2331.

Espinoza-Escalante F.M., Pelayo-Ortiz C., Gutiérrez-Pulido H., González-A´lvarez V., Alcaraz-González V. et Borjes A. (2008). Multiple response optimization analysis for pretreatments of Tequila's stillages for VFAs and hydrogen production. Bioresour Technol, **99**, 5822-5829.

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

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

Favier J.C., Ireland R.J., Laussucq C. et Feinberg M. (1993). Répertoire générale des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM Edition, Lavoisier. INRA Editions, 27-28.

Favier J.C., Ireland R.J., Toque C. et Feinberg M. (1995). Répertoire générale des aliments. Table de composition. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, INRA Editions, CNEVA et CIQUAI, 897.

Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S. et dos Santos W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Analytica Chimica Acta, **597**, 179-186.

Ganne V. et Mignot G. (1991). Application of statistical design of experiments to the optimization of factor VIII expression by CHO cells. Cytotechnology, **6**, 233-240.

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

Gourdon P. (1999). Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Thèse INSA, Toulouse.

- Gourdon P. et Lindley N.D.** (1999). Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, **1**, 224-231.
- Gourdon, P., Baucher, M.F., Lindley, N.D. et Guyonvarch, A.** (2000). Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2981-2987.
- Gualtieri M. et Rappaccini S.** (1994). Date stones in broiler's feeding. In *Technologie de la date*. Ed. GRIDAO, 35p.
- Gutmann M., Hoischen C. et Kramer R.** (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochem. Biophys. Acta*, **1112**, 115-123.
- Hermann T.** (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.*, **104**, 155-172.
- Hirasawa T., Wachi M. et Nagai K.** (2000). A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *itsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.*, **182**, 2696-2701.
- Hirose Y. et Okada H.** (1979). Microbial production of amino acids. In *Peppler H.J., Perlman D. (eds). Microbial Technol.* New York, Academic Press, pp. 211-240.
- Hoischen C. et Kramer R.** (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.*, **151**, 342-347.
- Hoischen C. et Kramer R.** (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3409-3416.
- Hucheng 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.
- Hujanen M., Linko S., Linko Y.Y. et Leisola M.** (2001). Optimization of cellulose production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30(2)**, 99-109.
- Jo S.J., Leong C.R., Matsumoto K. et Taguchi S.** (2009). Dual production of poly (3-hydroxybutyrate) and glutamate using variable biotin concentrations in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **107 (4)**, 409-411.
- Joji T., Kaetsu K., Yukio I. et Koichi Y.** (1965). Effects of Corn Steep Liquor and Thiamine on L-glutamic acid fermentation of hydrocarbons. *Appl. Microbiologie, A.S.M.* Vol, **13(1)**.
- Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Kramer R., Linke B., Mc Hardy A.C., Meyer F., Mockel B., Pfefferle W., Puhler A., Rey D.A., Ruckert C., Rupp O., Sahn H., Wendisch V.F., Wiegrabe I. et Tauch A.** (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L- aspartate derived amino-acids and vitamins. *J. Biotechnol.*, **104**, 5-25.

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

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

Kennedy M. et Krouse. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol Biotechno*, **D 1, 23**, 456–75.

Khan J.A., Abulnaja K.O., Kumosani T.A. et Abou-Zeid A.A. (1995). Utilization of Saudi Dates sugars in production of baker's yeast. *Biores. Technol*, **53**, 63–66.

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

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.

Kinoshita K. (1972). Fermentation equipment and instrumentation. In: The microbial production of amino acids. Yamada, K., Kinoshita, K., Sunoda, T., and Aida, K. (eds). Kodansha, Tokyo, 140-167.

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

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

Kim J.O., Kim Y.H., Yeom S.H., Song B.K. et Kim I.H. (2006). Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor. *Process Biochem*, **41**, 1208–1212.

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

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

Kimura E. (2002). Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in coryneform bacteria, *J. Biosci. Bioeng*, **94**, 545–551.

Kimura E., Kikuchi Y., Kawahara Y., Goto S., Kurahashi O. et Nakamatsu T. (2002). Stress-resistant microorganism and method of producing fermentative product. US patent **6**, 338-956.

Kuehl R.O. (2000). Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Pacific Grove (CA): Duxbury Press.

Kumagai H. (2000). Microbial production of amino acids in Japan. In: Scheper, T. (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, vol. **69**. Springer, Berlin, Germany, pp. 71-85.

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

Lewis G., Mathieu D. et Phan-Tan-Luu R. (1999). *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, USA.

Lhomme B. et Roux J.C. (1991). Utilization of experimental designs for optimization of *Rhizopus arrhizus* culture. *Bioresour. Technol*, **35(3)**, 301-312.

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.

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.

Luftig J.T. et Jordan V.S. (1998). *Design of experiments in quality engineering*. NY: McGraw-Hill.

Marienfeld S., Uhlemann E.M., Schmid R., Kramer R. et Burkovski A. (1997). Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Anatomie van Leeuwenhoek*, **72**, 291-297.

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

Marx A., Striegel K., De Graaf A.A. et Sahn H. (1997). Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng*, **56**, 168-180.

Mee-Sun P., Soon-Young C., Sung-jin K. et Kyung-Hee M. (1989). Properties of glutamine synthetase from *Corynebacterium glutamicum*. *Korean Biochem*, **22 (2)**, 128-132.

Mehaia M.A. et Cheryan M. (1991). Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzyme Microbiol. Technol*, **13**, 257–261.

Minnikin D.E., Goodfellow M. et Collins M.D. (1978). Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. *In*: I. J. Bousfield and A. G. Calley (Eds.) *Coryneform Bacteria*. Academic Press. London, UK, 85–160.

Minnikin D.E. et O'Donnell A.G. (1984). Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. *In*: M. Goodfellow, M. Mordarski, and S. T. Williams (Eds.) *The Biology of Actinomycetes*. Academic Press. London, UK, 337–388.

Mouffok A. (2007). Production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de dattes : optimisation du milieu de culture et effet des sucres purs et mixtes. Mémoire de magister, Setif.

Mohamed M. A. et Ahmed A. A. (2006), Libyan Date Syrup (Rub Al-Tamr). *Journal of Food Science*, **46**, 1162–1174.

Mohammed S., Shabana H.R. et Mawlod E.A. (1983). Evaluation and identification of Iraqi date cultivars: fruit characteristics of fifty cultivars. *Date Palm Journal*, **2** (1).

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

Munier P. (1973). *Le palmier dattier*. Ed. Maisonneuve, Paris, 221p.

Muriel C.B., Armel G. et Nicholas D.L. (1996). Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(2), 429-436.

Murthy M.S.R.C., Swaminathan T., Rakshit S.K. et Kosugi Y. (2000). Statistical optimization of lipase catalysed hydrolysis of methyl oleate by response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, **22**, 35-39.

Nampoothiri K.M., Hoischen C., Bathe B., Mÿckel B., Pfefferle W., Krumbach K., Sahn 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 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.

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 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.

Noui Y. (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de dattes Mech-Degla. Mémoire Magister, Boumerdès, 62 p.

Oshima K., Tanaka K. et Kinoshita S. (1964). Studies on glutamic acid fermentation. XI. Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. Agric. Biol. Chem, **28**,714-722.

O-Thong S., Prasertsan P., Intrasungkha N., Dhamwichukorn S. et Birkeland N.K. (2008). Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. Int J Hydrogen Energy, **33**, 1221–31.

Pan C.M., Fan Y.T., Xing Y., Hou H.W et Zhang M.L. (2008). Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. Bioresour Technol, **99**, 3146–54.

Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S., Hong S.I. et Kim S.W. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental design. Appl. Microbiol. Biotechnol, **58(6)**, 761-766.

Parton C. et Willis P. (1990). Strain preservation, inoculums preparation and development. In B. McNeil & L. M. Harvey (Eds), Fermentation: a practical approach. Oxford: IRL, 39-64.

Patzold R. et Bruckner H. (2005). Mass Spectrometric Detection and Formation of D-Amino Acids in Processed Plant Saps, Syrups, and Fruit Juice Concentrates. J. Agric. Food Chem, **53**, 9722-9729.

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.

Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., Paul S., Eikmanns B.J. et Sahm H. (1997). Pyruvate carboxylase as anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology, **143**, 1095-1103.

Peters-Wendisch P.G., Kreutzer C., Kalinowski J., Patek M., Sahm H. et Eikmanns B.J. (1998). Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterisation, expression and inactivation of the *pyc* gene. Microbiology, **144**, 915-927.

Peters-Wendisch P., Schiel B., Wendisch V.F., Katsoulidis E., Mockel B., Sahm H. et Eikmanns B.J. (2001). Pyruvate carboxylase as a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol, **3**, 295-300.

Plackett R.L. et Burman J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments, Biometrika, **33**, 305–325.

Pons B.J., Duchiron F., Duperray F., Guyonvarch A., Melaouene S. et More J. (1993). Les corynébactéries. In Leveau J.Y., Bouix M. (Eds). Microbiologie industrielle. Paris: Tec and Doc-Lavoisier et Apria, pp. 393-421.

Puech V., Chami M., Lemassu A., Laneelle M.A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R. et Daffé M. (2001). Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of

the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology*, **147**, 1365-1382.

Puri S., Beg O.K. et Gupta R. (2002). Optimization of alkaline protease from *Bacillus sp.* By response surface methology. *Curr. Microbiol*, **44(4)**, 286-290.

Radmacher E., Alderwick L.J., Besra G.S., Brown A.K., Gibson K.J., Sahm H. et Eggeling L. (2005a) Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, **151**, 2421-7.

Rollin C., Morgant V. et Guyonvarch A. (1995). ¹³C NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolicpaththways. *Eur. J. Biochem. Sc*, **227**, 488-493.

Rouhou S.C., Baklouti S., Hadj-Taïeb N., Besbes S., Chaabouni S., Blecker C. et Attia H. (2006). Élaboration d'une boisson à partir d'écart de triage de dattes : clarification par traitement enzymatique et microfiltration. *Fruits*, **61**, 389-399.

Roukas T. et Kotzekidou P. (1991). Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb. Technol*, **21**, 273–276.

Sadhukhan A.K., Ramana Murthy, M.V., Ajaya Kumar, R., Mohan EV.S., Vandana G., Bhar C. et Venkateswara Rao, K. (1999). Optimization of mycophenolic acid production in solid-state fermentation using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, **22(1)**, 33-38.

Sawaya W.N., Khatchadourian H.A., Khalil J.K. Safi W.M. et Al-Shalhat A. (1982) Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *J. Food Sci*, **47 (5)**.

Sawaya W.N. (1986). Dates of Saudi Arabia. Regional Agriculture and Water Research Centre, Ministry of Agriculture and Water, Riyadh, Saudi Arabia.

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

Shah A.H., Abdul Hameed Ahmed S. et Madjid Khan G. (2002). Optimisation of culture conditions for L-Lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *Online Journal of Biological Science*, **2 (3)**, 151-156.

Shaheen M.A. et Al-Qurashi A.D. (2007). Fruit chemical composition and it's correlations of some date palm cultivars during fruit development stages. King Abdulaziz University, Jeddah-Saudi Arabia, 1-5.

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

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

Shiio I., Otsuka S.I. et Takahashi M. (1962). Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J. Biochem, **51**, 56-622.

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

Shimizu H., Tanaka H., Nakato A., Nagahisa K., Kimura E. et Shioya, S. (2003). Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*, Bioprocess. Biosyst. Eng, **25**, 291-298.

Shimizu H. et Hirasawa T. (2006). Production of glutamate and glutamate-related amino acids: molecular mechanism analysis and metabolic engineering. Microbial Monographs, **5**, 1-38.

Siboukeur O. (1997). Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.

Sonntag K., Schwinde J., Graaf A.A.de, Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W. et Sahn H. (1995). ¹³C NMR Studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol, **44**, 489-495.

Stackebrandt E., Rainey F. A. et Ward-Rainey N. L. (1997). Proposal for a new hierarchal classification system, Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol, **47**, 479-491.

Stuible H.P., Meier S. et Schweizer E. (1997). Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine: proteine transferase that activites the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. J. Biochem, **248**, 481-487.

Stuible H.P., Wagner C., Andreou I., Huter G., Haselmann J. et Schweizer E. (1996). Identification and functional differentiation of the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. J Biochem, **178**, 4787-4793.

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.

Sunitha I., Subba Rao M.V. et Ayyanna C. (1998). Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the co-immobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. Bioprocess Eng, **18(5)**, 353-359.

Suzuki K., Kaneko T. et Komagata, K. (1981). Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol, **31**, 131-138.

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.

Takinami K., Yoshii H., Yamada Y., Odaka H. et Kinoshita K. (1968). Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acid. Amino Acid Nucl. Acid, **18**, 120-160.

Tavakkoli M., Hamidi-esfahani Z. et Hossein azizi M. (2009). Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology. Food Bioprocess Technol.

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.

Tochikura T. (1987). A glutamine synthetase-glutamate synthase system of *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum* and its application, p. 719-723. In O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, and K. C. A. M. Luyben (ed.), Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, vol. IV, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Udaka S. (1960). Screening method for microorganisms accumulations metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. J. Bacteriol, **79**, 754-755.

Vallino J.J. et Stephanopoulos G. (1993). Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. Biotechnol. Bioeng, **41**, 633-646.

Vander Heyden, Y., Luypaert, K., Hartmann, C., Massart, D.L., Hoogmartens, J. et De Beer J. (1995). Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental designs and statistical interpretations, Anal. Chim. Acta, **312**, 245–262.

Vander Heyden Y. et Massart D.L. (1996). Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry, in: Smilde, A., de Boer, J., Hendriks, M. (Eds.), Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products, Elsevier, Amsterdam, pp. 79–147.

Vander Heyden Y., Bourgeois A. et Massart, D.L. (1997). Influence of the sequence of experiments in a ruggedness test when drift occurs, Anal. Chim. Acta, **347**, 369–384.

Vilkas M. (1993). Vitamines. Ed. Hermann, 158p.

Viswanathan P. et Surlikar N.P (2001). Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on amaranthus grains grains by solid-state fermentation. J. Basic Microbiol, **41** (1), 57-64.

Volker F.W. (2007). Amino acid biosynthesis pathways, regulation and metabolic engineering Germany, 195.

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

Wang J.S., Yung C.K., Cheng W.L. et Liu Y.T. (1991). Optimisation of the culture condition for L-lysine production by *Brevibacterium* sp., pp: 1-13. Rept. Taiwan Sugar Res. Inst, **134**, 37-48.

Wang J. et Wan W. (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International journal of hydrogen energy*, **34**, 235–244.

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

Weuster-Botz D. (2000). Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? *J. Biosci. Bioeng*, **90** (5), 473-483.

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.

Wolfgang L. (2006). *Corynebacterium*—Nonmedical. In Martin D., Stanley F., Eugene R., Karl-Heinz S., Erko S. (Eds). *Prokaryotes*. Vol **3**. New York : Springer Science and Business Media, LLC, pp. 796–818.

Yahiaoui K. (1998). Caractérisation physico-chimique et l'évolution du brunissement de la datte Deglet-Nour au cours de la maturation. Mémoire Magiter, INA. El-Harrach, Alger, 103p.

Yu X., Hallet S.G., Sheppard J. et Watson AK. (1997). Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **47**(3), 301-305.

Zhang J., Marcin C., Shifflet M.A., Salmon P., Brix T., Greasham R., Buokland B. et Chartrain M. (1996). Development of a defined medium fermentation process for physotigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **44**(5), 568-575.

Zirari A., Harrak H., Chetto A., Lalaoui Y. R. et Outlioua K. (2003). Contribution à la Réhabilitation de la Diversité Génétique du palmier dattier dans l'Oasis de Fezouata. Rapport d'Atelier Diagnostic Participatif du Projet RAB 98G31 à Fezouata du 21 au 26 Avril 2003.

Résumé

L'objectif de ce travail était la mise au point et l'optimisation d'un milieu de culture à base de jus de datte pour la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture discontinue par deux modèles statistiques (Plackett-Burman et Box-Behnken).

Dans une première partie, des cultures en discontinue ont été réalisées afin de déterminer l'effet des différents éléments nutritionnels sur la production d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 en utilisant le modèle statistique Plackett-Burman. Il a été montré que l'urée (99,99%), le jus de datte (99,95%), bétaine (99,55%) et la peptone (98,34%) sont considérés comme les éléments les plus significatifs.

Dans une seconde partie, l'optimisation de la concentration des éléments issus du modèle Plackett-Burman a été réalisée en utilisant le modèle statistique Box-Behnken. Les concentrations optimales du jus de datte (45 g.l^{-1}), l'urée ($16,86 \text{ g.l}^{-1}$), la peptone (15 g.l^{-1}) et la bétaine ($12,04 \text{ g.l}^{-1}$) ont été déterminées. Sous ces conditions la concentration expérimentale de glutamate obtenue est de $33,20 \text{ g.l}^{-1}$.

Dans une dernière partie, les facteurs physiques (agitation, pH et taux d'inoculum) ont été optimisés en utilisant également le modèle statistique Box-Behnken. Il a été montré que la technique a permis d'améliorer la production de glutamate ($39,16 \text{ g.l}^{-1}$).

Mots clés : Optimisation, *Corynebacterium glutamicum*; Modèle expérimental statistique, Jus de datte, acide glutamique.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج حمض الغلوتاميك من طرف *Corynebacterium glutamicum* 2262 عن طريق تطوير وسط غذائي يحتوي على عصير التمر كمصدر كربون و ذلك باستخدام الطرق الإحصائية (Plackett-Burman, Box-Behnken).

تم انجاز عدة تجارب زرع غير مستمر في الجزء الأول من الدراسة، لتحديد تأثير مختلف العناصر الغذائية على إنتاج حمض الغلوتاميك من طرف *Corynebacterium glutamicum* 2262 و ذلك باستخدام الطريقة الإحصائية Plackett - Burman. وقد تبين أن urée (99.99٪)، jus de datte (99.95٪)، βétaine (99.55٪) و peptone (98.34٪) تعتبر من أهم العناصر.

تم في الجزء الثاني، دراسة تركيز العناصر المتحصل عليها بعد استخدام الطريقة الإحصائية Plackett-Burman و ذلك باستخدام الطريقة الإحصائية Box-Behnken. وقد تحددت التراكيز المثلى ل jus de datte (45 غال)، urée (16.86 غال)، peptone (15 غال) و βétaine (12.04 غال). في ظل هذه الظروف التجريبية كان تركيز الغلو تامات المتحصل عليه 33.20 غال.

أما في القسم الأخير، فقد تم تحسين العوامل المادية (سرعة حركة الوسط، درجة الحموضة وكمية اللقاح) باستخدام النموذج الإحصائي Box-Behnken. وقد تبين أن هذه التقنية قد حسنت إنتاج الغلو تامات إلى 39.16 غال).

الكلمات المفتاحية : تحسين, الطرق الإحصائية, *Corynebacterium glutamicum*, حمض الغلوتاميك, عصير التمر.

Abstract

The objective of this work was the development and optimization of culture medium date juice as carbon source for the production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in batch culture using statistical designs (Plackett-Burman and Box-Behnken).

In the first part, batch cultures were conducted to determine the effect of different nutrients on the production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* 2262 using the experimental design Plackett-Burman. It was shown that urea (99.99%), the date juice (99.95%), betain (99.55%) and peptone (98.34%) are considered as the most significant elements.

In a second part, an optimization of the concentration of elements from the Plackett-Burman design was carried out using the experimental design Box-Behnken. The optimal concentrations of date juice (45 g l^{-1}), urea (16.86 g l^{-1}), peptone (15 g l^{-1}) and betain (12.04 g l^{-1}) were determined. Under these experimental conditions the concentration of glutamate obtained was $33.20 \text{ (g l}^{-1}\text{)}$.

In a final section, physical factors (agitation, pH and inoculum size) were optimized using the Box-Behnken experimental design. It was shown that these techniques have improved the production of glutamate to (39.16 g l^{-1}).

Keywords: Optimization, *Corynebacterium glutamicum*; Experimental design, date juice, glutamic acid.