

Valorisation biotechnologique des dattes de faible valeur marchande par la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase

Par :

ACOURENE SAID

M. AMMOUCHE Ali Professeur Directeur de thèse
31-01-2013

Composition du jury : M. Bellal Mohand Mouloud Professeur Président M. Benamara Salem Professeur Examineur M. Benchabane Ahmed Maître de conférences Examineur M. Nouani Abdel-Ouahab Maître de conférences Examineur

Table des matières

Remerciements . . .	6
Dédicace . . .	7
Résumé . . .	8
Abstract . . .	10
ص خ لم . . .	12
Introduction . . .	13
Données bibliographiques . . .	17
Chapitre I/ Données sur la phoeniciculture et la datte . . .	17
1-1- Données sur la phoeniciculture . . .	17
1-2- Composition biochimique de la datte . . .	17
1-3- Traitement et conditionnement de la datte . . .	20
1-4- Valorisation de la datte . . .	20
Chapitre-II : Etude de la levure boulangère (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) . . .	27
2-1- Généralités et taxonomie . . .	27
2-2- Description des principales souches de levures . . .	27
2-3- Besoins nutritionnels et cultureux de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . .	28
2-4- Composition biochimique . . .	30
2-5- Métabolisme . . .	30
2-6- Utilisations de la levure . . .	31
Chapitre-III : Production de la levure boulangère . . .	32
3-1- Historique . . .	32
3-2- Procédé de fabrication utilisé par les lévurerries Algériennes . . .	33
Chapitre-IV : Production d'éthanol . . .	38
4-1- Généralités . . .	38
4-2- Préparation du moût . . .	38
4-3- Fermentation . . .	39
4-4- La distillation . . .	39
4-5- Rectification . . .	39
Chapitre-V : Etude des <i>Aspergillus</i> (<i>Aspergillus niger</i>) . . .	39
5-1- Généralités et taxonomie . . .	40
5-2- Besoins nutritionnels et cultureux des <i>Aspergillus</i> . . .	40
5-3- Utilisations des <i>Aspergillus</i> . . .	41
Chapitre-VI- Production de l'acide citrique . . .	43
6-1- Généralités . . .	43
6-2- Utilisations de l'acides citrique . . .	44
6-3- Production de l'acide citrique à partir du jus de citron . . .	45
6-4- Production d'acide citrique par voie de fermentation . . .	46
Chapitre-VII- Production d' α -amylase . . .	48
7-1- Généralités sur les enzymes . . .	48
7-2- Les α -amylases . . .	48

I- Matériel et méthodes . . .	53
1- Matériel . . .	53
1-1- Matériel végétal . . .	53
1-2- Matériel biologique . . .	53
2- Protocole expérimental . . .	58
2-1- Production de l'extrait de dattes . . .	58
2-2- Production de la levure boulangère . . .	58
2-3- Production d'éthanol . . .	60
2-4- Production de l'acide citrique . . .	60
2-5- Production d' α -amylase . . .	61
3- Méthodes analytiques . . .	62
3-1- Analyses biochimiques des extraits de dattes et de la mélasse . . .	62
3-2- Analyses portant sur la production de la levure boulangère . . .	62
3-3- Analyses portant sur la production d'éthanol . . .	63
3-4- Analyses portant sur la production de l'acide citrique . . .	64
3-5- Analyses portant sur la production d' α -amylase . . .	65
II- Résultats et discussion . . .	66
Chapitre-I : Composition biochimique des extraits de dattes (rebuts de Deglet-Nour, . . .	66
Chapitre-II : Production de la levure boulangère . . .	68
1- Production de la levure boulangère en Batch . . .	68
2- Production de la levure boulangère en Fed-batch . . .	76
3- Optimisation de la production en biomasse avec la souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DB . . .	90
Chapitre-III : Production d'éthanol . . .	94
3-1- Evolution de la productivité en éthanol . . .	94
3-2- Influence de la quantité en inoculum sur la production d'éthanol . . .	96
3-3- Influence des différents substrats sur la production d'éthanol . . .	96
3-4- Influence des différents souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur la production d'éthanol . . .	98
3-5- Influence de la teneur en sucres sur la production d'éthanol . . .	99
3-6- Influence de la quantité en phosphate d'ammonium sur la production d'éthanol . . .	101
3-7- Optimisation de la production en éthanol avec la souche de <i>Saccharomyces cerevisia</i> DB . . .	102
Chapitre-IV : Production de l'acide citrique . . .	106
4-1- Etude de la cinétique de fermentation . . .	106
4-2- Effet de l'enrichissement sur la production d'acide citrique . . .	108
4-3- Durée de la fermentation . . .	109
4-4- Effet de différents substrats sur la production d'acide citrique . . .	111
4-5- Effet de la température sur la production de l'acide citrique . . .	112
4-6- Effet de la teneur en sucres sur la production d'acide citrique . . .	114
4-7- Effet de l'addition d'alcool sur la production d'acide citrique . . .	115
4-8- Effet du pH initial sur la production d'acide citrique . . .	118

4-9- Effet de la quantité en inoculum sur la production d'acide citrique . .	119
4-10- Effet du taux d'aération sur la production d'acide citrique . .	121
4-11- Effet de la source azotée et des différentes concentrations en nitrate d'ammonium sur la production d'acide citrique . .	123
4-12- Effet des différentes concentrations en phosphore sur la production d'acide citrique . .	125
4-13- Optimisation de la production d'acide citrique avec <i>Aspergillus niger</i> ANSS . .	127
Chapitre-V : Production de l' α -amylase . .	135
5-1- Optimisation des paramètres de production de l' α -amylase par utilisation d' <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 . .	135
5-2- Optimisation de la production d' α -amylase par utilisation de <i>Candida guilliermondii</i> . .	144
5-3- Culture en fermenteur . .	149
Références bibliographiques . .	153
Annexes . .	170

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau la station expérimentale de Touggourt de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA).

Je remercie Monsieur AMMOUCHE ALI, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, de m'avoir encouragé, conseillé et soutenu tout au long de ce travail.

Je remercie Monsieur, BELLAL MOHAND MOULOUD Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et présider ce jury.

Je remercie également Monsieur, BENCHABANE AHMED Maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury, sa disponibilité et sa sollicitude sans retenue m'ont été d'un grand apport moral.

Je remercie également Monsieur, BENAMARA SALEM Professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

De même, je remercie Monsieur, NOUANI ABELOUAHAB Maître de conférences à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury.

L'occasion m'est donnée pour remercier tous mes collègues de travail au niveau de la station INRAA de Touggourt pour avoir toujours été à mes côtés dans tous les moments difficiles

Aussi, je tiens à remercier Monsieur TAMA MOHAMED, TALEB BRAHIM et Mademoiselle DJAFRI KAOUTHER pour l'aide qu'ils m'ont apporté afin de réaliser certaines analyses au niveau du laboratoire de technologie de datte de la station INRAA de Touggourrt.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de la station INRAA de Sidi-Mehdi Touggourt.

Merci aux étudiants qui m'ont accompagné pendant ces années de recherche avec énergie, enthousiasme et envie pour porter haut la valorisation de la datte Algérienne.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à ce travail.

Dédicace

A la mémoire de mon père SAID et de ma sœur FATIMA A ma femme FARIDA A mon frère Belkacem et mes sœurs Ouardia et Malika A mes enfants Massinissa, Lamia, Ghilass et Rania.

Résumé

Valorisation biotechnologique des dattes de faible valeur marchande par la production de la Levure Boulangère, Ethanol, Acide citrique et α -amylase

La présente étude traite de la fermentation submergée afin de produire de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase en utilisant les rebuts de dattes produits par la Deglet-Nour et les dattes produites par Tinissine comme milieux de fermentation de base. Les différentes levures utilisées pour la production de la levure de boulangerie et l'éthanol sont huit souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées à partir de dattes produites par les différents cultivars de palmier dattier et une souche ATCC 1102.

Pour la production d'acide citrique et d' α -amylase, nous avons utilisé une souche d'*Aspergillus niger* ATCC 16404, une souche d'*Aspergillus niger* ANSS isolée à partir d'un échantillon du sol de la région de M'ghaier et une souche de *Candida guilliermondii* (CGL) isolée à partir du levain. La production de ces métabolites a été réalisée sur Erlenmeyers et sur fermenteur agité ayant une capacité de 3 litres. Différentes conditions de fermentation telles que, la période d'incubation, la quantité en inoculum, la concentration en sucres, la source azotée et la concentration en phosphate d'ammonium ont été optimisées afin d'améliorer les rendements en levure boulangère et en éthanol.

Concernant la production d'acide citrique et d' α -amylase, les conditions de fermentation suivantes à savoir, la période d'incubation, la température, la teneur en sucres, les teneurs en éthanol et méthanol, le pH initial, le taux d'aération, la source azotée, les teneurs en azote et en phosphore ont été optimisés. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les rebuts de dattes et les dattes produites par Tinissine riches en sucres peuvent servir comme substrat à moindre coût pour la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase en utilisant les différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii*.

En ce sens, l'étude de la cinétique de croissance de huit souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées à partir des dattes montrent que les souches DB, HW et TTB donnent les meilleurs résultats à savoir, un temps de génération réduit, un taux de croissance élevé et un rendement en biomasse élevé. Quant à la fermentation en Fed-Batch, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un taux de dilution de 0.22 h^{-1} à savoir un rendement en biomasse de 29.2 à 32.9 g/L. Par ailleurs, les milieux à base de dattes donnent des rendements en biomasse élevés comparables à ceux du milieu à base de mélasse.

De ce fait, on peut préconiser les rebuts de dattes et les dattes de faible valeur marchande comme substrat de substitution à la mélasse pour la production de la levure boulangère. En outre, les souches DB, TTB et HW donnent des rendements en biomasse élevés soient 31.5 - 34.54 g/L comparables à ceux de la souche ATCC 1102 soit 32.9 g/L. Néanmoins, l'optimisation des paramètres de fabrication de la levure boulangère cultivée sur substrat à base de dattes afin d'améliorer les rendements est souhaitable. En ce sens, l'utilisation du sulfate d'ammonium et de l'urée à 50 - 50 % améliore de plus de 17.3 à 36.0 %, le rendement en biomasse par rapport à l'urée. Aussi, l'utilisation du phosphate d'ammonium comme source azotée améliore de 36.7 à 55.0 %, le rendement en biomasse. Quant à la source vitaminique, les résultats obtenus montrent qu'il n'est pas nécessaire d'apporter des vitamines au cours de la fermentation malgré une légère amélioration des rendements soit plus de 6.0 % en ajoutant 0.6 mg/L de thiamine.

Quant à la production d'éthanol, les rendements optimum obtenus avec les souches de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102, HW et DB sont de 1310, 117.5 et 136.0 g/L, respectivement sous les conditions optimales suivantes à savoir, une période d'incubation de 72 h, une quantité en inoculum de 4 % (w/v), une teneur en sucres de 180.0 g/L et une teneur en phosphate d'ammonium de 1.0 g/L.

Concernant la production d'acide citrique, cette dernière atteint son maximum à 144 h après inoculation. D'autre part, le méthanol ajouté 24 h après inoculation agit directement sur la morphologie du mycélium. Aussi, il permet d'améliorer la perméabilité des membranes cellulaires permettant ainsi une excrétion accrue d'acide citrique par les cellules mycéliennes. De plus, les conditions optimales pour une production maximale en acide citrique sont, une température de 30 °C, une teneur en sucres de 150.0 g/L, une teneur en méthanol de 3.0 %, un pH initial de 3.5, un taux d'aération de 1.0/L/L/min, des teneurs en nitrate d'ammonium et en phosphate de potassium de 2.5 g/L. Sous ces conditions optimales, les rendements en acide citrique obtenus avec les souches d'*Aspergillus niger* ANSS et ATCC 16404 par utilisation des rebuts de dattes et les dattes produites par Tinissine comme milieux de fermentation de base sont de 98.42 g/L et 106.44 - 126.40 g/L, respectivement.

Concernant la production d'α-amylase, les conditions de culture optimales sont, une période de fermentation de 96 h, une température de 30 °C, un pH initial de 5.5, une teneur en sucres de 20.0 g/L et des teneurs en extrait de levure et en phosphate de potassium de 5.0 g/L. Sous ces conditions optimales, les activités enzymatiques maximales obtenues sont de 3080.66 et 2600 μmoles/L/min, respectivement sur milieux à base de Rebut de Deglet-Nour et les dattes produites par Tinissine. Quant à *Candida guilliermondii*, les résultats obtenus montrent que la présence d'amidon induit fortement la production d'α-amylase avec un maximum à 5.0 g/L. Parmi les différentes sources d'azote testées, l'extrait de levure et l'urée à 5.0 g/L ont donné le maximum de biomasse et d'α-amylase estimées à 5.16 - 5.76 g/L et 2056.33 - 2304.19 μmoles/L/min, respectivement après 72 h d'incubation à 30°C, avec un pH initial de 6.0 et une teneur en phosphate de potassium de 6.0 g/L.

Mots clés : Dattes, Valorisation, Fermentation, Production, Optimisation, Souches

Levure boulangère, Ethanol, Acide citrique, α-amylase.

Abstract

Biotechnological valorization of dates low value by the production of Bakers' yeast, Ethanol, Citric acid and α -amylase

The present study deals with submerged fermentation to produce Bakers' yeast, ethanol, citric acid and α -amylase using Deglet-Nour date wastes and dates produced by Tinissine as the basal fermentation mediums. The yeasts used for the production of Bakers' yeast and ethanol are eight strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from dates produced by date palm varieties and strain of ATCC 1102. For the production of citric acid and α -amylase, we used strains of *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus niger* (ANSS) isolated from M'ghaier soil sample and *Candida guilliermondii* (CGL) isolated from leavening dough.

The production of these metabolites was carried in Erlenmeyers flasks and a stirred fermentor of 3 liters capacity. Different cultural conditions such as incubation period, inoculum content, sugars content, nitrogen source and ammonium phosphate content were optimized for enhanced Bakers' yeast and ethanol production. Concerning the citric acid and α -amylase production, the following cultural conditions, incubation period, the temperature, sugars content, ethanol and methanol content, initial pH, aeration rate, nitrogen source, nitrogen and phosphorus content were optimized. The results of this study indicate that the date wastes and dates produced by Tinissine rich in sugars, can serve as a low-cost substrate for Bakers' yeast, Ethanol, Citric acid and α -amylase production by fermentation using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*.

So, the study of kinetics growth of eight strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from dates shows that DB, HW and TTB strains gives the best results to know, a reduced generation time, a high rate growth and high biomass yield. Regarding to the Fed-batch fermentation, the best results were obtained with dilution rate of 0.22 h^{-1} , i.e., 29.2 -32.9 g/L biomass yield. Also, the date syrup provides high biomass yields comparable to molasses. Thus, we can recommend the dates wastes and dates of low value as an alternative substrate to the molasses for the production of baker's yeast. In addition, the strains of DB, TTB and HW isolated from dates produced by Deglet-Beida, Tantbought and Halwa varieties give an elevated biomass yields variable between 31.5 and 34.54 g/L. comparable to those of ATCC 1102 strain, i.e. 32.9 g/L. Nevertheless, the enrichment of these syrups with nitrogen, phosphorus and vitamins is necessary in order to improve the biomass yield. In this sense, the use of ammonium sulfate and urea at 50 - 50% improved the biomass yield more than 17.3 to 36.0%, compared to urea. Also, the use of ammonium phosphate as nitrogen source improves the biomass yield from 36.7 to 55.0 %. However, this nitrogen source is expensive compared to urea and causes a decrease in the strength of baker's yeast. Therefore, we recommend the use of ammonium sulfate and urea at 50 to 50% as nitrogen source for the production of baker's yeast on date syrup. Finally, regarding to the vitamins source, the results obtained show that it is not necessary to bring vitamins during fermentation despite a slight improvement in yields more than 6.0 % by adding 0.6 mg/L of thiamine.

As for the Ethanol production, the optimum yields obtained with strains of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102, HW and DB were 131.0, 117.5 and 136.0 g/L, respectively under optimum conditions of an incubation period of 72 h, inoculum content of 4 % (w/v), sugars content of 180.0 g/L and ammonium phosphate content of

1.0 g/L.

Concerning the citric acid production, this last reached to maximum after 144 h inoculation. On the other hand, methanol added 24 h after inoculation had a direct effect on mycelial morphology. It is also, increases the cell membranes permeability to provoke more citric acid excretion from mycelial cells. More over, the optimum conditions for maximum citric acid production are: Temperature of 30 °C, sugars content of 150.0 g/L, methanol content of 3.0 %, initial pH of 3.5, aeration rate of 1.0/L/L/min, ammonium nitrate and potassium phosphate content of 2.5 g/L. Under these optimal conditions, the maximum citric acid produced on basal fermentation medium of date wastes and dates produced by Tinissine are 98.42 g/L and 106.44 - 126.4 g/L, with strains of *Aspergillus niger* ANSS and ATCC 16404, respectively.

Concerning the #-amylase production with *Aspergillus niger* ATCC 16404, the optimum conditions are, an incubation period of 96 h, temperature of 30 °C, an initial pH of 5.5, sugars content of 20.0 g/L, yeast extract and potassium phosphate content of 5.0 g/L. Under these cultural conditions, the maximum enzyme activities obtained with *Aspergillus niger* ATCC 16404 are 3080.66 and 2600 µmoles/L/min, respectively on basal fermentation mediums of dates wastes and dates produced by Tinissine. As for *Candida guilliermondii*, the result shows that the presence of starch induces strongly the production of #-amylase with a maximum at 5.0g/L. Among the various nitrogen sources tested, yeast extract and urea at

5.0g/L gave the maximum biomass and #-amylase estimated at 5.16 - 5.76g/L and 2056.33-

2304.19 µmoles/L/min, respectively after 72h incubation at 30 °C, with an initial pH of 6.0 and potassium phosphate content of 6.0g/L.

Key words: Dates, Valorization, Fermentation, Production, Optimization, Strains

Bakers' yeast, Ethanol, Citric acid, #-amylase.

صناعات

التتبع البيوتكنولوجي للتمور ذات القيمة التجارية المنخفضة عن طريق إنتاج خميرة الخبز الإيثانول، حمض الليبومون و- α أميليز

تتناول هذه الدراسة التخمير لإنتاج خميرة الخبز والإيثانول وحمض الليبومون و- α الأميليز، باستخدام نفايات التمور التي تنتجها دقّة نور التمور التي تنتجها تبنيسين كأوساط تخمر أساسي، الخمائر المختلفة المستخدمة لإنتاج خميرة الخبز والإيثانول، هم ثماني سلالات *Saccharomyces cerevisiae* معزولة من التمور التي تنتجها أنواع مختلفة من الخبيل وسلالة ATCC 1102. إنتاج حامض الستريك و- α الأميليز، استعملنا سلالة ATCC 16404 *Aspergillus niger* وسلالة أخرى من *Aspergillus niger* التي عزلت من عينة التربة بمنطقة المعير وكذا سلالة *Candida guilliermondii* (CGL) التي عزلت من الحبوب المخمر. أجري إنتاج هذه الإيضات على قوارير زجاجية ومخلط مخمر بسعة 3 لترات، وكانت ظروف التخمر الأمثل المختلفة مثل فترة التخمر، وكمية الفلاح، تركيز السكريات، مصدر النيتروجين وتركيز فوسفات الأمونيوم من أجل تحسين إنتاج خميرة الخبز والإيثانول، فيما يخص إنتاج حامض الستريك و- α الأميليز، فإن ظروف التخمر هي، فترة التخمر، درجة الحرارة، تركيز السكريات، تركيزات الإيثانول والميثانول، درجة الحموضة، معدل التهوية، مصدر النيتروجين، تركيزات النيتروجين والفوسفور، تأثير المنتجات المتحصل عليها في هذه الدراسة إلى أن نفايات التمور وتمن نوع تبنيسين الغنية بالسكريات يمكن أن تكون بمثابة الركيزة الأقل كلفة لإنتاج خميرة الخبز، الإيثانول، حمض الليبومون، و- α الأميليز، وذلك باستخدام سلالات مختلفة من *Saccharomyces cerevisiae*، *Aspergillus niger*، و *Candida guilliermondii*. إن دراسة حركية نمو ثمانية سلالات *Saccharomyces cerevisiae* معزولة من التمور تشير إلى أن سلالات TIB.HW.DB تحقق أفضل النتائج؛ فترة جيل قصيرة، معدل نمو عال وكفاءة عالية للكفاءة الحيوية، أم بالنسبة للتخمير عن طريق Fed-Batch فقد تم الحصول على أفضل النتائج مع معدل تخفيف 0.22 hr^{-1} وكان ذلك بمرور 29.2 - 32.9 غ/ل. عاثة على ذلك، فالأوساط المكونة من التمور تعطي مرود عال للكفاءة الحيوية مقارنة بالأوساط المكونة من نيس السكر. ولذا يمكن أن نوصي باستخدام نفايات التمور والتمور ذات القيمة المنخفضة كبدائل الركيزة للنسب لإنتاج خميرة الخبز، بالإضافة إلى ذلك، فإن سلالات TIB.HW.DB تعطي مرود عال من الكفاءة الحيوية يساوي 3.15 - 34.5 غ/ل مماثلة لسلالة ATCC 1102 المقدر بـ 32.9 غ/ل. ومع ذلك، فإن التحسين من معاملات تصنيع خميرة الخبز المزروعة على الركيزة المكونة من التمور من أجل تحسين المرود، أمر مرغوب فيه. في هذا الاتجاه، فإن استخدام كبريتات الأمونيوم واليوريا بـ 50 - 50 % تحسن بنسبة أكثر من 17.3 حتى 36.0 % الكفاءة الحيوية، بالنسبة لليوريا. كما أن استخدام فوسفات الأمونيوم كمصدر للنيتروجين يحسن 36.7 حتى 55.0 % الكفاءة الحيوية. أما بالنسبة للفيثامين فقد أظهرت النتائج أنه ليس من الضروري إضافة الفيثامينات خلال عملية التخمر على الرغم من حدوث تحسن طفيف في المرود قد يفوق 6.0 % وذلك بإضافة 0.6 ملغم/لتر من الفيثامين.

أما بالنسبة للإنتاج الإيثانول، والمعاصيل العطلى التي تم الحصول عليها مع سلالات *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102، HW و DB هي 1310، و 117.5 و 136.0 غ/ل على التوالي في ظل الظروف المثلى التالية أي، فترة حضانه بـ 72 ساعة، وكمية من الفلاح 4 % (ب/ك)، وتركيز السكريات بـ 180.0 غ/لتر وتركيز فوسفات الأمونيوم بـ 1.0 غرام/لتر. فيما يخص إنتاج حامض الستريك، فقد بلغت دروسها 144 ساعة بعد التفوح. من ناحية أخرى فإن إضافة الميثانول بعد 24 ساعة من التفوح له تأثير مباشر على مورفولوجية الأقطور. كما أنه يحسن من فعالية أعشبية الخاليا مما يسمح بزيادة إفراز حامض الستريك في خاليا الميثانول. عاثة على ذلك، فإن الظروف المثلى لإنتاج أقصى قدر من حامض الستريك هي، درجة حرارة 30

درجة مئوية، تركيز السكريات بـ 150.0 غ/لتر، تركيز الميثانول بـ 3.0 %، pH 3.5، نسبة تهوية بـ 1.0 L L⁻¹ min⁻¹، تركيزات نترات الأمونيوم وفوسفات البوتاسيوم بـ 2.5 غرام/لتر. في ظل هذه الظروف المثلى، فإن مرود حامض الستريك المحصل عليه مع سلالات *Aspergillus niger*، ANSS و ATCC 16404 عن طريق استخدام نفايات التمور وتمن نوع تبنيسين كأوساط تخمر أساسية هي 98.42 غ/ل و 106.44-126.4 غ/لتر على التوالي. فيما يخص إنتاج α -أميليز فإن ظروف الزراعة المثلى هي فترة تخمير بـ 96 ساعة، 30 درجة مئوية، pH 5.5، تركيز سكريات بـ 20.0 غ/لتر وتركيزات لمستخلصات خميرة الخبز و فوسفات البوتاسيوم بـ 5.0 غ/لتر. في ظل هذه الظروف المثلى، فإن الأنشطة الأنزيمية القسوى المحصل عليها هي 3080.66 و 2600 μmoles /لتر/دقيقة على التوالي على أوساط مكونة من نفايا تمور دقّة نور و التمور الناتج من تبنيسين. أما فيما يخص سلالة *Candida guilliermondii* فقد بينت النتائج أن وجود النشا يدفع بقر α -أميليز مع حد أقصى بـ 5.0 غرام/لتر. من بين مصادر النيتروجين المختلفة المختبرة، خلاصة خميرة الخبز واليوريا بـ 5.0 غ/لتر قد أعطى أقصى كفاءة حيوية و- α أميليز المقدر بـ 5.16 - 5.76 غ/لتر و 2056.33 حتى 2304.19 μmoles /لتر/دقيقة على التوالي، وذلك بعد 72 ساعة حضانه في 30 درجة مئوية ومع pH 6.0 ومحتوى فوسفات البوتاسيوم بـ 6.0 غرام/لتر. **كلمات البحث:** التمور، التخمير، التخمير، إنتاج، تحسين، سلالات، خميرة الخبز، الإيثانول، حامض الستريك، و- α الأميليز.

Introduction

Les activités agricoles et agro-industrielles génèrent des quantités importantes de déchets qui peuvent constituer de nouvelles matières premières pour de nombreuses industries agro-alimentaires. A cet effet, leurs valorisations par des procédés biotechnologiques représentent une solution de choix dans la mesure où elle permet de produire des substances à haute valeur ajoutée.

L'Algérie produit annuellement 520.000 tonnes de dattes dont une partie plus ou moins importante est moins appréciée sur le marché constituée de dattes de faible valeur marchande et des écarts de tri de la Deglet-Nour (Anonyme, 2010). La production dattière en quantité et en qualité est influencée par plusieurs facteurs qui peuvent être liés au climat, au sol, à la qualité de l'eau, à l'irrigation, à la fertilisation, au drainage, aux maladies, aux ravageurs, à l'âge des palmiers et aux soins apportés aux régimes dès leurs pollinisations jusqu'à la récolte (Munier, 1973; Djerbi, 1992).

La Deglet-Nour représente plus de 50 % du verger national du dattier (Brac de la Perriere, 1982). Cette dernière a une maturation échelonnée sur un même régime de telle sorte qu'à la récolte, on aura des dattes mûres, des dattes complètement immatures (Blah) et des dattes ratatinées, desséchées et avariées (rebuts). Cette dernière catégorie peut atteindre 30.0 % de la production totale du palmier selon les conditions climatiques de l'année, d'irrigation, de fertilisation et des soins apportés aux palmiers et aux régimes (Djerbi, 1994). Concernant les autres variétés (Ghars, Degla-Beida, Mech-Degla....etc.), la production de dattes de qualité médiocre constituées de dattes avariées et parthénocarpiques peut atteindre 15 % de la production moyenne par palmier selon les conditions climatiques de l'année et les techniques culturales appliquées (Djerbi, 1992). Les rebuts de dattes, estimés à plus de 38.000 tonnes sont donnés tels quels aux animaux (Merrouchi *et al.*, 2006). A ceci s'ajoute un tonnage important de dattes communes ayant une faible valeur marchande estimé entre 70.000 et 100.000 tonnes (Anonyme, 2010). Afin de leur trouver un débouché plus rémunérateur, on a jugé utile de les améliorer par des transformations afin d'obtenir des produits nouveaux facilement commercialisables, tels que, les sirops, alcools, levures, acides organiques, acides aminées....etc.

En Algérie, il existe deux lévurreries utilisant plus de 20.000 tonnes de mélasse par an pour la fabrication de la levure boulangère (Anonyme, 2003). L'utilisation de la mélasse de betterave ou de canne peut causer certaines contraintes car elle peut éventuellement contenir des inhibiteurs de fermentation provenant des biocides utilisés pendant la culture de betteraves ou de canne ou des procédés d'extraction des sucres (Bouix et Leveau, 1993). Par ailleurs, avec l'amélioration du processus d'extraction des sucres utilisé par les sucreries, une baisse de la teneur en sucres des mélasses est notée

D'autre part, il est utile de signaler que l'Algérie importe entre 30.000 et 50.000 hectolitres d'alcool éthylique par an afin de couvrir ses différents besoins (Touzi, 1997). La production d'éthanol à partir des rebuts de dattes constituera une solution intéressante sur le plan économique. L'éthanol peut remplacer avantageusement celui obtenu par voie chimique à partir des produits pétroliers. En outre, l'intérêt de produire de l'éthanol vient du fait que c'est une substance énergétique stratégique. Son utilisation couvre un champ étendu d'activités industrielles : fabrication de spiritueux, d'intermédiaires chimiques

(produits de beauté, parfums, cosmétiques, produits pharmaceutiques, de solvants, de détergents, de désinfectants et d'acides organiques).

La production mondiale en acide citrique est estimée à plus de 1.6 millions de tonnes par an et elle est en constante augmentation de jour en jour (Berovic and Legisa, 2007).

La production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* est l'un des exemples le plus commercialement utilisé du métabolisme fongique. Beaucoup de micro-organismes tels que des mycètes et des bactéries peuvent produire l'acide citrique. Les divers mycètes, qui se sont avérés de bons accumulateurs de l'acide citrique dans leurs milieux de culture, incluent des souches d'*Awamori*, d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus restrictum*, de *Penicillium*, de *Piriformis*, de *Trichoderma viride*, de *Mucor* et de *Lipolytica* ([Arzumanov et al ., 2000](#)). Les souches mutantes pourraient améliorer la production de citrate par rapport aux souches sauvages (Sikander et al., 2001). Par ailleurs, la plupart des usines nouvellement construites ont adopté le procédé de fermentation submergée.

Quant aux enzymes amylolytiques, leurs utilisations ont été étendues à des secteurs variés, tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, les biotechnologies, chimie clinique, textiles, et détergents (Pandey et al., 1999). Par ailleurs, différentes bactéries et moisissures ont été largement utilisées à l'échelle industrielle pour la production d'une grande variété d'enzymes à savoir, les protéases, les catalases, les invertases et les α -amylases. Les amylases extracellulaires sont synthétisées par diverses espèces de levures, champignons, moisissures, et bactéries.

Parmi ces micro-organismes, on peut citer, *Bacillus subtilis*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Candida guilliermondii*, *Thermomyces langinosus*, *Humicola lanuginosa* et *Fusarium solani* (Hernandez et al., 2006; Kunameni et al., 2005, Lagzouli et al., 2007; Nawaz-Bhatti et al., 2007; Ravi et al., 2009). Le choix du milieu de fermentation est essentiel pour les micro-organismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par les micro-organismes a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote. Ces sources affectent non seulement la croissance mais aussi l'apparition des amylases (Pedersen et Nielsen, 2000). Enfin, l'Algérie importe l'ensemble de ses besoins en enzymes des pays développés. Le procédé de fabrication de l'amylase n'a pas été développé en Algérie. A cet effet, l'élaboration d'une technologie locale pour la production de cette enzyme à l'échelle industrielle s'avérera nécessaire.

Cette étude a pour objectifs d'utiliser les rebuts de la Deglet-Nour ainsi que les dattes de faible valeur marchande produites par le cultivar Tinissine comme substrat pour la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase. En effet, ces dattes sont riches en sucres qui peuvent être utilisés comme source carbonée de fermentation pour la production de ces métabolites. Enfin, on essaiera d'optimiser les paramètres de fabrication de ces métabolites.

Cette étude comporte quatre parties

1. Production de levure boulangère

L'objectif visé par ce travail est de produire une biomasse levurienne sur milieu à base de dattes. En effet, ces dattes sont riches en sucres qui peuvent être utilisés comme source carbonée de fermentation pour la production de la levure boulangère.

En outre, l'utilisation de la datte comme moyen de substitution à la mélasse est justifiée, car non seulement elle est produite localement en grande quantité et à bon marché mais aussi, elle permet d'économiser des devises au pays.

Par ailleurs, les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont au nombre de neuf dont huit isolées à partir des dattes et une souche témoin ATCC 1102 importée de France.

Enfin, la fixation des conditions de fermentation ainsi que l'étude du processus de fabrication de la levure boulangère cultivée sur substrat à base de dattes est nécessaire afin de se prononcer.

1. Production d'éthanol

L'objectif fixé par ce travail est la valorisation des dattes de faible valeur marchande ainsi que les rebuts de dattes produites par la variété Deglet-Nour par voie biotechnologique par la production d'éthanol. Les moûts de dattes sont riches en sucres, sels minéraux et vitamines. Ces substances sont considérées comme éléments essentiels pour la croissance des micro-organismes et plus particulièrement les levures employées pour la production d'éthanol.

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont au nombre de neuf et sont principalement employées pour leurs capacités à transformer les sucres de la datte en éthanol.

Par ailleurs, on essaiera d'optimiser les paramètres de production de l'éthanol.

1. Production d'acide citrique

L'objectif fixé par cette étude est la valorisation des dattes de faible valeur marchande par la production de l'acide citrique par voie de fermentation en utilisant deux souches d'*Aspergillus niger*, une souche ATCC 16404 et une autre isolée à partir d'un échantillon de sol de la région de M'ghaier. La datte peut constituer une source carbonée pour la fabrication de l'acide citrique par voie de fermentation par *Aspergillus niger*. Le procédé utilisé est une fermentation aérée avec une agitation en milieu acide. Le milieu de culture utilisé a une concentration en sucres totaux variant entre 120 et 200 g/L et est carencé en fer pour inhiber l'action de l'aconitase. La durée de la fermentation est de 6 à 10 jours.

Les résultats obtenus à l'échelle de laboratoire avec la datte sont prometteurs. Ainsi, il est possible d'obtenir un rendement supérieur à 70 % du poids total des sucres utilisés (Al-Obaidi et Berry, 1981).

D'autre part, la fixation des conditions optimales de production de l'acide citrique est l'un des objectifs à atteindre.

1. Production d' α -amylase

L'objectif visé par ce travail est de produire de l' α -amylase sur milieu à base de dattes. En effet, ces dattes sont riches en sucres qui peuvent être utilisés comme source carbonée de fermentation pour la production de cette enzyme.

Par ailleurs, on a utilisé une souche d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et une autre souche de *Candida guilliermondii* isolée à partir du levain pour produire des enzymes amylolytiques.

Enfin, on tentera d'optimiser les paramètres de production des enzymes amylolytiques.

Ce travail a donné lieu à la rédaction de sept publications

1. S. Acourene and A. Ammouche. Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012.

DOI 10.1007/s10295-011-1070-0

1. S. Acourene, A. Ammouche, K. Djafri, Amourache, M. Tama and B. Taleb. Utilisation of the date wastes as substrate for the production of Baker's yeast and Citric acid. *Biotechnology Journal*, 10(6), pp. 488-497, 2011
2. S. Acourene and A. Ammouche. Optimization of culture medium for Baker's Yeast, Ethanol, Citric Acid and α -amylase production from dates syrup. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(6), pp. 846-860, 2010.
3. S. Acourene, A. Ammouche et K. Djafri. Valorisation biotechnologique des dattes de faible valeur marchande par la fabrication de la Levure Boulangère, Alcool et Vinaigre. *Revue des régions arides*, No21 (1), pp. 284-298, 2008.
4. S. Acourene, A. Ammouche, K. Djafri. Valorisation des rebuts de dattes par la production de la Levure Boulangère, de l'Alcool et du Vinaigre. *Journal des Sciences et Technologie C*, 28, pp. 38 -45, Décembre (2008).
5. S. Acourene, A. Kh. Khalid, A. Bacha, M. Tama and B. Taleb. Optimization of Bakery Yeast production cultivated on musts of dates. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(10), pp. 964-971, 2007.
6. S. Acourene et M. Tama Utilisation des dattes de faible valeur marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tinissine et Tantboucht) comme substrat pour la fabrication de la Levure boulangère. *Revue des Energies Renouvelables: Production et Valorisation, Biomasse*, pp. 1-10, (2001).

Données bibliographiques

Chapitre I/ Données sur la phoeniciculture et la datte

1-1- Données sur la phoeniciculture

Le nombre de palmiers dattiers au niveau national a été estimé en 1959 à 7.300.000 pieds dont 900.000 pieds de la variété Deglet-Nour pour atteindre en 1985, 7.590.000 pieds (Merrouchi *et al.*, 2006). Dans le cadre de la loi sur l'accèsion à la propriété foncière (APFA) promulguée en 1983, environ 1.500.000 nouveaux palmiers ont été plantés pendant la décennie, 1985 - 1994. Ainsi, en 1994, le nombre de palmiers dattiers a atteint 9 millions. Enfin, en 2000, le nombre de palmiers dattiers a été estimé à plus de 12 millions puis à 17 millions en 2005 pour atteindre 19 millions en 2009 (Anonyme 2010; Merrouchi *et al.*, 2006).

Concernant la production dattière, cette dernière a été estimée à 198.000 tonnes en 1985 pour atteindre 261.000 tonnes en 1994, 420.000 tonnes en 2000 puis 492.188 tonnes en 2005 et 520.000 en 2009 (Anonyme 2010; Merrouchi *et al.*, 2006). La variété Deglet-Nour représente plus de 50 % de la production totale soit plus de 260.000 tonnes.

Par ailleurs, la quantité de rebuts de dattes produite varie d'un cultivar à un autre et au sein d'un même cultivar, elle varie sous l'influence de plusieurs facteurs (âge, conditions climatiques, techniques culturales...etc.). En ce sens, le cultivar Deglet-Nour génère plus de rebuts soit 10.0 à 15.0 % de la production totale par rapport aux cultivars Ghars et Degla-Beida soit 4.0 à 5.0 %. A cet effet, la quantité de rebuts de dattes produite en Algérie est de 38.000 tonnes (Merrouchi *et al.*, 2006).

Enfin, la production de dattes de faible valeur marchande a été estimée entre 70.000 et 100.000 tonnes (Anonyme, 2010).

1-2- Composition biochimique de la datte

1-2-1- Constituants de la pulpe

La pulpe est composée essentiellement d'eau, de sucres (saccharose, glucose et fructose) et de non sucres (protéines, cellulose, lipides, sels minéraux et vitamines).

Les sucres et l'eau constituent les éléments les plus importants qui confèrent à la datte, sa consistance.

L'eau est l'un des constituants essentiels du fruit. Elle a une importance fondamentale sur la qualité de la datte et agit sur sa conservation. Le taux d'humidité chez les différents cultivars de palmier dattier cultivés en Algérie varie de 10 à 55 % de M.F (Acourene et Tama, 1997; Acourene *et al.*, 2001). En ce sens, la consistance du mésocarpe au stade mûr, permet de classer les dattes en trois catégories selon la texture du fruit et sa teneur en eau (Acourene *et al.*, 2001) :

- Les dattes molles à chair aqueuse à l'état frais, nécessitant un traitement pour la réduction de leur teneur en eau pour être bien conservées. Cette dernière est supérieure à 30 %; cas du cultivar Ghars.
- Les dattes demi-molles à teneur en eau variant entre 20 et 30 %; cas de la variété Deglet-Nour.
- Les dattes sèches : à teneur en eau est inférieure à 20 %; cas des cultivars Degla-Beïda et Mech-Degla

Les dattes sont considérées comme des fruits riches en sucres. Ceux-ci existent sous deux formes : Saccharose et sucres réducteurs. Les principaux sucres réducteurs sont le fructose et le glucose mais les dattes contiennent d'autres sucres tels que l'arabinose, le galactose et autres (Ben Salah et Hellali, 1995). L'analyse de la composition des dattes en sucres permet de distinguer un groupe de cultivars dits à taux de sucres élevé pour lesquels cette valeur dépasse 50 % du poids frais de la chair. Par ailleurs, la teneur en sucres des dattes des différents cultivars cultivés en Algérie varie de 30.0 à 85.0 % et les non sucres entre 5.0 et 35.0 % (Acourene et Tama, 1997; Acourene *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les non sucres, la datte est faiblement pourvue en protéines 1.5 - 5.0 % de M.S (Baangoud et Shamshad, 1984; Sawaya *et al.*, 1983). Bien que leur profil en acides aminés soit favorable aux besoins humains, les teneurs sont trop faibles pour être considérées comme une source alimentaire importante. Quant à la teneur en fibres, cette dernière varie selon les cultivars et le stade de maturité de la datte, elle est faible chez les cultivars dits de qualité, Deglet-Nour, Ghars et Degla-Beida, soient 5.9, 2.75 et 3.95 % de M.F, respectivement et, est très élevée chez les cultivars de texture fibreuse tel, Ladjina soit 12.10 % de M.F (Acourene *et al.*, 2001). Pour la teneur en lipides, la datte est faiblement pourvue et elle varie entre 0.38 et 2.22 % de M.F (Baangoud et Shamshad, 1984; Sawaya *et al.*, 1983).

Le tableau 1 donne la composition en éléments minéraux de la datte. A priori, la datte occupe une place de choix comme aliment minéralisant au même titre que la plupart des fruits.

Tableau 1 : Composition de la pulpe de datte en sels minéraux

Sels minéraux	Teneur en mg/100g
Sodium	380.0 - 600.0
Potassium	600.0 - 1600.0
Calcium	20.0 - 150.0
Magnésium	32.0 - 170.0
Phosphore	34.0 - 120.0
Cuivre	0.2 - 1.9
Fer	1.5 - 8.0
Zinc	0.25 - 1.0
Manganèse	0.5 - 1.0

Source : Yousif et al. (1982).

· **Sels minéraux**

La datte est riche en éléments minéraux et plus particulièrement en sodium, potassium et calcium soient 380.0 - 600.0, 600.0 - 1600.0 et 20.0 - 150.0 mg/100 g de M.F, respectivement. Pour les autres éléments, ces derniers varient selon les cultivars et

leurs conditions de culture. En général, les cultivars de dattes présentent une teneur en phosphore satisfaisante variant entre 34.0 et 120.0 mg/100g de M.F. Pour la teneur en magnésium, cette dernière est satisfaisante et varie entre 32.0 et 170.0 mg/100 g de M.F. Par contre, les teneurs en Cuivre, Zinc et Manganèse sont faibles et varient entre 0.2 - 1.9, 0.25 - 1.0 et 0.5 - 1.0 mg/100 g de M.F, respectivement. Pour le fer, les dattes renferment des teneurs non négligeables soient 1.5 à 8.0 mg/100g de M.F.

· Vitamines

La pulpe de datte contient des vitamines en quantité variable selon les cultivars et leurs provenances. En général, elle contient la cobalamine (0.40 - 0.60 mg/100 g), l'acide nicotinique (0.50 - 0.60 mg/100 g), l'acide pantothénique (0.20 - 0.30 mg/100 g) et la vitamine C (8.0 - 20.0 mg/100 g) (tableau 2).

Tableau 2 : Composition vitaminique de la pulpe de datte

Vitamines	Teneur en mg/100g de pulpe
Acide ascorbique (Vitamine C)	8.00 - 20.00
Acide nicotinique	0.50 - 0.60
Acide pantothénique	0.20 - 0.30
Cobalamine	0.40 - 0.60
Thiamine (Vitamine B1)	0.06 - 0.13
Riboflavine (Vitamine B2)	0.05 - 0.17
Acide folique	0.06 - 0.07
Biotine	0.004 - 0.006
Pyridoxine (Vitamine B6)	Traces
Niacine (Vitamine PP)	Traces

Source : Yousif et al. (1982) et Munier (1973).

Toutefois, la datte reste déficiente en thiamine, riboflavine, acide folique, pyridoxine, biotine, vitamine E et niacine.

1-2-2- Constituants du noyau

Le noyau est constitué d'un albumen enveloppé d'une membrane cellulosique.

Il constitue un sous produit intéressant dont la valeur fourragère est équivalente à celle de l'orge (tableau 3).

Tableau 3 : composition chimique du noyau de datte

Constituants	Teneur en % de M.S
Eau	6.00 - 7.00
Cendres	1.00 - 1.22
Lipides	8.00 - 9.00
Protéines	5.00 - 6.00
Sucres	13.00 - 15.00
Cellulose	16.00 - 17.50
Fibres	30.00 - 35.00
Valeur fourragère	1.00 - 1.10

Source : Munier (1973).

1-3- Traitement et conditionnement de la datte

Les méthodes de traitement et de conditionnement de la datte varient selon les cultivars et leur destination.

Les dattes sèches (Degla-Beida, Mech-Degla...etc.) sont triées en dattes commercialisables et en dattes rebuts, destinées à l'alimentation animale.

Concernant les dattes molles, après un triage sommaire où on élimine les rebuts, elles sont déposées en tas où elles laissent exsuder un sirop. Après un temps de séchage suffisant, elles sont empilées dans des sacs d'étoffe puis comprimées. Pour la Deglet-Nour (datte de qualité supérieure) généralement destinée à l'exportation, cette dernière subit plusieurs traitements. La première opération consiste à trier ces dattes en plusieurs catégories :

<u>Dattes mûres</u>	- Branchettes - Marchande (Dattes demi-molles) - Sifi (Dattes sèches)
<u>Dattes immatures</u>	- Martouba - Bsers
<u>Dattes rebuts</u>	- H'chefs - Dattes véreuses - Dattes ratatinées

Les dattes mûres (1^{ère} catégorie) sont désinsectisées et conditionnées avant d'être commercialisées. L'utilisation de techniques de conditionnement spécifiques permettrait de conserver plus longtemps la qualité initiale des dattes stockées. Le conditionnement sous vide des dattes naturelles est le mode le mieux adapté pour une meilleure protection du produit contre la prolifération des levures et moisissures et contre la déshydratation. Pour les dattes fourrées, le conditionnement sous atmosphère modifiée avec une injection d'un mélange gazeux (20 % CO₂ et 80 % N₂) à la dose de 10 % s'est révélé le meilleur pour conserver la qualité initiale du produit durant le stockage (Achour *et al.*, 2003).

Pour ce qui est des dattes sèches, ces dernières sont commercialisées telles quelles et parfois ré humidifiées. Concernant les dattes, bsers, ces dernières sont suspendues dans des penderies (locaux ventilés pourvus de différents dispositifs sur lesquels sont accrochés les régimes) par contre, les rebuts sont destinés directement à l'alimentation du bétail. Il est à signaler que le traitement de la datte génère beaucoup de déchets (noyaux, dattes touchées,...etc.) qu'il convient de valoriser afin d'en tirer le maximum de profit.

1-4- Valorisation de la datte

Les dattes communes de faible valeur marchande représentent un tonnage important en Algérie soit 60.000 à 70.000 tonnes, auxquelles s'ajoute un certain tonnage provenant des écarts de tri de la Deglet-Nour. Généralement ces dattes sont données telles quelles aux animaux. Ainsi, leur transformation à l'échelle industrielle est souhaitable afin d'obtenir des produits nouveaux à haute valeur ajoutée.

1-4-1- Valorisation technologique de la datte

1-4-1-1- Les sirops

C'est un produit sirupeux, concentré de couleur jaune à brun, riche en sucres. Selon, Al-Ogaidi (1987); Mohamed et Ahmed (1981), les principales étapes pour la production du sirop de dattes sont (figure 1):

- Traitements préliminaires

Les dattes sont lavées avec l'eau, pour être débarrassées des impuretés. Ensuite, une fois lavées, elles sont dénoyautées à l'aide d'un dénoyateur et enfin broyées grossièrement.

- Extraction

L'extraction du sirop de dattes se fait par épuisement des pulpes à l'eau chaude.

La quantité d'eau utilisée est de 2.5 litres pour un kilogramme de pulpes de dattes. La température de cuisson est de 80 à 85 °C durant 40 à 50 minutes

- Clarification, décantation et filtration des jus

L'élimination des matières colloïdales peut se faire par voie chimique. Ce processus dit de purification se fait généralement par chaulage et carbonatation. L'ajout de lait de chaux et de dioxyde de carbone entraîne une précipitation des impuretés. Après formation du précipité, on décante pour obtenir un jus limpide, pour extraire le jus du précipité, il faut ajouter un adjuvant de filtration (Terre d'infusion ou terre de polyamide). Pour la filtration, on peut utiliser un appareil à plaques d'amiante seitz et un appareil à toiles et chambres de Simone, muni d'une pompe sous vide. Pour l'utilisation de ce filtre, on prépare la pré couche par mélange de l'aide filtrant avec du jus.

- Concentration sous vide

La concentration est réalisée par évaporation du jus sous vide jusqu'à obtention d'un sirop ayant 70 à 75 % de matières solides solubles. Le sirop de dattes peut être utilisé pour la fabrication de sucre liquide, de boissons rafraîchissantes ou comme édulcorant.

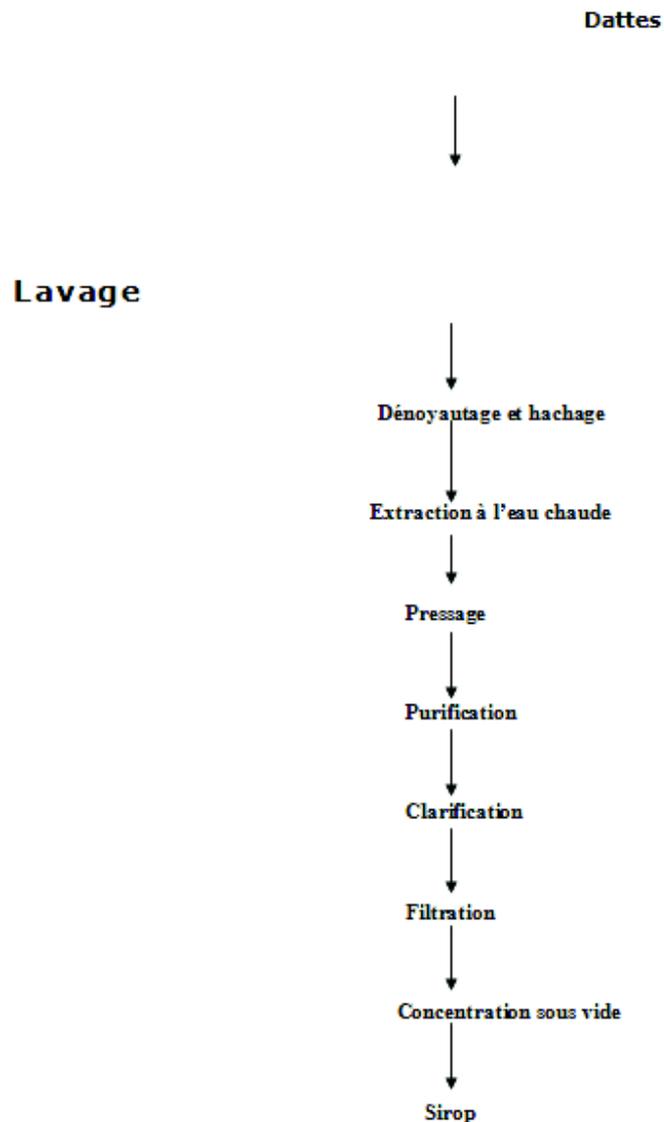


Figure 1 : Diagramme de fabrication du sirop de dattes.

1-4-1-2- Les confitures, gelées et marmelades

D'après certaines expériences menées en Arabie saoudite par Al-Shawan et al. (1987), les dattes se prêtent comme tout autre fruit à la préparation de confitures vue leur richesse en sucres. Le manque d'arôme particulier et d'acidité naturelle peuvent être suppliés par l'apport d'acide citrique et d'arômes. Selon, El-Moubarek et Osman (1984), les principales étapes pour la production de confitures sont (figure 2):

- Traitements préliminaires

Les dattes sont d'abord triées puis lavées à l'eau. Ensuite, elles sont dénoyautées manuellement, évaporées sous vide pendant 15 à 20 minutes, pelées et plongées dans de l'eau à une température de 85 °C pendant 1 minute. Après le blanchiment, les dattes sont broyées.

- Cuisson et concentration

Pour pouvoir produire des confitures de dattes présentant des caractéristiques sensorielles agréables et acceptables pour les consommateurs, nous proposons la formulation suivante (El-Moubarek et Osman, 1984) :

- 1.1 kg de dattes entières soit un kg de pulpes.
- 0.75 à 1 litre d'eau.
- 200 à 400 g de sucres.
- 10 g de pectines.
- 5 g d'acide citrique ou 50 à 100 ml de jus de citron.
- 5 ml d'arôme d'abricot, éventuellement.

Le mélange est ensuite chauffé à 80 °C pendant 30 à 40 minutes et sous agitation continue, jusqu'à l'obtention d'un concentré de dattes ayant un degré Brix variant entre 60 et 70 %.

- Conditionnement

Le conditionnement doit intervenir rapidement après la cuisson, de cette manière, la confiture encore chaude détruit les micro-organismes susceptibles d'être présents dans l'emballage. Le produit est versé dans un récipient ou bocal et on le laisse refroidir jusqu'à une température de 40 - 45 °C.

- Pasteurisation

Les bocaux fermés sont pasteurisés à une température de 105 °C pendant 15 minutes.

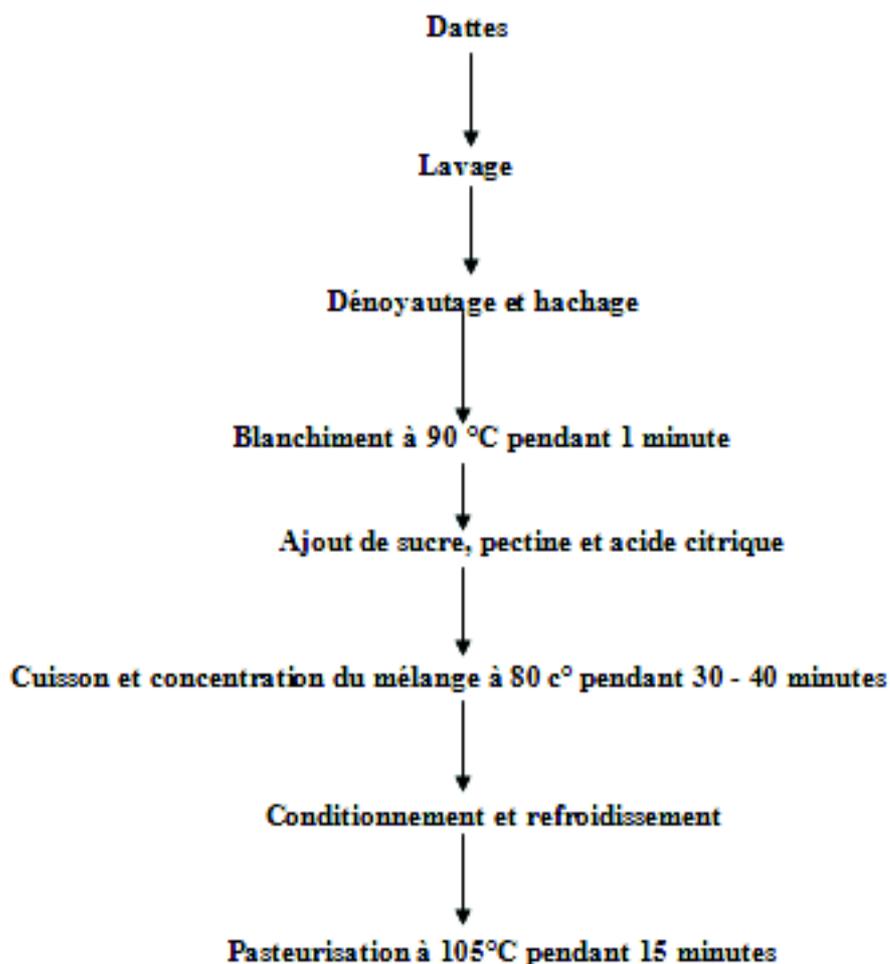


Figure 2 : Diagramme de fabrication des confitures de dattes.

Selon Al-Shawan *et al.* (1987), les confitures mixtes de dattes avec d'autres fruits contribuent à l'aromatization du produit tout en lui fournissant une acidité naturelle.

1-4-1-3- Les pâtes de dattes

Les pâtes de dattes peuvent être confectionnées à partir de dattes molles et demi-molles et peuvent être intéressantes pour l'utilisation des dattes dont l'aspect externe les rend impropres à la vente. On peut aussi utiliser un mélange de variétés de dattes. Elles peuvent être utilisées en biscuiterie, en pâtisserie pour le fourrage de gâteaux ou consommées telles quelles. On peut les mélanger avec d'autres produits (fruits confits, Amandes...etc.). On peut aussi obtenir des produits de grande valeur nutritive en mélangeant ces dernières avec des aliments riches en protéines ou en lipides tels le lait, les levures et les arachides (Al-Shawan *et al.*, 1987).

1-4-1-4- Les farines de dattes

Elles sont produites à partir de dattes sèches ou susceptibles de le devenir après dessiccation.

Les cultivars de dattes qui conviennent le mieux pour la fabrication de farine sont (Mech-Degla, Degla-Beida et Horra). Ces farines sont obtenues par simple broyage et sassage des dattes. D'après, Al-Ogaidi (1987), il est possible d'obtenir à partir de 100 kg de dattes sèches, 50 kg de farine de dattes ayant une teneur en eau de 5 %.

1-4-1-5- Production du caramel

On peut le produire à partir des dattes, des pâtes ou du sirop de dattes. D'après Al-Ogaidi (1987), les caramels de dattes présentent une qualité nutritive supérieure à celle produite à partir du saccharose et ceci du point de vue richesse en protéines, sels minéraux et vitamines. Selon, Al-Ogaidi (1987), la méthode de cuisson peut jouer un rôle important sur la qualité du produit obtenu. Ainsi une cuisson lente et prolongée à température basse donne un caramel de consistance molle et ayant un arôme satisfaisant. Par contre, une cuisson rapide à des températures élevées donne du caramel sec et se cassant facilement. Enfin, les principales étapes pour la fabrication du caramel sont :

- Préparation du mélange pour la pâte du caramel
- Evaporation et caramélisation
- Ajout de colorants et d'arômes
- Refroidissement et mise en forme
- Emballage et sertissage

1-4-1-6- Utilisation des rebuts de dattes comme aliment de bétail

Les sous-produits de dattes (noyaux, pulpes épuisées) ainsi que les dattes de qualité médiocre peuvent constituer une source appréciable pour l'alimentation du bétail. Ces sous-produits fournissent une grande quantité d'énergie estimée à 330 Calories pour 100g de dattes soit 0.75 UF/Kg (Bukhaiev, 1983).

Les noyaux de dattes après broyage et macération contribuent à l'amélioration de la pulpe en lipides et protéines. Selon Kamel *et al.* (1981), la farine issue de la pulpe et noyaux de dattes peuvent être incorporées jusqu'à 20 % dans l'alimentation des volailles.

Les résultats de cette expérimentation ont montré une croissance et un gain de poids conséquent.

1-4-2- Valorisation biotechnologique des dattes

1-4-2-1- Production d'alcool

La richesse de la datte en sucres permet à cette dernière d'être utilisée comme source carbonée pour la fabrication des produits alcooliques tels, le vin, l'alcool industriel et l'éthanol. Pour la fabrication d'alcool industriel, on utilise une fermentation naturelle du jus de datte ayant une teneur en sucres de 22 - 25 % tout en ajoutant de l'acide tartrique et du phosphate bi ammoniacal, on fixe le pH à 3.3 et on ajoute l'anhydride sulfureux pour assainir le milieu. Par contre, pour la production d'éthanol ou le facteur limitant étant le méthanol, il est indispensable d'utiliser des levures sélectionnées tels que : *Saccharomyces cerevisiae*. (Ould-Elhadj, 2001). Les principales étapes pour la fabrication d'alcool sont :

- Préparation du moût de dattes à une teneur en sucres de 18 - 23 %
- Ajout de *saccharomyces cervisiae* (2 - 4 %)
- Fixation des paramètres de fermentation: pH 4.8 - 5.0 et une température de 25°C.

Selon, Touzi (1997), il est possible d'obtenir jusqu'à 31 litres d'alcool par quintal de dattes.

1-4-2-2- Production de vinaigre

Les rebuts de dattes et les dattes communes peuvent être utilisés comme matière première de choix pour la production de vinaigre vue leur richesse en sucres. Le vinaigre est produit après une double fermentation :

- Fermentation alcoolique en milieu anaérobie
- Fermentation acétique par *Acétobacter aceti* en milieu aérobie stricte.

Selon Boughnou (1988), le vinaigre de dattes ayant une acidité de 8.5 % avec un rendement de production de 80 %, répond aux normes fixées par le comité mixte (F A O / O M S). Ce vinaigre peut se substituer à celui fabriqué synthétiquement. D'après Boughnou (1988), il est possible d'obtenir 2.0 à 2.5 litres de vinaigre titrant 8.5° par Kg de datte.

1-4-2-3- Production de levures

a/ Les levures boulangères

Elles sont obtenues par fermentation du moût de datte, à une température d'incubation de 28.0 à 30.0 °C, un pH de 4.5 et une aération de 2 V.V.M. Pour obtenir et maintenir une population de levures homogène en cuve, il faut remplacer continuellement le sucre consommé afin de maintenir constante sa concentration. D'après Al-Obaidi *et al.* (1987), il est possible d'obtenir 4.4 g de levures sèches par litre du moût de datte en fermentation discontinue.

b/ Les levures alimentaires

Etant donné que la datte est riche en sucres, cette dernière peut être utilisée comme source carbonée pour la production de biomasse microbienne riche en protéines. Ces dernières peuvent être incorporées dans les rations humaines ou animales. La biomasse obtenue peut

contenir jusqu'à 60 % de protéines. Selon Rougieux et Girard (1984), il est possible d'obtenir 5.0 - 8.0 g/l de levures sèches par litre du moût de datte en fermentation discontinue.

1-4-2-4- Production d'acide citrique

La datte peut constituer une source carbonée pour la fabrication d'acide citrique par voie de fermentation par *Aspergillus niger*. Le procédé utilisé est une fermentation aérée avec une agitation en milieu acide. Le milieu de culture utilisé est carencé en fer pour inhiber l'action de l'aconitase et une concentration en sucres totaux variant entre 140 et 200 g/l. La durée de la fermentation est de 6 à 10 jours (Al-Obaidi et Berry 1981). Les résultats obtenus à l'échelle de laboratoire sont prometteurs. Ainsi, il est possible d'obtenir un rendement supérieur à 70 % du poids total des sucres utilisés (Al-Obaidi et Berry 1981). Par ailleurs, Al-Obaidi et Berry (1982 a) ont montré que l'utilisation du jus de datte avec apport d'éléments nutritifs à des quantités bien déterminées peut donner une production en acide citrique de l'ordre de 74 % du poids total en sucres utilisés.

1-4-2-5- Production d'acides aminés (acide glutamique et lysine)

La datte peut constituer une source carbonée pour la fabrication d'acides aminés par voie de fermentation. Les acides aminés constituent un groupe de molécules utilisées essentiellement en alimentation tant humaine qu'animale. Les souches *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium flavum* ainsi que des souches génétiquement modifiées de l'espèce *Escherichia coli* sont à ce titre les micro-organismes les plus souvent utilisés. Parmi les acides aminés produits par l'intermédiaire de ces bactéries, les plus importants, en termes de quantités synthétisées, sont l'acide glutamique, la lysine, la phénylalanine, la thréonine et le tryptophane (Delaunay *et al.*, 2001; Pfefferle *et al.*, 1993).

La production d'acide glutamique est réalisée dans des bioréacteurs agités ayant une capacité de 3 à 500 m³ et munis d'orifices pour l'alimentation et le refroidissement. Il est à noter que l'apport d'oxygène dissous, la fixation de la température et du pH sont obligatoires. La température est fixée entre 30 et 35 ° C et le pH entre 7.0 et 8.0 (Hermann, 2003).

Pour la production de lysine, les conditions de culture sont selon Hadj-Sassi *et al.* (1996).

- Température : 32 - 34 °C
- pH : 6.5 -7.0
- Oxygène dissous : supérieur à 3 %
- Taux d'agitation : 200 tr/min
- Durée de fermentation : 48 heures

L'isolement de l'acide glutamique et de la lysine se fait selon trois méthodes (Hadj-Sassi *et al.*, 1996):

1. Par échange d'ions, évaporation et cristallisation pour obtenir une préparation contenant 98,5 % de chlorhydrate de lysine.
2. Séparation de la biomasse, l'évaporation et filtration pour obtenir une solution alcaline concentrée contenant de l'acide glutamique ou de la lysine (50%).
3. Séchage par atomisation de l'ensemble du bouillon de fermentation suivie d'une granulation pour obtenir de l'acide glutamique ou du sulfate de lysine ayant 47 % de lysine.

Chapitre-II : Etude de la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*)

2-1- Généralités et taxonomie

Les levures sont des champignons unicellulaires, de formes variables, sphérique à cylindrique, allongées, apiculées, dont la taille ne dépasse guère 6 à 8 millièmes de millimètre. Présence d'ascospores dans des asques à paroi lisse; 1 à 4 par asque. Lorsque on observe une levure au microscope électronique, on distingue, une paroi cellulaire, une membrane cytoplasmique, un cytoplasme, un noyau, des vacuoles, des ribosomes et des mitochondries (Larpen, 1990). Les **mitochondries** sont les véritables centrales énergétiques de la cellule lorsque celles-ci fonctionnent en présence d'oxygène. Leurs rôles sont l'utilisation des sucres pour produire de l'énergie et permettre ainsi à la cellule d'assurer sa croissance. Les levures se reproduisent par bourgeonnement, par scissiparité où la combinaison des deux processus. Il existe plusieurs genres de levures et la taxonomie de la levure boulangère est la suivante (Kreger-Vans, 1984) :

- Règne des protistes
- Embranchement des Eucaryotes
- Classe des Ascomycètes
- S/Classe des Hémiascomycètes
- Ordre : Endomycétales
- Famille des Saccharomycétaceae
- S/Famille des Saccharomycoidea
- Genre : saccharomyces
- Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*

Les caractéristiques morphologiques telles, la forme de la cellule, l'aptitude à la filamentation, les caractéristiques physiologiques et sexuelles peuvent être utilisées comme critères de classification et d'identification des levures.

2-2- Description des principales souches de levures

La souche de levure la plus communément utilisée est *Saccharomyces cerevisiae*. On la trouve dans les boulangeries sous la forme de levure fraîche. Toutefois, il existe dans les laboratoires spécialisés des souches de levures ayant des métabolismes différents de la souche dite « sauvage ».

- **Souche A** : *Brettanomyces sp*

De forme allongée, elle peut produire un pseudo-mycélium sur milieu solide et même sur milieu liquide non agité, s'agrège dans une culture âgée et la rend trouble. Il s'agit de cellules juxtaposées qui ont un aspect plus rectangulaire et se ramifient. Cet état fragile ne résiste pas à une forte agitation et le pseudo mycélium se casse pour redonner des cellules isolées.

- **Souche B** : *Schawnniomyces castellii*

De forme ovoïde, elle ressemble aux saccharomyces mais elle est remarquable par ses propriétés physiologiques : Elle a une activité amylolytique, a un fort effet Pasteur et peu ou pas d'effet Crabtree.

· **Souche C : Schizosaccharomyces**

Le groupe des schizosaccharomycètes est caractérisé par son mode de division végétatif qui est transversal alors que les autres levures bourgeonnent. Elles ont une forme plus rectangulaire. De plus leur signe sexuel est instable, ce qui veut dire que dans une culture pure il y ait deux types de cellules + et - . On peut aussi observer des figures caractéristiques de fécondations en V.

Souches D -- E -- F - : *Saccharomyces cerevisiae*

Souche D rho + sac +

C'est la souche sauvage, elle est prototrophe, c'est à dire qu'elle n'a pas d'exigences particulières et pousse sur milieu minimum. Elle possède un génome mitochondrial intact, (rho+) et peut donc respirer. Elle utilise le saccharose comme source de carbone et d'énergie, (sac+) car elle sécrète une invertase.

· Souche E rho - sac +

Elle ne diffère de la souche D que par une mutation altérant le cytochrome B. Elle ne peut donc pas respirer et ne poussera pas sur le glycérol qui est un substrat uniquement respirable.

· Souche F rho + sac -

Elle se diffère de la souche D par une mutation altérant la synthèse de la saccharase (elle n'est pas sécrétée à l'extérieur de la cellule) et ne poussera donc pas sur le saccharose.

2-3- Besoins nutritionnels et cultureux de *Saccharomyces cerevisiae*

2-3-1- Le carbone

La levure boulangère peut métaboliser plusieurs composés carbonés (Glucose, Fructose, Mannose, Saccharose et Maltose). Elle peut aussi métaboliser les acides tartrique, succinique, acétique, lactique et acétique ainsi que l'éthanol en anaérobiose. Les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont directement inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucres simples. Enfin, l'activité de l'invertase est élevée par contre, celle de la maltase est très variable et peut être un facteur limitant dans la fermentation du maltose. Les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées par les levures boulangères. Selon Gay (1979), la levure boulangère utilise les substances carbonées de la manière suivante (figure 3):

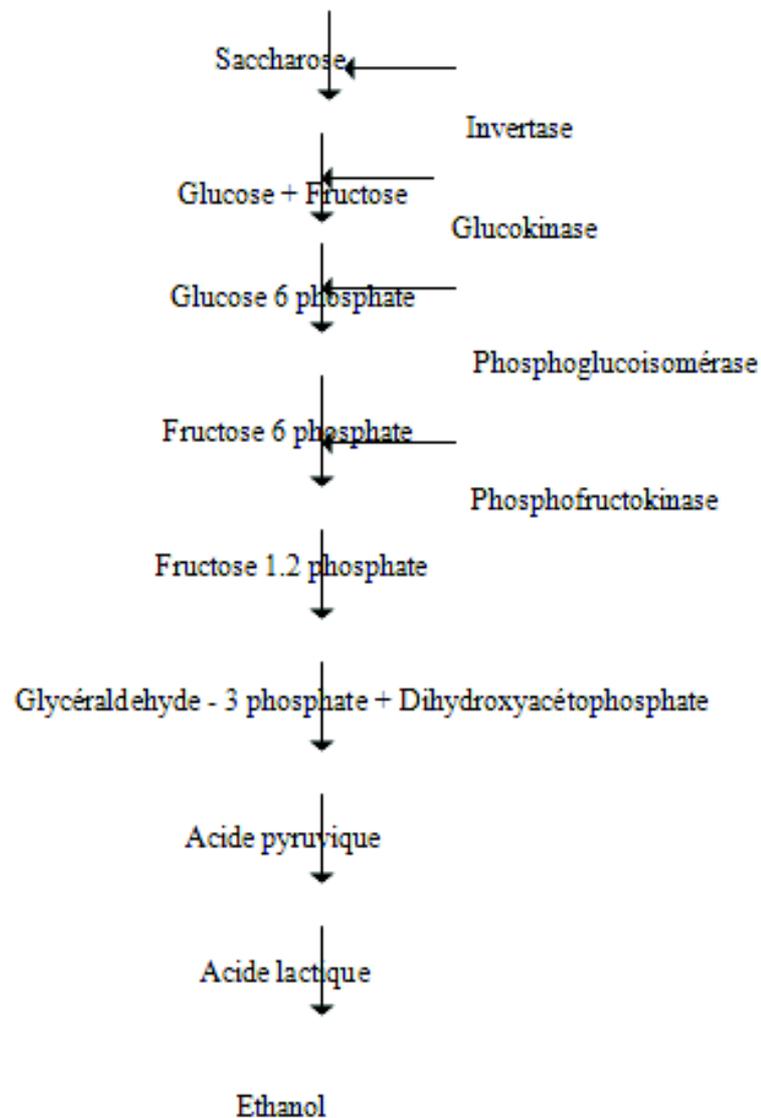


Figure 3 : Diagramme de fabrication de l'alcool.

2-3-2- L'azote

La levure peut utiliser l'azote sous forme minérale tels, l'urée, les nitrates et l'ammonium. La levure assimile les ions ammonium plus rapidement que les acides aminés en aérobiose. L'azote ammoniacal est rapidement transformé par la levure en de nombreux constituants, acides aminés, protéines et acides nucléiques (Gay, 1979).

2-3-3- Les sels minéraux

Les sels minéraux sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des levures et les plus indispensables sont : Le phosphore, potassium calcium, magnésium, cuivre et le manganèse. Leurs déficiences ont des répercussions négatives sur la fermentation. Toutefois, à part le phosphore, ces éléments sont en général présents en quantité suffisante dans les divers milieux carbonés telle la mélasse (Simon et Meunier, 1970).

2-3-4- Les facteurs de croissance (vitamines)

Les vitamines sont considérées comme des facteurs importants pour la croissance des levures. La déficience en ces dernières peut avoir des effets négatifs sur la croissance de la levure. Selon, Al-Obaidi *et al.* (1987), les teneurs en vitamines requises pour la levure boulangère sont :

- Biotine : 0,04 mg/100 ml du milieu de fermentation
- Pantothénate de calcium : 0,01 mg / / / /
- Thiamine : 0,006 mg / / / /

2-3-5- Besoins cultureux

La température idéale pour la croissance de la levure boulangère est comprise entre 25 et 30 °C, un pH compris entre 4.5 et 5.0 et un gramme d'oxygène pour la production d'un gramme de levure sèche (Reed et Nagodawithana, 1991).

2-4- Composition biochimique

La composition de la levure dépend de son type et de ses conditions de conservation. Le tableau 4 présente des valeurs moyennes indicatives pour des levures prélevées à l'état frais sur le marché européen (COFALEC, 1999).

Tableau 4 : Composition biochimique de la levure boulangère

Composants	En % de M.S	dont	En % de M.S
Eau	5.0 - 6.0		
Azote	6.5 - 9.3		
Protéines	40.6 - 58.0	Glutathion	0.5 - 1.5
Glucides	35.0 - 45.0	Glycogène	5.0 - 10.0
		Tréhalose	8.0 - 20.0
Lipides	3.0 - 6.0	Phospho-lipides	1.0 - 2.0
Sels minéraux	5.0 - 7.5	Potassium Sodium Calcium Magnésium Phosphore	0.8 0.2 0.02 - 0.15 0.04 - 0.18 0.8 - 1.3
Vitamines		Thiamine (B1)	0.002 - 0.015
		Riboflavine (B2)	0.002 - 0.008
		Pyridoxine (B6)	0.002 - 0.006
		Niacine (PP)	0.010 - 0.050

2-5- Métabolisme

La levure, comme tout être vivant, vit en *aérobiose* ; mais elle a aussi la remarquable faculté de s'adapter à un milieu **anaérobie** . Pour assurer ses dépenses énergétiques, elle utilise différents substrats carbonés, principalement des sucres. Le glucose est l'aliment carboné préférentiel de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le saccharose est immédiatement transformé en glucose et fructose par l'invertase par contre, le maltose entre dans la cellule de la levure grâce à une perméase spécifique

pour être ensuite scindé en deux molécules de glucose par la maltase. Les conditions d'oxygénation du milieu génèrent deux types de métabolisme (Gay, 1979).

a/ En aérobiose

Lorsque la levure se trouve en présence d'air, elle produit à partir du sucre et de l'oxygène, du gaz carbonique, de l'eau et une grande quantité d'énergie. C'est le processus métabolique de la respiration. Dans ces conditions l'oxydation du glucose est complète :

Glucose + Oxygène ----> Gaz carbonique + Eau + Energie

Toute l'énergie biochimique potentiellement contenue dans le glucose est libérée. Grâce à cette énergie, la levure assure son maintien en vie. Toutefois, elle peut aussi l'utiliser pour synthétiser de la matière organique, c'est-à-dire entrer en croissance et se multiplier. Il lui faudra alors trouver dans le milieu d'autres éléments nutritifs, en particulier de l'azote. Ce processus métabolique est optimisé par les industriels pour cultiver la levure.

b/ En anaérobiose

En absence d'oxygène, la levure peut utiliser les sucres pour produire l'énergie nécessaire à son maintien en vie. Ce processus métabolique a été défini par Pasteur comme étant celui de la fermentation. Les sucres sont transformés en gaz carbonique et en alcool.

Glucose ----> Gaz carbonique + Alcool + Energie

L'alcool formé contient encore beaucoup d'énergie. Il n'y a donc qu'une partie de l'énergie biochimique potentiellement présente dans le glucose qui a été libérée. Il assure un minimum vital à la levure, mais ne lui permet pas de se multiplier rapidement.

2-6- Utilisations de la levure

2-6-1- Utilisation de la levure pour la panification

Pour fabriquer le pain, on mélange la farine avec de l'eau, du sel et de la levure. La farine contient entre 1 et 2% de sucres, principalement du glucose et du fructose qui sont fermentés. La pâte est bien malaxée pour être bien homogénéisée et pour assouplir le gluten. On incube quelques heures et on cuit. Le gaz carbonique généré assure l'aspect vacuolisé de la mie par sa dilatation, et l'éthanol est éliminé par évaporation. La levure assure la production d'autres composés qui donnent de l'arôme et hydrolyse d'autres composés qui donnent sa texture au pain.

2-6-2- Utilisation de la levure pour la fabrication de boissons alcoolisées

Les levures sont principalement employées pour leur capacité à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification, de l'élaboration de la bière et de toutes les boissons alcoolisées. On suspecte que les levures qui portent des noms différents, *Saccharomyces ellipsoideus* pour le vin, *Saccharomyces carlsbergensis* pour la bière, sont des souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* (Bowman et Geiger, 1984). Les levures qui transforment le sucre du raisin en [alcool éthylique](#), sont toujours présentes sur les raisins eux-mêmes. Pour la bière, le substrat de base utilisé est l'orge. La fermentation se produit en ajoutant de la levure et elle se déroule en deux phases (Bourgeois et Larpent, 1996).

La fermentation primaire qui dure 5 à 10 jours à une température de 10 à 20 °C, ou on observe là l'essentiel des transformations des sucres en alcool.

- La fermentation secondaire qui dure 2 à 5 semaines à une température de 1 °C et pendant laquelle la bière subit des transformations biochimiques subtiles qui assurent son affinage.

2-6-3- Utilisation de la levure comme produit alimentaire

Selon Canu *et al.* (2000), les levures ont une grande valeur nutritive et peuvent entrer dans la ration alimentaire animale ou humaine. En ce sens, la production de "levures alimentaires" ou P.O.U (Protéine d'Organisme Unicellulaire), peut s'effectuer sur des substrats très variés. Le lactosérum par exemple, est un excellent milieu de culture permettant le développement de levures en utilisant le lactose comme source de carbone. Ce sont des souches de *Kluyveromyces lactis* qui donnent le meilleur rendement. Les mélasses de betteraves et de canne à sucre, riches en saccharose, permettent d'obtenir des biomasses protéiques.

Les deux espèces les plus couramment cultivées sur ces substrats sont, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*. Les liqueurs sulfuriques, les résidus de fabrication de la pâte à papier, riches en pentoses, ainsi que les hydrolysats cellulosiques provenant de déchets forestiers, paille de blé ou autres céréales, fournissent des milieux de culture pour *Candida utilis*. Enfin, les hydrocarbures, essentiellement les paraffines normales et le méthanol peuvent servir de substrats pour la production de protéines microbiennes qui peuvent être introduites dans l'alimentation animale ou humaine.

Chapitre-III : Production de la levure boulangère

3-1- Historique

En 1860, **Pasteur** prouve que la fermentation est causée par des organismes vivants et affirme que les agents responsables de la réaction doivent être liés à la cellule de la levure. Il démontre ensuite que la levure peut vivre aussi bien en présence qu'en l'absence d'oxygène, se multipliant dans le premier cas, provoquant une fermentation dans le second cas. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la production de la levure boulangère :

3-1-1- La méthode hollandaise : Levures hautes et basses

En 1780, les distillateurs hollandais mirent une nouvelle technique de fabrication de la levure de boulangerie qui s'appellera méthode hollandaise. La levure produite est vendue sous forme de crème. Vers 1825, le levurier Tebbenhof fabriqua pour la première fois une levure pressée. Tebbenhof eut l'idée de la presser pour en extraire l'eau, et de la vendre en blocs. C'est encore sous cette forme qu'elle est commercialisée de nos jours. Le filtre-presse, qui améliora sensiblement le procédé industriel, fut mis au point en 1867.

3-1-2- Le procédé viennois

Le procédé viennois de production de la levure de boulangerie date de 1867. C'est le point de départ reconnu de l'histoire de la levurerie. Ainsi, **Reimminghaus**, réalisa à l'usine Mautner de Vienne le procédé de fabrication de la levure industrielle. Ce procédé, consistait à préparer un moût de grains, de telle sorte que le dégagement du gaz carbonique entraînerait la levure à la surface, où elle recueillie. Après tamisage, la levure, d'abord lavée

à l'eau froide, se déposait dans une grande cuve, avant d'être essorée au moyen de presses à vis ou des filtres-presses.

3-1-3- La méthode moderne : Synchronisation de l'addition des sucres avec la croissance de la levure

La méthode dite d'addition continue marque la naissance de l'industrie moderne de la levure. Elle fut introduite en 1915 en Allemagne et elle consiste à synchroniser l'addition des sucres dont se nourrit la levure avec la croissance de celle-ci. De cette manière, il ne reste à aucun moment de surplus de sucres dans le milieu de fermentation, ce qui évite une formation d'alcool. Depuis, elle s'est largement perfectionnée grâce à une meilleure connaissance des matières premières et de la biologie des levures, ainsi qu'à l'automatisation des procédés.

Concernant, la pureté bactériologique, le choix des matières premières, la conduite des fermentations et le progrès scientifique ont permis la progression des connaissances et par conséquent, des perfectionnements constants en levurier. Ces derniers portèrent sur l'élimination des risques de contamination, le choix judicieux des matières premières, la conduite des fermentations et l'amélioration des produits finis. En 1883, **Emile Hanse n**, introduisit la culture pure, qui repose sur le double principe de la pureté bactériologique de l'ensemencement initial et du maintien de cette pureté pendant la fabrication de la levure. Les cuves de bois furent alors remplacées par des cuves en métal laqué stérilisables, puis en cuivre dans les années vingt, et enfin en acier inoxydable. Ces dernières se généralisèrent durant les années soixante.

Par ailleurs, en 1892 à Berlin, il a été introduit des séparateurs centrifuges de levures, qui remplacèrent la récolte manuelle.

Des machines opérant en continu seront ensuite introduites. D'autre part, dès 1900 - 1935, les chercheurs étudièrent le remplacement du milieu de culture à base de céréales par la mélasse enrichie en azote ammoniacal et en phosphore. **Enfin**, les diverses étapes de la fabrication de la levure ont fait l'objet de très importants progrès depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale. L'un des principaux, sur le plan industriel, a été le remplacement des anciens filtres-presses discontinus par des filtres rotatifs continus sous vide. La qualité et la productivité de la dernière phase de fabrication de la levure ont été améliorées. Grâce à eux, les industriels maîtrisent mieux le lavage de la levure.

3-2- Procédé de fabrication utilisé par les lévurerries Algériennes

La conduite de la multiplication des cellules de levure revêt une importance capitale dans la réalisation d'un double objectif que se fixe le levurier.

- **Le premier** est d'ordre qualitatif. Pour une souche déterminée, il faut répondre à des critères multiples qui sont : La meilleure force fermentative et sa stabilité, la nature du produit fini (levures pressées, levure sèche, etc.)
- **Le second** objectif est d'ordre économique. Le fabricant doit obtenir la qualité recherchée au meilleur coût.

Le procédé qui sera décrit dans cette étude est celui utilisé par la lévurerrie de Oued-Smar (Anonyme, 2003). Les étapes peuvent être sensiblement différentes selon les fabricants, en nombre et en modalité, mais le principe reste le même. Pour chacune, il s'agit de produire une quantité de levure suffisante pour pouvoir ensemer l'étape suivante.

3-2-1- Traitement de la mélasse

Il existe plusieurs procédés de clarification de la mélasse. Parmi ces procédés, la lévurerrie de Oued-Smar utilise le procédé suivant :

- Acidification - chauffage à 70 °C pour la mélasse de betterave.
- Acidification-chauffage et alcalinisation- chauffage pour la mélasse de canne.

La mélasse est diluée à 40 °Balling dans de l'eau chaude, stérile, ensuite on ajoute l'acide sulfurique pour abaisser le pH à 4.5. On chauffe à 70 °C durant 30 à 60 minutes et on laisse reposer durant 2 heures au minimum. Une fois le produit décanté, on centrifuge et on récupère le surnageant. Enfin, la mélasse clarifiée est stérilisée à une température de 130 °C durant

40 - 60 secondes.

3-2-2- Préparation de l'inoculum

a/ Entretien des souches

La levure boulangère utilisée est *Saccharomyces cerevisiae*, il existe plusieurs souches et chaque lévurerrie possède sa propre souche. Ces souches sont conservées à 4°C sur milieu gélosé incliné et les repiquages se font deux fois par mois. Le milieu gélosé est constitué d'éléments nutritifs suivants :

- Extrait de levure : 0.3 g
- Extrait de Malt : 0.3 g
- Peptone : 0.5 g
- Glucose : 1.0 g
- Agar : 2.0 g
- Eau distillée : 100 ml
- pH : 4.5

Après repiquage, les souches sont mises à incuber à 30°C durant 72 heures.

b/ Réactivation

- Première étape

Les souches entretenues sur milieu glosé incliné subissent une réactivation sur milieu de culture de composition suivante :

- Extrait de levure : 20.0 g
- Saccharose : 100.0 g
- Sulfate de magnésium ($MgSO_4$) à 20 % : 5.0 ml
- Phosphate d'ammonium à 20 % ($(NH_4)_2 PO_4$) : 5.0 ml
- Eau distillée q.s.p : 1000 ml
- Le pH est ajusté à 4.5 avec H_2SO_4 1 N

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, nous mettons 45 ml de milieu de réactivation stérilisé à 120°C pendant 15 à 20 minutes puisensemencé après refroidissement à partir du tube gélosé. La quantité de souche utilisée est d'un mg. On homogénéise puis on l'incube à 30°C pendant 18 heures et sous agitation continue à raison de 45 oscillations par minute.

- Deuxième étape

On inocule des fioles de 750 ml contenant un milieu de culture de même composition que celui de la première étape puis incubées dans une étuve à 30 °C durant 18 heures.

· Troisième étape

On inocule des fioles ou bidons de 14 litres contenant le milieu de culture avec le produit de la deuxième étape et on le cultive à 30 °C durant 18 heures.

3-2-3- Pré fermentation (Fermentation alcoolique)

Cette fermentation a pour but d'adapter la souche de levure au milieu de culture utilisé (à base de mélasse). Le fermenteur utilisé est d'une capacité de 15 m³ ayant un volume utile de 12 m³. La fermentation se fait en anaérobiose et se déroule comme suit :

a/ Nettoyage de la cuve par le système : Clean place (C.I.P), qui consiste-en :

- un rinçage à l'eau froide durant 5 min
- un rinçage à l'eau chaude durant 5 min
- un rinçage à la soude à 4 %
- un rinçage à l'eau chaude durant 5 min
- un rinçage à l'eau froide durant 5 min

b/ Alimentation de la cuve en éléments nutritifs (tableau 5)

Tableau 5 : Composition en éléments nutritifs de la cuve

Eléments	Quantité
Mélasse à 40°Balling	2.625 litres
Eau	9.375 litres
Urée à 20 %	30 litres
Phosphate d'ammonium	5 Kg
Sulfate de magnésium	5 Kg
Anti-mousse	5 litres
pH	4.4 à 4.6

Le pH du milieu est ajusté à 4.4 - 4.6 avec l'acide sulfurique puis stérilisé à une température de 120 °C durant 2 heures. Une fois le refroidissement est atteint, on fixe la température entre 30 et 32 °C et on coupe l'arrivée d'air au fermenteur tout en fermant la conduite de dégazage. Ensuite, on ensemence le fermenteur avec le milieu de Carlsberg

(14 litres), on ouvre à nouveau la conduite de dégazage et on introduit immédiatement 150 -200 m³ d'air pur. La durée de la fermentation est de 15 heures et la quantité de levure obtenue sera utilisée pour ensemencer le fermenteur de première génération.

3-2-4- Fabrication des levures de première génération

Le type de culture à partir de cette phase jusqu'à la fin de la culture est le Fed-Batch à alimentation graduelle en mélasse. Durant cette phase la fermentation se déroule en aérobiose. La vitesse de croissance spécifique est de 0.2 h⁻¹. Le fermenteur utilisé est d'une capacité de 75 m³ ayant un volume utile de 56 m³. La fermentation se fait en aérobiose et se déroule comme suit :

- a/ Nettoyage de la cuve par le système : Clean place (C.I.P).
- b/ Stérilisation de la cuve à une température de 130 °C durant 2 heures
- c/ Refroidissement de la cuve jusqu'à 30 °C et alimentation de la cuve en éléments nutritifs (tableau 6) :

Tableau 6 : Composition en éléments nutritifs de la cuve

Éléments	Quantité
Mélasses à 40°Balling	13.100 litres
Eau	30.900 litres
Urée	150 Kg
Phosphate d'ammonium	72 Kg
Sulfate de magnésium	5 Kg
Anti-mousse	5 litres
Milieu de pré fermentation	12'000 litres à 25 g/l de Levures

Le pH du milieu est ajusté entre 4.4 et 4.6 avec l'acide sulfurique puis stérilisé à une température de 120 °C. Ensuite, on inocule le fermenteur avec le milieu de pré fermentation. Le pH variant entre 4.4 et 4.6 et une température de 30.0 à 32.0 °C est maintenue durant toute la durée de la fermentation. La durée de la fermentation est de 15 heures avec injection d'air pure à un débit de 3000 à 6000 m³/heure.

L'arrivée de la mélasse et de la source azotée au fermenteur est réglée linéairement par une minuterie programmée. Aussi, le réglage automatique du pH se fait par une horloge programmée (4.8 - 5.6). Enfin, le réglage automatique de la température (30 - 32 °C) se fait par un échangeur de chaleur situé à l'extérieur.

3-2-5- Fabrication des levures de deuxième génération

Le fermenteur utilisé est d'une capacité de 250 m³ ayant un volume utile de

188 m³. La fermentation se fait en aérobiose et se déroule comme suit :

- a/ Nettoyage de la cuve par le système : Clean place (C.I.P).
- b/ Stérilisation de la cuve à une température de 130 °C durant 2 heures
- c/ Refroidissement de la cuve jusqu'à 30 °C et alimentation de la cuve en éléments nutritifs (tableau 7).

Tableau 7 : Composition en éléments nutritifs de la cuve

Eléments	Quantité
Mélasse à 40°Balling	42.600 litres
Eau	89.400 litres
Urée	715 Kg
Phosphate d'ammonium	330 Kg
Sulfate de magnésium	40 Kg
Anti-mousse	5 litres
Inoculum	56'000 litres de levures 1 ^{ère} génération

Le pH du milieu est ajusté à 4.4 - 4.6 avec l'acide sulfurique puis stérilisé à une température de 120 °C durant 2 heures. Ensuite, on inocule le fermenteur avec le milieu de pré fermentation. Le pH de 4.4 - 4.6 et une température de 30 - 32 °C sont maintenus durant toute la durée de la fermentation. La durée de la fermentation est de 18 heures avec injection d'air pure à un débit de 15 000 m³/heure. L'arrivée de la mélasse et de la source azotée au fermenteur est réglée linéairement par une minuterie programmée. Aussi, le réglage automatique du pH se fait par une horloge programmée (4.8 - 5.6). Enfin, le réglage automatique de la température (30 - 32 °C) se fait par un échangeur de chaleur situé à l'extérieur. La mélasse est apportée chaque heure durant 16 heures (tableau 8).

Tableau 8 : Composition en éléments nutritifs de la cuve

Temps en heures	Quantité de mélasse (50 % de polarisation) en kg	Quantité de mélasse à (40 ° Ba) en litres
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	820 934 1.156 1.300 1.480 1.690 1.954 2.271 2.620 3.000 3.410 3.850 4.320 4.820 5.350 5.900 6.480 7.090 7.730 8.400 9.100 9.830 10.590 11.380 12.200 13.050 13.930 14.840 15.780 16.750 17.750 18.780 19.840 20.930 22.050 23.200 24.380	820 934 1.156 1.300 1.480 1.690 1.954 2.271 2.620 3.000 3.410 3.850 4.320 4.820 5.350 5.900 6.480 7.090 7.730 8.400 9.100 9.830 10.590 11.380 12.200 13.050 13.930 14.840 15.780 16.750 17.750 18.780 19.840 20.930 22.050 23.200 24.380
Total	24.380	42.600

3-2-6- Fabrication des Levures de troisième génération

C'est la dernière phase de production et la levure produite est appelée levure commerciale. Cette fermentation se déroule dans deux cuves différentes et la capacité de chacune est de 250 m³ avec un volume utile de 188 m³. La fermentation se fait en aérobiose et se déroule comme suit :

- a/ Nettoyage de la cuve par le système : Clean place (C.I.P).
- b/ Stérilisation de la cuve à une température de 130 °C durant 2 heures
- c/ Refroidissement de la cuve jusqu'à 30 °C et alimentation de la cuve en éléments nutritifs (tableau 9) :

Tableau 9 : Composition en éléments nutritifs de la cuve

Eléments	Quantité
Mélasses à 40°Balling	42.600 litres
Eau	120.400 litres
Urée	640 Kg
Phosphate d'ammonium	255 Kg
Sulfate de magnésium	35 Kg
Anti-mousse	5 litres
Inoculum	700 litres de levures de 2 ^{ème} génération

Le pH du milieu est ajusté entre 4.4 et 4.6 avec l'acide sulfurique puis stérilisé à une température de 120 °C durant 2 heures.

Ensuite, on inocule le fermenteur avec le milieu de pré fermentation. Le pH de 4.4 - 4.6 et une température de 30 - 32 °C sont maintenus durant toute la durée de la fermentation. La durée de la fermentation est de 15 heures avec injection d'air pure à un débit de 15.000 m³/h. L'arrivée de la mélasse et de la source azotée au fermenteur est réglée linéairement par une minuterie programmée. Aussi, le réglage automatique du pH se fait par une horloge programmée (4.8 - 5.6). Enfin, le réglage automatique de la température (30 - 32 °C) se fait par un échangeur de chaleur situé à l'extérieur.

3-2-7- Séparation, conditionnement et stockage des levures

Les levures de deuxième et troisième génération sont lavées deux fois avec de l'eau salée puis séparées par filtration sous vide. La filtration est réalisée par un filtre rotatif garni d'une couche de fécule de pomme de terre. L'opération est effectuée en continu sur des appareils centrifuges qui permettent de laver la levure et d'obtenir une crème. Les plaquettes de levures fraîches sur la base du filtre sont raclées par une lame et tombent directement dans l'entonnoir d'alimentation de l'extrudeuse. La teneur en matière sèche de ces levures est de

33 %. La crème de levure obtenue est découpée et emballée en pains de 500 g puis conservées à une Température de 2 - 4 °C.

3-2-8- Séchage et emballage

Les levures obtenues sont séchées jusqu'à une teneur en eau de 6 % puis emballées.

Chapitre-IV : Production d'éthanol

4-1- Généralités

Les moûts alcoolisés sont obtenus par fermentation des moûts sucrés en présence de la levure boulangère tel que, *Saccharomyces cerevisiae*.

4-2- Préparation du moût

Pour les jus sucrés issus de la betterave, uniquement la dilution et l'acidification des moûts sont nécessaires avant la fermentation. Pour la mélasse de canne à sucre, les moûts sont clarifiés et pasteurisés afin d'éviter les problèmes d'incrustation et d'infection bactérienne.

4-3- Fermentation

- La pré fermentation

Elle a pour objet de développer une forte population de levures. Cette étape est conduite en milieu aérobie.

- La fermentation alcoolique

Celle-ci est réalisée dans un milieu riche en sucres, par un procédé en cascade. Ainsi, le moût est introduit dans le fermenteur puis inoculé avec le milieu de pré fermentation. La fermentation dure de 40 à 72 heures et la température est fixée entre 28.0 et 32.0 °C. Des recherches sont effectuées pour travailler avec des souches thermophiles et à hautes pressions afin de permettre une extraction continue de l'alcool produit (Bouix et Leveau, 1993).

4-4- La distillation

C'est l'opération classique de récupération de l'alcool éthylique produit par vaporisation. Cette opération par laquelle on extrait l'alcool résultant de la fermentation est autrefois réalisée dans des alambics. Par contre, maintenant elle s'opère dans des colonnes à distiller. Ainsi, le moût alcoolisé est réchauffé à 75 °C, puis éjecté dans la partie supérieure d'une colonne de distillation qui comporte des plateaux superposés. Le moût alcoolisé tombe sur le premier plateau et descend de plateau en plateau pour aboutir à la base de la colonne. Inversement, de la vapeur est injectée sous pression à la base de la colonne et progresse vers le haut en traversant successivement tous les plateaux. Elle entre ainsi en contact direct avec le liquide. Le moût s'épuise petit à petit de son alcool en descendant de plateau en plateau.

Arrivé au bas de la colonne, ce liquide épuisé, appelé vinasse, est éliminé. La vapeur s'enrichit au contraire en alcool à mesure qu'elle gagne le sommet de la colonne. Lorsqu'elle sort par le haut, elle est refroidie dans un condenseur et passe à l'état liquide.

4-5- Rectification

La production d'alcool rectifié à 96 % , à partir des moûts de toutes origines, se fait par la purification du moût alcoolisé, sur la colonne d'épuration et ensuite par la distillation et la rectification du moût épuré. Pour ce qui est de la mélasse, la colonne distillatrice fonctionne sous vide pour éviter les encrassements. Cette opération peut être complétée par une colonne d'affinage, afin d'éliminer les produits légers.

Chapitre-V : Etude des Aspergillus (Aspergillus niger)

5-1- Généralités et taxonomie

Les *Aspergillus* sont des champignons à thalle brun noir. Le mycélium est blanc ou jaune. Les conidiospores ont une taille de 1.5 à 3.0 μm , lisses et incolores. Les têtes conidiennes sont bisériées, radiées, scindées en plusieurs colonnes. Les vésicules sont sphériques à globuleuses ($\text{\O} 45 - 75 \mu\text{m}$). Les stipes sont lisses, brunâtres, de $20 - 30 \times 5 - 6 \mu\text{m}$. Les phialides ont une taille de $7.0 - 10 \times 3.5 - 5.0 \mu\text{m}$, les conidies sont sphériques brunes, rugueuses à équinulées de 4.0 à $5.0 \mu\text{m}$. Les sclérotos sont parfois trouvés ($0.8 - 1.2 \text{ mm}$) de couleur crème virant à un brun violacé (Cahagnier, 1997; Domchick, Gams et Anderson, 1993; Pitt et Hocking, 1997)

Il existe plusieurs genres d'*Aspergillus* et leur taxonomie est la suivante (Cahagnier, 1997) :

- Règne des protistes
- Embranchement des Eucaryotes
- Classe des Ascomycètes
- S/Classe des Euascomycètes
- Ordre : Plectomycètes
- Famille des Trichocomaceae
- Genre : *Aspergillus*
- Espèce : *Aspergillus niger*

5-2- Besoins nutritionnels et culturaux des *Aspergillus*

5-2-1- Le carbone

Les *Aspergillus* peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés, tels que, glucose, fructose, mannose, saccharose et maltose ([Pazouki et al., 2000](#)). Les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont directement inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucres simples. Enfin, l'activité de l'invertase est élevée par contre, celle de la maltase est très variable et peut être un facteur limitant dans la fermentation du maltose. Les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées par les *Aspergillus*.

5-2-2- L'azote

Il est à noter que la source et la teneur en azote affecte d'une manière nette la croissance d'*Aspergillus* et la synthèse de l'acide citrique. Les sources d'azote utilisées en fermentation citrique sont, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, le nitrate de potassium et l'urée. Ainsi, une teneur élevée en azote a pour effet, une augmentation de la croissance cellulaire et de la consommation des sucres mais une diminution de la quantité d'acide citrique produite. Aussi, une teneur en nitrate d'ammonium supérieure à 0.25 % conduit à une accumulation d'acide oxalique (Mattey, 1992; Kristiansen et Sinclair, 1978).

5-2-3- Les sels minéraux

Les sels minéraux sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des *Aspergillus* et leurs déficiences ou leurs excès ont des répercussions négatives sur la fermentation. A cet effet, une forte teneur en phosphore conduit à une élévation de la croissance cellulaire et une production faible en acide citrique (Kubicek et Rohr,

1977; Papagianni, 2007). Par ailleurs, l'acide citrique produit par *Aspergillus niger* est extrêmement sensible aux oligo-éléments (Fer, Cuivre, Zinc, Magnésium et Manganèse).

Ces éléments posent un problème critique dans la fermentation submergée. La concentration en ces métaux, devrait être en dessous de celle nécessaire pour une croissance optimale de la moisissure et une production maximale d'acide citrique. Le rendement en acide citrique est fortement dépendant de la concentration en FeCl_3 dans le milieu de culture. De petites quantités en fer sont essentielles pour obtenir un rendement élevé en acide citrique. Il est à noter que le cuivre est utilisé comme un antagoniste du fer durant la fermentation citrique. L'ajout de cuivre offre également l'avantage supplémentaire d'inhiber sélectivement la croissance de *Penicillium*. La quantité en Zinc dans le milieu de culture détermine le cours de la fermentation citrique. Ainsi, des niveaux élevés en Zinc dans le milieu de culture favorise la croissance de la moisissure et empêche une accumulation du citrate.

Par contre, de faibles teneurs en Zinc ont pour effet la limitation de la croissance d'*Aspergillus niger* et l'élévation de la production en acide citrique. La présence du manganèse augmente la croissance des cellules et diminue la consommation des sucres ainsi que l'acidogénèse. Par contre, sa carence en manganèse se traduit par la répression des enzymes du cycle de l'acide citrique, à l'exception du citrate synthétase. Cela conduit à un débordement de la production en acide citrique. Le magnésium est nécessaire à la fois pour la croissance de la moisissure ainsi que la production de l'acide citrique. Enfin, la concentration optimale en sulfate de magnésium pour une production maximale en acide citrique varie entre 0.20 et 0.25 g/L (Al-Obaidi et Berry, 1981; Papagianni, 2007).

5-2-4- Besoins cultureux

La température idéale pour la croissance des *Aspergillus* est comprise entre 20 et 42 °C, un pH de 2.0 à 6.5 et une activité de l'eau (a_w) faible soit 0.77 (Cahagnier, 1997).

5-3- Utilisations des *Aspergillus*

5-3-1- Production d'acide citrique

Mécanisme

L'acide citrique est un métabolite du cycle de Krebs. Chez certains organismes, en particulier chez *Aspergillus* et *Penicillium*, il y a un dérèglement naturel dans le fonctionnement normal du cycle de Krebs au niveau du métabolisme du citrate par une déficience ou un mauvais fonctionnement de l'enzyme aconitase. Ce déséquilibre peut être provoqué par des manipulations du milieu de fermentation. Deux enzymes ont une relation directe avec la fermentation citrique en l'occurrence l'aconitase et l'iso citrate dehydrogénase. Les activités de ces enzymes diminuent à un niveau très bas quant l'activité de la citrate synthétase augmente durant la phase d'accumulation de l'acide citrique. L'inhibition de l'aconitase par le fer et le cuivre est suggérée afin de permettre une accumulation du citrate. Les mécanismes exacts d'accumulation de l'acide citrique ne sont pas encore totalement élucidés. Une forte accumulation nécessite la décarboxylation oxydative de l'une des deux molécules de pyruvate en présence de CoA et NAD. Le CO_2 ainsi libéré est utilisé pour la carboxylation de la deuxième molécule de pyruvate en oxaloacétate.

La condensation d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate en acide citrique se fait par le citrate synthétase. Les régulateurs de l'accumulation de l'acide citrique sont l'aspartate par son

inhibition de l'enzyme pyruvate carboxylase, le citrate qui inhibe la phosphofructokinase, une enzyme essentielle dans la transformation du glucose et du fructose en pyruvate. Le blocage du cycle de Krebs au niveau de l'acide citrique résultant d'une diminution de l'aspartate, permet le fonctionnement optimal du pyruvate carboxylase. L'inhibition du P-F-K par le citrate est levée par l'accumulation de ions NH_4^+ dans la cellule. Cette condition est stimulée par une carence en Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} . Ces conditions affectent aussi l'action de l'aconitase et de l'isocitrate déshydrogénase, les deux enzymes qui catalysent le catabolisme de l'acide citrique (Floran, 1993; Manonmani et Sreekantiahk, 1989). Au cours du cycle se produisent des décarboxylations qui dégagent du CO_2 et des oxydoréductions qui donnent des réducteurs : NADH et FADH_2 . À chaque tour de cycle, 3 NADH et un FADH_2 sont générés, l'énergie stockée (grâce aux transferts d'électrons) dans les NADH et FADH_2 sera ensuite exploitée au cours des réactions de la phosphorylation oxydative.

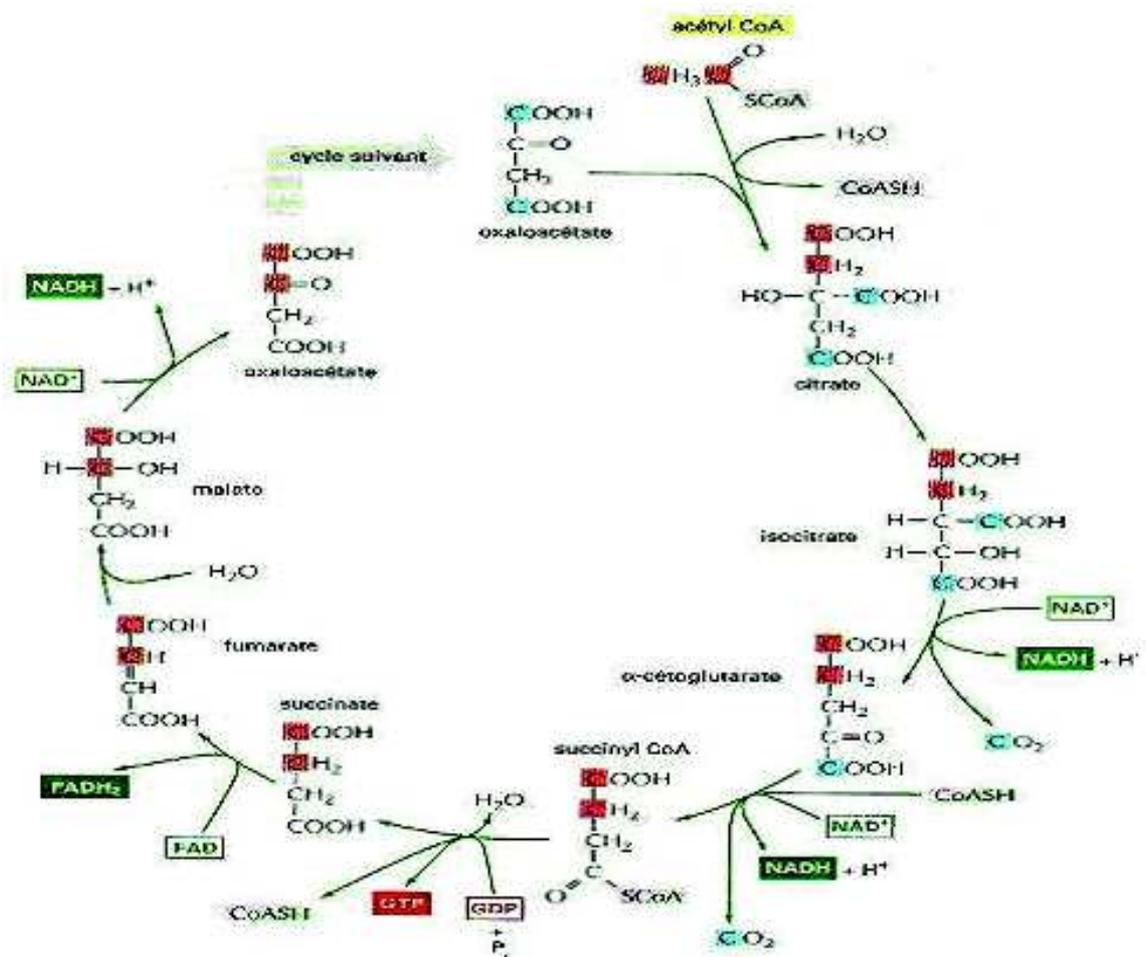


Figure 4 : Cycle de l'acide citrique.

Facteurs importants

- Concentration en sucres : 14 - 26 %
- Faible concentration de Mn, Mg et Fe : Mg^{2+} ou Mn^{2+} : 0.05 – 0.2 %
- Fe : 0.1 %

- pH : 2.2 - 4,2
- Température : 30°C

- Utilisations

L'acide citrique est largement utilisé dans les industries alimentaires et pharmaceutiques pour ses propriétés acidulantes. Il est aussi utilisé comme capteur des ions métalliques pour prévenir le développement d'odeurs et de goûts indésirables dans certains aliments.

L'acide citrique est aussi un composé majeur de l'industrie de fabrication de détergents écologiques. Il peut être utilisé dans les mélanges de ciment, les plastiques et dans beaucoup d'autres secteurs ([Ewary, 1989](#)).

5-3-2- Production d'acide oxalique

- Mécanisme

L'acide oxalique est dérivé de l'oxaloacétate, un métabolite du cycle de Krebs. Une déficience dans le fonctionnement du citrate synthétase résulte en un blocage dans la canalisation de cet intermédiaire dans le cycle de Krebs et donc son accumulation et sa transformation en acide oxalique (Kubicek *et al.*, 1984).

- Facteurs importants

- Concentration en sucres : 10 %
- Présence de sels basiques tels que CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Na_2HPO_4
- Sources d'azote : Elles permettent l'alcalinisation du milieu, par ex : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 favorisant l'accumulation d'acide oxalique
- pH : 2.2 - 4.2

- Température : En règle générale, la T°C optimale est juste au-dessus de la température minimale pour la croissance soit 8 - 10°C (Kubicek *et al.*, 1984).

Chapitre-VI- Production de l'acide citrique

6-1- Généralités

L'acide citrique est nommé ainsi car on le retrouve en grande quantité dans le citron. Il est produit sous deux formes, soit en cristaux transparents ou en une fine poudre blanche. Il est sans odeur et possède un goût acide très prononcé. L'acide citrique se trouve presque dans toutes les plantes et les tissus animaux. Les fruits d'agrumes contiennent l'acide citrique en grandes quantités, soit 5.0 % dans le fruit et environ 9.0 % dans le jus. Le goût aigre du jus du citron est principalement dû à la présence d'acide citrique (5.0 à 8.0 %) et en partie du à la présence de vitamine C. Autrefois, il était obtenu par extraction à partir de fruits d'agrumes mais désormais pratiquement 99 % de la production mondiale provient d'une fermentation par la moisissure *Aspergillus niger*.

La fermentation est le processus le plus économique, largement utilisé pour la production commerciale de l'acide citrique. Ainsi, dès 1919 un fabricant Belge a réussi à produire de l'acide citrique à l'échelle industrielle en employant *Aspergillus niger* et en utilisant un procédé de fermentation appelé culture de surface. Cette méthode avait été adoptée à grande échelle pour produire de l'acide citrique jusqu'à 1950. Après la deuxième guerre mondiale, une compagnie américaine (Milles) a adopté un autre procédé qui est la fermentation submergée pour produire de l'acide citrique à l'échelle industrielle. Depuis ce temps, ce procédé s'est généralisé progressivement (Guebel et Nestor-Darias, 2001).

6-2- Utilisations de l'acide citrique

Parmi les acides organiques produits à l'échelle industrielle, l'acide citrique est le plus important en termes quantitatifs avec une production annuelle estimée à plus d'un million de tonnes. (Soccol *et al.*, 2003). La croissance de la consommation annuelle est autour de 3.5 à 4.0 %. (Pandey *et al.*, 2001). L'industrie alimentaire consomme plus de 70 % de l'acide citrique produit à l'échelle mondiale, les industries pharmaceutiques consomment 12 %, et les 18 % restants sont consommés par d'autres industries (Pandey *et al.*, 2001).

6-2-1- Produits alimentaires et boissons

Dans le secteur alimentaire, l'acide citrique est incorporé dans la fabrication des bonbons, les confitures, les gelées, les boissons gazeuses, les sirops, les vins ainsi que les jus de fruits et de légumes. Il est aussi utilisé pour améliorer le goût de la glace et des gâteaux fourrés. Il est également parfois utilisé comme additif en pâtisserie.

Les différentes utilisations de l'acide citrique dans les industries alimentaires

Industries alimentaires	Utilisations
Fabrication de bonbons	Pour empêcher la cristallisation du saccharose et favoriser son inversion en glucose et fructose.
Confitures et gelées	Utilisé comme acidifiant et aussi pour ajuster le pH au seuil où la pectine agit comme agent gélifiant.
Boissons gazeuses et sirops	Utilisé comme acidifiant dans les boissons gazeuses à base de saccharose et aussi pour stimuler les arômes naturels de fruits.
Jus de fruits et de légumes	Utilisé comme agent stabilisant dans les jus de fruits et de légumes.
Vins	Utilisé pour prévenir la turbidité des vins, ajuster le pH et inhiber l'oxydation. Aussi, on l'utilise pour remonter l'acidité fixe et ainsi améliorer l'acidité gustative des vins

6-2-2- Produits pharmaceutiques

Les applications pharmaceutiques comprennent les préparations médicales et vétérinaires. Dans le domaine des préparations médicales, ce sont les poudres effervescentes qui sont les segments les plus importants, suivis par les sirops et les anticoagulants. L'acide citrique est considéré comme un excellent anticoagulant et, associé au sodium, on l'utilise comme remède pharmacologique pour certaines pathologies de calculs rénaux. L'acide citrique aide aussi à baisser le taux de sucre dans le sang, surtout chez les personnes qui souffrent d'hyperglycémie. Enfin, il est utilisé comme antioxydant dans la préparation de vitamines.

6-2-3- Produits cosmétiques

L'acide citrique est incorporé dans la fabrication des cosmétiques afin d'ajuster le pH, agit aussi comme agent antioxydant et comme agent tampon.

6-2-4- Détergents

L'acide citrique et les citrates ont été introduits à grande échelle dans les détergents au début des années 90, afin de remplacer les phosphates qui sont réputés nuisibles pour l'environnement. Ils sont utilisés comme co-adjuvants non phosphatés, dans les lessives en poudre. L'acide citrique et les citrates sont également incorporés dans les nettoyeurs de surface. Le principal avantage des citrates dans la formulation des détergents est leur biodégradabilité.

6-2-5- Autres usages

En 1994, le secteur industriel a représenté plus de 9 % de la consommation totale en acide citrique en Europe occidentale. L'acide citrique possède à un haut degré la propriété d'engager le fer ferrique dans un anion complexe double.

Pour cette raison, il est utilisé de façon courante dans le traitement de la cassee ferrique. En industrie, l'acide citrique est essentiellement utilisé dans les centrales électriques au charbon, pour le nettoyage et la sédimentation des parois des fours. Parmi les autres applications techniques de l'acide citrique, on peut citer le prétraitement des surfaces métalliques avant l'enduction et le nettoyage industriel.

6-3- Production de l'acide citrique à partir du jus de citron

La production de l'acide citrique par extraction à partir du jus de citron donne des rendements faibles avec un coût de production élevé. Par conséquent, ce procédé n'est pas rentable et très peu utilisé. À l'heure actuelle environ 7 % de la production mondiale est produite par extraction. Les fabricants d'acide citrique utilisent soit du jus concentré, soit du citrate de calcium. Ce sel est obtenu en saturant à chaud le jus avec du carbonate de calcium. Quelques producteurs utilisent de l'hydroxyde de calcium mais le citrate obtenu contient beaucoup d'impuretés (alumine, phosphate...etc.), lesquelles rendent son séchage et sa conservation très difficiles. Le citrate est lavé à l'eau bouillante puis égoutté et séché.

Ce dernier est ensuite décomposé par l'ajout d'acide sulfurique qu'on chauffe à 60 °C. Le sulfate de calcium précipité est séparé par filtration et lavé à l'eau bouillante jusqu'à une réaction neutre. La solution d'acide citrique obtenue est concentrée sous vide puis on procède à sa granulation à froid. Il se forme une masse compacte d'acide citrique sur laquelle vient surnager une couche d'eau visqueuse chargée d'acide sulfurique et de sulfate de calcium. Cette dernière est séparée par différence de densité. Les cristaux ainsi, formés sont séparés par un hydro extracteur ou une turbine centrifuge, puis ces derniers sont lavés et séchés.

Les cristaux, dit de première extraction, sont dissous une deuxième fois, décolorés au charbon, traités au ferrocyanure de potassium pour éliminer le fer et maintenus dans un excès d'acide sulfurique de concentration de 2.0 à 2.5 %. La solution d'acide citrique ainsi obtenue après filtration, est concentrée sous vide. Enfin, les granulés obtenus sont lavés, séchés, et tassés par tamisage. (Bouchard et Meritt, 1979).

6-4- Production d'acide citrique par voie de fermentation

6-4-1- Micro-organismes

Beaucoup de micro-organismes tels que des mycètes et des bactéries peuvent produire l'acide citrique par fermentation. Les divers mycètes, qui sont avérés de bons accumulateurs d'acide citrique dans les milieux de culture sont : *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus cinnomonens*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumaricus*, *Mucor pyriformis*, *Citromyces citrons*, *Citromyces ptefferianus*, *Citromyces glanber*, *Penicilium arenarium*, *Penicilium alivacum*, *Penicilium glaucum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium flavum*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Pseudomonas* et *Micrococcus*. Toutefois, *Aspergillus niger* reste le micro-organisme de choix pour la production de l'acide citrique (Kubicek et al., 1984; Strasser et al., 1994).

6-4-2- Les matières premières

La quantité d'acide citrique produite à l'échelle mondiale est à 99 % obtenue par fermentation submergée de la mélasse ou des milieux à base de saccharose, en utilisant *Aspergillus niger*.

Plusieurs hydrates de carbone sont considérés, expérimentalement comme, producteurs du citrate par *Aspergillus niger* incluant l'inuline (Drysdale et McKay, 1995), les dattes (Al-Obaidi et Berry, 1981), la mélasse (Gupta et Sharma, 1994), le soja (Khare et al., 1994), le caroube (Roukas, 1998). Ces dernières années les déchets agricoles et des industries agro-alimentaires sont utilisés en tant que sources alternatives de carbone pour la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* (Vandenbergh et al., 1999).

6-4-3- Les méthodes de fermentation

Actuellement, il existe trois types de procédés de fermentation qui sont utilisés pour la fabrication d'acide citrique. Ceux-ci sont:

- 1-Culture de surface.
- 2-Fermentation submergée.
- 3-Fermentation à semi-conducteurs.

6-4-3-1- Fermentation de surface

C'est une méthode originale et d'une utilisation simple. Aussi, elle consomme moins d'énergie et nécessitant moins de main d'oeuvre. Ainsi, le milieu de fermentation est stérilisé, refroidi et pompé dans des bacs de faible profondeur. L'inoculation est faite en soufflant avec de l'air des spores d'*Aspergillus niger* sur la surface des bacs en aluminium ayant une capacité de 50 à 100 litres. Aussi, l'air est apporté au-dessus de la surface de culture afin de fournir l'oxygène nécessaire au milieu de fermentation. Les spores en germent forment un tapis mycélien. Le milieu de culture utilisé est dilué de façon à avoir une teneur en sucres de 15 %. La température est maintenue entre 28 et 30 °C. Le pH du milieu de culture doit être inférieur à 2.0. Au-delà d'un pH 3.0, l'acide oxalique et l'acide gluconique peuvent être formés en grandes quantités. L'humidité relative est fixée entre 40 et 60 %. La durée de la fermentation est de 8 à 12 jours. A la fin de la fermentation, le milieu de culture fermenté est versé dans des bacs et l'acide citrique est séparé du mycélium par filtration. Le rendement de la fermentation est de l'ordre de 70.0 à 75.0 % (Drysdale et McKay, 1995).

6-4-3-2- Fermentation submergée

Les micro-organismes sont cultivés en suspension dans des cuves de grandes dimensions, sous des conditions environnementales strictement contrôlées. La température d'incubation joue un rôle important dans la production de l'acide citrique et elle varie entre 28 et 30 °C. L'agitation est maintenue entre 200 - 400 trs/min et une teneur en oxygène dissous entre 1.5 et 2 L/L/min (Moreira *et al.*, 1996). Le pH approprié est important pour améliorer le rendement en acide citrique. Ainsi, on recommande un pH inférieur ou égal à 5.0. Les organismes ont besoin des éléments principaux tels que le carbone, l'azote et le phosphore en plus de divers oligoéléments pour la croissance fongique et la production d'acide citrique.

Ainsi, la concentration en sucres du milieu recommandée est de 15.0 à 18.0 %. Par ailleurs, des teneurs élevées en fer, zinc, cuivre et manganèse posent problème au cours de la fermentation submergée. La durée de la fermentation est de 5 à 10 jours. On utilise en général des bioréacteurs pour la production d'acide citrique en fermentation submergée.

Ces fermenteurs peuvent avoir des capacités en milliers de m³. Les cuves de fermentation sont en général fabriquées avec de l'acier inoxydable qui peut être stérilisé à la chaleur. Elles doivent à la fois être très étanches et lisses, pour éviter la contamination par d'autres micro-organismes.

Elles doivent aussi être munies de plusieurs ouvertures pour placer les différents instruments de mesure, les entrées et sorties des différents produits utilisés et l'entretien (Sikander, 2004). La composition du milieu de culture dans le fermenteur en kg/tonne est la suivante : Glucose : 170 - 180, NH₄NO₃ : 2.5, MgSO₄ : 0.25, KH₂PO₄ : 0.3.

6-4-3-3- Solid state fermentation (SSF)

La fermentation SSF est caractérisée par le développement de micro-organismes dans un milieu sec ou présentant une teneur en eau faible et sur un matériau non soluble agissant à la fois comme source de nutriments et comme support physique. Cependant, il n'est pas nécessaire de combiner le rôle de l'appui et du substrat mais de reproduire plutôt les conditions d'une faible activité de l'eau et d'un haut transfert d'oxygène en employant un matériel inerte imbibé d'une solution d'éléments nutritifs. SSF offre de nombreux avantages en commençant par l'utilisation des résidus des industries agro-alimentaires et aussi, elle consomme moins d'énergie par rapport à la fermentation submergée (Pintado *et al.*, 1998; Prado *et al.*, 2005).

6-4-4- Extraction et purification de l'acide citrique

Le milieu de fermentation obtenu contient de l'acide citrique, de l'acide oxalique, des sucres résiduels et du mycélium. Les méthodes utilisées pour la récupération de l'acide citrique sont :

- Par addition d'hydroxyde de calcium en deux fois, la 1^{ère} addition éliminant l'acide oxalique (un sous produit), la 2^{ème} addition précipitant le citrate de calcium. L'acide citrique est récupéré à partir du citrate de calcium obtenu par l'addition d'acide sulfurique (Bouchard et Meritt, 1979).
- Par utilisation de résine échangeuse d'ions et de résines adsorbantes permettant d'améliorer les rendements de cristallisation. L'acide citrique est récupéré de la solution aqueuse par une résine amine échangeuse d'ions suivie d'une désorption thermique (Milson et Meers, 1985).

- Par une cristallisation de l'acide citrique en continu soit seul, soit combiné avec des cristalliseurs en batch (Bouchard et Meritt, 1979).
- Quelques usines utilisent l'extraction liquide en employant un mélange d'aminetri-Lauryl, n-octanol pour extraire l'acide citrique à partir du milieu de fermentation, suivie d'extraction à l'eau chaude. Ensuite, on purifie l'acide citrique obtenu par ajout de solvants comme le tributyl phosphate et une petite quantité de kérosène, ensuite on fait plusieurs lavages avec de l'eau. Ensuite, on le fait passer sur charbon actif, on le concentre par évaporation, on le cristallise et on un séchage (Milson et Meers, 1985). Cette méthode a été améliorée avec la possibilité de régénérer les solvants utilisés.

Chapitre-VII- Production d' α -amylase

7-1- Généralités sur les enzymes

Les premières démonstrations d'une activité enzymatique dans des extraits naturels remontent au 17^{ième} siècle, quand Spallanzani montre que le suc gastrique des oiseaux est impliqué dans la digestion de la viande. En 1833, Payen et Persoz isolent à partir du malt une substance qui est responsable de la fermentation et qu'ils ont nommés diastase. Ce terme sera par la suite utilisé pour désigner de manière générale toutes substances responsables de la fermentation. Plus tard, le suffixe -ase a été conservé pour désigner la macromolécule responsable d'une activité enzymatique. Par exemple, l'amylase est une enzyme responsable de la dégradation de l'amidon.

Une enzyme est une molécule protéique permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction (Pelmont, 1995). Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles qu'elles accélèrent par activation spécifique. Elles permettent d'atteindre l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992).

Il existe six principaux groupes d'enzymes, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent: Les oxydoréductases, transférases, hydrolases, ligases, isomérases et lyases. Les enzymes sont généralement nommées en additionnant le suffixe -ase au nom de leur substrat, telles sont classifiées par un système numérique standard. Leur numéro est attribué par l' «Enzyme Commission» (EC). (Berry et Paterson, 1990).

7-2- Les α -amylases

7-2-1- Origine

Jusqu'au début des années 1970, on a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, à partir des années 1970, plusieurs micro-organismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques (Pedersen et Nielsen, 2000). Les α -amylases sont des enzymes présentes dans le suc pancréatique, permettant l'hydrolyse de l'amidon en dextrines. Par la suite dans l'intestin,

deux enzymes, la maltase et l'isomérase finissent l'hydrolyse des dextrines et du maltose en glucose.

7-2-2- Définition de l' α -amylase, sa nomenclature et sa structure

a/ Définition de l' α -amylase

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie. C'est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases. Elle hydrolyse au hasard les liaisons osidiques de l'amidon (l'amylose et l'amylopectine), du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Keating *et al.*, 1998).

b/ Nomenclature de l' α -amylase

- **Nom codifié** : E.C.3.2.1.1.
- **Nom systématique** : 1 \square 4 α -D- glucane glucanohydrolase
- **Nom recommandé** : Alpha -amylase.
- **Synonymes** : Glycogénase, Endoamylase, Taka amylase A, Fortizyme, Amylopsine, Maxylase....etc. (Schamburg et Salzmann, 1991).

c/ Structure de l' α -amylase

Les α -amylases sont des métallo enzymes à calcium. Elles contiennent au moins un ion de calcium par molécule d'enzyme. Les ions de calcium sont nécessaires, d'une part à l'activité enzymatique et d'autre part au maintien et à la stabilité de la structure de l'enzyme (Bodri *et al.*, 1997). L' α -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C) et dont la partie glucidique est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose, et D-glucosamine (Nielsen *et al.*, 2001). La chaîne polypeptidique est constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts désulfures.

7-2-3- Les différentes sources d' α -amylase

a/ Source végétale

Parmi les α -amylases végétales, les plus étudiées sont celles provenant de céréales telles que le blé, seigle, triticale, orge et riz. La production de cette enzyme s'effectue, en général, après germination où l'activité enzymatique du blé augmente (Mercier, 1985).

b/ Source animale

Les α -amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères. Cependant, la difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière (organes difficile à collecter) et le coût de l'extraction est élevé (Mercier, 1985).

c/ Les sources microbiennes

- Sources bactériennes

Industriellement, l' α -amylase bactérienne est obtenue principalement par fermentation avec *Bacillus*. Cependant, depuis une dizaine d'années, de nombreuses α -amylases aux propriétés inhabituelles, ont été produites à partir de bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermoacidophiles. Ces α -amylases, de par leur action à pH acide (*Bacillus acidodarius*) ou alcalin (*Bacillus licheniformis* et *Bacillus stearothermophilus*) présentent un intérêt dans la transformation industrielle de l'amidon (Durand et Monsan, 1982).

- Sources fongiques

- Les moisissures

L' α -amylase fongique est sans doute la première à avoir été obtenue industriellement puisque dès 1894, Takamine avait breveté sa production par fermentation d'*Aspergillus oryzae* sur riz étuvé. Depuis, on continue d'utiliser le même micro-organisme ou ses homologues (*Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* et *Aspergillus effusus*) pour la production industrielle de cette enzyme (Hernandez *et al.*, 2006).

- Les levures

En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l' α -amylase par *Candida guilliemondii*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*...etc. (Lagzouli *et al.*, 2007)

7-2-4- Les propriétés de l' α -amylase

a/ Le poids moléculaire

Le poids moléculaire des α -amylases varie d'un micro-organisme à un autre et d'une espèce à une autre. En effet, leur poids moléculaire s'échelonne de 50.000 à 60.000 daltons (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

b/ L'effet de la température

Il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale et pour laquelle la totalité de la structure de l' α -amylase est maintenue. Toutefois, en dehors de cette zone, il y a risque de dénaturation de l'enzyme, traduisant une perte de son activité. Les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C. Par ailleurs, les α -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par rapport aux α -amylases fongiques (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992). La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 °C et 95 °C alors que, celle d'origine fongique varie entre 40 °C et 60 °C. Certaines souches hyper thermophiles peuvent résister jusqu'à des températures supérieures à 100 °C (Lucio de souza *et al.*, 1996).

c/ L'effet du pH

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4.0 à 9.0 avec un optimum se situant entre 4.0 - 5.0 et entre 6.0 - 8.5 pour les α -amylases fongiques et bactériennes, respectivement (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992). L' α -amylase produite par *Aspergillus niger* a un pH optimal de 5.0 à 6.0 (Hernandez *et al.*, 2006; Selvakumar *et al.*, 1998).

d/ Les activateurs et les inhibiteurs de l' α -amylase

Le calcium joue un rôle d'activateur allostérique et participe dans l'activité catalytique de l'enzyme et le maintien de sa structure tertiaire. Par ailleurs, la présence du calcium augmente la stabilité de l' α - amylase vis-à-vis de la dénaturation thermique, acide et par l'urée (Egas *et al.*, 1998). En effet, les α amylases hautement purifiées perdent rapidement leurs activités au dessus de 50 °C mais la présence des ions Ca^{++} réduit cette inactivation.

La force de liaison du métal à la protéine dépend de l'origine de l'enzyme. Ce métal est impliqué dans l'activité catalytique. D'autres métaux divalents tels que le baryum et le magnésium peuvent remplacer le calcium sans perte appréciable de son activité, mais il faut que la conformation de la protéine soit retenue et que le site actif ne soit pas altéré (Mercier, 1985). Les ions Zn^{++} , Mg^{++} et Mn^{++} sont également des activateurs de l' α - amylase

(Pedersen et Nielsen, 2000). Par contre, le Cuivre, et le Fer sont de grands inhibiteurs de l' α -amylase (Egas *et al.*, 1998).

7-2-5- Production de l' α -amylase

Le substrat de choix pour la production d' α -amylase à l'échelle industrielle est l'amidon. L'amidon est un mélange de glucanes que les plantes synthétisent comme réserve nutritive principale. Il s'agit d'un holopolymère d' α -glucose ou plus exactement, de maltose. Il offre deux variables, il est tantôt sous forme polymère linéaire d'amylose avec des liaisons α -1-4, tantôt à l'état d'amylopectine ramifié, dont la structure est assez proche de celle du glycogène.

L'utilisation des champignons dans la production d'enzymes amylolytiques est de plus en plus sollicitée à cause de la facilité de leur culture et l'absence de risque pathogène. Le choix du milieu de culture de fermentation est essentiel pour les micro-organismes, aussi bien pour leurs croissances que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par *Aspergillus niger* a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbones et d'azote (Hernandez *et al.*, 2006). Les sources de carbone affectent non seulement la croissance mais aussi l'apparition des amylases, mais également la vitesse avec laquelle les hydrates de carbone sont métabolisés (Hernandez *et al.*, 2006). De même, la source d'azote organique ou inorganique est essentielle pour la formation de biomasse cellulaire et d'enzymes (Pedersen et Nielson, 2000)

7-2-6- Purification des α -amylases

La purification consiste à extraire une enzyme donnée d'un mélange d'enzymes rencontrés dans un extrait brut. Chez les cellules eucaryotes, les divers organites contiennent différentes enzymes. On peut séparer ces organites après ouverture des cellules, par centrifugation différentielle ou par ultracentrifugation. On récupère successivement les noyaux, les mitochondries, les membranes du réticulum endoplasmique et les enzymes cytoplasmiques. Ceci est une première étape de purification des α -amylases. La pureté d'une enzyme peut se mesurer par une électrophorèse en gel d'acrylamide. On obtient pour les enzymes pures, une seule bande. La purification d'une enzyme peut prendre quelques jours à plusieurs mois. Il s'agit d'un savoir faire qu'il est préférable pour des raisons d'efficacité et de coût, de laisser aux industries spécialisées.

7-2-7- Récupération des α -amylases

La récupération des α -amylases exige leurs concentrations. Le taux de concentration et de pureté est fonction de l'utilisation de ces molécules dans les différentes industries. Les α -amylases doivent être stabilisées. Les préparations enzymatiques sont séchées mais pour de nombreuses applications. Toutefois, les utilisateurs préfèrent que les produits soient en solution. La stabilité est alors assurée par addition de calcium ou de glycérol. Pour la majorité des applications, les α -amylases sont sous forme libre. Les techniques d'immobilisation offrent cependant les avantages d'une récupération plus facile du produit, d'une réutilisation de l'enzyme ou de son emploi en système continu. Très souvent, l'enzyme se montre plus stable sous forme immobilisée. L'immobilisation se fait sous forme de liaison covalente, par adsorption (amyloglucosidases en gel d'agarose).

7-2-8- Utilisation des α -amylases

L'amidon est un composé glucidique abondant et peu coûteux dont la fonctionnalité et la valeur ajoutée peuvent être améliorées par un ensemble de modifications physiques, chimiques et /ou enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques ou nutritionnels spécifiques.

L' α -amylase par sa capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant de fabriquer des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (Pandey *et al.*, 1999).

Selon Hernandez *et al.*, (2006), les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industries pharmaceutiques, textiles, papeteries et détergents), en raison de leurs productivités et de leurs thermo stabilités. Le chiffre d'affaire total du marché des enzymes, y compris celles utilisées pour les diagnostics médicaux est de l'ordre d'un milliard de dollars dont 40 % sont représentés par les enzymes d'origine fongique. Selon, Nielsen *et al.*, (2001), les différentes applications industrielles des amylases sont :

- **Glucoserie** : Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité.
- **Sucrierie** : Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés afin de réussir le processus de cristallisation.
- **Biscuiterie et panification** : Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte.
- **Industrie textile** : Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et le protège au cours du tissage.
- **papeterie** : Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.
- **Détergent** : Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérées de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée.
- **Industrie pharmaceutique** : Agent anti-inflammatoire, un aide digestif (contre les dyspepsies et les fermentations intestinales). Traitement du diabète et de l'obésité.

I- Matériel et méthodes

1- Matériel

1-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de rebuts de Deglet-Nour (RDN) et des dattes produites par les cultivars, Ghars (GH), Degla-Beida (DB), Tantboucht (TTB) et Tinissine (TN). Les rebuts de Deglet-Nour sont constitués de dattes ratatinées et desséchées avant maturité qu'on appelle communément H'chefs. Les dattes utilisées dans cette étude proviennent des palmeraies de la région de Oued-Righ (Touggourt).

1-2- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé pour la production de la levure boulangère et l'alcool est une souche de *Saccharomyces Cervisiae* ATCC 1102. Par ailleurs, on a isolé huit souches de *Saccharomyces cerevisiae* à partir des dattes produites par quelques cultivars de palmier dattier. Ces souches ont été dénommées, TTB, HDN1, HDN2, DB, DB1, HW, ELK et TISB.

Pour la production de l'acide citrique, on a utilisé deux souches d'*Aspergillus niger*, une souche ATCC 16404 et une souche isolée à partir des échantillons des sols sahariens de la région de M'ghaier qu'on a dénommée ANSS.

Pour la production d' α -amylase, on a utilisé deux souches, une souche d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et une souche de *Candida guilliemondii* isolée à partir du levain qu'on a dénommée CGL.

1-2-1- Isolement et identification de *Saccharomyces cerevisiae*

- Prélèvement

Le prélèvement des levures se fait par frottement à la surface du fruit puis on dilue dans 10 ml d'eau distillée stérile puis on ensemence sur milieu sélectif.

- Enrichissement

Première étape

Milieu (a): Dans un tube à essai, on introduit 5 ml de milieu d'enrichissement liquide (2n) et 5 ml de milieu de culture. Après agitation durant 5 min, on incube à 30 °C durant 48 h.

Milieu (b): Dans un autre tube à essai, on introduit 5 ml du milieu (a) et 5 ml du milieu d'enrichissement liquide (2n) qu'on mélange puis on incube à 30 °C durant 48 h.

Milieu (c): Dans un autre tube à essai, on introduit 5 ml du milieu (b) et 9 ml du milieu d'enrichissement liquide (n) qu'on mélange puis on incube à 30 °C durant 48 h.

Deuxième étape

On inocule une boîte de pétrie contenant le milieu d'enrichissement gélosé (n) avec un ml du milieu (c) puis on incube à 30 °C durant 48 h. La composition des milieux enrichis est donnée en Annexes.

· **Isolement et purification**

Selon Guiraud et Galzy (1980), l'isolement consiste à séparer les souches de levures les unes des autres et à éliminer les bactéries et les moisissures encore présentes. A cet effet, on utilise des milieux sélectifs (Annexe).

Première étape

On inocule un tube à essai contenant 10 ml du milieu d'isolement et purification liquide puis on fait une incubation à 30 °C durant 48 h.

Deuxième étape

Dans le tube 1, ajouter à l'aide d'une pipette stérile 1 ml du milieu de purification de la première étape auquel on ajoute 9 ml d'eau distillée stérile puis homogénéiser. Ensuite, on prélève 1 ml de la dilution 1 et on la verse dans le tube 2 puis on homogénéise et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-4} . Le milieu gélosé est inoculé quand il est encore liquide mais refroidi à 45 - 50 °C. Ensuite, on vide le contenu du tube à essai dans une boîte de Pétri stérile. Agiter en tournant pour bien étaler le milieu et on incube à 30 °C pendant 48 h.

Troisième étape

On inocule un tube à essai contenant 10 ml du milieu de purification liquide avec l'inoculant de la deuxième étape puis on incube à 30 °C durant 48 h (Guiraud et Galzy, 1980).

· **Purification**

On fait inoculer une boîte de pétri contenant le milieu d'isolement purification gélosé et on incube à 30 °C durant 48 h et on répète l'opération cinq fois (Guiraud et Galzy, 1980).

· **Identification des souches de *Saccharomyces cerevisiae***

a/ Etude morphologique

a.1/ Caractéristiques culturelles

Test de croissance sur milieu liquide(Guiraud et Galzy, 1980)

- Formation de sédiments au fond du tube
- Aspect du sédiment (Fin, Grossier)
- Pellicule en surface
- Formation de gaz

Test de croissance sur milieu solide(Guiraud et Galzy, 1980)

- Forme des colonies (Circulaire, irrégulière, ondulé, filamenteuse... etc.
- Contours des colonies (nets, irréguliers, convexes ou concave)
- Taille des colonies (punctiforme moins de 1 mm de diamètre, plus de 1 mm de diamètre)
- Aspect (mat ou brillant)

a.2/ Etude des caractéristiques morphologiques (Test de filamentation)

La culture est effectuée sur milieu P.D.A et incubation à 22 °C durant 06 jours. La culture est examinée au microscope pour rechercher la présence éventuelle du pseudomycélium ou du mycélium vrai.

b/ Etude des caractéristiques sexuelles

Le milieu utilisé pour étudier la propriété des souches de levures à former des ascospores est le milieu Fowel(Guiraud et Galzy, 1980). Les observations au microscope ont porté sur:

- Forme des asques
- Forme des ascospores
- Nombre et position des ascospores dans l'asque

c/ Etude des caractéristiques physiologiques

c.1/ Test de fermentation des sucres

Ce test est réalisé avec des sucres très purs à des concentrations de 6.0 %. Le milieu de base utilisé est l'eau peptonée (10.0 ml) plus le rouge de phénol, conditionnée avec une cloche de Durham. On ajoute dans chaque tube 20.0 gouttes de la solution de sucres à tester. On stérilise puis on ensemence avec une suspension de souche à étudier. On met dans chaque tube une couche de l'huile de vaseline (1 cm d'épaisseur). Enfin, les tubes sont incubés à

30 °C durant 48 h à 03 semaines. Ainsi, l'acidification du milieu va se manifester par le virage de la couleur du rouge au jaune d'ou la fermentation du sucre. Quand il y'a apparition de bulles dans la cloche, cela se traduit par une production de gaz (Bouix et Leveau, 1993).

c.2/ Test d'assimilation des sucres (Auxanogramme)

Le milieu Sabourand sans sucres est versé dans des boites de pétri et ensemencé sur toute la surface avec une suspension de levures. Des disques de papier filtre de 1 cm de diamètre sont imprégnés de la solution sucrée à étudier puis séchés dans une étuve et disposés en cercles sur la surface de la gélose. Après 24 à 48 h d'incubation à 30 °C, l'assimilation de la source carbonée se traduit par le développement de colonies de levures sur la surface de diffusion du sucre (Bouix et Leveau, 1993). Les sucres utilisés sont le maltose, le glucose, le saccharose, le galactose, le lactose, le raffinose et l'arabinose.

c.3/ Test de résistance à l'actidione

On ensemence une boite de pétri contenant la gélose Sabourand + Actidione à 30 °C pendant 24 à 48 h et on observe au microscope la présence ou l'absence de colonies (Guiraud et Galzy, 1980).

c.4/ Test à l'uréase

On ensemence le milieu Urée-Indole-Rouge de phénol utilisé pour la différenciation des Enterobacteriaceae à 37 °C.

Ainsi, le rouge de phénol de couleur jaune vire au rouge violacé en 3 à 6 heures. La technique utilisée consiste à ensemencer avec une suspension de levure 0.5 ml de ce milieu et l'incuber à 37 °C durant 6 h (Guiraud et Galzy, 1980).

c.5/ Test de filamentation dans du sérum à 37°C

On prend 0.5 ml de sérum auquel on ajoute une goutte de suspension de levure, bien agiter et incuber à 37 °C durant 4 h. Ce test nous permet de voir la présence ou l'absence de filaments (Guiraud et Galzy, 1980).

d/ Identification des souches de levures par le mycotube Roche

C'est un test de confirmation compatible avec *Saccharomyces cerevisiae*. La technique utilisée consiste à mettre en contact l'extrémité du fil avec une colonie de levure et le tirer afin d'ensemencer chaque milieu qu'il traverse. Le tube est ensuite incubé à 30 °C durant 24 à

48 h. Tous les milieux que comporte ce tube contiennent des indicateurs de pH qui permettent sa lecture et une notice d'interprétation permet de déterminer si la réaction est positive ou négative. Enfin, les résultats sont reportés sur un diagramme de lecture qui comporte les principales levures rencontrées (Bouix et Leveau, 1993).

1-2-2- Isolement et identification d'*Aspergillus niger*

Isolement d'*Aspergillus niger*

L'isolement de quelques souches d'*Aspergillus niger* est effectué à partir des échantillons du sol provenant de la daïra de Mghaier située dans la région de Oued-Righ.

La préparation des dilutions des échantillons du sol consiste à prélever 10.0 g de sol auxquels on ajoute 90 ml d'eau distillée stérile suivi d'une agitation pendant 30 min. Ces solutions sont diluées jusqu'à 10^{-6} . Ensuite, 1.0ml de chaque suspension est déposé sur une boîte de Pétri contenant le milieu de culture de Czapeck-Dox (Annexes). Le pH du milieu est fixé à 6.5. Les boîtes sont incubées à 30.0 °C durant six jours (Botton *et al.*, 1990).

Purification des isolats

Pour la purification des souches d'*Aspergillus niger*, on prélève un frottement à partir de la boîte de pétri contenant plusieurs colonies que l'on mis dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique. Après agitation, on procède à la préparation des dilutions jusqu'à l'obtention d'une seule spore/ml. Les spores ainsi séparées (monospores) sont ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosé (Agar 2 %). Après incubation à 28° C durant 18 h, la colonie mycélienne est repiquée et identifiée (Botton *et al.*, 1990).

Identification des isolats

L'identification des isolats est basée sur les observations du mycélium fongique:

- Observations macroscopiques permettant de déterminer la couleur de la colonie pendant le développement et à mesurer son diamètre.
- Observations microscopiques permettant de détecter la présence du thalle, la présence ou

l'absence de septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores (Hawkswarth *et al.*, 1995).

Les isolats sélectionnés comme étant supposés des *Aspergillus niger* sont cultivés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de Czapek-Dox Agar et du Bromocrésol comme indicateur coloré (Botton *et al.*, 1990).

Ensuite on prélève 0.5 ml de la suspension conidienne qu'on verse dans chaque boîte de Pétri contenant 10 ml du milieu de Czapek-Dox Agar. Ces boîtes sont incubées à 30 °C pendant 3 à 5 jours. Les zones de couleur jaune due à la production d'acide citrique apparaissent sur ces boîtes. Sur la base des zones de couleur jaune formées, on sélectionne les zones les plus grandes et larges, comparables à celles du témoin (*Aspergillus niger* ATCC 16404) afin d'avoir des souches d'*Aspergillus niger* les plus performantes (Sikander, 2004). Ces dernières sont prélevées et transférées dans des boîtes de Pétri contenant le

milieu PDA et incubées à 30 °C pendant 4 à 6 jours. Cinq isolats d'*Aspergillus niger* ont été ainsi sélectionnés et utilisés dans la fermentation submergée.

1-2-3- Isolement et identification de *Candida guilliermondii*

Isolement

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement *Candida guilliermondii* est un milieu semi synthétique contenant l'amidon comme seule source carbonée (Annexes). Le milieu est stérilisé à 120 °C durant 15 min. Le pH étant fixé à 5.0 par HCL 0.1N. Les additions sont faites aseptiquement après refroidissement pour les milieux liquides, et à 45 °C pour les milieux gélosés.

Isolement et purification

Un gramme de levain de panification est mis dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture semi synthétique liquide avec l'amidon comme seule source de carbone, pour inhiber la croissance des autres bactéries. Ensuite, on ajoute quelques gouttes de chloramphénicol à 50.0 mg/L stérilisé par filtration sur millipore de 0.45 microns de diamètre. Après 72 h d'incubation à 30 °C, 1ml de chaque culture est ensemencé en surface après plusieurs dilutions adéquates avec de l'eau physiologique (8.5 g/L de NaCl) sur milieu semi synthétique solide contenant l'amidon comme seule source de carbone.

La mise en évidence de la dégradation de l'amidon est révélée par addition d'une solution iodo-iodurée (10.0 g/L d'iode et 20.0 g/L d'iodate de potassium). Les souches présentant un halo clair autour de leurs colonies sont retenues, la taille du halo étant notée pour chaque souche de levure testée.

Une fois les colonies sont différenciées, chacune d'elles est ré isolée dans une nouvelle boîte. Les boîtes dont les colonies sont bien séparées et développées sont récupérées pour l'identification.

Identification

L'identification de *Candida guilliermondii* comme toutes les levures fait appel à des caractères cultureux, morphologiques, sexuels et à des critères physiologiques. Les méthodes d'étude utilisées sont celles de Guiraud et Galzy (1980).

Etude des caractères cultureux

Les caractères cultureux sont étudiés sur deux milieux YPG et YM gélosés à 2.0 %.

Les cultures sont incubées à 25 °C durant 72 h, examinées puis laissées 4 semaines à une température de 27 °C et réexaminées une deuxième fois. Les caractéristiques des cultures ont été notées et celles présentant des colonies de forme circulaire sont séparées (Guiraud et Galzy, 1980).

Etude des caractères morphologiques

Ces caractères sont étudiés par examens microscopiques (objectifs ×10 puis × 40). Cette étude permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules. Les colonies caractérisées par des cellules rondes, division par bourgeonnement et une filamentation du pseudomycélium sans arthrospores sont retenues (Guiraud et Galzy, 1980).

Aptitude à la filamentation

Afin de confirmer que cette espèce peut former des filaments de type pseudomycelium, la technique consiste à effectuer une culture sur lame sur milieu PDA. Ensuite la filamentation est mise en évidence par examen microscopique (Guiraud et Galzy, 1980).

Test d'assimilation des substrats carbonés

Ce test est pratiqué uniquement sur trois substrats : D glucose, D galactose et Saccharose. Le test consiste en une culture sur milieu YNB de Wickerham qui ne contient pas de substrat carboné, il est réparti à raison de 1.0 ml par tube. Les tubes reçoivent ensuite

8.0 ml d'eau distillée et 1.0 ml de sucre à 5.0 % puis 2 à 3 gouttes d'une suspension dans l'eau physiologique. Après incubation à 25.0 °C durant 72 h, les cultures sont comparées à la culture témoin en utilisant un colorimètre pour mesurer la densité optique des diverses cultures (Guiraud et Galzy, 1980).

2- Protocole expérimental

2-1- Production de l'extrait de dattes

2-1-1- Extraction de l'extrait de dattes

Une fois les dattes lavées, dénoyautées et broyées, on ajoute à 1 kg de dattes, 2.5 litres d'eau. On chauffe à 85 °C durant 45 min et sous agitation continue.

2-1-2- Préparation du milieu de culture

On filtre l'extrait de dattes à travers un tissu, puis on le centrifuge à 5000 trs/min. Après décantation, on récupère le surnageant qu'on stérilise à 120 °C pendant 20 min

2-2- Production de la levure boulangère

2-2-1- Fermentation en discontinue (Batch)

2-2-1-1- Préparation de l' inoculum

a/ Entretien des souches

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont conservées à une température de

4 °C sur milieu gélosé, incliné. La composition du milieu d'entretien est rapportée en Annexes. Après repiquage, les souches sont mises à incuber à 30 °C durant 72 h puis on les conserve à 4 °C. Les repiquages se font une fois tous les 15 jours (Al-Obaidi *et al.*, 1987; Verduyn *et al.*, 1992).

b/ Pré fermentation

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* entretenues sur milieu gélosé incliné subissent une réactivation sur milieu de Carlsberg (Annexes). Dans un Erlenmeyer de 250 ml, nous mettons 30 ml de milieu de pré fermentation (Carlsberg) stérile qu'onensemence à partir du tube gélosé. La quantité de souche utilisée est d'un mg. On homogénéise puis

on incube à 30 °C pendant 18 h et sous agitation continue à raison de 45 oscillations par minute(**Verduyn et al ., 1992**) .

2-2-1-2- Fermentation

Le fermenteur utilisé est d'une capacité de trois litres muni de tous les accessoires et est rempli au 4/5 de son volume. L'ensemencement se fait par injection à l'aide d'une seringue stérile de 20 ml de suspension du milieu de réactivation pour 1 litre de milieu de culture à base d'extrait de dattes contenant une concentration en sucres de 20 g/L et enrichi en éléments nutritifs suivants :

- 2.65 g de sulfate d'ammonium
- 6.35 g d'urée
- 2.4 g de phosphate d'ammonium
- 0.2 g de sulfate de magnésium

On ajuste le pH à 4.4, on fixe la température entre 30.0 et 32.0 °C et on met sous agitation continue afin de favoriser l'oxygénation du milieu en dispersant l'air en très fines bulles. Au cours de la fermentation, une certaine quantité d'agent anti-mousse (Structol) est ajoutée afin d'éviter que la mousse ne déborde du fermenteur. La fermentation dure 18 à 24 h (Al-Obaidi *et al.*, 1987).

2-2-2- Fermentation semi discontinue (Fed-batch)

2-2-2-1- Pré fermentation

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, nous mettons 30 ml de milieu de Carlsberg stérile qu'on ensemence à partir du tube gélosé. La quantité de souche utilisée est d'un mg. On homogénéise puis on incube à 30 °C pendant 18 h et sous agitation continue à raison de 45 oscillations par minute(**Verduyn et al ., 1992**) .

2-2-2-2- Fermentation alcoolique

Cette fermentation a pour but d'adapter la souche de levure au milieu de culture utilisé. Ainsi, à l'aide d'une seringue, nous prélevons 20 ml de suspension du milieu de pré fermentation pour ensemencer 300 ml de milieu de culture à base d'extrait de dattes, enrichi en protéines et en sels minéraux. L'enrichissement de ce milieu de culture se fait de la manière suivante, à un litre du jus de dattes, on ajoute les éléments nutritifs suivants :

- 2.65 g de Sulfate d'ammonium [(NH₄)₂ SO₄]
- 25 ml d'Urée à 20 %
- 0.3 g de Phosphate d'ammonium [(NH₄)₂ PO₄]
- 0.2 g de Sulfate de magnésium [MgSO₄]

On ajuste le pH entre 4.3 et 4.7 et on porte au bain marie à 30 °C durant 18 h (Anonyme, 2002).

2-2-2-3- Fermentation proprement dite

La culture en semi continue s'est déroulée sur une période de 12 h et le fermenteur utilisé est d'une capacité de 3 litres muni de tous les accessoires et dans lequel on introduit :

- 500 ml d'eau

- 320 ml de crème de levure à 25 g/L provenant du milieu de culture de la fermentation alcoolique.
- 675 ml d'extrait de dattes ou de mélasse Le débit d'alimentation du fermenteur est réglé de façon à ce que la concentration en substrat soit constante dans la cuve et corresponde à la phase logarithmique de croissance cellulaire soit un taux d'alimentation en substrat fixé à 56 ml par heure
- 7.8 g de source azotée
- 7.5 g de phosphate d'ammonium

Les quantités de ces deux éléments nutritifs sont fractionnées en quatre fois, une partie est apportée au début de fermentation, une autre vers la troisième heure, une autre vers la sixième heure et la dernière vers la neuvième heure. La température de fermentation est maintenue constante à 30 °C. Le pH est fixé à 4.5 par ajout d'H₂SO₄ 0.1N ou de NaOH 0.1N au cours de la fermentation. L'agitation est de 300 trs/min et une aération fixée à 2.0 L/L/min (Anonyme, 2002).

2-3- Production d'éthanol

2-3-1- Préparation de l'inoculum

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, nous mettons 30 à 100 ml de milieu de Carlsberg puis on incube à 30 °C pendant 18 h et sous agitation continue à raison de 45 oscillations par minute (Verduyn *et al* ., 1992) . L'objectif de la pré fermentation est de développer une forte population de levures.

2-3-2- Culture proprement dite

Après incubation, l'inoculum est transféré dans un fermenteur de type Brunswick de trois litres rempli au 2/3 de sa capacité. L'extrait de dattes utilisé est enrichi en phosphate d'ammonium à raison de 0.5 à 2.5 g/L. La fermentation est conduite en anaérobiose à une température de 30.0 à 32.0 °C durant 72 h (Touzi, 1997). Le pH du milieu de fermentation est ajusté entre 4.2 et 4.5.

2-4- Production de l'acide citrique

2.4.1- Préparation de l'inoculum

La souche est ensemencée stérilement dans une boîte de pétri contenant un milieu de culture de malt gélosé. Après cinq jours d'incubation à 30 °C, des spores apparaissent à la surface du tapis mycélien. Elles sont récupérées dans de l'eau distillée stérile et diluées de façon à obtenir une concentration avoisinant 1.0×10^6 à 1.0×10^7 CFU/ml.

Cette concentration suffit pour inoculer 100 ml de milieu (Papagianni *et al* ., 2005; Sikander *et al* ., 2002).

2-4-2- Fermentation proprement dite (Production de l'acide citrique)

Le fermenteur utilisé est du type Brunswick muni de tous les accessoires pour fixer le pH, la température, l'agitation ainsi que la teneur en oxygène dissous et ayant une capacité de trois litres. On a procédé à l'ensemencement de 1.0 litre d'extrait de dattes avec la suspension

fongique. La quantité d'inoculum utilisée varie entre 1.0 et 5.0 %. La fermentation a été menée en aérobiose (0.5 à 2.0 L/L/min) et sous agitation continue à raison de 200 trs/min. L'huile de maïs a été ajoutée comme produit anti-mousse pour éviter le débordement de la mousse. Le pH initial du milieu de culture est ajusté entre 2.0 et 6.0. La température d'incubation est réglée entre 25.0 et 40.0 °C et la durée de la fermentation est de 6 à 10 jours (Al-Obaidi et Berry 1981; Papagianni *et al.* , 2005).

2-5- Production d' α -amylase

2-5-1- Production d' α -amylase par utilisation d'*Aspergillus niger*

Préparation de l'inoculum

Les souches sontensemencées stérilement dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant

50 ml d'un milieu de culture de composition suivante (g/L): Glucose, 20; (NH₄)₂SO₄, 6.6; KH₂PO₄, 3.5; FeSO₄, 0.15; MgSO₄, 0.10; MnCl₂, 0.45 et peptone, 3.0. La culture a été incubée à 30 °C durant 48 h à 200 trs/min. La suspension fongique est diluée de façon à obtenir une concentration avoisinant 3.10⁸ CFU/ml. Cette concentration de 1.0 ml suffit pour inoculer 50 ml de jus (Ellaiah *et al.*, 2002).

Fermentation submergée

L'extrait obtenu à partir des dattes produites par le cultivar Tinissine et les rebuts de dattes ayant une teneur en sucres variant entre 2.5 et 20 g/L a été amélioré en ajoutant les éléments nutritifs suivants : Extrait de levure de 0 à 6.0 g/l et KH₂PO₄ de 0 à 6.0 g/L. Les milieux ont été ajustés à un pH variant entre 4.0 et 9.0, stérilisés à 121 °C durant 15 min,ensemencés avec une concentration en inoculum de 2.0 % (3 X10⁸ CFU/ml) et incubés à une température de 30 °C durant 48 à 144 h. Toutes les cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de culture dans un agitateur orbital à raison de 105 trs/min. Les échantillons ont été récoltés en fin de fermentation soit 96 h.

2-5-2- Production d' α -amylase par utilisation de *Candida guilliemondii*

Préparation de l'inoculum

On ensemence les souches de *Candida guilliemondii* dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 20 ml d'un milieu de culture ayant une composition en g/L de : Glucose, 20.0, Extrait de levure 5.0, KH₂PO₄, 6.0. Le pH du milieu est fixé à 5 et la culture a été incubée à 30 °C durant 48 h à 200 trs/min (Lagzouli *et al.*, 2006).

Fermentation submergée

L'extrait obtenu à partir des dattes produites par le cultivar Tinissine et les rebuts de dattes ayant une teneur en sucres variant entre 2.5 et 20 g/L a été amélioré en ajoutant les éléments nutritifs suivants : Amidon de 0 à 20.0 g/L, Extrait de levure de 0 à 6.0 g/l et KH₂PO₄ de 0 à 6.0 g/L. Les milieux ont été ajustés à un pH variant entre 4.0 et 9.0, stérilisés à 120 °C durant 15 min,ensemencés avec une concentration en inoculum de 2.0 % (3 x 10⁸ CFU/ml) et incubés à une température de 30 °C durant 48 à 144 h. Toutes les cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de culture

dans un agitateur orbital à raison de 105 trs/min. Les échantillons ont été collectés en fin de fermentation soit 72 h.

3- Méthodes analytiques

3-1- Analyses biochimiques des extraits de dattes et de la mélasse

la teneur en eau est déterminée dans une étuve à 105 °C par dessiccation de 10.0 ml de jus de dattes ou mélasse durant 18 heures. La teneur en cendres est déterminée par incinération d'un 1.0 ml de jus de dattes ou mélasse dans un four à moufle à une température de 600 °C durant 3 heures. le pH est déterminé par la méthode préconisée par A.O.A.C (1975).

Les sucres réducteurs, le saccharose et les sucres totaux ont été déterminés par la méthode de Bertrand, rapporté par Audigie *et al* . (1984). Le principe de cette méthode consiste à faire agir un excès de liqueur cuproalcaline dans des conditions bien fixées puis on sépare l'oxyde cuivreux et on le traite par une liqueur sulfurique de sulfate ferrique. Dans ce cas, on ne dose que les sucres réducteurs. Pour doser les sucres totaux, on fait tout d'abord une hydrolyse acide afin de libérer les fonctions aldéhydiques ou cétoniques. De cette façon, on transforme le saccharose en sucres réducteurs. Enfin, le saccharose est déterminé de la façon suivante : (Sucres totaux - Sucres réducteurs) x (0.95).

L'azote total est déterminé par la méthode de Kjeldahl.

Les méthodes de dosage des éléments minéraux utilisées ont été rapportées par Sawaya *et al* . (1983); Yousif *et al* . (1982). Pour le dosage du phosphore, l'échantillon est minéralisé par voie humide puis mis en solution. La solution ainsi obtenue est traitée par le réactif vanadomolybdique. En présence de molybdate et de vanadate d'ammonium, les orthophosphates conduisent à la formation d'un complexe jaune intense de phosphovanadomolybdique. La densité optique de la solution jaune est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm. Pour le dosage du Sodium et Potassium, on procède d'abord à une minéralisation d'un ml de jus de dattes. Les cendres sont ensuite dissoutes dans 5 ml d'acide chlorhydrique à 20 % et complétée à 50 ml avec de l'eau distillée.

Ces solutions sont passées au photomètre à flamme et les teneurs en sodium et potassium sont déterminées grâce aux courbes étalons. Pour le dosage du Ca, Cu, Zn, Fe, Mg et Mn, l'échantillon est minéralisé et mis en solution acide. Ensuite ces solutions sont nébulisées dans une flamme en acétylène et les lectures sont effectuées à une longueur d'onde de 285 nm par spectrophotomètre d'absorption atomique (Perkin Elmer). Les teneurs en ces éléments sont déterminées grâce à des courbes étalons.

3-2- Analyses portant sur la production de la levure boulangère

3-2-1- Etude de l'évolution de croissance (Cinétique de croissance)

On prélève chaque deux heures jusqu'à 24 h, 10 ml du milieu de fermentation qu'on dilue au 1/20. On fait une lecture au spectrophotomètre à 620 nm (en absorbance). De cette façon là, on peut déterminer :

- La phase de latence.
- La phase exponentielle de croissance
- Le taux de croissance
- Le temps de génération

3-2-2- Quantité et rendement en biomasse

Une fois la fermentation terminée, on récupère le milieu de fermentation qu'on centrifuge à 3500 trs/min pendant 15 min. Ensuite, on récupère le surnageant pour doser les sucres résiduels ainsi que le culot qu'on lave deux fois avec l'eau distillée stérile et on centrifuge à chaque lavage. On pèse le culot pour déterminer le poids en biomasse fraîche puis on sèche dans une étuve à 75 °C durant 18 à 24 h pour déterminer le poids en biomasse sèche. Le rendement en biomasse est déterminé de la manière suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{P}{S_0 - SR}$$

Avec, P : Quantité en biomasse sèche, S₀ : Teneur en sucres initiale du milieu de fermentation et SR : Teneur en sucres résiduels.

3-2-3- Analyse de la qualité de la levure

Les méthodes d'analyse de la qualité de la levure produite sur les milieux à base de dattes et de mélasse ont été rapportées par Anonyme (1992).

- La teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche a été déterminée par dessiccation de 0.8g de levure dans une étuve à 75 °C jusqu'au poids constant.

- Les teneurs en protéines et en phosphore

La teneur en azote ainsi déterminée est multipliée par 6.25 pour obtenir la teneur en protéines. Concernant la teneur en phosphore, cette dernière est déterminée par minéralisation d'un gramme de levure par voie humide et mise en solution. La solution ainsi obtenue est traitée par le réactif vanadomolybdique.

- La force de levée

Elle représente le volume du CO₂ dégagé par la levure dans une pâte boulangère de composition donnée pendant un temps déterminé et à une température donnée.

La méthode utilisée est celle du S.J.A qui consiste à déterminer le temps de fermentation de la levure, ensuite on détermine la quantité de CO₂ dégagé dans une table de correspondance (Caballero *et al* ., 1995;Okagbue, 1988).

3-3- Analyses portant sur la production d'éthanol

3-3-1- Quantité de biomasse

Une fois la fermentation terminée, on récupère le milieu de fermentation qu'on centrifuge à 3500 trs/min pendant 15 min. Ensuite, on récupère le surnageant pour doser les sucres

résiduaire ainsi que le culot qu'on lave deux fois avec de l'eau distillée stérile et on centrifuge à chaque lavage. On pèse le culot pour déterminer le poids en biomasse fraîche puis on sèche dans une étuve à 75 °C jusqu'au poids constant pour déterminer le poids en biomasse sèche.

3-3-2- Détermination du pH

On récupère 100 ml de milieu de fermentation qu'on centrifuge et on détermine le pH du surnageant au pH mètre suivant la méthode AFNOR NF V08-406.

3-3-2- Dosage des sucres résiduaire

Après centrifugation, on récupère 100 ml de surnageant auquel on ajoute 10 ml d'acétate basique de plomb à 10.0 %. On filtre sur filtre en l'aidant avec une trompe à vide, puis on ajoute entre 1.0 et 2.0 g de carbonate de calcium. On filtre une deuxième fois et on s'assure de l'absence définitive du plomb. On récupère 50 ml du filtrat auquel on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique concentré et on porte au bain-marie à 70 °C durant 30 min. Après refroidissement, on dose les sucres totaux résiduaire par la méthode de Bertrand.

3-3-3- Dosage de la teneur en éthanol

La méthode utilisée est la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ainsi, on prépare une série de mélanges contenant, pour 10 ml de solution, des pourcentages en volume d'éthanol variant de 3 à 21 %. Les échantillons ont été mélangés avec 1 ml des solutions de Carrez 1 et Carrez II, puis centrifugés à 15000 trs/min durant 5 minutes. Le surnageant a été ensuite acidifié avec l'acide chlorhydrique 2N à une teneur de 1/10 (v/v). Ensuite, on injecte 0,3 μ l de chacune des solutions ainsi réalisées précédemment. Les échantillons prétraités ont été injectés dans une colonne en acier inoxydable. Le port de l'injection et le détecteur de la flamme à ionisation ont été maintenus à un niveau de température constant soit 200 °C alors que la température du four a été fixé à 150 °C. Enfin, on trace une courbe d'étalonnage qui sera utilisée pour déterminer la teneur en éthanol (Donmez et Ozelik, 1992; Pocock et Rankine, 1997).

3-4- Analyses portant sur la production de l'acide citrique

3-4-1- Dosage de la biomasse d'*Aspergillus niger*

100 ml de milieu de fermentation sont centrifugés à 3500 trs/min pendant 15 min puis on récupère le culot qu'on lave deux fois avec de l'eau distillée.

Le culot est centrifugé à chaque lavage et ce dernier est pesé pour déterminer le poids en biomasse fraîche puis séché dans une étuve à 45 °C jusqu'au poids constant pour déterminer le poids en biomasse sèche (Al-Obaidi et Berry 1981; Haq et Daoud, 1995).

3-4-2- Détermination du pH

Après centrifugation de 100 ml de milieu de fermentation, on détermine le pH du surnageant selon la méthode AFNOR NF V08-406 en utilisant un pH mètre.

3-4-3- Dosage de l'acide citrique et des sucres résiduaire

Les quantités en acide citrique ainsi que les quantités en sucres résiduels (glucose et fructose) sont dosées par HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur UV modèle SPD-10Avp, d'une colonne modèle CTO-10Avp. L'éluant utilisé dans l'analyse est une solution d'acide sulfurique 0.01N. Les analyses par HPLC ont été réalisées sous les conditions expérimentales suivantes: débit de la pompe, 0.6 ml/min, température de la colonne de 40 °C et une quantité d'échantillon de 20 µL (Crolla et Kennedy 2001).

3-5- Analyses portant sur la production d'α-amylase

3-5-1- Dosage de la biomasse

On détermine la biomasse mycélienne par filtration à travers un papier filtre Whatman, lavé avec de l'eau distillée et séché à 70 °C jusqu'au poids constant (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

3-5-2- Dosage de l'activité enzymatique

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Le dosage des sucres réducteurs est déterminé par une réaction colorimétrique due à la présence de l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA) (Bernfeld, 1955). L'activité enzymatique a été déterminée par ajout de 0.1 ml de surnageant du milieu de fermentation à 0.2 ml d'amidon soluble à 0.5 % et incubées à 37 °C durant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 0.4 ml d'acide 3,5 dinitro-salicylique, suivi par une ébullition durant 10 min. Le volume final a été dilué à 10 ml avec de l'eau distillée et la capacité d'absorption est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre UV.

Une unité d'activité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère

1.0 µmole de sucres réducteurs comme le D-glucose par minute dans les conditions d'essai. Les résultats sont présentés comme une activité spécifique (µmoles/L/min).

II- Résultats et discussion

Chapitre-I : Composition biochimique des extraits de dattes (rebut de Deglet-Nour,

Tinissine et Tantboucht) et mélasse

Tout processus de fermentation est lié à la qualité du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition biochimique des extraits de dattes et de mélasse est nécessaire. En ce sens, les résultats obtenus montrent que les extraits de dattes présentent une teneur en sucres totaux élevée (21.2 - 22.9 % de M.F) comparable à celle de la mélasse diluée à 50 % soit 22.0 % de M.F. Par ailleurs, les trois extraits de dattes ainsi que la mélasse sont pauvres en protéines et en phosphore soient 0.24 - 0.25 % de M.F et 14.25 - 37.00 mg/100 ml de M.F, respectivement (tableau 10).

Tableau 10 : Composition biochimique des extraits de dattes et de mélasse.

Constituants	Extrait des rebut de Deglet-Nour	Extrait de Tantboucht	Extrait de Tinissine	Mélasse diluée au 1/2
Teneur en eau en %	74.0	70.00	70.15	65.00
pH	4.6	4.85	5.9	6.7
Sucres réducteurs en % de M.F	9.13	21.20	22.90	1.00
Saccharose en % de M.F	12.80	0	0	20.94
Sucres totaux en % de M.F	22.61	21.20	22.90	22.00
Protéines en % de M.F	0.24	0.25	0.25	0.24
Cendres en % de M.F	1.19	1.49	1.34	4.00
Sodium en mg/100 ml de M.F	295.00	225.00	230.00	1300.00
Potassium en mg/100 ml de M.F	260.00	520.00	480.00	1750.00
Calcium en mg/100 ml de M.F	280.00	230.00	210.00	75.00
Mg en mg/100 ml de M.F	45.00	70.00	65.00	5.00
Phosphore en mg/100 ml de M.F	14.25	37.00	33.00	30.00
Zinc en mg/100 ml de M.F	0.25	0.50	0.20	0.24
Cuivre en mg/100 ml de M.F	0.07	0.25	0.12	0.09
Fer en mg/100 ml de M.F	2.69	5.86	2.20	0.095
Mn en mg/100 ml de M.F	0.07	0.14	0.08	0.03

D'autre part, Al-Obaidi *et al* . (1987); Reed et Pepler (1973) ont estimé les besoins en éléments nutritifs de *Saccharomyces cerevisiae* par litre de milieu de fermentation (tableau 11).

Tableau 11 : Besoins en éléments minéraux de *Saccharomyces cerevisiae*.

Eléments nutritifs	Besoins par litre de milieu de fermentation
Phosphore	2.2 - 3.6 g
Cuivre	15 μ g
Fer	70 μ g
Zinc	200 μ g
Manganèse	0.70 mg
Magnésium	450.00 mg
Potassium	2400.00 mg
Calcium	150.00 mg

Il est à noter que l'estimation des besoins de *Saccharomyces cerevisiae* en ces éléments nutritifs s'est basée sur l'hypothèse que 100 kg de mélasse ayant une teneur en sucres de 50 -

55 kg donne un rendement d'environ 25 - 27.5 kg de biomasse levurienne. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les extraits à base de dattes et la mélasse renferment des quantités en Cuivre, Zinc, Fer, Manganèse, Magnésium, Potassium et Calcium nettement supérieures aux besoins de la levure. En outre, l'étude comparative entre les extraits de dattes et la mélasse montre que les extraits de dattes renferment des sucres directement assimilables par la levure, en l'occurrence, le glucose et le fructose par contre, la mélasse renferme du saccharose qui doit être hydrolysé par la levure avant son utilisation.

Par ailleurs, les extraits de dattes renferment des teneurs en magnésium, manganèse et fer largement suffisantes aux exigences de la levure *Saccharomyces cerevisiae* soient, 450 - 700 mg/L, 0.7 - 1.4 et 22.0 - 58.6 mg/L, respectivement. Cependant, les extraits de dattes et la mélasse sont faiblement pourvus en phosphore et protéines soient 0.14 - 0.37 et 2.4 - 2.5 g/L, respectivement. Ces quantités couvrent à peine 4.8 à 12.75 % des besoins de la levure en phosphore et à 10.0 % des besoins en protéines. Concernant le pH, les extraits de dattes (Tantboucht et Rebutts de Deglet-Nour) présentent un pH acide variant entre 4.6 - 4.85, convenable au bon développement de la levure boulangère qui exige un pH de 4.5 à 4.8.

Pour ce qui est des besoins en éléments nutritifs d'*Aspergillus niger*, on constate que les extraits de dattes et de mélasse renferment des quantités en Cuivre, Zinc, Fer, Manganèse, et Magnésium nettement supérieures aux besoins d'*Aspergillus niger* pour la production d'acide citrique (tableau 12). Toutefois, les extraits de dattes sont faiblement pourvus en protéines et en phosphore soient 2.4 - 2.5 g/L, 142.5 - 370.0 mg/L, respectivement. Ces quantités couvrent à peine 50.0 - 54.5 % et 5.7 - 14.8 % des besoins d'*Aspergillus niger* en ces éléments. En ce sens, l'addition d'azote et de phosphore est indispensable pour la production et l'accumulation de l'acide citrique durant toute la période de fermentation

Tableau 12 : Besoins en sucres, protéines et en éléments minéraux d'*Aspergillus niger*.

Éléments nutritifs	Composition des extraits de dattes en éléments nutritifs	Besoins par litre de milieu de fermentation
Sucres	226.1 - 229.0 g/L	150.0 - 200.0 g/L
Protéines	2.4 - 2.5 g/L	4.4 - 5.0 g/L
Phosphore	142.5 - 370.0 mg/L	2500.0 mg/L
Cuivre	0.7 - 2.5 mg/L	0.15 mg/L
Fer	22.0 - 58.6 mg/l	1.30 - 1.95 mg/L
Zinc	2.0 - 5.0 mg/L	0.02 - 0.06 mg/L
Manganèse	0.7 - 1.4 mg/L	0.4 - 0.8 mg/L
Magnésium	450.0 - 700 mg/L	200.0 - 250 mg/L

Enfin, l'analyse biochimique des extraits de dattes permet de dire que ces derniers peuvent constituer un milieu de fermentation pour la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et enzymes de qualité meilleure par rapport à celui de la mélasse.

Chapitre-II : Production de la levure boulangère

1- Production de la levure boulangère en Batch

1-1- Etude de la cinétique de croissance de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC

1102 cultivée sur substrat à base de dattes

L'étude de la courbe de croissance obtenue avec la souche ATCC 1102 cultivée sur milieu à base de dattes indique que le temps d'acclimatation est réduit soit 2 h. La réduction du temps d'acclimatation peut être expliquée par la nature des sucres présents dans les extraits de dattes. Ce sont des sucres réducteurs directement assimilables par la levure. Toutefois, le temps d'acclimatation peut varier suivant la souche de levure utilisée (Riviere, 1975). Par ailleurs, après une phase exponentielle de 10 h, la phase stationnaire est atteinte au bout de

12 h où on enregistre l'épuisement du milieu de culture de ses éléments nutritifs (figures 5).

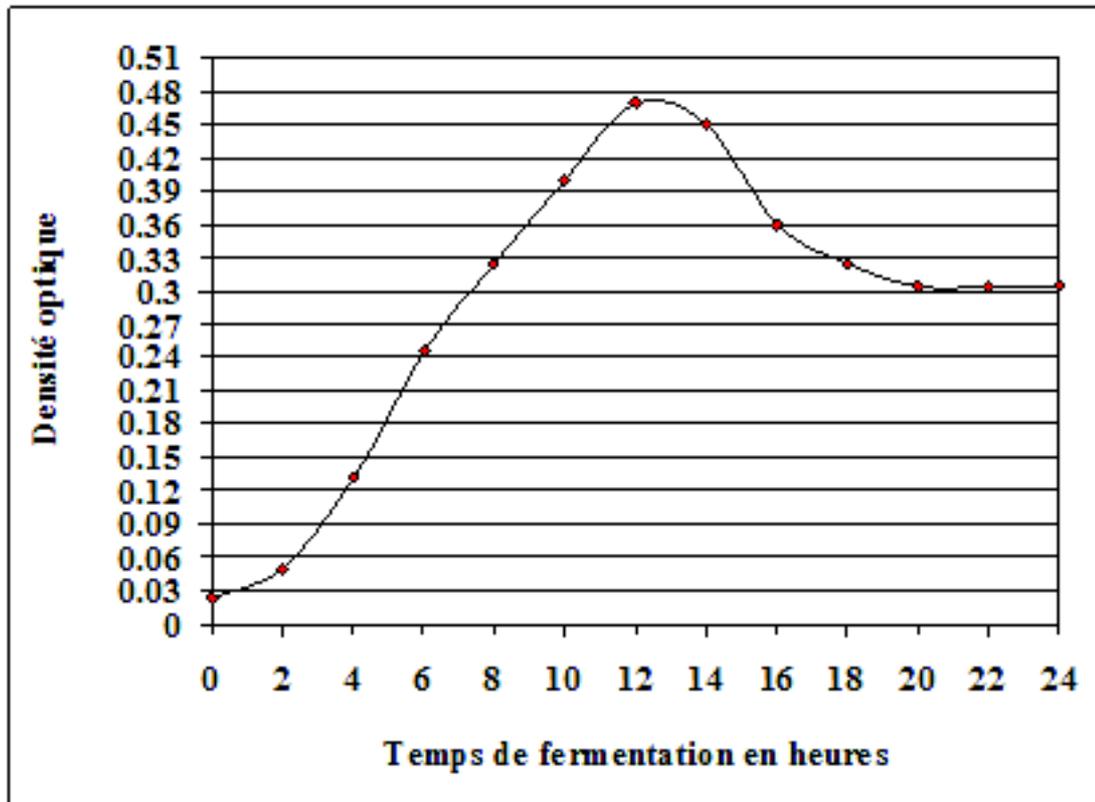


Figure 5 : Cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102 cultivée sur extrait de dattes

Le taux de croissance obtenu est de 0.37 h^{-1} , et il correspond au temps de génération de 1 h et 53 min (tableau 13).

Tableau 13 : Paramètres de croissance et rendement en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1102 cultivée sur extrait de dattes.

Substrats	Rebuts de Deglet-Nour
Temps d'acclimatation en h	2.0
Durée de la phase exponentielle de croissance en h	10.0
Taux de croissance en h^{-1}	0.37
Temps de génération en h et min	1.0 et 53.0
Sucres résiduaire en % de M.F	0.12
Biomasse sèche en g/L	4.36
Rendement net en %	23.60

Des résultats similaires ont été obtenus par Alves-Araujo *et al.* (2007); Mwesigye et Barford (1996); Nancib *et al.* (1997); Reeds et Pepler (1973), soit un taux de croissance variant entre 0.34 et 0.38 h^{-1} selon la souche et la teneur en sucres du milieu de fermentation. Par contre, **Van-Hoek** *et al.* (1998) ont obtenu un taux de croissance maximum de 0.42 h^{-1} en utilisant la souche DS28911 de *Saccharomyces cerevisiae*. Concernant la teneur en sucres résiduaire, les résultats obtenus montrent que cette dernière est faible soit 0.12% de M.F. Ainsi avec le milieu à base de dattes, plus de 94.0

% de sucres présents dans le milieu sont consommés par *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce qui est de la quantité de biomasse sèche, cette dernière est élevée soit 4.36 g/L

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Al-Obaidi *et al* . (1987) sur dattes soient 4.10 - 4.60 g/L. Toutefois, la quantité de biomasse sèche obtenue dans cette étude est inférieure à celles obtenues par Azmuda *et al* . (2006); Jalaluddin *et al* . (1995) soient 5.0 - 6.47 et 7.2 - 10.8 g/L, respectivement, et supérieure à celles obtenues par Mwesigye et Barford (1996); Win *et al* . (1996) soient 2.4 à 3.2 g/L. Pour ce qui est du rendement net, ce dernier est faible soit 23.60 % par rapport au rendement théorique qui est de l'ordre de 45.0 à 50.0 % selon Ammouche (1979). Ces faibles rendements obtenus expérimentalement laissent supposer que les sucres consommés par *Saccharomyces cerevisiae*, ne produisent pas seulement de la masse cellulaire et du CO₂, mais aussi des substances exo cellulaires qui se retrouvent dans le milieu.

Néanmoins, le rendement net obtenu est comparable ou même meilleur que ceux obtenus par Alves-Araujo *et al* . (2007); Aransiola *et al* . (2006); Fredriksson (2001); Mwesigye et Barford (1996); Nancib *et al* . (1997); Plessas *et al* . (2006); Reeds et Pepler (1973); Sonnleitner et Kappeli (1986); Win *et al* . (1996), variant entre 12.0 et 30.0 %. Enfin, on peut à priori dire que le milieu à base de dattes peut constituer un milieu de fermentation adéquat au bon développement de *Saccharomyces cerevisiae*.

1-2- Etude comparative de la cinétique de croissance des différentes souches de

***Saccharomyces cerevisiae* isolées à partir des dattes**

L'étude de la cinétique de croissance des différentes souches a été réalisée sur milieu à base de Rebut de Deglet-Nour. Les résultats obtenus montrent que les souches TTB, HDN2, DB, DB1, HW, ELK et TISB présentent un temps d'acclimatation faible soit deux heures comparable à celui de la souche ATCC1102. Par contre, la souche HDN1 présente un temps d'acclimatation relativement élevé soit trois heures. L'analyse de la vitesse d'utilisation du substrat à base de dattes au cours de la fermentation et ce pour les différentes souches montre que cette dernière s'effectue selon deux ordres de réactions successifs. Après une période d'acclimatation, la croissance est tout d'abord exponentielle et la réaction suit une loi d'ordre un, ensuite elle se produit suivant un ordre de réaction nulle.

Ainsi, avec ces souches, après une phase exponentielle de 8 à 10 h, la phase stationnaire est atteinte au bout de 10 à 12 h ou on enregistre l'épuisement du milieu de culture de ses éléments nutritifs (figure 6).

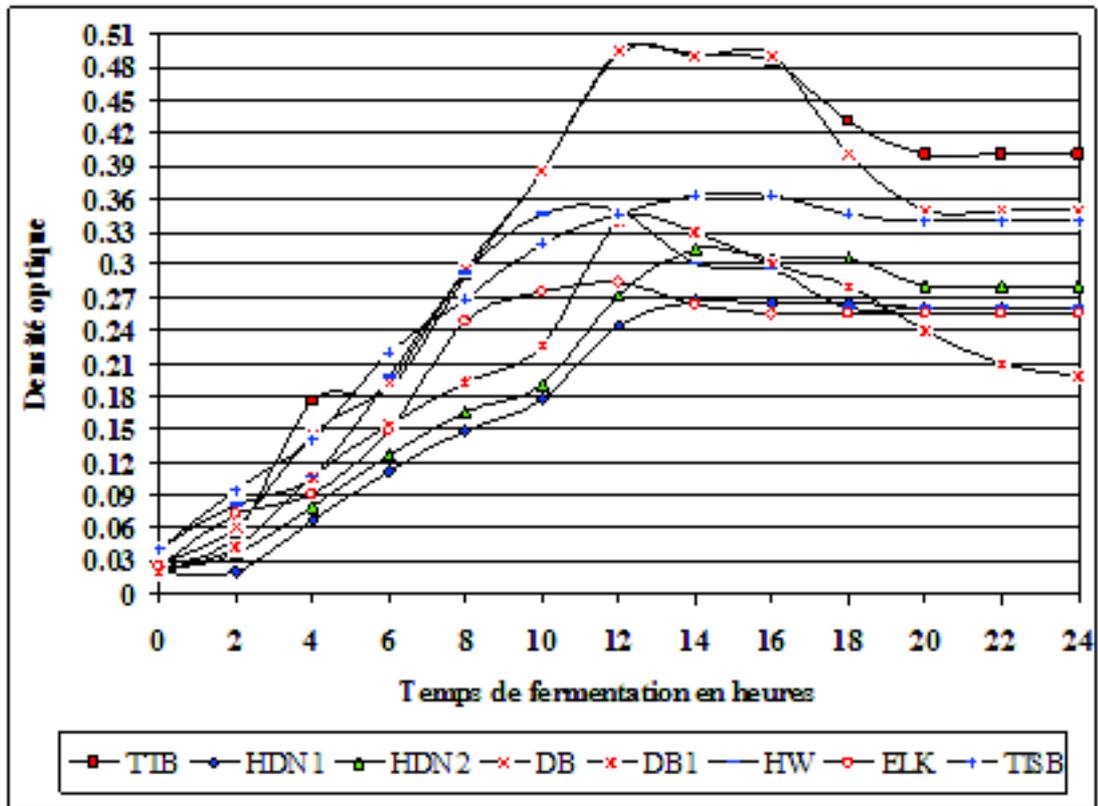


Figure 6 : Cinétique de croissance des différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Par ailleurs, la souche DB présente un taux de croissance élevé soit 0.473 h^{-1} et un temps de génération réduit soit 1 h et 28 min meilleurs que ceux de la souche ATCC 1102 soient 0.37 h^{-1} et 1 h et 53 min. Par contre, un taux de croissance faible et un temps de génération relativement élevé ont été obtenus avec la souche HDN1 soient 0.26 h^{-1} et 2 h et 40 min, respectivement (tableau 14).

Tableau 14 : Paramètres de croissance et rendement en biomasse des différentes souches.

Valorisation biotechnologique des dattes de faible valeur marchande par la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase

Souches	ATCC 11021	TTB	HDN1	HDN2	DB1	DB	HW	ELK	TISB
Temps d'acclimatation en h et min	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Durée de la phase exponentielle de croissance en h	10.0	12.0	10.0	12.0	12.0	12.0	10.0	10.0	12.0
Taux de croissance en h ⁻¹	0.37	0.37	0.26	0.34	0.30	0.47	0.40	0.34	0.32
Temps de génération en h et min	1.0 et 53.0	1.0 et 52.0	2.0 et 40.0	2.0 et 2.0	2.0 et 18.0	1.0 et 28.0	1.0 et 44.0	2.0 et 2.0	2.0 et 10.0
Sucres résiduaire en % de M.F	0.12	0.062	0.58	0.08	0.123	0.125	0.108	0.05	0.027
Biomasse sèche en g/L	4.36	4.32	2.97	3.85	3.22	4.52	4.21	3.88	3.44
Rendement net en %	23.60	22.29	20.91	20.03	17.15	24.11	22.25	19.90	17.43

Pour les autres souches, les taux de croissance et les temps de génération varient entre 0.30 et 0.40 h⁻¹ et 1 h et 44 min à 2 h et 10 min, respectivement. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Champagne *et al.* (1990); Mwesigye et Barford (1996); Nancib *et al.* (1997); Reeds et Pepler (1973) soient un taux de croissance variable entre 0.32 et 0.40 h⁻¹ et un temps de génération variant entre 1 h et 44 min et 3 h suivant la souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée. Par contre, Van-Hoek *et al.* (1998) ont obtenu un taux de croissance maximum de 0.42 h⁻¹ et un temps de génération de 1 h et 39 min en utilisant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* DS28911. Toutefois, Badotti *et al.* (2008) ont obtenu des taux de croissance faibles variant entre 0.24 et 0.26 avec les souches de *Saccharomyces cerevisiae* LCM001 et 1403-7A. D'autre part, la quantité de biomasse obtenue varie suivant la souche. Ainsi, les quantités en biomasse sèche produites par les souches DB et TTB sont comparables ou même meilleures soient 4.32 à 4.52 g/L que celle produite par la souche ATCC 1102 soit 4.36 g/L (tableau 14).

Par contre, la souche HDN1 donne une quantité en biomasse sèche faible soit 2.97 g/L. De même, Jalaluddin *et al.* (1995) ont obtenu des quantités en biomasse sèche élevées avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* (I) par rapport aux souches de *Saccharomyces cerevisiae* (II) et *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632. Aussi, Mwesigye et Barford (1996) ont obtenu des quantités en biomasse sèche élevées avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* UNSW par rapport à la souche de *Saccharomyces cerevisiae* A11. Enfin, Azmuda *et al.* (2006) ont obtenu des quantités en biomasse sèche élevées avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* DP-4, par rapport aux souches de *Saccharomyces cerevisiae* FP-2, FR-1, FT et FP-1. Concernant la teneur en sucres résiduaire, les résultats obtenus montrent que cette dernière est plus élevée chez la souche HDN1 soit 0.58 % par rapport aux souches ATCC 1102, DB et TTB soient 0.027 - 0.14 % de M.F, respectivement (tableau 14).

Aussi avec les souches TTB, HDN2, DB, DB1, HW, ELK et TISB, 93 % de sucres présents dans le milieu sont consommés par ces dernières; alors qu'avec la souche HDN1, uniquement

71 % de sucres qui sont consommés. Enfin, le rendement net obtenu est faible variant entre 17.15 et 24.11 % (tableau 14) par rapport au rendement théorique qui est de l'ordre de 45 % (Ammouche, 1979). Néanmoins, les rendements nets obtenus avec les souches HW, TTB, ATCC 1102 et DB sont comparables ou même meilleurs que ceux obtenus par Aransiola *et al.*, (2006); Fredriksson (2001); Mwesigye et Barford (1996); Nancib *et al.* (1997); Plessas *et al.* (2006); Reeds et Pepler (1973); Sonnleitner et Kappeli (1986) et Win *et al.* (1996), variant entre 12.0 et 30.0 %. Enfin, les rendements nets obtenus dans cette étude et ce pour l'ensemble des souches sont inférieurs à ceux rapportés par Badotti *et al.* (2008) avec des souches de *Saccharomyces cerevisiae* LCM001 et 1403-7A.

1-3- Optimisation de la croissance de la souche *Saccharomyces cerevisiae* DB

1-3-1- Effet de la teneur en oxygène dissous

Les résultats obtenus indiquent qu'une teneur en oxygène dissous élevée favorise la croissance cellulaire et la quantité de biomasse sèche obtenue est de 4.52 g/L et un rendement net de 24.11 % (figure 7).

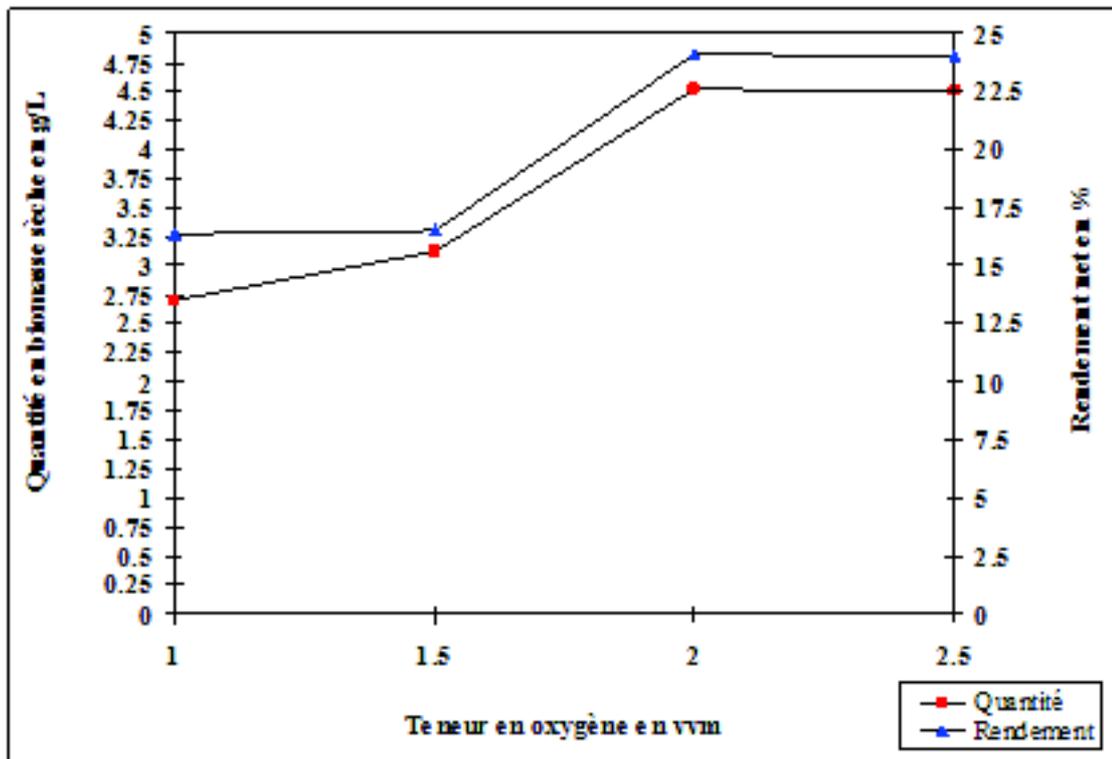


Figure 7 : Evolution de la quantité en biomasse et du rendement suivant la teneur en oxygène

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux rapportés par Blanco *et al.* (2008). Par ailleurs, une teneur en oxygène inférieure ou égale à 1.0 vvm donne une quantité en biomasse sèche faible soit 2.70 g/L.

Selon, Reed et Pepler (1973), une teneur en oxygène faible dans le milieu de fermentation conduit à une formation d'une certaine quantité d'alcool d'où diminution de la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*.

1-3-2- Effet de la source azotée

Parmi les sources d'azote testées, la meilleure croissance a été obtenue avec le phosphate d'ammonium suivi du sulfate d'ammonium et du sulfate d'ammonium + urée. Par contre, la croissance la plus faible a été obtenue avec le carbonate d'ammonium et l'ammoniaque. Ainsi, les quantités en biomasse sèche et les rendements nets obtenus sur milieux à base de Tinissine et rebuts de Deglet-Nour avec le phosphate d'ammonium, le sulfate d'ammonium et du mélange sulfate d'ammonium + Urée sont de 4.44 - 4.88, 4.35 - 4.55 et 4.32 - 4.52 g/L et 23.49 - 25.53, 23.05 - 24.20 et 22.88 - 24.11 %, respectivement (figure 8).

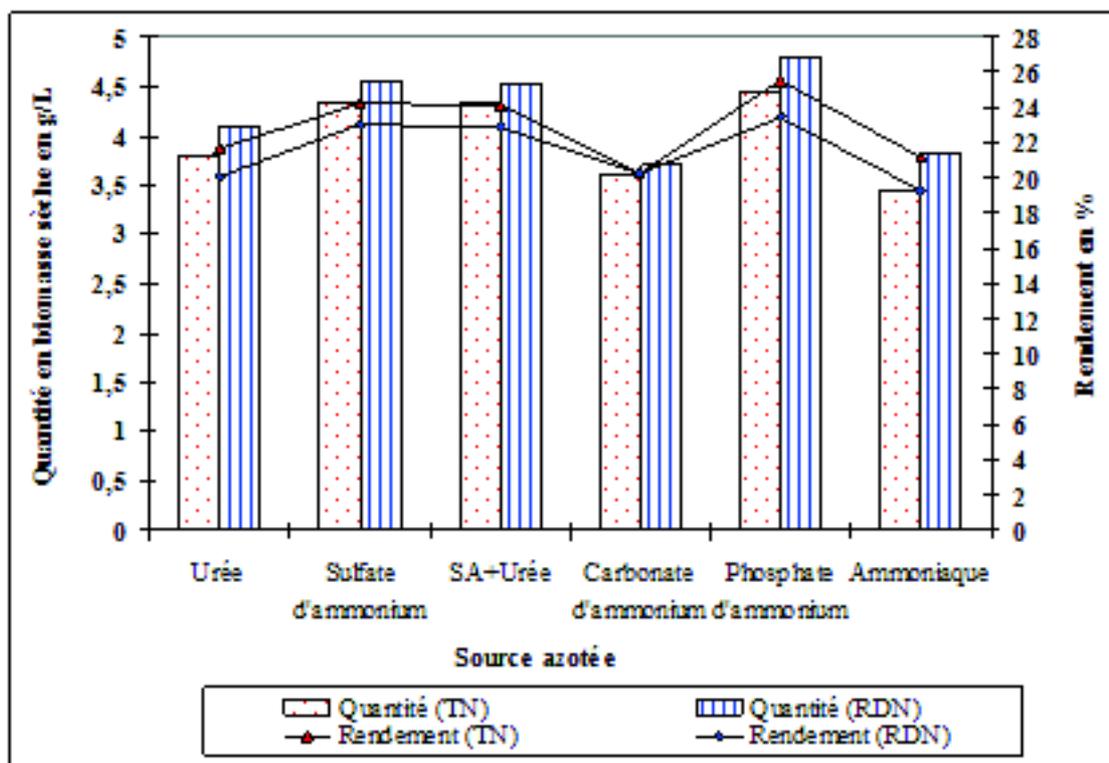


Figure 8 : Evolution de la quantité en biomasse et du rendement suivant la source azotée

Par conséquent, la meilleure source azotée est le phosphate de potassium alors que, plusieurs auteurs, recommandent l'utilisation du sulfate d'ammonium comme source azotée pour la production de la levure boulangère car ils ont obtenu de meilleurs rendements avec cette source d'azote (Al-Obaidi *et al.* , 1987; Champagne *et al.* , 1990; Jalaluddin *et al.* , 1995; Nancib *et al.* , 1997).

1-3-3- Effet de la teneur en sulfate de magnésium

La croissance de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* DB augmente avec la teneur en sulfate du magnésium apporté au milieu de culture. La croissance est maximale avec une teneur en sulfate de magnésium de 0.2 g/L (figure 9).

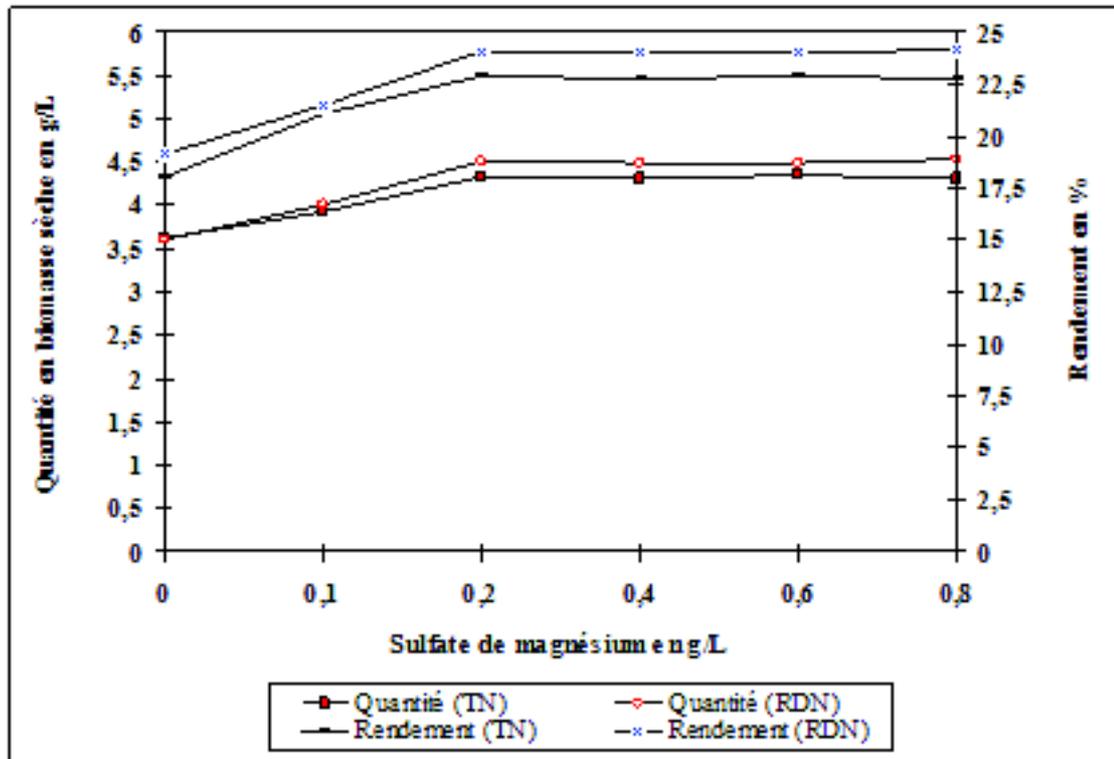


Figure 9 : Evolution de la quantité en biomasse et du rendement net suivant la teneur en sulfate de magnésium.

Ainsi la quantité de biomasse sèche et le rendement net obtenus avec une teneur en sulfate de magnésium de 0.2 g/L sont élevés soient 4.32 - 4.52 g/L et 22.88 - 24.11 %, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Al-Obaidi *et al.* (1987); Nancib *et al.* (1997).

1-3-4- Effets des différentes vitamines sur le rendement en biomasse

Les vitamines jouent un rôle essentiel dans la production de la levure boulangère. Les vitamines, telles que la biotine, l'acide pantothénique et la thiamine sont essentielles pour une croissance optimale de *Saccharomyces cerevisiae* (Reed et Nagodawithana, 1991).

Ainsi, les résultats obtenus indiquent que la biotine est essentielle pour la croissance de la levure boulangère. A cet effet, le tableau 15 montre que l'ajout de 0.4 mg/L au milieu de culture améliore la quantité de biomasse sèche pour atteindre des valeurs de 4.60 g/L avec le milieu à base de Tinissine et de 5.10 g/L avec le milieu à base de rebuts de Deglet-Nour.

Tableau 15 : Evolution de la quantité en biomasse sèche et du rendement net suivant les teneurs des différentes vitamines.

Teneurs en Vitamines en mg/L		Tinissine		Rebuts de Deglet-Nour	
		Biomasse sèche en g/L	Rendement net en %	Biomasse sèche en g/L	Rendement net en %
Biotine	0	4.52	22.88	4.52	24.11
	0.2	4.55	23.62	4.80	24.61
	0.4	4.60	23.71	5.10	26.27
	0.6	4.60	23.91	5.10	26.15
Panthothénate de calcium	0	4.32	22.88	4.52	24.11
	0.1	4.30	22.86	4.55	24.20
	0.2	4.38	23.29	4.65	24.73
	0.3	4.42	23.51	4.50	24.00
Thiamine	0	4.32	22.88	4.52	24.11
	0.04	4.65	24.47	4.92	25.33
	0.06	4.78	25.15	5.35	27.40
	0.08	4.68	24.60	5.12	26.36

De même le rendement net obtenu avec une teneur en biotine de 0.4 mg/L, est élevé soit 23.71 % avec le milieu à base de Tinissine et 26.27 % avec le milieu à base de Rebuts de Deglet-Nour. Des résultats similaires ont été obtenus par Al-Obaidi *et al* . (1987); Reed et Pepler (1973); Reed et **Nagodawithana** (1991). Ainsi, ils ont noté une légère amélioration de la quantité en biomasse sèche en ajoutant 0.04 mg de biotine pour 100 ml de milieu de culture. Par contre, Jalaluddin *et al* . (1995) ont estimé les besoins en biotine de *Saccharomyces cerevisiae* pour une croissance optimale à 50 μ g/L.

Quant au pantothénate de calcium, les résultats obtenus montrent que ce dernier n'a aucun effet sur les quantités en biomasses sèches produites et ceci quelle que soit la teneur de cette dernière. Ainsi, les quantités en biomasse et les rendements nets obtenus varient de 4.30 à 4.42 g/L et 22.88 à 23.51 % sur milieu à base de Tinissine et 4.50 à 4.65 et 24.00 à 24.73 % sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour, respectivement (tableau 15). Ceci est probablement lié à la richesse de ces deux milieux de culture en cette vitamine. Par contre, Al-Obaidi *et al* . (1987) recommandent une teneur en cette vitamine de 0.1 mg/L afin d'optimiser le rendement en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur milieu à base de dattes.

Pour ce qui est de la thiamine, le tableau 15 montre que l'ajout de la thiamine améliore d'une manière proportionnelle les quantités en biomasses et les rendements nets suivant la teneur de cette dernière dans le milieu de fermentation. A cet effet, la teneur optimale requise est de 0.06 mg/L. Ainsi, les quantités en biomasse sèches et rendements nets obtenus avec une teneur en thiamine de 0.06 mg/L, sur milieux à base de Tinissine et rebuts de Deglet-Nour sont de 4.78 - 5.35 g/L et 25.15 - 27.40 %, respectivement. De même, Al-Obaidi *et al* . (1987); Reed et Pepler (1973) recommandent une teneur en thiamine de 0.06 à 0.08 mg/L sur milieux à base de dattes et de mélasse afin d'optimiser la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

2- Production de la levure boulangère en Fed-batch

Le débit d'alimentation en substrat adopté est le même que celui appliqué à l'échelle industrielle par les levurreries de Boucheggouf et Oued-Smar à savoir 33 ml à 40 °Ba et durant 12 heures. Les résultats obtenus montrent qu'après 15 minutes, la levure croît à

une phase exponentielle de croissance qui est atteinte vers la première heure. A ce moment là, l'introduction du milieu de culture dans la cuve est réglée à un débit d'alimentation de façon à ce que la concentration du substrat soit constante et corresponde à une phase exponentielle de croissance cellulaire. Selon, Scribans (1993), si le débit d'alimentation est trop faible, la concentration cellulaire évolue selon une courbe plus ou moins proche de la courbe correspondant à l'évolution de la croissance en discontinue. Si au contraire le débit d'alimentation est trop élevé, la concentration en biomasse a tendance à diminuer car l'effet dilution l'emporte. Par ailleurs, le débit d'alimentation en substrat dépend du taux de dilution imposé à la culture, de la souche de levure et de la nature du substrat utilisé. A cet effet, la fixation du taux de dilution et du débit d'alimentation horaire en substrat sont des objectifs à atteindre.

a/ Déroulement de la fermentation

Selon, Malineau et Marnoux (1989), l'apport de sucres au milieu de fermentation d'une manière proportionnelle aux besoins de la levure, c'est à dire l'apport des sucres au fur et à mesure de la multiplication cellulaire à une teneur limitante permet de limiter au maximum l'effet Crabtree. D'autre part, Reed et Pepler (1973) signalent une formation d'une certaine quantité d'alcool au cours de la fermentation en aérobiose et ceci quels que soit le niveau d'aération requis et la teneur en sucres utilisée. Ainsi, ces derniers ont montré qu'un taux d'alcool formé inférieur à 0.05 % est un signe de bonne performance. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la teneur en alcool obtenue au cours des différentes fermentations est inférieure à 0.05 %. Concernant le temps de fermentation, les résultats obtenus avec le milieu à base de dattes, indiquent qu'au moment où on arrête l'alimentation du milieu en sucres (11^{ème} heure), la phase stationnaire est atteinte vers la 13^{ème} heure au cours de laquelle, on observe un épuisement du milieu en éléments nutritifs (sucres et protéines). Par contre, avec le milieu à base de mélasse, la phase stationnaire est atteinte vers la 15^{ème} heure. Par ailleurs, la consommation en sucres par *Saccharomyces cerevisiae* est plus importante avec le milieu à base de dattes par rapport au milieu à base de mélasse. Ainsi, on constate qu'avec le milieu à base de dattes, 89.5 à 90.5 % de sucres apportés sont consommés par la levure au bout de 12 h de fermentation, par contre avec le milieu à base de mélasse, la consommation en sucres n'est que de 80 % au bout de 12 h.

b/ Production de la levure boulangère au cours de la fermentation

Les résultats obtenus montrent que les quantités en biomasse sont faibles durant les trois premières heures de fermentation soient 13.40 à 19.30 g de MF/L et 5.20 à

7.30 g de MS/L quand la source azotée est apportée en totalité au début de la fermentation. Aussi, elles sont de 30.40 à 32.00 g de MF/L et 10.70 à 12.10 g de MS/L quand la source azotée apportée au milieu de culture est fractionnée (tableaux 16 et 17).

Tableau 16 : Quantité en biomasse en g/L de M.F au cours de la fermentation.

Durée de fermentation en h	Rebuts de Deglet-Nour		Tinissine		Tantboucht	
	N.F	F	N.F	F	N.F	F
3	19.30	32.00	13.40	31.20	13.80	30.40
6	28.80	48.20	25.50	45.40	26.00	41.80
9	47.60	62.20	41.90	57.10	37.10	48.00
12	56.00	76.10	54.40	67.30	45.00	60.11

F: Fractionnée N.F: Non fractionnée

Tableau 17 : Quantité en biomasse en g/L de M.S au cours de la fermentation.

Durée de fermentation en h	Rebuts de Deglet-Nour		Tinissine		Tantboucht	
	N.F	F	N.F	F	N.F	F
3	7.30	12.10	5.10	11.80	5.20	10.70
6	10.94	18.40	9.70	17.20	9.90	16.20
9	18.00	23.6	15.9	21.70	14.10	18.2
12	20.00	28.4	18.40	25.55	16.90	22.80

Cette faiblesse des quantités en biomasse est due à une faible consommation des sucres durant les trois premières heures de fermentation. Par ailleurs, les quantités en biomasse sont plus élevées quand la source azotée apportée au milieu de fermentation est fractionnée soient 22.80 à 28.40 g de MS/L. Par conséquent, dans une perspective d'améliorer la production de biomasse il est impératif de fractionner la source azotée au cours de la fermentation afin de respecter le rapport C/N.

2-1- Effet du taux de dilution sur le rendement en biomasse

L'équation représentative d'une culture en semi continue s'écrit $dx/dt = mx - DX$.

A l'égalité, selon Ammouche (1979), $dx/dt = 0$, donc, $mx = DX$. Ainsi, le taux de croissance devient égal au taux de dilution (D) imposé à la culture. Les résultats obtenus montrent qu'après un temps d'acclimatation relativement court qui est de 15 min, la levure croit à une phase exponentielle de croissance qui est atteinte vers la première heure. A ce moment là, l'introduction du milieu de culture dans la cuve est réglée à un débit d'alimentation de façon à ce que la concentration du substrat soit constante et correspondre à une phase exponentielle de croissance cellulaire. Selon, Scribans (1993), le débit d'alimentation en substrat dépend du taux de dilution imposé à la culture, de la souche de levure et de la nature du substrat utilisés. A cet effet, la fixation du taux de dilution est un objectif à atteindre.

La culture en Fed-Batch s'est déroulée sur une période de 12 h avec un volume utile de 1.5 litres. Dans ces conditions expérimentales, nous remarquons que la quantité en biomasse sèche augmente au fur et à mesure que le taux de dilution augmente jusqu'à un maximum de 0.22 h^{-1} . Au-delà, la quantité en biomasse sèche baisse pour atteindre $20.1 - 22.2 \text{ g/L}$ avec un taux de dilution de 0.30 h^{-1} (figure 10). Ainsi, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un taux de dilution de 0.22

h^{-1} .

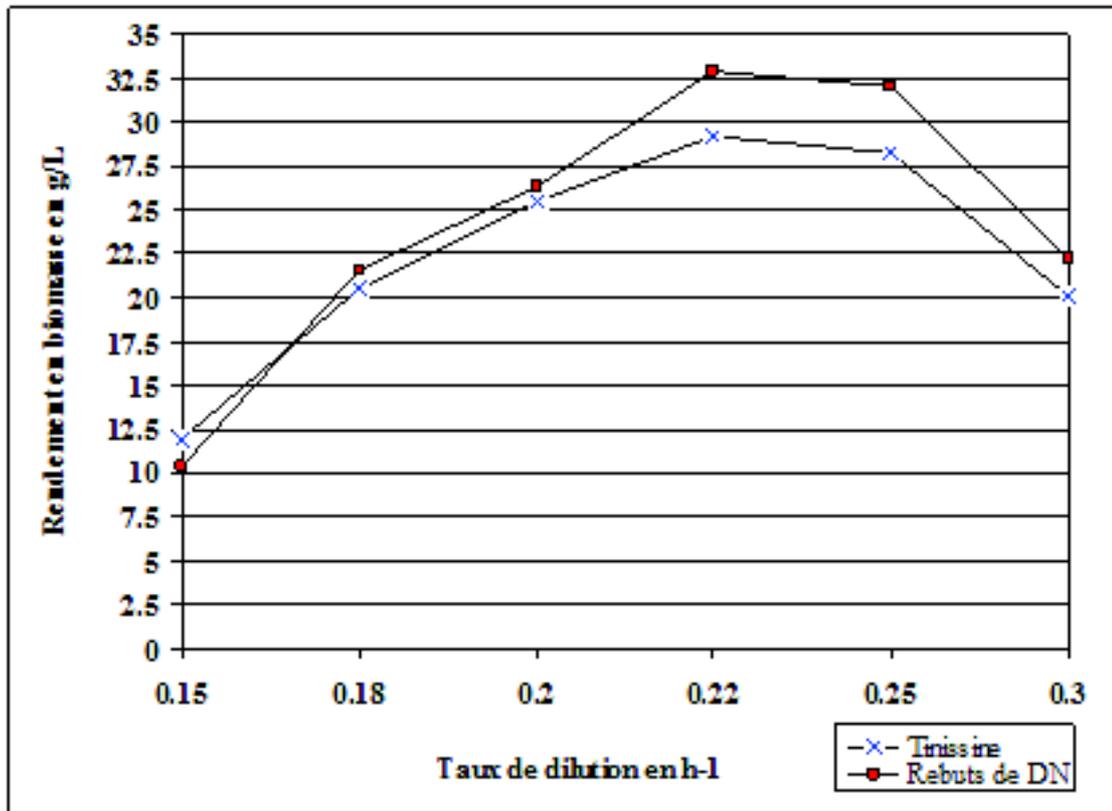


Figure 10 : Evolution de la quantité en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC1102 cultivée sur Tinissine et Rebuts de Deglet-Nour suivant le taux de dilution.

Ce dernier est semblable à ceux appliqués par Daramola et Zampraka (2008); Ejiolor et al. (1996); Reed et Pepler (1973) soient 0.18 à 0.20 h^{-1} . Toutefois, il est inférieur à ceux appliqués par Gueguim-Kana et al. (2007); Kristiansen (1994) soient 0.25 h^{-1} à 0.30 h^{-1} . Selon Van-Hoek et al. (1998), aux taux de dilution au-dessous de 0.28 h^{-1} , le métabolisme du glucose est entièrement respiratoire et une absence de production d'alcool a été notée avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae* DS28911.

Par contre, selon Cannizaro et al. (2004), à des taux de dilution élevés (supérieurs à 0.28 h^{-1}), le rendement en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* diminue d'une manière notable dû à la production d'éthanol. Ainsi, au taux de dilution de 0.22 h^{-1} , on obtient des quantités en biomasse sèches élevées soient 29.2 g/L sur milieu à base de Tinissine et 32.9 g/L sur milieu à base de Rebuts de Deglet-Nour. Il est à signaler que Ejiolor et al. (1994); Reed et Pepler (1973) ont obtenu de meilleurs rendements en biomasse avec un taux de dilution compris entre 0.20 et 0.23 h^{-1} . Par ailleurs, Akinyeam et al. (2003); Miskiewicz et Borowiak (2005); Van-Hoek et al. (1998) ont obtenu de meilleurs rendements avec un taux de dilution inférieurs variant entre 0.13 et

0.18 h^{-1} . De même, Belo et al. (2003), ont obtenu de meilleurs rendements avec un taux de dilution plus faible inférieur ou égal à 0.10 h^{-1} . Par contre, Daramola et Zampraka (2008); Gueguim-Kana et al. (2007); Kristiansen (1994) ont obtenu de meilleurs rendements

avec des taux de dilutions élevés supérieurs à 0.25 h^{-1} . Par ailleurs, aux taux de dilution faibles, inférieurs à 0.18 h^{-1} , la totalité des sucres présents dans les milieux de culture sont totalement consommés d'où une absence totale de sucres résiduaire en fin de fermentation.

Par contre, au delà d'un taux de dilution de 0.22 h^{-1} , la teneur en sucres résiduaire augmente dans le fermenteur pour atteindre un maximum de 2.15 - 2.5 % avec le taux de dilution de 0.30 h^{-1} (tableau 18).

Tableau 18 : Evolution des quantités en biomasse et des teneurs en sucres résiduaire suivant le taux de dilution.

Taux de dilution (h^{-1})	Tinissine		Rebuts de Deglet-Nour	
	Quantité en biomasse en g/L	Sucres résiduaire en %	Quantité en biomasse en g/L	Sucres résiduaire en %
0.15	11.90	0.00	10.40	0.00
0.18	20.55	0.00	21.61	0.00
0.20	25.45	0.12	26.36	0.15
0.22	29.20	0.15	32.90	0.20
0.25	28.20	1.45	32.00	1.50
0.30	20.10	2.15	22.20	2.50

Ainsi, on peut dire que l'efficacité chimique diminue avec l'augmentation de la teneur en sucres et au-delà d'un taux de dilution de 0.30 h^{-1} , la plus grande partie de sucres présents dans le milieu a été fermenté par voie éthanolique. A cet effet, Van-Hoeket *al.* (1998) ont noté une production accrue d'alcool soit 25.3 mmol d'éthanol/g de biomasse sèche/h au delà d'un taux de dilution de 0.40 h^{-1} . De même Cannizzaroet *al.* (2004) ont noté une diminution du rendement en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* dû à la production d'éthanolà des taux de dilution élevés supérieurs à 0.30 h^{-1} .

Selon les résultats de cette étude, on constate qu'au-delà d'un taux de dilution de 0.30 h^{-1} , il y'a lessivage du fermenteur qui se traduit par une diminution nette de la biomasse d'où limitation de la vitesse de croissance. Aussi, une production d'alcool plus importante a été notée et les sucres présents dans le milieu ne sont pas totalement métabolisés. Ceci est probablement lié à un excès de sucres dans le milieu qui empêche une bonne diffusion de l'oxygène, ce qui se traduit par une anaérobiose et ce quel que soit le niveau d'aération adopté.

Le même phénomène a été signalé par Miskiewicz et Borowiak (2005); Reed et Pepler (1973), qui ont montré qu'une teneur élevée en sucres dans le milieu de fermentation conduit à une suppression de la formation d'enzymes de la chaîne respiratoire. Ainsi, ils recommandent pour la production de la levure boulangère, la suppression de la fermentation éthanolique et de consacrer toute l'énergie nécessaire pour le développement des levures par voie respiratoire.

2-2- Influence des différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* sur le rendement en

biomasse et la force de levée

Le milieu de culture utilisé est l'extrait obtenu à partir des rebuts de dattes de la variété Deglet-Nour.

La quantité en biomasse sèche obtenue varie considérablement suivant la souche utilisée. Ainsi, les souches TTB, HW et DB donnent des quantités en biomasse sèches élevées variant entre 31.5 et 34.5 g/L comparables et voir meilleures que celle obtenue avec la souche ATCC 1102 soit 32.9 g/L . Par contre avec la souche HDN1, la quantité en biomasse sèche obtenue est très faible et elle est de 12.3 g/L (figure 11).

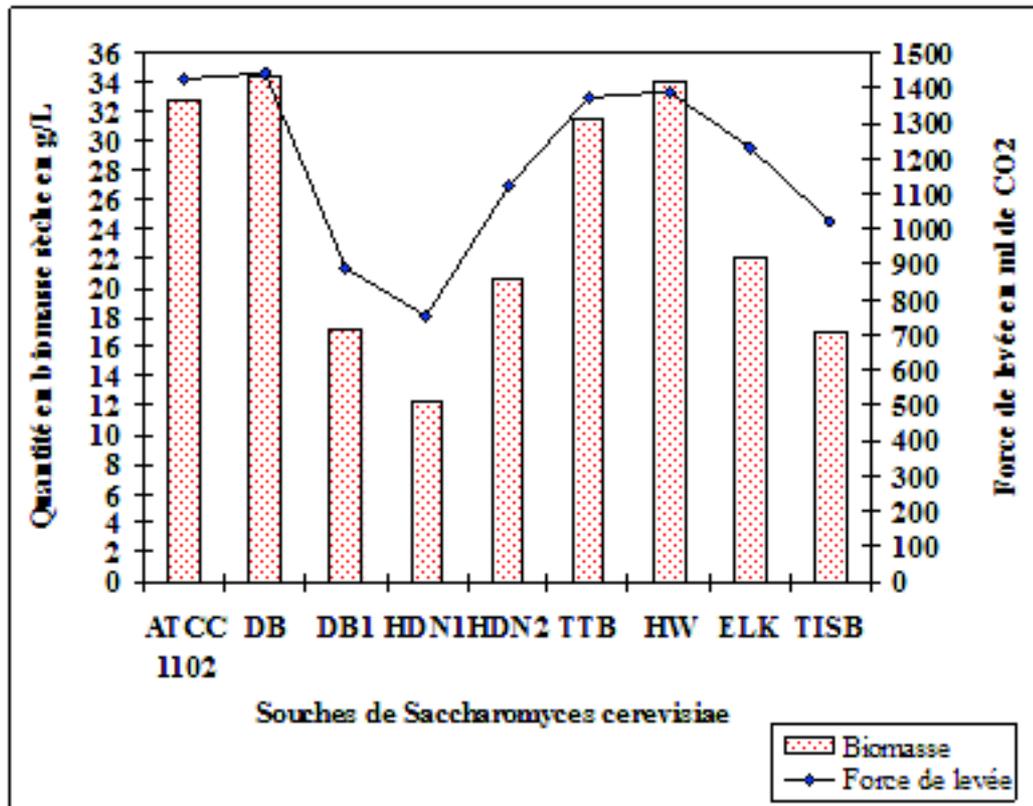


Figure 11 : Evolution de la quantité en biomasse sèche et de la force de levée suivant les différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutefois, Ejifor *et al.* (1994) ont obtenu un rendement meilleur en utilisant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 2155 soit 54.0 g de M.S/L. Quant au rendement net, les souches DB, HW et TTB donnent des rendements meilleurs variant entre 41.37 et 45.39 % comparables à celui obtenu avec la souche ATCC 1102 soit 43.29 % (tableau 19).

Tableau 19 : Quantité en biomasse et force de levée suivant les différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Souches	Quantité en Biomasse fraîche en g/L	Quantité en Biomasse sèche en g/L	Teneur en sucres résiduels en %	Rendement net en %	Force de levée en ml de CO ₂
ATCC 1102	86.5	32.9	0.29	43.29	1428.00
Degla-Beida (DB)	90.89	34.54	0.21	45.39	1444.00
Degla-Beida (DB1)	55.04	17.12	2.22	23.10	889.00
Rebuts de DN (HDN1)	36.17	12.3	2.75	16.72	752.00
Rebuts de DN (HDN2)	62.25	20.61	0.42	27.15	1122.00
Tantboucht (TTB)	86.57	31.5	0.17	41.37	1375.00
Halwa (HW)	89.79	34.12	0.108	44.77	1392.00
EI-Kaid (ELK)	68.91	22.10	0.098	29.00	1233.00
Tissibi (TISB)	58.14	16.96	1.468	22.66	1022.00

Des résultats similaires ont été rapportés par Al-Ogaidi *et al.* (1981), De Kock *et al.* (2000).

Par contre, les souches DB1, HDN1 et TISB donnent des rendements nets faibles variant entre 16.7 et 23.1 %. D'autre part, la force de levée la plus élevée a été obtenue avec la souche DB soit 1444.0 ml de CO₂ et la plus faible avec la souche HDN1 soit 752 ml de CO₂.

2-3- Influence de la nature du substrat sur le rendement en biomasse et la qualité de la levure boulangère

L'optimisation du processus de fabrication de la levure boulangère dépend du choix de

la souche, de la teneur en oxygène, de la teneur en phosphore, de la nature et de la teneur de la source azotée (Blanco *et al.*, 2008; **Chen et Chiger**, 1985; **Reed et Nagodawithana**, 1991).

a/ Influence de la nature du substrat sur la quantité en biomasse

Les résultats obtenus montrent que la quantité en biomasse fraîche est plus élevée avec le milieu à base de rebuts de Deglet-Nour soit 86.5 g/L par rapport à la mélasse soit 66.5 g/L (tableau 20).

Tableau 20 : Evolution de la quantité en biomasse sèche suivant les différents substrats

Substrat	Quantité en biomasse en g/L de M.F	Quantité en biomasse en g/L de M.S
Tinissine	76.9	29.2
Tantboucht	73.5	26.5
Rebuts de Deglet-Nour	86.5	32.9
Mélasse	66.5	25.3

De même, les quantités en biomasse sèches obtenues sont plus élevées avec le milieu à base de rebuts de Deglet-Nour soit 32.9 g/L par rapport aux milieux à base de mélasse et de Tantboucht soient 25.3 et 26.5 g/L, respectivement (figure 12).

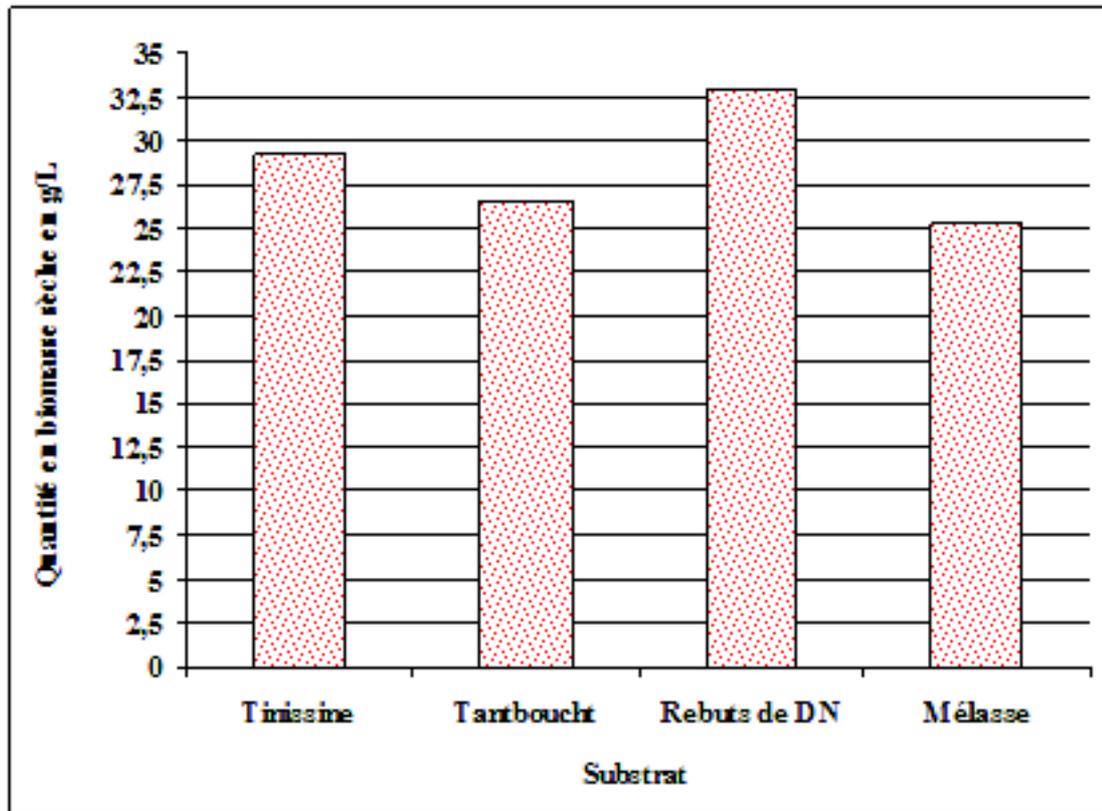


Figure 12 : Evolution de la quantité en biomasse sèche suivant la nature du substrat.

L'amélioration des quantités en biomasse obtenues avec les milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine est probablement liée à la richesse de ces derniers en magnésium, fer et manganèse. Toutefois, la faible quantité en biomasse obtenue avec le milieu à base de Tantboucht s'explique probablement par la richesse de ce dernier en cuivre et en zinc. En ce sens, Reed et Pepler (1973) signalent qu'une teneur en Cuivre de 1.75 mg/l ainsi qu'une teneur élevée en Zinc dans le milieu de fermentation peuvent réduire de 50 %, la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*. Néanmoins, les quantités en biomasse obtenues dans cette étude sont inférieures à celles obtenues par Ejiolorun et al. (1994 et 1996); Gueguim-Kana et al. (2007); Fredriksson (2001); Litchfield (1979); Reed et Pepler (1973); Sonnleitner et Kappeli (1986); Van-Hoek et al. (2000) sur milieu à base de mélasse et de glucose soient 45.0 à 54.0 g/L. Cette baisse des rendements est probablement liée à la teneur et à la qualité des éléments nutritifs utilisés. Toutefois, nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Blanco et al. (2008); Bouix et Leveau (1993); Win et al. (1996) à savoir 26.0 - 30.0 g/L sur milieu à base de mélasse. Enfin, Evans (1990) signale que l'ajout des sucres à une teneur limitante de l'effet Crabtree peut réduire le rendement en biomasse.

b/ Influence de la nature du substrat sur le rendement net

Les résultats obtenus montrent que les rendements nets sont faibles soient 34.60 à 43.29 %, inférieurs au rendement théorique estimé à 50 % (tableau 21).

Tableau 21 : Evolution du rendement net suivant les différents substrats

Substrat	Teneur en sucres résiduaux en %	Rendement net en %
Mélasses	1.13	34.60
Tantboucht	0.12	37.10
Tinissine	0.178	37.86
Rebuts de Deglet-Nour	0.29	43.29

Les rendements nets obtenus dans cette étude concordent avec ceux obtenus par Akinyeam *et al.* (2003); Ferrari *et al.* (2001); Layokun *et al.* (2006); Win *et al.* (1996). Toutefois, ces derniers sont inférieurs à ceux rapportés par Belo *et al.* (2003); Bhushan et Joshi (2006); Ejiofor *et al.* (1996); Solomon *et al.* (1991); Sonnleitner et Kappeli (1986); Van-Hoeket *et al.* (2000) soient 46.0 à 52.0 % sur les milieux à base de mélasses et de sirop de glucose. Par ailleurs, une étude comparative montre qu'avec les rebuts de dattes, on obtient un rendement net élevé soit 43.29 % par rapport aux autres soient 37.1 - 37.86 %. Par conséquent, on peut dire qu'avec le milieu à base de rebuts de dattes, une conversion maximale des sucres en substances cellulaires est notée. Il est à noter qu'avec la mélasses la quantité de sucres n'est pas totalement consommée d'où une teneur en sucres résiduaux élevée soit 1.13 %.

c/ Etude de la qualité de la levure fraîche

La production de levures de qualité dépend de la souche et de la nature du substrat utilisées (Reed et Pepler, 1973; Bouix et Leveau, 1993). Ainsi, les levures cultivées sur les trois substrats (Tinissine, Tantboucht et mélasses) sont de qualité meilleures comparées aux normes adoptées en Algérie car elles présentent des teneurs en protéines et en phosphore élevées, un bon délayage et une force de levée élevée (tableau 22).

	Milieux de culture				Normes de qualité Algériennes
	Rebuts de Deglet-Nour	Tantboucht	Tinissine	Mélasses	
Matière sèche en %	30.40	31.66	32.33	30.33	30 - 34.00
Protéines en % de M.S	43.50	43.65	44.90	44.00	44 - 46.00
Phosphore en % de M.S	2.06	2.12	2.40	2.30	2 - 2.50
pH	6.00	6.00	6.00	6.00	6.0 - 6.1
Force de levée (ml de CO₂)	1428.00	1325.00	1525.00	1350.00	800 - 1200
Délayage	Bon	Bon	Bon	Bon	

A cet effet, on peut dire que les levures produites sur les quatre substrats sont conformes aux normes adoptées en Algérie. D'autre part, une étude comparative des levures cultivées sur les quatre substrats montre que celles produites sur milieu à base de Tinissine sont de qualité meilleure représentées par des teneurs en phosphore et en protéines élevées, respectivement 44.9 et 2.4 % de M.S et une force de levée élevée soit 1525 ml de CO₂ par rapport à la mélasses.

Il est à noter que Reed et Pepler (1973); Litchfield, 1979 signalent qu'au fur et à mesure que le rendement en levures diminue, la qualité de celle ci augmente en conséquence. Par ailleurs, Bhushan et Joshi (2006); Ejiofor *et al.* (1994); Ejiofor *et al.* (1996); Ferrari *et al.* (2001) ont rapporté que les levures produites sur milieux à base de glucose, millet, jus de pomme et un mélange de lactosérum et mélasses présentent des forces de levée

comparables à celles obtenues dans cette étude. Enfin, les résultats du tableau 21 montrent que la force de levée, la plus élevée a été obtenue avec Tinissine et la plus faible avec Tantboucht. L'amélioration de la force de levée obtenue avec Tinissine est probablement liée à la qualité du jus de dattes de ce cultivar. A ce propos, Al-Obaidi *et al.* (1987) signalent que les substrats riches en biotine, et thiamine améliorent la force de levée de la levure boulangère.

2-4- Influence de la source azotée sur le rendement en biomasse et la force de levée

a/ Influence de la source azotée sur la quantité en biomasse

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de l'urée et de l'ammoniaque comme sources azotées donnent des quantités en biomasse faibles soient 76.9 - 86.5 g de M.F/L, 29.2 - 32.9 g de M.S/L et 88.1 - 90.6 g de M.F/L, 30.8 - 31.7 g de M.S/L, respectivement par rapport aux autres sources d'azote (tableau 23).

Tableau 23 : Evolution de la quantité en biomasse en g/L de M.F et M.S suivant la source azotée.

Substrat	Quantité de biomasse en g/L de M.F et de M.S									
	Urée		Sulfate d'ammonium		50 % Urée + 50 % S.A		Ammoniaque		Phosphate d'ammonium	
	MF	MS	MF	MS	MF	MS	MF	MS	MF	MS
Tinissine	76.9	29.2	106.0	37.1	109.4	38.3	88.1	30.8	141.8	45.37
Rebuts de Deglet-Nour	86.5	32.9	107.3	37.6	118.1	41.3	90.6	31.7	142.1	45.47

Pour les levures cultivées sur milieu à base de Tinissine et, en présence du sulfate d'ammonium, du sulfate d'ammonium urée à 50 - 50 % ou du phosphate d'ammonium, il y a une tendance à l'amélioration des quantités en biomasse de plus de, 27.0, 31.1 et 55.3 %, respectivement, en plus de l'accélération de la croissance cellulaire par rapport à l'urée. Il en est de même pour le substrat à base de rebuts de Deglet-Nour soient respectivement, 14.1, 25.6 et 38.2 %. En outre, Verduyn *et al.*, (1991) ont obtenu un rendement en biomasse de

40 g/L similaire à celui obtenu dans cette étude avec les deux sources d'azote (Sulfate d'ammonium + Urée et le phosphate d'ammonium). Par ailleurs, l'étude comparative des différentes sources azotées montre que le phosphate d'ammonium donne une quantité en biomasse sèche élevée soit 45.37 à 45.47 g/L par rapport aux autres sources d'azote (figure 13).

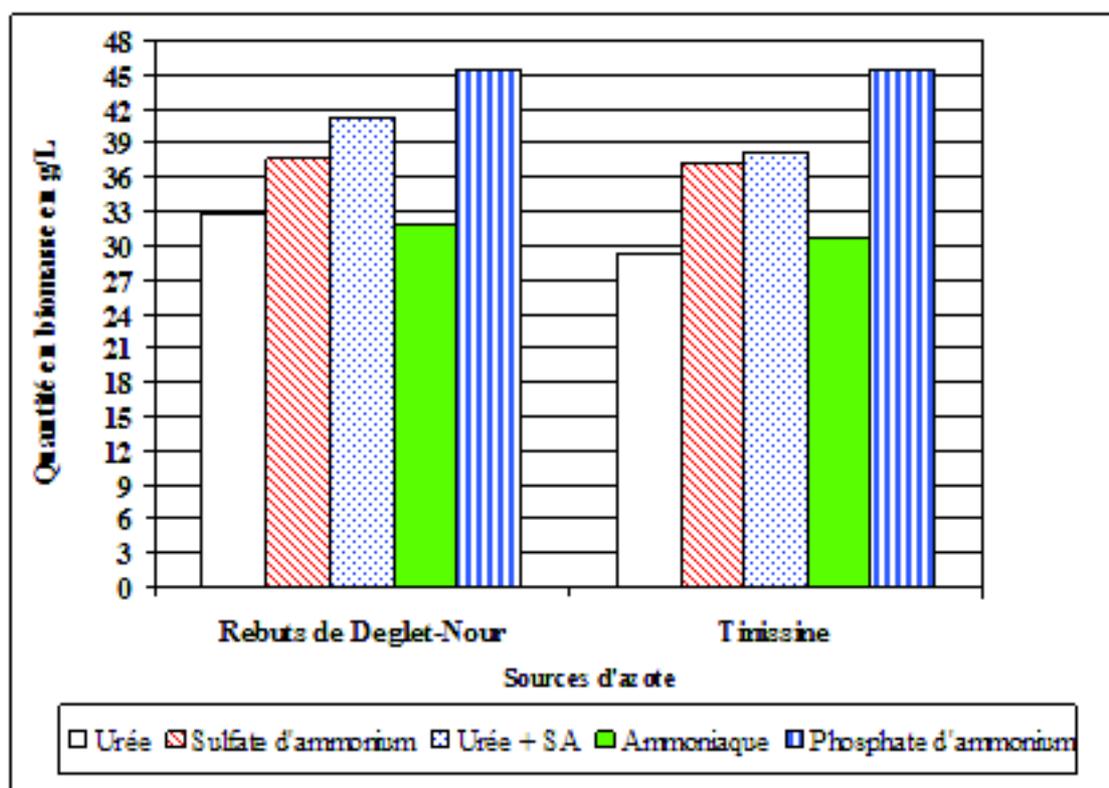


Figure 13 : Evolution de la biomasse sèche en fonction de la source azotée.

Des résultats similaires ont été obtenus par Ammouche (1979) avec *Hansenula polymorpha* cultivée sur méthanol. Enfin, la forte variation du pH observée au cours de la fermentation avec l'ammoniaque est peut être responsable de la chute des quantités en biomasse obtenues avec cette source d'azote. A ce propos, Reed et Pepler (1973) conseillent la fixation de la valeur du pH entre 4.5 et 5.0 durant toute la durée de la fermentation.

b/ Influence de la source azotée sur le rendement net

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de l'urée et de l'ammoniaque comme sources azotées donnent des rendements nets faibles soient 37.0 - 39.94 % et 43.29 - 41.74 %, respectivement par rapport aux autres sources d'azote (tableau 24).

Tableau 24 : Evolution du rendement net suivant la source azotée.

Substrat	Urée	Sulfate d'ammonium	50 % d'urée + 50 % de S.A	Ammoniaque	Phosphate d'ammonium
Tinissine	37.86	48.10	49.65	39.94	58.78
Rebut de Deglet-Nour	43.29	49.41	54.26	41.71	59.66

S.A: Sulfate d'ammonium

Ainsi, l'utilisation du sulfate d'ammonium, urée à 50 - 50 % et du phosphate d'ammonium donnent des rendements nets élevés soient 49.65 - 54.26 % et 58.78 - 59.66 %, respectivement et plus particulièrement avec le cultivar, Deglet-Nour.

Par conséquent, on peut dire qu'avec le milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et en présence du sulfate d'ammonium, urée et du phosphate d'ammonium comme sources azotées, une conversion maximale des sucres en substances cellulaires est notée. Des résultats similaires ont été rapportés par Ejiófor *et al.* (1994); Layokun *et al.* (2006); Miskiewicz et Borowiak (2005); Win *et al.* (1996).

c/ Influence de la source azotée sur la force de levée

Les résultats obtenus montrent que les sources azotées et plus particulièrement le sulfate d'ammonium, l'urée et le sulfate d'ammonium à 50 - 50% et l'ammoniaque n'ont pas d'effet sur la force de levée de la levure boulangère. Les forces de levée obtenues avec ces sources d'azote varient entre 1415 et 1540 ml de CO₂ (tableau 25).

Tableau 25 : Force de levée de la levure boulangère suivant la source azotée.

Substrat	Urée	Sulfate d'ammonium	50 % d'urée + 50 % de S.A	Ammoniaque	Phosphate d'ammonium
Tinissine	1525	1510	1540	1535	1316
Rebuts de Deglet-Nour	1428	1415	1444	1430	1116

Toutefois, l'utilisation du phosphate d'ammonium comme source azotée réduit légèrement la force de levée, soit 1116 à 1316 ml de CO₂. Cette baisse est probablement liée à un excès de phosphore dans le milieu de culture. A cet effet, Reeds et Pepler (1973), signalent qu'un excès du phosphore peut provoquer une chute de la force boulangère de la levure d'où dépréciation de sa qualité.

2-5- Influence de la source vitaminique sur le rendement en biomasse et la force de levée

La levure boulangère a besoin de plusieurs vitamines (biotine, thiamine, panthothénate de calcium...etc.) pour sa croissance et plus particulièrement la biotine. Ainsi, un gramme de levure contient approximativement 0.75 à 2.5 ppm de biotine et la quantité de cette vitamine requise est de 1.0 ppm pour une croissance optimale de *Saccharomyces cerevisiae* (Reed et Pepler, 1973). En général, la biotine participe à la synthèse de protéines et d'acides aminés, et dans la formation des polysaccharides et d'acides gras. Selon Dixon et Rose (1964), la déficience du milieu de culture en biotine peut provoquer une destruction de la membrane cytoplasmique de la cellule de *Saccharomyces cerevisiae*.

a/ Influence de la teneur en biotine sur la quantité en biomasse, le rendement net et la force de levée

Les résultats obtenus montrent que la biotine apportée n'a aucun effet sur les quantités de biomasses produites et ceci quelle que soit la teneur de cette dernière. Ainsi, les quantités de biomasse obtenues sont de 109.4 - 112.3 g/L de M.F et 38.3 - 39.3 g/L de M.S sur milieu à base de Tinissine et 118.1 - 124.2 g/L de M.F et 40.5 - 42.2 g/L de M.S sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour (tableau 26).

Tableau 26 : Quantité en biomasse, rendement net et force de levée.

Valorisation biotechnologique des dattes de faible valeur marchande par la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase

Paramètres		Quantité de biomasse en g/L de M.F	Quantité de biomasse en g/L de M.S	Rendement net en %	Force de levée en ml de CO ₂
Tinissine	Témoin 2	109.40	38.07	48.76	1540
	4 mg/L	109.80	38.12	49.05	1639
	6 mg/L	109.80	38.12	49.05	1639
	8 mg/L	109.80	38.12	49.05	1639
Rebuts de Deglet-Nour	Témoin 2	118.10	40.1	48.76	1444
	4 mg/L	120.30	41.2	55.45	1655
	6 mg/L	120.30	41.2	55.45	1655
	8 mg/L	120.30	41.2	55.45	1655

Par conséquent, on peut a priori dire qu'il n'est pas nécessaire d'apporter de la biotine au milieu de fermentation à base de dattes pour améliorer les rendements. Ceci est probablement lié à la richesse de ces deux milieux de culture en biotine. Concernant, le rendement net, les résultats obtenus montrent que l'ajout de biotine au milieu de culture n'a aucun effet. Ainsi, le rendement net obtenu varie entre 48.76 et 55.45 %. Pour ce qui est de la force de levée, les résultats obtenus montrent qu'au-delà d'une quantité de biotine de 4.0 mg/L, il y'a amélioration de la force de levée qui passe de 1444 à 1639 ml de CO₂ pour le substrat à base de rebuts de Deglet-Nour et de 1540 à 1655 ml de CO₂ pour le substrat à base de Tinissine. Enfin, les levures cultivées sur substrat à base de Tinissine présentent des forces de levée meilleures, soient 1540 à 1655 ml de CO₂ par rapport à celles cultivées sur substrat à base de Rebuts de Deglet-Nour, soient 1444 à 1639 ml de CO₂ et ceci quelle que soit la quantité de biotine ajoutée au milieu de culture.

b/ Influence de la teneur en pantothénate de calcium sur la quantité en biomasse, le rendement net et la force de levée

Les résultats obtenus montrent que le pantothénate de calcium n'a aucun effet sur les quantités de biomasses produites et ceci quelle que soit la teneur de cette dernière. Ainsi, les quantités de biomasse obtenues varient de 109.4 à 112.5 g/L de M.F et 37.6 à 38.9 g/L de M.S sur milieu à base de Tinissine et 118.1 à 120.5 g/L de M.F et 40.1 à 41.0 g/L de M.S sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour (tableau 27).

Tableau 27 : Quantité de biomasse, rendement net et force de levée.

Paramètres		Quantité de biomasse en g/L de M.F	Quantité de biomasse en g/L de M.S	Rendement net en %	Force de levée en ml de CO ₂
Tinissine	Témoin 1	109.40	37.6	48.76	1540
	2 mg/L	108.80	37.9	48.94	1540
	3 mg/L	109.80	38.12	49.05	1639
	4 mg/L	109.80	38.12	49.05	1639
Rebuts de Deglet-Nour	Témoin 1	118.10	40.1	48.76	1444
	2 mg/L	118.00	40.3	49.05	1639
	3 mg/L	119.30	40.65	52.76	1655
	4 mg/L	118.00	40.3	49.05	1639

Il en est de même pour le rendement net et la force de levée ou les résultats obtenus montrent que le pantothénate de calcium apporté n'a aucun effet et ceci quelle que soit la teneur de cette dernière. Ainsi, le rendement net et la force de levée varient de 48.48 à

50.46 % et 1530 à 1546 ml de CO₂, respectivement sur milieu à base de Tinissine et 52.76 à 53.94 % et 1423 à 1449 ml de CO₂, respectivement sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour. Ceci est probablement lié à la richesse de ces milieux de culture en cette vitamine.

Ainsi, Reed et Pepler (1973) ont montré qu'une quantité de 40 µg de panthothénate de calcium par g de levure sèche est suffisante pour obtenir un rendement maximal.

c/ Influence de la teneur en thiamine sur la quantité en biomasse, le rendement net et la force de levée

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de thiamine améliore d'une manière nette les rendements en biomasse. A cet effet, les quantités en biomasse sèche obtenues avec une teneur en thiamine de 0.6 mg/L sont 39.85 g/L sur milieu à base de Tinissine et 43.52 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour (tableau 28).

Tableau 28 : Quantité en biomasse, rendement net et force de levée

Paramètres		Quantité de biomasse en g/L de M.F	Quantité de biomasse en g/L de M.S	Rendement net en %	Force de levée en ml de CO ₂
Tinissine	Témoin 0.2 mg/L	109.40	38.30	34.95	1530.00
	0.4 mg/L	112.37	38.12	33.95	1546.00
	0.6 mg/L		39.85	35.20	1552.00
	0.8 mg/L		40.25	36.80	1549.00
			41.70	39.85	1556.00
Rebuts de Deglet-Nour	Témoin 0.2 mg/L	118.10	43.52	36.80	1448.00
	0.4 mg/L	120.50	44.20	36.65	1452.00
	0.6 mg/L		45.80	38.75	1458.00
	0.8 mg/L		46.25	39.15	1468.00
			47.20	39.95	1478.00

Aussi, les quantités en biomasse et les rendements nets obtenus avec des teneurs en thiamine de 0.6 et 0.8 mg/L, sont de 117.20 - 118.1 g/L de MF, 39.85 - 40.25 g/L de MS et 51.7 -

52.2 %, respectivement sur milieu à base de Tinissine et 128.0 - 130.2 g/L de M.F et 43.5 - 44.2 g/L de M.S et 57.2 - 58.3 %, respectivement sur milieu à base de Rebuts de Deglet-Nour. Par conséquent, on peut dire que la thiamine apportée à une teneur de 0.6 mg/L améliore légèrement, les quantités en biomasses produites et les rendements nets. Concernant, la force de levée, les résultats obtenus montrent que la thiamine n'a aucun effet. En outre, on peut dire que *Saccharomyces cerevisiae* peut s'adapter partiellement au manque de thiamine dans le milieu de culture. Toutefois, en levurerie l'ajout de thiamine au milieu de fermentation est fréquent et est souhaitable. A cet effet, Reed et Pepler (1973) ont montré qu'une quantité de 15 ppm de thiamine dans le milieu de fermentation est suffisante pour avoir une croissance optimale de la levure.

3- Optimisation de la production en biomasse avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* DB

Dans cet essai nous avons utilisé les rebuts dattes de Deglet-Nour comme substrat. L'optimisation du processus de fabrication de la levure boulangère dépend du choix de la souche, de la teneur en phosphore, de la nature et de la teneur de la source azotée (**Chen et Chiger**, 1985; **Reed et Nagodawithana**, 1991).

3-1- Effet du taux de dilution

La culture en Fed-Batch s'est déroulée sur une période de 12 h avec un volume utile de 1.5 litres. Dans cet essai, on a utilisé l'urée comme source azotée. Sous ces conditions expérimentales, nous remarquons que la quantité en biomasse sèche augmente au fur et à mesure que le taux de dilution augmente jusqu'à un maximum de 0.22 h^{-1} . Ainsi, la quantité en biomasse sèche optimale obtenue est de 34.54 g/L . Au-delà, la quantité en biomasse sèche diminue pour atteindre 20.1 g/L avec un taux de dilution de 0.30 h^{-1} (figure 14).

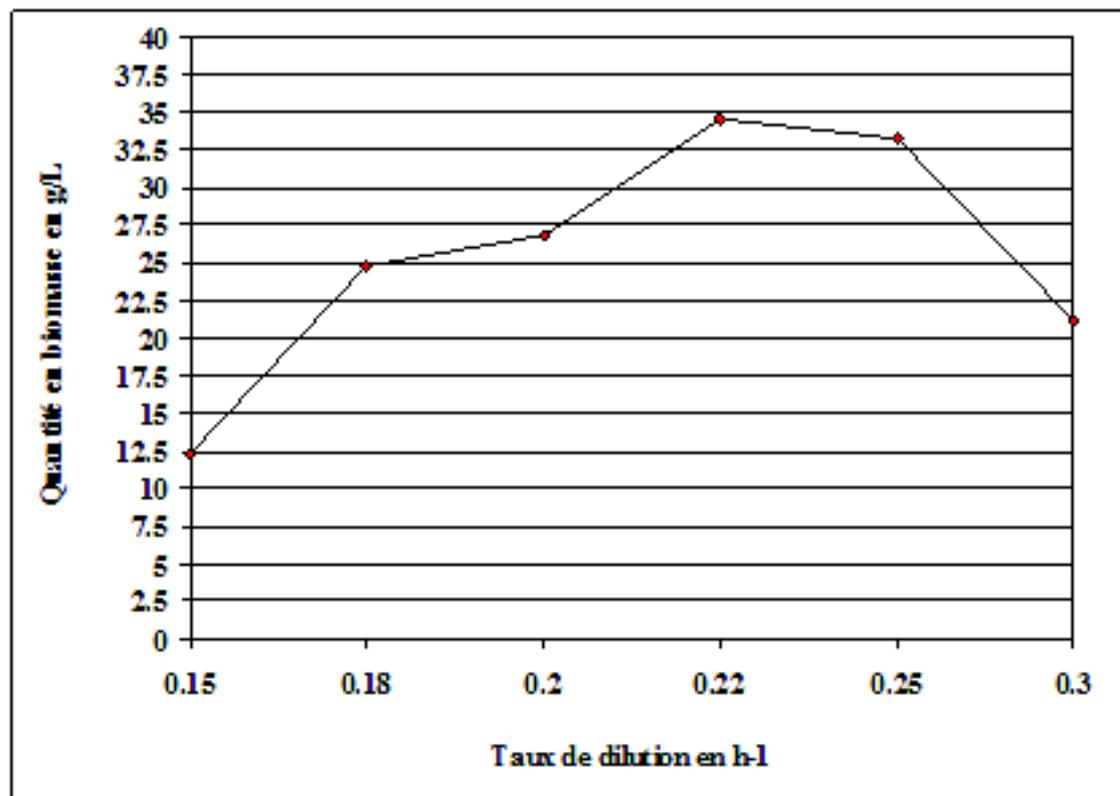


Figure 14 : Evolution de la quantité en biomasse sèche suivant le taux de dilution.

Ainsi, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un taux de dilution de 0.22 h^{-1} . Ce dernier est similaire à celui appliqué par Daramola et Zampraka (2008); Ejiolor et al. (1996); Reed et Pepler (1973) soient 0.20 à 0.22 h^{-1} . Toutefois, Akinyeam et al. (2003); Miskiewicz et Borowiak (2005) ont obtenu de meilleurs rendements avec des taux de dilution inférieurs à 0.15 h^{-1} . Par contre, Gueguim-Kana et al. (2007); Kristiansen (1994); Shashi et Joshi 2006; Van-Hoeket al. (1998) ont obtenu de meilleurs rendements à des taux de dilution

variant entre 0.24 et 0.28 h⁻¹. Selon Van-Hoeket *al.* (1998), aux taux de dilution au-dessous de 0.28 h⁻¹, le métabolisme du glucose est entièrement respiratoire et une absence de production d'alcool a été notée avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae* DS28911.

Par ailleurs, selon Cannizaro *et al.* (2004), à des taux de dilution élevés (supérieur à 0.28 h⁻¹), le rendement en biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* diminue d'une manière notable due à la production d'éthanol. Ainsi dans notre étude, une diminution nette du rendement d'où limitation de la vitesse de croissance a été notée au taux de dilution de 0.30 h⁻¹. Par ailleurs, aux taux de dilution faibles, inférieurs à 0.18 h⁻¹, la totalité des sucres présents dans les milieux de culture sont consommés soit une teneur en sucres résiduaire nulle. Par contre, au delà d'un taux de dilution de 0.22 h⁻¹, la teneur en sucres résiduaire augmente dans le fermenteur pour atteindre un maximum de 3.15 % avec un taux de dilution de 0.30 h⁻¹ (tableau 29).

Tableau 29 : Evolution de la quantité en biomasse sèche et de la teneur en sucres résiduaire suivant le taux de dilution

Taux de dilution	Quantité en biomasse en g/L	Sucres résiduaire en %
0.15 h ⁻¹	12.35	0.00
0.18 h ⁻¹	24.78	0.00
0.20 h ⁻¹	26.86	0.20
0.22 h ⁻¹	34.54	0.21
0.25 h ⁻¹	33.22	2.10
0.30 h ⁻¹	21.18	3.15

Ainsi, l'efficacité chimique diminue avec l'augmentation de la teneur en sucres et au-delà d'un taux de dilution de 0.30 h⁻¹, la plus grande partie de sucres présents dans le milieu a été fermenté par voie éthanolique. A cet effet, Van-Hoeket *al.* (1998) ont noté une production accrue d'alcool soit 25.3 mmol d'éthanol/g de biomasse sèche/h au delà d'un taux de dilution de 0.40 h⁻¹. De même Cannizaro *et al.* (2004) ont noté une diminution du rendement en biomasse de la levure boulangère due à la production d'éthanol à des taux de dilution élevés supérieurs à 0.30 h⁻¹.

3-2- Effet de la source azotée

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de l'urée comme source d'azote donne une quantité et un rendement en biomasse faibles par rapport aux autres sources d'azote soient 34.54 g/L et 43.77 %, respectivement. Par contre, les plus élevés ont été obtenus avec le sulfate d'ammonium, le sulfate d'ammonium urée à 50 - 50 % et le phosphate d'ammonium soient 40.22, 40.54, 47.23 g/L et 50.82, 51.44, 59.48 %, respectivement (figure 15).

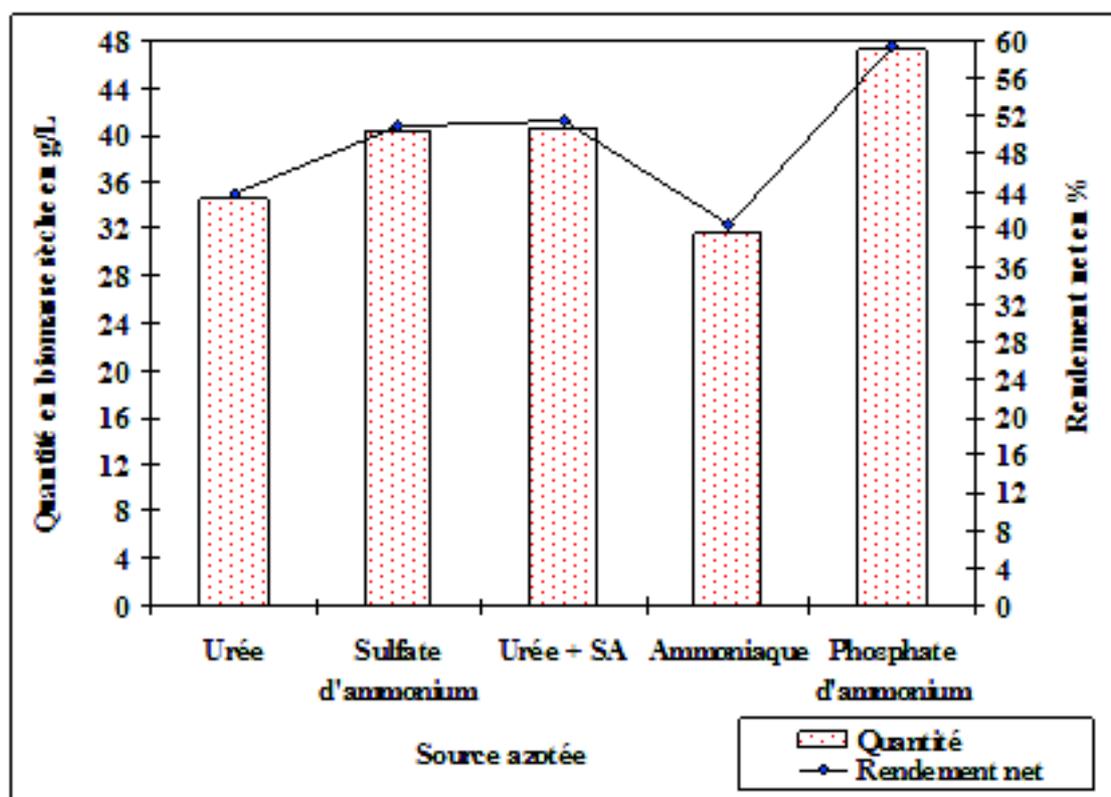


Figure 15 : Evolution de la quantité et du rendement en biomasse suivant la source azotée

Ainsi, en présence de ces trois sources d'azote, il y a une tendance à l'amélioration des quantités en biomasse sèches de plus de, 16.4, 17.3 et 36.7 %, respectivement, en plus de l'accélération de la croissance cellulaire par rapport à l'urée. Des résultats similaires ont été rapportés par Ejifor *et al.* (1994); Layokun *et al.* (2006); Miskiewicz et Borowiak (2005); Win *et al.* (1996). L'amélioration du rendement obtenu avec le phosphate d'ammonium est probablement liée à l'apport du phosphore en quantité appréciable indispensable au développement des levures. Ainsi, selon Reed et Pepler (1973), il faut au moins une part de P_2O_5 pour trois parts de NH_2 consommée. Cette source d'azote est intéressante car le phosphore apporté participe à la structure des acides nucléiques et des protéines des constituants pondéralement importants de la cellule de *Saccharomyces cerevisiae* (Reed et Pepler 1973). Toutefois, cette source d'azote est coûteuse par rapport à l'urée et au sulfate d'ammonium. En ce sens, on recommande l'utilisation de l'urée et du sulfate d'ammonium à 50 % - 50 % pour la production de la levure boulangère. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'utilisation du phosphate d'ammonium comme source azotée réduit légèrement la force de levée soit 1032.0 ml de CO_2 par rapport aux autres sources d'azote soient 1250.0 - 1312.0 ml de CO_2 (tableau 30).

Tableau 30 : Evolution de la quantité en biomasse, rendement net et force de levée suivant la source azotée.

Source azotée	Urée	Sulfate d'ammonium	50 % d'urée + 50 % de S.A	Ammoniaque	Phosphate d'ammonium
Quantité de biomasse en g/L de MS	34.54	40.22	40.54	31.64	47.23
Sucres résiduaire en %	0.21	0.18	0.22	0.25	0.16
Rendement net en %	43.77	50.82	51.44	40.30	59.48
Force de levée en ml de CO ₂	1250.0	1278.00	1312.00	1260.00	1032.00

Cette baisse de la qualité de la levure est probablement liée à un excès de phosphore dans le milieu de culture. A cet effet, Reeds et Pepler (1973), signalent qu'un excès de phosphore peut provoquer une chute de la force boulangère de la levure d'où dépréciation de sa qualité.

3-3- Effet de la source vitaminique

Concernant la source vitaminique, les résultats obtenus montrent que la biotine apportée n'a aucun effet sur les quantités et rendements en biomasse et ce quelle que soit la teneur de cette dernière. Ainsi, ces derniers varient entre 40.00 - 42.22 g/L et 50.76 - 53.17 %, respectivement (tableau 31).

Tableau 31 : Evolution de la quantité en biomasse, rendement net et force de levée suivant la source vitaminique.

Paramètres		Quantité en biomasse en g/L de M.S	Teneur en sucres résiduaire en %	Rendement net en %	Force de levée en ml de CO ₂
Biotine	Témoin	40.54	0.21	43.77	1250.0
	2 mg/l	40.00	0.22	42.22	1260.00
	4 mg/l	41.05	0.20	41.64	1312.00
	6 mg/l	40.22	0.18	50.82	1278.00
Panthothénate de calcium	Témoin	40.54	0.21	43.77	1250.0
	1 mg/l	39.67	0.20	41.28	1222.00
	2 mg/l	40.78	0.20	41.65	1260.00
	3 mg/l	41.44	0.19	42.22	1278.00
Thiamine	Témoin	40.54	0.21	43.77	1250.0
	0.2 mg/L	40.26	0.22	42.22	1260.00
	0.4 mg/L	45.22	0.20	41.28	1222.00
	0.6 mg/L	45.22	0.19	42.22	1278.00

Pour ce qui est de la force de levée, les résultats obtenus montrent qu'au-delà d'une quantité de biotine de 4 mg/L, il y'a amélioration de la force de levée qui passe de 1312 à 1488 ml de CO₂. Par ailleurs, l'ajout de panthothénate de calcium n'a aucun effet sur les quantités, rendements en biomasse et la force de levée et ces derniers varient entre 39.67 - 41.44 g/L, 50.21 – 53.00 % et 1222.00 - 1325.00 ml de CO₂, respectivement. Quant à la thiamine, l'ajout de 0.6 mg/L au milieu de fermentation améliore sensiblement la quantité et le rendement en biomasse ainsi que la force de levée soient 45.22 g/L, 57.67 % et 1405.00

ml de CO₂, respectivement par rapport au témoin soient 40.54 g/L, 51.44 % et 1312.00 ml de CO₂, respectivement.

Ainsi, on peut dire que l'ajout de biotine et du panthothénate de calcium au milieu de culture n'ont aucun effet significatif sur le rendement en levure boulangère. Ceci est probablement lié à la richesse des rebuts de dattes en ces vitamines. Des résultats similaires ont été obtenus par Al-Obaidi *et al.* (1987) sur milieu à base de dattes. Toutefois avec la thiamine, une légère amélioration du rendement a été notée et la teneur optimale requise est de 0.6 mg/L.

Chapitre-III : Production d'éthanol

3-1- Evolution de la productivité en éthanol

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour la production d'éthanol est la souche ATCC 1102 et le substrat utilisé est constitué de rebuts de dattes produits par Deglet-Nour.

3-1-1- Evolution de la biomasse et du pH

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* tolèrent généralement de fortes concentrations en éthanol. Les résultats obtenus montrent que le pH diminue au cours de la fermentation et il passe de 5.1 à 3.45 au bout de 84 h de fermentation. Par contre, la quantité en biomasse augmente et elle passe de 1.9 à 6.35 g/L au bout de 84 h (tableau 32).

Tableau 32 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduels et teneur en éthanol au cours de la fermentation.

Temps de fermentation en heures	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduels en g/L	Teneur en éthanol en g/L
0	5.10	1.90	180.00	0.00
12	4.32	2.80	123.2	49.0
24	3.87	4.86	80.0	62.0
36	3.87	5.46	62.5	78.0
48	3.90	6.00	41.8	91.0
60	3.97	6.10	28.1	104.0
72	3.50	6.20	5.1	118.0
84	3.45	6.35	4.2	118.0

Des résultats similaires ont été obtenus par Kongkiattikajorn *et al.* (2007); Touzi (1997) sur milieux à base de Glucose + Xylose et déchets de dattes. La quantité en biomasse obtenue dans cette étude est supérieure à celle indiquée par Wen-Chien et Cheng-Ta (1995) soit

3.5 g/L.

3-1-2- Production d'éthanol et consommation des sucres

La figure 16 montre que la teneur en sucres diminue au fur et à mesure que la production d'éthanol augmente pour atteindre 4.2 g/L au bout de 84 h de fermentation.

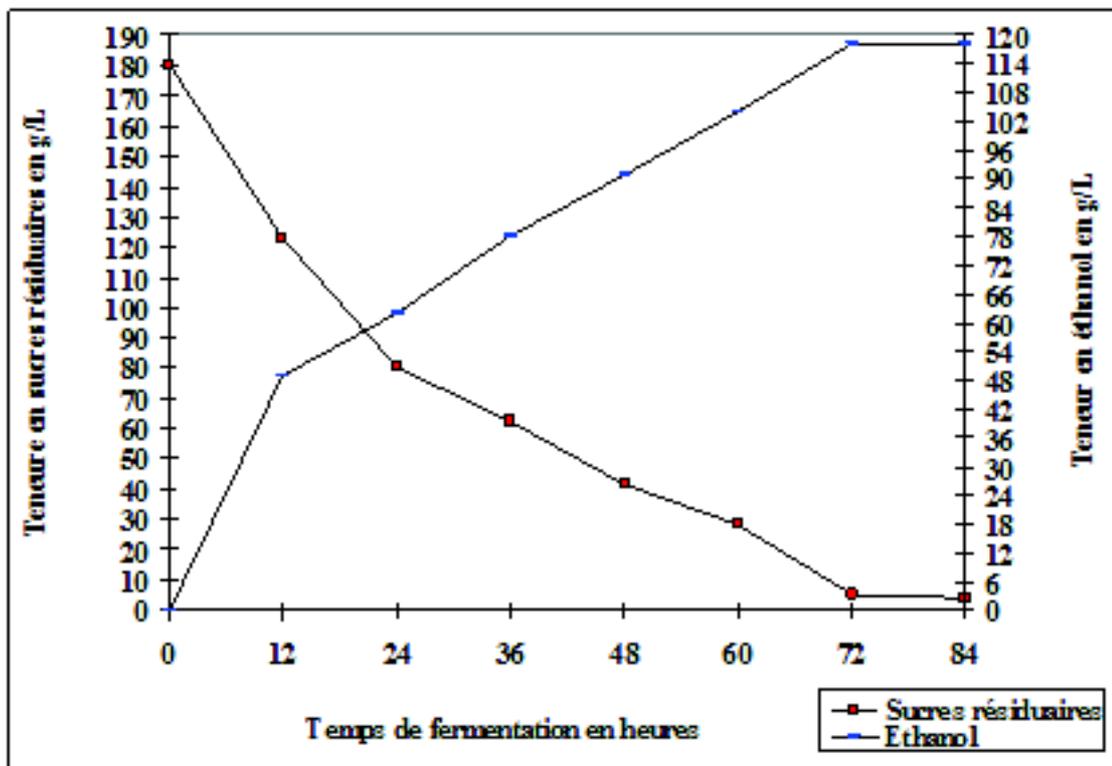


Figure 16 : Evolution de la quantité en sucres et en éthanol au cours de la fermentation

Des résultats similaires ont été obtenus par Caceres-Farfan *et al.* (2008; Grote and Rogers (1985); Kongkiattikajorn *et al.* (2007) soit une teneur en sucres résiduels en fin de fermentation de 4.0 à 6.2 g/L. En outre, la production en éthanol évolue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre 62.0 g/L en 24 h puis 91.0 g/L en 48 h pour se stabiliser à 118.0 g/L au delà de 72 h. Selon, Dombek et Ingram (1987), durant la période de croissance (durant les premières 18 h), il y a une faible accumulation de l'éthanol soit une teneur inférieure à 50.0 g/L.

La teneur en éthanol obtenue dans cette étude est supérieure à celles indiquées par Ayogu (1999); Caylack et Vardar Sukan (1998); Kim *et al.* (1992); Kiransree *et al.* (2000); Kongkiattikajorn *et al.* (2007); Mehaia (1991); Moriya *et al.* (1989); Nonus et Miniac (1985); Pandey et Agarwal (1993); Patil et Patil (1989); Pramanik (2003); Phowchinda (1999); Touzi (1997) variant entre 65.0 et 107.0 g/L. Toutefois, cette teneur est similaire à celle obtenue par Araque *et al.* (2008); Bandaru *et al.* (2007); Dombek et Ingram (1987) soit 118.0 à 122.0 g/L.

Dans cette étude la durée optimale pour une production maximale en éthanol est de 72 h. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Pramanik et Eswar-Rao (2005); Araque *et al.* (2008) ou la meilleure période de fermentation est de 72 h et où près de 97.0 % de sucres contenus dans le milieu de culture sont consommés. Toutefois, Cazetta *et al.* (2007) ont obtenu une teneur optimale en éthanol durant 48 h en utilisant une souche de *Zymomonas mobilis*. Enfin, Pramanik (2003) ont obtenu des teneurs en éthanol inférieures soient 93.0 à 102.0 g/L durant une période de fermentation plus longue soit 96 à 105 h.

3-2- Influence de la quantité en inoculum sur la production d'éthanol

Dans les réactions de fermentation, la quantité en inoculum est très importante afin d'obtenir une production maximale en éthanol en un minimum de temps. Les résultats obtenus montrent que le pH varie entre 3.00 et 3.37 (tableau 33).

Tableau 33 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduaire, quantité d'alcool et du rendement de métabolisation suivant la quantité en inoculum.

Quantité d'inoculum en ml/L	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduaire en g/L	Teneur en éthanol en g/L	Rendement de métabolisation en %
10 ml/l (1 %)	3.35	2.15	64.5	62.4	54.02
20 ml/l (2 %)	3.15	3.10	32.6	83.6	56.71
30 ml/l (3 %)	3.00	4.20	5.0	118.3	67.60
40 ml/l (4 %)	3.20	4.80	5.5	130.0	74.50
50 ml/l (5 %)	3.37	6.20	3.0	130.0	73.44
60 ml/l (6 %)	3.20	6.80	3.4	130.0	73.61
100 ml/l (10 %)	3.30	10.00	3.6	130.0	73.70

Pour ce qui est de la teneur en sucres résiduaire, on constate qu'avec une quantité d'inoculum supérieure ou égale à 4 % (w/v), plus de 97.2 % de sucres contenus dans le milieu de fermentation sont consommés par la levure alors qu'avec une quantité d'inoculum de 1% (w/v) uniquement 64.4 % de sucres qui sont consommés. Un résultat similaire a été signalé par Pramanik (2003). Quant à la quantité en biomasse, cette dernière augmente au fur et à mesure que la quantité en inoculum utilisée augmente.

Ainsi, la quantité en biomasse passe de 2.15 g/L pour une quantité en inoculum de 1.0 % à 10.0 g/L pour une quantité en inoculum de 10.0 %. Enfin, la teneur en éthanol et le rendement de métabolisation augmentent au fur et à mesure que la quantité en inoculum augmente pour se stabiliser au-delà de 4 % (w/v). Ainsi, la teneur en éthanol et le rendement de métabolisation obtenus peuvent atteindre des valeurs de 130.0 g/L et 74.50 %, respectivement en utilisant une quantité d'inoculum supérieure ou égale à 4 % (w/v). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Caceres-Farfan *et al.* (2008; Damore *et al.* (1989); Fadel et Foda (2001); Nanba *et al.* (1987); Patil et Patil (1990). Par contre, Siva-Kissava *et al.* (1995) ont obtenu de meilleurs rendements en éthanol avec une quantité en inoculum de 15.0 % (w/v).

3-3- Influence des différents substrats sur la production d'éthanol

Les résultats obtenus montrent que le pH en fin de fermentation est sensiblement plus élevé avec le substrat à base de saccharose soit 4.35 par rapport aux substrat à base de dattes. Quant à la teneur en sucres résiduaire, cette dernière est plus élevée dans les milieux à base de saccharose et de mélasse soit 11.5 - 14.5 g/L par rapport aux milieux à base de dattes soit 4.9 - 6.9 g/L (tableau 34).

Tableau 34 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduaire, teneur en éthanol et rendement de métabolisation suivant les différents substrats.

Substrats	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduelles en g/L	Teneur en éthanol en g/L	Rendement de métabolisation en %
Rebut de DN	3.00	6.80	5.5	130.0	74.50
Tinissine	3.20	6.20	6.4	131.0	75.46
Ghars	3.54	7.10	6.9	120.0	69.32
Degla-Beida	3.47	7.00	6.4	133.0	76.61
Tantboucht	3.60	6.85	4.9	118.0	67.39
Mélasse	4.00	4.45	11.5	100.0	58.44
Saccharose	4.35	3.22	14.5	92.0	55.58

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Essia-Ngang *et al.* (1992); Oranut (1999); Salmon et Mauricio (1994). Par ailleurs, la quantité en biomasse est élevée pour les substrats à base de dattes soit 6.20 à 7.10 g/L et faible pour les substrats à base de saccharose et de mélasse soient 3.22 et 4.45 g/L, respectivement. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Patil et Patil (1989) à savoir une quantité de biomasse de 4.3 à 6.65 g/L. Pour ce qui est de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation, les résultats obtenus montrent que les substrats à base de dattes riches en glucose et fructose donnent des teneurs en éthanol et des rendements de métabolisation élevés variant entre 118.0 - 133.0 g/L et 67.39 - 76.6 %, respectivement par rapport au saccharose et à la mélasse (riche en saccharose) soient 92.0 - 100.0 g/L et 55.58 - 58.44 %, respectivement (figure 17).

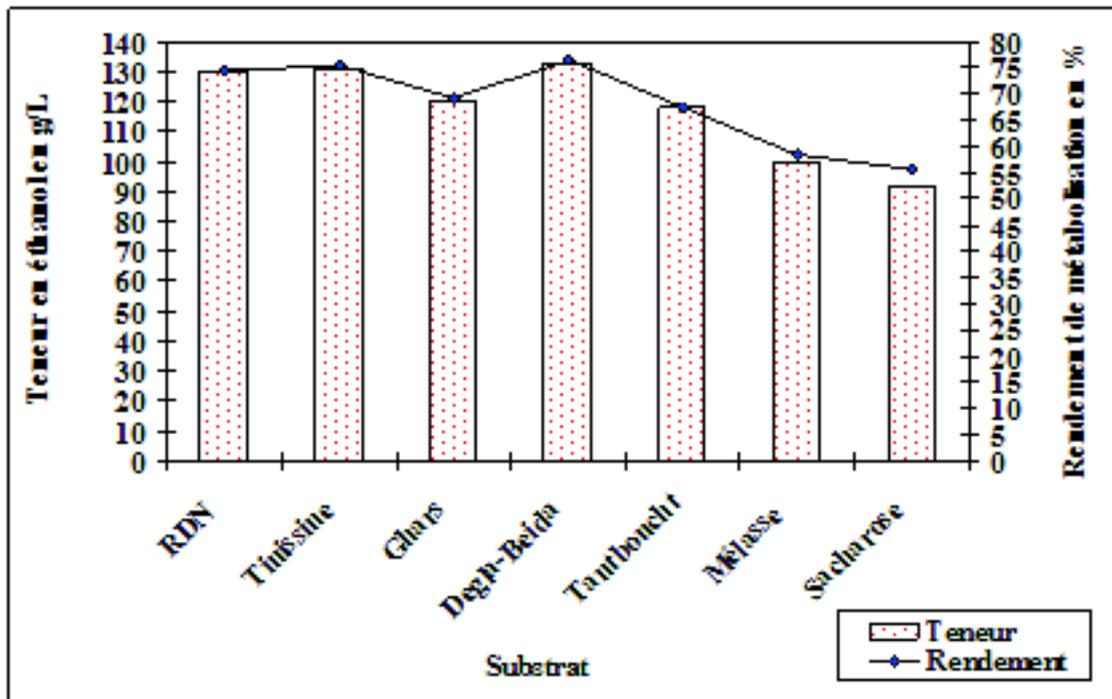


Figure 17 : Evolution de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation suivant les différents substrats.

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux de Abdel-Fattah *et al.* (1984); Kongkiattikajorn *et al.* (2007); Phowchinda (1999) qui ont obtenu un rendement élevé en éthanol avec le milieu à base de glucose et de fructose.

3-4- Influence des différents souches de *Saccharomyces cerevisiae* sur la production d'éthanol

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH, la plus faible a été obtenue avec la souche ATCC 1102 soit 3.0 et la plus élevée avec la souche HDN1 soit 4.9 (tableau 35).

Tableau 35 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduaux, teneur en éthanol et rendement de métabolisation suivant les différentes souches.

Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduaux en g/L	Teneur en éthanol en g/L	Rendement de métabolisation en %
ATCC1102	3.0	6.2	5.5	130.0	74.50
HDN1	4.9	13.50	19.0	87.3	54.22
HDN2	3.5	15.40	49.8	92.7	71.20
DB1	3.9	17.90	60.0	75.6	63.00
DB	3.7	6.3	6.4	131.0	75.46
TTB	4.7	12.40	18.2	97.0	59.95
HW	4.8	6.40	17.9	117.5	72.48
ELK	4.24	7.17	9.8	103.5	60.81
TISB	4.55	8.00	11.5	109.0	64.69

Quant à la quantité de biomasse, on constate que les souches TTB, HDN1, HDN2 et DB1 donnent des quantités élevées soient 12.4, 13.50, 15.40 et 17.90 g/L, respectivement par rapport aux souches ATCC 1102, DB et HW soient 6.2, 6.3 et 6.4 g/L, respectivement. D'autre part, les souches DB et HW produisent des vins ayant des teneurs en alcool et des rendements de métabolisation élevés variant entre 117.5 - 131.0 g/L et 72.48 - 75.46 %, respectivement comparables à ceux de la souche ATCC 1102 soient 130.0 g/L et 74.50 %, respectivement (figure 18).

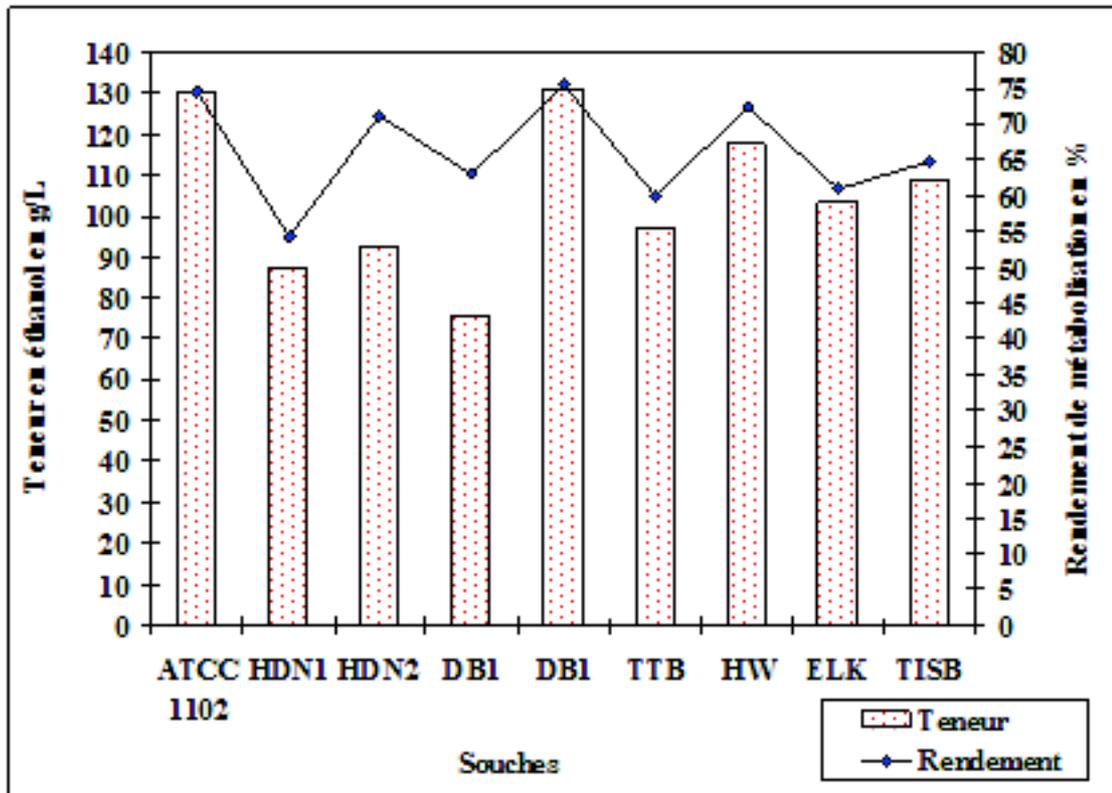


Figure 18 : Evolution de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation suivant les différentes souches.

Par ailleurs, la souche DB donne les meilleurs résultats à savoir un pH de 3.7, une quantité de biomasse sèche de 6.3 g/L, une teneur en sucres résiduels de 6.4 g/L, une teneur en éthanol de 131.0 g/L et un rendement de métabolisation de 75.46 % comparables à ceux de la souche ATCC 1102. Des résultats similaires ont été obtenus par Hayshida et Ohta (1981) en utilisant plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Par ailleurs, Morimura *et al.* (1997) ont obtenu de meilleurs résultats avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* K211 par rapport à la souche KF-7. D'autre part, Patil et Patil (1989) ont obtenu de meilleurs résultats avec les souches de *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3509, NCIM 3526, NCIM3286 par rapport aux souches NCIM 3107 et NCIM 3186. De même, Fadel et Foda (2001); Kiransree *et al.* (2000); Moriya *et al.* (1989); ont obtenu de meilleurs résultats avec les souches de *Saccharomyces cerevisiae* SH, A1; VS, VS3 et M-9 par rapport aux souches F111, F4, F25; VS2, VS4 et H-1, W-9.

En outre, la quantité en éthanol de 131.0 g/L obtenue avec la souche DB est comparable à celle obtenue par Douglas et Munnecke (1981); Poosaran *et al.* (1985); Sachde (1981) variant entre 128.0 et 133.0 g/L en utilisant des souches à haute tolérance vis-à-vis de l'éthanol telle que *Zymomonas mobilis*. D'autre part, Al-Ogaidi (1988) a obtenu une teneur en éthanol plus élevée soit 141.0 g/L en utilisant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée à partir des dattes irakiennes. Enfin, Araque *et al.* (2008) ont obtenu des rendements en éthanol élevés soit 76.0 % avec des souches de *Saccharomyces cerevisiae* (IR2, IX, L9 et SO613) thermo tolérantes (résistantes aux températures \geq à 40 °C).

3-5- Influence de la teneur en sucres sur la production d'éthanol

La teneur initiale en sucres du milieu est très importante car elle conditionne la teneur en éthanol en fin de fermentation.

Les différentes fermentations ont été menées avec des concentrations en sucres variant entre 100 et 350 g/L. Les résultats obtenus montrent que le pH en fin de fermentation est stable et il varie entre 3.0 et 3.5. Par contre, la quantité en biomasse obtenue augmente avec la teneur en sucres du milieu. Elle passe de 5.2 g/L pour une teneur en sucres de 10 - 12 % à 10.60 g/L pour une teneur en sucres de 30 - 35 % (tableau 36).

Tableau 36 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduels, teneur en éthanol et rendement de métabolisation suivant la teneur en sucres du milieu.

Teneurs en sucres du milieu de fermentation en %	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduels en g/L	Teneur en éthanol en g/L	Rendement de métabolisation en %
10 - 12	3.0	5.20	2.5	60.0	55.81 - 61.53
14 - 16	3.0	6.10	6.4	97.2	63.28 - 67.69
18 - 20	3.0	6.20	5.5	130.0	66.83 - 74.50
25 - 30	3.4	7.55	55.5	128.5	52.56 - 66.06
30 - 35	3.5	10.60	107.2	105.9	47.73 - 60.11

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Grote et Rogers (1985); Kiran-Sreea *et al.* (2000); Siva-Kissava *et al.* (1995). Concernant, la teneur en sucres résiduels, on constate qu'avec une teneur en sucres du milieu de 30 - 35 %, 35.7 % de sucres apportés ne sont pas consommés alors qu'avec une teneur de 18 - 20 %, uniquement 3.5 % de sucres apportés qui ne sont pas consommés. Il est à noter que la teneur en éthanol augmente avec la teneur en sucres du milieu de fermentation et elle passe de 60.0 g/L avec une teneur en sucres de 10 -

12 % à 130.0 g/L avec une teneur en sucres de 18 - 20 % pour chuter à 105.9 g/L avec une teneur en sucres supérieure à 30 %. Enfin, un rendement de métabolisation optimal soit 66.83 - 74.50 % a été obtenu avec une teneur en sucres du milieu de 18 - 20 %. Ces résultats concordent avec ceux de Abdel-Fattah *et al.* (1984); Cazetta *et al.* (2007); Grote et Rogers (1985); Monte Alegre *et al.* (2003); Moriya *et al.* (1989); Patil et Patil (1990); Pramanik (2003); Siva-Kissava *et al.* (1995) en utilisant des milieux de culture ayant une teneur en sucres de 18 à 21 %. Par ailleurs, Al-Ogaidi (1988); Atiyeh et Duvnjak (2002); Pramanik (2003); Limtong *et al.* (2007); Morimura *et al.* (1997) ont obtenu des teneurs en éthanol et des rendements de métabolisation élevés en utilisant des milieux de fermentation ayant une teneur en sucres de 22 à 25 %.

D'autre part, Bajpai et Margaritis (1985) ont obtenu des teneurs en éthanol élevées avec un milieu de fermentation ayant une teneur en sucres variant entre 26 et 28 %. Par contre, Kiran-Sreea *et al.* (2000); Mehaia (1991); Pandey and Agarwal (1993); Pramanik et Eswar-Rao (2005) ont obtenu de meilleurs résultats avec une teneur en sucres du milieu faible soit 14 - 15 %. Enfin, la chute de la production en éthanol obtenue avec une concentration élevée en sucres (≥ 30 %) est probablement liée à l'élévation de la pression osmotique qui est l'un des facteurs essentiels de synthèse du sorbitol (Bekers *et al.*, 2000; Cazetta *et al.*, 2007; Grubb and Mawson, 1993). D'autre part, à 35 ° C et à une teneur en sucres de la mélasse de 30 %, Cazetta *et al.* (2005) ont obtenu une production maximale en sorbitol avec *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Par ailleurs, selon Siva-Kissava *et al.* (1995); Pramanik

(2003), une teneur en sucres élevée conduit non seulement à un rendement faible en éthanol mais aussi à une période de fermentation plus longue.

3-6- Influence de la quantité en phosphate d'ammonium sur la production d'éthanol

La source d'azote est considérée comme l'un des éléments nutritifs responsables de la limitation du taux de fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*. La teneur maximale en éthanol produite au cours des différentes fermentations est étroitement liée à la quantité d'azote assimilable présente dans le milieu de culture (Bely *et al.*, 1990). Le phosphate d'ammonium est la meilleure source d'azote pour la production d'éthanol par rapport aux autres sources tels, le nitrate de potassium, le nitrate de sodium, le sulfate d'ammonium, l'urée...etc (Abdel-Fattah *et al.*, 1984; [Manginot *et al.*, 1998](#) ; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004). Les résultats obtenus montrent que le pH diminue au fur et à mesure que la quantité de phosphate d'ammonium ajoutée au milieu de fermentation devient plus importante. Ainsi, il passe de 4.15 avec une teneur en phosphate d'ammonium de 0.25 g/L à 3.0 avec une teneur en phosphate d'ammonium de 2.5 g/L (tableau 37).

Tableau 37 : Evolution du pH, biomasse, sucres résiduels, teneur en éthanol et rendement de métabolisation suivant la concentration en phosphate d'ammonium.

Quantité de Phosphate d'ammonium en g/l	pH	Quantité en biomasse en g/L	Teneur en sucres résiduels en g/L	Teneur en éthanol en g/L	Rendement de métabolisation en %
0.0	4.17	3.20	18.6	94.0	58.24
0.25	4.15	3.55	18.5	95.3	59.00
0.5	3.60	4.65	6.4	112.0	64.51
1.0	3.00	8.55	8.3	131.0	76.29
2.0	3.00	6.20	5.4	130.0	74.50
2.5	3.00	10.75	5.4	130.0	74.45

De même, la teneur en sucres résiduels diminue avec l'apport du phosphate d'ammonium pour atteindre 5.4 g/L avec une teneur en phosphate d'ammonium \geq à 2.0 %. Par contre la quantité en biomasse augmente avec la quantité de phosphate d'ammonium et elle passe de 3.55 g/L avec une teneur en phosphate d'ammonium de 0.25 g/L à 10.75 g/L avec une teneur en phosphate d'ammonium de 2.5 g/L. Des teneurs faibles en azote ont pour effet une diminution de l'activité cellulaire et par conséquent un rendement en biomasse faible ([Manginot *et al.*, 1998](#) ; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004).

L'ajout du phosphate d'ammonium au milieu de fermentation améliore la quantité en éthanol produite et le rendement de métabolisation pour atteindre 130.0 - 131.0 g/L et 74.50 - 76.29 %, respectivement en ajoutant 1.0 à 2.5 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Fadel et Foda (2001); [Manginot *et al.*, \(1998\)](#) ; Mendes-Ferreira *et al.* (2004). Enfin, un rendement de métabolisation optimum soit 76.29 % a été obtenu avec une quantité en phosphate d'ammonium de 1.0 g/L. A cet effet, on préconise l'ajout de 1.0 g/L de phosphate d'ammonium au milieu de culture; alors que plusieurs auteurs Bazua et Wilke (1977); Boughnou (1988); Navarro (1980); Touzi (1996) préconisent 2.0 à 2.5 g/L. Par contre, Donmez et Ozelik (1992); Limtong *et al.* (2007) ont obtenu de meilleurs rendements en éthanol en ajoutant 0.5 à 0.7 g/L de sulfate d'ammonium.

3-7- Optimisation de la production en éthanol avec la souche de *Saccharomyces cerevisia* DB

La teneur en éthanol évolue progressivement au cours de la fermentation, pour atteindre 66.0 g/L en 24 h, puis 103.0 g/L en 48 h et pour se stabiliser à 126.0 g/L au-delà de 72 h (figure 19).

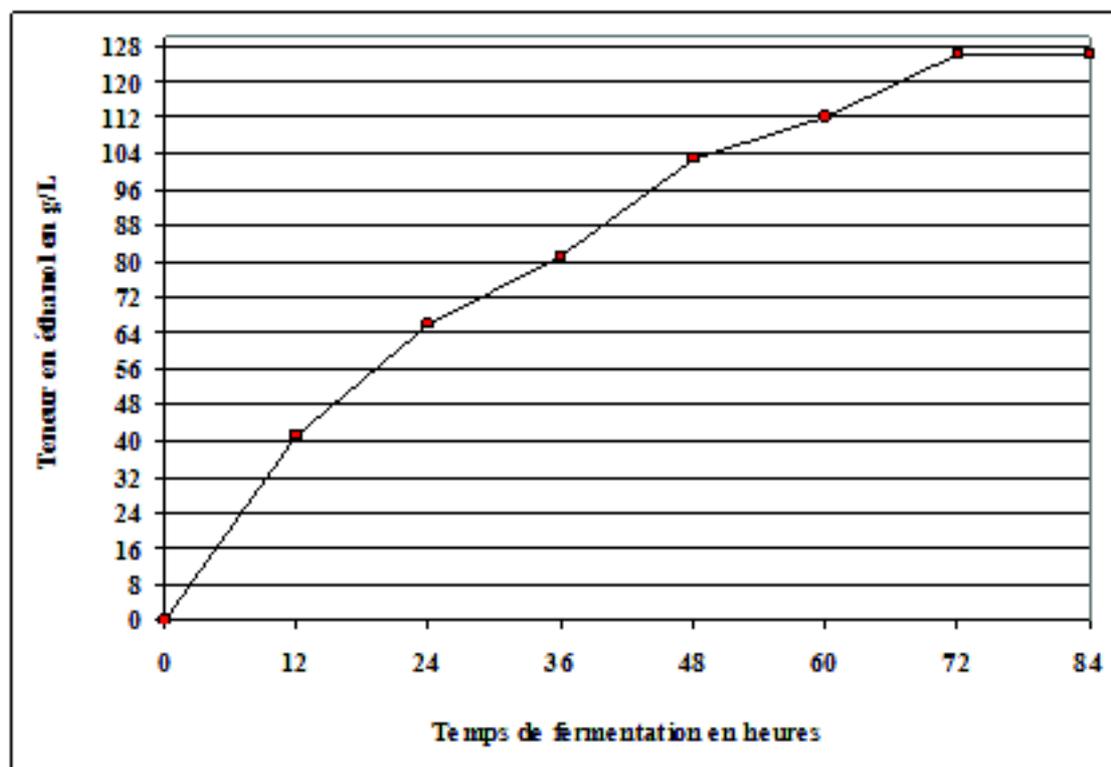


Figure 19 : Evolution de la quantité en éthanol au cours de la fermentation.

La période de fermentation optimale pour une production maximale en éthanol est de 72 h. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Kongkiattikajorn *et al.* (2007); Touzi (1997). Toutefois, Cazette *et al.* (2007) ont obtenu une quantité en éthanol maximale durant

48 h de fermentation en utilisant une souche de *Zymomonas mobilis*. Par contre, Pramanik (2003) a obtenu des quantités en éthanol inférieures durant une période de fermentation plus longue soit 96 à 105 h.

Par ailleurs, la teneur en éthanol et le rendement de métabolisation augmentent au fur et à mesure que la quantité en inoculum utilisée augmente pour stabiliser au-delà de 4.0 % (w/v). Ainsi, la teneur en éthanol et le rendement de métabolisation obtenus ont atteint des valeurs maximales de 136.0 g/L et 78.61 %, respectivement, en utilisant une quantité en inoculum supérieure ou égale à 4 % (w/v). Par contre, la quantité en éthanol et le rendement de métabolisation les plus faibles à savoir, 57.0 g/L et 49.56% respectivement ont été obtenus avec une quantité en inoculum de 1.0 % (w/v) (figure 20).

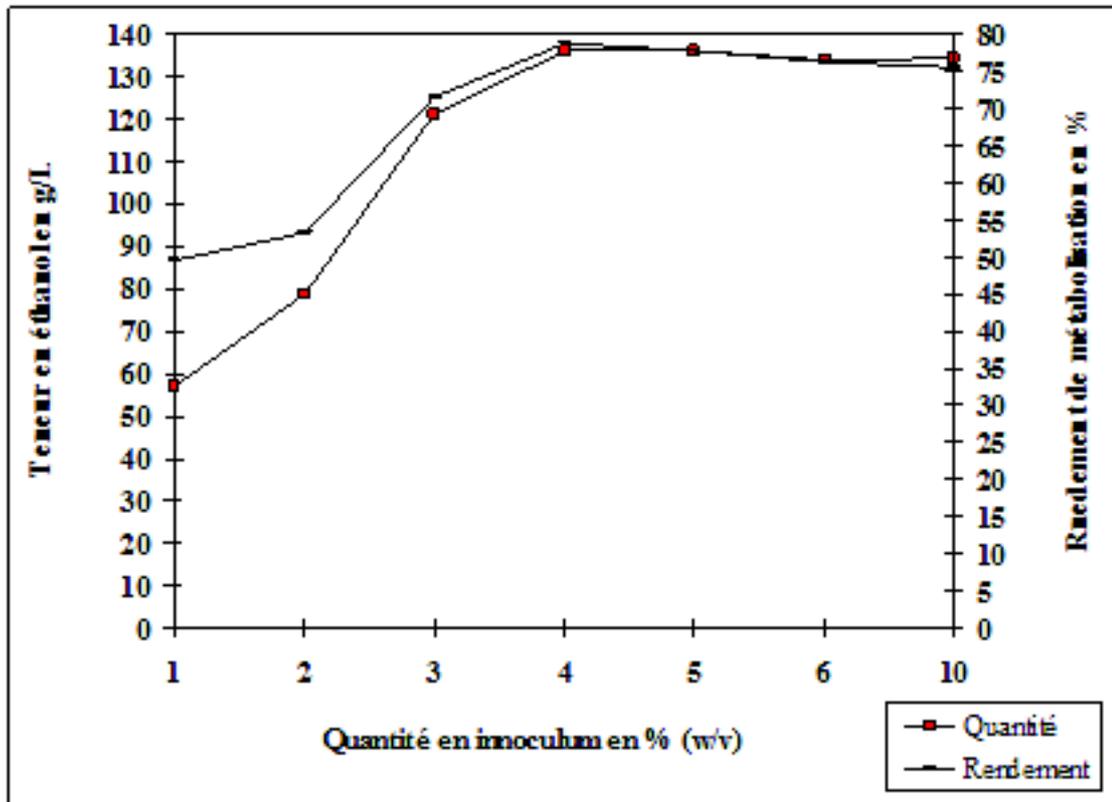


Figure 20 : Evolution de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation suivant la quantité en inoculum.

Ainsi, la quantité en inoculum optimale pour une production maximale en éthanol est de 4.0 % (w/v). Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Caceres-Farfan *et al.* (2008); Fadel et Foda (2001). Par contre, Siva-Kissava *et al.* (1995) ont obtenu de meilleurs rendements en éthanol avec une quantité en inoculum de 15.0 % (w/v).

D'autre part, la quantité en éthanol et le rendement de métabolisation augmentent avec la teneur en sucres du milieu et ils passent de 55.5 g/L et 56.63 %, respectivement avec une teneur en sucres de 100.0 g/L à 136.0 g/L et 78.61 %, respectivement avec une teneur en sucres du milieu de 180.0 g/L pour chuter à 100.0 g/L et 44.64 %, respectivement avec une teneur en sucres du milieu de 300.0 g/L (figure 21).

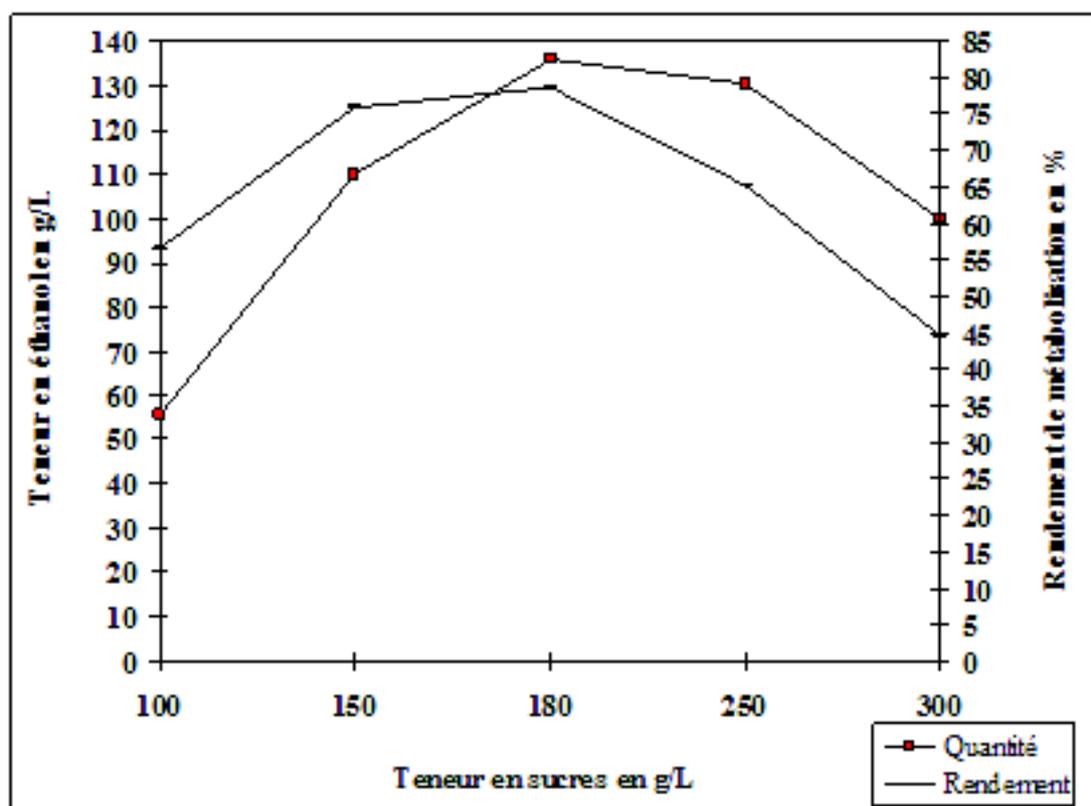


Figure 21 : Evolution de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation suivant la teneur en sucres du milieu.

Ainsi, la teneur en sucres optimale pour une production maximale en éthanol est de 180.0 g/L. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Cazette *et al.* (2007); Monte Alegre *et al.* (2003).

La source d'azote est considérée comme l'un des éléments nutritifs responsables de la limitation du taux de fermentation alcoolique avec *Saccharomyces cerevisiae* (Bely *et al.*, 1990). Ainsi, Manginot *et al.* (1998); Mendes-Ferreira *et al.* (2004) considèrent le phosphate d'ammonium comme la meilleure source azotée pour la production d'éthanol par rapport aux nitrate de potassium, nitrate de sodium, sulfate d'ammonium et urée.

La quantité maximale en éthanol produite au cours de la fermentation est étroitement liée à la quantité d'azote assimilable présente dans le milieu de culture (Bely *et al.*, 1990). Les résultats obtenus montrent une amélioration de la quantité en éthanol et du rendement de métabolisation avec l'élévation de la teneur en phosphate d'ammonium dans le milieu pour se stabiliser à un maximum de 136.0 g/L et 78.61 %, respectivement, avec une teneur supérieure ou égale à 1.0 g/L (figure 22). A cet effet, la teneur en phosphate d'ammonium optimale pour une production maximale en éthanol est de 1.0 g/L; alors que plusieurs auteurs préconisent 2.0 à 2.5 g/L (Bohlscheid *et al.*, 2007; Cazetta *et al.*, 2007; Touzi 1997).

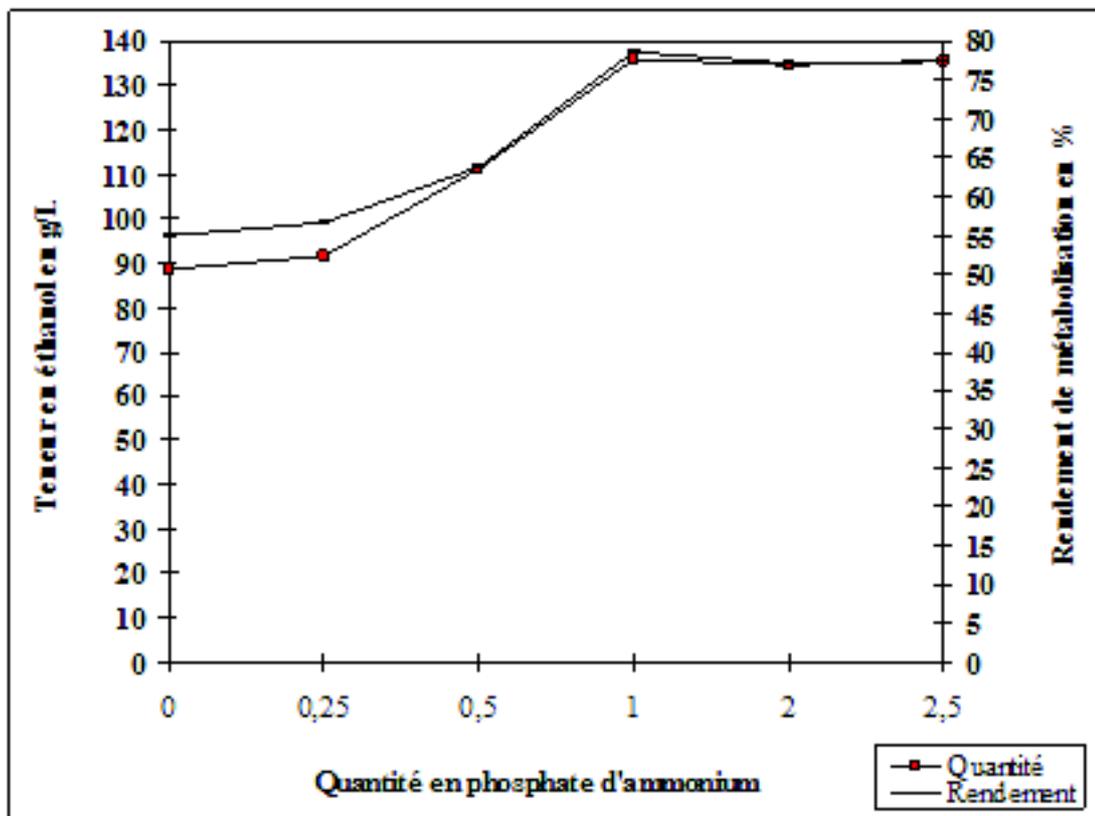


Figure 22 : Evolution de la teneur en éthanol et du rendement de métabolisation suivant la teneur en phosphate d'ammonium

En résumé, on peut dire que la teneur en éthanol obtenue au cours des différentes fermentations est élevée et elle varie entre 92.0 et 136.0 g/L. Ces résultats sont meilleurs comparés à ceux obtenus par Caylack et Vardar Sukan (1998); Kim *et al.* (1992); Kongkiattikajorn *et al.* (2007); Nonus et Miniac (1985); Pandey et Agarwal (1993); Phowchinda (1999) à partir de la mélasse et à ceux obtenus par Boughnou (1988); Mehaia (1991) sur rebuts de dattes. D'autre part, Abate *et al.* (1996); Wen-Chien et Cheng-Ta (1995) rapportent que chaque gramme de glucose peut fournir 0.51 g d'éthanol. Aussi, Gaudmaris *et al.* (1986) précisent que dans des conditions d'anaérobiose stricte, 100 g de sucres assurent une production de 46.0 g d'éthanol pur.

Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux trouvés par ces auteurs soient 0.555 à 0.786 g d'éthanol pour un g de sucres utilisé. Cependant, ils sont comparables à ceux obtenus par Araque *et al.* (2008) soient 0.67 à 0.76 g d'éthanol/g de sucres consommés. En outre, plusieurs auteurs se sont penchés sur l'amélioration du rendement en éthanol et plus particulièrement sur l'étude des facteurs responsables de l'inhibition de la biosynthèse d'éthanol qui apparaissent en fin de fermentation. A cet effet, Navarro (1980) a montré que des concentrations mêmes faibles en éthanol, inférieures à 6.0 % entraînent une inhibition partielle et irréversible de l'exo-kinase.

Cette inhibition est totale quand la concentration en éthanol atteint 15.0 % (Bazua and Wilke, 1977, Hayshida and Ohta, 1981). D'autre part, selon Pellerin et Lebrun (2001), les difficultés de fermentation du moût de raisin sont généralement dues à une diminution progressive de la viabilité des levures. Ceci est due à l'effet combiné de divers facteurs à savoir la perte de perméabilité de la membrane cytoplasmique de la levure due à une

synthèse de stérols insuffisantes, l'adsorption d'acides gras toxiques, une augmentation de la concentration en alcool éthylique et une diminution de la quantité d'azote assimilable ou une forte concentration en CO_2 .

Chapitre-IV : Production de l'acide citrique

Le matériel biologique utilisé est une souche d'*Aspergillus niger* ATCC 16404.

4-1- Etude de la cinétique de fermentation

L'étude de la cinétique de fermentation d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 montre qu'à partir du premier jour, le champignon commence à développer des filaments mycéliens non cénocytiques et des spores noires qui se multiplient abondamment jusqu'à la fin de la fermentation. D'après les figures 23 et 24, on remarque que la production de l'acide citrique se déroule sur quatre phases successives caractérisées par la croissance mycélienne et la production d'acide citrique.

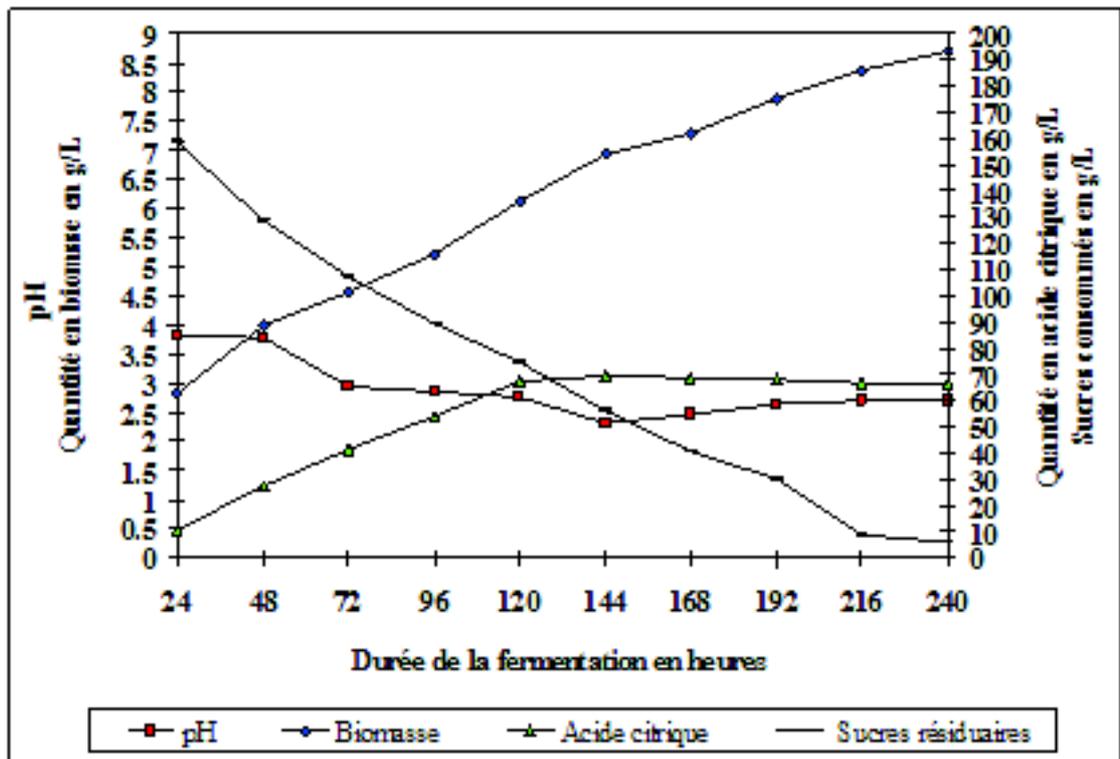


Figure 23 : Cinétique de fermentation d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 sur milieu à base de Tinissine.

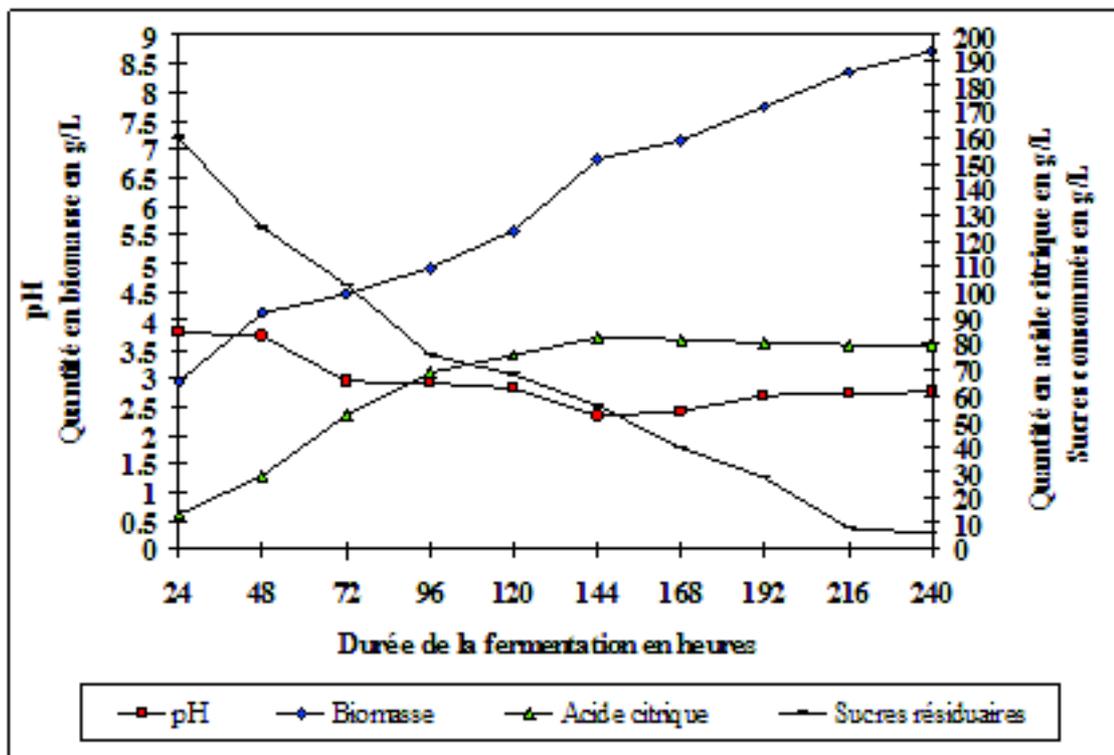


Figure 24 : Cinétique de fermentation d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour.

Une phase dite exponentielle de croissance (phase I) caractérisée par un accroissement rapide de la masse mycélienne durant les deux premiers jours de la fermentation. La consommation des sucres durant cette phase est très importante, par contre le pH diminue légèrement.

Une autre phase dite phase de perturbation de la croissance (phase II) où on enregistre une diminution des vitesses de croissance du mycélium et de la consommation des sucres

Selon Chimiel (1975), celle-ci serait due à la perturbation du métabolisme primaire d'*Aspergillus niger* résultant de l'épuisement du milieu de culture en phosphore et en azote.

Le phosphore serait d'après Papagianni (2007), l'élément de base de la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides membranaires. Une réduction de synthèse des acides nucléiques stimulerait par conséquent l'accumulation du citrate. Au cours de cette phase démarre la production de cet acide organique. Le pH chute alors brusquement indiquant l'accumulation d'acide citrique. Cette constatation a été faite également par Riviere (1975), selon lequel la synthèse d'acide citrique serait favorisée quand le milieu est déséquilibré.

La reprise de la croissance enregistrée dans le milieu de culture marque une phase de seconde croissance (phase III). Cette dernière correspondrait selon Chimiel (1975) au déclenchement du métabolisme secondaire du champignon. Au cours de cette phase des vitesses maximales de production de citrate sont relevées. La diminution progressive des vitesses de croissance du mycélium et de la consommation des sucres marque une phase dite stationnaire (phase IV). Ainsi, durant les quatre derniers jours de la fermentation, nous assistons à une stabilisation de la concentration en citrate et la stabilisation du pH autour de 2.7. Des résultats similaires ont été signalés par Hossain *et al.* (1984).

4-2- Effet de l'enrichissement sur la production d'acide citrique

Les résultats obtenus montrent une chute rapide du pH dans les milieux enrichis, 144 h après inoculation, ce dernier finit par atteindre la valeur de 2.34 pour les rebuts de Deglet-Nour et 2.30 pour Tinissine. Dans le cas des milieux non enrichis, le pH diminue lentement et se stabilise autour de 3.0 (tableau 38).

Paramètres/ Durée en h		24	48	72	96	120	144	168	192
Tinissine non enrichi	pH	3.80	3.70	3.20	2.95	2.90	2.90	3.00	3.10
	Biomasse en g/L	1.60	1.73	2.23	3.00	3.00	3.15	3.00	2.95
	Acide citrique en g/L	10.24	23.68	38.40	46.72	38.40	33.90	30.62	29.42
	Sucres consommés en g/L	42.75	77.56	100.44	119.5	120.00	125.00	126.00	126.50
	Rendement en %	23.95	30.53	38.23	39.10	32.00	27.12	24.30	23.25
Tinissine enrichi	pH	3.80	3.77	2.95	2.85	2.75	2.30	2.45	2.65
	Biomasse g/L	2.82	4.00	4.56	5.22	6.12	6.92	7.29	7.89
	Acide citrique en g/L	10.88	27.52	41.60	51.76	60.20	69.12	68.7	67.92
	Sucres consommés en g/L	41.54	71.65	94.76	116.46	130.57	144.0	149.44	150.25
	Rendement en %	26.19	38.40	43.90	44.44	46.10	48.00	45.97	45.20
Rebuts de Deglet-Nour non enrichi	pH	3.80	3.74	3.24	3.00	3.00	3.10	3.00	3.00
	Biomasse en g/L	1.71	1.78	2.24	2.95	3.00	3.10	2.95	2.90
	Acide citrique en g/L	12.80	33.92	47.36	58.24	55.00	51.84	50.35	50.22
	Sucres consommés en g/L	40.00	76.50	102.46	122.45	128.77	130.85	131.12	132.54
	Rendement en %	32.00	44.34	46.22	47.56	42.71	39.61	38.39	37.89
Rebuts de Deglet-Nour enrichi	pH	3.80	3.74	2.94	2.92	2.82	2.34	2.42	2.70
	Biomasse g/L	2.94	4.12	4.48	4.93	5.57	6.82	7.14	7.74
	Acide citrique en g/L	13.44	28.8	52.48	68.48	75.52	82.00	81.34	80.22
	Sucres consommés en g/L	40.00	75.00	97.58	124.72	135.00	144.00	146.44	147.00
	Rendement en %	33.60	38.40	53.83	54.90	55.94	56.94	55.54	54.57

Tableau 38 : Effet de l'enrichissement sur les différents paramètres de la fermentation.

Pour ce qui est de la quantité en biomasse, cette dernière évolue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre à 144 h après inoculation sur substrats à base de rebuts Deglet-Nour et Tinissine, 3.10 et 3.15 g/L, respectivement, dans les milieux non enrichis et 6.82 et

6.92 g/L, respectivement, dans les milieux enrichis. Par contre, la consommation de sucres est plus rapide. Ainsi, le champignon consomme environ la moitié de la quantité initiale en sucres au cours des trois premiers jours de fermentation. A cet effet, la teneur en sucres résiduels 192 h après inoculation est de 67.46 - 73.50 g/L dans les milieux non enrichis et 49.75 -

53.00 g/L dans les milieux enrichis. En outre, selon Tsay et To (1987) plus de 75 % du carbone fourni est converti en acide citrique. Dans cette étude, les milieux enrichis laissent supposer que les éléments nutritifs ajoutés ont permis au champignon une consommation de sucres élevée soit plus de 75.0 %. Les résultats obtenus dans cette étude avec les milieux enrichis sont proches de ceux rapportés par Hossain *et al.* (1984). Quant à la production d'acide citrique, celle ci débute 24 h après inoculation. La vitesse de production d'acide citrique varie d'une manière irrégulière au cours de la fermentation. Le maximum est atteint au 4^{ème} jour soit 58.24 g/L pour les rebuts de Deglet-Nour et 46.72 g/L pour Tinissine dans les milieux non enrichis et au 6^{ème} jour soit 82.00 g/L pour les Rebutts de Deglet-Nour et

69.12 g/L pour Tinissine dans les milieux enrichis. A la lumière de ces résultats, les milieux enrichis semblent les mieux indiqués puisqu'ils ont donné des résultats intéressants plus ou moins proches des résultats bibliographiques, à savoir une quantité en biomasse de 7.74 -

7.89 g/L, une quantité en acide citrique de 69.12 - 82.00 g/L et un rendement de 48.00 - 56.94 %. En effet, les résultats obtenus sur les milieux enrichis à base de Rebutts de Deglet-Nour sont proches de ceux rapportés par Al-Obaidi et Berry (1981) et (1982 b); Jernejc *et al.* (1989) à savoir 80.0 - 85.00 g/L et 58.00 - 60.00 %. Toutefois, ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Berry *et al.* (1977); Siboukeur *et al* (2001); Tsay et To (1987) soient 100.0 - 112.0 g/L et 63.00 - 69.95 %.

4-3- Durée de la fermentation

Les résultats obtenus montrent que le pH chute brusquement pour atteindre une valeur de 2.30 - 2.34 au bout de 144 h de fermentation. Par ailleurs, les quantités en biomasse augmentent au cours de la fermentation, elles passent de 2.82 - 2.94 g/L après 24 h à 4.48 - 4.56 g/L au bout de 72 h pour atteindre des maxima de 7.74 - 7.89 g/L au bout de 192 h de fermentation (tableau 39)

Paramètres/ Temps de fermentation en heures		24	48	72	96	120	144	168	192
Tinissine	pH	3.80	3.77	2.95	2.85	2.75	2.30	2.45	2.65
	Biomasse en g/L	2.82	4.00	4.56	5.22	6.12	6.92	7.29	7.89
	Acide citrique en g/L	10.88	27.52	41.60	51.76	60.20	69.12	68.70	67.92
	Rendement en %	26.19	38.40	43.90	44.44	46.10	48.00	45.97	45.20
Rebutts de Deglet-Nour	pH	3.80	3.74	2.94	2.92	2.82	2.34	2.42	2.70
	Biomasse en g/L	2.94	4.12	4.48	4.93	5.57	6.82	7.14	7.74
	Acide citrique en g/L	13.44	28.80	52.48	68.48	75.52	82.00	81.34	80.22
	Rendement en %	33.60	38.40	53.83	54.90	55.94	56.94	55.54	54.75

Tableau 39 : Evolution des différents paramètres suivant la durée de fermentation.

Quant à la quantité et au rendement en acide citrique, ces derniers évoluent au fur et à mesure de la fermentation, ils passent de 10.88 - 13.44 g/L et de 26.15 - 33.60 % après 24 h à 27.52 - 28.80 g/L et 38.4 % après 48 h pour atteindre un maximum de 69.12 - 82 g/L et 48.00 -

56.94 % à 144 h, respectivement. Enfin, au de là de 144 h, une chute légère de la production est notée pour atteindre une quantité et un rendement en acide citrique de 67.92 - 80.22 g/L et 45.20 - 54.75 %, respectivement (figure 25).

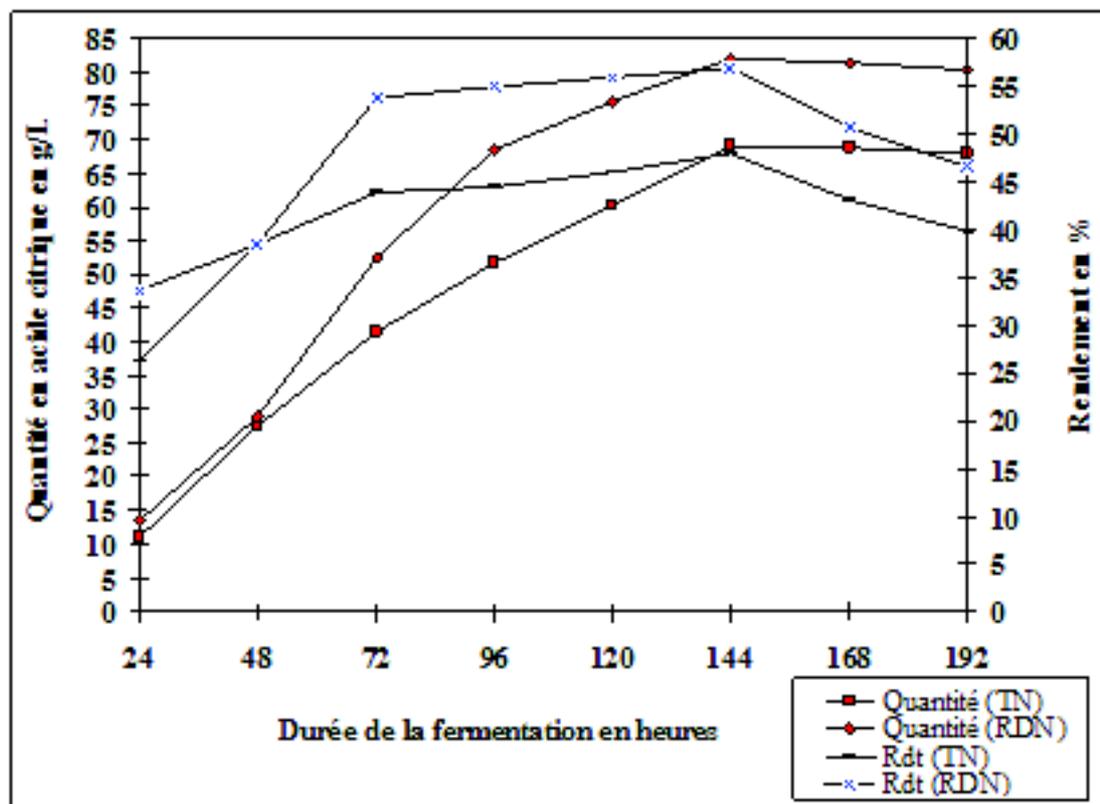


Figure 25 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique au cours de la fermentation.

Ainsi, la période optimale pour une production maximale en acide citrique est de 144 h. Cette durée de fermentation est similaire à celle rapportée par Sikander (2004). Par contre, Al-Obaidi et Berry (1982) ont obtenu sur milieu à base de dattes, un rendement en acide citrique de 80.8 g/L au bout de 192 h de fermentation. Par ailleurs, Amir *et al.* (2002); Mazhar *et al.* (2004); Papagianni *et al.* (2005); Sikander *et al.* (2003, a); Vergano *et al.* (1996) ont obtenu des quantités maximales en acide citrique, 168 h après inoculation.

Nos résultats sont meilleurs et plus significatifs comparés à ceux obtenus par les précédents auteurs car, la réduction de la période de fermentation permet une diminution des coûts de production en acide citrique. Par ailleurs, dans cette étude au delà de 144 h de fermentation, une chute de production en acide citrique est notée. Ceci pourrait être dû à l'épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs et à l'âge des mycètes.

Un résultat similaire a été rapporté par Sikander *et al.* (2002); Wieczorek et Brauer (1998). D'autre part, Zarowska *et al.* (2001), ont obtenu un rendement en acide citrique de 58.21 g/L sur milieu à base de mélasse en utilisant une souche *Yarrowia lipolytica*, 50 h après inoculation. Aussi, un rendement en acide citrique de 73.0 g/L a été obtenu

par Angumeenal et Venkappayya (2005) sur milieu à base d'*Artrocarpus heterophyllus* en utilisant *Aspergillus niger*, 48 h après inoculation.

4-4- Effet de différents substrats sur la production d'acide citrique

La source de carbone utilisée pour la production d'acide citrique a fait l'objet de plusieurs études. En général, seuls les sucres qui sont rapidement absorbés par *Aspergillus niger* permettent un haut rendement en acide citrique (Mattey, 1992).

Les polysaccharides, moins hydrolysés, ne sont pas une bonne matière première pour la fermentation citrique, car ils sont hydrolysés lentement ce qui limite la teneur en sucres requise dans le milieu de fermentation pour la production de l'acide citrique. La lenteur de l'hydrolyse des polysaccharides est due à la faible activité hydrolytique des enzymes à faible pH, nécessaire à la production de l'acide citrique (Papagianni, 2007). Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH final, la plus élevée a été obtenue avec le milieu à base de mélasse soit 2.41 et la plus faible avec le milieu à base de saccharose soit 1.61 (tableau 40).

Tableau 40 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant les différents substrats

Substrats	Saccharose	Mélasse	Rebuts de D.N	Tinissine
pH	1.61	2.41	2.34	2.30
Quantité en Biomasse en g/L	6.06	5.27	6.82	6.92
Quantité de sucres consommés en g/L	143.71	142.45	144.00	144.00
Quantité en acide citrique en g/L	86.40	73.60	82.00	69.12
Rendement en %	60.12	51.66	56.94	48.00

Quant aux quantités en biomasse, les plus élevées ont été obtenues avec les milieux à base de dattes soient 6.82 - 6.92 g/L et la plus faible avec le milieu à base de mélasse soit 5.27 g/L. Pour ce qui est des quantités de sucres consommés, elles sont élevées pour l'ensemble des milieux de culture soient 142.45 à 144.00 g/L à savoir une consommation de plus de 95.0 % de sucres apportés. Ainsi, on peut dire que le substrat n'a aucun effet sur la consommation des sucres.

Des résultats similaires ont été rapportés par Jianlong *et al.* (2000). Toutefois, selon Kubicek et Rohr (1989), le saccharose est préférable au glucose avec *Aspergillus niger* qui a une invertase extracellulaire active à pH bas. Cette supériorité du saccharose par rapport au glucose et fructose a été démontrée par Gupta *et al.* (1976); Hossain *et al.* (1984) qui ont rapporté que la nature des sucres peuvent affecter la consommation de ces derniers par *Aspergillus niger*. Concernant l'évolution des rendements en acide citrique, les quantités et rendements les plus élevés ont été enregistrés dans le milieu à base de saccharose soient 86.4 g/L et 60.12 % suivi du milieu à base de rebuts de Deglet-Nour soient 82.0 g/L et 56.94 %. Par contre, les plus faibles quantités et rendements ont été obtenus avec le milieu à base de Tinissine soient 69.12 g/L et 48.00 % (figure 26).

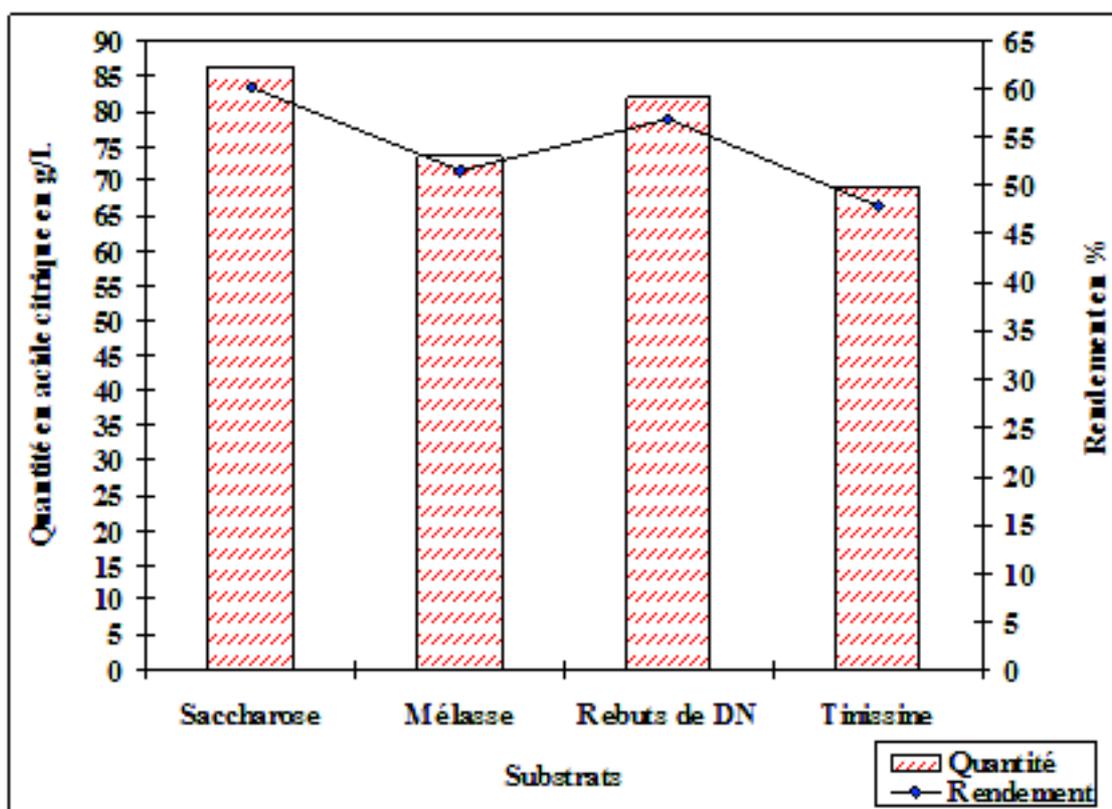


Figure 26 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant les différents substrats.

Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Al-Obaidi et Berry (1982); El-Holi et Al-Delaimy (2003), à savoir 76.4 % et 80.0 % sur milieux à base de mélasse et de saccharose.

4-5- Effet de la température sur la production de l'acide citrique

Les résultats obtenus montrent que les valeurs du pH final sont faibles à la température de 30 °C soient 2.3 et 2.34 sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine et légèrement plus élevées aux températures de 20 et 40 °C soient 2.92 - 3.00 et 3.00 - 3.15, respectivement. Concernant les quantités en biomasse produites, elles sont faibles à la température de 20 °C soient 4.12 - 4.44 g/L et élevées à la température de 30 °C soient 6.82 - 6.92 g/L (tableau 41).

Tableau 41 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la température.

	Température	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Tinissine	pH	3.00	2.49	2.30	2.70	3.15
	Biomasse en g/L	4.12	6.15	6.92	6.34	5.88
	Acide citrique en g/L	28.40	37.60	69.12	40.12	10.20
	Rendement en %	26.89	34.45	48.00	30.00	9.76
Rebuts de Deglet-Nour	pH	2.92	2.48	2.34	2.60	3.00
	Biomasse en g/L	4.44	6.55	6.82	6.62	6.25
	Acide citrique en g/L	38.40	57.60	82.00	44.80	19.20
	Rendement en %	36.84	53.06	56.94	34.40	17.40

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Abdulrahman *et al.* (2006); Arzumanov *et al.* (2000); Asad *et al.* (2002); Sayas et Hans-Jurgen (2006); Sikander *et al.* (2002 a). Quant aux quantités et rendements en acide citrique, ils sont élevés avec la température de 30 °C soient 69.12 g/L et 48.00 % sur milieu à base de Tinissine et 82.00g/L et 56.94 % sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour (figure 27).

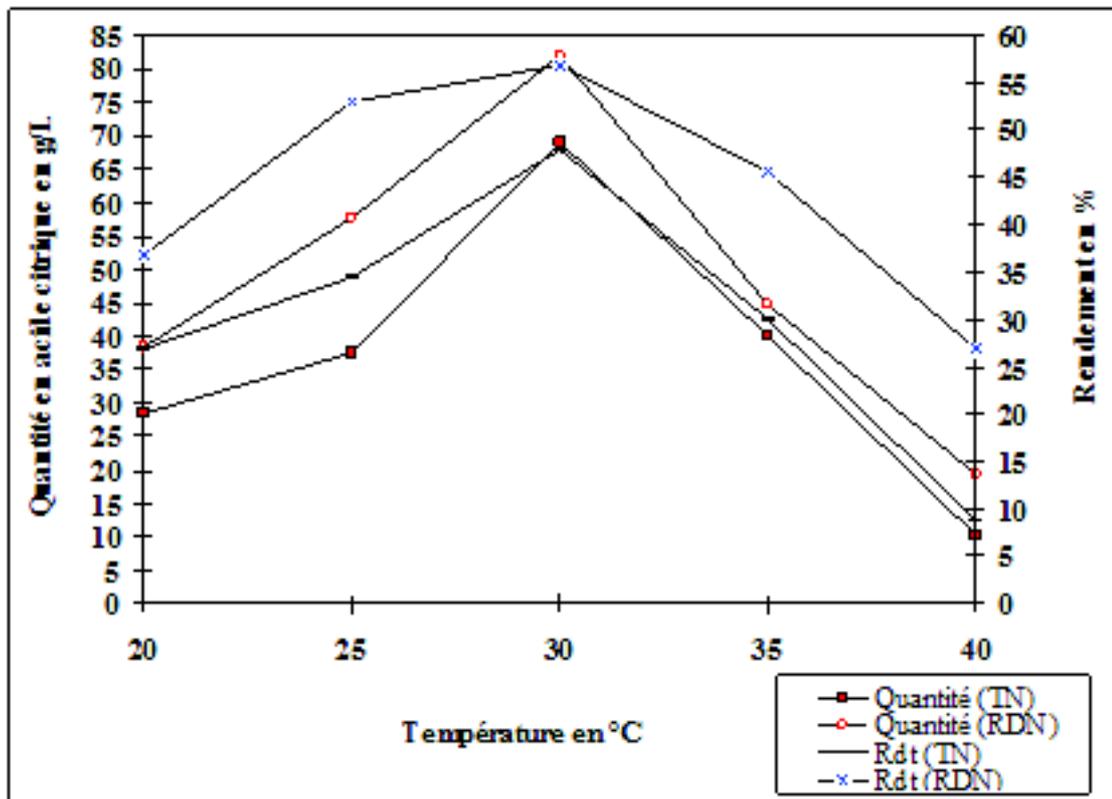


Figure 27 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la température.

Ainsi, la température optimale pour une production maximale en acide citrique est de 30 °C.

Des résultats similaires ont été obtenus par Aamir *et al.* (2002); Abdulrahman *et al.* (2006); Al-Obaidiet *et al.* (1982 b); Asad *et al.* (2002); El-Holi et Al-Delaimy (2003); Gupta *et al.* (1976); Ikram *et al.* (2002); Sikander *et al.* (2002 a).

Par ailleurs, une diminution progressive de la production en acide citrique aux températures élevées a été notée passant de 40.12 -44.80 g/L et 30.00 - 34.40 % à 35 °C et à 10.20 -

19.20 g/L et 9.76 - 17.40 % à 40 °C. Ceci est probablement dû à la dénaturation de la citrate synthétase et à une accumulation de l'acide oxalique (Abdulrahman *et al.*, 2006; Sikander *et al.*, 2002 a; Sikander, 2004). Selon, Asad *et al.* (2002); Hang and woodman (1998), la température de 40 °C est favorable à la production d'acide oxalique. Par contre, l'accumulation de l'acide citrique est complètement inhibée à une température supérieure à 40 °C.

4-6- Effet de la teneur en sucres sur la production d'acide citrique

Dans cet essai on a utilisé uniquement l'extrait issu des rebuts de Deglet-Nour afin de fixer la teneur en sucres dans le milieu de fermentation. Les résultats obtenus montrent que le pH du milieu de fermentation et le poids du mycélium varient peu avec la teneur en sucres soient 2.30 - 2.40 et 6.00 - 6.82 g/L (tableau 42).

Teneurs en sucres en %	12.0	14.0	15.0	16.0	17.0	18.0	20.0
pH	2.30	2.30	2.34	2.36	2.38	2.40	2.34
Biomasse en g/L	6.00	6.28	6.52	6.57	6.62	6.68	6.82
Quantité en acide citrique en g/L	70.00	74.58	82.00	82.12	81.78	81.86	82.00
Sucres consommés en g/L	117.8	136.25	142.00	144.72	145.58	146.65	144.00
Rendement en %	59.42	54.73	57.74	56.74	56.17	55.81	56.94

Tableau 42 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la teneur en sucres

Concernant la quantité en acide citrique, la plus élevée soit 82.12 g/L a été obtenue avec le milieu ayant une teneur en sucres de 16.0 %. Par contre, la plus basse soit 70.0 g/L a été obtenue avec le milieu ayant une concentration en sucres de 12.0 %. D'autre part, une faible teneur en sucres conduit à la baisse des quantités en acide citrique due à l'accumulation de l'acide oxalique dans le milieu de culture. Ainsi, pour la concentration en sucres de 12.0 %, la production d'acide citrique s'arrête au 4^{ème} jour où les sucres sont presque totalement consommés. Par contre, pour les concentrations en sucres de 16.0, 17.0 et 18.0 et 20.0 %, la production en acide citrique est de 82.12, 81.78, 81.86 et 82.00 g/L, respectivement. Quant aux rendements, ces derniers varient entre 54.73 et 59.42 % (figure 28).

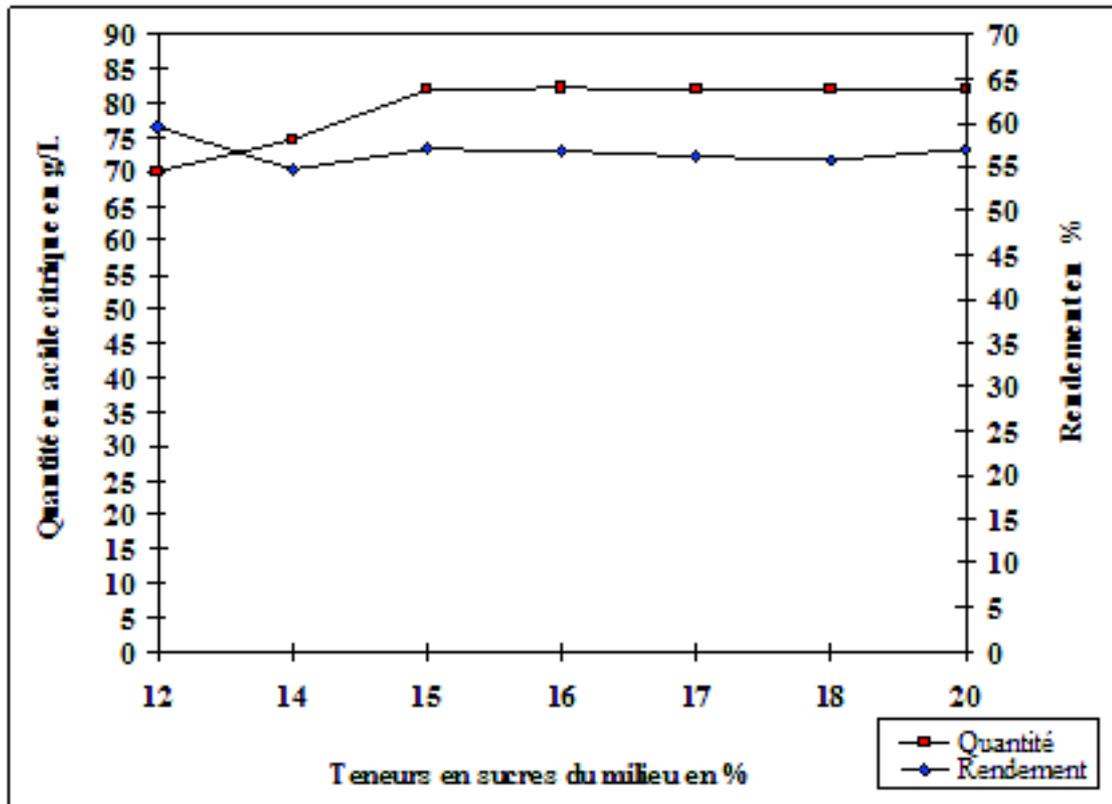


Figure 28 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la teneur en sucres.

Par conséquent, la meilleure teneur en sucres pour une production optimale en acide citrique est de 15.0 %. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par Abdulrahman *et al.* (2006); Al-Obaidi et Berry (1982 a); El-Holi et Al-Delaimy (2003); Hossain *et al.* (1984); Iqram *et al.* (2002); Jianlong *et al.* (2000); Papagianni *et al.* (1999 et 2005); Roukas (1998); Siboukeur *et al.* (2001); Sikander *et al.* (2002 a); Xu *et al.* (1989). Par ailleurs, une plus grande teneur en sucres du milieu entraîne une plus grande quantité de sucres résiduels soit 56.00 g/L avec une teneur en sucres ≥ 20.0 %, ce qui rend le processus peu économique. Des résultats similaires ont été rapportés par Pazouki *et al.* (2000). Enfin, pour la teneur en sucres de milieu de

12.0 %, la teneur en sucres résiduels est faible soit 2.2 g/L. Des résultats similaires ont été signalés par Haq *et al.* (2003); Hossain *et al.* (1984); Sikander (2004).

4-7- Effet de l'addition d'alcool sur la production d'acide citrique

L'addition d'alcool ayant un poids moléculaire bas a pour effet d'améliorer les rendements en acide citrique. L'addition de légères concentrations d'alcools à bas poids moléculaires tels que le méthanol et l'éthanol au milieu augmente la tolérance d'*Aspergillus niger* à la toxicité de certains métaux, tels que, le Zinc, Cuivre et le Fer dans le milieu de fermentation (Kubicek and Rohr, 1986). L'éthanol ainsi que le méthanol ont été ajoutés au milieu de culture ayant une teneur en sucres de 15.0 % à raison de 1.0, 2.0 et 3.0 et 4.0 %. Les résultats obtenus montrent que l'ajout d'éthanol et de méthanol au milieu de culture n'a aucun effet sur le pH et la quantité de biomasse. Ainsi, la valeur du pH et la quantité de biomasse varient entre 2.10 - 2.20 et entre 6.52 - 7.25 g/L, respectivement (tableau 43).

Teneur en alcool en %		Ethanol					Méthanol			
		0	1	2	3	4	1	2	3	4
Tinissine	pH	2.30	2.30	2.20	2.30	2.20	2.10	2.20	2.10	2.10
	Biomasse en g/L	6.72	7.25	7.06	7.20	7.15	7.03	7.07	6.96	7.18
	Acide citrique en g/L	69.12	68.64	70.40	70.70	70.42	69.24	70.00	79.82	80.44
	Rendement en %	49.51	49.73	50.14	50.40	49.90	49.60	49.46	55.97	56.84
Rebuts de D.N	pH	2.34	2.25	2.30	2.20	2.10	2.15	2.15	2.20	1.85
	Biomasse en g/L	6.52	7.25	7.16	7.15	7.00	6.62	6.73	6.82	7.05
	Acide citrique en g/L	82.00	81.64	83.40	83.70	82.00	82.00	86.40	96.0	96.0
	Rendement en %	57.74	59.15	58.15	58.42	57.70	58.15	60.63	66.66	66.11

Tableau 43 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la nature et la teneur en alcool

Par ailleurs, l'ajout de l'éthanol au milieu de fermentation n'a pas d'effet significatif sur la quantité et le rendement en acide citrique soient 68.64 - 70.70 g/L et 49.51 - 50.40 % sur milieu à base de Tinissine, respectivement et 81.64 - 83.70 g/L et 57.74 - 59.15 % sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour, respectivement. Toutefois, Moddax *et al.* (1986); Hossain *et al.* (1985) ont rapporté que l'ajout d'éthanol dans les milieux de fermentation peut améliorer la production d'acide citrique. D'autre part, l'ajout de méthanol améliore d'une manière notable la production de l'acide citrique. Ainsi, l'ajout de 3.0 % de méthanol donne une quantité et un rendement en acide citrique élevés soient 79.82 g/L et 55.97 % sur milieu à base de Tinissine et 96.65 g/L et 66.66 % sur milieu à base de Rebuts de Deglet-Nour, respectivement (figure 29).

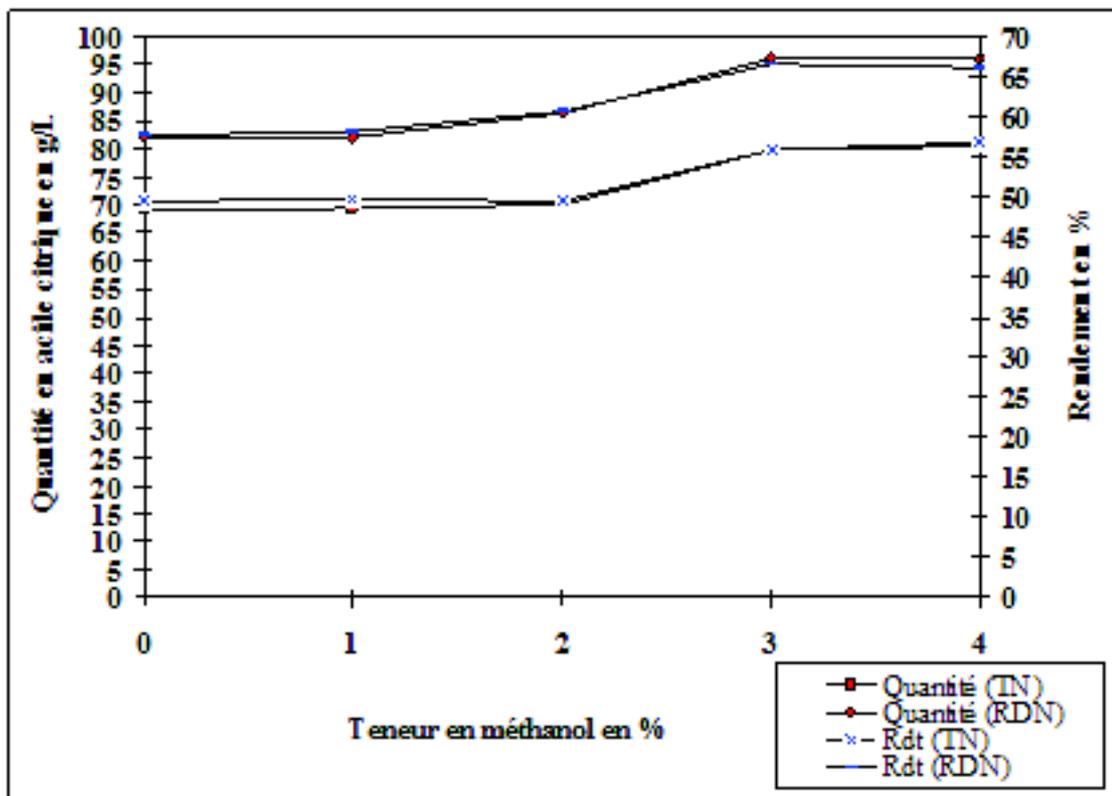


Figure 29 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la teneur en méthanol.

L'ajout de 3.0 % de méthanol au milieu de fermentation améliore de 15 à 17.0 % le rendement en acide citrique. Au delà de 3.0 % en méthanol, aucune amélioration significative de la production n'a été notée. Selon, Ikram *et al.* (2003) parmi les alcools testés comme agents stimulants, le méthanol s'avère le plus performant et donne une quantité maximale en acide citrique de 90.02 g/L, 24 h après inoculation sur milieu à base de mélasse.

Toutefois, selon Rubina *et al.* (2003), l'ajout de 1.0 % de méthanol donne une production maximale en acide citrique. De même, Ikram *et al.* (2003); Nadeem *et al.* (2010) ont obtenu des rendements élevés en ajoutant 1.5 % de méthanol au milieu de fermentation. D'autre part, Demirel *et al.* (2005); Kubicek et Rohr (1986); Roukos et Kotzekidou (1997) rapportent que l'ajout de 4.0 % de méthanol au milieu de fermentation induit une amélioration très significative des rendements en acide citrique.

Ceci est probablement lié à l'inhibition des effets toxiques des ions métalliques tels que le Cuivre, Fer et Zinc, présents dans le milieu de culture. Le méthanol améliore aussi la quantité en acide citrique produite à partir du jus de kiwi, ananas et maïs (Hang *et al.* 1987; Hang et Woodams, 1998; Tran et Mitchell, 1995). Le méthanol n'est pas assimilé par *Aspergillus niger* et son rôle exact dans la stimulation de la production de l'acide citrique n'est pas encore clair (Maddox *et al.*, 1986). D'autres études ont montré que le méthanol, stimule la production de l'acide citrique en améliorant la perméabilité de la membrane cellulaire provoquant ainsi plus d'excrétion d'acide citrique par les cellules mycéliennes dans le milieu de culture (Ikram *et al.*, 2003).

4-8- Effet du pH initial sur la production d'acide citrique

La production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* est sensible au pH initial du milieu de fermentation. Le tableau 43 montre l'effet des différents pH initiaux (2.0 - 6.0) sur les différents paramètres de la fermentation citrique. Ainsi, la valeur du pH final est légèrement plus élevée soit 3.33 - 3.54 à pH initial de 6.0 et basse soit 1.26 - 1.30 à pH initial de 2.0 (tableau 44)

Tableau 44 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant le pH initial.

pH initial		2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	6.0
Tinissine	pH	1.30	1.45	1.65	2.10	2.10	2.60	2.88	3.54
	Biomasse sèche en g/L	5.45	6.25	6.65	7.14	6.96	10.65	12.26	15.40
	Acide citrique en g/L	71.62	81.42	81.34	81.54	79.82	54.25	52.10	49.52
	Rendement en %	54.44	59.49	60.19	59.71	55.97	38.04	36.40	34.32
Rebuts de DN	pH	1.26	1.31	1.45	2.13	2.20	2.46	2.62	3.33
	Biomasse sèche en g/L	5.76	6.36	6.45	6.62	6.82	11.16	13.50	16.50
	Acide citrique en g/L	92.8	102.10	102.4	102.4	96.0	73.6	67.2	64.0
	Rendement en %	67.88	75.74	76.08	75.79	66.66	52.30	47.42	44.45

En outre, un pH initial bas inhibe légèrement la croissance d'*Aspergillus niger* et réduit le risque de contamination de la fermentation par d'autres micro-organismes. Ainsi, la quantité en biomasse obtenue à pH initial de 2.0 et 2.5 varie entre 5.45 et 6.25 g/L. Par contre au-delà d'un pH initial de 4.5, la quantité en biomasse augmente et les quantités obtenues aux pH initiaux de 4.5, 5.0 et 6.0, sur milieux à base de Tinissine et rebuts de Deglet-Nour sont de 10.65 - 11.16, 12.26 - 13.50 et 15.40 - 16.5 g/L, respectivement. Par ailleurs, des quantités et des rendements maximums en acide citrique sur milieux à base de Tinissine et rebuts de Deglet-Nour soient 81.34 - 102.4 g/L et 59.49 - 76.08 %, respectivement ont été obtenus avec un pH initial du milieu maintenu entre 2.5 et 3.5 (figure 30).

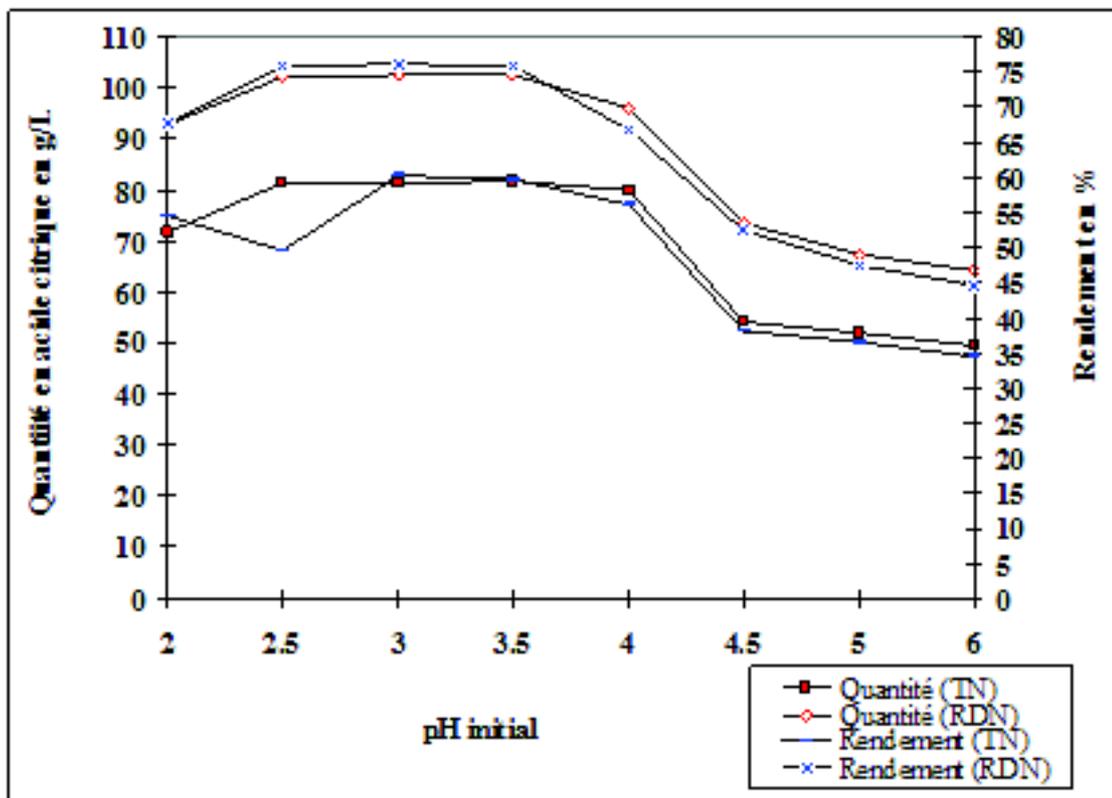


Figure 30 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant le pH initial du milieu

Ces résultats concordent avec ceux de Walid *et al.* (2006) qui ont obtenu un rendement maximum à un pH initial de 3.5 à 4.0. Selon Fezili *et al.* (1976); Papagiani *et al.* (2005); Papagianni (2007), un pH initial bas inférieur à 3.0 inhibe la production d'autres acides organiques tels, l'acide gluconique et l'acide oxalique. D'autre part, lorsque le pH augmente au-delà de 4.5, la production en acide citrique diminue progressivement et les quantités et rendements obtenus aux pH initiaux de 4.5, 5.0 et 6.0 sur milieux à base de Tinissine et rebuts de Deglet-Nour sont de 54.3, 52.1, 49.5 g/L et 38.0, 36.4, 34.3 %, respectivement.

Des résultats similaires ont été obtenus par Al-Obaidi et Berry (1982 b); Sikander *et al.* (2002 a); Papagianni (2007). Aussi, selon, Pappagianni *et al.* (2005), l'élévation du pH initial du milieu au dessus de la valeur de 5.0 a pour conséquence une réduction du rendement en acide citrique de 80 %. Toutefois, Ikram *et al.* (2002) ont obtenu sur milieu à base de mélasse une quantité en acide citrique élevée soit 98.92 g/L avec un pH initial du milieu de culture de 6.0.

De même, Abdulrahman *et al.* (2006); [Sanjay et Sharma \(1994\)](#) ont obtenu un rendement maximum à pH initial de 5.5 sur milieu à base de mélasse. Par ailleurs, Walid *et al.* (2006) recommandent un pH initial du milieu de fermentation de 4.0 afin d'optimiser la production en acide citrique. Enfin, selon Kristiansen et Sinclair (1978), le pH initial n'a pas d'effet direct sur la production d'acide citrique. Il est possible que le pH influe sur les enzymes qui sont actives dans la dégradation des substances cellulaires et de la perméabilité de la membrane cellulaire.

4-9- Effet de la quantité en inoculum sur la production d'acide citrique

Dans cet essai on a utilisé uniquement l'extrait issu des rebuts de Deglet-Nour, afin de fixer la quantité en inoculum optimale pour une production maximale en acide citrique. Parmi les facteurs affectant la production d'acide citrique, la quantité en inoculum peut être un de ces facteurs. Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH varie peu soit entre 2.00 et 2.34. (tableau 45)

Tableau 45 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la quantité en inoculum.

Quantité en inoculum en CFU/ml	10^3	10^6	10^9	10^{12}	10^{17}	10^{21}
pH	2.10	2.13	2.06	2.12	2.00	2.33
Biomasse sèche en g/L	4.20	6.62	15.76	16.12	20.06	24.45
Quantité en acide citrique en g/L	55.8	102.4	96.0	70.4	64.0	60.0
Rendement en %	44.56	75.79	68.22	50.21	45.29	42.79

Pour ce qui est de la quantité en biomasse, cette dernière augmente au fur et à mesure que la quantité en inoculum devient plus importante, elle passe de 4.20 g/L avec une quantité en inoculum de 10^3 CFU/ml à 20.06 - 24.45 g/L avec des quantités en inoculum de 10^{17} et

10^{21} CFU/ml. Par ailleurs, les milieux de culture ayant des quantités en inoculum élevées (10^{12} , 10^{17} et 10^{21} CFU/ml) et les milieux de cultures ayant des quantités en inoculum faibles à savoir 10^3 CFU/ml donnent des quantités et rendements en acide citrique faibles soient 70.4, 64.0, 60.0, 55.8 g/L et 50.21, 45.29, 42.79, 44.56 %, respectivement.

Par contre, le milieu de culture ayant une quantité en inoculum de 10^6 CFU/ml donne une quantité et un rendement en acide citrique élevés soient 102.4 g/L et 75.79 %, respectivement (figure 31).

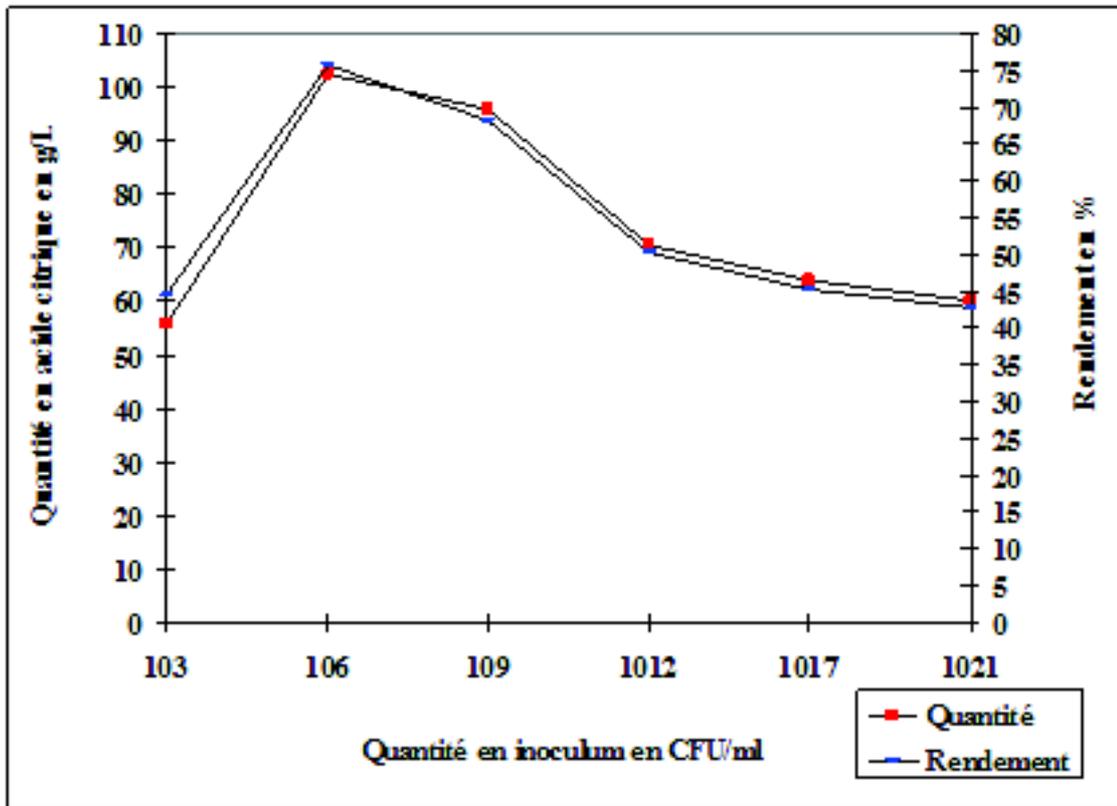


Figure 31 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la quantité en inoculum.

Ainsi, la quantité en inoculum optimale pour une production maximale en acide citrique est de 10^6 CFU/ml. Des résultats similaires ont été obtenus par Demirel *et al.* (2005); Ewary (1989); Haq *et al.* (2003); Papagianni *et al.* (1999); Rubina *et al.* (2003); Vergano *et al.* (1996). Par contre, Al-Obaidi et Berry (1981, 1982 b); Sikander *et al.* (20003 b); Sikander (2004) ont obtenu des rendements optimums avec une quantité en inoculum de 10^8 CFU/ml.

4-10- Effet du taux d'aération sur la production d'acide citrique

Dans cet essai on a utilisé uniquement l'extrait issu des rebuts de Deglet-Nour, afin de fixer le taux d'aération dans le milieu de fermentation. Le taux d'aération dépend de la souche, de la composition du milieu de fermentation et de la taille du fermenteur. Les résultats obtenus montrent que le pH diminue au fur et à mesure que le taux d'aération augmente. Ainsi, la valeur du pH passe de 2.13 pour un taux d'aération de 0.5 L/L/min à 1.75 pour un taux d'aération de 2.0 L/L/min (tableau 46).

Tableau 46 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant le volume en oxygène dissous.

Volume de l'oxygène dissous en L/L/min	0.5	1.0	1.5	2.0
pH	2.10	2.13	2.00	1.75
Biomasse sèche en g/L	5.62	6.62	7.47	11.56
Quantité en acide citrique en g/L	60.80	102.40	91.22	73.60
Rendement en %	47.02	75.79	64.23	55.21

Quant à la quantité de biomasse, cette dernière augmente avec le taux d'aération, elle passe de 5.62 g/L à 0.5 L/L/min à 11.56 g/L à 2.0 L/L/min. Concernant la quantité et le rendement en acide citrique, ces derniers passent de 60.8 g/L et 47.02 % à 0.5 L/L/min à 102.40 g/L et 75.79 % à un taux d'aération de 1.0 L/L/min pour chuter à 73.6 g/L et 55.21% à 2.0 L/L/min (figure 32).

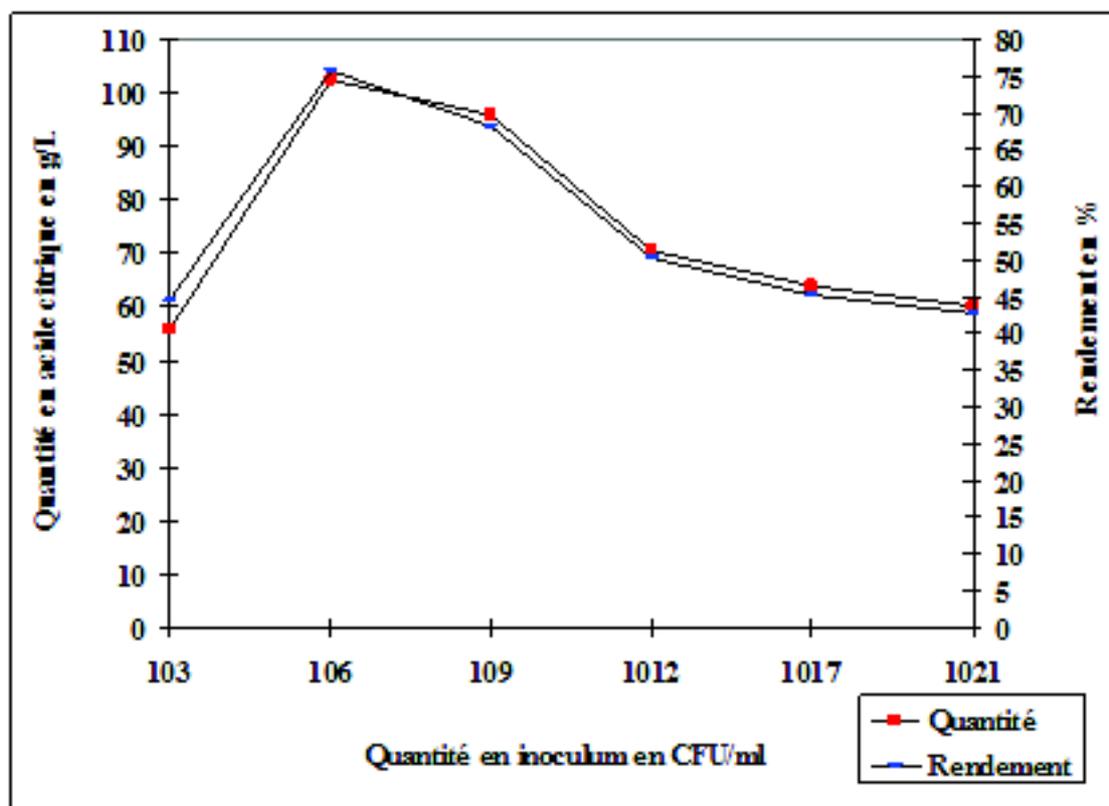


Figure 32 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant le taux d'aération.

Ainsi, le taux d'aération optimum pour une production maximale en acide citrique est de

1.0 L/L/min. Des résultats similaires ont été rapportés par Iqram *et al.* (2002); Sikander (2004). De même, Papagianni *et al.* (2005); Sayas et Hans-Jurgen (2006) ont obtenu des rendements élevés soient 110.0 98.0 g/L et 115.22 g/L, respectivement à un taux d'aération de 1.0 L/L/min en utilisant des souches d'*Aspergillus niger* ATCC et *Candida oleophila* ATCC 20177.

Par contre, Gomez *et al.* (1988) ont obtenu de meilleurs rendements à un taux d'aération de 1.5 L/L/min. Il est à noter que la demande en oxygène d'une culture en fermentation est si élevée que la quantité d'oxygène dans le milieu aqueux saturé est insuffisante (Sikander, 2004). Enfin, Papagianni (2007) a conclu que l'interruption de l'aération pendant

la fermentation, affecte la production de l'acide citrique, mais l'ampleur des dommages causés dépend de la durée d'interruption et de la phase de fermentation.

4-11- Effet de la source azotée et des différentes concentrations en nitrate d'ammonium sur la production d'acide citrique

Selon Matthey (1992), l'enrichissement du milieu de culture par ajout d'azote est nécessaire. Les résultats obtenus montrent que les valeurs du pH obtenus avec le carbonate d'ammonium sont légèrement élevées soient 2.40 à 2.55 par rapport au carbonate d'ammonium soient 2.10 à 2.15 (tableau 47).

Source azotée		Carbonate d'ammonium	Nitrate d'ammonium
Tinissine	pH	2.45	2.10
	Biomasse en g/L	12.80	7.14
	Quantité d'acide citrique en g/L	60.80	81.54
	Rendement en %	42.06	59.71
Rebut de Deglet-Nour	pH	2.40	2.13
	Biomasse en g/L	13.50	6.62
	Quantité d'acide citrique en g/L	67.20	102.40
	Rendement en %	47.42	75.79
Saccharose	pH	2.55	2.15
	Biomasse en g/L	8.32	5.42
	Quantité d'acide citrique en g/L	51.20	89.60
	Rendement en %	37.00	65.73

Tableau 47 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la source azotée

Quant à la quantité de biomasse, cette dernière est plus élevée soit 8.32 - 13.50 g/L avec le carbonate d'ammonium quel que soit le substrat utilisé par rapport au sulfate d'ammonium soit 5.42 - 7.14 g/L. Par ailleurs, l'utilisation du nitrate d'ammonium comme source azotée donne des quantités et rendements en acide citrique élevés soient 81.54 - 102.40 g/L et 59.71 - 75.79 %, respectivement par rapport au carbonate d'ammonium soient 51.20 - 67.20 g/L et 37.00 - 47.42 %, respectivement. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par [Saima et al.](#) (2003). Contrairement à nos résultats, Al-Obaidi et Berry (1982 a, b) ont obtenu de meilleurs rendements en acide citrique avec le carbonate d'ammonium.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que la valeur du pH final diminue légèrement avec l'augmentation de la teneur en nitrate d'ammonium dans le milieu. Ainsi, elle passe de 2.95 - 3.00 en absence du nitrate d'ammonium à 1.44 - 1.55 avec une teneur en nitrate d'ammonium de 3.0 g/L (tableau 48).

Quantité en nitrate d'ammonium en g/L		0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0
Tinissine	pH	2.95	2.95	2.85	2.10	1.60	1.55
	Biomasse en g/L	3.00	2.97	3.12	7.14	7.58	8.65
	Acide citrique en g/L	46.72	51.20	64.40	81.54	97.00	77.28
	Rendement en %	39.10	44.71	53.93	59.71	67.08	53.11
Rebut de Deglet-Nour	pH	3.00	3.00	2.88	2.13	1.55	1.44
	Biomasse en g/L	2.95	2.98	3.22	6.62	7.55	9.68
	Acide citrique en g/L	58.24	68.78	75.82	102.40	112.0	90.16
	Rendement en %	47.56	59.00	60.60	75.79	77.77	62.12

Tableau 48 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la teneur en nitrate d'ammonium

Quant à la quantité en biomasse, cette dernière augmente au fur et à mesure que la teneur en nitrate d'ammonium ajouté au milieu de fermentation devient plus importante et la quantité maximale soit 8.65 - 9.68 g/L est atteinte avec une teneur en nitrate d'ammonium de 3.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Papagianni *et al.* (2005). D'autre part, à de faibles teneurs en nitrate d'ammonium (≤ 1.0 g/L), on obtient des quantités et rendements en acide citrique faibles soient 46.72 - 75.82 g/L et 39.10 - 60.60 %, respectivement. D'autre part, des teneurs élevées en nitrate d'ammonium à savoir 2.0 et 2.5 g/L donnent des quantités et rendements élevés. Les optimums ont été obtenus avec la teneur en nitrate d'ammonium de 2.5 g/L à savoir 97.00 - 112.0 g/L et 67.08 - 77.70 % (figure 33).

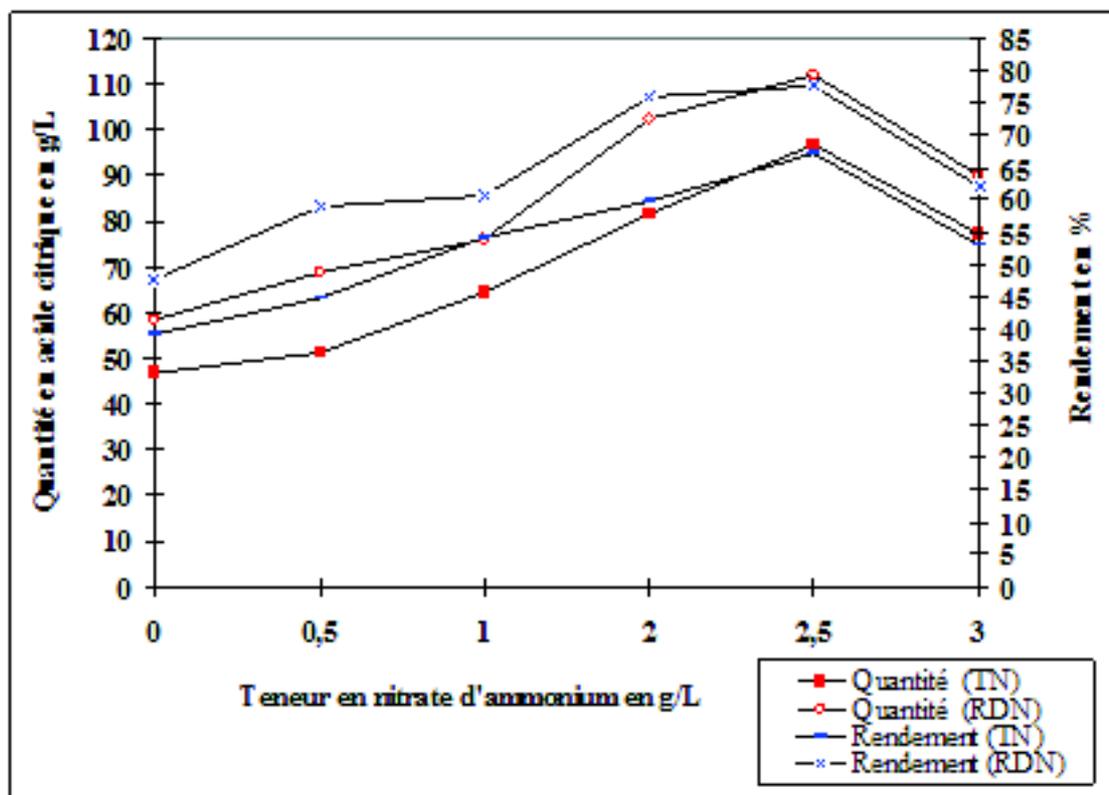


Figure 33 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la teneur en nitrate d'ammonium.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Al-Obaidi et Berry (1981); Sikander *et al.* (2002 a). L'avantage de l'utilisation du nitrate d'ammonium, est l'acidification du milieu de fermentation au fur et à mesure que les sels d'ammonium sont consommés et un pH acide favorise l'accumulation de l'acide citrique au cours de la fermentation (Mattey, 1992; Papagianni, 2007). De même, Al-Obaidi et Berry (1981); Sikander *et al.* (2002 b) ont obtenu des quantités maximales en acide citrique soient 67.8 et 89.64 g/L, respectivement en ajoutant au milieu de culture à base de mélasse, une quantité en nitrate d'ammonium de 2.5 g/L. Au-delà de 2.5 g/L, la production en acide citrique diminue pour atteindre 90.16 g/L et 62.12 % sur milieu à base de Rebutts de Deglet-Nour et 77.28 g/L et 53.11 % sur milieu à base de Tinissine avec une teneur en nitrate d'ammonium de 3.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Vandenberghe *et al.* (1999). Selon, Al-Obaidi et Berry (1981); Al-Obaidi et Berry (1982 b); Sikander *et al.* (2002 a), une teneur au dessus de 2.5 g/L a pour conséquence, la perturbation de la croissance fongique et de la production de l'acide citrique. Par ailleurs, Kristiansen et Sinclair (1978); Papagianni *et al.* (2005) ont obtenu des quantités maximales en acide citrique en ajoutant au milieu de culture une teneur en sulfate d'ammonium de 2.0 g/L. Enfin, [Saima et al.](#) (2003) ont obtenu un rendement maximum en acide citrique avec *Yarrowia lipolytica* en ajoutant au milieu de culture une teneur en nitrate d'ammonium de

3.0 g/L.

4-12- Effet des différentes concentrations en phosphore sur la production d'acide citrique

Les études relatives aux effets de limitation du phosphore ont été contradictoires. Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH final diminue légèrement au fur et à mesure que la quantité de phosphate de potassium devient plus importante. Ainsi, la valeur du pH passe de 3.10 avec une teneur en phosphate de potassium de 0.5 g/L à 1.55 avec une teneur de 3.0 g/L (tableau 49).

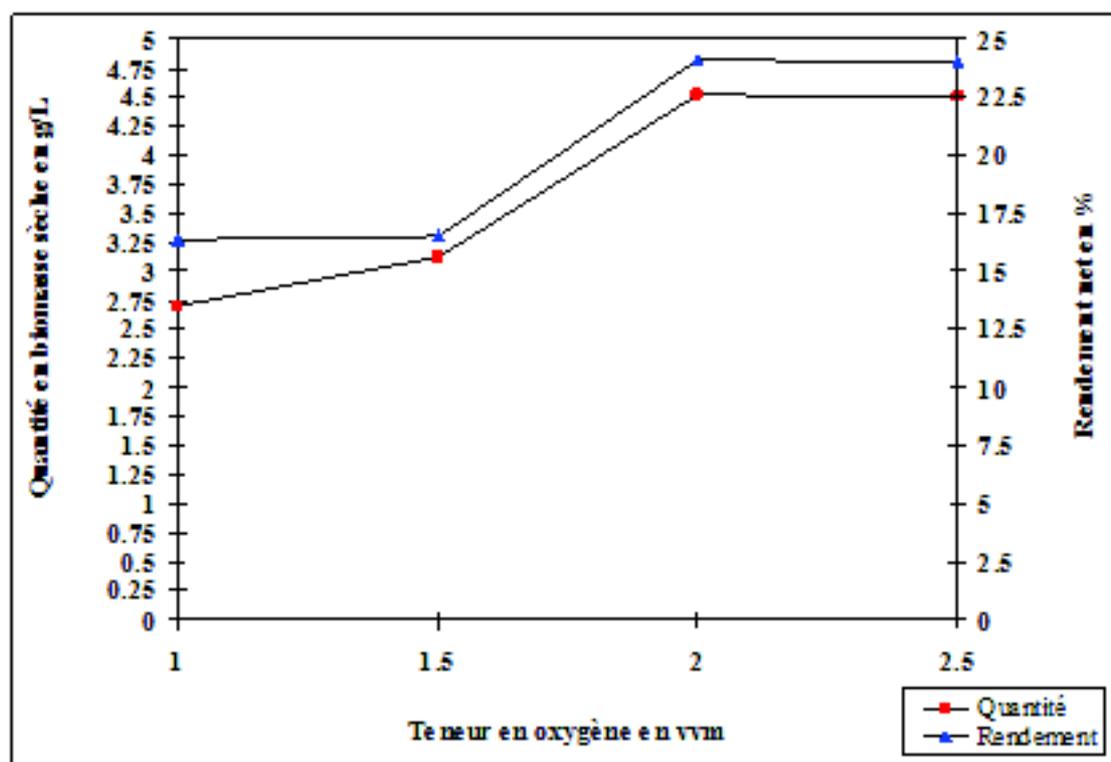


Tableau 49 : Evolution des différents paramètres de la fermentation suivant la teneur en phosphate de potassium.

Par ailleurs, lorsque les quantités en oligo-éléments ne sont pas limitantes, l'addition du phosphate a pour résultat une augmentation de la croissance d'*Aspergillus niger* (Papagianni, 2007). Ainsi, les résultats obtenus montrent que la quantité en biomasse augmente avec l'élévation du phosphore dans le milieu de fermentation. Cette dernière passe de 2.33 - 2.52 g/L avec une teneur en phosphate de potassium de 0.5 g/L à 8.44 - 8.63 avec une teneur en phosphate de potassium de 3.0 g/L.

Concernant, la production d'acide citrique, les résultats obtenus montrent que l'ajout de faibles quantités en phosphate (≤ 1.0 g/L) donnent des quantités et rendements en acide citrique faibles soient 46 - 58.22 g/L et 43.06 - 51.86 % sur milieu à base de Tinissine et 58.24 - 68.22 g/L et 56.00 - 61.87 % sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour (figure 34).

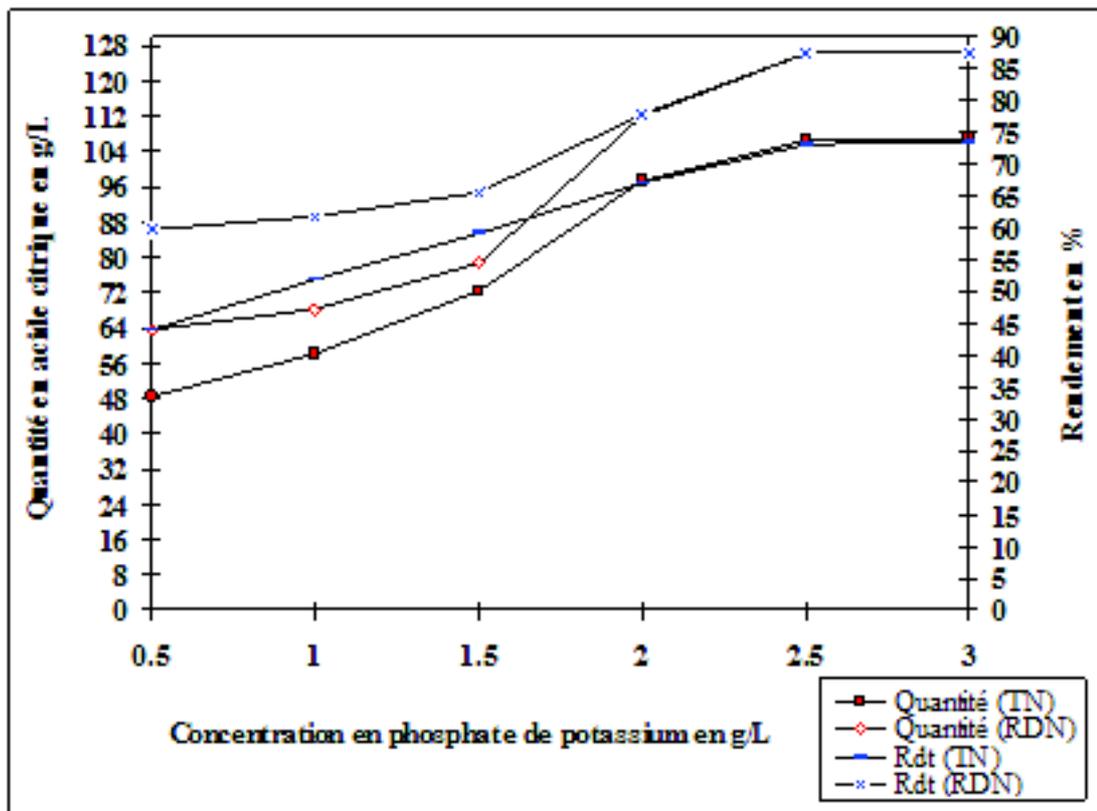


Figure 34 : Evolution de la quantité et du rendement en acide citrique suivant la teneur en phosphate de potassium.

Au-delà d'une concentration en phosphate de potassium de 1.0 g/L, la quantité et le rendement en acide citrique augmentent pour atteindre des maxima avec une teneur en phosphate de potassium de 2.5 g/L soient 106.44 - 126.40 g/L et 73.24 - 87.29 %, respectivement. Ainsi, la teneur en phosphore optimale pour une production maximale en acide citrique est de 2.5 g/L. De même, Kubicek et Rohr (1977); Sikander (2004); Tsay et To (1987) ont montré que l'accumulation de l'acide citrique est plus élevée lorsque la quantité de phosphore est de 2.0 à 2.5 g/L. Par contre, Asad *et al.* (2003) ont obtenu sur milieu de fermentation à base de mélasse, un rendement maximum en acide citrique soit 75.25 g/L en ajoutant au milieu de culture 1.5 g/L de phosphate de potassium. Toutefois, une quantité élevée ≥ 2.5 g/L en phosphore favorise la croissance d'*Aspergillus niger* au détriment de l'accumulation de l'acide citrique (Asad *et al.*, 2003).

4-13- Optimisation de la production d'acide citrique avec *Aspergillus niger* ANSS

Le milieu de culture utilisé est l'extrait de dattes obtenu à partir des rebuts de Deglet-Nour. Le matériel biologique utilisé est une souche d'*Aspergillus niger* isolée à partir des sols sahariens dénommée (ANSS). Le succès du processus de fermentation dépend à la fois du choix d'une souche appropriée et de l'optimisation des paramètres de culture.

Dans la présente étude, les conditions de fermentation tels que, la période de fermentation, la température, la teneur en sucres, la teneur en méthanol, le pH initial, le taux d'aération, la teneur en nitrate d'ammonium et la teneur en phosphate de potassium ont été

optimisés. La période d'incubation optimale pour une production maximale en acide citrique varie avec la souche et les conditions de fermentation. Les résultats obtenus montrent que la quantité en acide citrique produite évolue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre une valeur maximale soit 58.12 g/L après 144 h (figure 35).

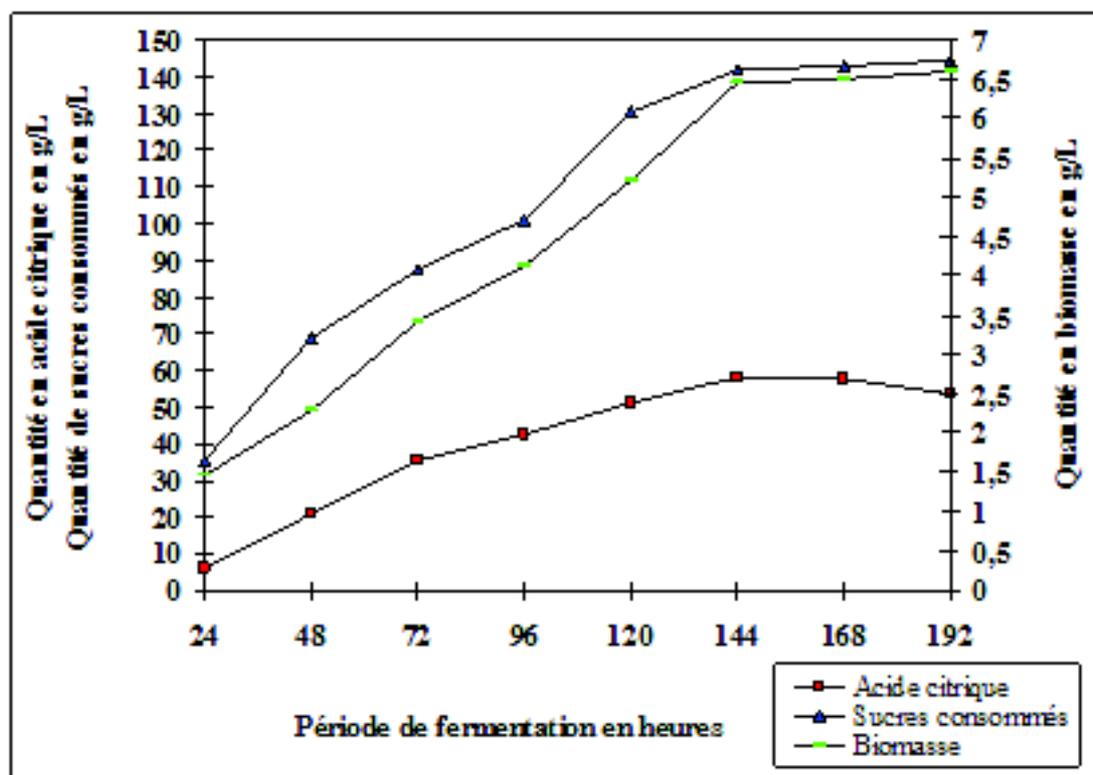


Figure 35 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique au cours de la fermentation.

Ainsi, la période optimale de fermentation pour une production maximale en acide citrique est de 144 h. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Abdulrahman *et al.* (2006); Iqram *et al.* (2002); Sikander *et al.* (2002 a). À la période d'incubation optimale, les quantités en sucres consommés et en biomasse sont de 142.0 et 6.45 g/L, respectivement. Enfin, au de là de 144 h de fermentation, une chute légère de la production est notée soit 53.44 g/L à 192 h. Des résultats similaires ont été signalés par Iqram *et al.* (2002); Wieczorek et Brauer (1998). Toutefois, Nadeem *et al.* (2010) ont obtenu des rendements élevés, 192 h après inoculation. En outre, Mazhar *et al.* (2004); Sikander *et al.* (2003 a) ont obtenu une production maximale en acide citrique sur milieu à base de mélasse, 168 h après inoculation.

Nos résultats sont meilleurs et plus significatifs comparés à ceux obtenus par les précédents auteurs, car, la réduction de la période de fermentation permet une diminution des coûts de production de l'acide citrique. Enfin, selon Arzumanov *et al.* (2000), la diminution de la productivité avec une période de fermentation plus longue est probablement due à l'épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs, à l'âge des mycètes et à une désintégration du système enzymatique responsable de la biosynthèse de l'acide citrique.

Par ailleurs, comme le montre la figure 36, la température a une profonde influence sur la production d'acide citrique. Lorsque la température est maintenue entre 20 °C et 25 °C, les quantités en acide citrique obtenues sont faibles soient 20.36 - 29.44 g/L, respectivement.

Les quantités en sucres consommés et en biomasse sont de 92.40 - 98.25 g/L et 3.68 - 5.45 g/L, respectivement.

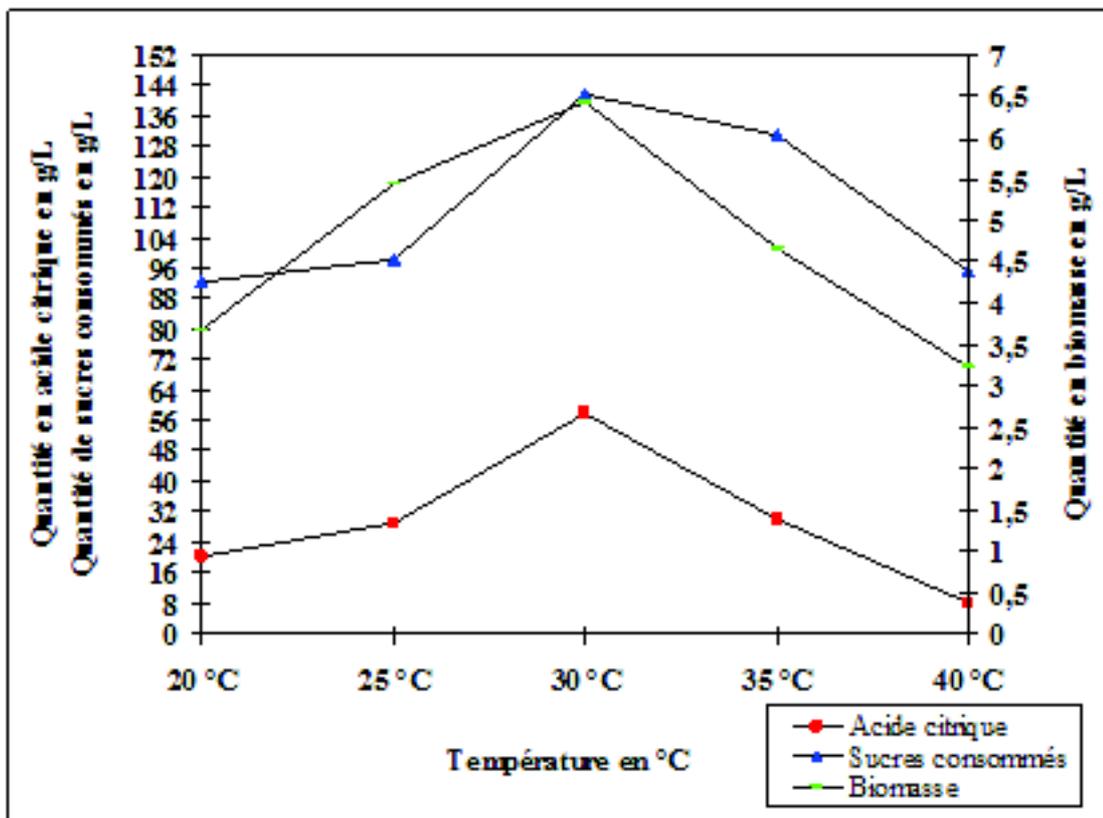


Figure 36 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant la température.

Lorsque la température du milieu est basse, l'activité enzymatique est faible et n'a aucun impact sur la production d'acide citrique (Sikander *et al.* 2002 a). La quantité optimale en acide citrique soit 58.12 g/L a été obtenue avec une température de 30 °C. Aussi, à la température optimale de 30 °C, les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues sont élevées soient 142.00 g/L et 6.45 g/L, respectivement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Abdulrahman *et al.* (2006); Arzumanov *et al.* (2000); Asad *et al.* (2002); Sayas et Hans-Jurgen (2006); Sikander *et al.* (2002 a). Par ailleurs, au fur et à mesure de l'élévation de la température, une diminution progressive de la production de l'acide citrique a été enregistrée. Ainsi, elle passe de 30.22 g/L à 35 °C à 8.45 g/L à 40 °C.

La diminution du rendement en acide citrique aux températures élevées (> 40 °C) est probablement due à la dénaturation de la citrate synthétase et à une accumulation de l'acide oxalique (Abdulrahman *et al.* 2006; Sikander 2004). Selon Asad *et al.* (2002), la température de 40 °C est plus favorable pour la production de l'acide oxalique alors que l'accumulation de l'acide citrique est complètement inhibée au delà de cette température. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues à ces températures (35 et 40 °C) sont de 131.15 - 95.45 g/L et 4.66 - 3.22 g/L, respectivement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Sikander (2004).

D'autre part, les résultats obtenus montrent que le maximum de production soit

58.12 g/L a été obtenu à une teneur en sucres du milieu de 150.0 g/L. Quant aux quantités de sucres consommés et en biomasse, elles sont de 142.00 et 6.45 g/L, respectivement (figure 37).

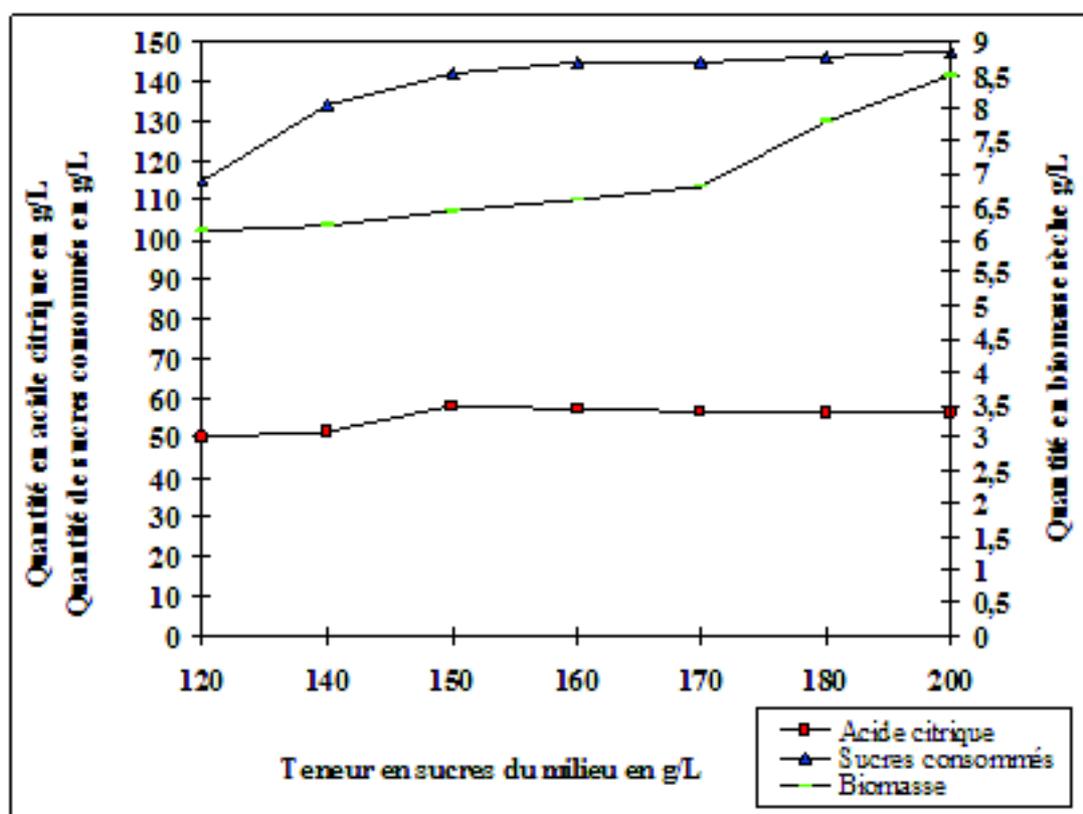


Figure 37 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant la teneur en sucres du milieu.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Abdulrahman *et al.* (2006); Demirel *et al.* (2005); El-Holi et Al-Delaimy (2003); Papagianni *et al.* (2005); Sikander *et al.* (2002 a). Par ailleurs, une chute légère soit 55.45 g/L a été observée lorsque la teneur en sucres du milieu a atteint 200.0 g/L. Ceci est peut être due à la croissance du mycélium, qui abouti à une viscosité accrue du milieu et à la formation de polyalcools (Demirel *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été rapportés par Iqram *et al.* (2002); Papagianni (2007); Sikander *et al.* (2002 a). En outre, une plus forte teneur en sucres \geq à 200.0 g/L, conduit à une plus grande quantité de sucres résiduels soit 52.55 g/L, rendant le procédé peu économique. Des résultats similaires ont été rapportés par Abdulrahman *et al.* (2006); Pazouki *et al.* (2000).

Enfin, la production d'acide citrique est faible soit 50.35 g/L à une teneur en sucres du milieu \leq à 120,0 g/L. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec cette teneur sont de 115.00 et de 6.12 g/L, respectivement.

En outre, les résultats obtenus montrent que la production de l'acide citrique augmente avec l'augmentation de la concentration en méthanol dans le milieu. Ainsi, l'ajout de 3.0 % de méthanol dans le milieu de fermentation donne une production en acide citrique de 75.28 g/L (figure 38).

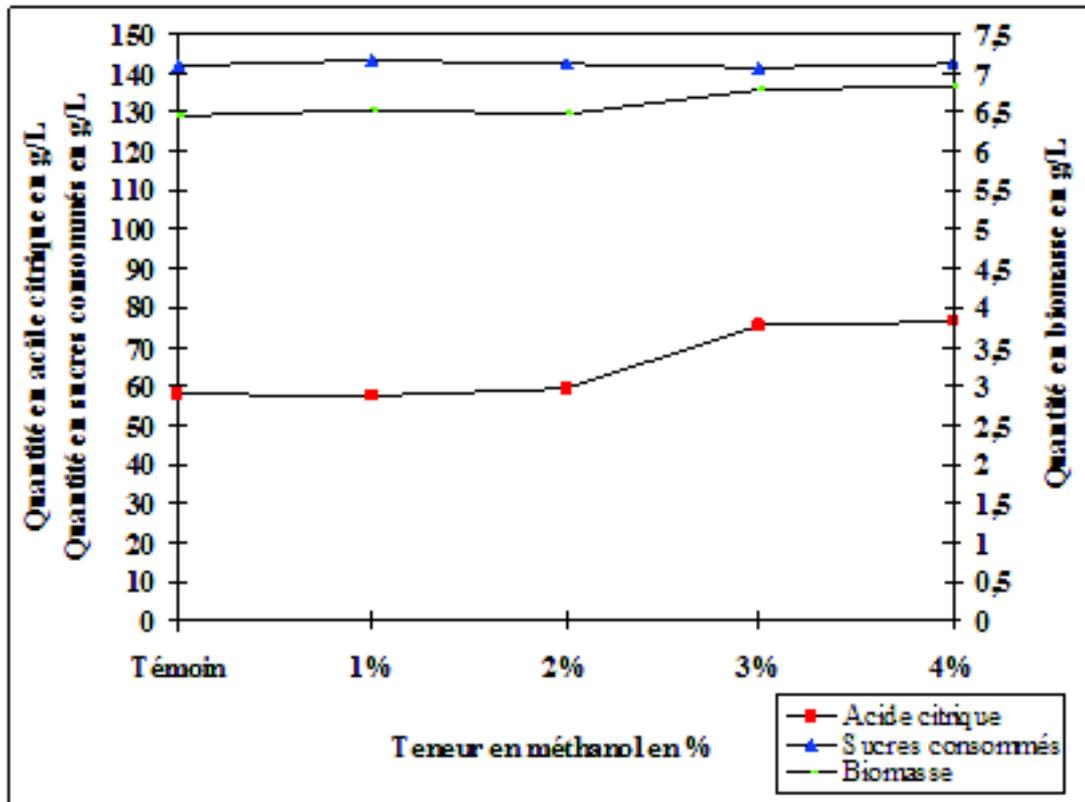


Figure 38 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant la teneur en en méthanol.

La concentration optimale en méthanol pour une production maximale en acide citrique est de 3.0 %. Au-delà, aucune amélioration significative de la production n'a été notée soit

76.56 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Demirel *et al.* (2005); El-Holi et Al-Delaimy (2003); Haq *et al.* (2003); Ikram *et al.* (2003); Sikander *et al.* (2002 b). Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec une concentration en méthanol de 3.0 % sont de 142.26 et de 6.84 g/L, respectivement. Toutefois, selon Rubina *et al.* (2003), l'ajout de 1.0 % de méthanol donne une production maximale en acide citrique. De même, Ikram *et al.* (2003); Nadeem *et al.* (2010) ont obtenu des rendements élevés en ajoutant 1.5 % de méthanol dans le milieu de fermentation.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que la production de l'acide citrique augmente au fur et à mesure que le pH initial du milieu devient plus acide. En ce sens, une quantité maximale soit 84.25 g/L a été obtenue avec un pH initial du milieu bas maintenu entre 2.5 et 3.5. Lorsque le pH initial du milieu de fermentation est maintenu entre 2.5 - 3,5, les quantités en sucres consommés et en biomasse sont élevées soient 140.15 et 6.88 g/L, respectivement (figure 39).

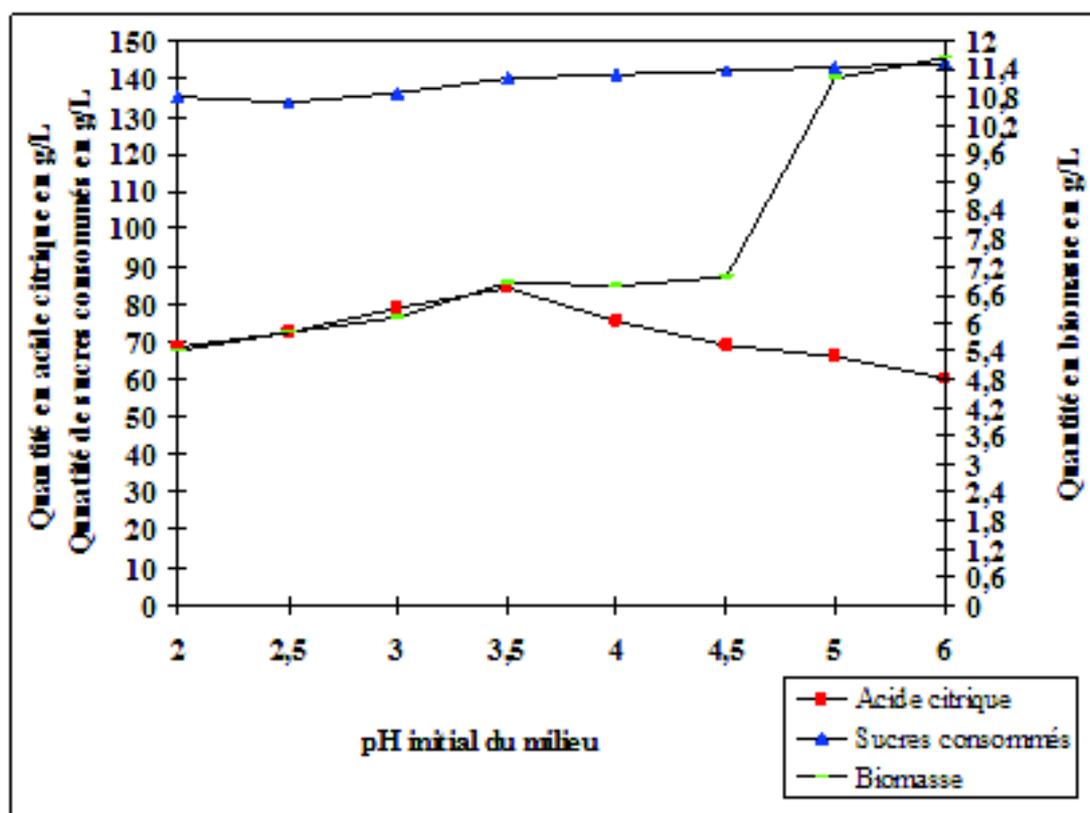


Figure 39 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant le pH initial

Ces résultats sont en cohérence avec les conclusions de *Walid et al.* (2006) qui ont obtenu un rendement maximum à un pH initial de 3.5 - 4.0. Selon, *Papagianni et al.* (2005), un pH initial bas inférieur à 3.0 inhibe la production d'autres acides organiques tels, l'acide gluconique et l'acide oxalique. En outre, un pH initial bas inhibe légèrement la croissance d'*Aspergillus niger* et réduit le risque de contamination du milieu de fermentation par d'autres micro-organismes. Ainsi, la quantité en biomasse obtenue à pH 2.0 - 2.5 est faible variant entre 5.41 et 5.79 g/L.

Lorsque le pH initial augmente au-delà de 4.5, la production en acide citrique diminue en conséquence et les quantités obtenues à pH initiaux de 4.5, 5.0 et 6.0 sont de 69.14, 66.32 et 60.14 g/L, respectivement. Les quantités en sucres consommés et en biomasse sont de 142.12, 143.18, 144.00 g/L et 7.00, 11.20, 11.65 g/L, respectivement. Un pH initial élevé conduit à l'accumulation de l'acide oxalique (*Papagianni, 2007; Sikander et al., 2002 a*).

Selon *Papagianni et al.* (2005), l'augmentation du pH initial à 5.0 au cours de la phase de production, réduit le rendement final en acide citrique de près de 80%. Toutefois, *Ikram et al.* (2002) ont obtenu des rendements maximums, avec un pH initial du milieu de 6.0. De même, *Abdulrahman et al.* (2006) ont obtenu des rendements maximums à pH 5.5. Enfin, *Walid et al.* (2006) recommandent un pH initial du milieu de 4.0 afin d'optimiser la production de l'acide citrique.

D'autre part, les résultats obtenus montrent que la quantité en acide citrique passe de 45.37 g/L à un taux d'aération de 0.5 L/L/min à 80.32 g/L pour un taux d'aération de

1.5 L/L/min pour atteindre un maximum de 84.25 g/L à un taux d'aération de 1.0 L/L/min. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues aux taux d'aération de 0.5 et

1.5 L/L/min sont de 127.32 - 136.12 g/L et de 5.55 - 7.52 g/L, respectivement (figure 40).

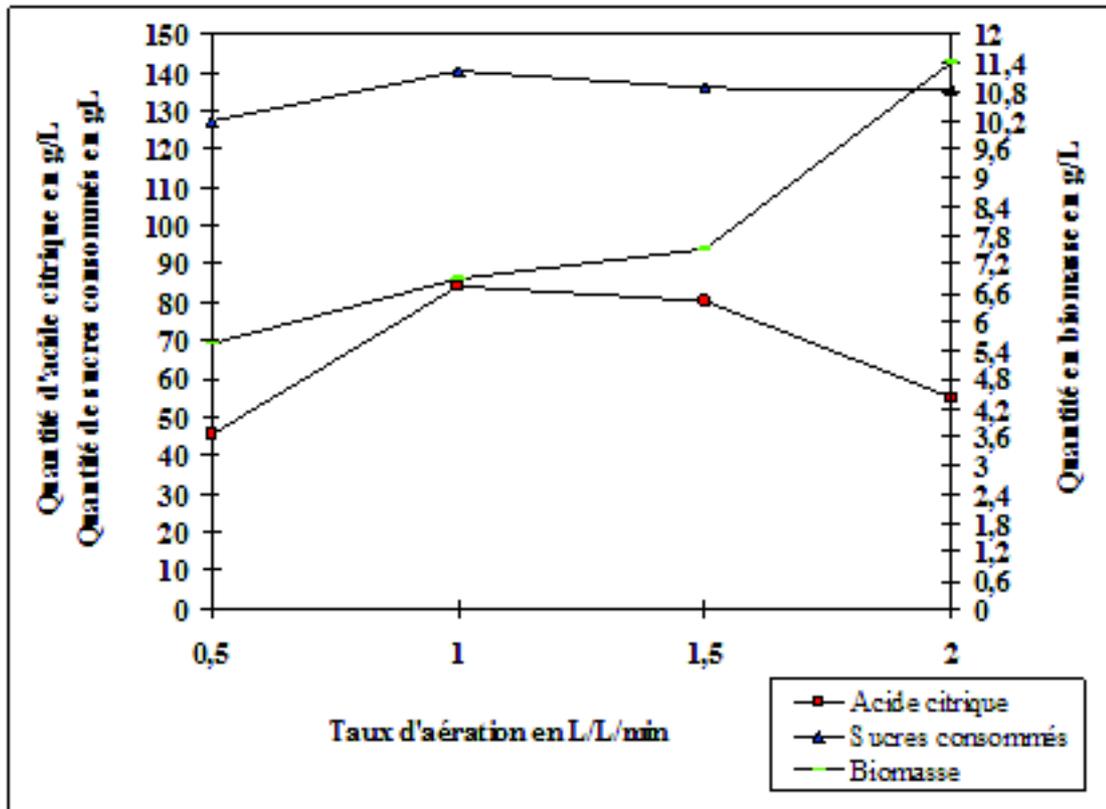


Figure 40 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant le taux d'aération.

Ainsi, le taux d'aération optimal pour une production maximale en acide citrique est de

1.0 L/L/min. Ceci est probablement dû à une bonne aération assurant une alimentation suffisante en oxygène. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec le taux d'aération optimum sont de 140.15 et 6.88 g/L, respectivement. Des résultats similaires ont été rapportés par Iqram *et al.* (2002); Sikander (2004). Enfin, la production d'acide citrique est de 55.28 g/L à un taux d'aération de 2.0 L/L/min. Par contre, la production de biomasse sèche s'élève à 11.42 g/L à ce taux d'aération.

D'autre part, les résultats obtenus montrent que les faibles teneurs en nitrate d'ammonium (≤ 1.5 g/L) donnent des quantités en acide citrique et en biomasse faibles soient 31.28 - 65.62 g/L et 1.21 - 3.85 g/L, respectivement (figure 41). Ceci pourrait être dû à la baisse de la quantité d'azote disponible pour une croissance convenable du mycélium.

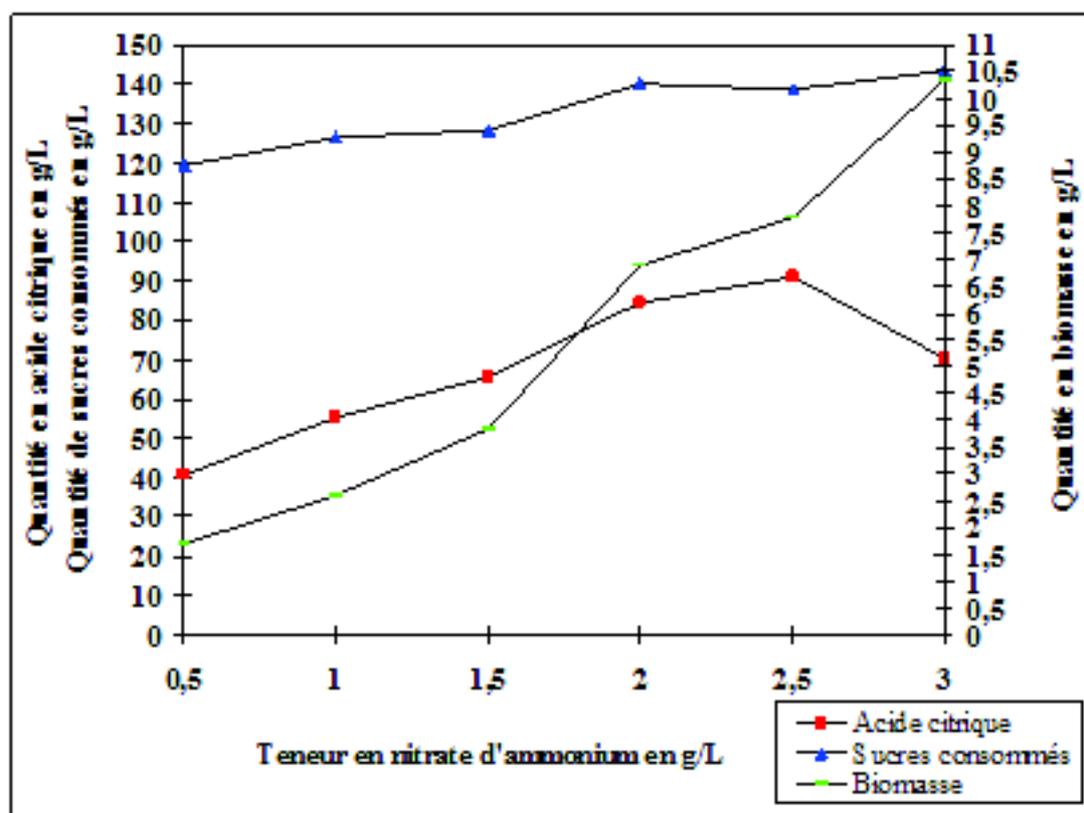


Figure 41 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant la teneur en nitrate d'ammonium.

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de Wieczorek et Brauer (1998) qui ont obtenu des rendements élevés avec une teneur en nitrate d'ammonium de 1.0 g/L. Dans cette étude, le rendement maximum soit 91.15 g/L a été obtenu avec une teneur en nitrate d'ammonium de 2.5 g/L. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec cette concentration sont de 138.45 et 7.78 g/L.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sikander (2004). Un avantage de l'utilisation du nitrate d'ammonium est que l'utilisation des sels d'ammonium par *Aspergillus niger* provoque une acidification du milieu de culture au fur et à mesure de la consommation de ces sels et un pH bas favorise l'accumulation de l'acide citrique (Papagianni, 2007). Par ailleurs, Vandenberghe *et al.* (1999) ont noté que des teneurs en azote supérieures à 2.5 g/L aboutissent à l'augmentation de la croissance fongique, à la diminution de la quantité en acide citrique produite et à l'accumulation de l'acide oxalique.

Ainsi, dans cette étude, nous avons noté une diminution de la production de l'acide citrique et la quantité obtenue est de 70.12 g/L à une teneur en nitrate d'ammonium \geq à 3.0 g/L. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec une teneur en nitrate d'ammonium de 3.0 g/L sont de 143.40 et 10.33 g/L, respectivement. Des résultats similaires ont été également obtenus par Demirel *et al.* (2005). Par contre, Ikram *et al.* (2005); Saima *et al.* (2003) ont obtenu de meilleurs rendements avec une teneur en nitrate d'ammonium de 3.0 g/L.

Enfin, les résultats obtenus montrent que l'ajout de faibles teneurs en phosphate de potassium \leq 1,0 g/L, donnent des quantités en acide citrique et en biomasse faibles soient 48.52 - 56.64 g/L et 2.39 - 3.96 g/L, respectivement. Ceci pourrait être dû à la baisse de la

quantité de phosphore disponible dans le milieu afin d'assurer une croissance convenable du mycélium.

D'autre part, une production maximale en acide citrique soit 98.42 g/L, une quantité en biomasse élevée soit 7.92 g/L et une quantité en sucres consommés élevée soit 146.12 g/L ont été obtenues avec une teneur en phosphate de potassium de 2.5 g/L. Par ailleurs, une légère diminution de la quantité en acide citrique soit 96.66 g/L a été notée avec une teneur en phosphate de potassium \geq à 3.0 g/L. Les quantités en sucres consommés et en biomasse obtenues avec cette concentration sont de 146.45 et 9.96 g/L, respectivement (figure 42).

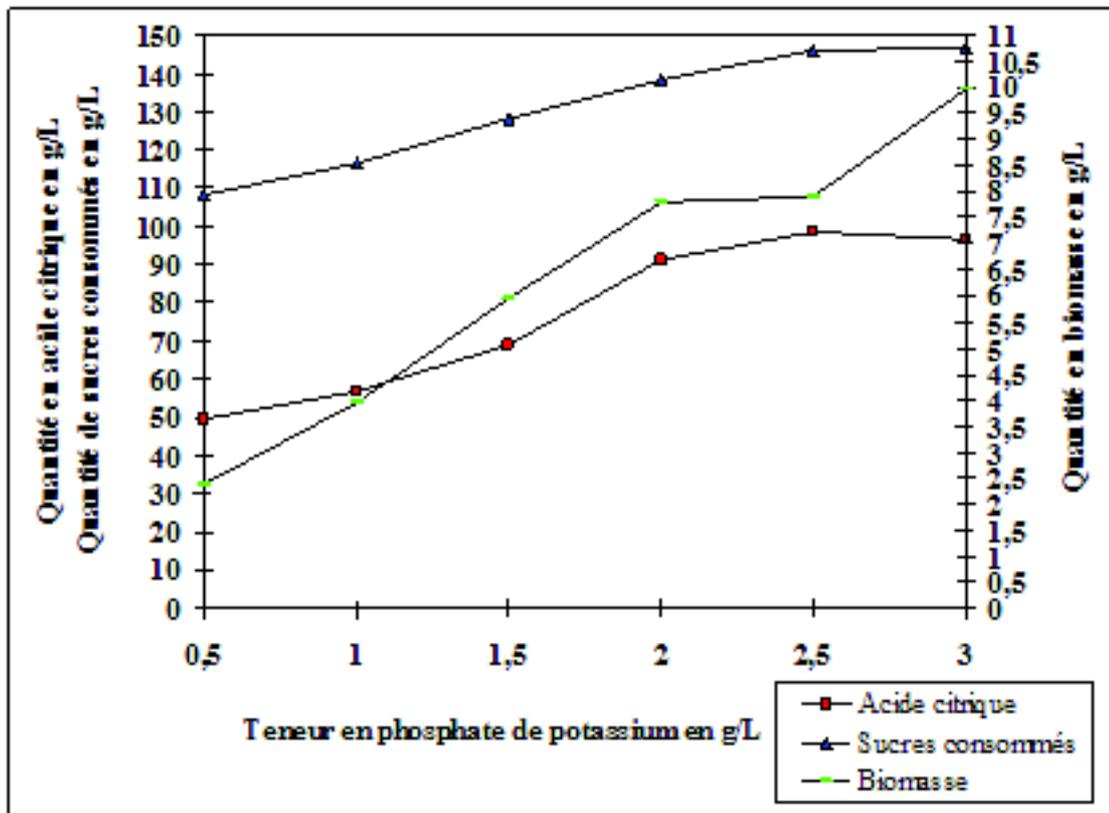


Figure 42 : Evolution des quantités en biomasse, sucres consommés et acide citrique suivant la teneur en phosphate de potassium.

Des résultats similaires ont été obtenus par Kubicek et Rohr (1977); Sikander (2004). Par contre, Sikander (2004) a obtenu un rendement élevé avec une teneur en phosphate de potassium variant entre 2.0 et 2.5 g/L. Toutefois selon, Assad *et al.* (2003), des teneurs élevées \geq 2,5 g/L en phosphate de potassium favorisent la croissance d'*Aspergillus niger*.

Chapitre-V : Production de l' α -amylase

5-1- Optimisation des paramètres de production de l' α -amylase par utilisation d'*Aspergillus niger* ATCC 16404

5-1-1- Effet de la durée d'incubation

Les résultats obtenus montrent que la production en biomasse évolue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre 1.22 -1.54 g/L à 48 h puis 1.87 - 1.96 g/L à 96 h et un maximum de 2.12 - 2.22 g/L à 120 h (figure 43). Aussi, on constate qu'au-delà de 96 h, la croissance cellulaire augmente lentement indiquant que la souche a atteint sa phase stationnaire.

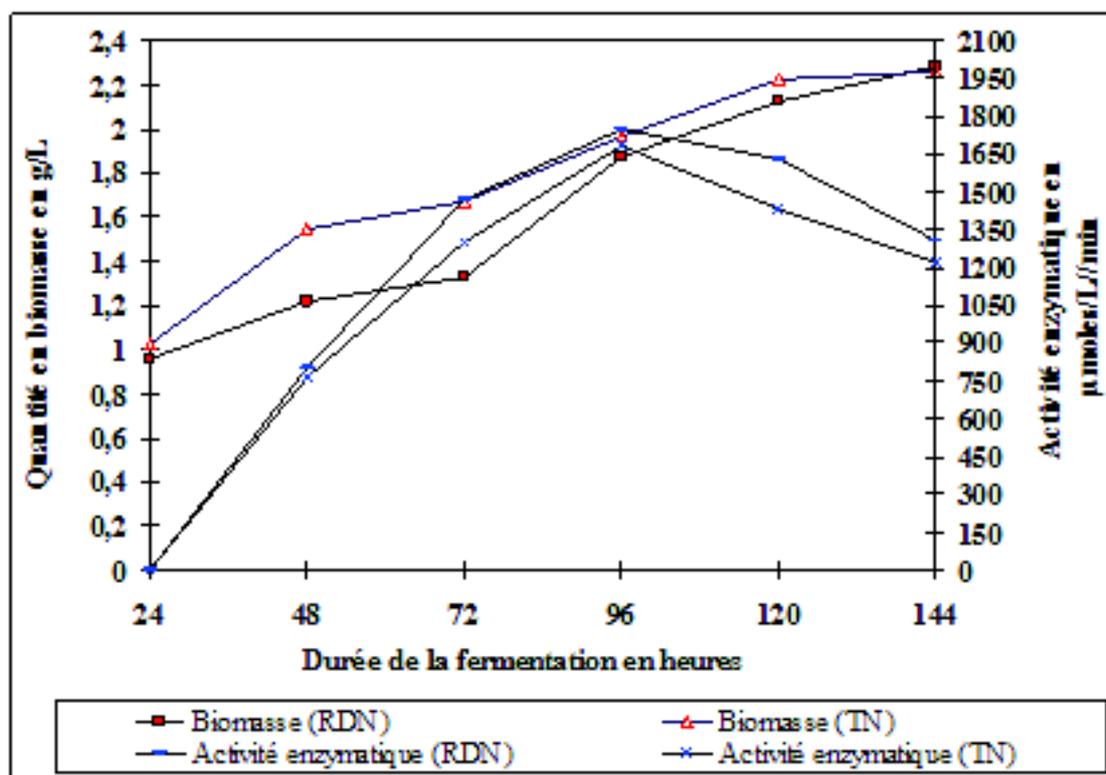


Figure 43 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique au cours de la période de fermentation.

Des résultats similaires ont été obtenus par Guillen-Moreira *et al.* (1999). La durée d'incubation optimale pour atteindre une production maximale en enzymes est régie par les caractéristiques de la culture et est dépendante du taux de croissance de la souche et du taux de production de l' α -amylase. Ainsi, les résultats obtenus montrent que la production d' α -amylase commence à partir de 48 h soient 800.00 et 760 μ moles/L/min sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement pour atteindre des valeurs maximales à

96 h soient 1748.00 et 1680.66 μ moles/L/min, respectivement. A cet effet, on peut dire que la période optimale pour une production maximale en α -amylase est de 96 h. Des résultats similaires ont été rapportés par Kathiresan et Manivannan (2006); Selvakumar *et al.* (1998); Wang *et al.* (2008).

Par contre, Kunamneni *et al.* (2005) signalent une production d' α -amylase élevée à 120 h avec une souche de *Thermomyces lanuginosus*. En outre, Lagzouli *et al.* (2007) ont obtenu de meilleurs résultats à 72 h avec la souche *Candida guilliermondii*. D'autre part, la production d'enzymes diminue progressivement au-delà de 96 h. Ainsi, l'activité enzymatique obtenue à 144 h est de 1310.66 μ moles/L/min sur milieu à base de rebuts de

Deglet-Nour et 1220.33 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieu à base de Tinissine. Des résultats similaires ont été obtenus par Guillen-Moreira *et al.* (1999). La baisse des rendements en enzymes après 96 h est peut être aussi dû à la dénaturation ou à la décomposition de l' α -amylase suite à l'interaction avec d'autres composés du milieu tels que rapportés par Ramesh et Lonsane (1987). La production d' α -amylase est maximale lorsque le champignon a atteint sa phase exponentielle de croissance. A cet effet, Carlsen *et al.* (1996) ont noté que la production d' α -amylase est étroitement associée à la croissance du champignon avec des taux de production en α -amylase faibles aux faibles taux de croissance. Ainsi, on peut dire que la croissance du mycélium est cruciale pour une production maximale de protéines extra cellulaires.

5-1-2- Effet de la température

La variation de la température peut provoquer des changements dans le profil métabolique des micro-organismes. Ainsi, la meilleure température de production d'amylase est située dans la gamme des mésophiles (Vidyalakshmi *et al.*, 2009). La température est l'un des facteurs essentiels qui affectent fortement les processus fermentaires par fermentation submergée ou par SSF (Vidyalakshmi *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus montrent que la production de biomasse est maximale à température de 30 °C soit 1.87 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et 1.96 g/L sur milieu à base de Tinissine. Par contre, la croissance cellulaire diminue au fur et à mesure que la température du milieu de culture augmente et les quantités en biomasse obtenues à la température de 45 °C sont de 0.35 et 0.32 g/L sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement (figure 44). Ainsi, on peut dire qu'aux températures élevées (≥ 40 °C), la croissance cellulaire d'*Aspergillus niger* est fortement inhibée.

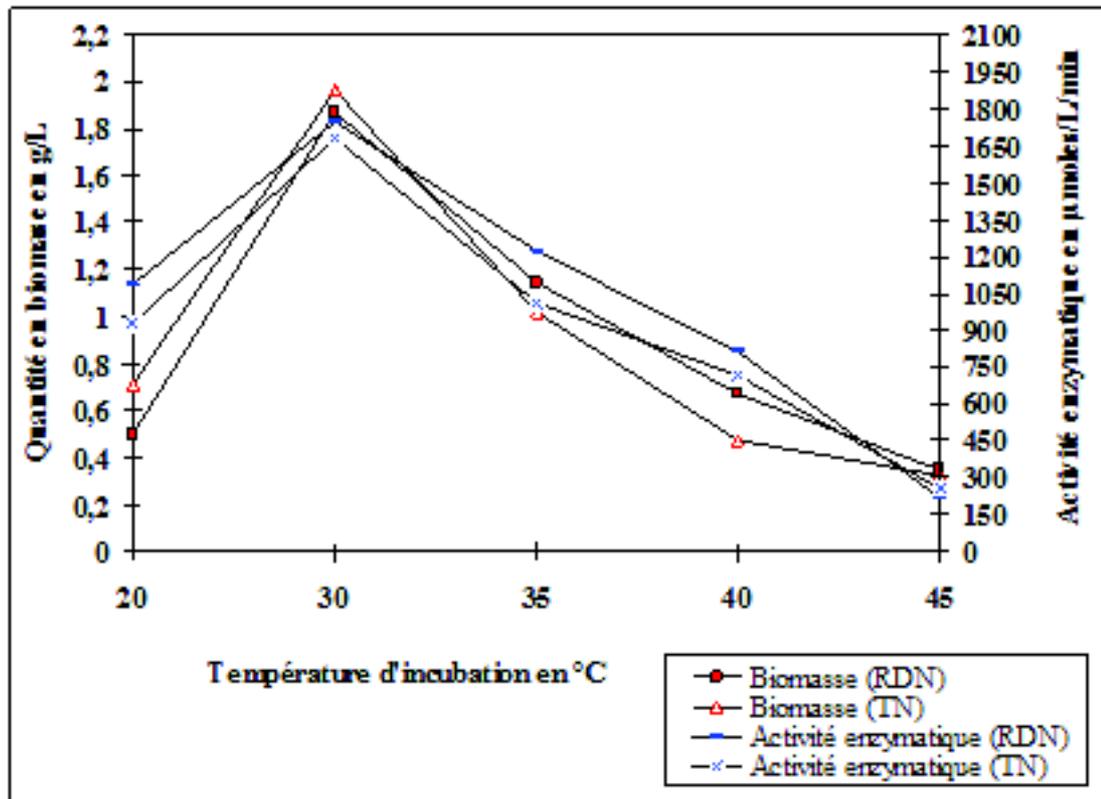


Figure 44 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la température.

Les mêmes constatations ont été rapportées par Pandey *et al.* (2000); Vidyalakshmi *et al.* (2009). La température de croissance est un paramètre très important qui varie d'un micro-organisme à un autre et de légères modifications de la température de croissance peuvent affecter la production d' α -amylase (Nawaz-Bhatti *et al.*, 2007). Des quantités assez importantes en α -amylase ont été produites par *Aspergillus niger* sur une gamme de température variant entre 20 °C et 40 °C, avec un optimum à 30 °C soient 1748.33 et

1680.66 μ moles/L/min sur milieux à base rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement. Il est à noter que, Alva *et al.* (2007); Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006); Ramachandran *et al.* (2004); Renato et Nelson (2009); Selvakumar *et al.* (1998); Wang *et al.* (2008) ont obtenu des résultats similaires. Par ailleurs, l'élévation de la température du milieu de culture entraîne une diminution importante de l'activité enzymatique.

Ainsi, au dessus d'une température de 35 °C, la production d' α -amylase diminue fortement et les activités enzymatiques obtenues sur milieux à base rebuts de Deglet-Nour et Tinissine aux températures de 40 et 45 °C sont de 816.66 - 713.66 μ moles/L/min et 215.66 - 252.33 μ moles/L/min, respectivement. En outre, les températures élevées peuvent non seulement affecter la croissance cellulaire du champignon mais aussi elles peuvent le détruire.

Ainsi, l'activité enzymatique est presque deux fois moins élevée à 40 °C par rapport à 30 °C. Les températures élevées, produisent de grandes quantités de chaleur métabolique provoquant ainsi une élévation de la température du substrat, qui inhibe à son tour la croissance microbienne et delà la synthèse d'enzymes (Nawaz-Bhatti *et al.*, 2007). D'autre part selon, Sindhu *et al.* (2009), une température au-dessus de 45 °C peut provoquer une diminution importante de l'humidité du substrat, qui affecte à son tour l'activité métabolique du micro-organisme qui aboutit à une croissance réduite et une production faible en α -amylase.

Par contre, Kunameni *et al.* (2005); Ravi *et al.* (2009) signalent que la température optimale pour une production maximale en amylase avec *Thermomyces langinosus* et *Humicola lanuginosa* est de 50 °C.

5.1.3/ Effet du pH initial

Parmi les paramètres physico-chimiques testés, le pH du milieu joue un rôle important car il provoque des changements morphologiques du micro-organisme utilisé et la sécrétion de l'enzyme est à son tour affectée. Par conséquent, la sélection d'un pH optimum est essentielle pour la production d' α -amylase. Selon Soni *et al.* (1992), la synthèse de

l' α -amylase extra-cellulaire est affectée par le pH, tout comme sa sécrétion et la stabilité du système amylolytique. Les résultats obtenus montrent que la quantité en biomasse maximale a été obtenue avec un pH initial de 5.5, soit 2.25 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et 2.38g/L sur milieu à base de Tinissine. Par contre, les quantités en biomasse les plus faibles ont été obtenues aux pH 4.0 et 9.0, soient 1.04 - 1.12 g/L et 1.12 - 1.22 g/L sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement (figure 45). Quant à l'activité enzymatique, les maxima soient 1836.33 et 1712.00 μ moles/L/min sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement ont été obtenues avec un pH initial de 5.5.

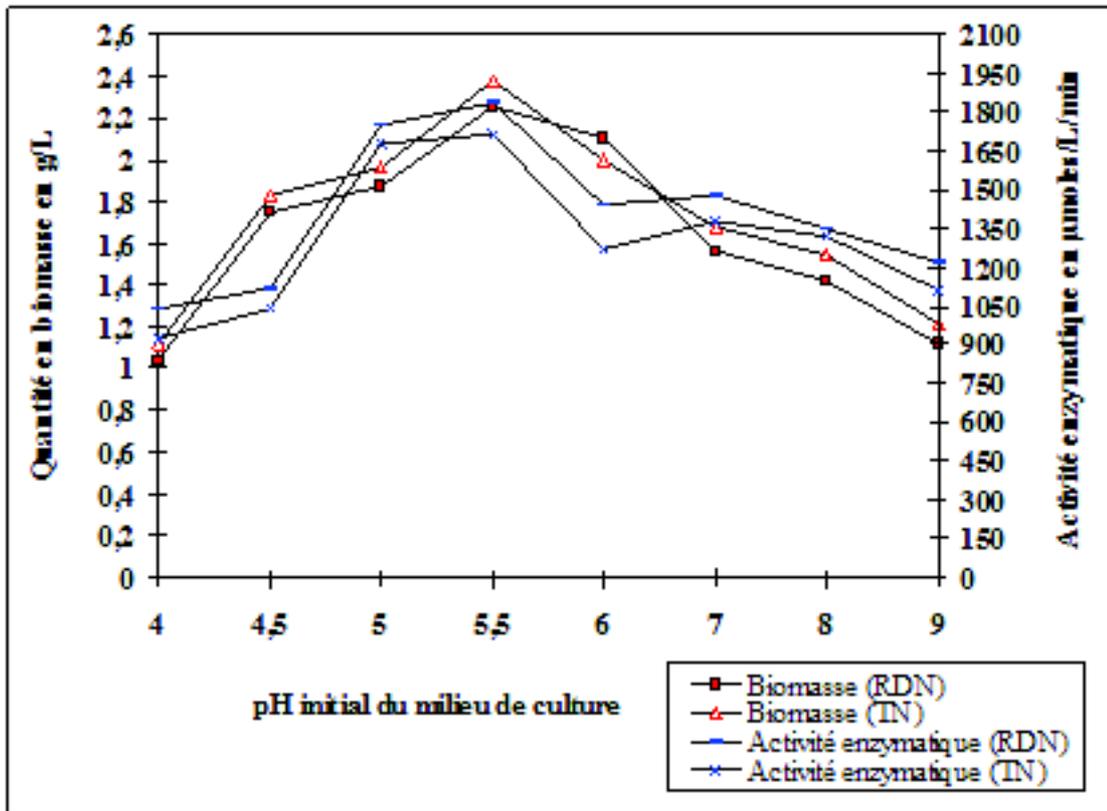


Figure 45 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant le pH initial.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Alva *et al.* (2007); Anto *et al.* (206); Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006); Hernandez *et al.* (2006); Renato et Nelson (2009) avec les souches d'*Aspergillus sp* et *Aspergillus niger*.

Par contre, Gangadharan *et al.* (2006); Pavezzi *et al.* (2008) rapportent qu'un pH de 3.5 à 4.0 est meilleur pour une production maximale en α -amylase avec *Bacillus amyloliquefaciens* et *Aspergillus awamori*. Par ailleurs, lorsque le pH est au dessus ou en dessous de l'optimum, la production en α -amylase diminue fortement et les activités enzymatiques obtenues aux pH 4.0 et 9.0 sont de 1042.50 et 1212.33 μ moles/L/min sur milieu à base de Rebutis de Deglet-Nour et 923.12 et 1110.00 μ moles/L/min sur milieu à base de Tinissine. A cet effet, Guillen-Moreira *et al.* (1999) signalent que la croissance des micro-organismes et la production d'enzymes sont inhibées lorsque le pH initial du milieu est supérieur à 10.0 ou inférieur à 4.0.

5-1-4- Effet de la teneur en sucres

Les résultats obtenus montrent que la croissance d'*Aspergillus niger* ATCC16404 varie suivant la teneur en sucres. Ainsi, la croissance augmente d'une manière proportionnelle à l'augmentation de la teneur en sucres du milieu pour atteindre des valeurs maximales à

20.0 g/L, soient 2.54 et 2.74 g/L sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement (figure 46). Quant à l'activité enzymatique, cette dernière augmente avec l'élévation de la teneur en sucres du milieu pour atteindre des valeurs maximales à

20.0 g/L soient 2283.00 et 1984.00 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement.

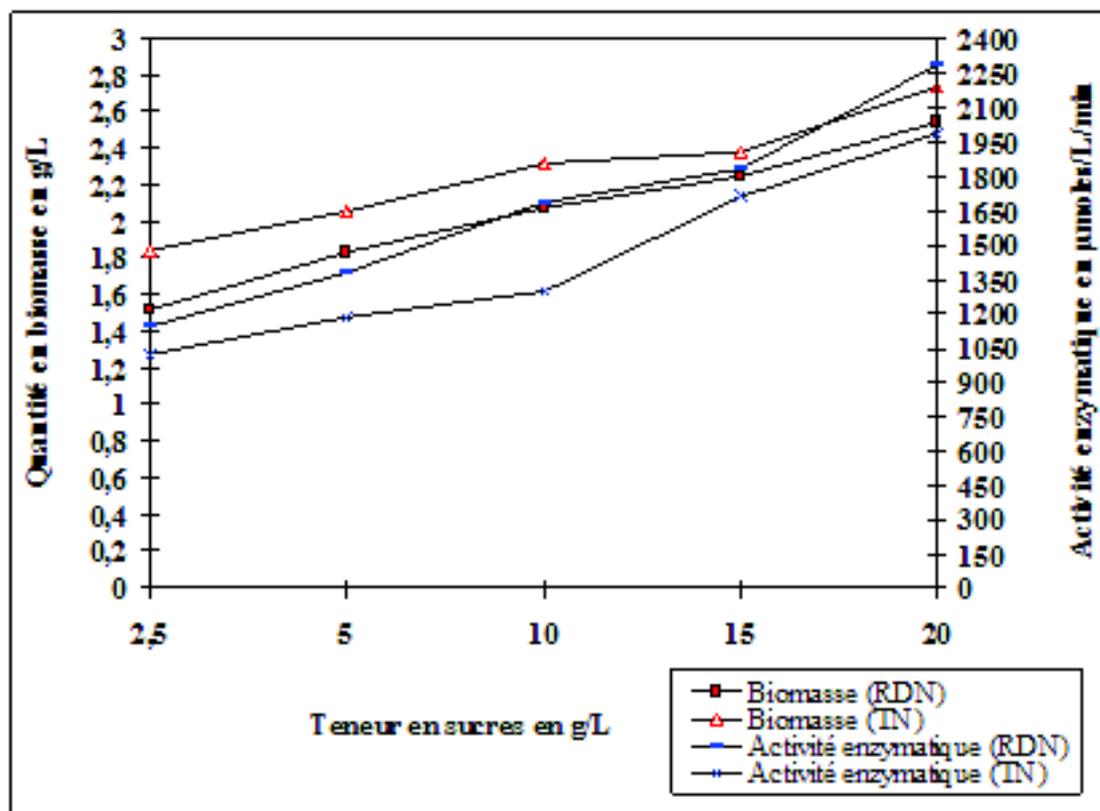


Figure 46 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en sucres.

Ainsi, la concentration en sucres maximale pour une production maximale en α -amylase est de 20.0 g/L. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Duran-Paramo *et al.* (2000) avec *Bacillus subtilis* et Hernandez *et al.* (2006) avec *Aspergillus niger*.

Par contre, les quantités en α -amylase, les plus faibles ont été obtenues avec une concentration en sucres du milieu de 2.5 g/L soient 1141.25 et 1023.66 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement.

5-1-5- Effet de la source azotée

Les résultats de la figure 47 montrent que les quantités en biomasse les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait de levure soient 2.79 g/L et 3.12 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement, suivi par l'urée soient 2.54 et 2.74 g/L, le lait en poudre soient 2.16 et 2.63 g/L, le nitrate d'ammonium soient 2.08 et 2.56 g/L, la peptone soient 1.93 et 2.12 g/L et l'extrait de viande soient 1.92 et 2.02 g/L. Les plus faibles quantités en biomasse ont été obtenues avec le carbonate d'ammonium, soient 1.63 g/L sur milieu de rebuts de Deglet-Nour et 1.36 g/L sur milieu à base de Tinissine.

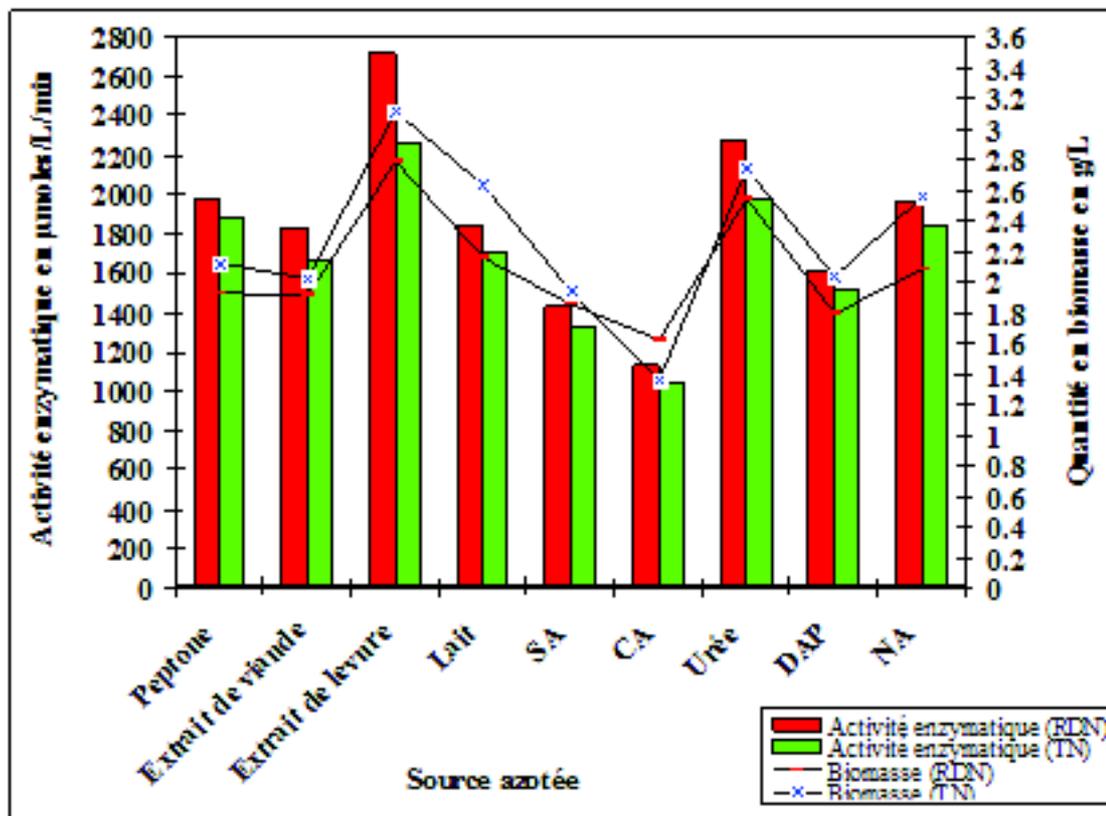


Figure 47 : Evolution de la quantité de biomasse et de l'activité enzymatique suivant la source azotée.

Selon Ramachandran *et al.* (2004), l'ajout d'azote au milieu de culture a un effet inducteur sur la production de diverses enzymes, y compris les α -amylases. Aussi selon, Dharani-Aiyer (2004), la teneur et la nature de la source azotée jouent un rôle important dans la synthèse

d' α -amylase. Parmi les sources d'azote testées, le maximum d' α -amylase produite a été obtenu avec l'extrait de levure soit 2716.66 et 2264.00 $\mu\text{moles/L/min}$ suivi de l'urée et de la peptone soit 2283.00 - 1984.00 et 1966.66 - 1880.00 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement.

Par contre, les plus faibles quantités ont été obtenues avec le carbonate d'ammonium et le sulfate d'ammonium soit 1133.33 - 1048.66 $\mu\text{moles/L/min}$ et 1436.00 - 1329.00 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Cherry *et al.* (2004); Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006); Lagzouli *et al.* (2007); Nguyen *et al.* (2000).

Par ailleurs, Dharani-Aiyer (2004); Kathiresan and Manivannan (2006); Kunamneni *et al.* (2005) ont obtenu de meilleurs résultats en utilisant la peptone comme source azotée. Par ailleurs, Ramachandran *et al.* (2004) signalent que la présence de sources azotées organiques tels que, l'extrait de levure et la peptone améliorent d'une manière significative la production en α -amylase par *Aspergillus niger*, par contre, la source d'azote inorganique en l'occurrence le chlorure d'ammonium, la réduit d'une manière notable.

Toutefois, le nitrate d'ammonium améliore légèrement l'activité enzymatique soit 1960.66 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et 1840.00 $\mu\text{moles/L/min}$

L/min sur milieu à base de Tinissine. Enfin, l'apport du carbonate d'ammonium comme source azotée a une influence négative, car on obtient une chute importante de l'activité enzymatique soit 1133.33 μ moles/L/min sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et 1048.66 μ moles/L/min sur milieu à base de Tinissine. Par conséquent, on peut dire que l'extrait de levure est la meilleure source azotée. Des résultats similaires ont été rapportés par Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006); Hernandez *et al.* (2006) avec *Aspergillus niger*.

D'autre part, Anto *et al.* (2006) signalent un dédoublement de la production en α -amylase en utilisant l'extrait de levure comme source azotée par rapport à l'urée. Enfin, Dharani-Aiyer (2004); Kathiresan et Manivannan (2006); Kunamneni *et al.* (2005); Pedersen, et Nielsen (2000) ont montré que la peptone est la meilleure source azotée pour *Bacillus licheniformis*, *Penicillium fellutanum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus oryzae*.

5-1-6- Effet de la teneur en azote

Les résultats obtenus montrent que la croissance d'*Aspergillus niger* ATCC16404 évolue d'une manière proportionnelle à la teneur en extrait de levure ajouté au milieu de culture pour atteindre des quantités maximales en biomasse avec une teneur en extrait de levure de 6.0 g/L soient 3.65 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et 3.94 g/L sur milieu à base de Tinissine. Par ailleurs, l'activité enzymatique évolue d'une manière proportionnelle à la teneur en extrait de levure ajoutée au milieu de culture pour atteindre des valeurs maximales à 5.0 g/L soient 2912.33 et 2400.00 μ moles/L/min sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement. Toutefois, au delà de 5.0 g/L, l'activité enzymatique chute à 1984.33 μ moles/L/min sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nour et à 1616.00 μ moles/L/min sur milieu à base de Tinissine (figure 48).

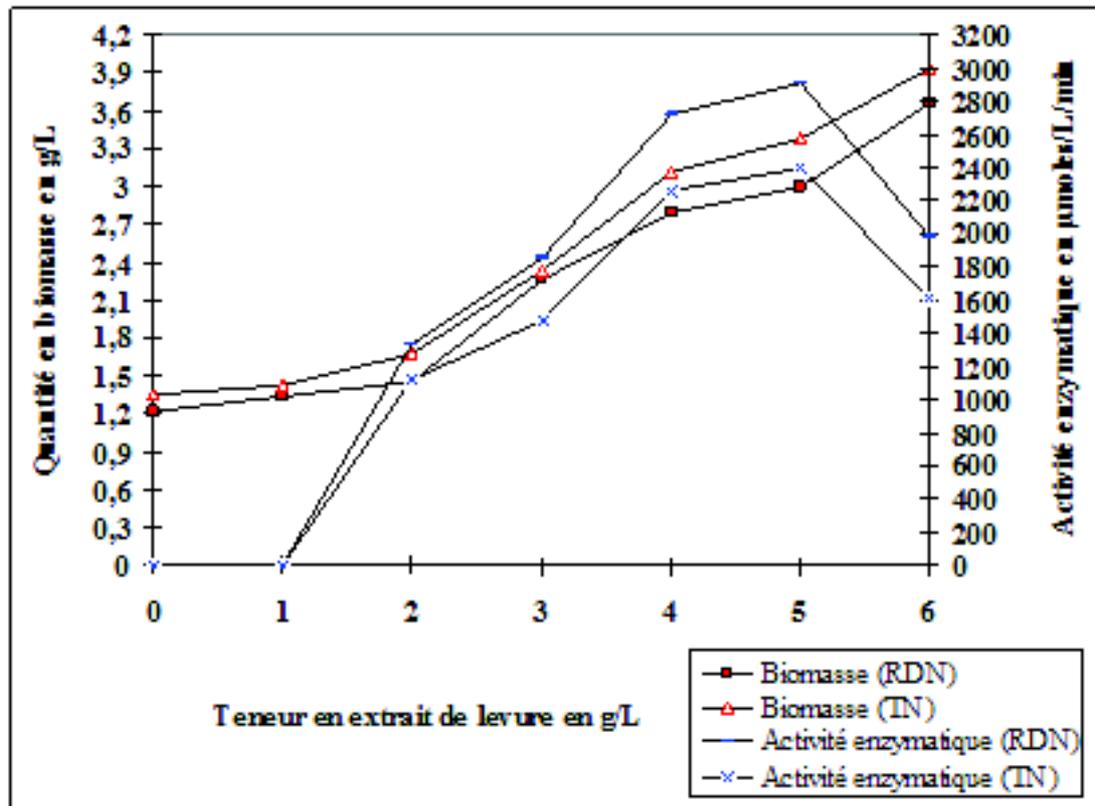


Figure 48 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en extrait de levure

Ainsi, la teneur en extrait de levure optimale pour une production maximale en extrait de levure est de 5.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Teodoro *et al.* (2000). Par ailleurs, l'activité enzymatique maximale produite par *Thermomyces lanuginosus* est obtenue avec des teneurs en extrait de levure variant entre 3.0 et 4.0 g/L (Kunamneni *et al.*, 2005), alors qu'avec *Aspergillus fumigatus*, la teneur optimale est de 2.0 g/L (Cherry *et al.*, 2004). Enfin, l'activité enzymatique maximale produite par *Aspergillus oryzae* a été obtenue à une teneur en azote de 20.0 g/L (Zhu *et al.*, 2004).

5-1-7- Effet de la teneur en phosphore

Le phosphore sert comme matériau de synthèse des composants cellulaires tels que l'AMP cyclique, les acides nucléiques, les phospholipides, les nucléotides et les coenzymes. Les résultats obtenus montrent que la croissance d'*Aspergillus niger* ATCC16404 évolue d'une manière proportionnelle à la teneur en phosphate de potassium ajoutée au milieu de culture pour atteindre des quantités maximales en biomasse avec une teneur en phosphate de potassium de 8.0 g/L soient 3.98 g/L sur milieu à base de rebuts de Deglet-Nourt et

4.15 g/L sur milieu à base de Tinissine (figure 49).

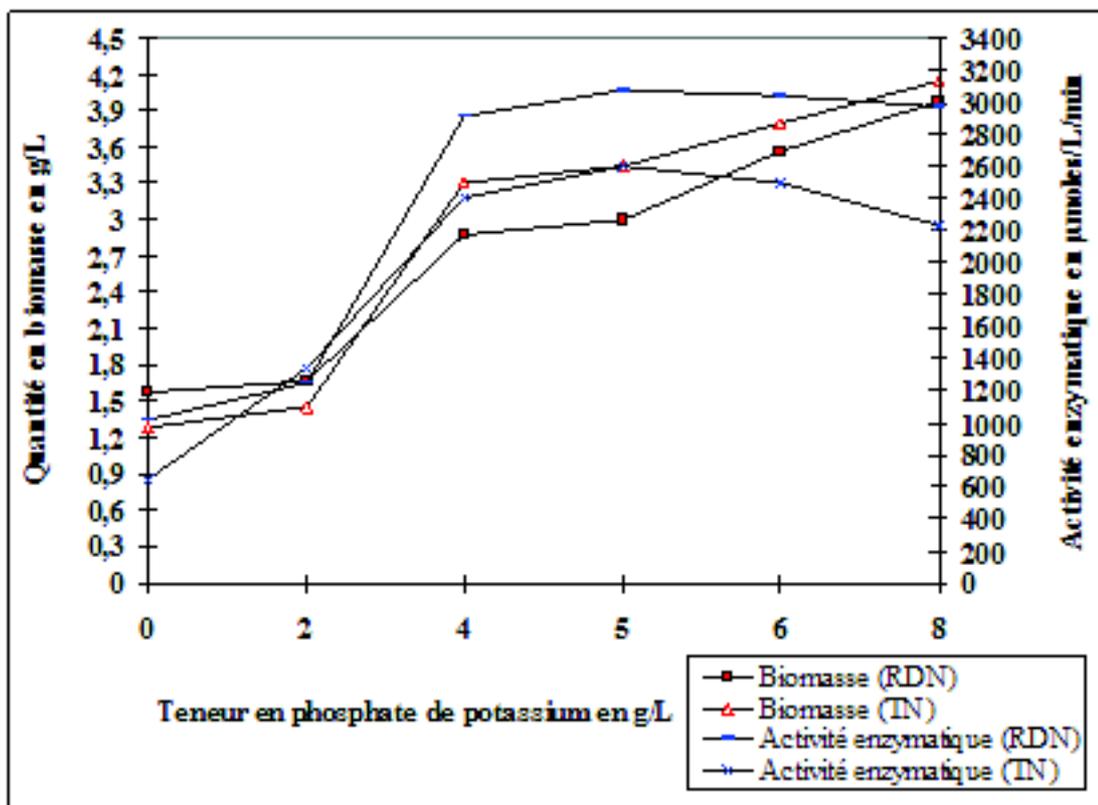


Figure 49 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en phosphate de potassium

La présence du phosphore dans le milieu de culture est indispensable car ce dernier sert à stimuler la synthèse de l' α -amylase (Gangadharan *et al.*, 2006). En ce sens, les résultats obtenus indiquent que les valeurs maximales de l'activité enzymatique ont été obtenues avec des teneurs en phosphate de potassium variant entre 4.0 et 8.0 g/L soient

2912.33, 3080.66, 3044.00, 2966.33 $\mu\text{moles/L/min}$ et 2400.00, 2600.00, 2500.00, 2228.00 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de Rebutts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement. Toutefois, les activités enzymatiques optimales ont été obtenues avec une teneur en phosphate de potassium de

5.0 g/L soient 3080.66 et 2600 $\mu\text{moles/L/min}$, sur milieux à base de Rebutts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Gangadharan *et al.* (2006). En outre, Yoon *et al.* (1989) signalent que la synthèse d' α -amylase est stimulée par l'ajout du phosphore au milieu de culture. Par contre, Bertolin *et al.* (2003) n'ont pas obtenu d'amélioration significative des rendements en gluco-amylase en ajoutant du phosphore au milieu de culture à base du son de blé. Enfin, les activités enzymatiques les plus faibles ont été obtenues avec des teneurs en phosphate de potassium \leq à 2.0 g/L soient 1022.00 -

1254.00 $\mu\text{moles/L/min}$ et 650.00 - 1340.33 $\mu\text{moles/L/min}$ sur milieux à base de rebutts de Deglet-Nour et Tinissine, respectivement.

5-2- Optimisation de la production d' α -amylase par utilisation de *Candida guilliermondii*

5-2-1- Effet de la durée d'incubation

Les résultats obtenus montrent que la croissance cellulaire évolue progressivement au cours de la fermentation pour atteindre 2.14 g/L à 24 h puis 3.52 g/L à 48 h et un maximum de 4.12 g/L à 96 h (figure 50). Toutefois, au-delà de 72 h, la croissance cellulaire augmente lentement indiquant que la souche a atteint sa phase stationnaire.

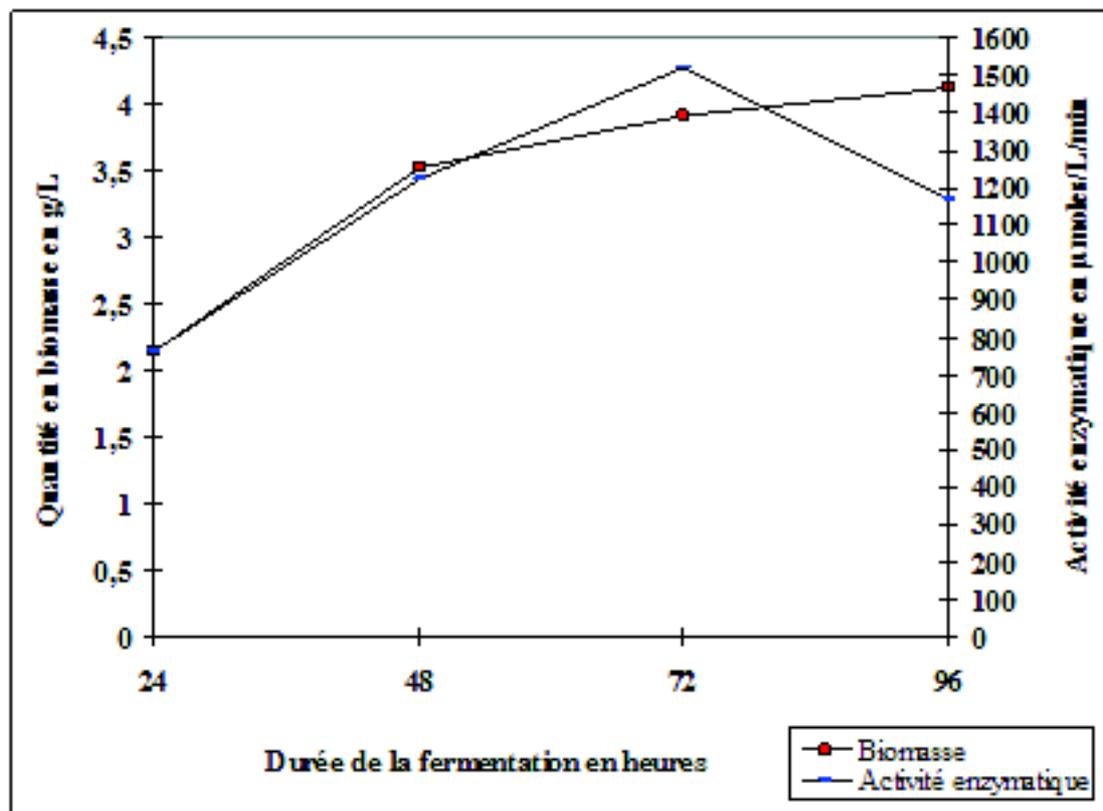


Figure 50 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique au cours de la fermentation

Des résultats similaires ont été obtenus par Lagzouli *et al.* (2007). La production d' α -amylase avec *Candida guilliermondii* commence durant les premières 24 h soit 762.33 $\mu\text{moles/L/min}$ pour atteindre une valeur maximale à 72 h soit 1519.23 $\mu\text{moles/L/min}$. Au-delà de 72 h, l'activité enzymatique diminue pour atteindre une valeur de 1168.33 $\mu\text{moles/L/min}$ à 96 h. Ainsi, on peut dire que la période optimale pour une production maximale en α -amylase est de 72 h. Des résultats similaires ont été rapportés par Lagzouli *et al.* (2007). Par contre, Hernandez *et al.* (2006); Renato and Nelson (2009) ont obtenu des rendements en enzymes élevés à 96 h avec *Aspergillus niger*. Enfin, Kunamneni *et al.* (2005) signalent une production d' α -amylase élevée à 120 h avec une souche de *Thermomyces lanuginosus*.

5-2-2- Effet du pH initial

Les résultats obtenus indiquent que la croissance de la souche de *Candida guilliermondii* varie suivant le pH initial. Cette dernière est maximale au pH initial de 6.0 soit 6.12 g/L.

Par contre, la croissance de cette souche est légèrement inhibée aux pH de 4.0 et 9.0 soient des quantités en biomasse de 3.40 et 2.56 g/L, respectivement (figure 51). Quant à l'activité enzymatique, cette dernière est maximale soit 1651.12 $\mu\text{moles/L/min}$ au pH initial de 6.0. Lorsque le pH est au dessus ou en dessous de l'optimum, la production en α -amylase diminue fortement et les activités enzymatiques obtenues aux pH 4.0 et 9.0 sont de 781.33 et 666.66 $\mu\text{moles/L/min}$, respectivement.

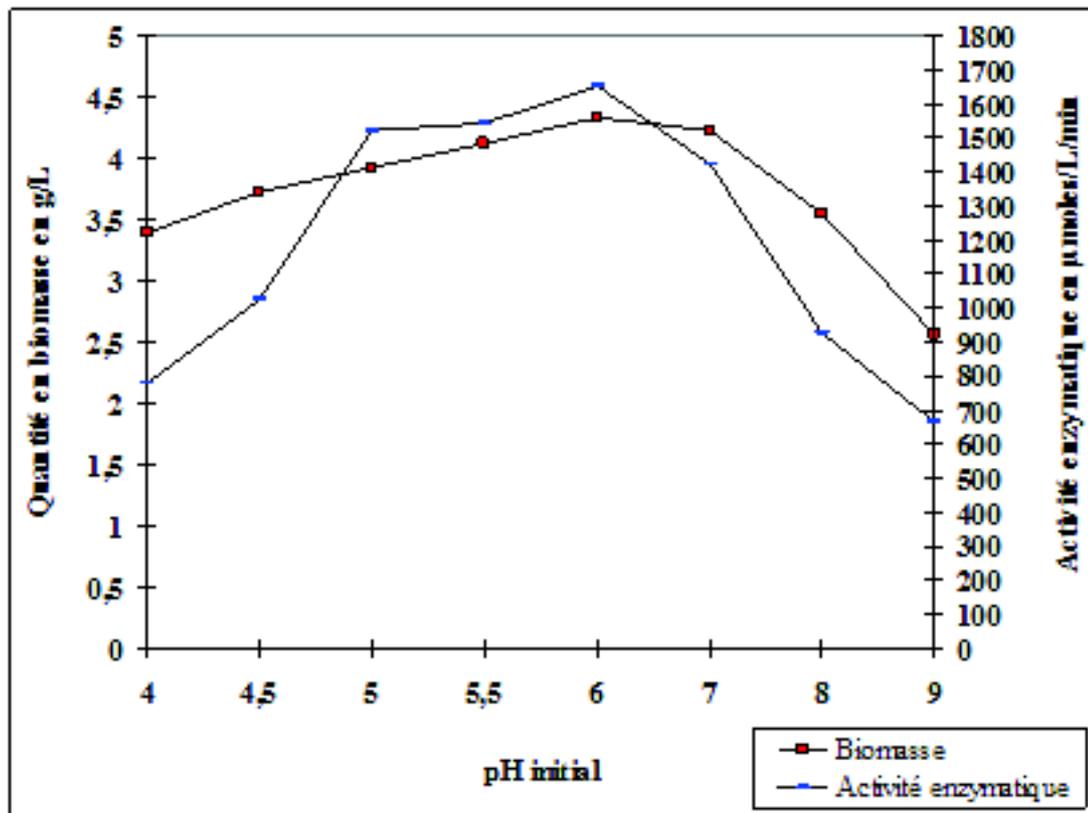


Figure 51 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant le pH initial.

Ainsi, le pH initial optimal de la culture est de 6.0. Des valeurs similaires variant de 5.0 à 6.5 ont permis de donner un maximum de production d'enzymes amylolytiques chez *Filobasidium capsuligenum* (De-Mot et Verachert, 1985). Chez *Lipomyces kononenkoae*, un pH initial de 5.5 a permis de donner une meilleure production d'enzymes amylolytiques (Lagzouli *et al.*, 2007; Spencer-Martins, 1982). De même, d'après Taylor *et al.* (1978), *Humicola lanuginosa* présente un pH optimum de 6.6. Contrairement à d'autres bactéries, *Bacillus sp.* présente un pH optimum de 7.0 pour la croissance et la production d'amylase (Teodoro et Martins, 2000).

5-2-3- Effet de la teneur en amidon

Les résultats obtenus montrent que la quantité en biomasse augmente avec l'élévation de la teneur en amidon pour atteindre des valeurs maximales avec des teneurs en amidon de 10.0, 15.0 et 20.0 g/L soient 6.12, 6.22 et 6.44 g/L, respectivement (figure 52)

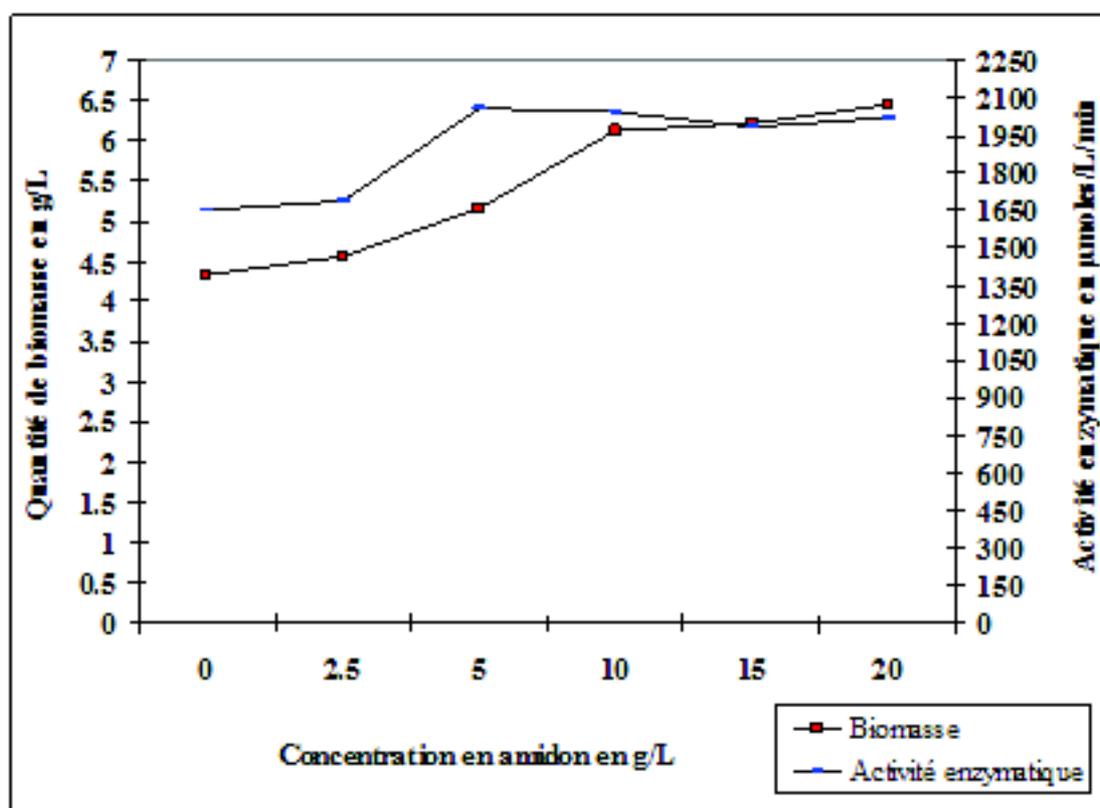


Figure 52 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en amidon.

Ainsi, on peut dire que l'ajout d'amidon au milieu de culture favorise la croissance de la souche de *Candida guilliermondii*. Des résultats similaires ont été rapportés par Lagzouli *et al.* (2007) avec *Candida guilleirmondii*. Quant à la production d'enzyme, cette dernière s'accumule progressivement dans le milieu pour atteindre une activité enzymatique maximale estimée à 2056.33 $\mu\text{moles/L/min}$ en ajoutant au milieu de culture 5.0 g/L d'amidon. Au-delà de 5.0 g/L, l'activité enzymatique se stabilise autour de 2000.00 $\mu\text{moles/L/min}$. Ainsi, on peut dire que la teneur en amidon optimale pour une production maximale en α -amylase est de

5.0 g/L. La même concentration a été utilisée pour la production d'amylase chez *Candida guilliermondii* (Lagzouli *et al.*, 2007), *Clostridium thermosulfurogenes* (Hyun *et al.*, 1985). Par contre, pour d'autres espèces de levures, comme *Lipomyces kononenkoae*, la concentration en amidon utilisée pour produire l'amylase est de 10 g/L (Spencer-Martins, 1982).

5-2-4- Effet de la source azotée

Parmi les sources d'azote inorganiques et organiques testées, la meilleure croissance a été obtenue avec l'extrait de viande soit 6.47 g/L suivi de l'urée soit 5.70 g/L, l'extrait de levure soit 5.16 g/L, Peptone soit 5.08 g/L et du phosphate d'ammonium soit 4.66 g/L (figure 53).

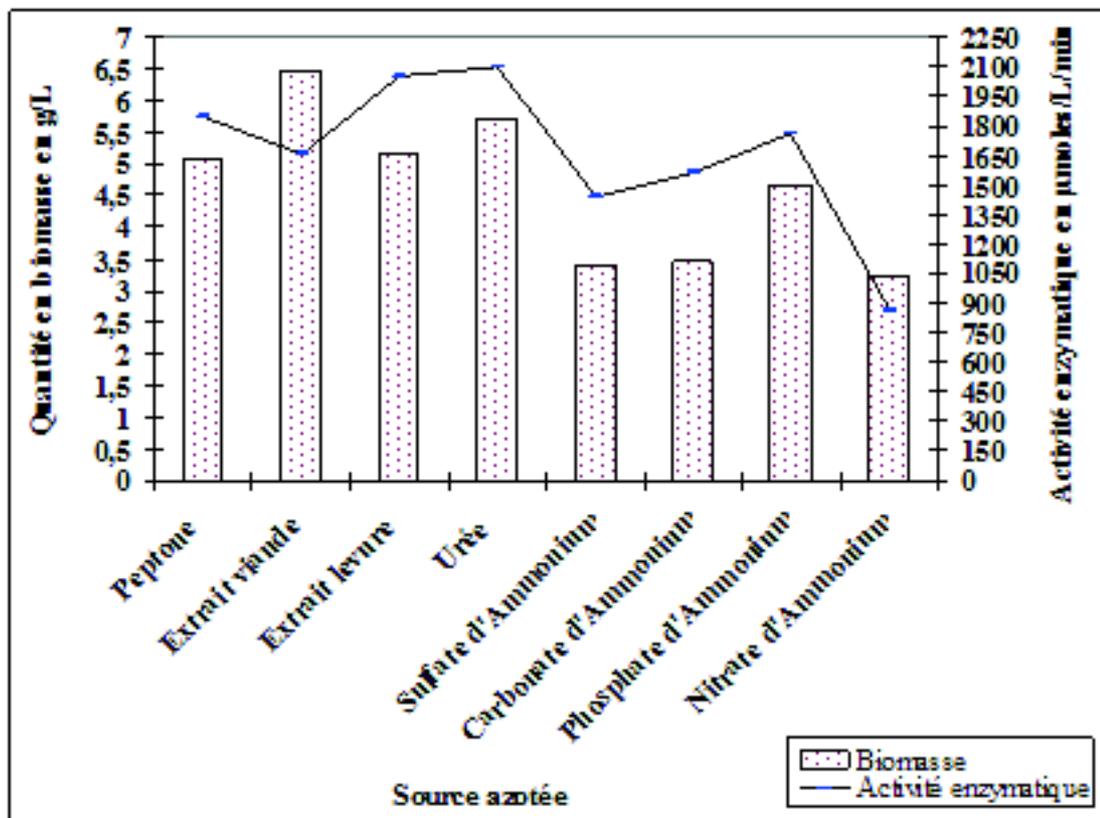


Figure 53 : Evolution de la quantité de biomasse et de l'activité enzymatique suivant la source azotée.

Il est à noter que Lagzouli *et al.* (2007) ont obtenu une meilleure croissance cellulaire en associant l'extrait de levure avec l'urée. Quant à l'activité enzymatique, le maximum est obtenu avec l'urée soit 2100.22 $\mu\text{moles/L}/\text{min}$ suivi de l'extrait de levure soit

2056.33 $\mu\text{moles/L}/\text{min}$ et de la peptone soit 1844.54 $\mu\text{moles/L}/\text{min}$. Par conséquent, on peut dire que l'urée est la meilleure source azotée pour une production maximale en α -amylase par *Candida guilliermondii*. Par contre, Kunamneni *et al.*, (2005) ont obtenu de meilleurs résultats avec la peptone en utilisant *Hermomyces lanuginosus*. Aussi, Lagzouli *et al.* (2007) ont obtenu une meilleure production de glucoamylase en utilisant l'association de l'extrait de levure et l'urée comme source azotée. Enfin, l'activité enzymatique la plus faible soit

865.00 $\mu\text{moles/L/min}$ a été obtenue avec le nitrate d'ammonium. Un résultat similaire a été obtenu par Lagzouli *et al.* (2007).

5-2-5- Effet de la concentration en urée

Les résultats obtenus montrent que la croissance cellulaire de *Candida guilliermondii* évolue d'une manière proportionnelle à la teneur en urée ajouté au milieu de culture pour atteindre une quantité maximale soit 6.85 g/L à 6.0 g/L. Quant à l'activité enzymatique, cette dernière évolue progressivement avec la teneur en urée pour atteindre une valeur maximale à 5.0 g/L soit 2100.22 $\mu\text{moles/L/min}$. Toutefois, au delà de 5.0 g/L, l'activité enzymatique chute à 1465.42 $\mu\text{moles/L/min}$. L'importance de l'urée dans la croissance et la production d' α -amylase dans cette étude a été prouvée. Le maximum de croissance et de production

d' α -amylase est atteint avec 5.0 g/L (figure 54).

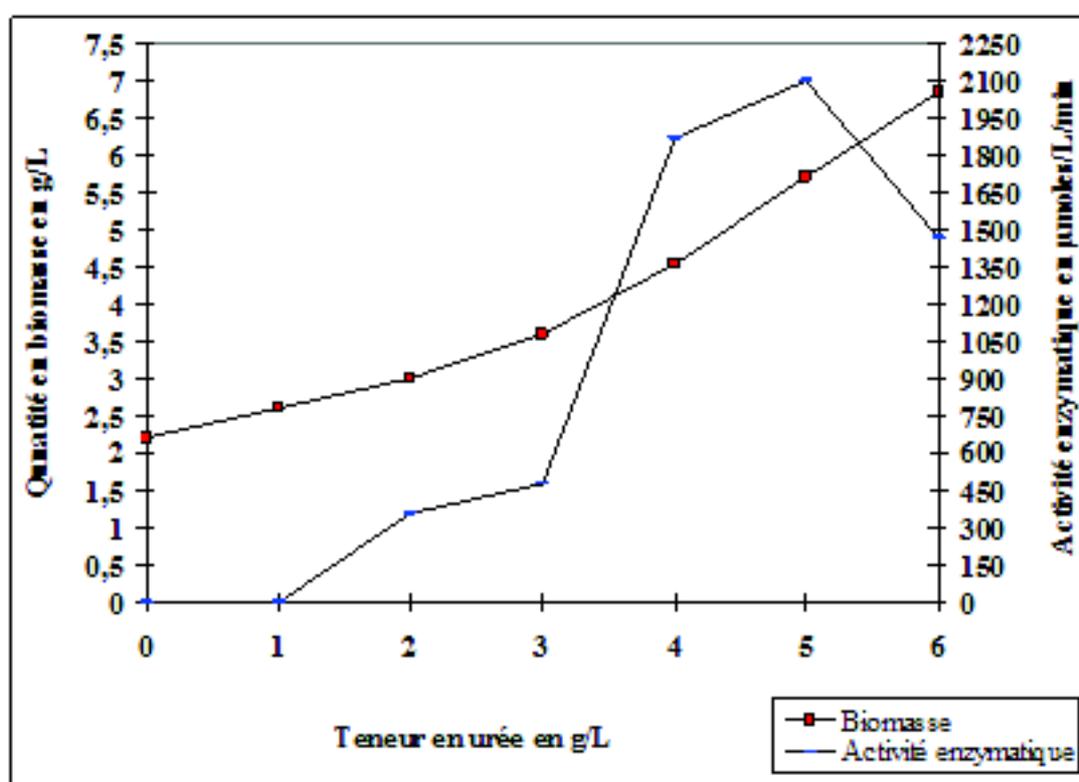


Figure 54 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en urée.

Différentes concentrations en extrait de levure et urée testées par d'autres chercheurs ont permis de produire des enzymes amylolytiques. Ainsi, le maximum de production de glucoamylase par *Candida guilliermondii* a été obtenu avec une teneur en extrait de levure de 5.0 g/L (Lagzouli *et al.*, 2007), alors qu'avec *Thermomyces lanuginosus*, la teneur en extrait de levure utilisée est de 2.0 g/L (Kunameni *et al.*, 2005). Enfin, le maximum d'activité amylolytique produit par *Bacillus sp.* a été obtenu avec 20.0 g/L d'extrait de levure (Teodoro *et al.*, 2000).

5-2-6- Effet de la concentration en phosphate de potassium

Les résultats obtenus montrent que la croissance de *Candida guilliermondii* augmente progressivement avec la teneur en phosphate de potassium pour atteindre un maximum de 5.87 à 8.0 g/L. Quant à l'activité enzymatique, les valeurs maximales ont été obtenues avec des teneurs en phosphate de potassium variant entre 5.0 et 8.0 g/L soient 2100.00 - 2304.19 $\mu\text{moles/L/min}$. Par contre, les plus faibles ont été obtenues avec une teneur en phosphate de potassium ≤ 2.0 g/L soit 856.66 $\mu\text{moles/L/min}$ (figure 55).

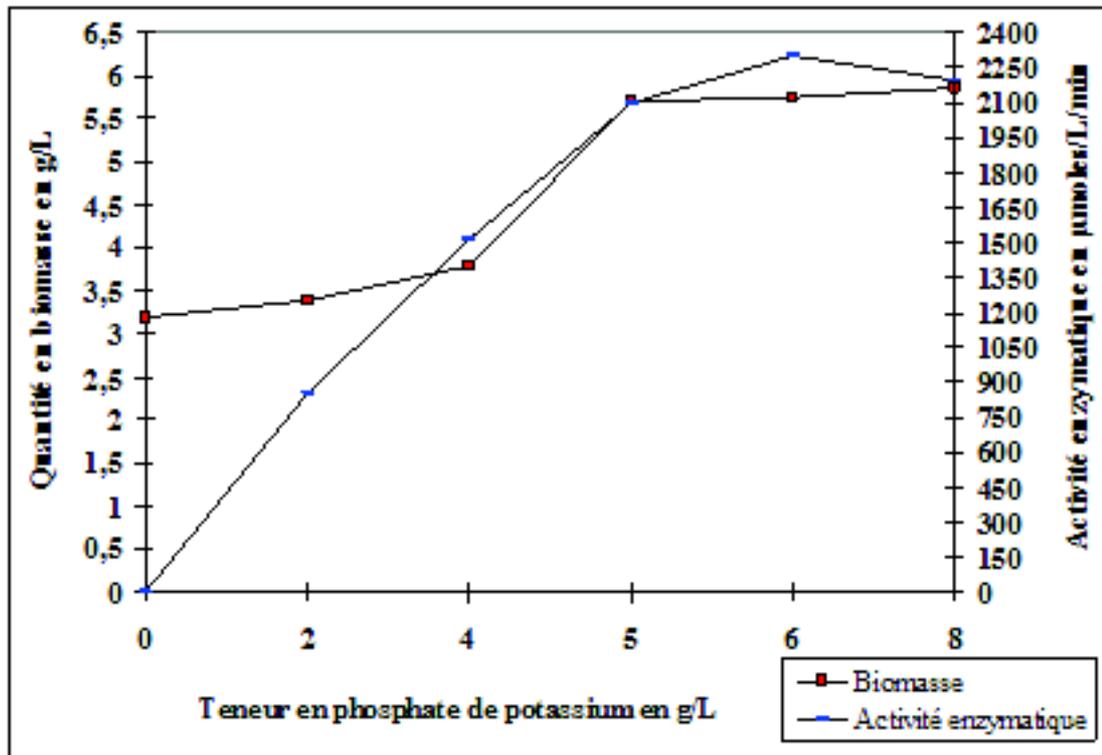


Figure 55 : Evolution de la quantité en biomasse et de l'activité enzymatique suivant la teneur en phosphate de potassium.

Des résultats similaires ont été obtenus par Gangadharan *et al.* (2006).

5-3- Culture en fermenteur

Enfin, la culture en fermenteur a permis de produire une biomasse beaucoup plus élevée soit 7.12 g/L en un temps relativement réduit par rapport aux Erlenmeyers soit 5.72 g/L. Ceci est dû au contrôle de la température et des facteurs gênant la croissance (épuiement du milieu, agitation, contrôle des variations de la température...etc.). Quant à l'activité enzymatique, cette dernière est plus élevée en fermenteur soit 2715.33 $\mu\text{moles/L/min}$ par rapport aux cultures en Erlenmeyers soit 2304.19 $\mu\text{moles/L/min}$. Ainsi, on peut dire que l'optimisation des paramètres de croissance et de l'apparition d'enzymes de *Candida guilliermondii* sur culture en fermenteur a permis d'améliorer la croissance et la production de l' α -amylase. Enfin, les essais de croissance et de production d'enzymes en fermenteur montrent que cette souche est prometteuse pour l'approfondissement des études afin d'améliorer la production en α -amylase en vue d'une application industrielle.

Cette étude a pour objectif l'utilisation des rebuts de dattes produits par Deglet-Nour et les dattes de faible valeur marchande produites par Tinissine comme substrats pour la production de la levure boulangère, éthanol, acide citrique et α -amylase. En effet, ces dattes

sont riches en sucres qui peuvent être utilisés comme source carbonée et aussi comme moyen de substitution à la mélasse pour la production de ces métabolites.

En ce sens, l'analyse biochimique des extraits de dattes montre que ces derniers sont riches en sucres réducteurs facilement assimilables par *Saccharomyces cerevisiae*. Par contre, ces derniers sont faiblement pourvus en azote et phosphore pour satisfaire les besoins de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii* en ces éléments.

Par ailleurs, les extraits de dattes renferment des quantités en sucres et en sels minéraux et plus particulièrement en potassium, calcium, magnésium, manganèse, cuivre et fer suffisantes pour une croissance optimale des différentes souches utilisées dans cette étude.

A cet effet, les résultats obtenus sur la production de la levure boulangère en fermentation discontinue montrent que les taux de croissance ainsi que les quantités en biomasse obtenues sont meilleurs sur milieu à base de dattes par rapport au milieu à base de mélasse. Par ailleurs, ces derniers sont meilleurs que ceux obtenus à l'échelle industrielle sur substrat à base de mélasse. D'autre part, l'étude comparative des différentes souches isolées à partir des dattes montre que les souches DB, TTB et HW présentent un taux de croissance élevé, un temps de génération réduit et un rendement en biomasse élevé, meilleurs ou comparables à ceux de la souche ATCC 1102. Pour ce qui est de la fermentation en Fed-Batch, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un taux de dilution de 0.22 h^{-1} à savoir une quantité en biomasse de 29.20 - 34.54 g/L. Par ailleurs, les milieux à base de dattes donnent des rendements en biomasse élevés par rapport au milieu de fermentation à base de mélasse.

De ce fait, on peut préconiser les rebuts de dattes et les dattes de faible valeur marchande comme substrat de substitution à la mélasse pour la production de la levure boulangère. En outre, les souches DB, TTB et HW donnent des rendements en biomasse élevés comparables à ceux de la souche ATCC 1102. Néanmoins, l'optimisation des paramètres de fabrication de la levure boulangère cultivée sur substrat à base de dattes afin d'améliorer les rendements et la qualité de la levure produite est souhaitable. En ce sens, l'utilisation du sulfate d'ammonium et de l'urée à 50 - 50 % améliore de plus de 17.3 à 36.0 %, le rendement en biomasse par rapport à l'urée utilisée seule comme source azotée. Aussi, l'utilisation du phosphate d'ammonium comme source azotée améliore de 36.7 à 55.0 %, le rendement en biomasse. Toutefois, cette source d'azote est coûteuse par rapport à l'urée et elle provoque une diminution de la force boulangère de la levure. Par conséquent, on recommande l'utilisation du sulfate d'ammonium et de l'urée à 50 - 50 % comme source azotée pour la production de la levure boulangère sur extraits de dattes. Enfin, pour ce qui est de la source vitaminique, les résultats obtenus montrent qu'il n'est pas nécessaire d'apporter des vitamines au cours de la fermentation malgré une légère amélioration des rendements soit plus de 6.0 % en ajoutant 0.6 mg/L de thiamine. Ceci est probablement lié à la richesse des extraits de dattes en biotine, pantothénate de calcium et thiamine nécessaires au développement de *Saccharomyces cerevisiae*.

Concernant la production d'éthanol, les résultats obtenus au cours de la fermentation montrent que la teneur en éthanol évolue progressivement au cours de la fermentation pour se stabiliser à 118.0 -126.0 g/L au-delà de 72 h de fermentation. Par ailleurs, la teneur en éthanol obtenue au cours des différentes fermentations et sur les différents substrats est élevée variant entre 92.0 et 136.0 g/L. De même le rendement de métabolisation est élevé et il varie entre 55.00 et 78.61 %.

Enfin, la souche DB isolée à partir des dattes produites par Degla-Beida donne une teneur en éthanol et un rendement de métabolisation élevés soient 136.0 g/L et 78.61 %, respectivement avec une quantité en inoculum de 4 % (w/v), une teneur en sucres de 180 g/L et une teneur en phosphate d'ammonium de 1.0 g/L. A la lumière de ces résultats encourageants obtenus, il est possible de mettre en place en Algérie des ateliers de fabrication de l'éthanol à partir des dattes. Ceci permettra à l'Algérie d'économiser des devises et de valoriser les rebuts de dattes et les dattes de faible valeur marchande.

Pour ce qui est de la production de l'acide citrique, les résultats obtenus montrent que l'enrichissement du milieu de fermentation par ajout d'éléments nutritifs permet une amélioration des rendements en acide citrique. Par ailleurs, les milieux à base de dattes et plus particulièrement les rebuts de Deglet-Nour ont donné les meilleurs résultats par rapport aux autres substrats. D'autre part, la période de fermentation optimale pour une production maximale en acide citrique est de 144 h. En outre, une production maximale en acide citrique a été obtenue à 30 °C. Par ailleurs, une teneur en sucres de 150.0 g/L s'avère plus performante pour une production maximale en acide citrique. L'addition de méthanol au milieu augmente la tolérance d'*Aspergillus niger* vis-à-vis de la toxicité de certains métaux, tels que, le Zinc, Cuivre et Fer. En ce sens, une amélioration significative de la production en acide citrique a été notée avec une teneur en méthanol de 3.0 %. Aussi, la fixation du pH initial à 3.5 a permis une amélioration très nette des rendements en acide citrique. De même, la quantité optimale en inoculum pour une production maximale en acide citrique est de 10^6 CFU/ml. Le taux d'aération maintenu à un niveau de 1.0 L/L/min a été jugé optimal pour une production maximale en acide citrique.

Enfin, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des teneurs en nitrate d'ammonium et en phosphate de potassium de 2.5 g/L. En résumé, les conditions optimales pour une production maximale en acide citrique sont les suivantes: Teneur en sucres de 150.0 g/L, un pH initial de 3.5, une quantité en méthanol de 3.0 %, une quantité en inoculum de 10^6 CFU/ml, un taux d'aération de 1.0 L/L/min et des teneurs en nitrate d'ammonium et en phosphate de potassium de 2.5 g/L. Des productions maximales en acide citrique, en l'occurrence, 98.42 g/L avec *Aspergillus niger* ANSS et 106.44- 126.40 g/L avec *Aspergillus niger* ATCC 16404 ont été obtenues avec ces conditions optimales. Enfin, il est à noter que l'acide citrique est l'un des produits les plus importants du métabolisme fongique produit à l'échelle industrielle par fermentation submergée avec des souches d'*Aspergillus niger*. A cet effet, nous pensons que ce travail ouvre des voies prometteuses pouvant contribuer à la production de l'acide citrique à l'échelle industrielle au niveau de l'Algérie en utilisant les rebuts de dattes et les dattes de faible valeur marchande produits localement.

Concernant la production de l' α -amylase, les résultats obtenus montrent que les dattes peuvent servir comme substrat de choix pour la croissance d'*Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii* tout en permettant une production élevée d' α -amylase. Ainsi, les rebuts de dattes et les dattes de faible valeur marchande contiennent la majorité des nutriments nécessaires à la croissance de ces souches et à la synthèse de cette enzyme. L'étude de l'effet des différents paramètres de fermentation sur la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii* en fermentation submergée a été réalisée. A cet effet, on peut dire que les conditions optimales pour une production maximale en α -amylase avec *Aspergillus niger* ATCC 16404 sont : Une période d'incubation de 96 h, une température de 30 °C, un pH initial de 5.5, une teneur en sucres de 20.0 g/L, l'utilisation de l'extrait de levure comme source azotée à une teneur de 5.0 g/L et une teneur en phosphate de potassium de 5.0 g/L. Sous ces conditions optimales, les activités enzymatiques obtenues sur culture en Erlenmeyers sont de 3080.66 et 2600 μ moles/L

min, sur milieux à base de rebuts de Deglet-Nour et les dattes produites par Tinissine, respectivement.

Quant à *Candida guilliermondii*, les résultats obtenus montrent que la présence d'amidon induit fortement la production d' α -amylase avec un maximum à 5.0 g/L. Parmi les différentes sources d'azote testées, l'extrait de levure et l'urée ont donné le maximum de biomasse et d' α -amylase estimées à 5.16 - 5.70 g/L et 2056.33 - 2100.22 μ moles/L/min, respectivement après 72 h d'incubation à 30°C, avec un pH initial de 6.0. L'optimisation des paramètres de croissance et de l'apparition d'enzymes avec *Candida guilliermondii* sur culture en Erlenmeyers a permis d'améliorer la croissance cellulaire et la production de l' α -amylase. Ainsi, une production en biomasse de 5.76 g/L et une activité enzymatique de

2304.19 μ moles/L/min ont été obtenues avec une teneur en urée de 5.0 g/L et une teneur en phosphore de 6.0 g/L. Par ailleurs, les essais de croissance et de production d'enzyme en fermenteur montrent que la souche de *Candida guilliermondii* isolée à partir du levain est prometteuse pour l'approfondissement des études, pour l'amélioration de la production de

l' α -amylase en vue d'une application industrielle. En ce sens, l'activité enzymatique obtenue sur culture en fermenteur est de 2715.33 μ moles/L/min. Enfin, dans cette étude les souches d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et *Candida guilliermondii* isolée à partir du levain apparaissent comme étant des souches hyper productrices d' α -amylase sur substrat à base de dattes.

Références bibliographiques

- Abate C., Callieri D., Rodríguez E. and Garro O. (1996). Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces sp.* *App. Microbiol. Biotechnol.*, **45 (5)**, pp. 580-583.
- Abdulrahman M., Al-Shehri A. and Yasseer S. (2006). Citric acid production from date syrup using immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Biotechnol.*, **5 (4)**, pp. 461-465.
- Abdel-Fattah, A.F., Abou-Zeid, A.A., and Farid, M.A. (1984). Production of ethyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*, including utilization of onion juice. *Agric. Wastes*, **9**, pp. 101-110.
- Achour, M., Ben Amara, S., Ben Salem, N. Jebali, A. et Hamdi, M. (2003). Effet de différents conditionnements sous vide ou sous atmosphère modifiée sur la conservation de dattes Deglet Nour en Tunisie. *Rev. Fruits*, **58**, pp. 205-212.
- Acourene S., Tama, M. (1997). Caractérisation physico-chimique des principaux cultivars de dattes de la région des Zibans. *Rev. Rech. Agron.*, **1**, pp. 59-66.
- Acourene S., Belguedj M., Tama M., Taleb B. (2001). Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des zibans. *Rev. Rech. Agron.* **8**, pp. 19-39.
- Akinyeam, O.P., Betiku, E. and Solomon, B.O. (2003). Substrate channelling and energetics of *Saccharomyces cerevisiae* DSM 2155 grown on glucose in Fed-Batch fermentation process. *African J. Biotechnol.*, **2 (5)**, pp. 96-103.
- Al-Obaidi, Z. S. et Berry, D. R. (1981). Production of citric acid from date syrup. *Date Palm J.*, **1 (1)**, pp. 79-98.
- Al-Obaidi, Z. S. et Berry, D. R. (1982 a). Scaling up of citric acid fermentation using fermenters. *Date Palm J.*, **1 (2)**, pp. 19-33.
- Al-Obaidi, Z.S. et Berry, D.R. (1982 b). Production of citric acid from syrup fermentation studies in shacked culture. *Date palm J.*, **1 (2)**, pp.79-98.
- Al-Obaidi, Z.S., Aziz, G.M., Al-Hakkah, T.S. and Al-Hilli, M.A. (1987). Optimization of propagation medium for Baker's Yeast using date extract and molasses : Determination of the optimum concentration of micro elements and vitamins. *Date Palm J.*, **5 (9)**, pp. 64-78.
- Al-Ogaidi, H.K.H. (1987). Dates and confectionary products. Ed. F.A.O, Baghdad, Irak, 182 p.
- Al-Ogaidi, H.K.H. (1988). Isolation and identification of some ethanol production yeast grown on date juice. *Date Palm J.*, **6 (2)**, pp. 433-445.
- Al-shawan, M., Tissane, S.M. and Mnina, M.Z. (1987). Production of jam, Jelly and Kutter from dates. *Date palm J.*, **5 (1)**, pp. 73-86.
- Alva, S., Anupama, J. Savla, J., Chiu, Y.Y., Vyshali, P., Shruti, M., Yogeetha, B.S., Bhavya, D., Purvi, J., Ruchi, K., Kumudini, B.S., Varalakshmi, K.N. (2007). Production

- and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. *African J. Biotechnol.*, **6(5)**, pp. 576-581.
- Alves-Araujo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, C., Leao, I. and Sousa, M.J. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulasporea delbrueckii*. *Microbiol.*, **153**, pp. 898-904.
- [Amir I.](#) , [Sikander A.](#) , [Ikram U.H.](#) and [Qadeer M.A.](#) (2002). Time course profile of citric acid fermentation by *Aspergillus niger* and its kinetic relations. *Pakistan J. Biol. Scienc.*, **2 (11)**, pp. 760-761.
- Ammouche, A. (1979). Contribution à l'étude de la concentration en méthanol et de la source azotée sur la croissance de la levure *Hansenula polymorpha*. Thèse Magister, INA, 72 p.
- Angumeenal, A. and Venkappayya, D. (2005). Artrocarpus heterophyllus, a potential substrate for citric acid biosynthesis using *Aspergillus niger*. [Lebensmittel-Wissenschaft und-Technol.](#) , **38 (1)** , pp. 89-93.
- Anonyme (1992). Contrôle de la levure fraîche et sèche. Ed.: CERIAL, Blida, 5 p.
- Anonyme (2003). Fabrication de la levure boulangère. Ed.: Levurerie de Oued-Smar, 10 p.
- Anonyme (2010). Statistiques agricoles, superficies et productions. Ed., Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (M.A/D.S.A.S.I), Série B, Alger, 64p.
- Anto, H., Trivedi, U.B., Patel, K.C. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresour. Technol.*, **97 (10)**, pp. 1161-1166.
- Araque, E., Parra, C., Rodríguez, M., Freer, J. and Jaime, B. (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzym. Microbiol. Technol.*; **43 (2)**, pp. 120-123.
- Aransiola, E.F., Betiko, E., Adetunji, O.A., Solomon, B.O. (2006). Production of Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) from raw cassava starch hydrolyzates in a bioreactor under Batch process. *Biotechnol.*, **5 (1)**, pp. 98-103.
- Arzumanov, T.E., Shishkanva, N.V. et Finogenova, T.V. (2000). **Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol** . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53 (5)**, pp. 525-529.
- [Asad, U.R.](#) , [Sikander A.](#) and [Ikram, U.H.](#) (2002). Temperature optima for citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Biotechnol.*, **1 (2)**, pp. 108-110.
- [Asad, U.R.](#) , [Sikander, A.](#) , [Ikram, U.H.](#) (2003). Phosphate Limitation for enhanced citric acid fermentation using *Aspergillus niger* mutant UV-M9 on semi-pilot scale. *Pakistan J. Biol. Scienc.*, **6 (14)**, pp. 1247-1249.
- Atiyeh, H. and Duvnjak, Z. (2002). Production of Fructose and Ethanol from Sugar Beet Molasses Using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Biotech. Prog.*, **18 (2)**, pp. 234-239.
- A.O.A.C (1970). Official methods of analysis. Ed, Washington, D.C , 11th, 200 p.
- Audigie, C.I., Figarelle, J. et Zonszani, F. (1984). Manipulations d'analyses biochimiques. Ed. : Doin éditeurs; Paris, pp. 88 - 97.

- Ayogu, T.E. (1999). Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits. *Biores. Technol.*, **69**, pp.189-190.
- Azmuda, N., Jahan, N. and Rahman-Khan, A. (2006). Production and comparison of indigenous and commercial Baker's Yeasts. *Bangl. J. Microbiol.*, **23 (2)**, pp 89-92.
- Baangoud, S.M. and Shamshad, M.A. (1984). Chemical composition of major dates cultivars in the united Arab Emirates. *Date Palm J.*, **3 (2)**, pp. 381-394.
- Bajpai, P. K. and Margaritis, A. (1985). Kinetics of ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis* at varying D-glucose concentrations. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **7**, pp. 462-464.
- Bandaru, V.V.RBandaru, S.R., Somalanka, S.R., Mendu, D.R., Imandi, S.B., Bejawada, S., Devarajan, N.R.T., Karothi, J., Chityala, A. (2007). Optimization of fermentation parameters to enhance the production of ethanol from *Palmyra Jaggery* using *Saccharomyces cerevisiae* in a Batch fermentor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **143 (3)**, pp. 224-235
- Bataillon M., Rico A., Sablayrolles J.M., Salmon J.M., Barre P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, pp. 101-106.
- Bazua, C.D., and Wilke, C.R. (1977). Ehanol effects on the kinetics of a continious fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, pp. 105-117.
- Badotti, F., M.G Dário, M.G, S.L Alves, S.L, Cordioli, M .L, Miletti, L.C, Araujo, P.S and Stambuk, B.U (2008). Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factori.*, **7 (4)**, pp. 1459-1475.
- Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoport, Zikmanis, A.P. (2000). The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, pp. 147-150.
- Belo, I., Pinheiro, R., Mota, M. (2003). Fed-batch cultivation of *saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor. *Biotechnol. Progr.*, **19 (2)**, pp. 665-671.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. and Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, pp. 246-252.
- Ben Salah M, Hellali R. (1995). Evolution de la composition chimique des dattes de trois variétés tunisiennes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) *Rev. Inst. Nation. Agron., Tunisie*, **10 (2)**, pp.119-127.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase, ###. In: Methods in enzymology, Vol. 1, S.P. Colowick, N.O. Kaplan. Ed.: Academic Press, New York, USA, pp. 149-154.
- Berovic, M. and Legisa, M. (2007), Citric acid production. *Biotechnol. Ann. Rev.*, **13**, pp. 303-343.
- Berry, D. R , Chimiel A., Al- Obaidi, Z.S. (1977). Citric acid fermentation. In Genetic and physiology of *Aspergillus niger*. Ed.: Smith and Patherman, Académic press, London, England, pp. 405-426.
- Berry, D.R., Paterson, A. (1990). Enzyme in food industry. In : Suckling C.J. Ed : Enzyme chemistry impact and application. Chapman and Hall. pp. 306 – 356.

- Bin-Shahna, S., Qassim, Y.A., Al-Qahri, M. (1987). The chemical composition of various types of dates in the P.D.R.Y. *Date Palm J.*, **5 (2)**, pp. 143-195.
- Bhushan, S. and Joshi, V.K (2006). Baker's yeast production under fed batch culture from apple pomace. *J. Scienc. Ind. Researc.*, **65 (1)**, pp. 72-76.
- Blanco, C.A., Rayo, J., Giralda, J. M. (2008). Improving industrial full-scale production of Baker's Yeast by optimizing aeration control. *J. AOAC Int.*, **91 (3)**, pp. 607-613.
- Bodri, E.A., Bower, B., Berka, R.M., Dunn-Coleman, N.S. (1997). Economically important organic acid and enzyme products. In : Martinelli S-D. & Kinghorn J-R. Ed.: *Aspergillus = 50 years on progress in industrial microbiology*. Elsevier, **Vol. 29**, pp. 561-602.
- Bohlscheid, J.C., Fellman, J.K., Wang, X.D., Ansen, D., Edwards, C.G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J. Appl. Microbiol.*, **102 (2)**, pp. 390-400.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, Ed.: Masson, Paris, 450 p..
- Bouchard, E.F. and Meritt, E.G. (1979). Citric acid. In : Encyclopedia of chemical technology. Vol. 63, Ed.: Thon Killey and Sons Inc, New-york, 45 p.
- Bouix M. et Leveau J.Y. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed.: Technique et documentation Lavoisier, Apria, Paris, 523 p.
- Boughnou, N (1988). Essai de production de vinaigre à partir des déchets de dattes. Thèse de magister en sciences alimentaires, INA, El-Harrach, 82 p.
- Bourgeois, C.M. et Larpent, J. (1996). Aliments fermentés et fermentations alimentaires. In : Microbiologie alimentaire, Vol II, Ed. : Lavoisier, Paris, 523p.
- Bowman L. and Geiger, E. (1984). Optimization of fermentation conditions for alcohol production. *Rev. Biotechol. Bioeng.*, **26**, pp. 1492-1497.
- Bukhaiev, E.T. (1983). Détermination de la valeur alimentaire des produits du palmier et leurs utilisations dans l'alimentation des ruminants. In: 3^{ime} conférence sur Sciences et Recherche sur le palmier dattier, Baghdad, Irak.
- Caballero, R., Olguin, P., Cruz-Guerrero, A., Gallardo, F., Garcia-Garibay, M. and Gbmez-Ruiz, L. (1995). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Researc. Int.*, **28 (1)**, pp. 37-41.
- Caceres-Farfan, M., Lappe, P., Larque-Saavedra, A., Magdub-Mendez, A., Barahona-Perez, L. (2008). Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes Lem.*) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Biores. Technol.*, **99 (18)**, pp. 9036-9039.
- Cahagnier, B. (1997). Moisissures des aliments peu hydratés. Ed.: Lavoisier technique et documentation. Paris, 50 p.
- Cannizzaro, C., Valentinotti, S. and Stockar, U. (2004). Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration. *J. Biopr. and Biosyst. Eng in*, **26 (6)**, pp. 377-383.
- Canu, G., Joao, D., Neves, Y., Chenier, A. (2000). Levures et industrie alimentaire. In: Cours sur les fermentations, 5 p.

- Carlsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J. (1996). Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. *J. Biotechnol.*, **45**, pp. 81-93.
- Carpenter, P.L (1972). Microbiology. Ed.: W.B, Saunders company Toronto, pp. 10-303.
- Caylack, B. and Vardar Sukan, F. (1998). Comparison of different production processes for Bioethanol. *Turk J Chem* , **22**, pp. 351-359.
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A., Buzato, J.B., Scarmino, I.S., Silva, R.S.F. (2005). Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Proc. Biochem.*, **40**, pp. 747–751.
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A, Buzato, J.B., Scarmino, I.S. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Biores. Technol.*, **98 (15)**, pp. 2824-2828.
- Champagne, C. P., Goulet, 1.J., Lachance, R.A. (1990). Production of Bakers' Yeast in cheese whey ultrafiltrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56 (2)**, pp. 425-430.
- Chen, S. L. and Chiger, M. (1985)**. Production of bakers' yeast..In: Moo-Young, Ed., Comprehensive biotechnology, Vol. 3. Ed.: Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, pp. 429-455.
- Cherry, H.M., Towhid Hossain, M.D., Anwar, M.N. (2004). Extracellula glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. *Pak. J. Biol. Sci.*, **7(11)**, pp. 1988-1992.
- Chimiel, A. (1975). Kinetic studies of citric acid by *Aspergillus niger*. Phase mycelium grown and product formation. *Acta Microbial.*, **7 (24)**, pp. 185-193.
- COFALEC (1999). Les progrès de la levurrerie. Ed.: Copyright , England, 232 p.**
- Daramola, M.O. and Zampraka, L. (2008). Experimental study of the production of biomass by *Sacharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. *Afric. J. Biotechnol.*, **7 (8)**, pp. 1107-1114.
- Damore, T., Celotto, G., Russell, I., Stewart, G.G. (1989). Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °C. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **11**, pp. 411-416.
- De Kock, S.H., Du Preez, J.C., Kilian, S.G. (2000). Anomalies in the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* strains in aerobic chemostat cultures. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, pp. 231-236.
- Delaunay, S., Lapujade, P., Leyval, D., Germain, P., Goergen, J.L et Engasser, J.M. (2001). Problématique de l'amélioration de la production d'acides aminés par voie microbienne. *Bul. Acad. Lorraine Scienc.*, **40 (4)**, pp. 20-23.
- Demayer, A., F. Jacob, F., M. Jay, M., Menguy, G. et Perrier, J. (1982). La bioconversion bioénergétique. Ed.: Technique et documentation, Lavoisier, Paris, pp.186-250.
- De-Mot, R. and Verachtert, H. (1985). Purification and characterization of extracellular amyolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50(6)**, pp. 1474-1482.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z. Meraihi, Bennamoun, L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production

- by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.*, **73**, pp. 190-197.
- Djerbi, M. (1994). Précis de Phoéniciculture. Ed.: F.A.O, 520 p.
- Dharani-Aiyer, P.V. (2004). Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African J. Biotechnol.*, **3 (10)**, pp. 519-522.
- Dixon, B. and Rose, A.H. (1964). Observation on the fine structure of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by biotin deficiency. *J. Gen. Microbiol.*, **35**, pp. 411-419.
- Dombek, K.M. and Ingram, L.O. (1987). Ethanol production during Batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53 (6)**, pp. 1286-1291.
- Domchick, H., Gams, W. et Anderson, T.H. (1993). Compendium of soil Fungi. Vol. I Ed.: I.H.W. Verlag. Eching., 220 p.
- Donmez, S. and Ozelik, F. (1992). Ethanol fermentation of beet molasses by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **14**, pp. 413-416.
- Douglas, D.M et Munnecke, M. (1981). Basic principes of ethanol fermentation. In Biomass conversion, Chap 18, pp. 339-355.
- Drysdale, C.R. et McKay, A.M. (1995). Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **41 (5)**, pp. 252-254.
- Dumoulin, E.D (1986). Determination of ethanol in complex products of distilleries by stripping on gaz chromatographic analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, pp. 66-70.
- Durand, G. et Monsan, P. (1982). Les enzymes : Production et utilisations industrielles. Ed.: Bordas, Paris, pp. 23-24.
- Duran-Paramo, E., Garcia-Kirchner, R., Hervagault, J.F., Thomas, D., Barbotin, J.N. (2000). α -Amylase production by free and immobilized *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84**, pp. 479-4850
- Egas, M.C., Da Cota, M.S., Cowman, D.A., Pires, E-M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* ork A: Purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, **2 (1)**, pp. 23-32.
- Ejiofor, A.O, Solomon, B.O, Posten, C., Deckwer, W.D (1994). Analysis of the respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose in a fed-batch fermentation strategy for accurate parameter estimation. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41 (6)**, pp. 232-239.
- Ejiofor, A.O., Chisti, Y., Moo-Young, M. (1996). Fed-batch production of baker's yeast using millet (*Pennisetum typhoides*) flour hydrolysate as the carbon source. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, **16 (2)**, pp. 102-109.
- El-Holi, M.A. et Al-Delaimy, K. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African J. Biotechnol.*, **2 (10)**, pp. 356-359.
- El-Moubarek, A. and Osman, A.M. (1984). Industrializations of Sudanese dates. Quality of date jam as affected by of maturity. *Date palm J.*, **3 (1)**, pp. 317-327.
- Essia-Ngang, J.J., Wolniewicz, E., Letourneau, F., Villa, P. (1992). Stimulation of *Lactobacillus* during alcoholic fermentation: Action of Sucrose Hydrolysis by Yeast. *Biotechnol. Lett.*, **14**, pp. 741-746.

-
- Estanov, P (1988). Valorisation de la datte dans les systèmes agricoles oasiens. *CIHEAM, Série A, Séminaires méditerranéens*, **11**, pp. 301-318.
- Evans, I.H. (1990). Yeast strains for baking. In: Spencer, J.F.T, Yeast technology, P (93 - 95). Ed.: L'usine nouvelle, Paris, 239 p.
- Ewary, E. (1989). *Aspergillus niger* strain producing citric acid on sucrose and vegetable oil. *Oskara Langego. Wrocrauiu.*, **76**, pp.49-56.
- Fadel, M. and Foda, M.S. (2001). A novel approach for production of highly active baker's yeast from fodder yeast, a by product from ethanol production industry. *J. Biol. Scienc.*, **1 (7)**, pp. 614-620.
- Ferrari, M.D, Bianco, R., Froche, C., Loperena, M.L. (2001). Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotech. Lett.*, **23 (1)**, pp. 1-4.
- Fezeli, A., Ogawa T., Fazeli A. (1976). Effect of ferrocyanide treatment and step change of pH on citric acid production from Iranian beet molasses with *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* , . . . **54 (2)** , pp. 63-66.
- Floran, J. (1993). Les moisissures. Ed : Société française de microbiologie, Paris, pp. 129-130.
- Franz A., Burgstaller W., Muller B., Schinner F. (1993). Influence of medium components and metabolic inhibitors on citric acid production by *Penicillium simplicissimum*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, pp. 2101-2107
- Fredriksson, J. (2001). Probing Control of glucose feeding in cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. Master Thesis, Department of Automatic Control Lund Institute of Technology, Sweden, 54p.
- Gana, S. et Touzi, A. (2001). Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation en discontinue et continue. *Rev. Energ. Renouvel.*, **spéciale Biomasse**, pp. 51-58.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A.(2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for #-amylase production. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, pp. 269-274.
- Gaudmaris, G., Arlie, J.P. et Bet, J.C. (1986). Les carburants de substitution. *Rev. Rech.*, **17**, pp. 376-384.
- Gay, R. (1979). Microbiologie et industrie alimentaire. Ed.: APRIA, Vol II, Paris, pp. 111-179.
- Girard, J. 1962). Le palmier dattier. Dans compte rendu des travaux de recherches effectués à la station d'El-Arfiane, 20 p.
- Gomez, R., Schnabe, I., Garrido J. (1988). Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **10 (3)**, pp. 188-191.
- Grote, W., Rogers, P.L. (1985). Ethanol production from sucrose-based raw materials using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Biomass Rev.*, **8**, pp. 169-184.
- Grubb, C.F., Mawson, A.J. (1993). Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechol. Let.*, **15**, pp. 621-626.
-

- Guebel, D.V., Néstor Darias, N.V. (2001). Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic flux balance model. *J. Biotechnol.*, **15**, pp. 60-70.
- Gueguim-Kana, E.B, Oloke, J.K., Lateef, A. (2007). Novel feeding strategies for *Saccharomyces cerevisiae* DS2155, using glucose limited exponential fed batch cultures with variable specific growth rates. *African J. Biotechnol.*, **6 (9)**, pp. 1122-1127.
- Guillen Moreira, F. Arrias de Lima, F., Fazzano Pedrinho, S.R., Lenartovicz, V., Giatti Marques de Souza, C., Peralta, R.M. (1999). Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. *Rev. Microbiol.*, **30 (2)**, pp.1-9.
- Guiraud J., Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed.: les éditeurs de l'usine nouvelle, Paris .236p.
- Gupta, S., Heading, L.G., Jorgensen, C.B. (1976). Effect of sugars, hydrogen ions concentration and ammonium nitrate in the formation of citric acid on *Aspergillus niger*. *Acta. Microbiol. Scienc. Humy.*, **23**, pp. 7-63.
- Gupta, S. and Sharma, C.B. (1994). Continuous production of citric acid from sugarcane molasses using a combination of submerged immobilized and surface stabilized cultures of *Aspergillus niger* KCU 520. *Biotech. Lett.* **16 (6)**, pp. 599-604.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem.*, **38**, pp. 1599-1616.
- Hadj-Sassi, A., Deschamps, A.M., Lebeault, J.M., 1996. Process analysis of L-lysine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* under different oxygen and carbon dioxide supplies and redox potentials. *Process Biochem.*, **31**, pp. 493-497.
- Haq, U.I; Sikander, A., Iqbal J. (2003). Effect of volume of culture medium on enhanced citric acid productivity by a mutant culture of *Aspergillus niger* in stirred fermentor. *Let. Appl. Microbiol.*, **36 (5)**, pp. 302-306.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N.(1995). Dictionnaire of the fungi , 8th ed. CAB.International Walling Ford. UnitedKingdom.
- Hayshida, S. et Ohta, K. (1981). Formation of high concentrations of alcohol by various yeasts. *J. Inst. Brew.*, **87**, pp. 542-543.
- Herman, T. (2003). Industrial production of amino acids by *Coryneform bacteria*. *J. Biotechnol.*, **104**, pp.. 155-172.
- Hernandez, M.S., Rodr#iguez, M.R., Perez-Guerra, N., Perez-Roses, R. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. Food Eng.*, **73**, pp. 93-100.
- Heslot, H. (1994). La levure dans les industries alimentaires. Ed., Lavoisier, Tech. et Doc., 56 p.
- Hossain, M., Brooks J.D, Moddax, J.S. (1984). The effect of sugar on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19 (6)**, pp. 393-397.
- Hyun, H.H.and Zeikus, J.G. (1985). Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49(5)**, pp.1174-1181

- Ikram, U.H., Sikander A., Qadeer, M.A., Javed, I. (2002). Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. *Électron. J. Biotechnol.*, **5 (2)**, pp. 8-9.
- Ikram, U.H., Ali, S., Sikander, A., Qadeer, M. A., Iqbal, J. (2003). Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. *Biores. Technol.*, **86 (3)**, pp. 227-233.
- Jalaluddin, A. K., Khalid, O. A., Taha, A. K., Abou-Zeid, A.A.Z. (1995). Utilisation of Saudi dates sugars in production of Baker's yeast. *Biores. Technol.*, **53**, pp. 63-66.
- Jernejc, K., Vendramin, M., Cimerman, A. (1989). Lipid composition of *Aspergillus niger* in citric acid accumulating and nonaccumulating conditions. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **11**, pp. 452-456.
- Jianlong, W., Xianghua, W., Ding, Z. (2000). Production of citric acid from molasses integrated with in-situ product separation by ion-exchange resin adsorption. *Biores. Technol.*, **75 (3)**, pp. 231-234.
- Kamel, B.S., Diab, M.F., Iliyan, M.A., Salman, A.J. (1981). Nutritional value of whole dates and date pits. *Poultry Scienc.*, **60**, pp. 1005-1012.
- Kathiresan, K. and Manivannan, S. (2006). Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African J. Biotechnol.* **5(10)**, pp. 829-832.
- Kaur, P., Grewal, H.S., Kocher, G.S. (2003). Production of α -amylase by *Aspergillus niger* using wheat bran in submerged and solid state fermentations. *Indian J. Microbiol.*, **43**, pp. 143-145.
- Keating, L., Kelly, C., Forgartry, W. (1998). Mechanism of action and the substrate dependent pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Researc.*, **309**, pp. 311-318.
- Khare, S.K., Jha, K., Gandhi, A.P. (1994). Use of agarose-entrapped *Aspergillus niger* cells for the production of citric acid from soy whey. *App. Microbiol. Biotechnol.*, **41 (5)**, pp. 571-573.
- Kim, C.H., Abidin, Z., Ngee, C.C., Rhee, S.K. (1992). Pilot-scale ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* from simultaneously saccharified sago starch. *Biores. Technol.*, **40 (1)**, pp. 1-6.
- Kiransree, N., Sridhara, M., Venkateswar-Rao, L. (2000). Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioproc. Biosys. Engin.*, **22 (3)**, pp. 243-246.
- Kreger Vans, R.J. (1984). The yeast taxonomic study. Ed : Elsevier, Holland, 54 p.
- Kongkiattikajorn, J., Rodmui, A., Dandusitapun, Y. (2007). Effect of Agitation rate on Batch fermentation of mixture culture of Yeasts during ethanol production from mixed glucose and xylose. *Thai J. Biotechnol.*, pp.1-4.
- Kristiansen, B. and Sinclair, C.G. (1978). Production of citric acid in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, pp.1711-1722.
- Kristiansen, B. (1994). Integrated design of fermentation plant. The production of bakers' yeast. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp. 1-83.

- Kubicek, C.P. and Rohr, M. (1977). Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Europ. J. Appl. Microbiol.*, **4**, pp. 167 - 168.
- Kubicek, C.P., Schreferl-Kunar, G., W6hrer, W., Rohr, M. (1988). Evidence for a cytoplasmatic pathway of oxalat biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microb.*, **55**, pp. 633-637.
- Kubicek, C.P., Rohr M. (1989). Citric acid fermentation. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **4**, pp. 331-73.
- Kunameni, A., Permaul, K. Singh, S. (2005). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, pp. 168-171.
- Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribereau-Gayon P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape musts by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, pp. 1246-1249.
- Lagzouli, M., Charouf, R. El-Yachioui, O., Berny, M.E.H., Jadal, M. (2007). Optimisation de la croissance et de la production de gluco amylase extra cellulaire par *Candida guilliermondii*. *Bull. Soc. Pharm.*, **146**, pp. 251-70.
- Larpent, J.P. et Gourgand, P. (1990). Microbiologie pratique. Ed.: Collection Herman, Paris, pp. 35-111.
- Larpent-Gourgand, M. and Sanglier, J.J. (1992). Biotechnologies, Principe et méthodes. Ed.: Doin.Editeurs, Paris, pp. 574-581.
- Layokun, S.K., Obawole, A.B., Fatile, I.A., Solomon, B.O. (2006). Investigation of cashew apple juice as a substrate for single cell protein production. *J. Food Scienc.*, **51 (1)**, pp. 237-238.
- Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Biores. Technol.*, **98**, pp. 3367-3374.
- Litchfield, J.H. (1979). Production of single cell protein for use in food or feed. In : Pepler, H.J, Perlman, Mirobiol., Technol.Vol (1), pp. 93-95..
- Lucio de Souza, E., Erika, M.E.H., Castilho, V.M., Delima, A., Bellini, M.Z., Cruz, D., Cruz, Z.R. (1996). Production and characterization of #-amylase from *Rhizopus sp.* *Arq. Biol. Technol.*, **39 (4)**, pp. 831 – 839.
- Maiorella, B.L. (1985). L'éthanol: Comprehensive biotechnology. The principal's applications and regulations of biotechnology. In: Industry, Agricultural and medical, Vol. 3. Ed.: Pergamon, Press., England, pp. 262-265.
- Mahmoud, A.E. (1993). Different factors affecting growth and amylase production by fungi inhabiting poultry feeds. *J. Basic Microbiol.*, **33 (3)**, pp.187-192.
- Maldonado, O., Rolz, C., Shneider de Cabrera, S. (1975). Wine and vinegar production from tropical fruits. *J. Food Scienc.*, **40 (2)**, pp. 265-267.
- Malineau, M. et Marnoux, M. (1989). Microbiologie alimentaire, T(2) : Les fermentations alimentaires. Ed.: Technique et documentation, Paris, pp. 53-65.

- Manginot, C., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **23 (8)**, pp. 511-517.
- Manonmani, H.K. and Sreekantiahk, K.R. (1989). Citric acid production by a selected isolate of *Aspergillus niger* in defined media. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4 (2)**, pp. 75-79.
- Mattey, M. (1992). The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12**, pp. 87-132.
- Mazhar, R., Sikander, A., Ikram, U.H., Waheed, A. (2004). Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* NG-110 in shake flask. *J. Biol. Scienc.*, **3 (3)**, pp. 360-370.
- Mehaia, M.A. (1991). Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **13**, pp. 257-261.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A. and Leao, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.*, **97 (3)**, pp. 540–545.
- Mercier, C. (1985). Les enzymes amylolytiques. In : Hydrolases et polymérase. Ed.: Gauthier Villars, Paris, pp. 109-142.
- Merrouchi, L., Acourene, S., Bouamar, B. (2006). Valorisation des rebuts de dattes et des dattes communes dans les oasis du sud-est Algérien. *Rev. Rech. Agro.*, **18**, pp. 79-87.
- Miskiewicz, T. and Borowiak, D. (2005). A logistic feeding profile for a Fed-Batch baker's yeast process. *Electronic J. Polish Agric. Universit.*, **8 (4)**, pp. 1-13.
- Milson, P.E. and Meers, J.L. (1985). Citric acid. In : Comprehensive biotechnology. Ed.: Bergamon Press, New-York, pp. 6654-680.
- Mohamed, M.A. and Ahmed, A.A. (1981). Libyan date syrup (rub-at-tamr). *J. Food Scienc.*, **46 (4)**. pp. 1162-1166.
- Mohammed, N.A., Al-Obaidi, Z.S., Hassen, N.A., Jassem, M.A. (1986). Semi-industrial production of baker's yeast using date extract and molasses". *J. Agricul. Water Resou. Resear.*, **5, (1)**, pp. 20-45.
- Monte-Alegre, R., Rigo, M. Joekes I. (2003). Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysolite. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **46 (4)**, pp. 29-37
- Moreira, M.T., Sanromain, A., Feijoo, G. and Lema, J.M. (1996). Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **19**, pp. 261-266.
- Morimura, S., Ya-Ling, Z., Kenjikida, K. (1997). Ethanol production by repeated-Batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermo tolerant strains. *J. Ferm. Bioeng.*, **83 (3)**, pp. 271-274.
- Moriya, K., Shimoi, O, Ichi-Sato, S., SAITO, K. Tadenuma, M. (1989). Ethanol fermentation of beet molasses by a yeast resistant to distillery waste water and 2-deoxyglucose. *J. Fermt. Bioeng.*, **67 (5)**, pp. 321-323

- Munier, P. (1973). Le palmier dattier. Ed.: G.P, Maisonneuve, la rose, Paris, 211p.
- Mwesigye, P.K. and Barford, J.P. (1996). Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Fermt. Bioeng.*, **82 (2)**, pp. 101-108.
- Nadeem AF, Syed Q, Baig S, Irfan A and Nadeem A (2010). Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower Alcohols. *Turk. J. Biochem.*, **35**, pp. 7-13.
- Nadhim, A. (1982). Production d'éthanol à partir de sucres de dattes. In: Seminary on the dates. 4 – 9 Dec, 1982, Baghdad, pp. 112 -138.
- Nanba, A., nishizawa, V., Tsuchiya, V. and Nagai, S. (1987). Kinetic analysis for Batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.*, **65 (3)**, pp. 277-283.
- Nancib, N., Nancib, A. and Boudrant, J. (1997). Use of date wastes products in the fermentative formation of Baker'S Yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.*, **60**, pp. 67-71.
- Navarro, J.M. (1980). Fermentation alcoolique: Influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'éthanol. *J. cellul. Mol. Biol.*, **26**, pp.241-246.
- Nawaz-Bhatti, H., Hamid-Rashid, M., Nawaz, R., Asgher, M., Perveen, M., Abdul Jabbar, A. (2007). Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid-state fermentation by *Fusarium solani*. *Food Technol. Biotechnol.*, **45 (1)**, pp. 51-56.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V., Vriend, G. (2001). The determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering.*, **14 (7)**, pp. 505-512.
- Nonus, M. et Miniac, M. (1985). Gain de productivité en éthanol en fermentation alcoolique des produits de sucrerie (mélasses, égouts). *J. Ind..Agricul..Aliment.*, **102**, pp. 971-985.
- Ojha, M. (2001). Cours de Microbiologie générale et appliquée. Ed.: Institut de microbiologie Université de Paris, France, 70 p.
- Okagbue, R. N. (1988). A note on the leavening activity of yeasts isolated from Nigerian palm wine. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, pp. 235-240.
- Oranut, P. (1999). Utilization of mixed sugars for Alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Thammasat Int. J. Scienc. Technol.*, **4 (2)**, pp. 1-9.
- Ould-Elhadj, M.M. (2001). Etude comparative de la productivité d'alcool brut des dattes selon les variétés. *Rev. Rech. Agro.*, **9**, pp. 91-99.
- Pandey, K. and Agarwal, P.K. (1993). Effect of EDTA, potassium ferrocyanide, and sodium potassium tartarate on the production of ethanol from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **15**, pp. 888-898.
- Pandey, A., Selvakumar, C.R., Soccol, C.R, Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current Scienc*, **77**, pp.149-162.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *App. Biotechnol. Biochem.* **31**, pp.135-152.

- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Léon, J.A., Nigam, P. (2001). Production of organic acids by fermentation on semiconductors. In: Fermentation on semiconductors: Fundamental principles and applications. Ed. : The New Delhi Publishers of Asiatech, New-Delhi, pp. 113-126.
- Papagianni M., Matthey, M., Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **25**, pp. 710-717.
- Papagianni, M., Frank Wayman, F., Matthey, M (2005). Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Envir. Microbiol.*, **71** (11), pp. 7178-7186.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane, transport and modelling. *Biotechnol. Advanc.* N°25, pp. 244-263.
- Patil, S.G. and Patil, B.G. (1989). Chitin supplement speeds up the ethanol production in cane molasses fermentation. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **11**, pp. 38-43.
- Patil, S.G. and Patil, B.G. (1990). Acceleration of ethanol production activity of yeast in cane molasses fermentation by the addition of fungal mycelium. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **12**, pp. 141-148.
- Pavezzi, F.C., Gomes, E., Roberto-Da-Silva, R. (2008). Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. *Brazilian J. Microbiol.*, **39** (1), pp. 127-135.
- Pazouki, M., Felse, P.A., Sinha, J. and Pa,da, T. (2000). Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Biopro. Engin.*, **22** (4), pp. 353-361.
- Pedersen, H., and Nielsen, J. (2000). The influence of nitrogen sources on the alpha amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, pp. 278-281.
- Pellerin, P. et Lebrun, R. (2001). Vers une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique par addition au moût d'un bio-régulateur spécifique : Impact sur la vitesse de fermentation et sur les caractéristiques du vin. *Rev. Œnologues* , **101** , pp. 13-16.
- Pelmont, J. (1995). Enzymes. Ed.: Presse universitaire Grenoble, France, pp. 292-665.
- Pessoa, D.F., Diasde, C., Angela, C. (1982). Production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Microbiol. Rev.*, **13** (2), pp. 225-229.
- Pfefferle, W., Lotter, H., Friedrich, H., Degener, W. (1993). Process for the fermentative production of amino acids. *Europ. Patent*, pp. 532-867.
- Phowchinda, O. (1999). Utilization of mixed sugars for alcoholic fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Thammasa Int J. Scienc. Techol.*, **4** (2), pp. 23-31.
- Pintado, J., Torrado, A., Gonzalez, M. P., Murado, M. A. (1998). Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzy. Microbiol.*, **6** pp. 55-62.
- Pitt, J.I. and Hockinga, D. (1997). Fungi and food spoilage. Ed.: Blackie Academic and Professional. London, 220 p.

- Plessas, S., Kourkoutas, Y., Psarianos, C., Kanellaki, M., Koutinas, A. (2006). Continuous baker's yeast production using orange peel as promoting support in the bioreactor. *J. Scienc. Food Agricu.*, **86 (3)**, pp. 407-414.
- Pocock, K.F. and Rankine, B.C. (1997). Measurement of the alcohol content of wine by gas chromatography". *Rev. Aust. Wine Brew. Spirit* , **93**, pp. 32 - 34.
- Poosaran, N., Heyes, R.H., Rogers, P.L. (1985). Ethanol production from cassava starch using a highly productive strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. *Biomass*, **7**, pp. 171-183.
- Pramanik, K. (2003). Parametric studies on Batch alcohol fermentation using *Saccharomyces* yeast extracted from toddy. *J. Chin. Inst. Chem. Engin.*, **34 (4)**, pp. 487-492.
- Pramanik, K. and Eswar-Rao, D. (2005). Kinetic study on ethanol fermentation of grape waste using *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from toddy. *India J. Instit. Engin.*, **85**, pp. 53-58.
- Prado, F.C., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L., Rodrigues-Leon, J.A., Soccol, C.R. (2005). Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. *Braz. J. Chem. Engin.*, **22 (4)**, pp. 22-35.
- Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C.R., Pandey, A. (2004). Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its Properties. *Brazilian. Arch. Biol. Technol.*, **47**, pp. 309-317.
- Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. (1987). Solid-state fermentation for production of alpha amylase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnol. Lett.*, **9**, pp. 323-328.
- Ravi, K.S., Shashi K., Surendra, K. (2009). Production of α -amylase from agricultural byproducts by *Humicola lanuginosa* in solid state fermentation, *Current trends Biotechnol. Pharm.*, **3(2)**, pp. 172-180.
- Reed, G., and Nagodawithana, T. W.** (1991). Yeast technology. Ed.: Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y, pp. 261-368.
- Reed, G. and Pepler, H.J. (1973). Baker's yeast production. Yeast technology, Ed.: Westport, Connecticut, AVI, Pub. company INC, New York, pp. 53-102.
- Renato, P.R. and Nelson, P.G. (2009). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25 (11)**, pp.1929-1939.
- Riviere, J. (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Ed.: Masson et c^{ie}, Paris, 2032 p.
- Rougieux, G. et Girard, H. (1984). Essai de production de levures à partir du jus de dattes. *Ann. Inst. Agricole*, **1**, pp. 1028-1030.
- Roukas, T. (1998). Citric acid production from carob pod extract by cell recycle of *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Food Biotechnol.*, **12**, pp. 91-104.
- [Rubina M.](#) , [Sikander A.](#) , [Ikram, U.H.](#) and [Abdul-Waheed](#) , W. (2003). Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* NG-110 in Shake Flask. *J. Biolog. Scienc.*, **3 (3)**, pp. 360-370.

- Sablayrolles J.M. (1998). Conduite de la fermentation alcoolique. In : Œnologie. Fondements Scientifiques et Technologiques. Ed.: Flanzy, Lavoisier Tec. et Doc, Paris, pp. 415-444.
- Sachde, A.G., (1981). On study of the possibility of producing quantity wines from some commercial varieties of dates. *J. Agricul.*, **16 (1)**, pp. 93-106.
- [Saima, K.](#) , [Asad, U.R.](#) , [Ambreen, S.](#) , [Sikander, A.](#) , Kiran, S., [Ikram, U.H.](#) (2003). Nitrogen limitation for citrate accumulation by *Yarrowia lipolytica* NRRL-143 in shake flask. *J. Food Technol.*, **1 (4)**, pp. 157-159.
- Sanjay, K. and Sharma, P. (1994). A highly performance fermentation process for production of citric acid from sugarcane molasses. *J. Microbiol.*, **23**, pp. 211-217.
- Salmon, J.M. and Mauricio, J.C. (1994). Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during Alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, **16**, pp. 89-94.
- Sawaya, W.N, Safi L, Black, L.T., Al-Muhamed, M.M. (1983). Physical and chemical characterization of the major date varieties grown in Saudi-Arabia. *Date palm J.*, **2 (2)**, pp 183-196.
- Sayas, A. and Hans-Jurgen, R. (2006). Oxygen and temperature effect on continuous citric acid secretion in *Candida oleophila*. *Electronic J. Biotechnol.*, **9 (4)**, pp 15-26.
- Schamburg, D., Salzmann, M. (1991). Alpha amylase. In: Enzyme hand Book. Vol. IV Ed. : Spring-verlag, Berlin. Pp. 1-11.
- Shadafza, D., Ogawa, T., Fazeli, F. (1976). Comparison of citric acid production from beet molasses and date syrup with *Aspergillus niger*. *Hakko Kogaku Zasshi*, **54**, pp. 65-75.
- Scribans, R. (1993). Mode de conduite des bio réacteurs. In: Biotechnologie. Ed.: Lavoisier, Tech.et Doc, Paris, pp. 238-250.
- Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A. (1998). Biosynthesis of gluco-amylase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using tea waste as the basis of solid substrate, *Bioresour. Technol.*, **65**, pp. 83-85.
- Siboukeur, O., Ould-Elhadj, D. et Zargat, F. (2001). Contribution à l'étude de la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* cultivée sur moût de dattes de la variété Ghars. *Rev. CDTN, spéciale biomasse*, pp. 93-96.
- Sikander, A., Haq, I. et Qadeer (2001). **Effect of mineral nutrient on the production of citric acid by *Aspergillus niger*** . *J. Biol. Scienc.*, **32 (1)**, pp. 31-35.
- Sikander, A., Ikram H.Q., Qadeer, M.A. and Javed, I. (2002 a). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic J. Biotechnol.*, **5 (3)**, pp. 114-125.
- [Sikander, A.](#) , [Hamad A.](#) , [Ikram, U.H.](#) . (2002 b). Enhancement in citrate production by alcoholic limitation. *J. Biol. Scienc.*, **2 (2)**, pp. 70-72.
- [Sikander, A.](#) , [Asad, U.R.](#) , A., [Ikram, U.H.](#) (2003 a). Time Course Study of Citrate Fermentation by *Aspergillus niger* in Stationary Culture. *Pakistan J. Biol. Scienc.*, **6 (4)**, pp.331-333.

- Sikander, A., [Asad, U.R.](#) , [Amna, E.](#) , [Ikram, U.H.](#) , [Javed, I.](#) (2003 b). Effect of Vegetative Inoculum on Submerged Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*. *Pakistan J. Biol. Scienc.*, **4**, pp. 334-335.
- Sikander, A. (2004). Studies on the submerged fermentation of citric acid by *Aspergillus niger* in stirred fermentor. Thesis of doctorate, University of Pendjab, Pakistan, 428 p.
- Simon, R. et Meunier, R. (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Ed.: Masson et Cie, Paris, 559 p.
- Sindhu, R., Suprabha, G.N., Shashidhar, S.(2009). Optimization of process parameters for the production of α - amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African J. Microbiol. Researc*, **3(9)**, pp. 498-503.
- Siva-Kissava, S., Rakshit, S.K., Panda, T. (1995). Production of ethanol by *Zymomona mobilis* : The effect of Batch step feeding of glucose and relevant growth factors. *Proc. Biochem.*, **30 (1)**, pp. 41-47.
- Socol, C.R., Prado F.C., Vandenberghe L.P., Pandey A. (2003). General aspects of the citric acid production by submerged fermentation on semiconductors. In: Concise Encyclopedia of Technology. Ed.: The Press of Haworth, New York, pp. 652-664.
- Solomon, B.O., Layokun, S.K., Omobuwajo, T.O. (1991). Nigerian blackstrap molasses substrate for the production cell protein with particular reference to baker's yeast. *J. Technol.*, **3**, pp. 25-29.
- Soni, B.K., Kapp, C., Goma, G., Soucaille, P. (1992). Solvent production from starch effect of pH on α -amylase and glucoamylase localization and synthesis in synthetic medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, pp. 539-543.
- Sonnleitner, B. and Kappeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, pp. 927-937.
- Spencer-Martins, I. (1982). Extracellular isoamylase produced by the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Appl. Environ. Microbiol*, **44 (6)**, pp. 1253-1257.
- Strasser, H., Burgstaller, W., Schinner, F. (1994). High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, pp. 365-370
- Taylor, P.M., Napier, E.J., Fleming, I.D. (1978). Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Carbohydr. Res.*, **61**, pp. 301-308.
- Teodoro, C.E., Martins, M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Braz. J. Microbiol.*, **31 (4)**, pp. 298-302.
- Touzi, A. (1997). Production d'éthanol à partir des déchets de dattes. *Rev. Rech. Agro.*, **1**, pp. 53-58.
- Tsay, S. and To, Y. (1987). Citric acid production using immobilised conidia of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioengin.*, **29**, pp. 25-31.
- Van-Hoek, P., Van-Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64 (2)**, pp. 4226-4233.

-
- Vandenbergh, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A., Lebeault, J.M. (1999). Microbial production of citric acid. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **42**, pp. 263-276.
- Van-Hoek, P., Hulster, E., Johannes, P., Van-Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2000). Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol Bioengin.*, **68**, pp. 517-523.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1992).** Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Rev. Yeast*, **8**, pp. 501-517.
- Vergano, M.G., Fernandez, N., Soria, M.A., Kerber, M.S. (1996). Influence of inoculum on citric acid preparation. *J. Biotechnol.*, **12**, pp. 655-656.
- Vidyalakshmi, R. Paranthaman, R., Indhumathi, J. (2009) Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus sp.* *World J. Chem.*, **4 (1)**, pp. 89-91.
- [Walid, A. L ., Khaled, M.G . , Ehab R.H . \(2006\). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Biores. Technol.*, **19**, pp. 171-173.](#)
- Wang, Q., Wang, X., Maa, H. (2008). Glucoamylase production from food wastes by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process. Biochem.*, **43**, pp. 280-286.
- Wieczorek, S. and Brauer, H. (1998). Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. *Biopro. Engin.*, **18 (1)**, pp. 1-6
- Win, S.S., Impoolsup, A., Noomhorm, A. (1996). Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch and Fed-Batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *J. Indust. Microbiol Biotechnol.*, **16 (2)**, pp. 117-123.
- Xu, D.B., Madrid, C. P., Rohr, M., Kubicek, C. P. (1989). The influence of type and concentration of the carbon source in production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Technol.*, **30**, pp. 553-558.
- White, J. (1954). *Yeast Technology*. Ed.: Chapman and Hall, London, 50 p.
- Yousif, A.K., Benjamin, N.D., Kado, A. (1982). Chemical composition of four Iraqi date cultivars. *Date palm J.*, **1 (2)**, pp. 285-294.
- Zarowska, B., Wojtatowicz, M., Rymowicz, W., Robak, M. (2001). Production of citric acid on sugar beet molasses by single and mixed cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Electronic J. Polish Agric. University*, **4 (2)**, pp. 1-8.
- Zhu, L.Y., Nguyen, C.H., Sato, T., Takeuchi, M. (2004). Analysis of secreted proteins during conidial germination of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68 (12)**, pp. 2607-2612.

Annexes

1/ Milieux d'enrichissement de *Saccharomyces cerevisiae*

Constituants	Simple concentration (n)		Double concentration (2n)
	Gélosé (Solide)	Liquide	
Extrait de levure Glucose Rose de Bengale Gélose Eau distillée pH	5.0 g 20.0 g 0.3 g 30.0 g 1000 ml 5.0	5.0 g 20.0 g 0.3 g - 1000 ml 5.0	10.0 g 40.0 g 0.3 g - 1000ml 5.0

2/ Milieu d'isolement et de purification de *Saccharomyces cerevisiae*

Constituants	Gélosé (Solide)	Liquide
Extrait de levure Saccharose Agar Acide lactique Sulfate de magnésium à 20 % NH ₄ HPO ₄ à 20 % Eau distillée pH	20.0 g 100.0 g 30 g 5.0 ml 5.0 ml 1000 ml 5.0	20.0 g 100.0 g - 5.0 ml 5.0 ml 1000 ml 5.0

3/ Milieu de Czapeck-Dox d'isolement d'*Aspergillus niger*

- Saccharose : 30.0 g
- Na₂NO₃: 2.0 g
- KH₂PO₄: 1.0 g
- MgSO₄: 0.5 g
- KCl : 0.5 g
- FeSO₄: 0.01g
- Agar : 20.0 g
- Eau distillée : 1000ml

4/ Milieu d'isolement de *Candida guilliermondii*

- Amidon : 4.0
- (NH₄)₂SO₄ : 15.0
- KH₂PO₄ : 3.0
- MgSO₄.5H₂O : 0.5
- Extrait de levure : 4.0
- Micro-éléments en solution : 1.0 ml
- Agar : 15.0 g

5/ Composition du milieu d'entretien de *Saccharomyces cerevisiae*

- Extrait de levure : 3.0 g

- Extrait de Malt : 3.0 g
- Peptone : 5.0 g
- Glucose : 10.0 g
- Agar : 20.0 g
- Eau distillé : 1000 ml
- pH : 4,5

6/ Composition du milieu de Carlsberg

- Extrait de levure : 20 g
- Saccharose : 100 g
- Sulfate de magnésium (MgSO_4) à 20 % : 5 ml
- Phosphate d'ammonium à 20 % (NH_4)₂ PO₄ : 5 ml
- Eau distillée : 1000 ml
- Le pH est ajusté à 4.5

Conclusion