

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et de Microbiologie



MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Option : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Thème

Bio production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* en utilisant deux substrats d'intérêt : les dattes variété "Mech-Degla" et la mélasse de canne à sucre.

Élaboré par

M^r Meghni Karim

M^r Laimeche Assalas

M^r Mesbahi Zahereddine

Devant le jury composé de :

Président : M^r Bouacem. Kh

MCA

Promotrice : M^{me} Berrouane. N

MAB

Examinatrice : M^{lle} Zareb. A

MCB

Promotion : 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Nous exprimons notre profonde gratitude à Dieu, l'omniscient, pour nous avoir béni avec la connaissance et les capacités nécessaires pour mener à bien ce travail de recherche. Nous reconnaissons l'importance de cette opportunité et nous nous engageons à utiliser cette science de manière bénéfique pour la société.

Nous adressons nos remerciements chaleureux à M^{me} Berrouane, notre promotrice, pour son engagement indéfectible, sa confiance en nos capacités et ses précieux conseils tout au long de ce projet. Sa présence inspirante et ses orientations éclairées ont été des facteurs déterminants pour la réalisation de ce travail.

Nous exprimons également notre gratitude envers M^r Bouacem pour son soutien constant, son assistance précieuse et ses encouragements qui nous ont motivés à maintenir le cap malgré les défis rencontrés. Sa contribution a été d'une importance capitale dans notre cheminement et nous lui en sommes sincèrement reconnaissants.

Nous tenons également à exprimer notre sincère gratitude envers M^{lle} Zareb pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire. Sa participation en tant qu'examineur a été d'une importance capitale dans l'évaluation de notre travail de recherche.

DEDICACE

*Nous souhaitons exprimer notre
profonde gratitude envers nos parents
qui ont été une source constante de
soutien, d'encouragement et de patience
tout au long de notre parcours. Leur
amour inconditionnel, leurs sacrifices
et leur confiance indéfectible en nous
ont été des fondements essentiels de
notre réussite.*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CODES	SIGNIFICATION
AC	Acide citrique
A.	<i>Aspergillus</i>
<i>A.niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
pH	Potentiel hydrique
GES	Gaze à effet de serre
Mn ²⁺	Manganèse
SmF	Fermentation à l'état liquide
SSF	Fermentation à l'état solide
GRAS	Généralement reconnu comme sans danger
MA	Malt agar
PDA	Potato dextrose agar
g/l	Gramme par litre
Kg/l	Kilogramme par litre
°C	Degré Celsius
MD	Mech-Degla

LISTE DES TABLEAUX

N° Des Tableaux	TITRES DES TABLEAUX	PAGE
Tableau 1	Micro-organismes producteurs d'acide citrique	4
Tableau 2	Avantages et inconvénients des différents types de fermentations avec leurs effets sur la production d'acide citrique	8
Tableau 3	Principaux facteurs qui influencent la production d'acide citrique	20
Tableau 4	Paramètres physico-chimiques de la mélasse	27
Tableau 5	Compositions chimiques de la datte Mech-degla	28
Tableau 6	Caractéristiques physico-chimiques de la datte Mech-Degla	28
Tableau 7	Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des trois solutions mères (moût de dattes, la mélasse et l'amalgame).	35
Tableau 8	Quantité de l'acide citrique pour chaque milieu de fermentation	43

LISTES DES FIGURES

N° de Figures	Titre de figures	Page
Figure 1	Organigramme illustrant le processus de production d'AC à partir de différents substrats	05
Figure 2	Différentes applications conventionnelles d'AC (PPCPs- Produits pharmaceutiques et de soins personnels)	09
Figure 3	Appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i>	15
Figure 4	Les étapes en photos de la préparation du Moût de dattes de la variété Mech-Degla	29
Figure 5	Mélasses de canne à sucre traitées avec de l'eau distillé	30
Figure 6	Culture d' <i>A.niger</i> sur milieu PDA	30
Figure 7	Réalisation d'une fermentation submergée	32
Figure 8	Procédé d'extraction de l'acide citrique	34
Figure 9	Évolution du pH des substrats au cours de la fermentation.	36
Figure10	Évolution de l'assimilation des sucres au cours de la fermentation.	39

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION.....	01
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	03
I. Production d'acide citrique.....	03
I.1. Production durable d'acide citrique.....	03
I.2. Micro-organismes utilisés pour la production de l'acide citrique.....	04
I.3. Substrats utilisés pour la production d'acide citrique.....	04
I.4. Techniques de fermentation pour la bio-production d'AC.....	06
I.4.1. Fermentation à l'état liquide.....	06
I.4.2. Fermentation à l'état solide.....	07
I.5. Applications de l'acide citrique.....	09
I.6. Techniques de récupération et de purification de l'acide citrique.....	10
II. Souche et substrats d'intérêts.....	11
II.1. Souche d'intérêt.....	11
II.1.1. Généralité sur les <i>Aspergillus</i>	11
II.1.2. <i>Aspergillus niger</i>	12
II.1.2.1. Classification de l' <i>Aspergillus niger</i>	12
A. Morphologie	13
B. Physiologie.....	15
II.1.2.2. Culture de l' <i>Aspergillus niger</i>	16
II.1.2.3. Méthodes de culture d' <i>Aspergillus niger</i>	16
II.2. Substrats d'intérêts.....	17
II.2.1. Dattes.....	17
II.2.1.1. Variété d'intérêt (Mech-Degla).....	17
II.2.1.2. Composants favorisant la croissance de l' <i>Aspergillus niger</i> et la production de de l'acide citrique.....	18
II.2.2. Mélasse	18
III. Production d'acide citrique par <i>Aspergillus niger</i>	18
III.1. Paramètres clés pour la production d'acide citrique par <i>Aspergillus niger</i>	20
III.1.1. Source de carbone.....	20
III.1.2. Source de phosphore.....	22
III.1.3. Source de l'azote.....	22

III.1.4. pH du milieu de culture.....	22
III.1.5. Oligo-éléments.....	23
III.1.6. Concentration d'alcools.....	23
III.1.7. Aération.....	24
III.1.8. Autres facteurs	25
Étude Expérimentale.....	26
Chapitre I : Matériel Et Méthodes.....	26
I.1. Lieu et durée du stage.....	26
I.2. Objectif de l'étude.....	26
I.3. Matériel et méthodes.....	26
I.3.1. Matériel biologique et substrats utilisés.....	26
I.3.2. Appareils utilisés.....	28
I.3.3. Méthodes.....	28
I.3.3.1. Repiquage de la souche d' <i>Aspergillus niger</i>	28
I.3.3.2. Préparation du moût de dattes.....	29
I.3.3.3. Préparation de la mélasse.....	30
I.3.3.4. Préparation de l'inoculum.....	30
I.3.3.5. Inoculation du milieu de fermentation.....	31
I.4. Fermentation.....	31
I.4.1. Suivi de la fermentation	32
A. Mesure du pH.....	32
B. Mesure des sucres totaux.....	33
I.5. Récupération de l'acide citrique.....	33
Chapitre II : Résultats et discussion.....	35
II.1 Caractéristiques physico-chimiques et biochimique des substrats.....	35
II.1.1. Évolution du pH.....	36
II.1.2. Évolution des sucres totaux.....	38
II.1.3. Production de l'acide citrique.....	43
Conclusion.....	46
Références bibliographiques.....	47

Introduction

L'acide citrique est un composé organique essentiel utilisé dans de nombreux secteurs industriels tels que l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. En raison de ses propriétés acides, antioxydantes et de conservation, l'acide citrique est largement utilisé comme additif alimentaire, agent de conservation, agent chélatant et dans de nombreuses autres applications (**Campbell Plat et al., 1989**).

Traditionnellement, l'acide citrique était principalement produit à partir de sources naturelles telles que les agrumes. Cependant, avec l'avancement des biotechnologies, la production d'acide citrique par fermentation microbienne est devenue une méthode plus économique et écologiquement durable (**Chergui, D et al., 2021**). À l'heure actuelle, 99 % de l'acide citrique produit dans le monde est obtenu par fermentation (**Kuforiji et al., 2010**).

Un grand nombre de microorganismes, notamment des bactéries, des champignons et des levures, ont été utilisés pour produire de l'acide citrique. Cependant, l'*Aspergillus niger*, un champignon couramment présent, est plus utilisé que les autres microorganismes pour la synthèse commerciale de l'acide citrique en raison de son rendement final plus élevé lorsqu'il est combiné avec des sucres fermentescibles. Il est facile à manipuler, peut fermenter diverses matières premières peu coûteuses et fournit constamment des rendements élevés (**Show et al., 2015**).

Il a été démontré que la production d'acide citrique par l'est fortement influencée par plusieurs conditions environnementales et certains oligo-éléments. Pour développer un processus de production maximale d'acide citrique, la standardisation du milieu utilisé et des conditions de fermentation sont cruciales (**Bekir et al., 2009**). Il est bien établi que les conditions nutritionnelles influent fortement sur la production d'acide citrique (**Ali et al., 2012**).

La disponibilité abondante et peu coûteuse de substrats appropriés, tels que les déchets biodégradables provenant de diverses industries, joue un rôle crucial dans l'efficacité de la production d'acide citrique par fermentation. Cela permet de résoudre les problèmes liés à l'élimination des déchets tout en réduisant la dépendance de l'industrie vis-à-vis d'autres sources de production d'acide citrique (**Sawant et al., 2018**). Les dattes, qui sont des fruits riches en nutriments et en sucre, représentent des substrats potentiellement intéressants pour la production d'acide citrique (**Siboukeur et al., 2001**). De plus, la mélasse, un sous-produit de l'industrie sucrière, est également utilisée comme substrat en raison de sa teneur élevée en sucres fermentescibles (**Hajar, 2017**).

Dans cette étude, notre objectif principal était de contribuer à la production d'un produit à forte valeur ajoutée en utilisant un produit local, les dattes, et de comparer cette production avec l'utilisation de la mélasse comme substrat. Plus précisément, nous avons cherché à évaluer et comparer la capacité des dattes de qualité inférieure de la variété MECH DEGLA et de la mélasse à servir de substrats pour la production d'acide citrique.

Ce mémoire est principalement structuré en deux sections distinctes :

- La première partie, consacrée à la revue de la littérature, aborde la production d'acide citrique en mettant en avant les aspects clés de ce processus. Cela englobe la souche sélectionnée d'intérêt, désignée sous le nom de '*Aspergillus niger*', dans laquelle ses caractéristiques et son rôle dans la production d'acide citrique sont examinés. De plus, elle examine les substrats utilisés dans cette production, en analysant leur importance et leurs propriétés.
- La seconde partie, consacrée à la partie expérimentale, est composée d'un premier chapitre dans lequel sont présentés les matériaux utilisés ainsi que les méthodologies expérimentales appliquées dans cette étude. Le chapitre suivant présente les résultats obtenus à partir de ces expériences, accompagnés d'une discussion correspondante. Enfin, une conclusion approfondie est formulée pour résumer de manière concise les découvertes principales et les conclusions tirées de cette recherche.

Synthèse

Bibliographique

I. Production d'acide citrique

L'acide citrique est un additif alimentaire utilisé dans l'industrie alimentaire comme acidifiant, correcteur d'acidité, agent de levuration, dans la composition d'arôme, etc. La production industrielle de l'acide citrique en poudre est réalisée via la culture d'*Aspergillus niger*, nourri sur substrat contenant du sucre (saccharose ou glucose). D'un point de vue commercial et économique, l'acide citrique est produit par la fermentation des glucides présents dans les amidons et les sucres. Cette fermentation peut être réalisée en utilisant différentes souches de moisissures, dont *Aspergillus niger*, et en utilisant différents substrats, tels que la mélasse, le glucose, le lactose, etc. La production d'acide citrique peut être décrite en trois grandes étapes : la préparation de l'inoculum, la fermentation et l'extraction. Enfin, il existe des processus de production d'acide citrique de courte durée destinés à la production en grandes quantités d'acide citrique d'une grande pureté. Environ 80% de la génération d'acide citrique est réalisée par fermentation submergée (**Siboukeur O., et al 2001**).

I.1. Production durable d'acide citrique

L'acide citrique (AC) est principalement obtenu par la fermentation aérobie du glucose, mais il existe un besoin d'approches plus durables pour sa production. Les acides carboxyliques sont considérés comme des produits chimiques importants et ont été identifiés comme des candidats prometteurs pour les intrants de construction. Ils présentent des avantages environnementaux considérables en raison de leur caractère non toxique, comestible et biodégradable. En outre, l'AC offre de vastes possibilités d'application dans des domaines tels que l'alimentation, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les détergents, l'agriculture et la nanotechnologie (**Carlos et al., 2006 ; Ashkan et al., 2010 ; Guillermo et al., 2010**).

Cependant, le marché de l'AC connaît une pression accrue avec une baisse des prix, rendant la production d'AC peu rentable en raison des coûts élevés de l'énergie et des matières premières. Parallèlement, la demande d'AC continue d'augmenter en raison de nouvelles applications. Par conséquent, il est essentiel de trouver de nouvelles approches pour une production d'AC écologiquement durable et économiquement viable. Une voie prometteuse consiste à utiliser des déchets agro-industriels peu coûteux et leurs sous-produits, en les fermentant en milieu solide à l'aide de souches microbiennes existantes ou génétiquement modifiées. Cette approche

pourrait contribuer à résoudre les défis liés à la production d'AC tout en valorisant les déchets et en réduisant l'impact environnemental (Dhillon, G. S *et al*, 2011).

I.2. Micro-organismes utilisés pour la production de l'acide citrique

Divers microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures ont été cultivés dans différents substrats afin de produire des composés organiques, notamment de l'acide citrique, comme le montre le **Tableau 1**.

L'utilisation des bactéries et de la levure revêt une importance considérable dans la production d'acides citrique, même si les études conventionnelles impliquent généralement l'utilisation de moules. Parmi les levures, *Yarrowia lipolytica* a été largement utilisée pour sa capacité à produire de grandes quantités d'AC. Un inconvénient de la fermentation de la levure réside dans le fait qu'elle produit des quantités importantes d'acide iso-citrique (AIC), un sous-produit indésirable (Caroll *et al*, 2006 Rymowicz *et al*, 2010).

Tableau 1 : Micro-organismes producteurs d'acide citrique (Crolla *et al*, 2004 ; Kuforiji *et al*, 2010)

Champignons , *A. awamori*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A.*

fonsecaeus, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. wentii*, *A. saitoi*, *A. flavus*, *Absidia sp*, *Acremonium sp*, *Botrytis sp*, *Eupenicillium sp*, *Mucor piriformis*, *Penicillium citrinum*, *P. janthinellu*, *P. luteum*, *P. restrictum*, *Talaromyces sp*, *Trichoderma viride* , *Ustilina vulgaris*

Levure *Candida tropicalis*, *C. catenula*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Kloekera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia lipolytica*

Bactéries *Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium ssp*.

Levure *Candida tropicalis*, *C. catenula*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Kloekera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia lipolytica*

I.3. Substrats utilisés pour la production d'acide citrique

En raison de l'augmentation des prix, de la diminution des ressources non renouvelables et de la concurrence avec l'approvisionnement alimentaire, ainsi que des préoccupations concernant la pollution environnementale, l'accent est mis sur la récupération, le recyclage et la valorisation de la biomasse lignocellulosique. Cela revêt une importance particulière pour l'industrie

alimentaire et agricole, qui génère d'énormes quantités de déchets (solides et liquides) lors du traitement, pouvant souvent être utilisés pour produire des bioproduits à forte valeur ajoutée. Ces déchets représentent un risque de pollution de l'environnement et entraînent une perte de biomasse et de nutriments (Dhillon, G. S et al, 2011).

Par le passé, les déchets de transformation alimentaire étaient souvent sous-estimés ou utilisés dans des applications de faible valeur, tels que les aliments pour animaux ou l'engrais. Cependant, ces dernières années, de nouvelles méthodes et politiques de gestion et de traitement des déchets ont été introduites (figure 1), mettant l'accent sur la récupération, la bioconversion et l'utilisation des éléments de valeur présents dans ces déchets. Cette évolution est motivée par la nécessité de prévenir la pollution environnementale, d'économiser de l'énergie et de nouveaux matériaux, ainsi que pour des raisons économiques (Chundakkadu, K. (2005).

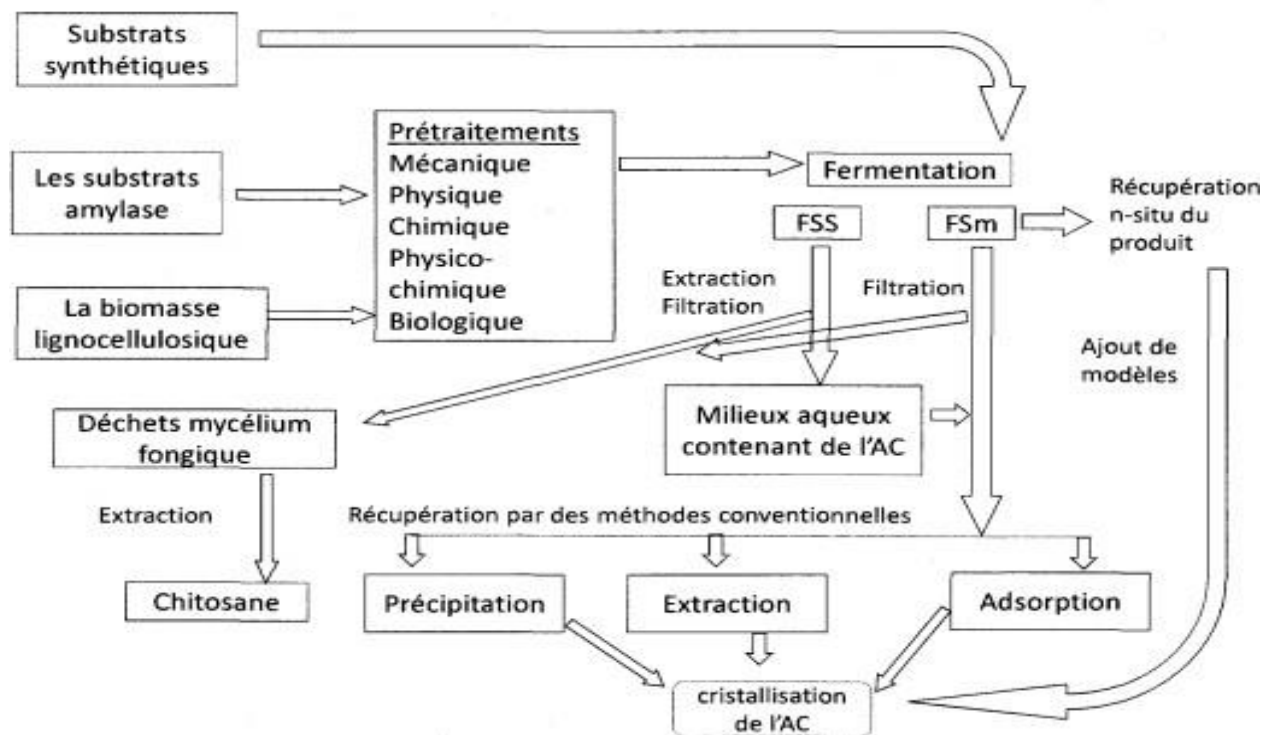


Figure 1 : Organigramme illustrant le processus de production d'AC à partir de différents substrats (Dhillon, G. S et al, 2011).

En général, les déchets de transformation alimentaire ont un potentiel de recyclage des matières premières ou de transformation en produits à haute valeur, ou peuvent être utilisés comme denrées alimentaires ou aliments pour animaux/fourrage après traitement biologique. La bioconversion des déchets de transformation alimentaire suscite un intérêt croissant. Il est

crucial d'utiliser les déchets agro-industriels pour la production d'acides carboxyliques (AC) en raison de l'augmentation des coûts des matières premières et de l'abondance de ces déchets (en raison de la population croissante). En effet, cela évite des coûts d'élimination, une perte de carbone précieux et des émissions de gaz à effet de serre (GES). Cependant, les déchets agro-industriels sont souvent complexes et nécessitent des prétraitements pour améliorer la disponibilité des éléments nutritifs et la rhéologie (viscosité et taille des particules). Ces améliorations favorisent le transfert d'oxygène et de nutriments, et augmentent le rendement de production en utilisant efficacement le substrat complet (Dhillon, G. S *et al.*, 2011).

I.4. Techniques de fermentation pour la bio-production d'AC

La fermentation est la principale méthode de production de l'AC dans le monde, représentant environ 99% de la production totale. *A. niger* est une moisissure largement reconnue et privilégiée pour sa capacité à produire de l'AC de manière efficace. La bio-production d'AC peut être subdivisée en trois étapes distinctes : la préparation, l'inoculation du milieu de fermentation, la fermentation elle-même et enfin la récupération/purification de l'AC. Les méthodes les plus couramment utilisées pour la bio-production d'AC sont la fermentation à l'état liquide (SmF) et la fermentation à l'état solide (SSF), comme indiqué dans le tableau de l'annexe 1. Selon le type de fermentation, une variété étendue de substrats peut être employée pour obtenir une production d'AC efficace et viable (Kuforiji *et al.*, 2010 ; Dhillon, G. S *et al.*, 2011).

I.4.1. Fermentation à l'état liquide

Selon les estimations, environ 80% de la production mondiale d'AC provient de la fermentation à l'état liquide (SmF), où la moisissure *A. niger* est cultivée dans un milieu contenant du glucose ou du saccharose (Kumar, V *et al.*, 2013), Principalement, la production d'AC provient de sous-produits de l'industrie sucrière.

Cependant, d'autres matières premières telles que les hydrocarbures, les résidus de déchets agro-industriels et divers matériaux riches en féculents ont également été utilisés comme sources de carbone pour la fermentation à l'état liquide (SmF) de l'AC (Jianlong *et al.*, 2000 ; Maurya *et al.*, 2000 ; Vandenberghe *et al.*, 2000 ; Ambati *et al.*, 2001 ; Rivas *et al.*, 2008).

La fermentation à l'état liquide (SmF) offre plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes, tels qu'une productivité et un rendement élevés, des coûts de main-d'œuvre réduits et un risque de contamination moindre. La durée de fermentation varie généralement de 5 à 12 jours en fonction des conditions. Bien que la SmF soit couramment utilisée pour la production

à grande échelle d'AC, il est nécessaire d'explorer des méthodes alternatives pour une production industrielle viable et durable afin de faire face à la baisse des prix et à la demande croissante du marché. La fermentation à l'état solide (SSF) offre une approche prometteuse pour obtenir un rendement élevé d'AC en utilisant une variété de déchets agro-industriels naturels et renouvelables, ainsi que leurs sous-produits. Cette méthode ne peut pas être réalisée efficacement par la SmF. De plus, la SSF a regagné en popularité dans les pays occidentaux en raison de la nécessité urgente de résoudre les problèmes croissants liés à la gestion des déchets agro-industriels (**Dhillon, G. S et al, 2011**).

I.4.2. Fermentation à l'état solide

La production d'acide citrique par fermentation en milieu solide (SSF) a suscité un vif intérêt en raison de ses nombreux avantages pour la fabrication de produits chimiques en grande quantité, tels que l'acide citrique lui-même, ainsi que des enzymes (**Romero-Gomez et al., 2000**). Les procédés de fermentation en milieu solide présentent plusieurs avantages significatifs, notamment une faible consommation énergétique et une réduction notable des déchets, contribuant ainsi à atténuer les préoccupations environnementales. Dans le but de rendre la production industrielle d'acide citrique réalisable par fermentation en milieu solide, des recherches ont été menées principalement sur l'utilisation de résidus agro-industriels en tant que substrats appropriés. Cette approche est principalement motivée par la disponibilité facile, le faible coût, la richesse en glucides et autres nutriments essentiels de ces résidus, ainsi que par leur potentiel avantageux pour la croissance des champignons filamenteux (**Ramachandran et al., 2004**). De plus, la biotransformation des résidus agro-industriels apporte une solution aux problèmes d'élimination de ces déchets. L'utilisation de ces déchets agricoles dans la production d'acide citrique a considérablement amélioré son efficacité économique. Le choix d'un substrat adéquat pour le procédé de fermentation en milieu solide dépend de plusieurs facteurs, notamment le coût et la disponibilité. Selon (**Chundakkadu, 2005**). La fermentation en milieu solide (SSF) est caractérisée par la croissance des micro-organismes sur des matériaux solides en l'absence de liquide libre. Au cours de la SSF, l'humidité nécessaire à la croissance microbienne se trouve sous forme absorbée ou complexée à l'intérieur de la matrice solide. Ce substrat solide est généralement constitué de composés naturels issus de produits agricoles, de sous-produits et de résidus agro-industriels, ou de matières synthétiques (**Pandey, 2003**). Divers types de fermenteurs ont été employés pour la production d'acide citrique par fermentation en milieu solide (SSF). Parmi ces fermenteurs, on trouve les erlenmeyers, les incubateurs en verre, les plateaux, les bioréacteurs à tambour horizontal tournant, les

bioréacteurs à colonne garnissage, les lits de percolation à simple couche, les lits de percolation à multicouches, et bien d'autres encore (Papagianni *et al.*, 1999 ; Pandey *et al.*, 2000 ; Vandenberghe *et al.*, 1999).

Ces dernières années, plusieurs chercheurs ont comparé les procédés SSF et SmF et ont conclu que le procédé SSF présente de nombreux avantages par rapport au procédé SmF. Les bénéfices du procédé SSF sont détaillés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents types de fermentations avec leurs effets sur la production d'AC (Dhillon, G. S *et al*, 2011).

Type	Avantages et inconvénients	Production d'AC	Références
SL	<p>Avantages : Coûts de fonctionnement, d'installation et d'énergie moindres; microorganismes de surface, très peu</p> <p>Inconvénients : Production importante de chaleur, long temps de réaction, besoin de grand espace, sensible à la contamination par <i>Penicillium</i>, <i>Aspergillus</i> et autres, des levures et des bactéries lactiques</p>	Utilisés dans les industries de petite ou moyenne envergure	Socol et al., 2003
SmF	<p>Avantages : Mécanismes de contrôle sophistiqués, baisse des coûts de main-d'œuvre, une productivité et un rendement accrus</p> <p>Inconvénients : Coûts élevés des milieux, sensible à l'inhibition par les métaux traces, en risque de contamination, quantité importante d'effluents à traiter</p>	80% de la production mondiale d'AC	Vanderberghe et al., 1999
SSF	<p>Avantages : Technologie simple, rendement plus élevé, grand choix de milieux à faible coût qui ressemble à l'habitat naturel de plusieurs microorganismes, meilleure circulation d'oxygène, moins sensible à l'inhibition par les éléments en traces, moins d'énergie et de coût, faible risque de contamination bactérienne, moins coûteux par la valorisation des déchets</p> <p>Inconvénients : Difficultés de mise à l'échelle, contrôle difficile des paramètres opératoires tels que le pH, l'humidité, la température, les nutriments, la détermination rapide de la croissance microbienne, les produits d'impuretés et des coûts plus élevés des produits de récupération</p>	Rendements plus élevés, procédé de production d'AC économiquement efficace et industriellement réalisable en raison de l'utilisation efficace et la valeur ajoutée des déchets	Gowethaman et al., 2001; Durand et al., 2003; Robinson et al., 2003 ; Holker et al., 2004; Susana et al., 2006

Bien que la SSF ait été largement étudiée pour une production durable d'acide citrique (AC) et d'autres produits industriels au cours des décennies passées, il reste encore des améliorations à apporter pour augmenter les rendements de production d'AC. Le procédé SSF présente un fort potentiel pour développer une technologie commerciale de production d'AC rentable, mais une automatisation accrue du processus est nécessaire pour une utilisation industrielle plus étendue, ce qui peut être réalisé grâce à une amélioration de la conception des réacteurs. De plus, en utilisant de manière durable la biomasse renouvelable et abondante, et en optimisant les différents paramètres de fermentation, il serait possible d'obtenir une production technico-économiquement viable d'AC (Dhillon, G. S *et al*, 2011).

I.5. Applications de l'acide citrique

La demande d'acide citrique est en constante augmentation.

Les applications de l'acide citrique (AC) sont vastes, en raison de son statut GRAS (Generally Recognized as Safe): Généralement Reconnu Comme Sans Danger), ce qui est reflété par les chiffres actuels concernant sa production : en 2007, la production mondiale était estimée à 1,6 million de tonnes, avec une valeur estimée à 2,6 milliards de dollars en 2014, et 3,6 milliards de dollars en 2020. Le marché de l'AC connaît une expansion continue en raison de son utilisation répandue dans l'industrie alimentaire, les produits pharmaceutiques, les produits de santé grand public et la biomédecine (figure 2). En tant qu'acide faible, l'acide citrique est utilisé comme antioxydant, conservateur, acidifiant, régulateur de pH ou arôme dans les aliments et les boissons, ainsi que dans des applications comparables dans les industries pharmaceutiques et cosmétique. L'acide citrique est actuellement principalement produit en Chine, qui représente environ 60 % de la production mondiale (Kouassi, E. 2018).

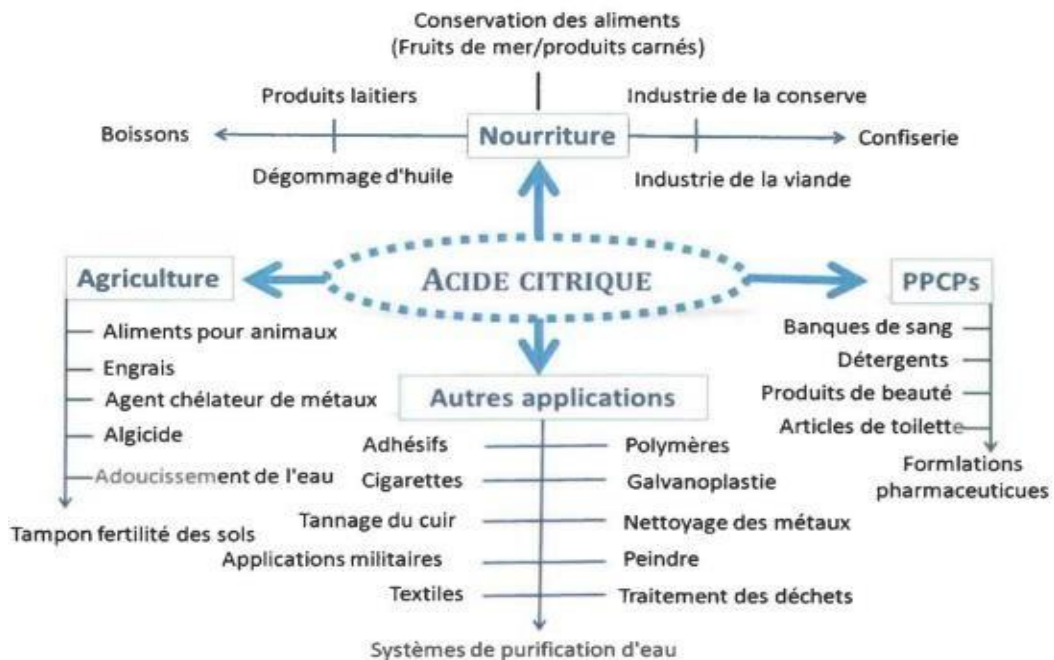


Figure 2 : Différentes applications conventionnelles d'AC (PPCPs- Produits pharmaceutiques et de soins personnels) (Dhillon, G. S *et al*, 2011).

L'AC présente des propriétés bactéricides et bactériostatiques contre *Listeria monocytogenes*, un pathogène alimentaire capable de se développer à des températures basses et en présence de

concentrations salines élevées. Ce pathogène est souvent présent dans les produits de charcuterie, y compris les saucisses de Francfort ((Bal *et al.*, 1998 ; Nickelson *et al.*, 1999).

L'AC suscite un intérêt mondial croissant en raison de sa biodégradabilité, de sa biocompatibilité, de sa non-toxicité et de ses propriétés antibactériennes. Des études ont exploré l'utilisation prometteuse de l'AC comme copolymère dans les nanomatériaux pour la nanomédecine (Ashkan *et al.*, 2010 ; Guillermo *et al.*, 2010) ont développé un nano-polymère à base d'AC pour servir de support biocompatible dans la culture de diverses cellules, telles que les cellules endothéliales, les tissus ligamentaires, les cellules musculaires, les cellules osseuses et les cellules cartilagineuses, ainsi que pour l'administration de médicaments.

À l'avenir, l'AC pourrait également être utilisé dans la lixiviation chimique des impuretés des minerais naturels, pour l'extraction de métaux d'intérêt. Ainsi, l'AC pourrait jouer un rôle potentiellement important dans l'hydrométallurgie, qui se tourne de plus en plus vers des techniques écologiques basées sur la biologie (Dhillon, G. S *et al.*, 2011).

I.6. Techniques de récupération et de purification de l'acide citrique

La récupération de l'acide citrique peut être effectuée à l'aide de trois principales opérations unitaires : la précipitation, l'extraction et l'adsorption (en utilisant principalement une résine échangeuse d'ions). La méthode de cristallisation peut également être utilisée, mais elle présente un risque de contamination en raison de la présence de matériaux indésirables provenant de la matière première et de l'autolyse des cellules microbiennes (Drysdale & McKay, 1995).

La méthode de précipitation a été la plus couramment utilisée pour la récupération de l'acide citrique car elle est applicable à tous les procédés, mais elle nécessite l'élimination des micelles du champignon, du bouillon de fermentation et des matières en suspension par filtration (Dhillon *et al.*, 2011).

Dans cette méthode, de l'oxyde de calcium hydraté (lait de chaux) est ajouté au milieu, puis la chaux est précipitée dans du citrate tricalcique tétrahydraté. Ensuite, le précipité est filtré et lavé à l'eau. Il est ensuite traité dans un acidulateur avec du sulfate de calcium, où l'acide sulfurique forme du gypse. Le mélange est ensuite filtré et la liqueur mère est traitée avec du charbon actif et passée à travers des échangeurs d'anions et de cations. Ensuite, elle est concentrée par évaporation sous vide à 40 °C. Enfin, des cristaux d'acide citrique monohydraté se forment dans un cristalliseur sous vide à une température de 20 à 25 °C, et de l'acide citrique anhydre se forme à des températures de cristallisation supérieures à 36,5 °C (Kubicek, 1986 ; Grewal et Kalra, 1995).

Les déchets générés par ce processus comprennent le sulfate de calcium et les résidus de micro-organismes contenant des acides aminés, du sucre, des colloïdes, des pigments et des matières inorganiques. Ces déchets pourraient être utilisés dans les cimenteries ou séchés pour être utilisés dans les usines d'alimentation (**Dhillon et al., 2011**).

L'extraction par solvant est une alternative à la purification et à la cristallisation de l'acide citrique, car elle présente des avantages environnementaux par rapport à la méthode de précipitation. Cette méthode utilise de l'alcool n-octylique et de la tridodécylamine comme solvants pour extraire l'acide citrique, éliminant ainsi la production de gypse. Elle a été recommandée par la *Food and Drug Administration* des États-Unis pour une utilisation dans les applications alimentaires et pharmaceutiques (**Grewal & Kalra, 1995**).

Une autre technique utilisée est l'électrodialyse, qui utilise des membranes chargées électriquement pour séparer l'acide citrique des autres composants de la solution. Cette méthode s'est avérée économique pour les milieux de fermentation clairs, bien qu'elle soit environ 50% plus coûteuse que d'autres procédés de récupération tels que la précipitation (**Amenaghawon et Aisien, 2012**).

Différentes méthodes analytiques sont utilisées en laboratoire pour la détermination et la quantification de l'acide citrique. Celles-ci incluent la spectrophotométrie, la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide à haute performance, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à haute résolution et la méthode traditionnelle de titrage (**Themelis et Tzanavaras, 2001 ; Jham et al., 2002 ; Williams, 1984 ; Del Campo et al., 2006**).

II. Souche et substrats d'intérêts

II.1. Souche d'intérêt

II.1.1. Généralité sur les *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus*, découvert en 1729 par **Micheli**. Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes : on les rencontre aussi bien en milieu rural (silos à grain, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matière organique en décomposition) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitats (poussières accumulées derrière les meubles, cadre, faux plafonds, conduits d'aération, plantes en pots, ...) (**Chabasse et al., 2002**).

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins. Ces filaments sont de diamètre fin et régulier, ils sont septés et ramifiés (**Quatresous, 2011**).

Certaines espèces sont capables de se développer dans des environnements extrêmes de températures (élevées/basses) et de concentrations (élevées de sel/sucre). Des milieux faibles acidités ou de faibles niveaux d'oxygène (**Chi-Ching et al., 2018**).

Les *Aspergillus* peuvent causer des problèmes tels que la détérioration des aliments, la production de mycotoxines et des infections chez les humains et les animaux. Cependant, certaines espèces sont utilisées dans la biotechnologie pour produire des métabolites bénéfiques tels que les acides organiques (**Samson et al., 2014**). Les souches d'*Aspergillus* démontrent une adaptation et une aptitude supérieures à se développer dans divers substrats (**Levente et al., 2003**).

II.1.2. *Aspergillus niger*

Parmi les 180 espèces du genre *Aspergillus* officiellement reconnues, l'*Aspergillus niger* est d'un intérêt particulier en raison de son utilisation en biotechnologie pour produire des composés à partir de substrats peu coûteux. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes. Il est considéré comme le microorganisme le plus polyvalent pour la production d'acides, de protéines et d'enzymes de valeur industrielle parmi lesquelles : les cellulases, les pectinase, les xylanases, les amylases, les glucoamylases et les protéases, en plus d'une variété de composés d'intérêt pharmacologique (**Ward et al., 2006 ; Mary et al., 2019**).

Cependant, les applications industrielles de l'*Aspergillus niger* ne se limitent pas à la production d'acide citrique ; en tant que sécréteur prolifique, de nombreuses enzymes et autres molécules d'intérêt industriel sont produites par ce champignon.

II.1.2.1. Classification de l'*Aspergillus niger*

La section Nigri des *Aspergillus* a été l'objet d'études approfondies par de nombreux taxonomistes, aboutissant à une révision récente (**Abarca et al., 2004**). Dans leurs travaux, **Mosserey (1934)** a décrit initialement 35 espèces d'*Aspergillus* noirs, tandis que **Raper et Fennell (1965)** ont restreint le nombre d'espèces acceptées dans le groupe *A. niger* à 12. Par la suite, **Al-Musallam (1980)** a examiné plus spécifiquement la taxonomie du groupe *A. niger* en se basant principalement sur des caractéristiques morphologiques. Elle a identifié sept espèces distinctes et a décrit *A. niger* comme un agrégat comprenant sept variétés et deux formes.

Selon **Bocquet (1993)**, la position taxonomique d' *A. Niger* peut être résumée comme suit :

- ▶ Règne : *Mycètes (Fungi)*
- ▶ Embranchement : *Amastigomycota*
- ▶ Sous-embranchement : *Deutéromycotina*
- ▶ Classe : *Deutéromycètes*
- ▶ Ordre : *Moniliales*
- ▶ Famille : *Mniliaceae (mucedinaceae)*
- ▶ Genre : *Aspergillus*
- ▶ Espèce : *Aspergillus niger*

A. Morphologie

D'après **Bennett (2009)**, les spores d'*Aspergillus* sont des composants courants des aérosols où elles dérivent sur les courants d'air, se dispersant à la fois sur de courtes et de longues distances en fonction des conditions environnementales. Lorsque les spores entrent en contact avec une surface solide ou liquide, elles se déposent et, si les conditions d'humidité sont bonnes, elles germent, la capacité à se disperser dans le monde entier grâce aux courants d'air et à croître presque n'importe où lorsque la nourriture et l'eau appropriées sont disponibles signifie que « ubiquitaire » est l'un des adjectifs les plus couramment utilisés pour décrire ces moisissures.

La morphologie du champignon joue un rôle crucial dans les caractéristiques physiques du bouillon de fermentation, ce qui a un impact direct sur le rendement final du produit (**Jayanta et al., 2001**).

Le comportement rhéologique du champignon est étroitement lié à sa morphologie et à la concentration de la biomasse. La rhéologie du bouillon de fermentation est un aspect fondamental des systèmes de fermentation fongique, en particulier des champignons filamenteux, et joue un rôle crucial dans les processus de transport dans les bioréacteurs ainsi que dans le rendement de production du produit souhaité (**Henzler et al., 1987**).

Même avec une faible teneur en matière sèche, le bouillon de fermentation présente des caractéristiques non-newtoniennes distinctes. Dans les systèmes de fermentation d'*A. niger*, différentes formes peuvent être observées dans le bouillon pendant le processus de fermentation, telles que les formes filamenteuses ou granulées. Pendant la phase filamenteuse, l'enchevêtrement des hyphes du mycélium, associé à une forte concentration de biomasse, peut

entraîner un comportement non-newtonien très visqueux, en revanche, dans la forme granulée, le mycélium forme des agrégats sphériques stables, avec un réseau ramifié plus dense et partiellement lié par des hyphes, ce qui se traduit généralement par des bouillons non-newtoniens moins visqueux. La fermentation liquide de l'acide citrique (AC) bénéficie grandement de l'utilisation de la forme granulée d'*A. niger*. Le comportement rhéologique des bouillons de fermentation joue un rôle crucial dans le mélange homogène de la masse et des processus de transfert de chaleur. Il influence également le transfert d'oxygène vers les cellules, qui est souvent une étape limitante sur le plan cinétique dans la fermentation. Une stratégie possible pour atténuer cette limitation consiste à favoriser la formation de petites agrégations sphériques de cellules (**Levente et al, 2003**).

Cependant, il est important de noter que le manganèse (Mn^{2+}) joue un rôle essentiel dans la croissance d'*A. niger*. Des études ont démontré que le métabolisme cellulaire d'*A. Niger* est perturbé en cas de carence totale en Mn^{2+} (**Rohr et al., 1996**).

Afin d'optimiser la bio-production d'AC, il est crucial d'ajuster la concentration initiale de Mn^{2+} dans le milieu de fermentation. Cependant, les suspensions mycéliennes présentent un caractère non-newtonien et une viscosité élevée, ce qui rend le mélange difficile et impacte significativement le transfert d'oxygène à l'interface. Ainsi, l'utilisation de bioréacteurs agités mécaniquement est nécessaire pour assurer un transfert efficace de matière, de chaleur et d'oxygène dans les bouillons de fermentation non-newtoniens. La rhéologie du bouillon de fermentation est influencée par la complexité du substrat, l'augmentation de la biomasse pendant la croissance et la formation de différents métabolites, ce qui peut entraîner des problèmes de transfert d'oxygène et une faible productivité d'AC (**Gurpreet et al., 2012**).

A. niger a une croissance rapide, un mycélium septé à l'aspect poudreux ou duveteux de couleur variable suivant les milieux de culture. Sur le milieu Malt Agar (MA) (pH 6,5) mycélium à croissance rapide d'aspect de velours ou de feutre, blanc cotonneux au départ, devenant poudreux avec l'apparition de spores noires. Le revers est blanchâtre. Sur le milieu Czapek (pH 5,5) (**Cahagnier, 1998**).

L'identification de *Aspergillus niger* repose sur la mise en évidence des têtes aspergillaires bisériées radiées, noires à maturité lors de l'examen microscopique des colonies. En effet, des filaments dressés non cloisonnés appelés conidiophores prennent naissance sur les filaments végétatifs. Ces conidiophores à parois lisse, hyalines ou de couleur brunâtre dans sa moitié supérieure, très longue (1,5 à 3 mm) et se terminent par une vésicule de forme globuleuse, 30 à

100 μm (en moyenne 45 à 75 μm) sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogénèse s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent collées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne. Les spores unicellulaires sont de forme globuleuse (3,5 à 5 μm), échinulée à très verruqueuse, souvent disposées en chaînes et de pigmentation brune. Les phialides sont insérées sur la vésicule par des cellules intermédiaires sous-jacentes appelées métules (structure bisériée) disposées sur tout le pourtour de la vésicule, l'ensemble stipe et vésicule constitue le conidiophore et l'ensemble vésicule, phialides et conidies forme la tête aspergillaire (Figure01) (Chabasse *et al.*, 2002).

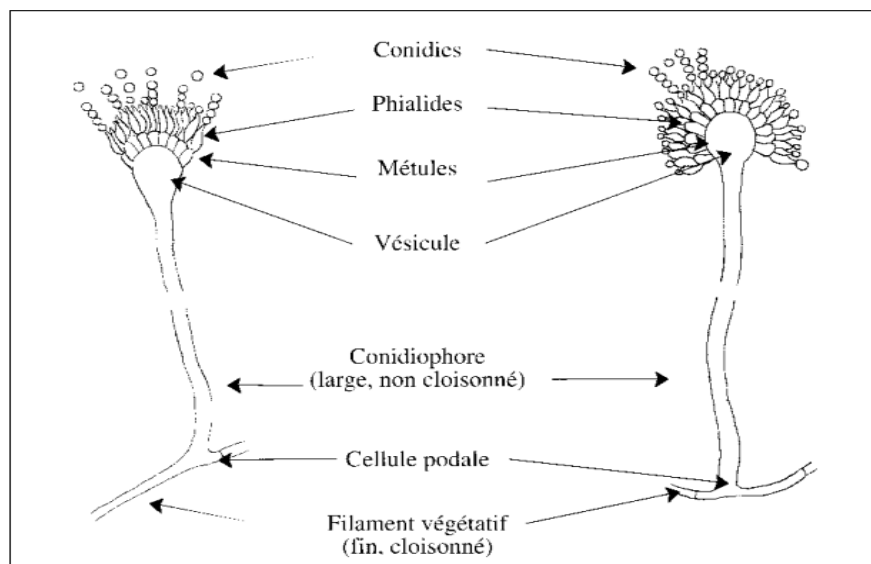


Figure 3 : Appareil reproducteur des *Aspergillus* (Chabasse *et al.*, 2002).

B. Physiologie

L'une des caractéristiques fondamentales de l'ensemble du règne fongique est sa stratégie nutritionnelle distinctive. Ces organismes sécrètent des acides et des enzymes dans l'environnement environnant, décomposant ainsi les molécules polymériques en molécules plus simples qui sont ensuite absorbées par la cellule fongique. Comme les animaux, les champignons sont hétérotrophes. Alors que les animaux mangent leur nourriture puis la digèrent, les champignons digèrent d'abord leur nourriture puis la "mangent". L'accès aux nutriments est favorisé par des forces mécaniques, les pointes des hyphes fongiques se développant dans et à travers leur substrat alimentaire. Les espèces d'*Aspergillus* sont des exemples typiques du mode de vie fongique. Elles se trouvent le plus souvent dans les habitats

terrestres et sont couramment isolées du sol et de la litière végétale associée. Le processus de décomposition effectué par ces moisissures est important pour entraîner le cycle naturel des éléments chimiques, en particulier dans le cycle du carbone où elles contribuent à la reconstitution de la réserve de dioxyde de carbone et d'autres composés inorganiques (**Carroll et Wicklow, 1992**).

II.1.2.2. Culture de l'*Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un champignon filamenteux largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour la production d'acides organiques, d'enzymes et de pigments. Pour cultiver cette espèce de champignon, il est indispensable de maîtriser certaines techniques de culture. Tout d'abord, il est important de choisir un le milieu de culture en fonction de l'objectif de la culture. Les milieux couramment utilisés pour la culture d'*Aspergillus niger* incluent le milieu de Sabouraud, le milieu de Czapek-Dox et le milieu de la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA). Une fois le milieu de culture choisi, il doit être stérilisé avant utilisation pour éviter toute contamination (**Abdel-Sater et al., 2011 ; Singh et Singh, 2008**).

II.1.2.3. Méthodes de culture d'*Aspergillus niger*

Les *Aspergillus* sont des champignons qui présentent une croissance rapide sur les milieux de culture courants tels que la gélose au malt, la gélose de Sabouraud et la gélose PDA, auxquels des antibiotiques peuvent être ajoutés (**Tabuc, 2007 ; Gacem, 2011**). Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates formées de courts filaments aériens de couleur blanche. Après 96 heures d'incubation, les colonies prennent leur teinte caractéristique, qui peut être brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La couleur des colonies est un moyen rapide d'orientation dans l'identification des espèces d'*Aspergillus* : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger*, et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est généralement incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (**Tabuc, 2007**).

La méthode de culture elle-même peut également affecter la croissance et le rendement d'*Aspergillus niger*. Les méthodes de culture couramment utilisées incluent la culture en surface, la culture en submergée et la culture en suspension. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients en fonction de l'objectif de la culture (**Abdel-Sater et al., 2011**).

La culture d'*Aspergillus niger* est un processus complexe qui nécessite une attention particulière aux détails pour obtenir des résultats optimaux. En maîtrisant les techniques de culture appropriées, il est possible d'obtenir des cultures de haute qualité pour diverses applications industrielles peuvent être obtenues ((Frisvad *et al.*, 2006 ; Singh et Sing, 2008).

II.2. Substrats d'intérêts

II.2.1. Dattes

Les dattes sont définies comme les fruits du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), appartenant à la famille des *Arecaceae* (Al-Shahib et Marshall, 2003). Les dattes, en tant qu'aliment riche en nutriments et ayant des effets physiologiques et thérapeutiques bénéfiques sur le corps humain (Rahmani et al., 2014). Elles sont composées principalement de sucres naturels, de fibres, d'acides aminés essentiels et d'antioxydants naturels, tels que les polyphénols, qui jouent un rôle dans la protection contre les maladies dégénératives et le stress oxydatif (Vayalil, 2012).

En Algérie, on recense plus de 940 cultivars de palmiers dattiers. Les variétés les plus couramment cultivées comprennent la Deglet-nour, Mech-Degla, Ghars et la Degla-Beida. Ces variétés se distinguent par leurs différentes saveurs, consistances, formes, couleurs, poids et dimensions (Belguedj, 2001).

II.2.1.1. Variété d'intérêt (Mech-Degla)

C'est une variété populaire des dattes sèches compte tenu de ses qualités gustative, sa facilité de conservation et de ses multiples utilisations. Elle est récoltée en mois d'octobre et novembre. Cette variété est excellente, digestible et très appréciée par le consommateur, elle présente en effet, une texture farineuse et une consistance sèche ce qui lui confère une bonne aptitude à la conservation, notamment sous vide pour plus de 12 mois, la rendant ainsi très appréciée des consommateurs (Taleb et Hamdaoui, 2021 ; Belguedj, 2002).

Généralement le fruit de ce cultivar a une forme subcylindrique un peu allongée et aplatie à la base. Il peut atteindre une taille de 3,5 cm de longueur et un poids de l'ordre de 6,5 g. A certains stades de croissance, la date est de couleur rouge orangé, elle devient beige clair à la maturité avec des nuances de marron. Son épicarpe est ridé, pas trop brillant et cassant. Le mésocarpe

est un peu charnu de consistance sèche, de couleur blanche et de texture farineuse (**Belguedj, 2001**).

II.2.1.2. Composants favorisant la croissance de l'*Aspergillus niger* et la production de de l'acide citrique

Certaines composantes des dattes favorisent la croissance de l'*Aspergillus niger* et la production d'acide citrique. Les dattes sont riches en sucres fermentescibles tels que le glucose et le fructose, qui servent de source de carbone et d'énergie pour les micro-organismes. Ces sucres sont facilement métabolisés par l', favorisant ainsi sa croissance et sa capacité à produire de l'acide citrique (**Zargat,1996**).

De plus, les dattes contiennent également des nutriments essentiels tels que des vitamines, des minéraux et des acides aminés, qui sont nécessaires à la croissance et au métabolisme des micro-organismes. Ces nutriments fournissent les éléments nécessaires à l'*Aspergillus niger* pour produire efficacement de l'acide citrique (**Siboukeur et al., 2001**).

II.2.2. Mélasse

La mélasse est un mélange résultant du raffinage du sucre extrait de la betterave sucrière ou de la canne à sucre. Elle contient 40 à 50 % de sucre, très riche en minéraux « potassium, calcium, magnésium, phosphore » ce qui n'est pas le cas du saccharose. C'est une substance très nutritive pour les levures et les bactéries dans les fermenteurs. Sa richesse en composés nutritifs pour les levures explique son utilisation comme substrat essentiel dans l'industrie de la fermentation contrairement au saccharose qui est très calorifique. Elle est aussi une source riche en calcium, en magnésium et en fer. La mélasse est utilisée comme substrat pour production d'aliments de bétails et les distilleries d'alcool ((**Younsi, 2018 ; Ourihane, 2016**)).

III. Production d'acide citrique par *Aspergillus niger*

L'acide citrique, autrefois isolé des agrumes, est maintenant produit industriellement par le champignon filamenteux. Cette découverte a été initiée il y a plus de 100 ans par **James Currie (1917)**, un chimiste alimentaire, qui a publié une étude décrivant les propriétés exceptionnelles d'*Aspergillus niger* pour la production industrielle d'acide citrique. **Currie** a notamment démontré les conditions de croissance nécessaires à la biosynthèse de l'acide citrique, ainsi que la capacité du champignon à se développer à un pH bas (2,5 à 3,5) tout en produisant de grandes quantités de ce métabolite. Ces travaux ont établi une corrélation directe entre la quantité de

substrat dans le milieu et la production d'acide citrique, jetant ainsi les bases de la fermentation industrielle moderne de cette substance. Contrairement à d'autres espèces de champignons qui produisaient de l'acide citrique en 1917, chaque souche d'*Aspergillus niger* testée par Currie était capable de produire efficacement cette molécule lorsqu'elle était cultivée dans des solutions de sucre. Deux ans plus tard, la société américaine *Pfizer* a construit une usine pilote pour la production biochimique d'acide citrique, et au milieu des années 1920, la production utilisant la fermentation d'*Aspergillus niger* dépassait largement l'extraction à partir des agrumes (**Development of Deep-tank Fermentation, Pfizer, Inc. 2008**).

Le cycle de l'acide citrique a été entièrement élucidé au cours des décennies suivantes, ce qui a valu à **Hans Krebs et Fritz Lipmann** le prix Nobel en **1953**. Les microbiologistes industriels, dont James Currie, avaient pour objectif d'exploiter ce cycle métabolique, ainsi que d'autres voies métaboliques, pour fermenter des molécules utiles.

L'*Aspergillus niger* est considéré comme le choix optimal de microorganismes pour la bio-production d'acide citrique (AC). Les caractéristiques de croissance et d'adaptabilité d'*A. niger* dans une multitude de milieux de culture, combinées à une régulation précise et à un contrôle efficace des flux glycolytiques, ainsi qu'à la sécrétion d'AC par la mitochondrie et le cytosol, contribuent à l'accumulation considérable d'AC. La réglementation des diverses enzymes métaboliques associées à l'effet de multiples facteurs positifs sur le flux glycolytique favorise une production d'AC élevée, tout en minimisant sa dégradation via le cycle de l'AC (**Levente et al., 2003**). Les principaux avantages d'*A. Niger* parmi de nombreux microorganismes sont sa facilité de manipulation/récolte, sa capacité à fermenter une variété de matières premières, de préférence les résidus de déchets agricoles, et les rendements élevés de production (**Caroll et al., 2006 Rymowicz et al., 2010**).

Dans la littérature, la plupart des études mentionnent l'utilisation de souches d'*A. Niger* en tant que microorganismes le plus favorable pour la production d'AC. Cependant, avec les progrès de la biotechnologie, il y a eu développement de nouvelles souches génétiquement modifiées et l'amélioration de souches existantes productrices d'AC par mutagénèse et sélection de souches potentielles de productivité plus élevées d'AC. Cependant, l'utilisation effective de ces nouvelles souches en question dans l'application industrielle et leur stabilité sur une période de temps, s'appuyaient sur les souches classiques. À cet égard, le rôle des substrats est également un facteur essentiel pour améliorer le rendement de production d'AC (**Gurpreet et al ;2012**).

III.1. Paramètres clés pour la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*

La croissance de l'*Aspergillus niger* est influencée par plusieurs facteurs environnementaux tels que : la température, le pH, la concentration en nutriments, la quantité d'oxygène et la présence d'inhibiteurs de croissance (tableau 3). Ces différents facteurs environnementaux doivent être pris en compte pour optimiser la croissance de l'*Aspergillus niger* dans des conditions de culture spécifiques.

Tableau 3 : Principaux facteurs qui influencent la production d'acide citrique (Karim et al. 2010)

Facteurs	Effets
Source de carbone	Positifs : saccharose, glucose, fructose, galactose
	Négatif : amidon, xylose, arabinose, sorbitol, acide pyruvique
Source de phosphore	Positif : phosphate monopotassique (0,5–5,0 g/L)
Source d'azote	Positif : nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium, peptone, extrait de malt, urée (0,1–0,4 gN/l)
	Négatif : des concentrations élevées conduisent à la production de biomasse
pH	Positif : < 3 (selon l'espèce)
Oligo-éléments	Positifs : zinc, cuivre, sulfate de magnésium (faibles niveaux)
Alcools inférieurs	Positif : méthanol, éthanol, <i>n</i> -propanol, isopropanol, acétate de méthyle (1–4 % v/w)

III.1.1. Source de carbone

Les *Aspergillus* peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés, tel que, glucose, fructose, mannose, saccharose et maltose. 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. Les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées par les *Aspergillus* (Pazouki et al., 2000).

Plusieurs études adaptées sur plusieurs décennies ont révélé que la source de carbone a un impact direct sur le rendement en acide citrique. Les monosaccharides et les disaccharides sont considérés comme la source de carbone préférée, car ils sont métabolisés plus rapidement par le champignon, ce qui se traduit par un rendement plus élevé (**Mattey, 1992**). En revanche, les polysaccharides ne conviennent pas comme matière première, car le processus de décomposition prend trop de temps pour atteindre le taux de catabolisme des sucres nécessaires à la production d'acide citrique. La lenteur de l'hydrolyse des polysaccharides est attribuée à une activité enzymatique réduite, qui influence le pH dans le milieu de fermentation (**Hossain et al., 1984 ; Xu et al., 1989 ; Papagianni et al., 2005**). Parmi les monosaccharides, le saccharose présente un rendement supérieur au glucose, au fructose et au lactose, par ordre décroissant (**Angumeenal et Venkappayya, 2013**). Cette supériorité du saccharose est attribuée à la présence d'une forte invertase extracellulaire liée au mycélium d'*A. niger*, qui hydrolyse rapidement le saccharose à faible pH (**Kubicek-Pranz et al., 1990**).

La production économique de saccharose ou de glucose pur à grande échelle peut être difficile. Par conséquent, on utilise des sources de carbone à faible coût telles que la mélasse de canne à sucre et de betterave, qui sont des déchets provenant des raffineries de sucre. Étant donné que ces matières premières proviennent de différentes sources, un prétraitement peut être nécessaire. Les principaux contaminants sont généralement les cations, et les méthodes de prétraitement couramment utilisées incluent la précipitation à l'aide de ferrocyanure de potassium ou l'utilisation de résines échangeuses de cations (**Angumeenal et Venkappayya, 2003**).

La concentration de la source de carbone est également un facteur critique pour la production réussie d'acide citrique, tout aussi important que le type de source de carbone utilisée. La production d'acide citrique est directement liée à la concentration en sucre, de sorte que plus la concentration est élevée, plus la quantité d'acide citrique produite est importante (**Xu et al., 1989**). Cependant, des études ont montré que la concentration maximale d'acide citrique peut être obtenue avec une concentration en sucre de 14 à 22 %. Une étude menée par Xu et al. (1989) utilisant différentes sources de sucre telles que le saccharose, le glucose, le fructose, le mannose et le maltose a montré que le rendement maximal était obtenu avec une concentration en sucre de 10 % (p/v), à l'exception du glucose, pour lequel un rendement maximal de 7,5 % (p/v) a été obtenu (**Amenaghawon et Aisien, 2012**).

Pour répondre aux besoins de l'organisme microbien, le substrat doit contenir des proportions adéquates d'éléments minéraux. La fermentation citrique est fortement influencée par des

éléments tels que l'azote, le phosphore, le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse et le magnésium. Les concentrations de ces oligoéléments dans le milieu de culture doivent être limitées (**Zergat, 1996**).

III.1.2. Source de phosphore

En plus de l'azote et de la source de carbone, le phosphate s'est révélé être un facteur critique pour la production d'acide citrique (**Shu et Johnson, 1948b**). Cependant, l'ajout de phosphate n'a qu'un léger effet sur l'accumulation d'acide citrique et la croissance mycélienne (**Hang et al., 1987**). **Kubicek et Röhr (1977)** ont conclu que l'acide citrique s'accumule en présence d'une limitation en phosphate, même en l'absence de limitation d'azote.

Une forte teneur en phosphore conduit à une élévation de la croissance cellulaire et une production faible en acide citrique (**Papagianni, 2007**).

III.1.3. Source de l'azote

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des microorganismes, y compris l'*Aspergillus niger*. Il est nécessaire à la synthèse des protéines, des acides nucléiques et d'autres composants cellulaires. La mélasse de canne à sucre contient des composés azotés tels que des acides aminés, des peptides, des protéines et des sels d'ammonium (**Glusz et Ledakowicz, 1999**).

La concentration d'azote a un effet significatif sur la production d'acide citrique, car l'azote fait partie intégrante des protéines cellulaires et est essentiel au métabolisme cellulaire (**Ali et al., 2002**). Le type de source d'azote utilisée affecte à la fois la synthèse de l'acide citrique et la croissance du champignon. Le nitrate d'ammonium favorise une croissance végétative réduite, tandis que le sulfate d'ammonium favorise une période de croissance végétative plus longue. Il est nécessaire de limiter la concentration d'azote, car une concentration supérieure à 0,25 % entraîne l'accumulation d'acide oxalique, ce qui diminue le rendement en acide citrique (**Gupta et al., 1975**). Le sulfate d'ammonium est généralement le choix préféré en tant que sel d'azote, car il n'induit pas la production indésirable d'acide oxalique, tout en abaissant le pH du milieu au fur et à mesure de sa consommation (**Nigam, 2009**).

III.1.4. pH du milieu de culture

Le pH du milieu de fermentation subit des changements continus en raison des activités métaboliques microbiennes, principalement en raison de la sécrétion d'acides organiques tels que l'acide citrique, ainsi que des acides gluconique et oxalique indésirables. Les espèces microbiennes telles que *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Penicillium* sont capables de réduire

rapidement le pH en dessous de 3, tandis que d'autres champignons tels que *Sporotrichum* et *Pleurotus* maintiennent un pH plus stable entre 4 et 5 (Del Campo *et al.*, 2006). Le pH du milieu de fermentation est particulièrement important pendant la phase de sporulation et de production. Lors de la germination, les spores absorbent l'ammoniac et libèrent des protons, ce qui augmente l'acidité du milieu et favorise la production d'acide citrique. À un pH bas d'environ moins de 2, la formation de produits indésirables tels que l'acide oxalique et gluconique est inhibée, et la possibilité de contamination par d'autres micro-organismes est également réduite, ce qui facilite la récupération de l'acide citrique (Max *et al.*, 2010).

III.1.5. Oligo-éléments

L'acide citrique produit par l'*Aspergillus niger* est extrêmement sensible aux oligo-éléments (Fer, Cuivre, Zinc, Magnésium et Manganèse) (Allag et Saoudi, 2021).

Des études ont montré que les ions métalliques divalents tels que le manganèse, le zinc, le cuivre, le magnésium et le fer ont des effets sur la production d'acide citrique (Käppeli *et al.*, 1978 ; Dronawat *et al.*, 1995). Tomlinson *et al.* (1950) ont conclu que les concentrations optimales de fer et de zinc sont respectivement de 1,3 et 0,3 ppm. Ces auteurs ont également souligné l'importance du manganèse dans la fonction cellulaire, la sporulation et la production de métabolites secondaires, notamment la synthèse de la paroi cellulaire. Une carence en manganèse affecte l'anabolisme d'*A. Niger*, entraînant une concentration élevée d'ammonium à l'intérieur de la cellule. Une diminution de l'accumulation d'acide citrique a été observée en présence de concentrations élevées de fer, ainsi que des changements dans la croissance mycélienne (Mischak *et al.*, 1985). Grewal et Kalra (1995) ont conclu qu'à des concentrations élevées de zinc, les champignons maintenaient leur croissance sans accumulation d'acide citrique (Drysdale & McKay, 1995). D'autres métaux traces tels que le nickel, le molybdène et le cobalt ont également été signalés comme ayant un impact sur l'accumulation d'acide citrique chez *A. Niger* (Habison *et al.*, 1983). Il est crucial de prendre en compte l'interdépendance des composants du milieu, car elle joue un rôle essentiel dans la production d'acide citrique. Par conséquent, un contrôle rigoureux de ces oligo-éléments est nécessaire pour une production optimale d'acide citrique.

III.1.6. Concentration d'alcools

Moyer (1953) a été le premier à signaler l'effet des alcools sur la production d'acide citrique. Il a découvert que le méthanol avait un effet positif significatif sur la formation d'acide citrique à partir de différentes sources de carbone, notamment les sources de glucides bruts et le glucose commercial (Moyer, 1953). Il a également été conclu que la quantité optimale de

méthanol/éthanol nécessaire dépend de la composition du milieu et de la souche de micro-organisme utilisée, généralement située entre 1 % et 3 %.

Moyer (1953) a également étudié l'effet de l'éthanol sur l'accumulation d'acide citrique. Il a constaté que l'ajout d'éthanol doublait l'activité de la citrate synthétase, réduisait l'activité de l'aconitase de 75 % et augmentait légèrement les activités des autres enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Ces effets de l'alcool entraînaient une augmentation de l'accumulation d'acide citrique, attribuée à la dégradation lente de l'acide citrique résultant de l'activité réduite de l'aconitase. En tant que source de carbone, l'éthanol augmentait également la disponibilité du carbone dans le cycle de l'acide citrique. **Roukas et Harvey (1988)** ont obtenu une production maximale d'acide citrique avec une concentration de méthanol de 2 %, tandis qu'une concentration supérieure entraînait une diminution de la production d'acide citrique. Il a été conclu que l'effet inducteur du méthanol était le résultat de son effet inhibiteur sur les ions métalliques (**Kiel et al., 1981**). Ces résultats soulignent la nécessité de limiter la quantité de méthanol pour une production optimale d'acide citrique.

III.1.7. Aération

La quantité d'oxygène fournie est un facteur critique dans la bioproduction d'acide citrique en raison de sa nature hautement aérobie (**Grewal & Kalra, 1995**). Des taux d'aération variables peuvent avoir des effets néfastes sur les performances et le rendement de la fermentation. À des taux d'aération élevés, la pression partielle du dioxyde de carbone dissous dans le milieu est réduite, ce qui peut affecter négativement la réaction catalysée par le pyruvate carboxylase. Cela peut entraîner des pertes de dioxyde de carbone, endommageant la biomasse finale et les concentrations de citrate (**Angumeenal & Venkappayya, 2013**).

Cependant, il a été démontré que le dioxyde de carbone a un effet positif sur la synthèse de l'acide citrique (**Vandenberghé et al., 1999**). Une pression partielle élevée de dioxyde de carbone empêche la libération des spores des champignons filamenteux, ce qui améliore l'accumulation d'acide citrique. Cependant, des taux d'aération élevés peuvent entraîner un moussage excessif dans le milieu, nécessitant l'utilisation d'agents anti-mousse. Pour optimiser économiquement la production, il est recommandé d'augmenter progressivement le taux d'aération de manière uniforme dans le milieu avec une intensité similaire (**Li et al., 2014**).

Des études ont montré que des interruptions d'aération prolongées pendant l'idiophase peuvent irréversiblement compromettre la capacité d'*A. Niger* à synthétiser et à accumuler de l'acide citrique, bien que la viabilité de l'organisme soit maintenue (**Kubicek et al., 1980**).

III.1.8. Autres facteurs

D'autres facteurs qui ont des effets sur la production d'acide citrique comprennent les lipides tels que l'huile d'arachide (**Millis *et al.*, 1963 ; Kumar et Ethiraj, 1976 ; Souza *et al.*, 2014**) et le monofluoroacétate de sodium (**Meixner-Monori *et al.*, 1984**). **Millis *et al.* (1963)** ont montré que les lipides améliorent le rendement en acide citrique sans affecter le poids sec du mycélium.

Les sels minéraux sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des *Aspergillus*, leurs déficiences ou leurs excès ont des répercussions négatives sur la fermentation (**Karaffa et Kubicek, 2003**). **Karim *et al.* (2010)** ont étudié les effets du fluorure de calcium, du fluorure de sodium et du fluorure de potassium sur la production industrielle d'acide citrique.

Étude
Expérimentale

Chapitre I :
Matériel
Et
Méthodes

I.1. Lieu et durée du stage

Cette étude a été menée au laboratoire de traitement des eaux (laboratoire G 03) du département des sciences agronomiques de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, sur une période d'un mois (du 28 mai au 30 juin 2023).

I.2. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est la production de l'acide citrique en utilisant *A. niger* comme souche microbienne sur différents substrats. Le premier substrat est la mélasse de canne à sucre, largement utilisée dans la production d'acide citrique, le deuxième substrat est le moût de dattes de la variété Mech-Degla, et enfin un mélange des deux substrats à taux équivalent nommé ici amalgame.

Notre objectif aussi est de déterminer si les dattes de cette variété peuvent être une alternative viable à la mélasse de canne à sucre pour la production de l'acide citrique. De comparer les rendements de production. L'étude comprendra également le développement de procédés de prétraitement et de fermentation spécifiques à chaque substrat, visant à optimiser la conversion des sucres contenus dans les deux types de déchets en acide citrique.

Et en fin de déterminer si les dattes Mech-Degla peuvent être utilisées comme une source alternative durable et économiquement viable pour la production d'acide citrique, offrant ainsi une solution de valorisation des déchets végétaux.

I.3. Matériel et méthodes

I.3.1. Matériel biologique et substrats utilisés

Le matériel biologique utilisé est un champignon appartenant à la classe des Ascomycètes, plus précisément de l'espèce *A. niger*, fourni par le laboratoire de microbiologie du département de biochimie et microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

La première biomasse utilisée dans le cadre de notre étude est une mélasse de canne à sucre, qui nous a été fournie par la raffinerie de sucre de la société 'La Belle' avec son rapport d'essai physico-chimique réalisé par le laboratoire de contrôle de qualité physico-chimique "SABRINNEL". Ce rapport nous a fourni des informations détaillées sur les paramètres

physico-chimiques de la mélasse de canne à sucre. Les données présentées dans le **Tableau 4** sont extraites de ce rapport et permettent de mieux comprendre la composition de la mélasse utilisée dans notre étude. Ces données sont importantes pour évaluer l'adéquation de la mélasse en tant que substrat dans la production d'acide citrique.

Tableau 4 : Paramètres physico-chimiques de la mélasse

Paramètres	Pourcentage (%)
Pureté (teneur en sucre)	58 à 62 %
Brix	> 72 %
pH	6,4 à 7 %
Matière grasse	0,1 %
Protéines	0 %
Sels	0,09 %
Fibre	0 %
Calcium	20 %
Magnésium	24 %
Fer	0,004 %
Matière sèche	77 %
Matière organique	26,73 %
Azote total	0,07 %

Le deuxième substrat végétal utilisé est constitué de dattes, de la variété dure commune "Mech-Degla", très répandue dans nos vergers phoenicoles. La date est de couleur rouge orangé et devient beige clair à la maturité avec des nuances de marron. Son épicarpe est ridé, pas trop brillant et cassant. Le mésocarpe est un peu charnu, de consistance sèche, de couleur blanche et de texture farineuse (**Belguedj M., 2001**).

La composition chimique et les caractéristiques physico-chimiques de la datte Mech-Degla sont exposés dans les tableaux ci-joints :

Tableau 5 : Composition chimiques de la dattes Mech-degla (**Chibane et al., 2007**).

Poids Total (g)	Pulpe (g)	Eau (%)	Protéines (%)	Lipides (%)	Pectines (%)	Sucres Totaux (%)	Cendres (%)	pH
6,10	5,10	14,71	0,18	0,25	0,18	75 ,10	2	6,14

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques de la dattes Mech-Degla (**Yefsah-Idres et al., 2019**).

	Teneur en eau (%)	Taux de solides solubles
Mech-Degla	12,07 ± 0,02	71,50 ± 0,29

I.3.2. Appareils utilisés

Les principaux appareils utilisés sont :

- Agitateur pour une fermentation submergée de marque Retsch 220 V, 50 Hz, 25 W.
- Une étuve pour une température constante à 30 °C, de marque Wisd Thermo stable ON-32230 VAC, 50-60 Hz
- Un autoclave pour la stérilisation des substrats et la verrerie utilisée,
- Un pH mètre pour mesurer le taux d'acidité de marque Hanna instrument Type stylo HI98103 Checker®
- Un réfractomètre pour mesurer le degré Brix ou les sucres totaux (REFRACTOMETRE A MAIN BRIX 0/10% EN 0,1%).

I.3.3. Méthodes

I.3.3.1. Repiquage de la souche d'*Aspergillus niger*

Nous avonsensemencé l'échantillon de moisissure à la surface d'un milieu de culture Potato Dextrose agar (PDA) contenu dans 10 boites de pétri. Avant l'ensemencement, on additionne un antibiotique pour éviter la contamination bactérienne. Les boites sont ensuite mises à incuber à 30 °C pendant 7 jours.

I.3.3.2. Préparation du moût de dattes

Le moût est un liquide sucré servant de matière première dans les industries de fermentation. Dans cette étude, nous avons utilisé le moût de datte comme substrat de fermentation. Pour sa préparation, nous avons procédé successivement à :

- ▶ un lavage : qui se fait à l'eau de robinet. Il permet de débarrasser les dattes des poussières, du sable en diminuant éventuellement la charge microbienne. Le lavage est une opération nécessaire pour obtenir un produit de qualité hygiénique relative.
- ▶ un égouttage : qui permet de débarrasser les dattes de l'eau de lavage. Il se fait à l'aide d'un tamis.
- ▶ un dénoyautage : réalisé manuellement. Les pulpes de dattes sont ensuite découpées en petits morceaux.
- ▶ une hydratation : les pulpes de datte sont immergées dans de l'eau distillée dont la température est de 80 °C, le tout est porté au bain marie pendant 60 minutes sous agitation continue (Zergat, 1996). En respectant le rapport (1/3) (kg/L) dattes/eau distillée (Acourene *et al.*, 2008).
- ▶ une filtration : effectuée à l'aide de compresses. Un pressurage permet d'extraire le maximum de jus et donc un maximum de sucres.
- ▶ une stérilisation : réalisée à l'autoclave, à une température de 120 °C pendant 20 minutes. Ce traitement suffit pour éliminer la charge microbienne du moût et diminuer donc la compétition entre celle-ci et le champignon *sans* provoquer la dégradation et la caramélisation des sucres (Siboukeur *et al.*, 2001).

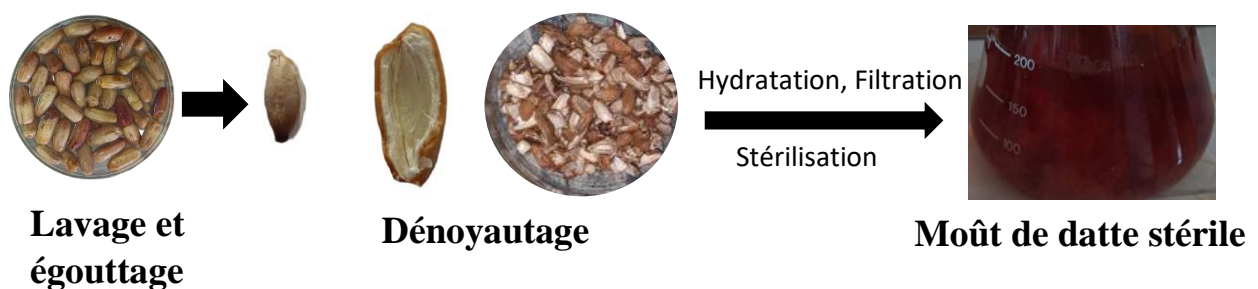


Figure 4 : Les étapes en photos de la préparation du Moût de dattes de la variété Mech-Degla (Original, 2023).

I.3.3.3. Préparation de la mélasse

- ▶ Nous avons préparé un mélange homogène de mélasse brute et d'eau distillée (**Figure 9**), selon des proportions bien déterminées dans le but d'obtenir une concentration en sucre désirée (un degré Brix de 15 %).
- ▶ Stériliser le substrat à une température de 120 °C pendant 20 min dans l'autoclave.
- ▶ Refroidissement de la solution de substrat : refroidir la solution à une température de 30 °C.



Figure 5 : Mélasse de canne à sucre traité avec de l'eau distillé (**Original, 2023**).

I.3.3.4. Préparation de l'inoculum

La souche *est* ensemencée stérilement sur 10 boîtes de pétri contenant 10 ml de milieu PDA. Pour récupérer le maximum des spores.

Après 7 jours d'incubation à 30 °C, des spores apparaissent à la surface du tapis mycélien (**figure 10**). Elles sont récupérées dans l'eau distillée stérile puis dénombrées grâce à la cellule de Malassez (Voir annexe 3 pour la méthode du dénombrement).



Figure 6 : Culture d'*A.niger* sur milieu PDA (**Original, 2023**).

La suspension fongique est ensuite diluée de façon à obtenir une concentration de l'ordre de 1.57×10^7 spores/mL. Cette concentration suffit pour inoculer 50 mL des substrats.

I.3.3.5 Inoculation du milieu de fermentation

On ensemence stérilement dans chaque béchers 100 mL de suspension :

- 100 ml du moût de dattes avec 1.57×10^7 spores/mL d'*A.Niger* ;
- 100 ml de la mélasse avec 1.57×10^7 spores/mL d'*A.Niger* ;
- 50 ml du moût de dattes + 50 ml de la mélasse avec 1.57×10^7 spores/mL d'*A.Niger* ;

I.4. Fermentation

La température de culture est un facteur important à prendre en compte. *A. niger* peut être cultivé à une large plage de températures, allant de 20 °C à 45 °C, mais la température optimale de culture varie en fonction de l'objectif de la culture, en général, à des températures plus élevées, la croissance peut être plus rapide, mais cela peut également entraîner une diminution de la production de certains métabolites d'intérêt. D'autre part, à des températures plus basses, la croissance peut être plus lente, mais certains métabolites peuvent être produits en plus grande quantité (Frisvad *et al.*, 2006). Une étude menée par Farhat *et al.*, en (2014) a montré que la température optimale pour la croissance de l'*Aspergillus niger* se situe entre 30 et 37 °C.

En ce qui concerne la quantité d'oxygène, l'*Aspergillus niger* est une espèce aérobic stricte, ce qui signifie qu'elle a besoin d'une quantité suffisante d'oxygène pour sa croissance (Kaur et Kapoor, 2018).

La fermentation est réalisée en béchers. L'incubation a lieu dans une étuve sous agitation continue dont la température est réglée à 30 °C.

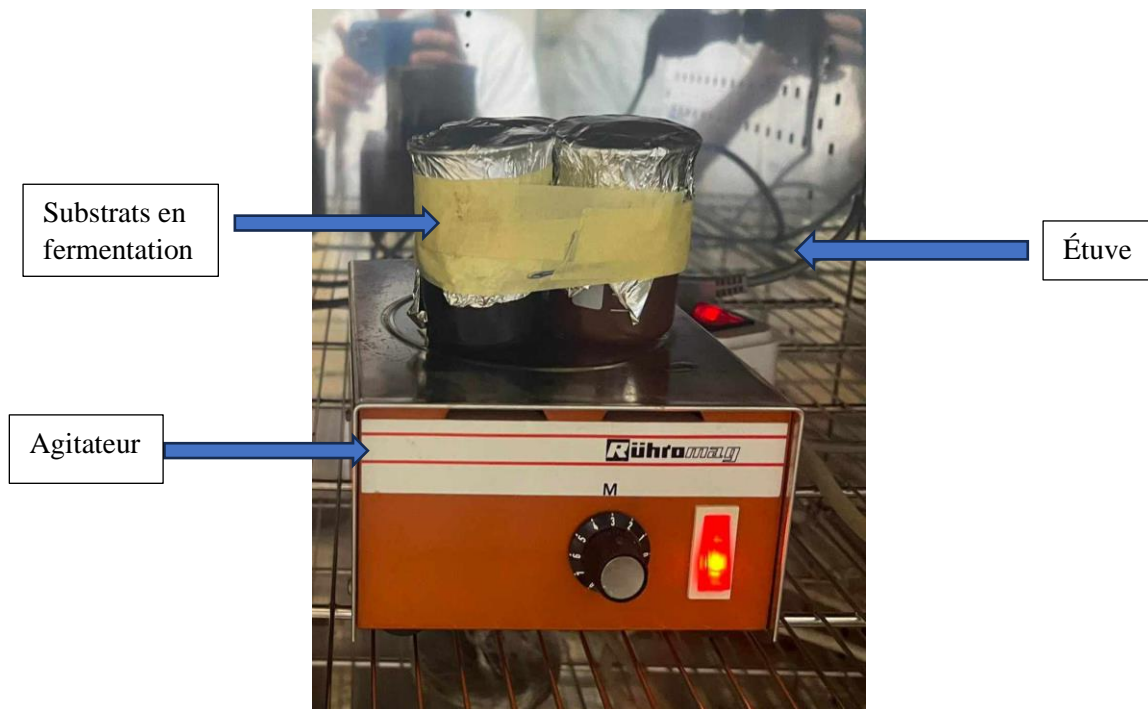


Figure 7 : Réalisation d'une fermentation submergée (Original, 2023).

I.4.1. Suivi de la fermentation

Des prélèvements se font tous les 2 jours pendant 14 jours avec une prise d'essai de 20 mL. Ces prélèvements serviront pour l'étude de la cinétique de production de l'acide citrique et la consommation de sucre par *A. niger*.

L'évolution de la cinétique de production est contrôlée par la détermination de :

- La teneur en sucres résiduels ;
- L'évolution du pH ;

A. Mesure du pH

La détermination du pH, est essentielle pour le contrôle des deux substrats utilisés, avant et au cours de la fermentation. Sa variation, renseigne sur l'activité métabolique du champignon, donc sur la transformation des sucres en citrate. La détermination du pH s'effectue dans les conditions de la présente étude par une lecture directe à l'aide d'un pH-mètre préalablement

étalonné. Le pH est ajusté à 3,6 au milieu (jours 5-6) de la fermentation par une solution L'hydroxyde de sodium (NaOH).

B. Mesure des sucres totaux

Les sucres totaux sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre. Cette analyse permet de quantifier la quantité totale de sucres présents dans les différents substrats. Les sucres sont des composés essentiels pour la fermentation, car ils sont convertis en acide citrique par l'activité métabolique du champignon.

I.5. Récupération de l'acide citrique

La récupération de l'acide citrique à partir de la suspension se fait généralement par plusieurs méthodes telles que la précipitation ou extraction par solvant, car la cristallisation directe n'est pas possible à cause de la présence d'impuretés originaires des produits utilisés. Il est indispensable de réaliser une purification.

L'extraction de l'acide citrique à partir des jus fermentés s'effectue selon le protocole suivant: séparation du mycélium par filtration, ajout de carbonate de calcium (CaCO_3) au filtrant jusqu'à un pH de 5.8 pour former du citrate de calcium en solution, chauffage à 60°C et traitement avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) pour former l'acide citrique, puis séparation de précipité (Sulfate de calcium CaSO_4) par filtration en utilisant du papier filtre, décoloration au charbon actif et purification avec la résine échangeuse d'ion et enfin la cristallisation.

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode d'échange d'ions avec un système d'écoulement à contre-courant à lit mobile simulé. Nous avons optimisé les conditions expérimentales pour minimiser les dilutions de la solution d'acide citrique obtenue lors de l'élution en utilisant une quantité de résorbant de 100 ml de chaque suspension (**Berovic et al., 2007**). Cette quantité a été déterminée après des expérimentations approfondies visant à trouver la quantité optimale de résorbant pour maintenir l'efficacité de la séparation tout en évitant les dilutions excessives. Les résultats obtenus ont démontré que cette quantité de résorbant était suffisante pour notre système spécifique (**Berovic et al., 2007**)

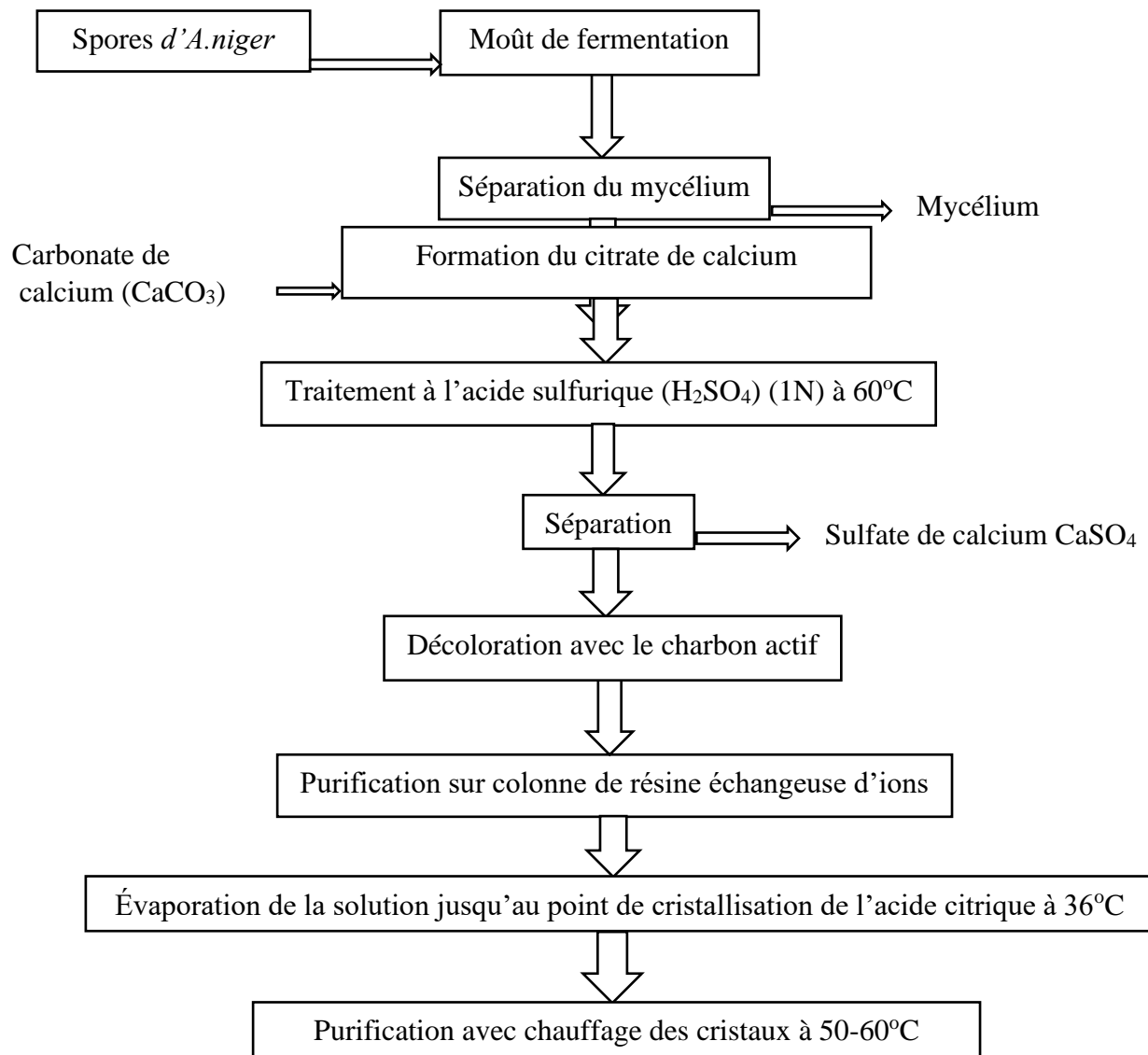


Figure 8 : Procédé d'extraction de l'acide citrique (Larpen Gourgard et Sanglier, 1995).

CHAPITRE II

Résultats

Et

Discussion

II.1 Caractéristiques physico-chimiques et biochimique des substrats

Il est essentiel de caractériser les substrats (le moût de datte et la mélasse) afin d'assurer le succès de la fermentation, car le processus fermentaire est directement influencé par la composition du milieu de culture. Cette caractérisation implique l'évaluation des caractéristiques physico-chimiques telle que le pH, ainsi que des caractéristiques biochimiques telle que les sucres totaux. Les résultats de cette caractérisation sont regroupés dans le **tableau 08**.

Tableau 07 : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des trois solutions mères (moût de dattes, la mélasse et l'amalgame).

Produits Mesures	Moût de dattes	Mélasse	Amalgame (mélasse + Moût de dattes)
Sucres totaux	14 %	15 %	15 %
pH	4,8	5,4	5,2

Il ressort du tableau ci-dessus que :

Sucres totaux :

- Le moût de dattes présente une teneur en sucres totaux de 14%.
- La mélasse affiche une teneur en sucres totaux de 15%.
- L'amalgame, qui est composé du mélange de moût de dattes et de mélasse, a également une teneur en sucres totaux de 15%.

Cette analyse indique que toutes les solutions mères contiennent des quantités significatives de sucres. La teneur élevée en sucres totaux peut être attribuée à la présence naturelle de sucres dans les dattes et dans la mélasse.

Potentiel Hydrogène :

- Le moût de dattes à un pH de 4.8.
- La mélasse a un pH de 5.4.
- L'amalgame présente un pH de 5.2.

Ces valeurs de pH varient légèrement entre les différentes solutions mères. Les valeurs de pH légèrement acides (inférieures à 7) indiquent que les solutions sont légèrement acides. Cela peut être attribué à la présence d'acide citrique dans les dattes et la mélasse et/ou par l'augmentation de l'activité de l'eau dans les substrats ayant provoqué une activité microbienne et par conséquent une baisse du pH.

Ces résultats mettent en évidence les concentrations de sucres totaux présents dans chaque substrat, ainsi que les valeurs de pH correspondantes. Les sucres totaux sont essentiels pour la fermentation, car ils servent de source de carbone pour l'*A. niger* dans sa production d'acide citrique. Le pH du milieu de culture joue également un rôle crucial dans l'activité de l'*A. niger* et l'efficacité de la production d'acide citrique.

Dans notre étude, nous avons procédé à la caractérisation des propriétés physico-chimiques et biochimiques de trois substrats employés pour la production d'acide citrique par fermentation avec l'*A. niger* : le moût de datte, la mélasse et l'amalgame (une combinaison de moût de datte et de mélasse).

II.1.1. Évolution du pH

Le pH initial d'un milieu de fermentation doit être optimisé et défini en fonction du microorganisme, du substrat et de la technique de production. Le substrat et la technique de production influencent la cinétique du pH (Dashen *et al.*, 2014). Le graphique ci-dessus représente l'évolution du pH pour le moût de dattes, la mélasse et l'amalgame au cours de la fermentation :

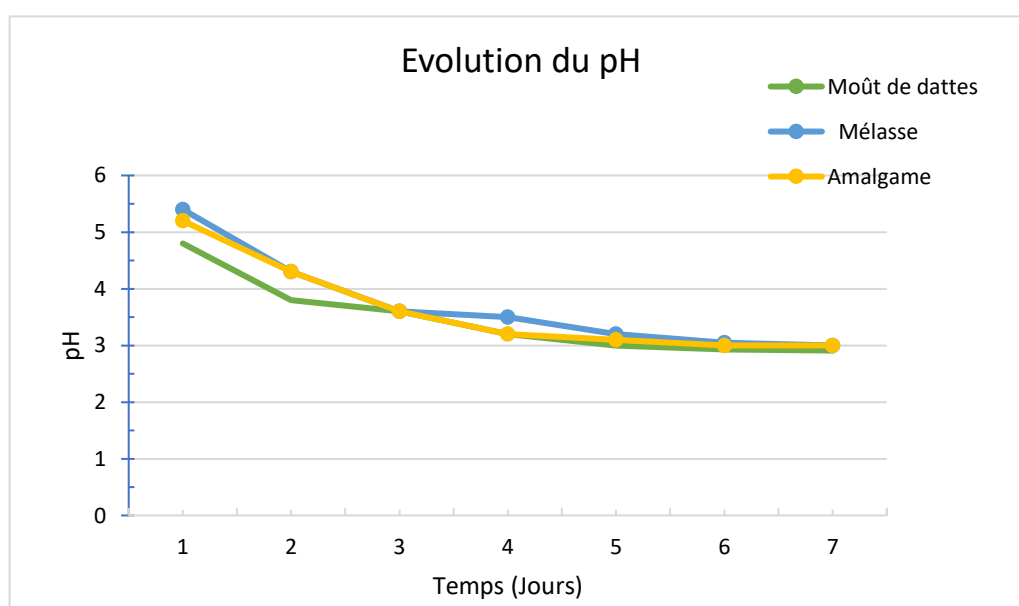


Figure 9 : Évolution du pH des substrats au cours de la fermentation.

On observe une diminution progressive du pH pour tous les substrats au fil des jours. Au départ, le pH est légèrement acide, avec des valeurs autour de 4,8 pour le moût de dattes, 5,4 pour la mélasse et 5,2 pour l'amalgame. L'étude de **Bautista et al., (2019)** a montré que le pH optimal pour la croissance de l'*Aspergillus niger* varie entre 3 et 6,5.

Au fur et à mesure que les jours passent, le pH diminue de manière significative pour tous les substrats. On peut voir que le pH atteint des valeurs plus acides, avec une diminution plus prononcée entre les jours 2 et 4, où les valeurs de pH chutent rapidement.

À partir du jour 6, les valeurs de pH semblent se stabiliser, avec de légères variations mais globalement maintenues à un niveau bas et constant. Cela peut indiquer un équilibre atteint dans les réactions chimiques et biochimiques en cours, ainsi qu'une influence limitée des facteurs externes sur le pH.

L'analyse des résultats suggère que la fermentation des sucres présents dans le moût de dattes, la mélasse et l'amalgame conduit à une augmentation de l'acidité, comme le montre la diminution régulière du pH. Cette acidification peut être attribuée à la production d'acide citrique par l', impliqué dans le processus de fermentation.

Les résultats précédemment mentionnés démontrent la variation du pH dans chaque milieu de fermentation au fil du temps. On observe une diminution progressive du pH dans tous les milieux, indiquant une acidification du milieu de culture. Au 6^{ème} jour, une baisse plus marquée du pH est constatée, atteignant environ 2.7 dans le moût de datte et 2.8 dans la mélasse et l'amalgame, attribuable à l'activité métabolique de l'*A. niger* qui produit de l'acide citrique.

Il est essentiel de noter que le pH a été ajusté au 6^{ème} jour en utilisant une solution de NaOH afin de maintenir un pH optimal pour la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique. Ce réglage permet de favoriser l'activité enzymatique de l'*A. niger* et de créer des conditions propices à la production d'acide citrique en ramenant les valeurs de pH à environ 3,6.

La régulation du pH joue un rôle crucial dans la fermentation car elle influence fortement les enzymes et la croissance des microorganismes selon les conditions du milieu. Un pH adéquat permet d'optimiser les processus métaboliques, favorisant ainsi la production d'acide citrique.

Le pH du moût de datte étudié dans cette recherche a été mesuré à 4.8, indiquant une légère acidité par rapport à d'autres études antérieures, telles que celles rapportées par **Zergat (1996)**

et Benahmed Djilali et al., (2010) (tableau IV, Annexe 2), qui ont obtenu respectivement des valeurs de pH de 5.31 et 5.8.

Cette différence de pH peut s'expliquer par une augmentation de l'activité de l'eau dans le moût de datte, favorisant ainsi une activité microbienne plus intense et entraînant une baisse du pH.

Il convient de souligner que l'évolution du pH observée dans les différents milieux de fermentation (moût de datte, mélasse et amalgame) démontre une diminution progressive. Au 6^{ème} jour, le pH a été ajusté en utilisant une solution de NaOH, maintenant ainsi des conditions favorables à l'activité de l'*A. niger* et à la production d'acide citrique, en accord avec les travaux de Kessas et al. (2012).

Le pH du milieu de fermentation subit des changements continus en raison des activités métaboliques microbiennes, principalement en raison de la sécrétion d'acides organiques (tels que l'acide citrique, ainsi que des acides gluconique et oxalique indésirable). Les espèces microbiennes telles que *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Penicillium* sont capables de réduire rapidement le pH en dessous de 3, tandis que d'autres champignons tels que *Sporotrichum* et *Pleurotus* maintiennent un pH plus stable entre 4 et 5 (Del Campo et al., 2006). Le pH du milieu de fermentation est particulièrement important pendant la phase de sporulation et de production. Lors de la germination, les spores absorbent l'ammoniac et libèrent des protons, ce qui augmente l'acidité du milieu et favorise la production d'acide citrique. À un pH bas (moins de 2), la formation de produits indésirables tels que l'acide oxalique et gluconique est inhibée, et la possibilité de contamination par d'autres micro-organismes est également réduite, ce qui facilite la récupération de l'acide citrique (Max et al., 2010).

En résumé, cette étude révèle une diminution progressive du pH dans les milieux de fermentation, avec un ajustement effectué au 6^{ème} jour à l'aide d'une solution de NaOH. Cela contribue à maintenir des conditions propices à l'activité de l'*A. niger* et à la production d'acide citrique, malgré de légères différences de pH par rapport aux résultats antérieurs rapportés dans la littérature scientifique.

II.1.2. Évolution des sucres totaux

Généralement, la concentration en sucres dans les deux milieux diminue progressivement au cours de la fermentation. Le graphique suivant représentant les mesures (en degré Brix) des sucres totaux pour le moût de datte, la mélasse et l'amalgame aux différents jours de la fermentation :

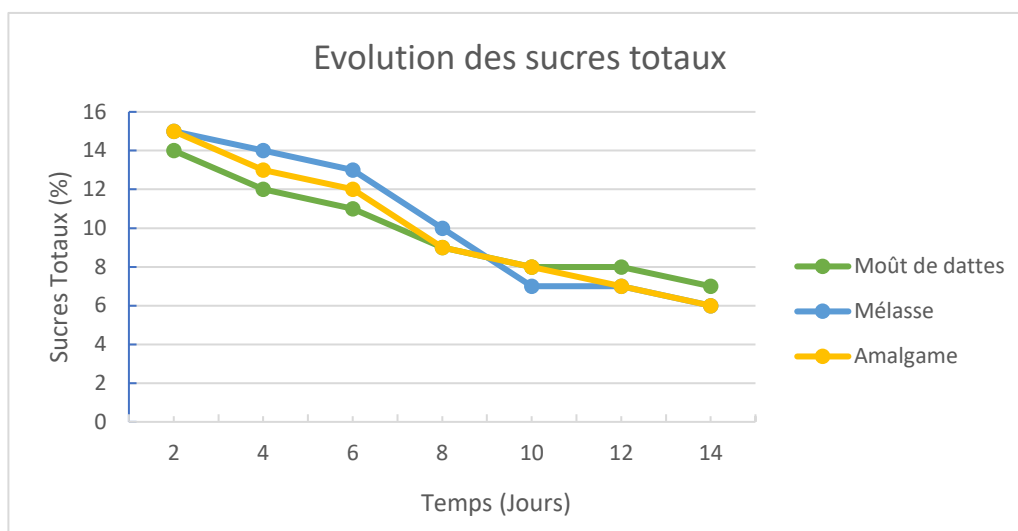


Figure 10 : Évolution de l'assimilation des sucres au cours de la fermentation.

La figure 9 représente l'évolution des sucres totaux pour chaque type de substrat (moût de dattes, mélasse et amalgame) au fil des jours.

On observe une diminution régulière des sucres totaux pour tous les substrats au cours de la période de mesure. Au départ, les sucres totaux sont relativement élevés, avec des valeurs de 14% pour le moût de dattes, 15 % pour la mélasse et 15 % pour l'amalgame.

Cependant, au fur et à mesure que les jours passent, les valeurs des sucres totaux diminuent progressivement pour tous les substrats. Cette diminution peut être attribuée à la consommation des sucres par l'*A. niger* présent dans les solutions.

La diminution des sucres totaux indique que les sucres sont métabolisés par le micro-organisme lors du processus de fermentation. Les sucres sont convertis en acide citrique.

Ces concentrations de sucres totaux constituent une source de carbone essentielle pour la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique. Il est intéressant de noter que les concentrations de sucres totaux dans la mélasse et l'amalgame sont légèrement supérieures à celle du moût de datte.

Étant un organisme hétérotrophe dépourvu de chlorophylle, l'*A. niger* est incapable de réaliser ses propres synthèses et dépend donc de sources externes de carbone pour son développement normal.

La concentration en nutriments est également un facteur important pour la croissance de l'*Aspergillus niger*. Plusieurs études ont montré que sa croissance est favorisée par la présence

de sources de carbone telles que le glucose et le saccharose (Alvarez *et al.*, 2018 ; Aslam *et al.*, 2020).

Plusieurs études adaptées sur plusieurs décennies ont révélé que la source de carbone a un impact direct sur le rendement en acide citrique. Les monosaccharides et les disaccharides sont considérés comme la source de carbone préférée, car ils sont métabolisés plus rapidement par le champignon, ce qui se traduit par un rendement plus élevé (Mattey, 1992). En revanche, les polysaccharides ne conviennent pas comme matière première, car le processus de décomposition prend trop de temps pour atteindre le taux de catabolisme des sucres nécessaires à la production d'acide citrique. La lenteur de l'hydrolyse des polysaccharides est attribuée à une activité enzymatique réduite, qui influence le pH dans le milieu de fermentation (Hossain *et al.*, 1984 ; Xu *et al.*, 1989 ; Papagianni *et al.*, 2005). Parmi les monosaccharides, le saccharose présente un rendement supérieur au glucose, au fructose et au lactose, par ordre décroissant (Angumeenal et Venkappayya, 2013). Cette supériorité du saccharose est attribuée à la présence d'une forte invertase extracellulaire liée au mycélium d'*A. niger*, qui hydrolyse rapidement le saccharose à faible pH (Kubicek-Pranz *et al.*, 1990).

La production économique de saccharose ou de glucose pur à grande échelle peut être difficile. Par conséquent, on utilise des sources de carbone à faible coût telles que la mélasse de canne à sucre et de betterave, qui sont des déchets provenant des raffineries de sucre. Étant donné que ces matières premières proviennent de différentes sources, un prétraitement peut être nécessaire. Les principaux contaminants sont généralement les cations, et les méthodes de prétraitement couramment utilisées incluent la précipitation à l'aide de ferrocyanure de potassium ou l'utilisation de résines échangeuses de cations (Angumeenal et Venkappayya, 2003).

La concentration de la source de carbone est également un facteur critique pour la production réussie d'acide citrique, tout aussi important que le type de source de carbone utilisée. La production d'acide citrique est directement liée à la concentration en sucre, de sorte que plus la concentration est élevée, plus la quantité d'acide citrique produite est importante (Xu *et al.*, 1989). Cependant, des études ont montré que la concentration maximale d'acide citrique peut être obtenue avec une concentration en sucre de 14 à 22 %. Une étude menée par Xu *et al.* (1989) utilisant différentes sources de sucre telles que le saccharose, le glucose, le fructose, le mannose et le maltose a montré que le rendement maximal était obtenu avec une concentration en sucre de 10 % (p/v), à l'exception du glucose, pour lequel un rendement maximal de 7,5 % (p/v) a été obtenu (Amenaghawon et Aisien, 2012).

Selon les études de (**Porges, 1932 in Hossain et al., 1984 in Zergaat, 1996**), une concentration en saccharose comprise entre 14 % et 20 % est nécessaire pour atteindre le rendement maximal en acide citrique. Dans notre cas, nous avons travaillé avec une concentration en sucres totaux d'environ 14-15 %.

La fermentation citrique est favorisée par une augmentation du taux de sucre, du moins jusqu'à 20 %. Au-delà de cette valeur, la conversion du sucre commence à diminuer. Pour les faibles concentrations de sucre, une augmentation de la concentration a un effet bénéfique sur la production d'acide citrique. Ainsi, il semble qu'au-delà d'une concentration initiale de 20 %, il se produise une perturbation métabolique qui se traduit probablement par une inhibition des enzymes (**Kessas et al., 2012**).

Nous n'avons pas réalisé la détermination des teneurs en oligoéléments minéraux dans les dattes et leur moût en raison d'un manque de ressources. Nous nous sommes référés aux résultats fournis par **Boughnou (1988) in Zergat (1996)**, qui travaillait sur le jus de déchets de dattes, ainsi qu'aux travaux de **Saddek et Faouzi (1993)** sur le jus de cinq variétés de dattes (tableau I et tableau II, Annexe 1), et au rapport d'essai physico-chimique de la mélasse réalisé par le laboratoire de contrôle de qualité 'SABRINNEL' (tableau III, Annexe 2).

Les milieux industriels tels que la mélasse sont généralement riches en azote, tandis que les milieux de laboratoire nécessitent souvent l'ajout de sels d'ammonium en tant que suppléments (**Gupta et al., 1975**). Une concentration élevée en azote augmente la consommation de sucre et la croissance du champignon, tout en réduisant la quantité d'acide citrique produite (**Hang et al., 1977**). **Kristiansen et Sinclair (1979)** ont également découvert que la limitation de l'azote est nécessaire pour obtenir un bon rendement en acide citrique dans un système continu.

Le rendement maximal en acide citrique dans un fermenteur agité à l'échelle du laboratoire a été atteint avec une concentration de nitrate d'ammonium maintenue à 0,2 % (**Ali et al., 2002a**). Une étude réalisée par **Kareem et al. (2010)** a complété le milieu de fermentation contenant des déchets d'ananas avec 0,25 % (p/v) de méthanol, ce qui a entraîné une augmentation de 17,6 % de la production d'acide citrique. Cette augmentation était également accompagnée d'une augmentation de la biomasse. Des variations supplémentaires de la concentration ont conduit à des perturbations de la croissance fongique et à une production plus faible d'acide citrique.

Pour favoriser la croissance fongique et la production d'acide citrique, une concentration de phosphate de 0,5 à 5 g/L est nécessaire selon **Shu et Johnson (1948)** ; et il est essentiel d'avoir une concentration de phosphore inférieure à 2.5 g/L afin d'éviter la synthèse d'acide oxalique et gluconique selon **Zergat (1996)**. Les concentrations de phosphore dans le moût varient de 4.92

à 7.93 mg/100 mL, tandis que la mélasse présente une concentration de 0.17 g/kg et restent dans les bonnes conditions de la production de l'AC.

En ce qui concerne le fer, sa concentration varie de 0.01 à 0.20 mg/100 mL dans le moût de datte (**Zergat, 1996**) et de 0.004 % dans la mélasse. Les concentrations de magnésium, de zinc et de cuivre dans le moût de datte sont respectivement de l'ordre de 0.14 à 17 mg/100 mL, de 1.06 à 1.1 mg/100 mL et de 0.039 à 0.131 mg/100 mL. Il convient de noter que le cuivre est absent dans la mélasse, tandis que la concentration de zinc est de 0.04 mg/100 g et celle de magnésium de 0.24 g/100 g. Les valeurs mentionnées fournissent une estimation de la composition en oligoéléments des substrats, lesquels jouent un rôle important dans la fermentation citrique.

Selon **Tsay et To (1987)** cités par **Zergat (1996)**, la production d'acide citrique est maximale avec une concentration de fer (Fe^{2+}) comprise entre 0.1 et 2 mg/L.

D'autres études ont montré aussi que les ions métalliques divalents tels que le manganèse, le zinc, le cuivre, le magnésium et le fer ont des effets sur la production d'acide citrique (**Käppeli et al., 1978 ; Dronawat et al., 1995**). D'après les travaux de **Word et Suzuki (1976)** cités par **Zergat (1996)**, une concentration de zinc d'environ 0.013 mg/100 g favorise la phase de croissance, tandis qu'une faible concentration inférieure à 0.006 mg/100 g limite l'augmentation de la biomasse et entraîne la transition vers la phase d'accumulation d'acide citrique. Le magnésium et le fer sont des métaux essentiels pour l'utilisation des sucres et la surproduction d'acide citrique par *A. niger* (**Benyahia, 1992**).

Tomlinson et al. (1950) ont conclu que les concentrations optimales de fer et de zinc sont respectivement de 1,3 et 0,3 ppm. Ces auteurs ont également souligné l'importance du manganèse dans la fonction cellulaire, la sporulation et la production de métabolites secondaires, notamment la synthèse de la paroi cellulaire. Une carence en manganèse affecte l'anabolisme d'*A. Niger*, entraînant une concentration élevée d'ammonium à l'intérieur de la cellule. Une diminution de l'accumulation d'acide citrique a été observée en présence de concentrations élevées de fer, ainsi que des changements dans la croissance mycélienne (**Mischak et al., 1985**). Grewal et Kalra (1995) ont conclu qu'à des concentrations élevées de zinc, les champignons maintenaient leur croissance sans accumulation d'acide citrique (**Drysdale & McKay, 1995**).

Les données relatives aux oligoéléments présents dans les substrats, ainsi que les recommandations pour une fermentation citrique réussie, indiquent que les concentrations observées sont appropriées pour une fermentation optimale.

D'autres métaux traces tels que le nickel, le molybdène et le cobalt ont également été signalés comme ayant un impact sur l'accumulation d'acide citrique chez *A. Niger* (**Habison et al., 1983**). Il est crucial de prendre en compte l'interdépendance des composants du milieu, car elle joue un rôle essentiel dans la production d'acide citrique. Par conséquent, un contrôle rigoureux de ces oligo-éléments est nécessaire pour une production optimale d'acide citrique.

II.1.3. Production de l'acide citrique

Le tableau ci-joint présente les rendements d'acide citrique obtenus pour chaque milieu de fermentation :

Tableau 08 : Quantité de l'acide citrique pour chaque milieu de fermentation

Milieus	Moût de dattes	Mélasse	Amalgame
Quantité de l'AC (g/L)	81,5	85.5	87,64

L'amalgame (combinaison de moût de dattes et de mélasse) présente le rendement le plus élevé en termes de production d'acide citrique, avec 87,64 g/L. Cela indique que la combinaison de ces deux substrats favorise une meilleure production d'acide citrique.

Le milieu de fermentation à base de mélasse obtient le deuxième meilleur rendement avec 85,5 g/L, tandis que le milieu de fermentation à base de moût de dattes obtient le rendement le plus faible avec 81,5 g/L.

Les résultats suggèrent que l'utilisation d'un mélange de moût de dattes et de mélasse (amalgame) permet d'obtenir des rendements plus élevés en termes de production d'acide citrique par rapport à l'utilisation de chaque substrat individuellement.

Les résultats obtenus dans notre étude mettent en évidence des rendements significatifs de production d'acide citrique dans chaque milieu de fermentation. Cependant, il convient de noter qu'il existe des variations entre nos résultats et ceux des études antérieures. Ces différences peuvent être expliquées par divers facteurs tels que les conditions expérimentales, les souches

spécifiques d'*A. niger* utilisées, les procédures expérimentales spécifiques et les caractéristiques chimiques des substrats.

Les conditions expérimentales peuvent varier d'une étude à l'autre, ce qui peut influencer la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique. Des paramètres tels que la température, le pH, le temps de fermentation et la concentration en nutriments sont des variables importantes à prendre en compte. Les différences dans ces paramètres peuvent contribuer à la variation des rendements d'acide citrique entre les études.

Il est également essentiel de considérer les souches spécifiques d'*A. niger* utilisées dans chaque étude. Différentes souches peuvent présenter des capacités métaboliques distinctes, ce qui peut influencer la production d'acide citrique. Les souches sélectionnées pour notre étude peuvent différer de celles utilisées dans d'autres travaux, ce qui peut expliquer les variations de rendement observées.

Par ailleurs, les procédures expérimentales spécifiques adoptées dans chaque étude peuvent également contribuer aux différences de résultats. Par exemple, l'utilisation d'un prétraitement tel que l'hexacyanoferrate de potassium dans une étude antérieure peut favoriser la production d'acide citrique en éliminant les ions de fer en excès. De telles procédures peuvent améliorer les conditions de fermentation et entraîner des rendements plus élevés.

En ce qui concerne l'étude menée par **Briki et Zitouni (2013)**, qui ont utilisé le moût de datte de la variété "Ghars" et a obtenu un rendement de 92 g/L d'acide citrique, nos résultats pour le moût de datte (81.5 g/L) sont comparables. Cependant, il est important de noter que différentes variétés de dattes peuvent présenter des compositions chimiques variables, ce qui peut influencer les rendements d'acide citrique. Ainsi, les différences de rendement entre notre étude et celle de **Briki et Zitouni (2013)** peuvent être attribuées à des variations dans les propriétés chimiques et les compositions spécifiques des variétés de dattes utilisées.

En résumé, les résultats de notre étude démontrent une production significative d'acide citrique dans chaque milieu de fermentation. Les divergences observées par rapport aux études antérieures peuvent être attribuées à des facteurs tels que les conditions expérimentales, les souches d'*A. niger* utilisées, les procédures expérimentales spécifiques et les caractéristiques chimiques des substrats. Pour obtenir des rendements d'acide citrique plus élevés et plus constants, il est nécessaire de poursuivre la recherche en optimisant les conditions de fermentation, en sélectionnant les souches appropriées et en comprenant les propriétés spécifiques des substrats utilisés. Quels que soient les résultats obtenus, il convient de souligner

que notre méthode présente un avantage économique considérable en raison de son coût de production réduit.

L'utilisation de l'amalgame, qui est un mélange de moût de dattes et de mélasse, se révèle particulièrement intéressante pour la production d'acide citrique en raison de son avantage économique significatif. En combinant ces deux substrats, nous obtenons un milieu de fermentation qui présente des caractéristiques optimales pour la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique, tout en étant plus économiquement viable par rapport à l'utilisation de substrats individuels.

L'amalgame offre des avantages économiques notables. Premièrement, le moût de dattes et la mélasse sont souvent disponibles à des coûts réduits, voire considérés comme des sous-produits ou des déchets de l'industrie agroalimentaire. En combinant ces deux substrats, nous maximisons l'utilisation des ressources existantes et réduisons les coûts liés à l'approvisionnement en matières premières. Cela permet d'optimiser la rentabilité du processus de production d'acide citrique.

De plus, l'amalgame présente une composition équilibrée en termes de nutriments et de sucres, ce qui favorise la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique. En combinant les propriétés bénéfiques du moût de dattes, riche en nutriments, et de la mélasse, riche en sucres, nous créons un milieu de fermentation idéal pour l'activité de l'. Cela se traduit par des rendements satisfaisants en acide citrique, tout en minimisant les coûts associés à l'utilisation de substrats plus complexes ou spécifiques.

Enfin, l'utilisation de l'amalgame offre une flexibilité dans le processus de fermentation. Les proportions du moût de dattes et de la mélasse peuvent être ajustées en fonction des besoins spécifiques de la production d'acide citrique, ce qui permet d'optimiser les conditions de fermentation et d'obtenir des rendements supérieurs. Cette adaptabilité du substrat contribue à l'efficacité globale du processus de production, offrant la possibilité d'optimiser les ressources et les résultats.

L'utilisation de l'amalgame comme substrat pour la production d'acide citrique présente un avantage économique indéniable. En combinant le moût de dattes et la mélasse, nous créons un milieu de fermentation équilibré, efficace et économiquement avantageux pour la croissance de l'*A. niger* et la production d'acide citrique. Cette approche nous permet d'optimiser les ressources, de réduire les coûts et d'obtenir des rendements satisfaisants, faisant de l'amalgame un choix convaincant sur le plan économique.

CONCLUSION

L'objet de cette étude consistait à comparer diverses combinaisons de substrats, incluant le moût de dattes, la mélasse et l'amalgame, pour la production d'acide citrique par *A. niger*. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer les performances de chaque substrat en termes de rendement de production, d'évolution du pH, de taux de sucres totaux et de quantité d'acide citrique générée.

L'évolution du pH au cours de la fermentation a manifesté une diminution pour chaque formulation, imputable à l'activité métabolique de *A. niger* et à la production d'acide citrique. De plus, les taux de sucres totaux ont graduellement décru dans chaque composition, signifiant leur utilisation par *A. niger* durant la fermentation.

Les mesures des quantités d'acide citrique produites pour chaque substrat ont révélé des valeurs de 81.5 g/L pour le moût de dattes, 85.5 g/L pour la mélasse et 87.64 g/L pour l'amalgame. Ces constats mettent en évidence l'avantage économique incontestable de l'amalgame, fusionnant le moût de dattes et la mélasse, en termes de production d'acide citrique. L'amalgame a manifesté les meilleurs rendements parmi les diverses combinaisons expérimentées.

L'utilisation de l'amalgame associant le moût de dattes et la mélasse présente des perspectives prometteuses pour la production d'acide citrique. Cette approche optimise l'utilisation des ressources locales, réduit les coûts de production et génère des rendements satisfaisants. De plus, elle valorise les dattes impropres à la consommation directe et ouvre de nouvelles perspectives pour l'industrie de l'acide citrique en Algérie.

Afin d'améliorer davantage ces résultats, des recherches complémentaires pourraient être entreprises. L'optimisation des conditions de fermentation, l'exploration de diverses combinaisons de substrats et l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents de la production d'acide citrique par *A. niger* s'avéreraient opportunes. Ces efforts pourraient induire des améliorations notables dans la production et une meilleure compréhension des processus impliqués. Il conviendrait également d'évaluer les conséquences environnementales de cette approche, notamment en termes de consommation d'eau, d'émissions de gaz à effet de serre et d'impact sur les écosystèmes locaux.

Pour résumer, les résultats obtenus démontrent l'efficacité de l'amalgame à base de moût de dattes et de mélasse, ouvrant des perspectives prometteuses pour l'industrie de l'acide citrique en Algérie, tant d'un point de vue économique que de durabilité environnementale. Elle permet une exploitation optimale des ressources locales et la valorisation des sous-produits alimentaires, contribuant ainsi au développement de l'industrie locale.

Références
Bibliographiques

- **Adams, L.K., Lyon, D.Y., Alvarez, P.J.J. (2006).** Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19), 3527-3532.
- **Abdel-Sater, M. M., Abdel-Monem, M. E., & El-Gendy, N. M. (2011).** Response surface optimization of growth and pectinase production in submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(3), 162-172.
- **Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004).** Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
- **Ali, H. K. Q., Daud, M. Z. M., & Al-Azzawi, Z. (2012).** Economic benefit from the optimization of citric acid production from rice straw through Plackett-Burman design and central composite design. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 36(1), 81-93.
- **Alvarez, A., Díaz-Muñoz, I., & Roque, A. (2018).** Effect of different carbon sources on citric acid production by GH1: kinetic and thermodynamic evaluation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(9), 2669-2676.
- **Acourene S., Ammouche A., Djaafri K., (2008).** Valorisation des rebuts de dattes par la production de la levure boulangere, de l'alcool et du vinaigre. *Sciences& Technologie C* 28, pp.38 -45.
- **Angumeenal, A. R., & Venkappayya, D. (2013).** An overview of citric acid production. *LWT Food Science and Technology*, 50(2), 367–370.
- **Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabanes, F. J. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 33-49.
- **Aslam, S., Siddiqui, S. A., & Ajaz, M. (2020).** Optimization of citric acid production by using different carbon sources. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 9(3), 142-147.
- **Ayudhya, S. K. N., Tonto, P., Mekasuwandumrong, O., Pavarajarn, V., & Praserthdam, P. (2006).** Solvothermal synthesis of ZnO with various aspect ratios using organic solvents. *Crystal Growth and Design*, 6(11), 2446-2450.
- **Bautista, M. A. R., Morales-Sánchez, E., & Hernández-López, E. (2019).** Optimization of citric acid production by with sugarcane molasses and corn steep liquor. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 9(6), 1-6.
- **Bekir, S., Çevrimli, E. K., & Harun, Ç. (2009).** Effects of Fermentation Conditions on Citric Acid Production from Beet Molasses by . *Asian Journal of Chemistry*, 21(4),3211-3218.
- **Benyahia Z., (1992).** Amélioration du rendement de production de l'acide citrique par

. Mémoire Ingénieur:U.S.T.H.B, Alger.

- **Berovic, M., & Legisa, M. (2007)**. Citric acid production. *Biotechnology annual review*, 13, 303-343
- **Brierley, C. L., & Brierley, J. A. (2013)**. Progress in bioleaching: Part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 7543-7552.
- **Broekhuis, A. A., Haverkamp, J., & Witholt, B. (1983)**. Fluorocarbon-silicones as liquid phases in gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 268, 89-102.
- **Castellanos, F., & García-Ochoa, F. (2010)**. Citric acid production by in stirred tank bioreactors. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 39-48.
- **Chagas, B. M., dos Santos, A. A., da Silva, A. M., Carvalho, N., Figueiredo, B. V., Chaves-Alves, V. M., Góes-Neto, A. (2019)**. Production of hydrolases by in biofilm and pelleted cultures under solid-state fermentation and submerged fermentation: A comparative study. *Process Biochemistry*, 86, 172-181.
- **Cheah, W. Y., Show, P. L., Ng, I. S., Ooi, C. W., Ling, T. C., Chang, J. S., & Juan, J. C. (2018)**. Optimization of carbon sources and process parameters for citric acid production by *Candida tropicalis* using response surface methodology. *Journal of Environmental Management*, 223, 308-318.
- **Chergui, D., Akretche-Kelfat, S., Lamoudi, L., Al-Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait-Amar, H. (2021)**. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 7134–7141.
- **Chundakkadu, K. (2005)**. Solid state fermentation systems—An overview. *Critical Reviews Biotechnology*, 25, 1-30. <http://dx.doi.org/10.1080/07388550590925383>
- **Clemente, J. S., Gomes, N. M., & Rodrigues, M. A. (2018)**. Biotechnological applications of yeasts in food science: A review. *Food Research International*, 103, 384-397.
- **Curvelo-Santana, J. C., & Carvalho, J. A. (2013)**. Production of citric acid from sugarcane molasses by fermentation with . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 297-312.
- **Davis, L. L., Bartley, J. P., Oliver, R. W., & Sternberg, S. P. (1983)**. Comparison of and *Candida lipolytica* citric acid production in liquid-churned and surfaceturbulence fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 9-17.
- **Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011)**. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 505-529.
- **Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., & Verma, M. (2011)**. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. Pages 49-73

- **Domingues, F. C., de Souza, R. B., Rodrigues, M. I., & Teixeira, J. A. (2000).** High citric acid production by using a combined solid-state and submerged fermentation technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86(1-9), 885-898.
- **Driouch, H., Sommer, B., Wittmann, C., & Rohde, M. (2010).** Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 181-188.
- **Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., & Wittmann, C. (2011).** Optimized bioprocess for production of fructose from sucrose by recombinant strains of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 979-989.
- **Driouch, H., Hädicke, O., & Wittmann, C. (2012).** Integration of bioinformatics and synthetic promoters lead to the discovery of novel elicitors in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 76.
- **Driouch, H., & Beuchel, C. (2019).** Pectinase and Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* in Biotechnological Processes. In: Satyanarayana T., Kunze G. (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore.
- **Driouch, H., Hädicke, O., Klamt, S., Schrader, J., & Wittmann, C. (2012).** Integrated metabolic profiling and parallel ¹³C-labeling experiments show route-dependent redirection of citric acid flow in . *FEBS Journal*, 279(2), 286-297.
- **Driouch, H., Weber, M., Krull, R., & Wittmann, C. (2010).** The filamentous fungus in submerged culture—morphology, rheology, and process engineering. *Biotechnology Advances*, 28(6), 642-658.
- **Driouch, H., Sauer, M., & Wittmann, C. (2010).** Improving the bioconversion yield of fructose to mannitol in *Candida magnoliae*: Mutant characterization and metabolic flux analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 571-581.
- **Efremenko, E. N., & Bilay, V. I. (2013).** Citric acid production by on glucose–xylose media. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(6), 4307-4312.
- **Fink, G. R., & Cook, J. E. (2005).** RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(2), 177-184.
- **Finkelstein, D. B., & Ballou, C. E. (1967).** The enzymatic synthesis of UDP-glucose from uridine diphosphate glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 242(1), 104-110.
- **Fleissner, A., Dersch, P., & Jahreis, K. (2010).** Suppressor mutations in the C-terminal domain of the hexokinase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on carbon source and genetic background. *Current Genetics*, 56(5), 447-457.
- **Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K., & Hiroshi, H. (2007).** Regulation of fatty acid

metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829-839.

- **Gao, L., Xu, J., Yuan, Z., Chen, J., & Yang, Z. (2008).** Enhanced production of poly (gamma-glutamic acid) by optimizing the medium composition and fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 496-501.
- **Gavrilescu, M. (2004).** Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 4(6), 497-526.
- **Gienapp, E., & Herth, W. (1961).** The physiology of aspergillus. I. Requirements for citric acid production by . *Applied Microbiology*, 9(3), 195-198.
- **Gombert, A. K., Pons, T., & Van Den Broek, P. (2001).** Engineering of growth-coupled product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(4), 346-353.
- **Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006).** Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141-146.
- **Griffin, S. G., Wyllie, S. G., & Markham, J. L. (1999).** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322-332.
- **Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., & Courdavault, V. (2010).** Transcriptome analysis of *Betula pendula* bark in response to infection by the rust fungus *Melampsorium betulinum*. *Plant Physiology*, 152(1), 495-511.
- **Gupta, A., Kaur, R., Saran, S., & Singh, R. (2012).** Screening, purification and characterization of a novel thermoalkaliphilic lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 74(3-4), 185-191.
- **Hossain, M. T., Roy, M., & Uddin, M. N. (2009).** Utilization of hydrolysate cane molasses as a low-cost carbon source for citric acid production by . *Biotechnology*, 8(2), 276-281.
- **Huang, C., Ding, J., Xu, Y., Ding, G., Zhang, T., & Chen, H. (2011).** Production of xylanase from *Trichoderma reesei* RUT C30 in corn stover ethanol stillage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(6), 1418-1430.
- **Huijberts, G. N. M., Eggink, G., de Waard, P., & Prenosil, J. E. (1992).** On-line stoichiometry determination and adaptive control of baker's yeast fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(1), 29-41.
- **Ji, X. J., Huang, H., Du, J., & Zhu, J. (2008).** Bioconversion of corn stover hydrolysate to poly(3-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Bioresource Technology*, 99(10), 4316-4322.
- **Jo, J. H., Kim, J. H., Lee, J. Y., Kim, S. J., Lee, Y. J., Lee, S. J., & Lee, K. H. (2007).** Bioconversion of coffee residues to bioethanol with brewing yeast. *Journal of Microbiology*

and Biotechnology, 17(5), 859-864.

- **Jordà, J., & Domenech, J. (1996).** Simultaneous biosynthesis and uptake of citric acid in . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 442-448.
- **Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002).** Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7), 703-714.
- **Kelly, C. T., Fogarty, W. M., & Gormley, T. R. (1998).** The effect of different forms of nitrogen on alpha-amylase and glucoamylase production by . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(6), 895-899.
- **Kessas, R, Benabdi, L, et Bouarfa, H. (2012).** "Optimisation des paramètres de production de l'acide citrique à partir de mélasse de canne à sucre avec ." *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, vol. 14, p. 57-62.
- **Kim, H., Lee, S. Y., & Kim, B. C. (2016).** Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from canola oil by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(6), 1053-1067.
- **Kossman, M., Tsakona, S., Kornaros, M., & van Loosdrecht, M. C. M. (2012).** Biohydrogen and carboxylate production from wheat straw hydrolysate by mixed cultures. *WaterResearch*, 46(4), 1193-1202.
- **Kouassi, E. (2018).** Contribution à la valorisation des sous-produits agricoles en bioproduits.
- **Kouassi, E. (2018).** Contribution à la valorisation des sous-produits agricoles en bioproduits.
- **Kuforiji, O. O., Kuboye, A. O., & Odunfa, S. A. (2010).** Orange and pineapple waste as potential substrates for citric acid production. *International Journal of Plant Biology*, 1, e4.
- **Kumar, V., & Park, C. S. (2014).** Potential and utilization of straw cellulose as reinforcement in composite materials: A review. *Composites Part B: Engineering*, 56, 395-410.
- **Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997).** Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331-371.
- **Larpen-Gourgaud, Monique (1995).** *Biotechnologies - Principes Et Méthodes*. Collection : BIOSCIENCES ET TECHNIQUES. Éditeur : DECITRE. Format : Broché. 668 pages.
- **Lee, B. H., & Lee, H. (2003).** Application of reverse osmosis to concentrated black liquor treatment. *Journal of Membrane Science*, 213(1-2), 31-39.
- **Lee, I. H., Song, Y. S., & Min, J. (2008).** Lignocellulose pretreatment technologies and their effects on hydrolysis inhibitors: A review. *Bioresource Technology*, 99(23), 6731-6741.

- **Liu, H., Luo, Q., Yuan, X., & Huang, H. (2009).** Production of citric acid from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SICAU57. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1005-1013.
- **Liu, J., Zhu, Y., & Wang, X. (2011).** Study on synthesis and application of high efficiency lignin dispersant. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(6), 3657-3663.
- **Loos, A., van den Berg, C., & van Heerikhuizen, H. (1991).** Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose under aerobic conditions. *Yeast*, 7(1), 29-51.
- **Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002).** Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.
- **Mäkelä, M. R., Hildén, K. S., & de Vries, R. P. (2010).** Degradation and modification of plant biomass by fungi. In: *Handbook of Plant-Based Biofuels*. CRC Press.
- **Ma, M., & Hanna, M. A. (1999).** Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology*, 70(1), 1-15.
- **Ma, X., Liu, Q., & Yang, J. (2011).** Production of 2,3-butanediol from glucose and xylose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 830-840.
- **Malakar, P., Venkatesh, K. V., & Kumar, S. (2012).** Optimization of acid hydrolysis of rice straw for ethanol production. *Journal of Engineering Science and Technology*, 7(2), 247-256.
- **Manzoor, M., & Bhatti, H. N. (2012).** Utilization of citrus peel waste for the production of butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Applied Sciences*, 12(15), 1613-1616.
- **Meena, V. S., Bisht, J. K., & Bisht, M. P. S. (2007).** Antimicrobial and phytochemical evaluation of certain medicinal plants used in Indian traditional folk medicine for the treatment of microbial infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(2), 72-82.
- **Molina-García, A. D., Zafra-Ruíz, J., Rodríguez-Gómez, F. J., Serrano-Aroca, Á., & Núñez-Delicado, E. (2011).** Isolation and characterization of cellulolytic yeasts from the intestine of wood-feeding insects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 825-831.
- **Montesinos, J. L., Pastor, F. I. J., Luengo, J. M., & del Cerro, C. (1991).** Influence of glucose and ammonium concentration on the kinetics of citric acid production by. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(6), 548-554.
- **Naganuma, T., Hidaka, M., Tsushima, K., & Fukui, S. (1994).** Fermentative production

of citric acid from inositol by *Candida citricarpa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(2), 110-114.

• **Navarro, A. R., Guerra, N. P., & Mateo, E. (2008)**. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Biotechnology Letters*, 30(5), 849-854.

• **Nevalainen, H., Peterson, R., & Zelena, K. (2005)**. Biotechnology of filamentous fungi – the state of the art. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 635-648.

• **Nielsen, J. (2003)**. It is all about metabolic fluxes. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7031-7035.

• **Ogbonna, J. C., & Yada, H. (2001)**. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 259-274.

• **Oh, H., & Park, C. S. (2004)**. Production of citric acid by immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(11), 1349-1353.

• **Oloke, J. K., & Takigawa, S. (2004)**. Production of citric acid from sugarcane molasses by solid-state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(3), 231-236.

• **Orihane. (2016)**, Rapport d'essai physico-chimique, Laboratoire de contrôle de qualité physico-chimique << SABRINNEL >>.

• **Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., & Vandenberghe, L. P. S. (2000)**. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 74(1), 81-87.

• **Pauly, M., & Keegstra, K. (2010)**. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54(4), 559-568.

• **Pimentel, D., & Patzek, T. W. (2005)**. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*, 14(1), 65-76.

• **Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., ... & Oliver, S. G. (2001)**. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology*, 19(1), 45-50.

• **Rajoka, M. I., Zia, M. A., & Malik, K. A. (2003)**. Citric acid production by using cane molasses in solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 88(2), 153-156.

• **Ramachandran, S., Fontanille, P., & Pandey, A. (2006)**. Larsson C (2016) Submerged vs. solid-state fermentation for the production of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 41(7), 1842-1847.

- **Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., & Soccol, C. R. (2007).** Oil cakes and their biotechnological applications—A review. *Bioresource Technology*, 98(10), 2000-2009.
- **Ratanapongleka, K., & Eurwilaichitr, L. (2010).** Bioethanol production from rice straw using cellulase produced by on-site *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 101(1), 356-361.
- **Ratledge, C. (2004).** Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- **Rehm, H. J., & Reed, G. (2009).** *Biotechnology: A multi-volume comprehensive treatise*. Wiley-VCH.
- **Rinaldi, R., & Schüth, F. (2009).** Design of solid catalysts for the conversion of biomass. *Energy & Environmental Science*, 2(6), 610-626.
- **Rodriguez-Couto, S., & Sanroman, M. A. (2006).** Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- **Ruiz-Herrera, J., & Sentandreu, R. (2002).** Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178(6), 477-483.
- **Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., & Faeth, S. H. (2004).** Evolution of endophyteplant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9(6), 275-280.
- **Sandhu, D. K., & Singh, A. (2007).** Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Journal of Renewable Energy*, 32(7), 1246-1251.
- **Santoyo, G., Rosales, S., & Bayardo, M. (2005).** Production of xylanase by solid-state fermentation on coffee pulp. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1231-1236.
- **Sarubbo, L. A., Converti, A., de Souza, A. N., & da Silva, S. S. (2008).** Batch and repeatedbatch fermentations of manioc wastewater with *Candida guilliermondii* for biosurfactant production. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3), 643-649.
- **Sarrouh, B. F., & de Barros, C. L. (2010).** Study of the fermentation of cashew apple juice by *Saccharomyces cerevisiae* for wine production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 803-809.
- **Schuster, E., & Dunn-Coleman, N. (2000).** Fructooligosaccharide production by . *Journal of Biotechnology*, 77(1), 41-50.
- **Sharma, S., & Mandhan, R. P. (2005).** Citric acid production from corn cob by solid-state fermentation using . *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41(3), 249-252.
- **Shrestha, P., & Khanal, S. K. (2010).** Pectin production from fruit peels and its use in food processing: A review. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 6(1), 69-80.

- **Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002).** Bioprocess engineering: Basic concepts (2nd ed.). Prentice Hall.
- **Siboukeur O., Ould El Hadj M.D. & Zargat F., (2001).** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par Cultivée sur Moût de Dattes de la Variété Ghars. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse, 93-96.
- **Singh, J., Batish, D. R., Pandher, J. K., & Kohli, R. K. (2007).** In vitro allelopathic effects of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) on four native leguminous species. *Annals of Applied Biology*, 150(1), 79-86.
- **Singh, J., Batish, D. R., Pandher, J. K., & Kohli, R. K. (2008).** Nitrogen release dynamics and growth of four native leguminous species: Implications for reforestation of sub-Himalayan degraded lands. *Environmental Management*, 41(4), 597-608.
- **Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2007).** New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 141-149.
- **Sonnet, P. E. (2005).** Global warming, climate change and their impact on the world's frost regions and rivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1832), 1491-1510.
- **Souza, T. C., & Magalhães, L. V. (2010).** Carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 1-6.
- **Spier, M. R., & Hoonde, K. M. V. (1997).** The isolation and identification of a quorum sensing signal molecule in two new strains of *Lactobacillus curvatus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(1-2), 109-112.
- **Stahl, U., & Schmoll, M. (2010).** Lessons from the genomes of industrially relevant fungi. In: *Industrial Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- **Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010).** The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13-24.
- **Steen, E. J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., ... & Keasling, J. D. (2010).** Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 463(7280), 559-562.
- **Steiger, M. G., Gasser, B., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2013).** Microbial carotenoids production: Detailing the carotenoid biosynthesis pathway from a synthetic biology perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6197-6214.

- **Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012).** Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(11), 1-7.
- **Sun, L., Zhang, S., Yang, D., Zhang, Z., Xu, G., & Sun, X. (2010).** Development of an industrial medium for recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells by DOE methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 575-584.
- **Szewczyk, E., Chiang, Y. M., & Oakley, B. R. (2008).** Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7607-7612.
- **Thakker, C., & Madamwar, D. (2005).** Solid state fermentation for production of cyclodextrin glycosyltransferase using sugarcane bagasse: Application of the Plackett-Burman experimental design. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(5), 207-212.
- **Thakur, V. V., & Rajor, A. (2013).** A review on green extraction technology for bioactives from plant materials. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(3), 88-95.
- **Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., & Current, T. (2013).** Bioconversion of lignocellulosic residues for value-added products. *Bioresource Technology*, 135, 523-524.
- **Tiso, T., & Sabelhaus, P. (2016).** Bioprocess engineering towards sustainable industrial production of chemicals and materials from renewables. *Journal of Cleaner Production*, 141, 579-583.
- **Tsakona, S., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008).** Valorization of olive mill wastewater through the production of polyhydroxyalkanoates. *Water Research*, 42(18), 4095-4104.
- **Vandamme, E. J., & Soetaert, W. (2002).** Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(2), 132-146.
- **Wang, Z. W., Zhuge, J., & Fang, H. (2001).** Priorities for microbial biotechnology in sustainable agricultural systems. *Journal of Biotechnology*, 85(2), 71-85.
- **Watanabe, M., Suzuki, T., Suzuki, H., & Yamaguchi, M. (2004).** Site-saturation mutagenesis of NAD(P)H-dependent D-xylose reductase from *Candida tenuis*. *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 103-108.
- **Williamson, G., & Larroche, C. (eds.). (2010).** *Fermentation products: An overview*. Wiley-Blackwell.
- **Yen, H. W., Yen, T. Y., Chen, C. H., & Lin, C. Y. (2010).** Carotenoid production from mutant strain of *Xanthophyllomyces dendrorhous* using complex carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 646-651.

- **Zergat F., (1996).** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **Zhang, L., Gu, T., Wu, H., Chen, J., Ni, Y., & van Zyl, W. H. (2013).** Efficient lipid production with *Trichosporon oleaginosus* through integrated utilization of duckweed biomass as co-substrate. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 25.
- **Zhou, C. H., Xia, X., Lin, C. X., & Tong, D. S. (2011).** Biomanufacture of platform chemicals from renewable resources: Incentives, prospects, and challenges. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-688.

ANNEXES

ANNEXES I

Tableau -I- composition minérale du jus de déchets de datte (**Boughnou, 1988**) in
(Zergat1996)

Constituants	Quantités : mg/100ml de jus
Phosphore	4,92
Potassium	1,07
Magnésium	0,14
Fer	0,016
Manganèse	0,010
Calcium	0,60

Tableau-II- composition minérale des jus de cinq variétés de dattes en mg/100ml
(Saddek et Faouzi, 1993)

Composés	Variétés				
	DN	SL	MD	GH	TH
Magnésium	22	17	17	14	14
Phosphore	6,92	10,94	7,93	19,59	14,94
Fer	0,22	0,177	0,20	0,32	0,24
Manganèse	0,075	0,038	0,099	0,057	0,052
Cuivre	0,148	0,064	0,134	0,074	0,039
Zinc	1,06	2,92	1,10	3,31	3,59

ANNEXES 2

Tableau -III- Caractéristiques physico-chimiques de la mélasse de cane a sucre utilisé (Ourihane ; 2016)

PARAMÈTRES ANALYTIQUES RECHERCHÉS	RÉSULTATS	MÉTHODES	UNITÉ
Matière sèche	77	Étuvage	%
Matière organique	26,73	Incinération	%
Phosphore	0,17	Spectrophotométrie	g/kg
Azote total (azote Kjeldahl)	0,07	Kjeldahl	%
Potassium	0,019	Spectro à flamme	g/100g
Calcium	14,34	SAA	g/100g
Magnésium	0,24	SAA	g/100g
Zinc	0,04	SAA	mg/100g
Sélénium	0,00	SAA	mg/100g
Plomb	0,00	SAA	mg/100g
Nikel	0,00	SAA	mg/100g
Mercure	0,00	SAA	mg/100g
Cuivre	0,00	SAA	mg/100g
Chrome	0,00	SAA	mg/100g
Cadmium	0,00	SAA	mg/100g
Arsenic	0,00	SAA	mg/100g

Tableau -IV- Paramètres physico-chimiques des dattes variétés *Ghars* et *Mech-degla* (Benahmed Djilali *et al.*, 2010)

Paramètres Physico-chimiques	Variétés	
	<i>Ghars</i>	<i>Mech-Degla</i>
pH à 22°C	6,00±0,05	5,59±0,04
Humidité (%)	16,73±0,62	14,09±0,16
Taux de cendre (%)	1,84±0,40	1,82±0,06
Acidité titrable (g d'acide citrique pour 100g de produit)	1,84±0,40	0,13±0,01
Teneur en protéines (%)	2,66	2,76
Teneur en polyphénols totaux (%) EAG ou mg pour 100g de MF)	0,75±0,041	1,8±0,038

ANNEXES 3

Procédé de comptage par la cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles : Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

- Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$
- Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

1. Remplissage de la cellule de numération

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

-Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

2. Numération

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

ANNEXES 4

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

3. Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée. Soient : -n : nombre de cellules comptées.

-V : volume de comptage.

-f : facteur de dilution.

-N : nombre de cellules par litres.

Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1 \rightarrow N = n / V$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Tableau -V- : Appareils utilisés

Appareil	Référence
Etuve	Wisd Thermo stable ON-32 230 VAC, 50-60 Hz
Bain-marie	Memmert Typ W350T, F-Nr 020014, 50Hz, Nenntemp 100°C
Agitateur magnétique	Retsch 220 V, 50 Hz, 25 W.
Balance de précision	Mettler Toledo XPR204S
pH mètre	Hanna instrument Type stylo HI98103 Checker®
Four a moufle	J.P. SELECTA, s.a. 2000994 230VAC, 50-60Hz

ANNEXES 5

Préparation du milieu PDA

Voici le protocole utilisé pour la préparation de milieu de culture pour la croissance de *L'Aspergillus Niger* :

Constituants :

- 200 g de Pomme de terre ;
- 15 g de Dextrose ou de sucre blanc de cannes ; - 20 g d'agar - agar, gélose ou de gélatine ;
- 1 litre d'eau distillée.

Préparation :

1. Dissoudre 20g d'agar-agar dans 300 ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
2. Peser 200g de pomme de terre, éplucher la pomme de terre, mélanger 200g de pomme de terre bien découpé avec 300 ml d'eau distillée,

Bouillir à 100° C pendant 20 à 25 minutes, ensuite recueillir l'eau de la pomme de terre environ 300 ml.
3. Le 300 ml de l'eau venant de la pomme de terre est mélangé à 300 ml de la solution agar - agar.
4. Ajuster ensuite le volume du mélange au moyen de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
5. Auto - claver le mélange à la température de 125° C, la pression de 1,4 bar pendant 15 minutes.
6. Sous hotte à flux laminaire, couler la solution obtenue sur des boîtes de Pétri.
7. Laisser sécher pendant 24 à 48 heures⁵⁵.

En présence de PDA de synthèse, la procédure devient simple, car il suffit de :

1. Prendre 39 gr de PDA de synthèse,
2. Le mélanger à 1 l d'eau distillée,
3. Secouer doucement jusqu'à obtenir un mélange homogène,

ANNEXES 5

4. Auto - claver sous une pression de 1,4 bar à la température de 125°C durant 15 minutes,
5. Laisser refroidir un peu sous la hotte, puis couler la solution sur les boîtes de Pétri,
6. Laisser sécher pendant 24 à 48 heures.

Résumé :

Ce mémoire examine l'utilisation de différents substrats, tels que le Moût de dattes, la Mélasse et leur combinaison, dans la fermentation pour produire de l'acide citrique en utilisant l'*Aspergillus niger*. L'objectif est de valoriser les ressources locales et de proposer une alternative économiquement avantageuse aux substrats importés pour l'industrie de l'acide citrique. Les résultats démontrent que l'utilisation de l'Amalgame, composé de Moût de dattes et de Mélasse, permet d'obtenir des rendements satisfaisants, avec des quantités respectives de 81,5 g/l, 85,5 g/l et 87,64 g/l. Cette approche présente des avantages économiques en optimisant l'utilisation des ressources locales et en réduisant les coûts de production. En conclusion, l'utilisation de l'Amalgame comme substrat offre une solution économiquement avantageuse pour la production d'acide citrique. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour maximiser les rendements à grande échelle et consolider ces résultats prometteurs.

Mots-clés : Fermentation, *Aspergillus Niger*, Substrats, Acide Citrique, Datte, Valorisation desressources locales, Mech-Degla, Mélasse.

Abstract

This thesis examines the use of different substrates, such as Date Must, Molasses, and their combination, in fermentation for citric acid production using *Aspergillus niger*. The main objective is to valorize local resources and provide an economically advantageous alternative to imported substrates in the citric acid industry. The results demonstrate that the use of the Amalgam, composed of Date Must and Molasses, yields satisfactory results, with quantities of 81.5 g/L, 85.5 g/L, and 87.64 g/L, respectively. This approach offers economic advantages by optimizing the utilization of local resources and reducing production costs. In conclusion, the use of the Amalgam as a substrate provides an economically advantageous solution for citric acid production. Further research is needed to maximize yields on a large scale and solidify these promising findings.

Keywords: Fermentation, *Aspergillus niger*, Substrates, Citric Acid, Date, Valorization of local resources, Mech-Degla, Molasses.

ملخص :

يستكشف هذا البحث استخدام مختلف الأطياب، مثل مست البلح، العصير السكري، وتركيبتهما المشتركة، في عملية التخمر لإنتاج حامض الليمون باستخدام الفطر أسبرجيلوس نيجر. الهدف الرئيسي هو تهمين الموارد المحلية وتقديم بديل ميزون اقتصاديا للاستخدامات المستوردة في صناعة حامض الليمون. تشير النتائج إلى أن استخدام التركيبة المشتركة يؤدي إلى عوائد مرضية، حيث تصل الكميات إلى 81.5 جم/ل لمست البلح، و85.5 جم/ل للعصير السكري، و87.64 جم/ل للتركيبة المشتركة. تقدم هذه الطريقة مزايا اقتصادية من خلال تحسين استخدام الموارد المحلية وتقليل تكاليف الإنتاج. في الختام، يوفر استخدام التركيبة المشتركة كونها طيبة لإنتاج حامض الليمون حال اقتصادي ا ميزونا. يلزم إجراء مزيد من البحوث لتحقيق أقصى عوائد على نطاق واسع وترسيخ هذه النتائج الواعدة.

الكلمات الرئيسية: التخمر، الفطر أسبرجيلوس نيجر، الأطياب، حامض الليمون، تمر، تهمين الموارد المحلية، مش-دقلة دبس السكر