

ESSAI BIOTECHNOLOGIQUE DE PRODUCTION D'ACIDE GLUTAMIQUE PAR UNE SOUCHE DE *Bacillus subtilis* CULTIVEES SUR MOÛT DE REBUTS DE DATTES (VARIETE DEGLET NOUR)

DJAFRI K¹ DOUMANDJI A²; BERGUOIA M¹ ; KHEMISSAT E¹ et ACOURENE S¹

1- Station de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA)

Touggourt BP 17 Ouargla.

2- Département Agroalimentaire Université de Blida (USDHB)

Résumé : L'objectif de cette étude est la production d'acide glutamique par une souche de *Bacillus subtilis* B9 isolée à partir d'échantillons d'eau de mer, en employant un moût rebuts de dattes comme milieu de fermentation. Ainsi, le pH initial, la quantité d'inoculum, les teneurs, en sucres, en acide glutamique ajouté au milieu, en azote ainsi que sa source, ont été optimisées. Les résultats obtenus montrent qu'une quantité optimale en acide glutamique soit 38.84 g/L, a été obtenue avec un taux d'inoculum de 1% et un pH initial de 7. Cette même quantité (38.84 g/L) a été obtenue également en ajoutant au milieu de fermentation une quantité de sucres de 30g/L. La supplémentation du milieu de fermentation avec de l'acide glutamique à raison de 5 g/L a permis d'augmenter la production en cet acide aminé qui finit par atteindre 55.28 g/L. D'autre part, des rendements maxima en acide glutamique soit 65.76 g/L et 2.393 g/g de sucres sont obtenus en ajoutant au milieu de fermentation 10 g/L de sulfate d'ammonium comme source d'azote.

Mots clés : *Rebuts, dattes, Optimisation, Bacillus subtilis B9, Fermentation submergée Acide glutamique*

A BIOTECHNOLOGICAL TEST FOR THE PRODUCTION OF GLUTAMIC ACID BY A STRAIN OF *BACILLUS SUBTILIS* GROWN ON MUST OF WASTE DATES (DEGLET NOUR VARIETY)

Abstract : The objective of this study is the production of glutamic acid by use of a strain of *Bacillus subtilis* B9 autochthon isolated from samples of sea water and using scrap dates variety deglet nour as fermentation medium. And different culture conditions, the initial pH, the amount of inoculum, the sugar content, the content of glutamic acid, the source and the content of nitrogen were optimized. Combination the results obtained show that the optimum amount of glutamic acid was obtained in an amount of 1 % inoculum was 38,84 g/L. Moreover, a maximum quantity of glutamic acid was 38,84 g/L was obtained with an initial pH of 7. Furthermore, an optimal amount of glutamic acid is 38.84 g/L was obtained by adding to the fermentation medium with a sugar content of 30 g/L. In addition, a maximum production of glutamic acid is 55,28g/L was obtained by adding to the fermentation medium 5 g/L of glutamic acid. On the other hand, a maximum production of glutamic acid is 65,76g/L was obtained by adding to the fermentation medium 10 g/L ammonium sulfate.

Finally, the optimum conditions for maximum production of glutamic acid are: amount of inoculum of 1.0%, an initial pH of 7, a sugar content of 30 g/L, a glutamic acid content of 5 g/L, the use of ammonium sulfate as nitrogen source in an amount of 10 g/L. An amount and a maximum yield of glutamic acid to be 65.76 g/L and 2.393 g/g of sugar, respectively were obtained with these optimal conditions.

Keywords: Scrap dates deglet nour, submerged fermentation, yield, Optimisation, parametres, strain, *Bacillus subtilis* B9, glutamic acid.

Introduction

En Algérie, la production de dattes est évaluée à 790.000 tonnes dont une partie plus ou moins importante estimée entre 95.000 et 105.000 tonnes est moins appréciée sur le marché, constituée de dattes communes et des écarts de tri de la Deglet-Nour[1]. Les dattes riches en sucres sont utilisées soit pour la

consommation humaine, soit pour la production de la levure boulangère, des glaces, le caramel, l'éthanol, le vinaigre, les enzymes, l'éthanol, les acides organiques et les acides aminés dont l'acide glutamique. La production mondiale en acide glutamique est de 1.5 millions de tonnes et la demande en cet acide est en constante

augmentation d'année en année [2]. C'est l'un des acides aminés les plus largement utilisés en industries alimentaires et pharmaceutiques. En tant qu'exhausteur de goût (E 620), il est employé comme condiment dans les pays asiatiques ainsi que comme additif entrant dans la composition de nombreux aliments. Il peut être obtenu par synthèse chimique, par catalyse enzymatique, par extraction (à partir d'une matière première riche en l'acide aminé recherché) ou encore par culture microbienne. Cette dernière méthode s'avère être la plus économique lorsqu'elle peut être employée, c'est à dire lorsqu'il existe une souche microbienne hyper productrice de l'acide aminé désiré. Il est produit principalement par fermentation submergée, fermentation liquide de surface et la fermentation à l'état solide de surface (SSF) à partir de différentes sources d'hydrates de carbone, tels que la mélasse et les dattes [38]. Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (*C. glutamicum*) sont à ce titre les micro-organismes les plus souvent utilisés pour la production de cet amino-acide. Par ailleurs, plusieurs souches microbiennes tels que, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium*

flavum, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium lilium*, *Corunebacterium callunae* sont actuellement utilisées pour sa production [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]). L'élaboration des premiers procédés de production d'acides aminés par voie microbienne, date de la fin des années 1950[8]. Depuis, de nombreuses améliorations leur ont été apportées, soit en modifiant le procédé ou le biocatalyseur utilisé, afin d'augmenter les rendements. Ainsi, de nombreuses études ont porté sur l'induction de l'excrétion de l'acide glutamique dans le milieu de culture. En effet, les souches hyper productrices d'acide glutamique appartenant au genre *Corynebacterium*, ne l'excrètent pas naturellement; un stress doit leur être appliqué pour induire le processus d'excrétion. A l'échelle expérimentale, les moyens les plus utilisés sont la déficience en biotine et l'ajout d'un ou plusieurs tensioactifs [11] [12] [13].

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude dont l'objectif l'optimisation de la production de glutamate mettant en œuvre une souche de *Bacillus subtilis* B9 isolée à partir de l'eau de mer cultivée sur milieu à base de rebuts de dattes.

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de rebuts de dattes (Deglet-Nour) issus de la palmeraie de la station INRAA de Touggourt.

2. Protocole expérimental

2.1. Préparation du milieu de culture ou moût de dattes

1.2. Matériel microbiologique

Une souche de *Bacillus subtilis* isolée en à partir de l'eau de mer de la localité de Béjaia par l'équipe de technologie alimentaire de la station INRAA Touggourt a été utilisée.

Une fois les dattes lavées, dénoyautées et broyées, on ajoute à 1 kg de rebuts de dattes, 2.5 litres d'eau. On porte au bain-

marie à 85 °C durant 45 minutes, sous agitation continue. Après refroidissement, on récupère la fraction liquide en utilisant une gaze. Une centrifugation à 5000 tours durant dix minutes nous permet de récupérer le moût (surnageant). On le stérilise à 120 °C pendant 20 min.

2.2. Préparation de l'inoculum

La souche de *Bacillus subtilis* B9 estensemencée stérilement dans un Erlenmeyer de 250ml contenant 20 ml de Milieu Mossel.

2.3. Fermentation submergée

Afin de déterminer l'influence des paramètres sur la croissance de *Bacillus subtilis* et la production de l'acide glutamique et d'obtenir un minimum d'essai, un plan d'expérience de Plackett-Burman a été utilisé, dont les facteurs étudiés sont les suivants:

Le moût obtenu à partir des rebuts de dattes de Deglet-Nour et ayant une teneur en sucres variant entre 10.0 et 60.0 g/L a été modifié par addition des éléments nutritifs suivants :

- acide glutamique à des teneurs variant entre 0 et 20.0 g/L.

- sulfate d'ammonium (Source d' azote) à des teneurs variant entre 0 et 14.0 g/L.

Le milieu de culture a été ajusté à un pH variant entre 5.0 et 9.0, stérilisé à 121 °C durant 15 min puisensemencé avec une concentration en inoculum variant entre 1.0 et 8.0 % (3×10^7 cellules/ml). La fermentation a été réalisée dans un Erlenmeyer de 250 mL, contenant 50 ml du milieu de culture et incubé à 37.0 °C durant 72 h sous agitation continue.

Méthodes d'analyses

Le pH est déterminé par pHmétrie préalablement étalonné.

La quantité de biomasse est déterminée par filtration à travers un filtre Wattman, lavage avec l'eau distillée et séchage à 50 °C jusqu'à poids constant [4].

Les sucres résiduels ont été déterminés par la méthode de Dubois [14].

Le dosage de l'acide glutamique après réaction avec la ninhydrine (jaune) virant au violet foncé (couleur pourpre) détectable par spectrophotométrie 570 nm [15]. Une courbe étalon est utilisée pour déduire la teneur de l'échantillon en acide glutamique.

Résultats et discussion

1.- Influence de la quantité en inoculum sur le rendement en acide glutamique

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH varie entre 4.62 et 5.04 (tableau I).en revanche ; le rendement en biomasse augmente au fur et à mesure que la quantité en inoculum devient plus importante puisqu'il passe de 4.42 g/L avec une quantité en inoculum de 1.0 % à

une valeur maximale de 12.0 g/L avec une quantité en inoculum de 8.0 %. Le rendement en acide glutamique par rapport à la teneur en sucre du moût diminue avec l'élévation de la quantité en inoculum du milieu pour atteindre des valeurs faibles soient 22.42 g/L et 1.063 g/g de sucres avec une quantité en inoculum de 8.0 % ((tableau 1).

Tableau 1 - Effet de la quantité en inoculum sur les différents paramètres de fermentation

Quantité en inoculum en %	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
pH	5.00	4.68	5.04	4.88	4.62
Rendement en Biomasse (g/L)	4.42	3.64	7.04	9.52	12.04
Rendement en acide glutamique (g/L)	38.84	34.38	31.66	28.16	22.42
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	1.346	1.260	1.396	1.265	1.063

Ainsi, la quantité en inoculum optimale pour une production maximale en acide glutamique est de 1.0 %. Des résultats similaires ont été obtenus par Bajaj [16] ; Nampoothiri et Pandey [17] . Par ailleurs, Tavakkoli et al. [18] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec une quantité en inoculum de 2.0 % en utilisant une souche de *C. glutamicum*. Par contre, Chen et al [19]; Jyothi et al[20] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec une quantité en

inoculum variant entre 4.0 et 5.0 % en utilisant des souches de *B. subtilis* et *B. divaricatum*. Enfin, Delaunay et al et Dubreuil supposent qu'il est nécessaire de ralentir la croissance afin de favoriser la production de l'acide glutamique. Néanmoins, avec les essais qu'ils ont menés avec *Corynebacterium glutamicum* 2262, [21] [22] ils ont obtenu un rendement élevé en acide glutamique (85.0 g/L) avec une quantité en inoculum élevée soit 10.0 %.

2.- 1.- Influence du pH initial sur le rendement en acide glutamique

Le pH est un facteur important qui influe sur la physiologie du micro-organisme en affectant la solubilité et l'absorption des nutriments, l'activité enzymatique, la morphologie de la membrane cellulaire, la formation de produits et les réactions d'oxydo-réduction [23]. Ainsi, la valeur du

pH est légèrement plus élevée soit 5.42 à pH initial de 9.0 et basse soit 4.23 à pH initial de 5.0. Par ailleurs, la quantité en biomasse augmente avec l'élévation du pH initial du milieu pour atteindre une quantité maximale de 4.42 g/L à pH=7.0. Au-delà du pH=7.0, la quantité en biomasse chute à 3.26 g/L à pH=9.0 (tableau 2).

Tableau 2.- Effet du pH sur les différents paramètres fermentation

pH initial	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
pH	4.23	4.67	5.00	5.11	5.42
Rendement en Biomasse (g/L)	3.54	3.84	4.42	3.40	3.26
Rendement en acide glutamique (g/L)	22.27	24.38	38.84	23.62	13.62
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	1.075	1.199	1.346	1.120	0.653

Quant à la quantité et au rendement en acide glutamique, ces derniers augmentent avec l'élévation du pH initial pour atteindre des valeurs maximales de 38.84 g/L et 1.346 g/g de sucres, respectivement à pH=7.0. Au-delà du pH=7.0, la quantité et le rendement en acide glutamique chutent pour atteindre des valeurs faibles de 13.62 g/L et 0.653 g/g de sucres, respectivement à pH=9 (tableau II).

Ainsi, le pH optimum pour une production maximale en acide glutamique est égale à 7.0. Des résultats similaires ont été obtenus par Andrew et Argyrios[24] ; Bajaj et Singhal[3] ; Delaunay et al. [6] ; Du et al. [25] ; Jyothi et al. [20] ; Ko et Gross[26]

3.- 2.- 1.- Influence de la teneur en sucre du moût sur le rendement en acide glutamique

Les résultats obtenus montrent que le pH du milieu de fermentation augmente avec l'élévation de la teneur en sucres du milieu pour atteindre une valeur maximale de 6.38 à une teneur en sucres de 50.0 g/L (tableau III). Le rendement en biomasse augmente avec l'élévation de la teneur en sucres du

; Liu et al. [27] ; Nadeem et al. [28] ; Nampoothiri et Pandey[29] ; Vijayalakshmi et Dhurjeti-Sarvamangala [30]; Xu et al. [32]. Par ailleurs, Yugandhar et al. [31] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique à un pH initial de 6.0 en utilisant une souche de *Brevibacterium roseum*. Par contre, Vijayalakshmi et Dhurjeti-Sarvamangala [30]; Zareian et al. [32] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique à un pH initial ≤ 5.0 en utilisant des souches d'*Arthrobacter globiformis* et de *Lactobacillus plantarum*, respectivement.

milieu pour atteindre une valeur maximale de 15.28 g/L avec une teneur de 50.0 g/L. De même, les rendements en acide glutamique augmentent avec l'élévation de la teneur en sucres du milieu pour atteindre des valeurs maximales de 36.71 à 38.84 g/L et 1.064 à 1.346 g/g de sucres avec des teneurs initiales en sucres du moût \geq à 30.0 g/L (tableau 3)

Tableau 3.- Effet de la teneur en sucre du milieu de culture sur les paramètres de fermentation

Teneur en sucres en g/L	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
pH	5.67	4.90	5.00	5.37	6.38
Rendement en Biomasse (g/L)	3.30	3.10	4.42	8.74	15.28
Rendement en acide glutamique (g/L)	9.71	22.27	38.84	37.40	36.71
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	0.971	1.207	1.346	1.199	1.064

Ainsi, la teneur optimale en sucres du milieu de culture pour une production maximale en acide glutamique est égale à 30.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Andrew et Argyrios[24] ;

Delaunay et al. [6]; Nampoothiri et Pandey[34] ; Xu et al. [31] en utilisant des souches de *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium sp.* Par ailleurs,

Nampoothiri et Pandey, [35] ; Yao et al. [36] ont obtenu des rendements élevés en acide glutamique avec une teneur en sucres variant entre 20.0 et 30.0 g/L en utilisant des souches de *Brevibacterium sp.* et *Bacillus subtilis*.

En outre, Cao et al. [36] ; Mouffok et al. [38] ; Shi et al. [39] ont obtenu une production élevée en acide glutamique avec une teneur en sucres variant entre 45.0 et 50.0 g/L en utilisant des souches de

4.- Influence de la nature de la source azotée sur les rendements en glutamate

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH, la plus élevée est obtenue avec l'urée (soit 9.22) et la plus faible avec le jaune d'oeuf (soit 3.86). Par ailleurs, parmi les sources d'azote inorganiques et

Bacillus amyloliquefaciens LL3, *Corynebacterium glutamicum* et *Bacillus subtilis* ZJU-7.

Aoki et al. [40] ; Chen et al. [41] ; Ito et al. [42] ont obtenu des rendements plus élevés en acide glutamique avec une teneur en sucres variant entre 75.0 et 120.0 g/L en utilisant des souches de *Corynebacterium glutamicum* F172-8, *Bacillus subtilis* et *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14.

organiques testées, la meilleure croissance a été obtenue avec l'urée soit 10.80 g/L suivi du jaune d'oeuf soit 9.26 g/L, le phosphate d'ammonium soit 7.22 g/L, le sulfate d'ammonium soit 6.74 g/L, le nitrate d'ammonium soit 5.42 g/L, l'extrait de levure soit 4.42 g/L et le carbonate d'ammonium soit 4.14 g/L (tableau 4).

Tableau 4.- Effet de la nature de la source azotée sur les paramètres de fermentation

Source azotée	Urée	Jaune d'oeuf	Extrait de levure	Nitrate d'ammonium	Phosphate d'ammonium	Sulfate d'ammonium	Carbonate d'ammonium
pH	9.22	3.86	5.00	5.46	5.30	4.37	7.43
Rendement en Biomasse (g/L)	10.80	9.26	4.42	5.42	7.22	6.74	4.14
Rendement en acide glutamique (g/L)	25.51	22.59	38.84	43.76	43.35	55.28	39.72
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	0.854	0.757	1.346	1.580	1.462	1.852	1.418

Quant à la quantité et rendements en acide glutamique, les valeurs maximales ont été obtenues avec le sulfate d'ammonium soient 55.28 g/L et 1.852 g/g de sucres suivi du nitrate d'ammonium et phosphate d'ammonium soient 43.35 - 43.76 g/L et 1.462 - 1.580 g/g de sucres, respectivement. Par contre, les valeurs les plus faibles ont été obtenues avec le jaune

d'œuf soient 22.59 g/L et 0.757 g/g de sucres, respectivement.

Ainsi, la meilleure source azotée pour une production maximale en acide glutamique est le sulfate d'ammonium. Des résultats similaires ont été rapportés par Abdel-Fattah et al. [43] ; Bajaj et al.[44] ; Cao et al. [37] en utilisant des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

amyloliquefaciens et *Bacillus* s, respectivement. Par ailleurs, Bajaj et al.[3] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique en utilisant les chlorures d'ammonium comme source d'azote. De même, Niaz et al. [10] ; Zareian et al. [33] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique en utilisant le nitrate d'ammonium comme source azotée. Par contre, Jaseph et Rao[45] ; Vijayalakshmi et Dhurjeti-Sarvamangala [30] ont obtenu des rendements élevés en acide glutamique avec l'urée en utilisant des souches de *Corynebacterium glutamicum* et

5.- influence de la teneur en acide glutamique ajouté au milieu sur les rendements

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH final augmente légèrement avec l'augmentation de la teneur en acide glutamique du milieu. Ainsi, elle passe de 3.28 en absence de l'acide glutamique à 4.87 avec une teneur en acide glutamique de 20.0 g/L.

Le rendement augmente avec l'élévation de la quantité en acide glutamique ajoutée au milieu de fermentation et la quantité maximale soit 13.50 g/L a été atteinte avec une teneur en acide glutamique de 20.0 g/L (tableau 5).

Le rôle de l'acide glutamique dans la synthèse de ce dernier par les souches

Arthrobacter globiformis. Il est à noter que la plupart des chercheurs ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec des sources d'azote inorganiques (Chen et al., [41] ; Du et al., [25] ; Goto et Kunioka [46]; Jung et al., [47] ; Shi et al., [39] ; Shih et al., [48]). A cet effet, Goto et Kunioka[46] suggèrent que les ions NH₄⁺ sont nécessaires pour la production de l'acide glutamique et la disponibilité de ces cations est plus élevée dans les sources d'azote inorganiques par rapport aux sources d'azote organiques. [46]

bactériennes diffère selon que l'on a à faire à des *Bacillus* indépendants ou dépendants de la présence de l'acide glutamique dans le milieu de culture. Dans le premier cas, l'acide glutamique apporté est utilisé comme matière première, et dans le second cas, il est utilisé comme régulateur des enzymes responsables de la synthèse de cet acide [49]. Les résultats obtenus montrent qu'en absence de l'acide glutamique ajouté au milieu de culture, la synthèse de cet acide dans le milieu est très faible soit 4.67 g/L. D'autre part, une quantité et un rendement élevé ont été obtenus avec une teneur en acide glutamique \geq à 5.0 g/L soient 55.28 - 59.00 g/L et 1.85. - 1.993 g/g de sucres.

Tableau 5.- Effet de la teneur en acide glutamique ajouté au milieu de culture sur les paramètres de la fermentation

Teneur en acide glutamique en g/L	0	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0
pH	3.28	4.05	4.37	4.47	4.54	4.87
Rendement en Biomasse (g/L)	1.96	2.26	6.74	7.06	8.77	13.50
Rendement en acide glutamique (g/L)	4.67	20.30	55.28	56.73	57.34	59.00
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	0.0156	0.686	1.852	1.918	1.926	1.993

Ainsi, la teneur en acide glutamique optimale pour une production maximale en acide glutamique est de 5.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Bajaj et al. [44] ; Goto et Kunioka [46] en utilisant des souches de *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 et *Bacillus subtilis* IFO3335, respectivement. Par ailleurs, Hoa et al. [50] ; Xu et al. [31] ; Yao et al. [36] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec une

teneur en acide glutamique variant entre 10.0 et 30.0 g/L en utilisant des souches de *Bacillus subtilis*. D'autre part, Jeong et al ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec une teneur en acide glutamique de 60.0 g/L en utilisant une souche de *Bacillus subtilis*. [51] Enfin, Jung et al. (2005) ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique avec une teneur en acide glutamique de 90.0 g/L en utilisant une souche de *Bacillus sp* RKY3. [47]

6.- Influence de la teneur en sulfate d'ammonium ajouté au milieu de culture sur le rendement en glutamate

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH final augmente légèrement avec l'augmentation de la teneur en sulfate d'ammonium du milieu. Ainsi, elle passe de 4.05 en absence de sulfate d'ammonium à 5.32 avec une teneur en sulfate

d'ammonium de 14.0 g/L. Quant à la quantité en biomasse, cette dernière augmente au fur et à mesure que la quantité de sulfate d'ammonium ajoutée au milieu de fermentation devient plus importante et la quantité maximale soit 6.88 g/L a été atteinte avec une teneur en sulfate d'ammonium de 14.0 g/L (tableau 6).

Tableau 6.- Effet de la teneur en sulfate d'ammonium sur les différents paramètres de la fermentation

Teneur en azote en g/L	0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0
pH	4.05	4.44	4.10	4.21	4.31	4.35	4.37	5.32
Rendement en Biomasse (g/L)	3.38	9.68	2.64	2.38	3.40	2.70	6.74	6.88
Rendement en acide glutamique (g/L)	2.00	2.00	15.66	27.67	37.2	65.76	55.28	42.54
Rendement en en acide glutamique (g/g de sucres)	0.0674	0.0711	0.569	0.976	1.361	2.393	1.852	1.553

D'autre part, la quantité et le rendement en acide glutamique augmentent avec l'élévation de la teneur en sulfate d'ammonium du milieu pour atteindre des valeurs maximales avec une teneur en azote de 10.0 g/L soient 65.76 g/L et 2.393 g/g de sucres. Au-delà de cette teneur la quantité et le rendement en acide glutamique diminuent pour atteindre des valeurs de 42.54 g/L et 1.553 g/g de sucres à 14.0 g/L.

Ainsi, la teneur en azote optimale pour une production maximale en acide glutamique est de 10.0 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus par Bajaj et al. [44] ; Jaseph et Rao[45] ; Jyothi et al. [20] ; Zareian et al. [33] en utilisant des souches de *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus glutamicus*, *Brevibacterium divaricatum*, *Lactobacillus plantarum*. Par ailleurs, Cao et al. [37] ;

Vijayalakshmi et Dhurjeti-Sarvamangala [2] ont obtenu de meilleurs rendements en acide glutamique à une teneur en azote de 2.0 g/L en utilisant des souches de *Bacillus amyloliquefaciens* . D'autre part, Ito et al. [42] ont obtenu des rendements élevés en acide glutamique avec une teneur en chlorures d'ammonium de 18.0 g/L en utilisant une souche de *Bacillus subtilis*. En outre, Abdel-Fattah et al. [41] ont obtenu des rendements élevés en acide glutamique avec une teneur en sulfate d'ammonium de 20.0 g/L en utilisant une souche de *Bacillus licheniformis*. Enfin, Mouffok et al[38]. ; Shi et al. [39] ont obtenu une production en acide glutamique élevée avec une teneur en azote variant entre 30.0 et 60.0 g/L en utilisant des souches de *Corynebacterium glutamicum* et *Bacillus subtilis*, respectivement.

Conclusion

La production de l'acide glutamique par la souche de *Bacillus subtilis* B9 isolée localement à partir de l'eau de mer cultivée sur milieu à base de rebuts de dattes en fermentation submergée est prometteuse. La source carbonée considérée comme un sous produit du palmier dattier et composante essentielle apporte une valeur ajoutée appréciable à ce

processus biotechnologique. En plus, cette matière première peu couteuse est disponible localement et permet de donner des rendements en acide glutamique satisfaisant. Cette étude est de nature à suggérer la possibilité de concevoir différents schémas de production de l'acide glutamique qui peuvent constituer un atout industriel pour les régions sahariennes

algériennes. Par ailleurs, l'optimisation de la production en acide glutamique par fixation des paramètres physiques de la fermentation et ajout d'éléments nutritifs au milieu de culture a été réalisée. Ainsi, les conditions optimales pour une production maximale en acide glutamique peuvent être résumés comme suit : quantité en inoculum de 1.0 %, pH initial de 7.0, teneur en en

sucres de 30.0 g/L, teneur en acide glutamique ajouté de 5.0 g/L, l'utilisation du sulfate d'ammonium comme source azotée à raison de 10.0 g/L. Ces conditions de culture optimales permettent de donner des rendements maxima en acide glutamique, soient, 65.76 g/L et 2.393 g/g de sucres,

Références bibliographiques

- [1].- Anonyme (2013). Palmier dattier, superficies et productions. In M.A, Statistiques agricoles, superficies et productions. M.A/D.S.A.S.I, Série B, 50 p
- [2].- Vijayalakshmi, P. and Sarvamangala, D. (2011). Fermentative production of l-glutamic acid. *Inter. J. Adv. Biotechnol. Resea.*, 2(3), pp. 376-381.
- [3].- Bajaj, I.B. and Singhal, R.S. (2009). Sequential optimization approach for enhanced production of Poly(γ -Glutamic acid) from *B. subtilis*. *Food Technol. Biotechnol.*, 47(3), pp. 313-322
- [4].- Cheng, C., Asada, Y., Aida, T. (1989). Production of poly glutamic acid by *Bacillus subtilis*A35 under denitrifying conditions. *Agr. Biol Chem.*, 53, pp. 2369-2375
- [5].- Changlin, L., Huanlan, Z., Chuan, J., Ting, Y. and Cheng, Z. (2009). Production of γ -poly glutamic acid via liquid fermentation by *Bacillus subtilis* natto. *Modetrn Food Sci. Technol*, 25(8), pp.935-939.
- [6].- Delaunay, S., Gourdonb, P., Lapujadea, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.M., Lindley, N.D., and Goerg, J.L. (1999). An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzym. Microb. Technol.*, 25, pp. 762-768.
- [7].- Karube, I., Kawarai, M., Matsuoka, H. and Suzuki, S. (1985). Production of L-glutamate by immobilized protoplast. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 21, pp. 270-277.
- [8].- Kinoshita, S. (1985). Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA, editors. *Biology of Industrial Microorganisms*. London: Benjamin/Cummings ed., pp. 115-42.
- [9].- Moosavi-Nasab, M. Izadi, M. and Hosseinpour, S. (2010). Glutamic Acid Production from Potato by *Brevibacterium linens*. *World Academy Sci. Engin. Technol.*, 68, pp. 1245-1247.
- [10].- Niaz, B., Nadeem, S., Muhammad-Muzammil, H., Khan, J.A. and Zahoor, T. (2009). Optimization of Fermentation Conditions for Enhanced Glutamic Acid Production by a Strain of *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14. *Pakistan J. Zool.*, 41(4), pp. 261-267.
- [11].- Bona, R. and Moser, A., (1995). Modeling of the L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Bioprocess Eng.*, 17, pp. 139-42
- [12].- Ganguly, Y S., and Banik, A.K. (2011). Optimization of physical conditions for the production of L-glutamic acid by a mutant *Micrococcus glutamicus*

- AB100. Intern. J. Pharma Bio Sci. 2(2), pp. 295-299.
- [13].- Hoischen, C. and Kraimer, R. (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. Arch Microb., 151, pp. 342-7
- [14].-Audigie C.I., Figarella J., Zonszani F. (1984). Manipulation of biochemical analyzes.Ed. Doin editors, Paris, France, 211p.
- [15].- Spies, J.R. (1957). Colorimetric procedure for amino acids. Methods Enzym., 3, pp. 468-471
- [16].-Bajaj, I.B. and Singhal, R.S. (2010). Effect of aeration and agitation on synthesis of poly (γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Biotechnol. Biopr. Engin., 15, pp. 635-640.
- [17].- Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. (1998). Immobilization of *Brevibacterium* cells for the production of l-glutamic acid. Biores. Technol., 63, pp. 101-106.
- [18].- Tavakkoli, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Azizi, M.H. (2012). Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology. Food Biopr. Technol., 5, pp. 92-99.
- [19].- Chen, X., Chen, S., Sun, M. and Yu, Z. (2005). High yield of poly-c-glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. Biores. Technol.; 96, pp. 1872-1879.
- [20].- Jyothi, A.N., Saskiran, K., Nambisan, B., and Balagopalan, C. (2005). Optimisation of glutamic acid production from casavva starch factory residues using *Brevibacterium divaricatum*. Process Biochem, 40, pp. 3576-3579.
- [21].-Delaunay, S., Lapujade, P., Leyval, D., Germain, P., Goergen, J.L., Engasser, J.M. (2001). Problématique de l'amélioration de la production d'acide amine par voie microbienne: Improvement in the amino-acid microbial production. Bul. Acad. Lorraine Sci., 40(4), pp. 1-7.
- [22].-Dubreuil, P., (1985). Cinétiques et modélisation de la fermentation glutamique. Thèse INPL-Nancy, 208 p.
- [23].- Cromwick, A.M., Birrer, G.A. and Gross, R.A. (1996). Effects of pH and aeration on g-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. Biotechnol. Bioeng., 50, pp. 222-227.
- [24].- Andrew, R. and Argyrios, M. (2003). Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. Biotchnol. Let., 25(6), pp. 465-468.c
- [25].- Du, G., Yang, G., Qu, Y., Chen, J. and Lun, S., (2005). Effects of glycerol on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. Process Biochem. 40, pp. 2143-2147.
- [26].- Ko, Y.K. and R.A., Gross (1998). Effects of glucose and glycerol on poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. Biotechnol. Bioeng. 57, pp. 430-437.
- [27].- Liu, Q., Shao-ping O., Jonghyok, K., Guo-Qiang, C. (2007). The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol., 132, pp. 273-279.
- [28].-Nadeem, S., Niaz, B., Muzammil, H.M., Rana, S.M., Rajoka, M.I. and Shakoori, AR. (2011). Optimising carbon and nitrogen sources for L-glutamic acid production by *Brevibacterium* strain NIAB SS-67. Pakistan J. Zool., 43(4), pp.285-290.
- [29].-Nampoothiri, M.K and Pandey, A. (1999). Fermentation and recovery of L-

glutamic acid from cassava starch hydrolysate by ion-exchange resin column.

Rev. Microbiol., 30(3), pp. 10-21.

[30].- Vijayalakshmi, P. and Sarvamangala, D.R. (2011a). Production of L-Glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300 and *Arthrobacter globiformis* MTCC 4299 using fruits of *Muntingia calabura* Linn. Intern. Resea. J. Microbiol., 2(4) pp. 116-121

[31].- Xu, H., Jiang, M., Li, H. and Ouyang, P. (2005). Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. Proc. Biochem., 40(2), pp. 519-523.

[32] .- Yugandhar, N.M., Raju, C.A.I., Rao, P.J., Jaya-Raju, K. and Sri Rami-Reddy, D. (2007). Production of glutamic acid using *Brevibacterium roseum* with free and immobilized cells. Res. J. Microb., 2, pp. 584-589.

[33] .- Zareian, M., Ebrahimpour, A., Abu Bakar, F., Sabo-Mohamed, A.K., Forghani, B., Mohd-Safuan B.A.K. and Saari, N. (2012). A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from malaysian fermented foods. Inter. J. Mol. Sci. 2012, 13, pp. 5482-5497.

[34] .- Nampoothiri, M.K and Pandey, A. (2005). Effect of different carbon sources on growth and glutamic acid fermentation by *Brevibacterium sp.* J. Basic Microb., 35(4), pp. 249-254.

[35].- Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. (1995). Glutamic acid fermentation using *Brevibacterium sp.* DSM 20411. J. Food Sci. Technol., 32, pp. 406-408.

[36] .- Yao, J., Xu, H., Shi, N., Cao, X., Feng, X., Li, S. and Ouyang, P. (2010). Analysis of carbon metabolism and improvement of γ -Polyglutamic acid production from *Bacillus subtilis* NX-2. Appl. Biochem. Biotechnol., 160, pp. 2332-2341.

[37].- Cao, M., Geng, W., Liu, L., Song, C., Xie, H., Guo, W., Jin, Y. and Wang, S. (2011) Glutamic acid independent production of poly-glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of pgsBCA genes. Biores. Technol., 102, pp. 4251-4257

[38].- Mouffok, A. Bedaida, I.K., Nancib, A., Nancib, N., Goergen, J.L. and Boudrant, J. (2012). Sequential optimization approach for enhanced production of glutamic acid from *Corynebacterium glutamicum* 2262 using date juice. Biotechnol. Biop. Engin., 17(4), pp. 795-803

[39].- Shi, F., Xu, Z. and Peilin, C. (2006). Efficient production of poly-glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7. Appl. Biochem. Biotchnol., 133, pp. 271-281.

[40].- Aoki, R., Wada, M., Takesi, N., Tanaka, K. and Yokota, A. (2005). Enhanced glutamic acid production by a H⁺ ATPase defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem, 69(8), pp. 1466-1472.

[41].- Chen, J., Shi, F., Zhang, B. and Zhu, F. (2010). Effects of Cultivation Conditions on the Production of γ -PGA with *Bacillus subtilis* ZJU-7. Appl. Biochem. Biotechnol 160, pp. 370-377

[42].- Ito, Y., Tanaka, T., Ohmacha, T. and Asada, Y. (1996). Glutamic acid independent production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. Biosci., Biotechnol. Biochem. 60(8), pp. 1239-1242.

[43].- Abdel-Fattah, Y.R., Soliman N.A. and Berekaa, M. (2007). Application of Box-Benhken design for optimisation of poly γ -glutamic acid by *Bacillus licheniformis* SAB-26. Res. J. Microbial., 2(9), pp. 664-670.

- [44].- Bajaj, I.B., Lele, S.S. and Singhal, R.S. (2009). A statistical approach to optimization of fermentative production of poly(c-glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biores. Technol.*, 100, pp. 826-832.
- [45].- Jaseph, R. and Rao, T.N.R. (1973). Glutamic acid fermentation employing starchy tubers as raw material. *J. Food Sci. Technol.*, 10, pp.160-164
- [46] .- Goto, A. Kunioka, M. (1992). Biosynthesis and hydrolysis of poly-(g-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, pp. 1031-1035.
- [47].- Jung, D.Y., Jung, S., Yun, J.S., Kim, J.N., Wee, Y.J., Jang, H.G. and Ryu, H.W. (2005). Influence of cultural medium component on the production of poly(y-glutamic acid) by *Bacillus* sp. RKY3. *Biotechnol. Biopr. Engin.*, 10, pp. 289-295.
- [48].- Shih, I.L., Van, Y.T. and Chang, Y.N . (2002). Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(g-glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enz. Microb. Technol.*, 31, pp. 213-220.
- [49].- Kunioka, M. (1995). Biosynthesis of poly (-glutamic acid) from l-glutamine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, pp. 501-6
- [50].- Hoa, G.H., Ho, T.I., Hsie, K.H., Su, Y.C., Lin, P.Y., Yang, J., Yang, K.H. and Yang, S.C. (2006). γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *J. Chinese Chem. Soci.*, 53, pp. 1363-1384.
- [51].- Jeong, J.H., Kim, J.N., Wee, Y.J. and Ryu, H.W. (2010). The statistically optimized production of poly(c-glutamic acid) by batch fermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3. *Biores. Technol.*, 101, pp. 4533-4539