

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Science de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par : BRIKI Khaoula

ZITOUNI Nabila

Thème

Production d'acide citrique par *Aspergillus niger* cultivée sur milieu à base de dattes "variété Ghars"

Soutenu publiquement

Le : 03/07/2013

Devant le jury :

M ^{me} KHALEF Sakina.	M. A. (A).	Président	U.K.M. Ouargla
M ^{me} SIBOUKEUR Oum el khir.	M.C. (A).	Encadreur	U.K.M. Ouargla
M ^{elle} MIMOUNI Yamina.	M. A. (A).	Co- promoteur	U.K.M. Ouargla
M ^r LOUNI Soufiane.	M.A. (B).	Examineur	U.K.M. Ouargla

Année Universitaire : 2012 /2013

DEDICACES

A mes très chers parents Omelkheir et Abd elkader , A mes frères et sœurs Zakia , Abdelmalek , Abdellah, Nabil et Wafa.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter en reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie et pour leurs soutien morale

Aux les petits-enfants de la famille :Nouha, Aya

A mes oncles, tantes, cousins et cousines

A mes grands-mères Mabrouka et Messouda

A la proche de la famille Soumia

A la famille Zitouni et la famille Hamdat

A tous mes chères amies Nadia, Dalila ,Amel, Fatiha, Sara,Nawal,Asma, Soumia, Batoul, Sana,Mounira,Hanan , Iman, pour leurs soutiens et leurs bénédictions.

A mon intime et binôme BRIKI KHAOULA

A tout mes collègues de section microbiologie (promotion 2013)

NABILA



Remerciement

« Il est bon qu'une personne aime son travail et le plus beau qu'elle le respecte »

Avant tout

Nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir données la force et la patience pour achever ce travail et nos parents pour tous ce qu'ils ont fait pour nous.

Nous tenons à remercier respectivement tous ceux qui nous ont aidées, soutenues ; et encouragées pour la réalisation de ce modeste travail en particulier :

- Mme Siboukeur Oum El kheir Maître de conférence A à l'Université de Ouargla pour les informations et les conseils.

-Melle MIMOUNI Yamina.

- Mme KHALLEF Sakina Maître Assistant A à l'Université de Ouargla pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

- Mr LOUNI Soufiane Maître Assistant B à l'Université de Ouargla pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

-Melle Kherfi et toute l'équipe de laboratoire de l'ITAS.

-Toute personne ayant aidé de près ou de loin ou contribué à l'élaboration de ce mémoire.

ZITOUNI Nabila/BRIKI Khaoula



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	10
Première partie: Etude Bibliographique	
CHAPITRE I: La datte	
I- La datte.....	14
I-1 Généralités sur les palmiers dattiers.....	14
I-2 Classification botanique.....	14
I-3 Ecologie.....	14
I-4 Définition de la datte	15
I-5 Composition biochimique de la datte.....	16
I-5-1 Composition biochimique de la partie comestible « pulpe ».....	16
I-5-1-1 Eau.....	16
I-5-1-2 Glucides.....	16
I-5-1-3 Acides aminés.....	16
I-5-1-4 Acides gras.....	17
I-5-1-5 Eléments minéraux.....	17
I-5-1-6 Vitamines.....	17
I-5-1-7 Fibres.....	17
I-5-1-8 Composés phénoliques.....	17
I-6 Valorisation des dattes.....	18
CHAPITRE II : Métabolisme de l'acide citrique	
II Métabolisme de l'acide citrique.....	20
II-1 Généralités.....	20
II-2 Métabolisme de l'acide citrique cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs).....	20
II-3 Applications de l'acide citrique.....	22
II-3-1 Industrie alimentaire.....	22
II-3-2 Industrie pharmaceutique.....	23
CHAPITRE III: Microorganisme producteur de citrate : <i>Aspergillus niger</i>	
III Microorganismes producteurs de citrate : <i>Aspergillus niger</i>	25
III-1 Le genre <i>Aspergillus</i>	25
III-1-1 Caractères généraux.....	25
III-1-2 Croissance et cycle fongique.....	26
III-1-3 Caractères cultureux.....	26
III-2 L'espèce <i>Aspergillus niger</i>	27
III-2-1 Ecologie.....	28
III-2-2 Caractères cultureux / Aspect macroscopique.....	28
III-2-3 Morphologie microscopique.....	29
Deuxième Partie: Etude Expérimentale	
Chapitre I : Matériel et méthodes	
I Matériel.....	32
I-1 Matériel végétal.....	32
I-2 Matériel biologique.....	32
II Méthodes.....	32
II-1 Prélèvement et purification de la souche.....	32
II-1-1 Prélèvement.....	32
II-1-2 Repiquage et purification.....	33

II-1-3 Identification.....	34
II-1-3-1 Critères d'identification macroscopique.....	34
II-1-3-2 Critères d'identification microscopique	34
II-2 Préparation du moût.....	35
II-2-1 Caractéristiques du moût de fermentation.....	35
II-3 Conduite de la culture de la moisissure.....	36
II-3-1 Préparation de l'inoculum.....	36
II-3-2 Inoculation de milieu de fermentation.....	36
II-3-3 La fermentation.....	36
II-3-4 Suivi de la fermentation.....	37
II-3-4-1 Prélèvements.....	37
II-3-4-2 Etude de la cinétique de fermentation.....	37
II-4 Analyses physico- chimiques et biochimiques.....	38
II-4-1 Analyse physico-chimiques.....	38
II-4-1-1 pH.....	38
II-4-1-2 Conductivité électrique.....	39
II-4-2 Analyses biochimiques.....	39
II-4-2-1 Taux de matière sèche.....	39
II-4-2-2 Taux de cendres totales.....	39
II-4-2-3 Dosage des sucres.....	40
II-4-2-4 Dosage de l'acide citrique.....	40

Chapitre II : Résultats et Discussion

I Identification.....	42
I-1 Résultats.....	42
I-1-1 Identification macroscopique.....	42
I-1-2 Identification microscopique.....	43
II Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques.....	44
II-1 Résultats.....	44
II-1-1 Analyses physico-chimiques.....	44
II-1-2 Analyses biochimiques.....	45
II-2 Discussion.....	47
III Cinétique de fermentation.....	51
III-1 Résultats.....	51
III-1-1 Croissance mycélienne.....	51
III-1-1-1 Evolution de la croissance.....	51
III-1-2 Evolution du pH.....	52
III-1-3 Evolution des sucres.....	53
III-1-4 Evolution de la production d'acide citrique.....	54
III-2 Discussion.....	56
CONCLUSION	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65

ANNEXES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

Introduction

La production dattière algérienne est estimée à 261 000 tonnes/an pour une campagne normale, avec 53% de variétés communes. Parmi ces dernières, 120.000 tonnes seulement sont commercialisables et plus de 14.000 tonnes sont de très faible qualité marchande (**OULD EL HADJ *et al.*, 2012**).

La richesse de ces dattes en sucres offre à celles-ci la possibilité d'être valorisées en divers produits (sirop, vinaigre, alcool, levure...) (**ACOURENE et TAMA, 2001**).

Par ailleurs, les fruits du palmier dattier peuvent constituer un substrat de choix pour la production de substances à forte valeur ajoutée ; l'acide citrique en l'occurrence, en mettant en œuvre la culture d'une moisissure *Aspergillus niger* réputée meilleure productrice d'acide citrique (**SIBOUKEUR *et al.*, 2001**).

Aspergillus niger représente le microorganisme de choix à l'échelle industrielle pour sa facilité de culture, sa stabilité génétique, ses rendements élevés, sa capacité d'utilisation de matériel à bon marché et l'absence de métabolites indésirables (**ZERGAT, 1996**).

L'acide citrique intermédiaire le plus important du tous le cycle de **KREBS** est un produit présent dans de nombreux fruits et légumes. Il a été isolé en 1784 par **SCHEEL** à partir du jus de citron (**ZERGAT, 1996**). En 1880, **GRIMAUX** et **ADAM**, le synthétisent à partir du glycérol et déterminent sa structure chimique (C₆ H₈ O₇) (**BLANCH *et al.*, 1989**).

L'acide citrique est un produit de première importance en industrie alimentaire: confiserie, conserverie, confiture, et dans la fabrication des boissons comme agent acidulant. Il trouve d'autres applications dans d'autres secteurs tels que l'industrie pharmaceutique, le tannage, la teinture, la fabrication d'encre... (**CAMPBELL-PLAT *et al.*, 1989**). Il est à signaler que ce produit continu jusqu'à l'heure actuelle à être importé de l'étranger, et il n'existe aucune industrie dans ce domaine en Algérie d'où l'intérêt accordé à cet acide organique.

Aujourd'hui, 99% de la consommation mondiale en cet acide est produite biotechnologiquement. L'acide citrique est généralement produit sur substrat mélasse étant donné que la source de carbone de choix pour l'espèce *Aspergillus niger*, est le saccharose (**ZERGAT, 1996**).

Une étude portant sur l'utilisation d'un substrat autre que la mélasse a été menée en 1996 à l'ex ITAS de Ouargla. Le substrat utilisé avait été un moût de dattes (**ZARGAT, 1996 ; SIBOUKEUR *et al.*, 2001**).

Le présent travail vise à étudier la possibilité de l'utilisation des dattes à sucres réducteurs au lieu des dattes à saccharose comme substitut de la mélasse dans la fabrication du citrate.

Il s'agit d'utiliser le moût de dattes "Ghars" comme substrat pour la culture d'*Aspergillus niger* et donc pour la production d'acide citrique.

Le principal objectif de cette étude vise à une contribution à la production d'un produit à forte valeur ajoutée à partir d'un produit local « les dattes ».

Le procédé de production d'acide citrique est une fermentation aérée avec agitation (en submergé) en milieu acide.

Cette étude comporte quatre parties essentielles;

- I. Isolement, purification de la souche à partir des oranges (pourriture verte) ;
- II. Préparation d'un moût à 14g/l de sucres à partir des dattes mures (variété Ghars) ;
- III. Inoculation du milieu de fermentation et fermentation ;
- IV. Calculs des bilans de production.

Liste des photographies

N°	Titre	Page
1	Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	42
2	Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	43

Liste des figures

N°	Titre des figures	Pages
1	Datte et noyau de palmier dattier	15
2	Cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs)	22
3	Schéma du champignon genre <i>Aspergillus</i>	27
4	Procédure expérimentale	33
5	Courbe d'étalon utilisée pour le dosage d'acide citrique	40
6	Evolution du poids sec de mycélium au cours de la fermentation	52
7	Evolution des vitesses de la croissance mycélienne au cours de la fermentation	52
8	Evolution du pH du moût au cours de la fermentation	53
9	Evolution de l'assimilation des sucres au cours de la fermentation	54
10	Evolution des vitesses de consommation des sucres au cours de la fermentation.	54
11	Evolution de production de l'acide citrique au cours de la fermentation	55
12	Evolution des vitesses de production d'acide citrique au cours de la fermentation	55
13	Evolution du poids sec du mycélium, de la concentration en sucre résiduels, de la concentration en acide citrique et du pH dans le milieu non enrichi (MNE).	59
14	Evolution des vitesses de croissance mycélienne, de consommation des sucres et de production d'acide citrique dans le milieu non enrichi (MNE).	60
15	Evolution du poids sec du mycélium, de la concentration en sucre résiduels, de la concentration en acide citrique et du pH dans le milieu enrichi (ME).	60
16	Evolution des vitesses de croissance mycélienne, de consommation des sucres et de production d'acide citrique dans le milieu enrichi (ME).	61

Liste des Abréviations

Codes	Significations
DN	Deglet-Nour
SL	Sba'La'rus
MD	Mech Déгла
GH	Gasb Hlu
TH	Thuri
MNE	Milieu non enrichi
ME	Milieu Enrichi
C.E	Conductivité Electrique
PDA	Potatoes Dextrose agar
Aw	Activité de l'eau.
P.F	Poids frais
ms	Millisiemens
FDA	Food and Drug Administration

Références bibliographiques

1. **ACOURENE S., 1992.**Caractéristiques Physico-Chimiques des Principales Variétés de Dattes et Valorisation de la Datte in Symposium de la Datte. Recueil des communications, Biskra, p 4.
2. **ACOURENE S., AMMOUCHE A., DJAAFRI K., 2008.** Valorisation des Rebutts de Dattes par la Production de la Levure Boulangere, de l'alcool et du Vinaigre. *Sciences & Technologie C* **28**, pp.38 -45.
3. **AGROVIN., 2012.** ACIDE CITRIQUE Acidifiant et antioxydant de moûts et de vins. Rev. AGROVIN **10**, 1.
4. **AMELLAL H., 2008.**Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes: formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse de Doctorat, Université M'hamed Bougara, Boumerdes.
5. **BENAHMED DILALI A., AMRANI M., AZOUAOU M., DAMIR A. & BENAMARA S., 2010.** Possibilité de Fabrication d'un Jus Naturel à Base d'un Sirop de Dattes Communes et d'un Extrait de Spiruline et Jus de Citron Naturel. *Université de Boumerdès*. Algérie.
6. **BENCHABANE A., KECHIDA F., BELALOUI D., AOUDJIT R., OULD EL HADJ M. D., 2012.** Valorisation de la Datte par la Formulation d'une Boisson a Base de Lait et de Jus d'Orange. *Algerian journal of arid environment* **1(2)**, 25-35.
7. **BENYAHIA Z., 1992.** Amélioration du Rendement de Production de l'Acide Citrique par *Aspergillus niger*. Mémoire Ingénieur:U.S.T.H.B, Alger.
8. **BESSAH R., TOUZI A., 2001.** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 37-40.
9. **BLANCH W.H., DREW S., WONG D., 1989.**Comprehensive Biotechnology **03**, pp.665-680.
10. **BOTTON B., BRETON A., FEVER M., GAUTHIER S., GUY PH., LARPENT G.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2^{ième} Ed, MASSON, Paris.P183.

11. **BOUKHIAR A., 2009.** Analyse du processus traditionnel d'obtention du vinaigre de dattes tel qu'appliqué au sud algérien: essai d'optimisation. Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara, Boumerdès.
12. **CAMPBELL-PLATT G., COOK P.E., 1989.** Fungi in the Production of Foods and Ingredients. Inj. Appl. Bact. Symp. Supplement, pp. 117-131.
13. **CRISTINA T., 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Université de Bucarest, France.
14. **DELARRAS C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de contrôle sanitaire. Médicale international et TEC et DOC, Paris. PP. 112-140.
15. **DJIDDA A., ACOURENE S., DJAFRI K., AMOURACHE L., 2012.** Valorisation Rebut de Dattes par la Production de L'acide Citrique, -Amylase et Invertase. *Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie*. 23^{ième} Forum.
16. **DIGUTA C. F., 2010.** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, France.
17. **ECKERT R., RANDALL D., BURGGREN W., FRENCH K., 1999.** Physiologie animale mécanismes et adaptations, DE BOEK UNIVERSITE, Paris(Bruxelles) , pp.87-88.
18. **GACEM M. A., 2011.** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de Citrullus colocynthis sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire de Magister en biologie, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
19. **GANA M. L., & HAMI F., 1992.** Production de l'acide Citrique par l'*Aspergillus niger* sur Milieu à base de Mélasse de Canne à Sucre. Mémoire Ingénieur: U.S.T.H.B, Alger.
20. **GHACHEM F., 1992.** Analyse des Caractéristiques Morphologique et Biochimiques des Fruits de quinze Cultivars les plus connus du Palmier Dattier (*Phoenix Dactylifira*) de la Vallée Oued Ghir. Mémoire d'Ingénieur Agronomie: INFS/AS, Ouargla.
21. **HAMDI M., 1993.** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile thèse de doctorat, Université de Provence, Marseille.
22. **JERNEJC K., VANDRAMIN M., CIMERMAN A., 1989.** *Aspergillus niger* Lipid Composition of in Citric Acid Accumulating and Nonaccumulating Condition. In *Enzyme. Microbial. Technol.* Vol.11, pp. 452-456.

23. **KEDRI S., 1994.** Etude de Quelques Aspects de la Qualité des Jus Issu de Trois Variétés de Dattes Molles "Ghars" Tanslite et Litima dans la Région de Ouargla. Mémoire d'Ingénieur Agronomie saharienne: INFS/AS, Ouargla.
24. **KHANNANE N., LAHRACH A.H., 1995.** Contribution a l'étude de la Qualité Hygiénique et Organoleptique des Jus des Dattes (Ghars" Tanslite Et Litima). Mémoire d'Ingénieur Agronomie Saharienne: INFS/AS, Ouargla.
25. **LEDMYA H. & ERCHICH, F., 1992.** Essai de Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Saccharose. Mémoire Ingénieur en génie biologique:U.S.T.H.B, Alger.
26. **MEYER A., DEIANA J., BERNARD A., 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^e Ed, DOIN éditeurs, France, pp204-205.
27. **MORETTI E., FELIPPONE F., 2000.** Acide citrique par fermentation. *Pressindustria SpA - Biassono (MI) Italie.*
28. **OULD EL HADJ M. D., CHEICK M., HAMDI W., SAYAH Z. & BOUAZIZ, S., 2012.** Etude comparative de la production d'éthanol brut à partir de trois variétés de dattes communes (Degla Beida, Tacherwit Et Hamraya) réparties dans les différentes classes de dattes (molle, demi-molle et sèche) de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est algérien). *Algerian journal of arid environment* **2(2)**, 78-87.
29. **QUATRESOUS N., 2011.** Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges.
30. **SADDEK B., FAOUZI M., 1991.** Essai de Production d'acide Citrique Cultivé sur Jus de Dattes. Mémoire d'ingénieur en génie biologique:U.S.T.H.B, Alger.
31. **SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J C., VAN DIJCK P. W. M., 2002.** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**,426–435.
32. **SIBOUKEUR O., OULD EL HADJ M.D. & ZARGAT F., 2001.** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes de la Variété Ghars. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 93-96.
33. **TELLI A., 2010.** Optimisation des Conditions d'extraction des Polyphenols de Dattes Lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) Variete Ghars. *Annales des Sciences et Technologie(2)* 2.pp107-114.
34. **VAUBOURDOLLE M., 2007.** Infectiologie. 3^e Ed, LE MONITEUR INTERNAT, Paris. p 436.

35. **ZERGAT F., 1996.** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla.

I. La datte

I.1. Généralités sur le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*)

Le palmier dattier: *Phoenix dactylifera L.*, provient du mot "phoenix" qui signifie dattier chez les phéniciens, et dactylifera dérive du terme grec "dactulos" signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit .

Le dattier est un arbre probablement originaire du gofle persique, cultivé dans les régions chaudes et humides. C'est une espèce dioïque, monocotylédone, arborescente, appartenant à une grande famille d'arbre à palmier et produit des dattes (AMELLAL, 2008).

I.2. Classification botanique

La place du palmier dattier dans le règne végétal est rappelée ci-dessous

- Groupe: spadiciflore
- Ordre: palmale
- Famille: palmacées
- Sous famille: coryphoidées
- Tribu: phœnicées
- Genre: phœnix
- Espèce: *Phœnix dactylifera L.*

Le genre phœnix comporte au moins douze espèces. La plus connue est *Phœnix dactylifera L.*, dont les fruits "dattes" font l'objet d'un commerce international important (AMELLAL, 2008).

I.3. Ecologie

Le palmier dattier est cultivé comme arbre fruitier dans les régions chaudes arides et semi-arides. Cet arbre peut s'adapter à de nombreuses conditions grâce à sa grande variabilité.

Le palmier dattier est une espèce thermophile; il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols, il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation (AMELLAL, 2008).

I.4. Définition de la datte

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré d'une chair.

La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée:

- d'un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau;
- d'un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue;
- d'un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (**Munier, 1973**).

Les dimensions de la datte sont très variable, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes, selon les variétés, leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouge, brune plus ou moins foncées (**AMELLAL,2008**).

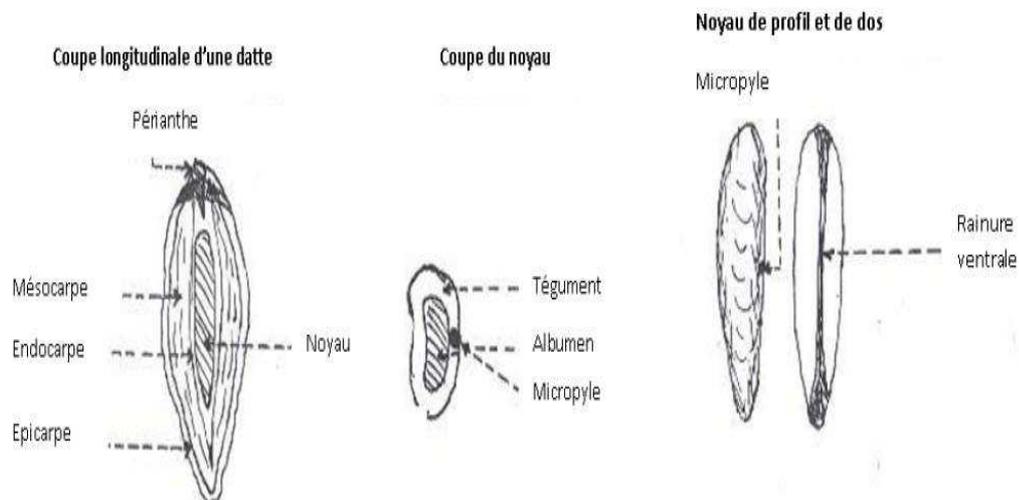


Figure 1: Datte et noyau de palmier dattier (BOUKHIAR, 2009).

La consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories:

1. dattes sèches, de consistance dure: degla-beida ,mech degla (Algérie), Amsersi (Mauritanie).
2. dattes demi-molles: deglet Nour (Algérie, Tunisie), Mehjoul (Maroc), Tinterguel (Mauritanie).
3. dattes molles: Ghars(Algérie), Ahmar (Mauritanie) (**Munier, 1973**).

I.5. Composition biochimique de la datte

I.5.1. Composition biochimique de la partie comestible "pulpe"

I.5.1.1. Eau

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30% du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19% (**AMELLAL, 2008**).

I.5.1.2. Glucides

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement la présence de trois types de sucres: le saccharose, le glucose ,le fructose. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que: le galactose, le xylose et le sorbitol (**BOUKHIAR, 2009**).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 60 et 80% du poids de la pulpe fraîche (**AMELLAL, 2008**).

I.5.1.3. Acides aminés

Les dattes sont caractérisées par une faible teneur en protéines. Elle est généralement moins de 3% du poids sec (**BOUKHIAR, 2009**). Malgré cette faible teneur, les protéines des dattes sont équilibrées qualitativement (**AMELLAL, 2008**).

I.5.1.4. Acides gras

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9% du poids frais. Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation (AMELLAL, 2008).

I.5.1.5. Eléments minéraux

L'étude de 58 variétés de dattes cultivées dans la région des Zibans réalisée par ACOURENE *et al.*, (2001), montre que le taux de cendres est compris entre 1,10 et 3,69% du poids sec. La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux essentiellement en potassium, en magnésium, en phosphore et en calcium (AMELLAL, 2008).

I.5.1.6. Vitamines

Ce sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à presque toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial. En général, la datte constitue une source importante de vitamine du groupe B (AMELLAL, 2008).

I.5.1.7 Fibres

La datte est riche en fibres. Elle en apporte 8,1 à 12,7% du poids sec. Selon BENCHABANE (1996), les constituants pariétaux de la datte sont les pectines, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Du fait de leur pouvoir hydrophile, les fibres facilitent le transit intestinal et exercent un rôle préventif des cancers colorectaux, des appendicites, de la diverticulose, des varices et des hémorroïdes, Elles ont également un effet hypocholestérolémiant (AMELLAL, 2008).

I.5.1.8. Composés phénoliques

La datte "variété Ghars" en l'occurrence renferme des composés phénoliques dont la teneur est fonction du stade phenologique (AMELLAL, 2008; TELLI, 2010)

L'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélé la présence des acides cinnamiques, des flavones, des flavanones et des flavonols. Selon HENK *et al.*,(2003), les polyphénols jouent un rôle important dans l'organisme. Ils ont des effets anti-

inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire.

I.6. Valorisation des dattes

Aujourd'hui, grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de mettre sur le marché local et même international, une nouvelle génération de produits. Effectivement, les produits et sous-produits du palmier dattier, riche en sucres fermentescibles (65 %), constituent des substrats de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée dont l'impact socio-économique est considérable tant du point de vue de la création d'emplois que de la mise à la disposition des consommateurs de substances stratégiques fortement prisées et souvent importées à coup de devise forte.

De nombreux micro-organismes, bactéries, champignons filamenteux et levures sont susceptibles d'être produits en masse à partir de différents substrats carbonés (**BESSAH et TOUZI, 2001**).

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de dattes, de la variété molle commune "Ghars", très répandue dans nos vergers phoenicicoles. Ces dattes à sucres réducteurs sont de couleur marron foncé au stade tmar (ZERGAT, 1996).

I.2. Matériel biologique

Le matériel biologique est un champignon appartenant à la classe des Ascomycètes, Il s'agit de l'espèce *Aspergillus niger*. Les moisissures sont des champignons filamenteux, ce sont des eucaryotes, hétérotrophes non photosynthétiques et immobiles. Leur reproduction et leur dissémination s'effectuent grâce à la formation de spores. Ils sont dotés de propriétés lytiques importantes: (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiquesetc.) (ZERGAT, 1996).

II. Méthodes

II.1. Prélèvement et purification de la souche

II.1.1. Prélèvement

L'*Aspergillus niger* apparaît sous forme d'une moisissure de couleur verte sur l'orange (pourriture verte). Le prélèvement de cette espèce s'est fait au niveau du laboratoire à l'aide d'une anse de platine flambée, à proximité d'une zone stérile.

Pour le réaliser, il faut frotter la pourriture verte et ensemercer l'échantillon de moisissure prélevé à la surface d'un milieu de culture (Potatoes Dextrose agar "PDA") contenu dans 3 boîtes de pétri. Avant l'ensemencement, on additionne trois gouttes d'acide acétique concentrées à 3%

dans chaque boîte comme agent bactériostatique pour éviter la contamination bactérienne. Les boîtes sont ensuite mises à incuber à 37°C pendant 7 jours (DELARRAS, 2007).

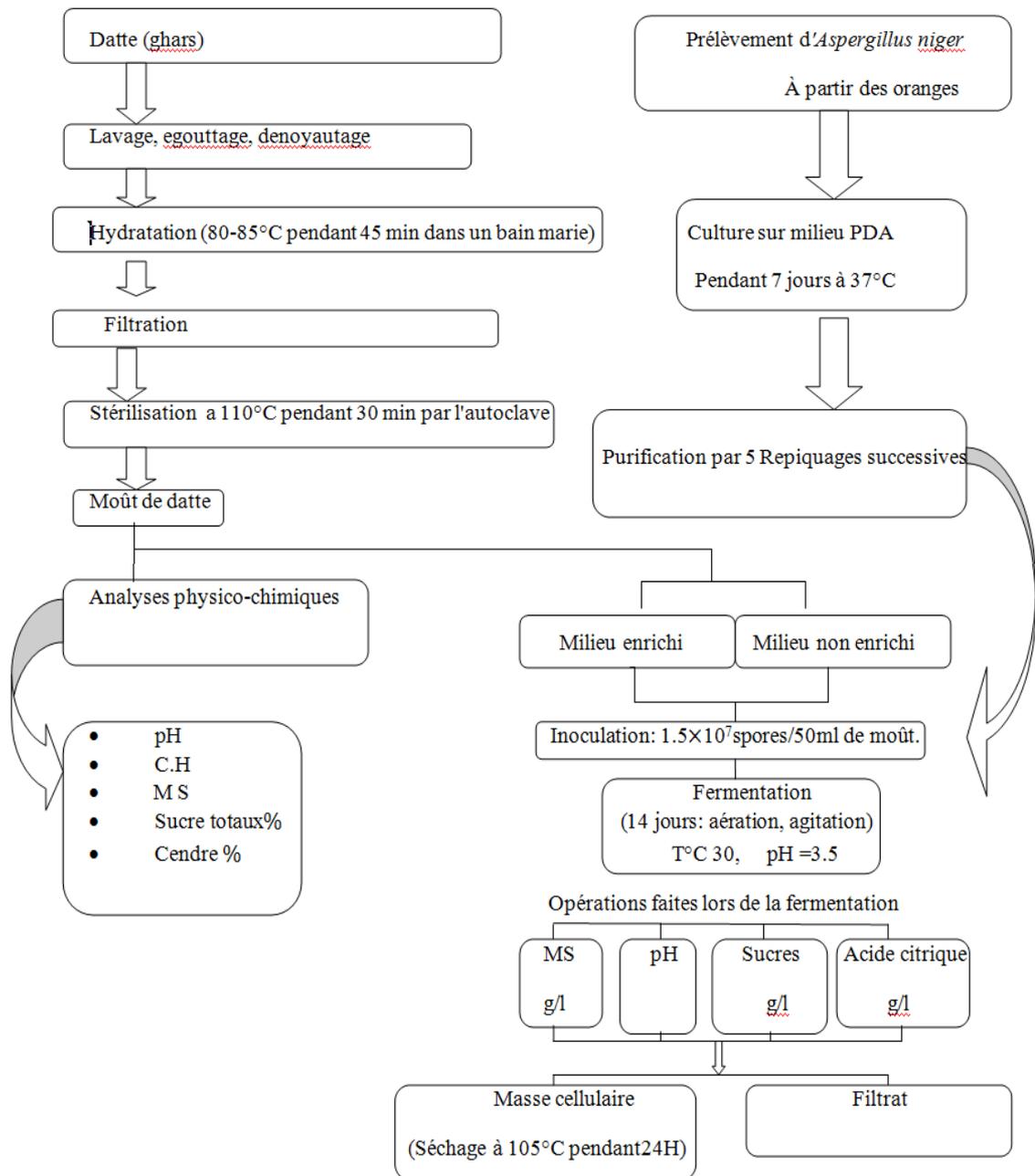


Figure 4: Procédure expérimentale

II.1.2. Repiquage et purification

On récupère les boîtes et on prélève une partie des colonies à l'aide d'une anse de platine stérile. Par la suite, et par la même méthode que la précédente, on ensemence trois nouvelles boîtes contenant le milieu de culture "PDA".

On a réalisé la purification par cinq repiquages successifs jusqu'à l'obtention des colonies identiques (DELARRAS, 2007).

II.1.3. Identification

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturels et à la morphologie, rarement à des propriétés biochimiques. Elle nécessite souvent l'utilisation de milieux standards favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier (BOTTON *et al.*, 1990).

II.1.3.1. Critères d'identification macroscopique

- ❖ **L'aspect des colonies** : les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).
- ❖ **Le relief des colonies** : les colonies peuvent avoir un aspect plat ou plissé et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure) envahissantes.
- ❖ **La couleur des colonies** est un élément très important d'identification; les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, brune allant jusqu'au noir. Les pigments localisés au niveau du mycélium (DIGUTA, 2010).

II.1.3.2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier. Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur les types de spores. La plupart des organismes ne produisent que des spores axesuées, l'identification est fondée sur l'examen de ces dernières.

II.2. Préparation du moût

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 45 minutes sous agitation continue (ZERGAT, 1996). À raison de 1Kg/3l d'eau distillée (ACOURENE *et al.*, 2008).
- une filtration: effectuée à l'aide d'un tissu. 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 110°C pendant 30 minutes. Ce traitement suffit pour éliminer la charge microbienne du moût et diminuer donc la compétition entre celle-ci et le champignon *Aspergillus niger* sans provoquer la dégradation et la caramélisation des sucres (ZERGAT, 1996).

II.2.1. Caractéristiques du moût de fermentation

Le moût de fermentation doit subir une dilution de telle façon à obtenir une concentration en sucres totaux voisine de 14 % permettant de donner les meilleurs rendements (ZERGAT, 1996).

Une comparaison des résultats obtenus avec un milieu enrichi (M_E) et un autre non enrichi (M_{NE}) est effectuée.

Le milieu enrichi contient les sels suivants dans les proportions suivantes:

- $MgSO_4$: 0,15g/l

- KH_2PO_4 : 0,3g/l
- Urée : 1g/l

Le pH final est ajusté à 3,5 par une solution d'acide sulfurique 0,1 N.

Ce milieu est additionné de 100 mg/l d'oxytétracycline afin d'empêcher le développement bactérien (ZERGAT, 1996).

II.3. Conduite de la culture de la moisissure

II.3.1. Préparation de l'inoculum

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

Après 7 jours d'incubation à 37°C, des spores apparaissent à la surface du tapis mycélien. Elles sont récupérées dans l'eau distillée stérile puis dénombrées grâce à la cellule de malassez (ZERGAT, 1996).

La suspension fongique est ensuite diluée de façon à obtenir une concentration de l'ordre de 1.57×10^7 spores/ml (voir Annexe 8). Cette concentration suffit pour inoculer 50 ml de moût (ZERGAT, 1996).

II.3.2. Inoculation du milieu de fermentation

Onensemence stérilement 1l du moût avec 1.57×10^7 spores/50 ml du moût (ZERGAT, 1996).

II.3.3. La fermentation

La fermentation est réalisée en erlenmeyer. L'incubation a lieu dans un agitateur incubateur dont la température est réglée à 30°C.

II.3.4. Suivi de la fermentation

II.3.4.1. Prélèvements

Les prélèvements se font tous les 2 jours pendant 14 jours avec une prise d'essai de 20ml.

Ces prélèvements serviront pour l'étude de la cinétique de production de l'acide citrique et la consommation de sucre par *Aspergillus niger*.

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

- ❖ la teneur en acide citrique.
- ❖ la teneur en sucres résiduels.
- ❖ l'évolution du pH.
- ❖ dosage de la matière sèche récupérée (la masse mycélienne) (ZERGAT, 1996).

II.3.4.2. Etude de la cinétique de la fermentation

La croissance mycélienne d'*Aspergillus niger* en culture agitée se déroule en cinq phases.

- **Phase de germination de spores**

La durée de cette phase dépendant étroitement de la température, peut être écourtée par l'utilisation de spores pré germées.

- **Phase exponentielle de croissance:**

Dépendant de la température, cette phase est caractérisée par une intense multiplication du mycélium et par un taux de croissance (μ) constant.

La croissance mycélienne obéit à l'équation suivante :

$$X_t = X_a e^{\mu(t-t_a)}$$

X_t : poids sec du mycélium au temps t en (g/l).

X_a : poids sec du mycélium au temps t_a en (g/l).

t : temps marquant le début de la phase 2 (heure).

μ : taux de croissance (heure⁻¹).

La vitesse de croissance obéit à l'équation:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

- **Phase de perturbation de la croissance**

Lors de cette phase, nous assistons à une inhibition de la croissance et à un début de la production d'acide citrique. Le taux de croissance est caractérisé par 03 étapes successives; il diminue, s'annule puis augmente.

- **Phase secondaire de croissance:**

Cette phase est caractérisée par une accélération de la vitesse de production de l'acide citrique. La variation de la croissance mycélienne suit l'équation suivante:

$$X_t^2 = X_c^2 + 2K(t - t_c)$$

- X_t : poids sec du mycélium au temps t_c en (g/l).
- X_c : temps marquant le début de la phase 4.
- K : constante de la croissance secondaire g^2/l^2h .

La vitesse de croissance obéit à l'équation:

$$\frac{dX}{dt} = K \cdot X^{-1}$$

- **Phase de production**

Durant cette phase, la majorité de l'acide citrique est formée. La durée de cette phase dépend de la température et de la concentration en sucres (ZERGAT, 1996).

II.4. Analyse physico-chimiques et biochimiques des dattes et de moût de dattes

II.4.1. Analyse physico-chimiques

II.4.1.1. pH

La détermination du pH, est essentielle pour le contrôle du moût, 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 déterminé à l'aide d'un pH-mètre (WTW). Cet appareil permet une mesure électrochimique du pH. Une électrode en verre dont le potentiel dépend de la concentration en ions H_3O^+ de la solution est opposée à une électrode de référence. L'étalonnage du voltamètre permet de lire le pH.

II.4.1.2. Conductivité électrique

La conductivité électrique nous renseigne sur la teneur en sels solubles du moût Elle est mesurée à l'aide du conductimètre (WTW).

Les résultats sont exprimés en ms/cm.

II.4.2. Analyse biochimiques

II .4.2.1. Taux de matière sèche

Elle est déterminée par dessiccation du produit dans une étuve à la température 105°C pendant 24 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

On calcule le taux de la matière sèche par la formule suivante:

$$\text{MS}\% = \frac{P_2 - P}{P_1 - P} \times 100$$

- P : poids de la capsule à vide en (g).
- P_1 : poids de la capsule avec la prise d'essai avant dessiccation en (g).
- P_2 : poids de la capsule avec la prise d'essai après dessiccation en (g).

II.4.2.2. Taux de cendres totales

Elles sont déterminées par incinération du produit dans un four à moufle électrique à 600°C pendant une heure.

$$\text{La teneur en cendres totales}\% = \frac{G - G_1}{g} \times 100$$

- G: poids de la capsule avec cendre en (g).
- G_1 : poids de la capsule à vide en (g).
- g: poids de la prise d'essai en (g).

II.4.2.3. Dosage des sucres

Les sucres totaux sont dosés par la méthode de DUBOIS qui permet de doser les oses en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré. En présence des deux réactifs, les sucres donnent une couleur jaune orangé, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux.

La densité optique est déterminée au spectrophotomètre à 490 nm.

II.4.2.4. Dosage de l'acide citrique

L'acide citrique est dosé par la méthode de MARIER et BOULET(1958).

Le principe consiste en la réaction de coloration qui a lieu sous l'action combinée de la pyridine et de l'anhydride acétique à 32°C en présence d'acide citrique. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en citrate.

La densité optique est lue au spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 420 nm.

Un courbe étalon est établi préalablement (ZERGAT, 1996).

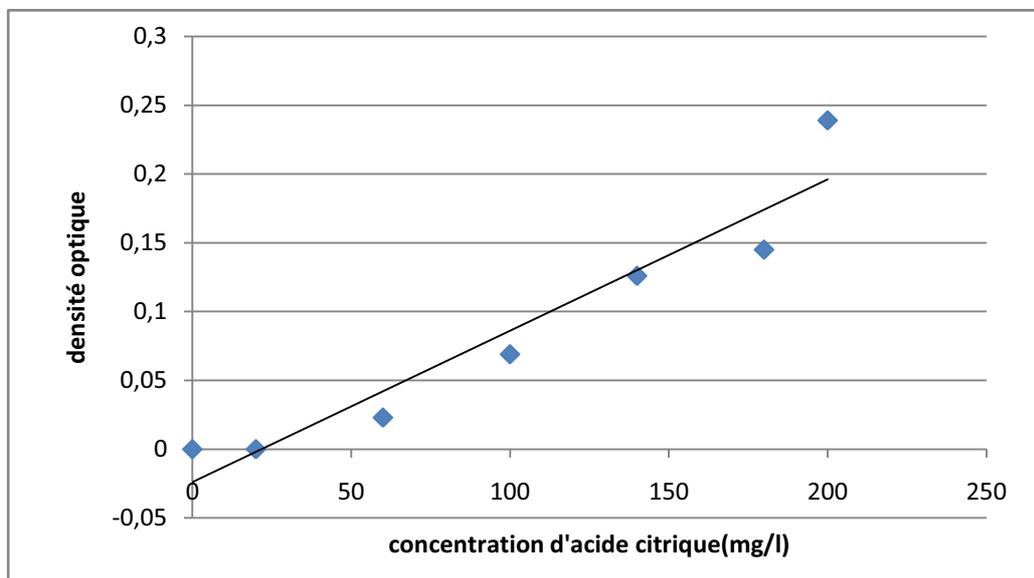


Figure 5: Courbe étalon utilisée pour le dosage de l'acide citrique.

II. Métabolisme de l'acide citrique

II.1. Généralités

L'acide citrique (acide 2-hydroxy-1,2, 3-propanetricarboxylique) est très diffus dans la nature. (MORETTI et FELIPPONE, 2000). Il est solide, blanc, incolore, inodore, d'une saveur excessivement aigre. (EUGENE, 1837). Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes .Il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron, en 1784, par SHEELE. Sa structure a été établie par LIEBIG en 1838. La synthèse chimique de l'acide citrique, à partir de la glycérine, remonte à 1880. En 1893, WETTNER découvrit quelques micromycètes capables de produire de l'acide citrique par fermentation de substrats contenant du sucre.

Les premiers équipements industriels remontent au début du siècle. Ils produisaient l'acide citrique par extraction à partir de citrons (qui en contiennent de 7 à 9 %) ; jusqu'en 1920, plus de 90 % de la production mondiale d'acide citrique était réalisée en Italie. À cette époque le procédé industriel par fermentation, en utilisant *Aspergillus niger* comme micro-organisme producteur et le sucre comme matière première commença à se développer en Europe et aux États-Unis. Au début des années 30, 80 % de la production mondiale d'acide citrique était réalisée par fermentation.

De nos jours, l'acide citrique est produit par des techniques de fermentation« en surface » et en «submergée » (MORETTI et FELIPPONE, 2000).

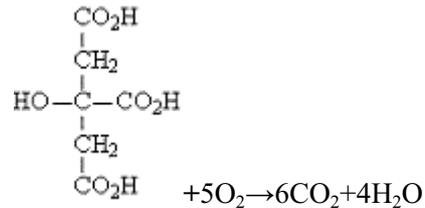
II.2. Métabolisme de l'acide citrique cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs):

Dans les conditions aérobies, l'acide pyruvique est décarboxylé en un résidu *acétate* à deux carbones, qui ensuite réagit avec le coenzyme A ($\overline{\text{CoA}}\text{SH}$) pour donner l'acétyl coenzyme A (acétyl CoA). Dans cette réaction couplée, NAD^+ accepte un atome d'hydrogène de l'acide pyruvique et un du coenzyme A. Le coenzyme A agit comme un porteur de résidus acétate qu'il transfère à l'acide *oxaloacétique* pour former de l'acide citrique au cours de la première réaction du cycle de l'acide citrique. Cette réaction libère du $\overline{\text{CoA}}\text{SH}$ libre qui est recyclé pour transférer à nouveau des résidus acétate de l'acide pyruvique à l'oxaloacétate.

Toutes les réactions de la voie glycolytique conduisant à la formation d'acide pyruvique ont lieu dans le cytosol. La formation d'acétyl CoA et de CO_2 à partir de l'acide

pyruvique et les huit réactions importantes qui composent le cycle de l'acide citrique sont toutes catalysées par des enzymes situées dans la matrice ou dans la membrane interne de la mitochondrie. Pour chaque résidu acétate entre dans le cycle, deux nouvelles molécules de CO₂ et deux molécules d'eau sont produites.

La totalité de la réaction d'oxydation complète du pyruvate, via l'acide citrique et la chaîne des transporteurs d'électrons, s'écrit ainsi:



Le cycle de l'acide citrique est aussi appelé le cycle de **KREBS**. En effet, **Hans KREBS**, vers 1940, a décrit les différentes étapes réactionnelles et a montré qu'il s'agissait d'un cycle. Ce cycle porte aussi le nom de cycle de l'acide tricarboxylique car plusieurs intermédiaires de ce cycle ont trois groupes carboxyles. Le résidu acétate à deux carbones de l'acétyl CoA se condense d'abord avec l'acide oxaloacétique à quatre carbones pour former l'acide citrique à six carbones. Au cours des étapes 4 et 5, deux groupes carboxyles de l'acide isocitrique sont enlevés pour former deux molécules de CO₂. De plus, quatre atomes d'hydrogène sont transférés au NAD⁺ pour former deux molécules de NADH réduit. La succinate déshydrogénase (fixée à la membrane interne de la membrane mitochondriale) catalyse l'étape 6. Dans cette réaction, deux atomes d'hydrogène sont transférés depuis l'acide succinique vers FAD, ce qui donne de l'acide fumarique et du FADH₂. Une autre oxydation se produit lorsque l'acide malique est converti en acide oxaloacétique à la suite du transfert de deux atomes d'hydrogène vers NAD⁺ (étape 8). Un nouveau résidu acétate se condense ensuite avec l'axaloacétate pour reformer la molécule d'acide citrique, permettant de démarrer un nouveau cycle (**ECKERT *et al.*, 1999**).

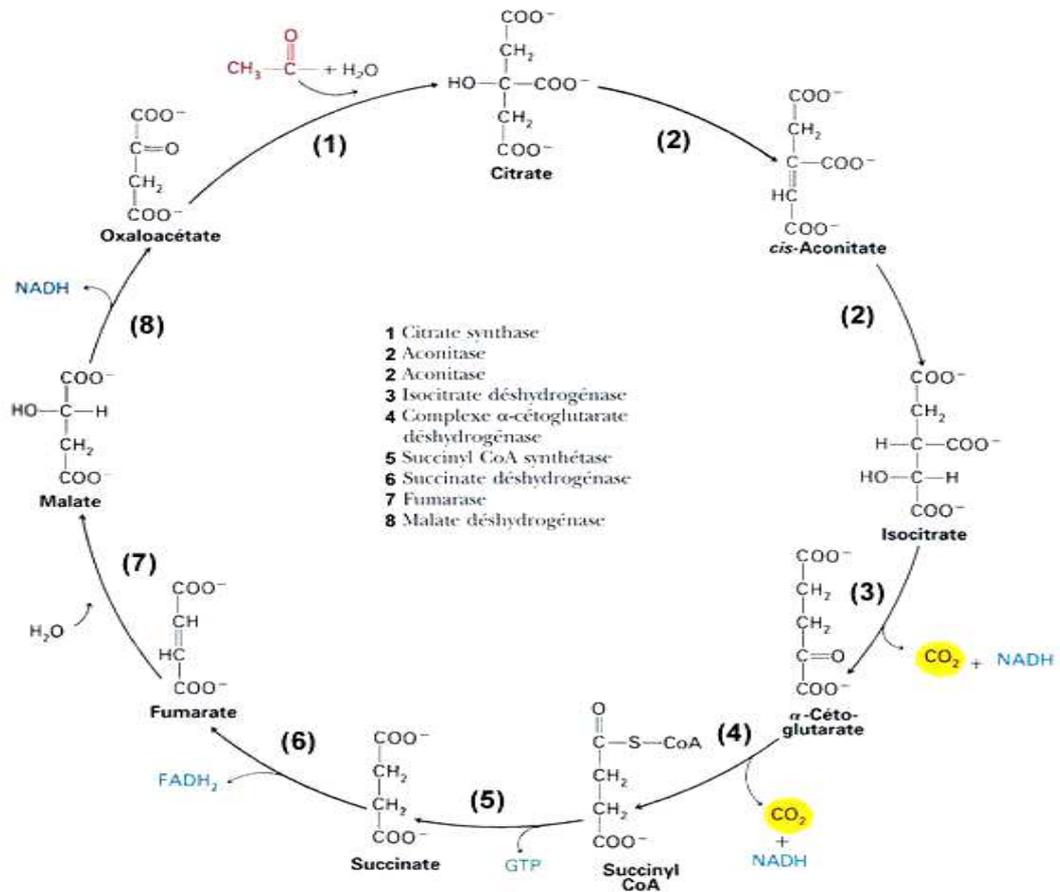


Figure 2: Cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) (ECKERT *et al.*, 1999).

II.3. Applications de l'acide citrique

L'acide citrique est utilisé en industrie alimentaire et pharmaceutique.

II.3.1. Industrie alimentaire

- Il est utilisé comme additif (boisson, confiture, etc...) (A.MEYER *et al.*, 2004). Dans les boissons, il est utilisé en général comme rafraîchissante ou effervescente;
- Dans la fabrication des bonbons, dans la conservation des fruits, de poisson, des glaces, des friandises en général, les sauces, les jus et sirops de fruit, etc ;
- Pendant les vendanges, comme acidifiant du goût;
- Dans les vins blancs, rosés et rouges, pour corriger l'acidité pendant les processus d'élaboration;
- Il peut être utilisé comme agent nettoyant de l'acier inoxydable en raison de son pouvoir séquestrant; (AGROVIN, 2012)

- Dans celle des plastiques sous la forme d'esters;
- Dans la purification des métaux grâce à son pouvoir chélatant (**MEYER, 2004**).

II.3.2. Industrie pharmaceutique

- L'acide citrique favorise indirectement la croissance des os en facilitant l'assimilation du calcium et en régulant la taille des cristaux de calcium dans les os;
- Il est utilisé comme composant de solutions d'irrigation vésicale;
- L'acide citrique et ses sels empêchent une coagulation sanguine du sang conservé;
- Il est utilisé comme solution de rinçage lors de traitements du canal radiculaire en médecine dentaire;
- Dans les poudres et comprimés effervescents, l'effet effervescent est obtenu grâce à l'acide citrique et le bicarbonate de sodium (**MEYER, 2004**).

III. Microorganisme producteur de citrate: *Aspergillus niger*

III.1. Le genre *Aspergillus*

Les champignons sont des microorganismes filamenteux, dont l'élément structural est l'hyphe, plusieurs hyphes formant le mycélium ou thalle.

Le règne des champignons est composé de quatre phylas: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Basidiomycota. (DELARRAS, 2007).

Les champignons microscopiques ou mycètes comprennent:

- Les levures, champignons unicellulaires.
- Les moisissures, champignons filamenteux, ils sont ubiquistes se rencontrent également sur les végétaux, les produits d'origine végétale, les viandes et les produits d'origine animale, les cadavres d'animaux et les déjections des animaux herbivores...

Les moisissures ont un rôle utile dans la fabrication de nombreux aliments (boissons, fromages, saucisses et saucissons...) dans les industries alimentaires comme les *Aspergillus*, *Penicillium*..... (DELARRAS, 2007).

Les *Aspergillus* sont fréquents dans la nature. Ils vivent en saprophytes dans le sol mais aussi à sa surface et sur les végétaux. A la faveur de courants d'air, les spores d'*Aspergillus* sont véhiculées et peuvent se déposer sur des substrats divers. On peut isoler des *Aspergillus* à l'extérieur dans l'atmosphère, mais aussi à l'intérieur des habitations, sur les vêtements (VAUBOURDOLLE, 2007).

III.1.1. Caractères généraux

Les champignons du genre *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois en 1729. Ce sont des champignons saprophytes, c'est-à-dire qui tirent leur nourriture de substances organiques en décomposition. Ce sont des moisissures à filaments hyalins, cloisonnés, et ils sont haploïdes. Le genre *Aspergillus* comprend aujourd'hui 185 espèces, dont une vingtaine est retrouvée en pathologie humaine (BADILLET *et al.*, 1987). Les *Aspergillus* sont ubiquistes, et en région tempérée plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver. Ces champignons ont un métabolisme aérobie. De plus ils participent au recyclage du

carbone et de l'azote de l'environnement. Ils sont thermophiles (certaines espèces peuvent survivre à des températures proches de 70°C) et ne requièrent pas de nutriments spécifiques (QUATRESOUS, 2011).

III.1.2. Croissance et cycle fongique

Dans l'environnement les *Aspergillus* sont sous la forme de champignons filamenteux septés et ramifiés : cette forme végétative est appelé mycélium. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium : les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninucléées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides. Les phialides sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3 µm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (QUATRESOUS, 2011).

III.1.3. Caractères culturaux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud (TABUC, 2007), PDA (GACEM, 2011)) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C.

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : 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 incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (TABUC, 2007).

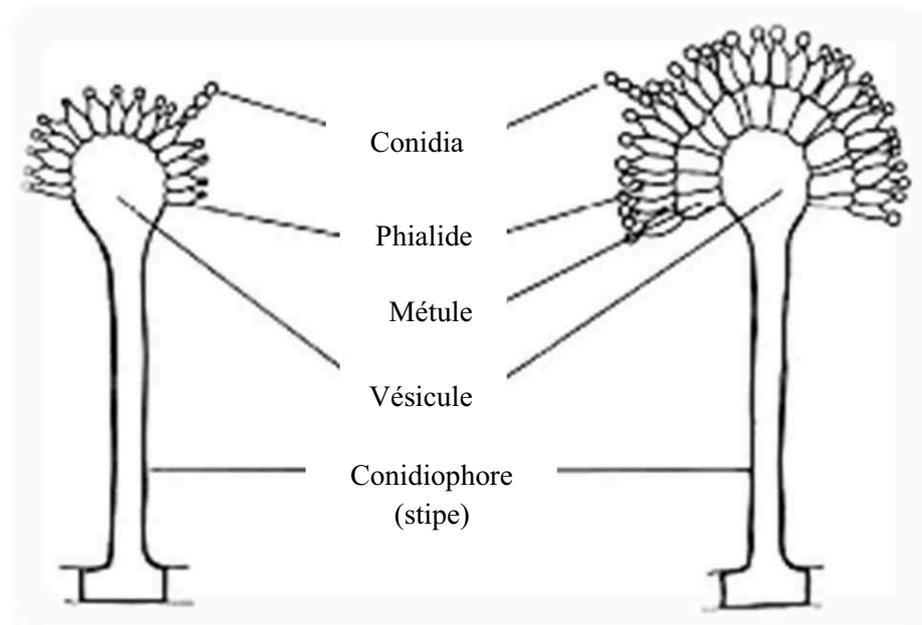


Figure 3: Schéma du champignon genre "Aspergillus" (VAUBOURDOLLE, 2007).

III.2. L'espèce *Aspergillus niger*

A. niger est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919.

L'acide citrique est employé couramment dans une variété d'industries et, en volume des ventes, dépassent largement les autres métabolites tels que l'acide gluconique

L'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*A. niger* et *A. fistulosum* parce que les rendements de ces organismes sont élevés et la formation de produits indésirables tels que l'acide gluconique et l'acide oxalique est minime. La Food and Drug Administration (FDA) a classé *A. niger* comme source d'acide citrique (21 Code of Federal Regulations §173.280) (SCHUSTER *et al.*, 2002).

En plus de l'acide citrique, *A. niger* offre plusieurs applications par sa production d'enzymes comme Pectinase, protéase et amyloglucosidase qui étaient les premiers à être exploitées et ont été initialement produites en culture de surface (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Et d'autres acides carboxyliques comme les acides malique, fumarique et oxalique et plus récemment la production de mycotoxines (HAMDI, 1993).

Position systématique d'*Aspergillus niger*

- Règne : Mycètes (Fungi)
- Embranchement : Amastigomycota
- Sous-Embranchement: Deutéromycotina
- Classe: Deutéromycètes
- Ordre: Oniliales (hyphales)
- Famille: Moniliacées
- Genre: *Aspergillus*
- Espèce: *Aspergillus niger* (ALEXOPOULOS, 1979)

III.2.1. Écologie

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique.

Dans la nature, on le trouve dans le sol et de la litière, dans le compost et le matériel végétal en décomposition.

Aspergillus niger est capable de croître dans la plage température large de 6–47 ° C avec une température relativement élevée avec un optimum de 35 à 37 ° C. La limite d'activité de l'eau pour la croissance est 0,88 (aw) qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* peut pousser sur une très large gamme de pH : 1,4–9,8.

Ces capacités et l'abondante production de conidies, qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce, avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (SCHUSTER *et al.*, 2002).

III.2.2. Caractères cultureux et Aspects macroscopiques

Ce champignon croît facilement sur milieu de Czapek (QUATRESOUS, 2011) ; PDA, milieu gélosé (GACEM, 2011), une colonie peut atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, le

mycélium extensif hyalin en grande partie immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques. Le verso est incolore à jaune. Un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes. Cette espèce a une croissance rapide, avec un optimum thermique compris entre 25 et 30°C, mais il peut pousser jusqu'à 42°C. Son développement est aussi inhibé par l'actidione (QUATRESOUS, 2011).

III.2.3. Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des têtes conidiennes larges, brun-rouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre). Les phialides, très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. Métules et phialides sont légèrement teintées de brun. Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. Elles sont typiquement globuleuses, brunes, échinulées à très verruqueuses, et mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre. La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées. La tête aspergillaire est donc bisériée radiée, et noire à maturité (QUATRESOUS, 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif d'utiliser le moût de dattes comme substitut de la mélasse pour la production de l'acide citrique par *Aspergillus niger*.

Nous avons commencé par la détermination de la composition physico- chimique et biochimique de la matière première et le moût de datte "Ghars " (milieu de fermentation).

Nous avons utilisé deux types de milieux : un milieu non enrichi et un milieu enrichi. Ces deux milieux sont inoculés par *Aspergillus niger* à raison de $1,57 \cdot 10^7$ spores/ml. Ils renferment 14% de sucre totaux, avec un pH initiale de 3,5, à une température de 30°C.

La fermentation est menée sous agitation avec une aération continue et dure 14 jours.

La meilleure production d'acide citrique a été obtenu dans le milieu non enrichi avec une valeur égale à 92g/l qui correspond à un taux de consommation en sucres de 134,98g/l et un pH de l'ordre de 1,92 à la fin de la fermentation. Le rendement obtenu est de 68,15%.

A l'échelle industrielle, le meilleur milieu de culture est celui qui permet à une souche de produire le maximum de citrate, avec un faible coût et dans un temps court.

La présente étude a montré que le milieu non enrichi est le meilleur milieu parce qu'il permet à l'*Aspergillus niger* de synthétiser une quantité d'acide citrique très importante. Il est moins cher que le milieu enrichi. Il est donc plus économique.

Pour améliorer ces résultats, nous préconisons l'utilisation des dattes sèches riches en saccharose. En effet l'espèce *Aspergillus niger* a une préférence pour le saccharose. A priori les dattes à saccharose conviennent mieux à ce type de production .En plus, il serait intéressant de mener une recherche sur l'optimisation des conditions de fermentation telles que l'agitation et l'aération. L'aération particulièrement parce qu'elle joue un rôle cruciale dans le développement des microorganismes.

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
1	Caractérisation physico-chimique des pulpes des dattes et de la solution mère de moût de dattes	44
2	Caractéristiques biochimiques des dattes et de leur moût	45
3	Rendement en acide citrique sur MNE et ME.	55

Introduction

*Etude
bibliographique*

Chapitre I.

La Datte

Chapitre II.
Métabolisme
de l'acide citrique

Chapitre III.

*Microorganisme producteur
de citrate: *Aspergillus niger**

Etude
Expérimentale

Chapitre I.

Matériel et Méthodes

Chapitre II.
Résultats et Discussion

Conclusion et Perspectives

*Références
bibliographiques*

Annexes

CHAPITRE II: Résultats et Discussion

I. Identification

I.1 Résultats

I.1.1 Identification macroscopique

Il s'agit de décrire :

- l'aspect des colonies, les colonies d'*Aspergillus niger* apparaissant sous forme laineuses et granuleuses;
- les reliefs des colonies, les colonies de cette espèce présentent un aspect plissé et mou;
- la taille des colonies, la taille de l'espèce est comprise entre 1.5-2cm et peut être étendue à 4cm.
- la couleur des colonies, les colonies apparaissent blanches puis jaune puis noirâtre, et verso : jaune pâle (DIGUTA, 2010).

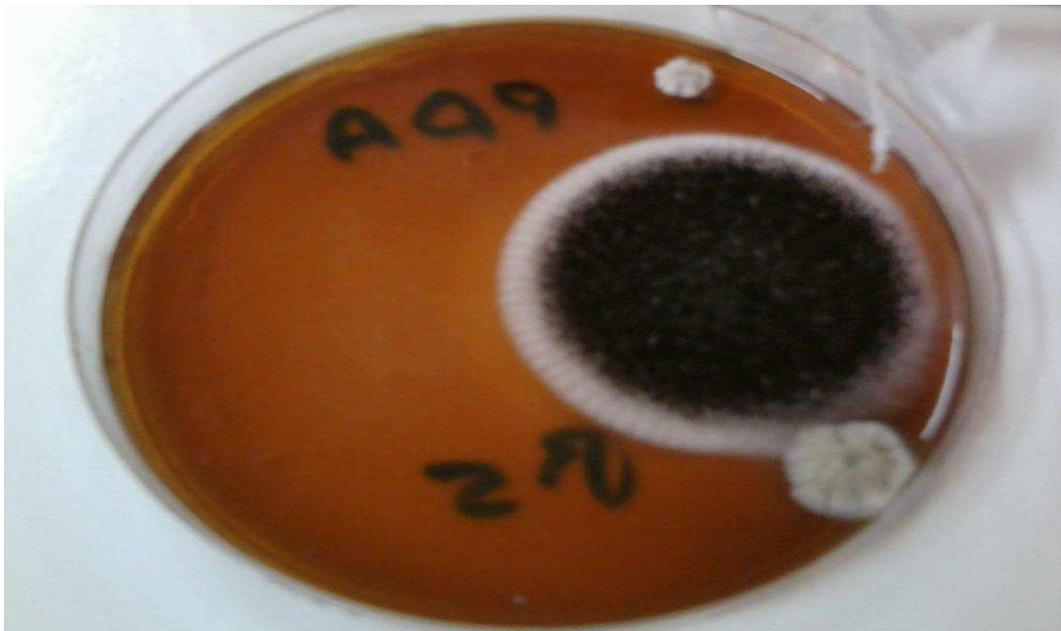


Photo 1: Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* (photo originale)

I.1.2 Identification microscopique

L'identification se fait par un examen microscopique d'une colonie fongique après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle avec une goutte d'huile d'immersion. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier.

- le thalle, *Aspergillus niger* possède un appareil végétatif constitué de filaments (les hyphes) qui ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium. Le thalle est de forme cloisonné (septé).
- les spores, sont le produit de reproduction asexuée, les spores (les conidies) d'*Aspergillus niger* sont exogènes et sont formés par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

Aspergillus niger possède des amérospores qui sont unicellulaires et de petite taille et cet aspect est distingué selon la forme et les modalités de septation (**DIGUTA, 2010**).



Photo 2: Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* (photo originale)

II. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques

II.1 Résultats

Les caractéristiques physico-chimiques (pH, C.E, ...etc.) et biochimiques (sucres, éléments minéraux, protéines) de la matière première sont regroupées dans le tableau I.

Etant donné que le processus fermentaire est étroitement lié à la composition du milieu de culture, une caractérisation du moût de datte s'avère nécessaire pour la réussite de la fermentation.

II.1.1 Analyses physico-chimiques

Tableau I : Caractérisation physico-chimique des pulpes et de la solution mère de moût

Produit	Dattes	Moût
Mesure		
pH	5.48	5.05
Conductivité électrique (ms/cm)	3.1	3.02

Il ressort du tableau I que:

- ❖ Le pH des dattes "Ghars" ayant fait l'objet de la présente étude est égale à 5.48 .Ceci est en accord avec les résultats rapportés par **ZERGAT (1996)**.Le pH du moût est plus acide puisqu'il est égale à 5.05.

La valeur du pH de moût est proche de valeur trouvée par **ZERGAT (1996)**; **BENCHABANE (2012)** est respectivement pH 5.31, pH 5,8 – 6,2.

La valeur de pH de datte "5.48" est comparable à celle **BENAHMED DILALI et al., (2010)**.

Cette différence peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité de l'eau dans le moût ayant provoquée une activité microbienne et par conséquent une baisse du pH.

La conductivité électrique du moût est égale à de 3.02 ms/cm. Elle a légèrement diminué par rapport à celle de la datte. Cette différence serait probablement due à la filtration du moût de dattes.

II.1.2 Analyses biochimiques

Les résultats des analyses réalisées sont consignés dans le tableau II

Tableau II : Caractéristiques biochimiques des dattes et de leur moût

Paramètres	Pulpe fraiche	Moût
Matière sèche %	73.36	6
Humidité %	26.62	93.98
Cendres %	1.77	0.30
Sucre totaux%	86.2	33

Il ressort du tableau II que:

- ❖ La teneur en eau des dattes est égale à 26.62. Elle est proche de celle trouvée par **GHACHEM (1992)**; **KEDRI (1994)**; **KHENNANE** et **LAHRACHE (1995)** soient respectivement 23.25%, 25.74%, 20.47% elle est plus élevée par rapport à celle trouvée par **ZERGAT (1996)** pour la variété "Ghars" qui est égale à 16,47.
La teneur en eau de moût est égale à 93.98%. Elle est proche de celle trouvée par **BENCHABANE (2012)** soit 89.43%.
Nous expliquons la différence entre les résultats aboutis dans cette recherche et d'autres par des chercheurs par le fait de non pas analyser les dattes juste après la récolte.
- ❖ La teneur en matière sèche de moût de datte est égale à 6% puisqu'il a subit intentionnellement une dilution.
- ❖ Le taux de cendres des dattes est égal à 1.77%. Cette valeur est proche de celles trouvées par **PASSAT (1979)** in **ZERGAT (1996)** (2% environ) et **BENAHMED DILALI et al ., 2010** (1.84%); **DOWSEN** et **ATEN (1963)** in **ZERGAT (1996)**; **MAATALAH (1970)** in **ZERGAT (1996)**; **ACOURENE (1992)** donnent une marge de 1.7 à 2.5% pour les différentes variétés algériennes.

Le taux de cendre du moût ayant fait l'objet de notre étude est de 0.30%. Ce taux est faible par rapport à celui de la datte. Cela s'explique par le fait que seulement une partie des éléments minéraux des dattes passe dans le moût.

Enfin, le taux des cendres de la datte renseigne sur sa richesse en éléments minéraux.

Concernant les éléments minéraux, les cendres de la datte renferment des quantités appréciables de Ca, de Mg, de S, de Na et de Cu (**RANDOIN *et al.*,1985 in KEDRI,1994 ; FETHI,1979 ; MAATALAH, 1970 in ZERGAT 1996**) et (**KEDRI,1994**).

BOUGHNOU (1988) in ZERGAT (1996), rapporte que le moût de rebut de dattes est riche en éléments minéraux surtout en phosphore et en potassium.

- ❖ La teneur des dattes en sucres totaux est égale de 86,2% du poids frais. C'est une valeur comparable à celle trouvée par **MAATALAH (1970) in ZERGAT(1996)** soit 85 % du poids frais, mais supérieur à celle de **DOWSEN et ATEN (1963) in ZERGAT (1996)** qui est de 61-68% pour les dattes en général. **PATRON.A, PATRON.S et SWINZOW.H (1954) in MUNIER (1973) in ZERGAT (1996)** ont trouvé une valeur plus supérieure à nous pour la variété « Ghars » soit 93% du poids frais.
- ❖ La teneur du moût en sucres totaux est égale à 33%. Cette valeur est élevée par rapport la valeur qui trouvée par **ZERGAT(1996)** est 16.64%.
- ❖ Les dattes comme tous les fruits renferment très peu de protéine, **ZERGAT(1996)** rapporte une teneur égale à 0.39%. Cette valeur concorde à celle trouvées par **SADDEK et FAOUZI (1993)** à savoir 0.393% et 456%. Selon **DOWSEN et ATEN (1963); MAATALAH (1970) in ZERGAT (1996)**, la datte contient 0.38 à 2.5% de protéines.

OULD EL HADJ *et al.*, (2012), MAALALLAH (1970) in ZERGAT (1996), AL ASWAD (1983) ; ALOGAIDI (1987) in ZERGAT (1996) , signalent que les protéines de dattes sont qualitativement bien équilibrées bien que leur teneur soit faible.

La datte contient la totalité des acides aminés indispensables et en proportions équilibrées **EL OGAIDI (1987) ; MAATALAH (1970) ; DERKAOUI (1985) in ZERGAT (1996)**.

II.2 Discussion

Etant hétérotrophe, dépourvue de chlorophylle, *Aspergillus niger* est incapable de réaliser ses propres synthèses; de ce fait, elle a besoin absolument d'un aliment carboné pour se développer normalement.

Le moût de datte est riche en sucres simples à priori facilement assimilables par le champignon avec 33% de sucres totaux.

Ce taux est le double que ce qui est préconisé pour cette culture. En effet l'obtention de bons rendements en acide citrique exige selon **JERNEJC *et al.*, (1982)** in **SADDEK et FAOUZI (1993)** une teneur en sucres de l'ordre de 14%.

Selon **SIMON et MEUNIER (1970)** in **ZERGAT (1996)**, la concentration en sucres dans le moût devrait se situer entre 12 et 15%.

DING BANG XU *et al.*, (1989) notent l'absence de citrate sur les milieux contenant moins de 2.5% de sucres. Ils préconisent des taux plus élevés variant entre 10 à 14%.

Dans notre cas, nous avons travaillé avec une concentration en sucres totaux de l'ordre de 14% **JERNEJC *et al.*, (1982)** in **SADDEK et FAOUZI (1993)**.

Selon **PORGES (1932)** in **HOSSAIN *et al.*, (1984)** in **ZERGAT (1996)**; une concentration en saccharose variant entre 14 à 20% est nécessaire pour obtenir le maximum d'acide citrique.

DING BANG XU *et al.*,(1989) ont étudié l'influence de différentes sources de carbones sur la production de l'acide citrique, et ont montré que le meilleur taux est obtenu à partir du maltose, saccharose, mannose, glucose puis le fructose.

Selon **HOSSAIN *et al.*, (1985)** in **ZERGAT (1996)** ; le galactose est le seul glucide qui inhibe la production de citrate.

Pour couvrir les besoins du microorganisme, le moût doit contenir de bonnes proportions d'éléments minéraux (ZERGAT, 1996).

Toutefois, la fermentation citrique est très influencée par: le phosphore, le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse et le magnésium (ZERGAT.1996).

Les teneurs en ces oligoéléments dans le milieu de culture doivent être limités (ZERGAT, 1996).

La détermination des teneurs de la datte et de son moût en ces oligoéléments minéraux ne réalise pas car il y a un manque de moyens. On s'est référé aux résultats donnés par BOUGHNOU(1988) in ZERGAT (1996) travaillant sur le jus de déchets de dattes et à ceux de SADDEK et FAOUZI(1993) travaillant sur le jus de cinq variétés de dattes (tableau VIII-Annexe 3)

D'après les résultats de tableau VIII-Annexe 3, on remarque que le moût de datte contiendrait ces oligoéléments mais en petites quantités:

- Ainsi, les teneurs du moût en phosphore varient de 4,92 à 19,59mg/100ml (ZERGAT, 1996).
- pour le manganèse et le fer, leur teneur sont respectivement égales à 0,01 à 0,099mg/100ml et de 0,016 à 0,323mg/100ml (ZERGAT, 1996).
- Les teneurs en magnésium, en Zinc et en cuivre sont respectivement de l'ordre de 0,14 à 22mg/100ml, de 1,06 à 3,59mg/100ml et de 0,039 à 0,148mg/100ml.

Ces valeurs donnent une idée approximative sur la composition minérale du moût de dattes en oligoéléments, intéressant la fermentation citrique (ZERGAT ,1996).

En effet, une teneur en phosphore inférieure à 2,5g/l est nécessaire pour éviter la synthèse des acides oxalique et gluconique (ZERGAT, 1996).

TSAY et TO (1987) in ZEGAT (1996) ont affirmé qu'avec une concentration en fer (Fe++) comprise entre 0,1 et 2 mg/l la production d'acide citrique est maximale.

Selon WORD et SUZUKI (1976) in ZERGAT (1996), le Zinc à une concentration de l'ordre de 0,013mg/100g, maintient la phase de croissance, alors qu'à faible concentration,

inférieure à 0,006mg/100g l'augmentation de la biomasse est limitée, et la culture passe à la phase d'accumulation d'acide citrique.

Le magnésium et le fer sont des métaux essentiels pour l'utilisation des sucres et pour une surproduction d'acide citrique par *Aspergillus niger* (BENYAHIA, 1992).

En outre l'ion cuivreux (Cu⁺⁺) joue un rôle antagoniste vis-à-vis du Fer et permet d'accroître la production surtout dans le cas de la mélasse qui en contient des quantités élevées (ZERGAT, 1996).

Les oligoéléments comme le cuivre, le Fer et le Zinc favorisent la consommation des sucres, de l'azote et du phosphore ainsi que l'accumulation du citrate dans le milieu (KATARINA *et al.*, 1982 in GANA et HAMI, 1992).

ZERGAT (1996); BORTELES (1927); WOLF (1930) in GANA et HAMI (1992) ont été les premiers à insister sur l'importance du cuivre sur la formation du citrate, tandis que BERRY *et al.*, (1977) in ZERGAT(1996) recommandent l'utilisation de taux très faibles pour le cuivre variant entre 0.1 et 1mg/l.

SADDEK et FAOUZI (1993) notent que l'addition de manganèse entraîne l'augmentation du taux des lipides membranaires et l'arrêt de l'accumulation de citrate.

Selon COCKER (1977) in ZEGAT (1996), l'usage du manganèse à plus de 0,3% est toxique pour la souche *Aspergillus niger*, alors que BOWES (1980) in LEDMYA et ERCHICHE (1992), estiment que cela dépend de la souche utilisée.

Enfin, on peut dire que selon les données bibliographiques concernant les oligoéléments contenus dans le moût, et ceux préconisés pour une bonne fermentation citrique que les teneurs sont convenables pour une bonne fermentation.

Concernant les matières protéiques, elles sont inexistantes dans le moût, cela est dû à la faible teneur de la datte elle-même en ces composés. Toutefois, la teneur en matières azotées doit être suffisamment faible dans le milieu de culture pour éviter la formation d'oxalates (RIVIERE, 1975 in ZERGAT ,1996).

Selon **EL OGAIDI (1987)** in **ZEGAT(1996)**, la meilleure source d'azote pour la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* est celle fournie par les nitrates de potassium et les nitrates d'ammonium.

Selon **LEDMYA et ERCHICHE (1992)** l'utilisation des nitrates d'ammonium à des concentrations variant entre 1,6 et 3g/l est retenue par de nombreux auteurs.

Dans la présente étude nous avons choisi d'enrichir le milieu de culture en urée, car c'est un élément nutritif à bon marché, et utilisé largement à l'échelle industrielle.

Parmi les conditions nécessaires pour la réussite de la fermentation citrique, est son déroulement en milieu acide. D'après **SADDEK et FOUZI(1993)** les meilleurs rendements sont obtenus à pH 2,5.

Afin d'empêcher la formation d'acides indésirables, un pH bas variant entre 2 et 3 devient impératif lors de la phase de production de l'acide citrique (**BERRY et al., 1977;BOWES, 1980** in **LEDMYA et ERCHICHE, 1992**). **RIVIERE (1975)** in **ZERGAT(1996)** préconisent un pH inférieur à 3,5 pour éviter la formation des acides oxalique et gluconique, d'autant plus que ces valeurs garantissent la stérilité du milieu et préviennent les contaminations éventuelles.

Dans la présente étude, un pH de 3,5 est pris comme valeur initiale (tableau XII-Annexe7). Selon **DJIDDA et al., (2012)** c'est un pH optimal pour une production maximale d'acide citrique.

A partir la lumière de ce qui précède on peut dire qu'un milieu de culture doit constituer une source d'énergie, une source d'aliments (carbone, azote, élément minéraux....etc.) et aussi une source d'oxygène dans le cas des fermentations aérobie (**EL OGAIDI, 1987**in **ZERGAT, 1996**)

Donc le moût de dattes est un bon milieu de culture parce qu'il assure pour l'*Aspergillus niger* une bonne croissance et une bonne production de citrate à cause de leur richesse en éléments essentiels et en quantités équilibrées.

III. Cinétique de la fermentation

La cinétique de fermentation est une étape très importante parce qu'elle permet d'étudier la vitesse de production de cellules microbiennes ou des produits métabolisés par celle-ci dans le temps, en fonction du milieu environnant (ZERGAT, 1996).

III.1. Résultat

III.1.1. Croissance mycélienne

III.1.1.1. Evolution de la croissance

Sur les deux milieux (milieu non enrichi et milieu enrichi), les courbes d'évolution de la croissance mycélienne présentent presque la même allure. Le poids sec évolue progressivement pour atteindre son maximum à la fin de la fermentation, soit 19,15 g/l pour MNE et 37,33 g/l pour ME (Fig 6), (Tableau IX-Annexe 5).

L'évolution de la biomasse de la souche est irrégulière. La croissance mycélienne se déroule en 4 phases (Fig 7) :

La phase de latence n'étant pas apparente, nous pensons que cela serait dû à l'utilisation de spores prégermées.

Au cours de la première étape qui dure 02 jours, la croissance du mycélium est exponentielle. A cette étape les vitesses de croissance du mycélium atteignent leur maximum soit respectivement : 5,98 g/1/j et 12,55 g/1/j pour MNE et ME (tableau IX- Annexe 5)

La seconde étape est caractérisée par la chute des vitesses de croissance qui atteignent 0,32g/1/j après 8 jours pour MNE et 0,25 g/1/j après 10 jours pour ME.

Au cours de la 3^{ème} étape, les vitesses de croissance augmentent de nouveau atteignant 1,02 g/1/j et 1,06 au douzième jour respectivement pour MNE et ME.

La quatrième étape dure 2 jours. Au cours de celle-ci le champignon réduit sa vitesse de croissance qui atteint à la fin de la fermentation 0,17 g/1/j et 0,2 g/1/j respectivement pour MNE et ME.

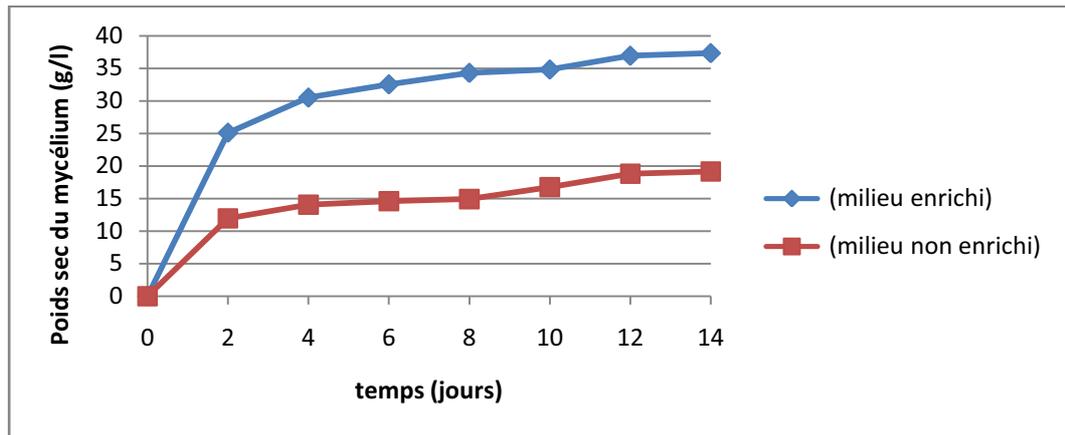


Figure 6: Evolution du poids sec de mycélium au cours de la fermentation.

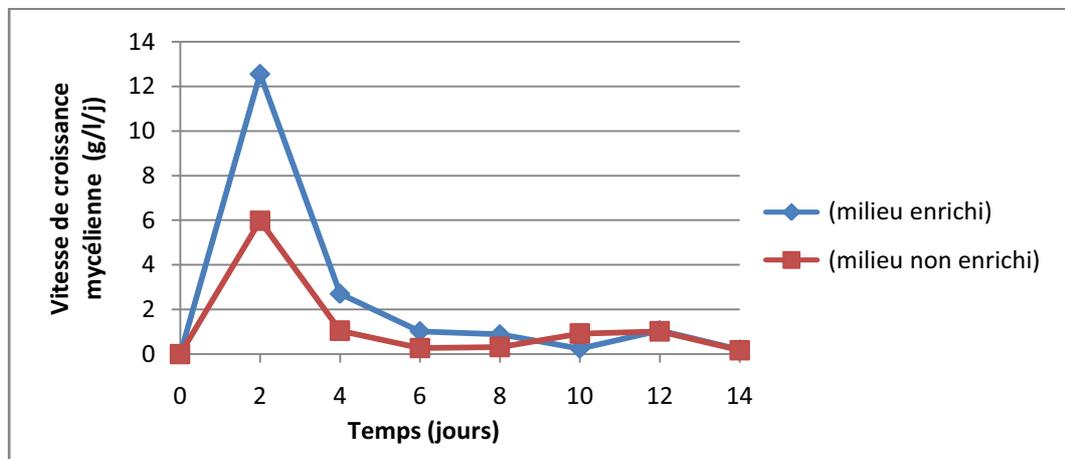


Figure 7: Evolution des vitesses de la croissance mycélienne au cours de la fermentation.

III.1.2. Evolution du pH

Les valeurs du pH enregistrées montrent que le milieu MNE est plus acide que ME (fig 8).

Dans le milieu MNE, après une faible diminution au deuxième jour qui est suivie d'une légère hausse au quatrième jour, le pH chute rapidement pour atteindre 1,92 à la fin de la fermentation (Tableau XII-Annexe 7). La stabilisation du pH autour de 2, a été déjà signalée par **HOSSAIN (1984)** in **ZERGAT (1996)**.

Dans le milieu ME, le pH n'évolue que lentement. Il passe de 3,5 à 3,2 après deux jours de fermentation.

Après une légère hausse enregistrée au quatrième jour, le pH diminue lentement jusqu'au douzième jour pour se stabiliser à 3 à la fin de la fermentation.

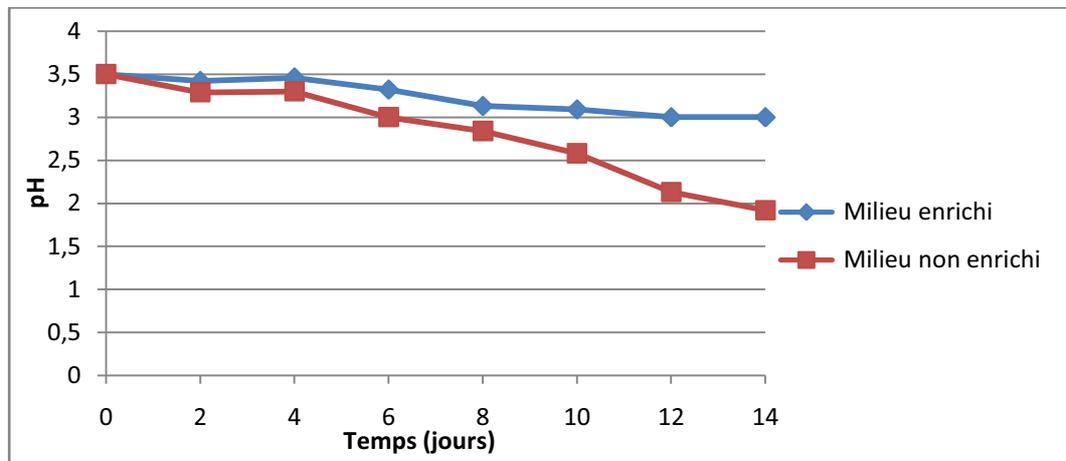


Figure 8: Evolution du pH du moût au cours de la fermentation.

III. 1.3. Evolution des sucres

Généralement, la concentration en sucres dans les deux milieux diminue progressivement à la cours de la fermentation. Cependant, cette diminution est plus rapide dans ME que dans MNE. En effet nous constatons que le champignon a consommé presque la moitié de la quantité initiale des sucres totaux au cours des deux premiers jours de la fermentation dans le milieu ME.

Une grande quantité du sucre est consommé dans les premiers deux jours soit 47,70 g/l et 68 g/l respectivement pour MNE et ME (fig 9), par conséquent les vitesses d'assimilation des sucres atteignent leur maximum au deuxième jour de fermentation soit 22,15g/l/j et 34 g/l/j respectivement pour MNE et ME (Tableau X-Annexe 6).

Nous observons une diminution de la consommation en sucre à partir de 2^{ième} jour jusqu'à la fin de la fermentation.

Les taux des sucres résiduels à la fin de la fermentation sont égaux à 5,02 g/l et 2,6 g/l respectivement pour MNE et ME (Tableau X-Annexe 6).

Les résultats relatifs au MNE se rapprochent de ceux de **HOSSAIN (1984) in ZERGAT (1996)**. Selon lequel le taux de sucre résiduel serait de 7g/l; et **ZERGAT (1996)** qui trouvée 5.6 g/l.

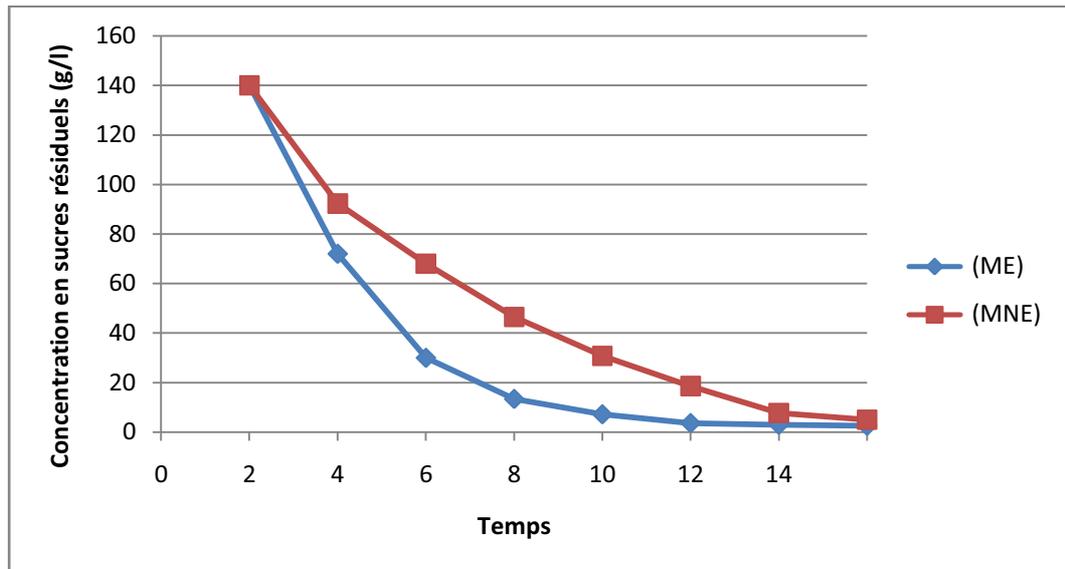


Figure 9: Evolution de l'assimilation des sucres au cours de la fermentation.

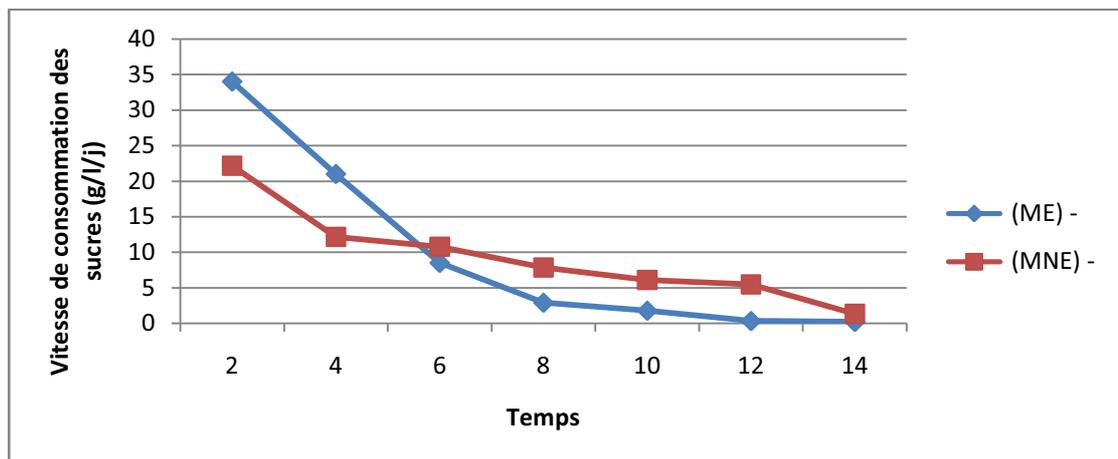


Figure 10: Evolution des vitesses de consommation des sucres au cours de la fermentation.

III.1.4. Evolution de la production de l'acide citrique

Les résultats obtenus lors de la présente étude (fig 11), montrent que la production de l'acide citrique commence vers le 2^{ème} jour de la fermentation pour les deux milieux.

La plus forte production est enregistrée dans le milieu non enrichi MNE soit 92g/l.

La concentration maximale en acide citrique est relevée au 14^{ème} jour pour MNE avec 92g/l et au 10^{ème} jour pour ME avec 1,51g/l (Tableau XI- Annexe 7).

À partir de ces résultats, on remarque que les vitesses de production d'acide citrique varient d'une manière irrégulière au cours de la fermentation.

Elles sont maximales au 14^{ème} jour pour MNE avec 24,17 g/l au 2^{ème} jour pour ME avec 0,75g/l/j.

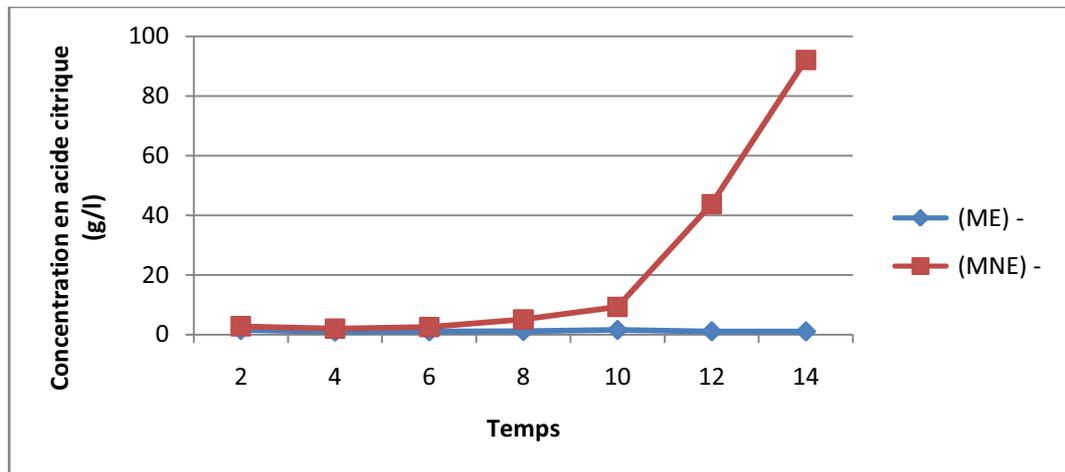


Figure 11: Evolution de production de l'acide citrique au cours de la fermentation.

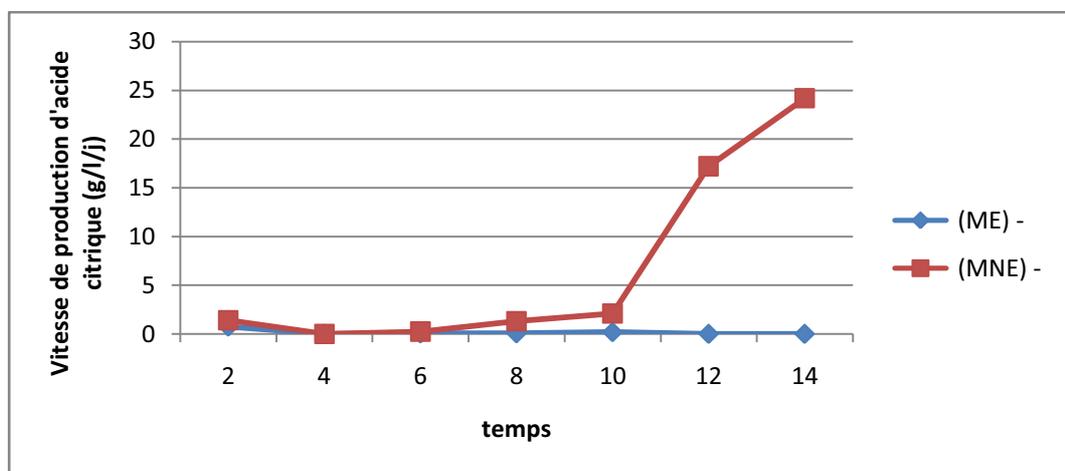


Figure 12: Evolution des vitesses de production d'acide citrique au cours de la fermentation.

Tableau III - Rendement en acide citrique sur MNE et ME

Milieux	MNE (milieu non enrichi)	ME (milieu enrichi)
Rendement%	68.15	0.74

III.2. Discussion

L'analyse des différents paramètres mesurés (fig13-15) et calculés (fig14-16) montre que la production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* se fait en 02 grandes phases consécutives:

- 1- une phase caractérisée généralement par une forte croissance mycélienne ou la biosynthèse du citrate est faible avec une importante consommation en sucres.
- 2- lors de la deuxième phase, le mycélium produit du citrate mais sa croissance est très réduite. Cette phase est marquée d'une diminution progressive du pH.

Dans le cas de cette étude, ces deux phases sont plus distinctes avec le milieu MNE qu'avec le milieu ME.

Nos observations sont en accord avec celles rapportées par de nombreux auteurs (**MARCHAL, 1979** in **LEDMYA et ERCHICHE, 1992**; **WORLD et SUZUKI, 1976**; **CHMIEL, 1975**; **EL OGAIDI ; 1987** in **ZEGAT, 1996**)).

Les deux grandes étapes citées, communes aux 2 milieux de cultures comportent 04 phases successives déterminées par la croissance mycélienne et l'accumulation du citrate.

Après une phase de latence qui est très courte voir nulle du fait de l'utilisation des spores pré germées, nous distinguons une phase I dite phase exponentielle de croissance caractérisée par un accroissement rapide de la masse mycélienne durant les 02 premiers jours.

La consommation en sucre durant ces deux phases est très importante, tandis que le pH est faiblement modifié.

La diminution des vitesses de croissance et de consommation de sucres marquant une phase II appelée phase de perturbation de la croissance. Selon **ZERGAT (1996)**, elle serait due à la perturbation du métabolisme primaire d'*Aspergillus niger* qui résulterait de l'épuisement du milieu en phosphore et en azote. Le phosphore est un élément de base pour la synthèse des acides nucléiques et phospholipidiques membranaires, selon **HONECKER et al., (1989)** une réduction de la synthèse de l'ADN stimule l'accumulation du citrate.

C'est au cours de cette phase que démarre la production d'acide citrique. Le pH chute brusquement traduisant ainsi l'accumulation de citrate dans le milieu. Cette phase est bien apparente en MNE.

Selon **RIVERE (1975)** in **ZERGAT (1996)**; il ya une synthèse de citrate quand le milieu est déséquilibré.

La phase de seconde croissance (phase III) connu par un reprise de la croissance enregistrée dans les 2 milieux; selon **CHMIEL (1975)** in **ZERGAT (1996)**, dans cette phase il y a un déclenchement du métabolisme secondaire d'*Aspergillus niger* induit par la concentration élevée en sucres dans le milieu.

Au cours de cette phase, la vitesse de production atteint son maximum.

La quatrième phase dite phase stationnaire définit par une diminution progressive des vitesse de croissance mycélienne et de la consommation de sucres.

Pendant les deux derniers jours de la fermentation, on observe en milieu ME une diminution de la concentration en citrate, selon **MATEY (1977)** in **ZERGAT (1996)**, ce dernier serait catabolisé par l'*A. niger*.

La stabilisation du pH autour de 2, et la présence de sucres résiduels de l'ordre de 7g/l dans le milieu ont déjà été signalée par **HOSSAIN (1994)**.

Donc le milieu MNE permet de donner des résultats plus intéressants et proches des résultats bibliographiques.

Les quantités de biomasses relevées dans les deux milieux MNE et ME et qui sont égales respectivement à 19.15g/l et 37.33g/l dépassent les 12g/l, marge au dessous de laquelle sont atteint les meilleurs taux d'acide citrique (**BERRY et al., 1977** in **ZERGA T,1996**). Mais la valeur obtenue en MNE se rapproche de 21g/l trouvée par **EL OBEIDI et al., (1981)** in **ZERGAT (1996)** avec lequel ils ont obtenu un rendement de 63%.

Concernant le milieu ME, la forte quantité de biomasse enregistrée 37.33g/l, qui dépasse largement les valeurs préconisées par les auteurs cité précédemment, ainsi que la faible modification du pH en fin de la fermentation indiquent une faible production de citrate (1.51g/l).

Pour le milieu ME, on peut supposer que les sels de magnésium ($MgSO_4$) additionnés permettent au champignon une consommation des sucres d'une façon rapide et excessive en même temps.

En effet, selon **DASGUPTA *et al.*, (1981)** in **BENYAHIA (1992)** le magnésium serait un ion essentiel pour l'utilisation des sucres par le champignon.

D'autre part, les oligoéléments, comme le cuivre, le fer et le zinc que contient le milieu ME ont permis une meilleure utilisation de l'azote et du phosphore additionné au milieu. En effet, selon **KATARINA *et al.*, (1982)** in **ZERGAT (1996)** ;le fer, le zinc et le cuivre aident dans la consommation des sucres, de l'azote et du phosphore.

Donc, en milieu ME le champignon a profité de l'enrichissement pour une meilleure utilisation des constituants du milieu et surtout les sucres pour favoriser sa croissance au dépend de la synthèse du citrate.

Une production de 92 g/l d'acide citrique en MNE se rapproche des valeurs rapportées par **JERNEJC *et al.*, (1982)** in **ZERGAT(1996)**; **SUZUKI *et al.*, (1991)** in **SADDEK et FAOUZI (1992)** à savoir plus de 80g/l et **ZERGAT(1996)** a obtenu 94.4 g/l d'acide citrique.

BOTTON *et al.*, (1985) in **ZERGAT (196)** rapportent une production d'acide citrique de 112g/l. De même **KAROW *et al.*, (1947)** in **BENYAHIA (1992)** et **PING SHU(1947)**; **TRUMPHY et MILLIS (1963)** in **BERRY *et al.*, (1977)** in **ZERGAT (1996)** ont obtenu des quantités d'acide citrique de l'ordre de 100g/l. **DJIDDA *et al.*, (2012)** rapportent une production d'acide citrique de l'ordre 98.42 g/L.

La production enregistrée lors de la présente étude est faible en comparaison avec celles rapportées par la bibliographie, cela pourrait être certainement dû aux contraintes liées à l'expérimentation.

Néanmoins quelque soit les résultats obtenus, le milieu MNE (non enrichi) semble plus intéressant que le milieu ME (enrichi) puisqu'il a permis une meilleure production de citrate.

En outre, il parait d'autant plus intéressant puisqu'il est moins coûteux, d'où son importance sur le plan économique.

• Etude des rendements

Il a été reconnu que les rendements élevés sont obtenus quand il y a arrêt de développement de mycélium et quand le pH est voisin de 2.

Donc le rendement obtenu avec le milieu ME est très faible (0,74%) par contre en MNE le rendement égale à 65,15 % paraît acceptable (Tableau III).

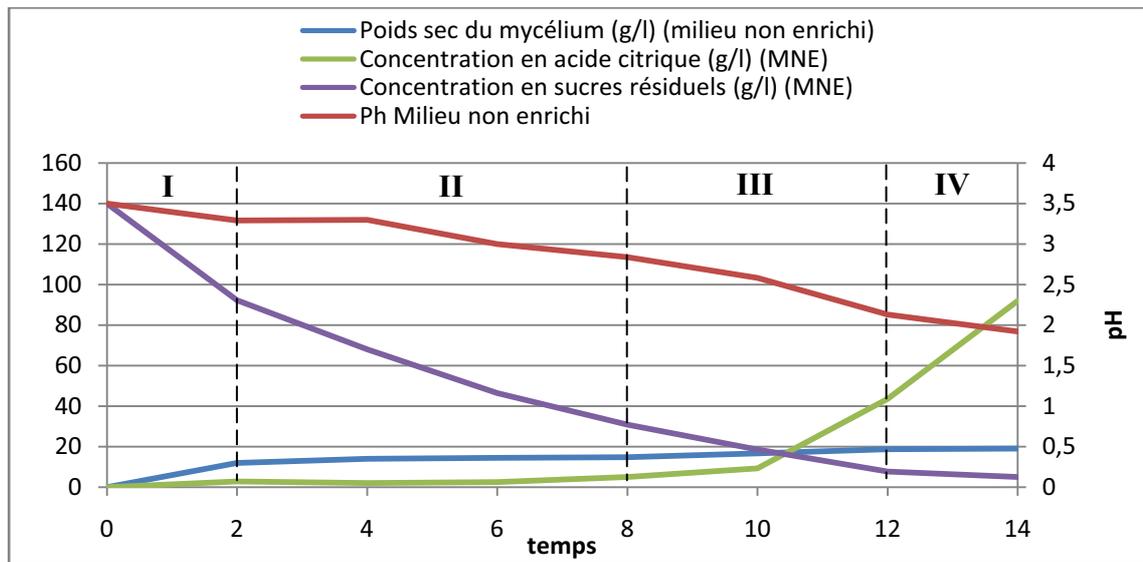


Figure 13: Evolution du poids sec du mycélium, de la concentration en sucre résiduels, de la concentration en acide citrique et du pH dans le milieu non enrichi (MNE).

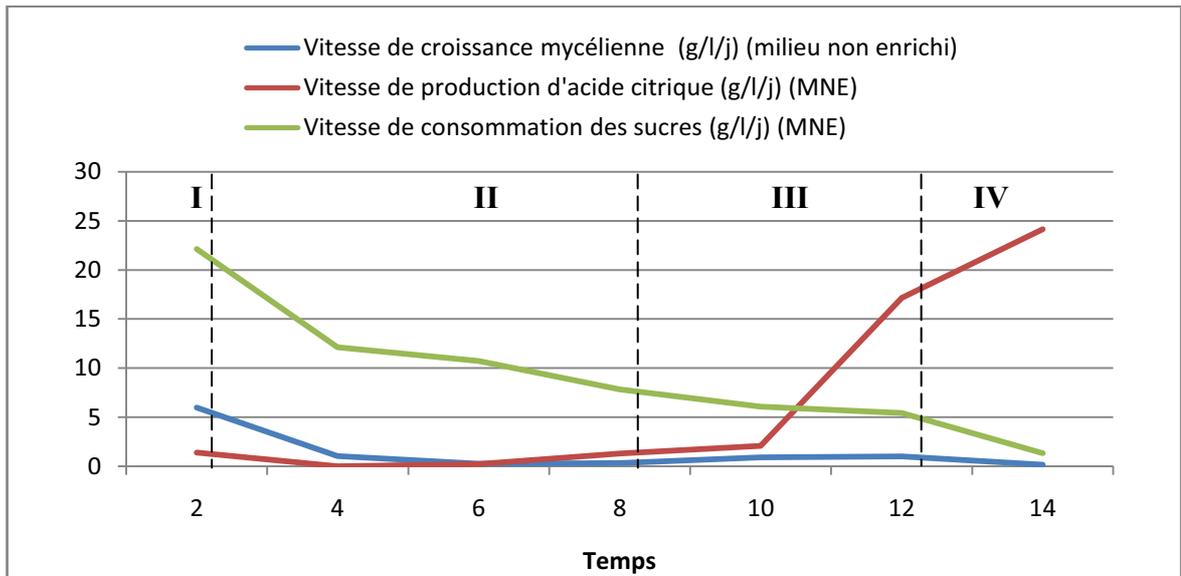


Figure 14: Evolution des vitesses de croissance mycélienne, de consommation des sucres et de production d'acide citrique dans le milieu non enrichi (MNE).

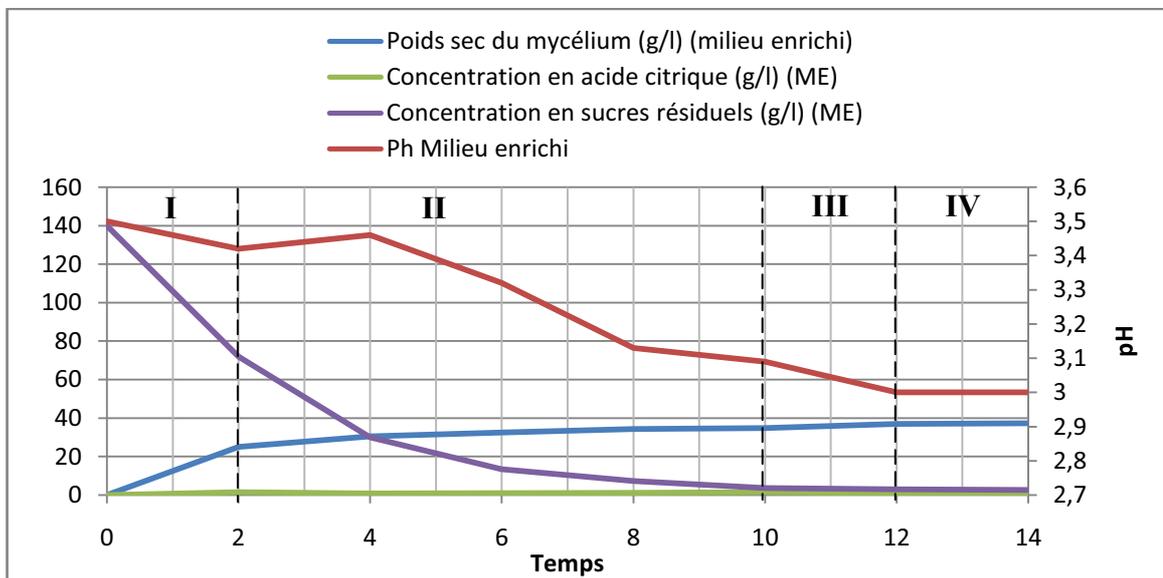


Figure 15: Evolution du poids sec du mycélium, de la concentration en sucre résiduels, de la concentration en acide citrique et du pH dans le milieu enrichi (ME).

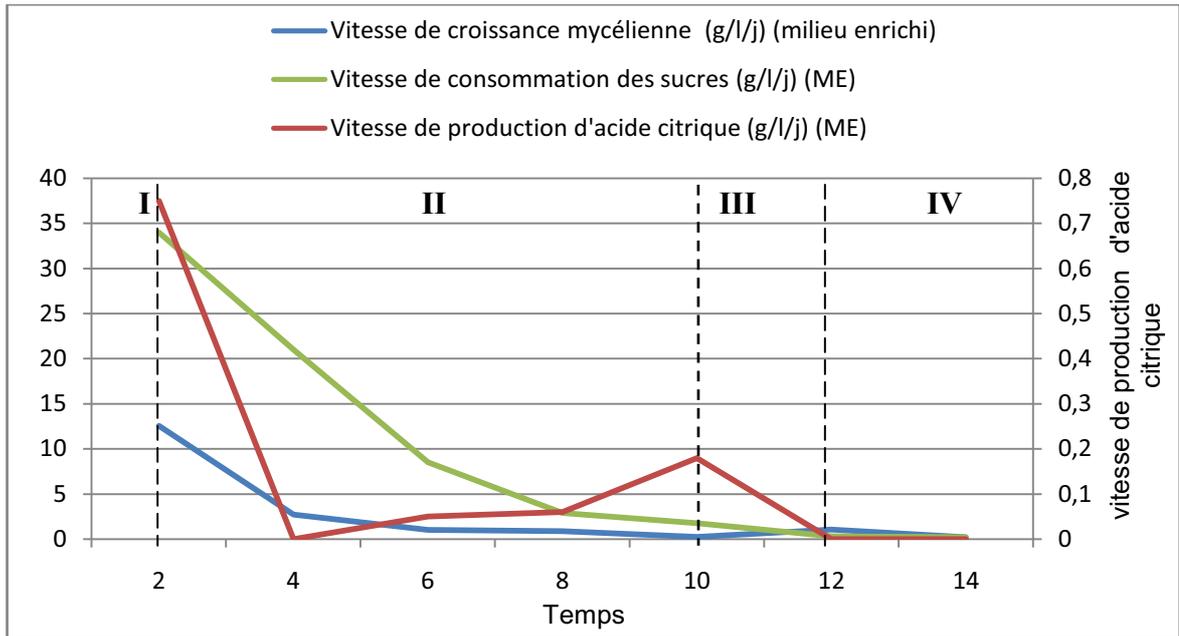


Figure 16: Evolution des vitesses de croissance mycélienne, de consommation des sucres et de production d'acide citrique dans le milieu enrichi (ME).

ANNEXE-1-

Méthode de dosage de l'acide citrique

- **Mode opératoire**

Dans un bain de glace, on introduit un tube à essai contenant 1ml de milieu de fermentation filtré auquel on ajoute 1.3ml de pyridine.

Le mélange agité vivement au vortex, reçoit ensuite 5,7ml de l'anhydride acétique. Après une deuxième agitation de 30 secondes, le tube est transféré dans un bain marie à 32°C.

Le développement de la coloration jaune est complet au bout de 30mn.

Une droite étalon est établie préalablement (fig.-4-) avec des solutions d'acide citrique connues variant de 20mg/l à 200mg/l. (TABLEAU-1-).

Tableau-IV- les valeurs d'étalonnage d'acide citrique

Tubes	Solution Mère (mg/l)	Acide Citrique (mg/l)	H2O (ml)	Pyridine (ml)	Anhydride Acétique (ml)
1	0,0	0	1	1,3	5,7
2	0,1	20	0,9	1,3	5,7
3	0,3	60	0,7	1,3	5,7
4	0,5	100	0,5	1,3	5,7
5	0,7	140	0,3	1,3	5,7
6	0,9	180	0,1	1,3	5,7
7	1	200	0	1,3	5,7

ANNEXE-2-

Tableau -V- composition en éléments minéraux selon (FETHI 1979; RANDOIN *et al* 1985 in KEDRI, 1994) et (MAATALAH, 1970) in ZERGAT (1996) en mg/100g de poids frais

Auteurs Éléments % P. F	FETHI (1979)	RANDOIN (1985)	MAATALAH (1970)
Phosphore	54.8-63.8	50	/
Magnésium	43.8-51	63	63
Fer	1.3-2	2.15	3.1
Manganèse	/	0.3	0.7
Cuivre	0.2-0.8	0.4	/
Zinc	/	0.15	/

Tableau -VI- teneur en éléments minéraux en mg/100g de poids frais des dattes Ghars (KEDRI, 1994).

Eléments Datte	Mg	Fe	Cu	Zn
Ghars	17.38	3.16	1.92	2.1

ANNEXE-3-

Tableau -VII- composition minérale du jus de déchets de dattes (BOUGHNOU, 1988) in ZERGAT (1996)

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-VIII- 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

Légende:

DN: Deglet-Nour

SL: Sba'La'rus

MD: Mech Déglá

GH: Gasb Hlu

TH: Thuri

ANNEXE-4-

Méthode de dosage des sucres (Méthode de Dubois)

a-Extraction des sucres

- Peser 10g de l'échantillon finement broyé et on les mettre dans un bécher de 250ml;
- Ajouter 90ml d'eau distillée;
- L'extraction s'effectue dans un bain marie durant 30mn à 100C° tout en agitant de temps à l'aide d'une baguette en verre;
- Filtrer sur un papier filtre;
- Compléter avec l'eau distillée à 100ml;

b-Clarification:

- Ajouter 10ml d'acétate de plomb pour la destruction des protéines;
- Agiter jusqu'à l'apparition d'un précipité qui se sédimente au fond du bécher;
- Filtrer à l'aide d'un papier filtre.

c-Elimination de l'acétate de plomb:

- Additionner au filtrat 1g de Na₂CO₃ pour précipiter l'acétate de plomb;
- Filtrer la solution afin d'éliminer le plomb précipité;

d-Dilution:

- Diluer la solution jusqu'à 1/100 ppm;

d-Dosage des sucres:

- Ajouter 0,1ml de phénol et 3ml d'acide sulfurique concentré;
- La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre à 490nm.

Annexe -5-

Tableau-IX- Evolution de la biomasse et de la vitesse de la croissance mycélienne au cours de la fermentation dans les deux milieux

Temps	Milieu non enrichi		Milieu enrichi	
	Poids sec du mycélium (g/l)	Vitesse de croissance mycélienne (g/l/j)	Poids sec du mycélium (g/l)	Vitesse de croissance mycélienne (g/l/j)
0	0	0	0	0
2	11.96	5.98	25.1	12.55
4	14.06	1.05	30.5	2.7
6	14.6	0.27	32.54	1.02
8	14.92	0.32	34.30	0.88
10	16.76	0.92	34.81	0.25
12	18.80	1.02	36.93	1.06
14	19.15	0.17	37.33	0.20

Vitesse de croissance mycélienne $= \frac{dx}{dt}$ (g/l.j)

$$\frac{dx}{dt} = \frac{X-X_0}{t-t_0}$$

X= poids sec du mycélium au t

X0 = poids sec du mycélium au t0

Annexe -6-

Tableau-X- Evolution de l'assimilation et des vitesses d'assimilation des sucres au cours de la fermentation dans les deux milieux

Temps	Milieu non enrichi		Milieu enrichi	
	Concentration en sucres résiduels (g/l)	Vitesse de consommation des sucres (g/l/j)	Concentration en sucres résiduels (g/l)	Vitesse de consommation des sucres (g/l/j)
0	140	-	140	-
2	92.3	22.15	72	34
4	68	12.15	30	21
6	46.5	10.75	13.4	8.5
8	30.8	7.85	7.2	2.9
10	18.6	6.1	3.65	1.77
12	7.7	5.45	3.01	0.32
14	5.02	1.34	2.60	0.20

Vitesse de consommation du substrat = $\frac{DS}{Dt}$ (g/l.j)

$$\frac{DS}{Dt} = \frac{S-S_0}{t-t_0}$$

S : concentration de sucre présent au temps t

S₀ : concentration de sucre présent au temps t₀

Annexe -7-

Tableau-XI- Evolution de la production et de la vitesse de production d'acide citrique au cours de la fermentation dans les deux milieux

Temps	Milieu non enrichi		Milieu enrichi	
	Concentration en acide citrique (g/l)	Vitesse de production d'acide citrique (g/l/j)	Concentration en acide citrique (g/l)	Vitesse de production d'acide citrique (g/l/j)
0	-	-	-	-
2	2.80	1.4	1.50	0.75
4	2	0	0.92	0
6	2.49	0.24	1.02	0.05
8	5.1	1.30	1.14	0.06
10	9.26	2.08	1.51	0.18
12	43.65	17.19	1.06	0
14	92	24.17	1.02	0

Vitesse de consommation du substrat = $\frac{DS}{Dt}$ (g/l.j)

$$\frac{DP}{Dt} = \frac{P-P_0}{t-t_0}$$

P : concentration en acide citrique au temps t

P₀ : concentration en acide citrique au temps t₀

Tableau-XII- Evolution de pH au cours de la fermentation dans les deux milieux

Temps	Milieu non enrichi	Milieu enrichi
0	3.5	3.5
2	3.29	3.42
4	3.30	3.46
6	3	3.32
8	2.84	3.13
10	2.58	3.09
12	2.13	3
14	1.92	3

Annexe -8-

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 froter, 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.

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 : $N = (n / V) \times f$

RESUME

Le moût issu des dattes "Ghars" constitue un milieu riche en sucres pour la culture "submergée" d'une moisissure *Aspergillus niger* pour produire l'acide citrique.

Dans ce travail, nous avons étudié la possibilité de substituer la mélasse par une matière première disponible localement: les dattes. L'effet de l'enrichissement minéral du moût en $MgSO_4$: 0,15g/l; en $Kh_2 PO_4$: 0,3g/l et l'enrichissement azoté: 1g/l d'urée a été étudié.

Les résultats permettent un bon rendement en biomasse (37.33g/l) et une faible production d'acide citrique de l'ordre de (1.02g/l) dans le milieu enrichi. En revanche le milieu non enrichi donne une production plus forte d'acide citrique de l'ordre de (92g/l) et un faible rendement en biomasse (19.15g/l)

Mots clés: Moût -Ghars- Datte- Culture submergée - *Aspergillus niger* - Acide citrique.

انتاج حامض الليمون بواسطة *Aspergillus niger* مزروعة في وسط تمرى، نوع غرس

ملخص

يعتبر العصير المستخلص من التمر (غرس)، وسطا ملائما لإنتاج حامض الليمون من خلال الزراعة المغمورة.

للفطر *Aspergillus niger*.

في هذا العمل درسنا إمكانية استبدال دبس السكر بمادة أولية تنتج محليا ألا وهي التمر و أثر إضافة الأملاح المعدنية التالية:

* كبريتات المغنيزيوم : 0.15 غ/ل.

* ديهيدروجنفسفات البوتاسيوم: 0.3 غ/ل.

* ومصدر آزوتي (يوريا): 1 غ/ل.

أظهرت النتائج أن الوسط المستفيد من الإضافة م.م.م. أعطى محصول جيد من الكتلة الحيوية (37.33 غ/ل)، وانخفاض في إنتاج

حامض الليمون في حدود (1.02 غ/ل) بالمقابل فإن الوسط م.غ.م. غير المستفيد من الإضافة أعطى إنتاجا أعلى من حامض

الليمون في حدود (92 غ/ل) وانخفاضا في عائد الكتلة الحيوية (19.15 غ/ل).

كلمات مفتاح:

عصير – غرس – التمر- الزراعة المغمورة - *Aspergillus niger* - حمض الليمون.

Citric acid production by Aspergillus niger grown on medium based on date, variety "Ghars"

ABSTRACT

The resulting mash of dates "Ghars" is a rich medium for growing sugar "submerged" in a mold *Aspergillus niger* to produce citric acid. In this work, we studied the possibility of molasses substituted by a locally available raw material: dates. The effect of mineral enrichment wort $MgSO_4$: 0.15 g / l in $Kh_2 PO_4$: 0.3 g / l and nitrogen enrichment: 1g / l of urea was investigated.

The results give a good yield of biomass (37.33g / l) and low production of citric acid in the range of (1.02g / l) in the enriched environment . In contrast, the non-enriched environment gives higher production of citric acid in the range of (92g / l) and low biomass yield (19.15g / l)

KEY WORDS: Must – Ghars – Date - Submerged Culture - *Aspergillus niger* - Citric Acid.