

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Biotechnologie Microbienne



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

**Optimisation d'un milieu de culture à
base de mélasse pour la production d'une
souche d'haloarchée**

Présenté par :

AMGHAR Zahir & REZKELLAH Samir

Soutenu le : 20/06/2017

Devant le jury composé de :

Mme BOUCHERBA MCA Examinatrice

Mme IDRES MAA Encadreur

Mme ARKOUB MCB Président

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous remercions Allah, le tout puissant pour nous avoir donné le courage d'avancer et d'achever ce travail.

On remercie, tous les membres du jury ; Mme BOUCHERBA, et Mme. ARKOUB pour le temps et l'intérêt qu'ils ont accordé à ce modeste travail.

Nous exprimons notre respect et gratitude pour Mme IDRES, pour avoir accepté de nous encadrer et avoir assisté notre travail avec Bienveillance.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères au personnel de CEVITAL, pour nous avoir encadrés durant notre stage au niveau du complexe CEVITAL. Ainsi qu'à tous le personnel de laboratoire sucre 3000 T/J, pour leurs enseignements et surtout leur modestie et simplicité, un grand merci.

Un remerciement particulier

Et l'ingénieur du laboratoire Génie biologique.

Un merci sincère est adressé à nos enseignants, qui nous ont accompagnées tout au long du premier semestre, même toute l'année. Sans oublier de remercier les personnes les plus importantes dans nos vies, nos très chers parents, pour leur soutien et leur amour inconditionnels.

Un immense merci à vous.

Enfin un merci venant du fond du cœur à toute personne ayant contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

La mémoire de mon père.

Ma mère,

qui a été toujours là pour moi.

Mes frères, ma sœur

Et leurs enfants.

Ma chère femme et ma princesse Naila.

Toute ma famille.

A tous mes collègues du travail au sein de CEVITAL

Particulièrement le quart D.

Toute notre promo M2 BM.

A mon ami Mr DJEUDI

Ainsi qu'à tous mes autres amis sans exception.

Et enfin à ami Mr REZKELLAH Samir

et sa famille.

Zahir

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mon père, mes frères et sœurs Sabrina, Amal, Halim,

Nadir, Nassim, Billal et Amine

A mon épouse et mes deux anges Melissa et Zakaria

A mes amis Ferhat et Fares

A mon binôme et ami Zahir et sa famille

A toute la promotion biotechnologie microbienne

2016/2017

.

Samir

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : recherches bibliographiques	
I. La mélasse.....	2
I.1. Définition.....	2
I.2. les différents types de mélasse.....	2
I.2.1. Mélasse de betterave sucrière.....	2
I.2.2. Mélasse de canne à sucre.....	2
I.3. Propriétés physico-chimique des mélasses.....	2
I.4. Les contaminants de la mélasse.....	3
I.5. Domaines de valorisation de la mélasse.....	4
II. Les Haloarchées.....	4
II.1. Historique	4
II.2. Définition des halophile.....	4
II.3. Les archées halophiles extrême.....	5
II.3.1. Caractéristique générales des archées halophile extrême.....	5
II.3.2. Caractères culturels.....	5
II.3.3. Caractères morphologiques.....	5
II.3.4. Demandes nutritionnelles.....	6
II.4. Les conditions de culture des halophiles.....	6
II.4.1. La température de croissance.....	6
II.4.2. Le pH optimal de croissance.....	6
II.5. Intérêt des archées halophiles.....	6
II.5.1. Production de biosurfactants.....	6
II.5.2. Production d'enzymes.....	7
II.5.3. Autres métabolites produits par les archées.....	7
III. Plans d'expériences.....	7
III.1 Définition.....	7
III.2. Notion d'espace expérimental.....	8
III.3. Plans de Plackett et Burman.....	9
III.4. Notion de surface réponse (RSM).....	9

Chapitre : Matériel et Méthode

I. Matériel.....	11
I.1. La mélasse.....	11
I.2. Matériel biologique.....	11
I.3. Milieux de culture.....	11
I.4. Appareillages et réactifs.....	11
II. Méthodes.....	11
II.1. Analyse Physico-chimiques de la mélasse.....	11
II.1.1. Le Brix.....	11
II.1.2. La polarisation.....	12
II.1.3. Détermination de la pureté.....	12
II.1.4. Détermination du pH.....	12
II.1.5. Tests complémentaires.....	13
II.2. Culture des souches d'haloarchées.....	13
II.2.1. Préparation de la pré-culture.....	13
II.2.2. Culture.....	13
II.2.3. Estimation de la croissance.....	13
II.2.3.1. Mesure de densité optique (DO).....	13
II.2.3.2. Estimation du volume des culots.....	13
II.2.3.3. Extraction et dosage des pigments membranaires.....	13
II.2.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des haloarchées.....	14
II.2.4.1. Préparation du germe cible.....	14
II.2.4.2. Dépôt des échantillons expression et expression des résultats.....	14
II.3. Préparation d'un milieu de culture à base de mélasse.....	14
II.3.1. Détermination d'une source d'azote idéale pour les haloarchée.....	14
II.4. optimisation de la croissance par les plans factoriels.....	15
II.4.1. Plan fractionnaire de criblage.....	15

Chapitre : Résultats et Discussion

I. Analyse physico-chimique de la mélasse.....	16
I.1. Caractéristique physicochimique de la mélasse.....	16
I.2. Composition en sucre de la mélasse déterminée par HPLC.....	16
II. Optimisation d'un milieu de culture à base de mélasse pour la production d'Haloarchées.....	17
II.1. Culture en tubes de souches d'haloarchées sur milieux à base de mélasse additionnés de NaNO ₃ ou de NH ₄ Cl.....	17
II.1.1. Cultures en tubes sur milieu à 2,5% de mélasse avec le NaNO ₃ ou le NH ₄ Cl.....	17
II.1.2. Cultures en tubes sur milieu à 5% de mélasse avec le NaNO ₃ ou le NH ₄ Cl.....	19
II.1.3. Cultures en tubes sur milieu à 10% de mélasse avec le NaNO ₃ ou le NH ₄ Cl.....	20

II.2.Détermination de l'activité antibiotique dans les surnageants de culture.....	21
II.3. Extraction des pigments membranaires.....	21
II.4.Détermination d'une source d'azote pour la réalisation du plan d'optimisation.....	23
II.5.Détermination des facteurs influençant par un plan fractionnaire de criblage.....	24
II.5.1. Elaboration d'un modèle pour la croissance.....	24
II.5.2.Test de signification des coefficients.....	25
II.5.3.Validation du modèle.....	27
II.5.4.Optimisation de la croissance.....	28
Conclusion.....	30

Aconit : Plante de la famille des renonculacées

Aconitique : Relatif à un acide dérivé de l'aconit et de nombreux végétaux

Albumine : Élément protéinique présent dans les produits laitiers et les œufs

Amide : Dérivé de l'ammoniac

Aminoacide : Corps ayant une fonction amine, constituant des protéines

Bactériorhodopsine : Combinaison d'une protéine membranaire et d'un pigment caroténoïde contribuant à transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique

Bétaïne : Composé ionique dipolaire, dérivé triméthylé du glycolle, que l'on trouve dans la betterave (lycine)

Biosurfactant : Molécule amphiphile à action détergente produite par des micro-organismes

Caroténoïdes : Pigment constitué d'isoprènes

Chlorine : Un noyau aromatique hétérocyclique constitué de trois cycles pyrole et d'un cycle azoline

Chlorite : Sel d'acide chloreux

Diène : Hydrocarbure ayant deux doubles liaisons carbone-carbone

Halocines : composés antimicrobiens de nature protéique ou peptidique

Halophile : Vivant sur un sol salé

Isoprène : Diène qui sert à la fabrication de nombreux polymères

Itaconique : Acide méthylène succinique

Rhodopsine : Protéine constitutive du pourpre rétinien

Succinique : Acide présent dans de nombreux végétaux et qui joue un rôle important dans les réactions couplées d'oxydation et de réduction

ATP: Adénosine Triphosphate

DO: Densité Optique

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

H7: Halocline 7

K: Constante

Kcal: kilo calories

KCl: Chlorure de potassium

M : Milieu

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MH : Milieu pour Halorubrum

Mol : Mole

MS : Matière sèche

NaCl: Chlorure de sodium

NaNO₃ : Nitrate de sodium

NH₄Cl: Chlorure d'ammonium

nm : Nanomètre

Pol : Polarisation

rpm : Rotation par minute

S : Souche

SS : Solution saline

T: Tonne

V/V: volume/volume

W/V: poids/volume

xi : niveau attribué au facteur i

°Z : degré Zeiman

Titre	Page
Figure 1: Domaine de variation du facteur.	8
Figure 2: Domaine d'étude pour deux facteurs. Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.	8
Figure 3 : Représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse	9
Figure 4 : Absorbances à 600nm des cultures d'Haloarchées sur milieux à 2.5% de mélasse avec le NaNO ₃ ou NH ₄ Cl	18
Figure 5 : Croissance des 08 souches d'haloarchées en tubes sur milieux à 5% de mélasse avec le NaNO ₃ ou NH ₄ Cl	20
Figure 6 : Croissance des 08 souches d'haloarchées en tubes sur milieux à 10% de mélasse avec le NaNO ₃ ou NH ₄ Cl	21
Figure 7 : Caractéristique des caroténoïdes chez <i>Haloarcula japonica</i> .	23
Figure 8 : Diagramme d'effets en Pareto	26
Figure 9 : Courbes des effets principaux	26
Figure 10 : Courbes des résidus	27
Figure 11 : Courbes iso-réponses	29

Titre	Page
Tableau IV: Composition des milieux à base de mélasse avec le NaNO_3 ou le NH_4Cl	15
Tableau VI : Facteurs et domaines expérimentaux du plan de criblage	15
Tableau VII : Caractéristiques physico-chimiques de la mélasse prélevée au niveau des bacs 35T3 et 35T4	16
Tableau VIII : Composition en sucres de la mélasse	17
Tableau IX : Observations à l'œil nu des cultures en tubesensemencées sur des milieux à 2.5% de mélasse avec le NH_4Cl ou NaNO_3	18
Tableau X : Observations à l'œil nu des cultures en tubesensemencées sur des milieux à 5% de mélasse avec le NH_4Cl ou NaNO_3	19
Tableau XI : Observations à l'œil nu des cultures en tubesensemencées sur des milieux à 10% de mélasse avec le NH_4Cl ou NaNO_3	20
Tableau XII: Pics et absorbances des pigments membranaires des cultures d'haloarchées cultivées sur mélasse	22
Tableau XIII: Matrice des expériences et résultats expérimentaux	24
Tableau XIV : ANOVA de la croissance	25
Tableau XV: ANOVA analyse de la variance	28

Liste des tableaux en annexes

Titre	Annexe
Tableau I : Composition chimique de la mélasse	I
Tableau II: Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au sel	II
Tableau III: Les souches d'Haloarchées utilisées	III
Tableau V: Plan fractionnaire de criblage	VI

Introduction

L'industrie agroalimentaire engendre des déchets très variés potentiellement valorisables, ce qui leur donne une dimension de coproduits. Ils représentent une excellente source d'énergie propre, leur confèrent une forte valeur ajoutée. La revalorisation des déchets de l'industrie permet de concilier bénéfices économiques et protection de l'environnement.

L'industrie de raffinage de sucre est un secteur de l'industrie agroalimentaire particulièrement présent dans la région de Bejaia. Elle engendre la mélasse comme principal coproduit.

En effet, cette dernière est un excellent substrat de par sa richesse en sucre et en minéraux qui pourrait être utilisé dans les bioprocédés pour produire que ce soit la biomasse, les acides organiques ou les alcools (**Curtin, 1983**).

Les haloarchées sont des microorganismes halophiles extrêmes, non pathogènes (**Robinson et al., 2005 ; Eckburg et al., 2003**). Ils exigent un minimum de 150 g/l de NaCl pour leur croissance (**Cavicchioli et al., 2003**).

Selon **Oren (2002)**, les haloarchées présentent un intérêt biotechnologique considérable tant en production de biomasse et d'enzymes (**Margesin et Shinner, 2001**), ou encore de métabolites comme les halocines (**Shand et Leyva, 2007**), ainsi que divers pigments membranaires, bactériorhodopsine, caroténoïdes, halorhodopsine (**Kanekar et al., 2012 ; Rodrigo-Banos et al., 2015**).

Dans ce travail nous avons essayé d'optimiser un milieu de culture à base de la mélasse de CEVITAL pour la production d'haloarchées et éventuellement, la production d'halocines et de pigments caroténoïdes.

Notre travail est divisé en deux (2) parties :

Une partie bibliographique portant sur la mélasse, les haloarchées et les plans d'expériences.

Une partie pratique dans laquelle nous avons en premier lieu, cherché la source d'azote ayant une influence significative sur la croissance des souches d'haloarchées cultivés sur milieu à base de mélasse. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'optimiser la croissance d'une souche d'archées par la méthode des plans d'expériences en variant les valeurs des facteurs jugés plus influents. Et on a terminé par une conclusion

I : La mélasse

I.1. Définition

La mélasse est un coproduit visqueux issu du processus de fabrication de sucre et contient environ 40% à 60% de saccharose fermentescible par des microorganismes (Dumbrepatil et al., 2008). Elle est de couleur sombre de densité moyenne 1,4. Sa production est estimée à 4% des tonnages des usines de betterave et de canne à sucre (Seidali et al., 2016).

I.2. Différents types de mélasse

I.2.1. Mélasse de la betterave sucrière

Un coproduit issu de la fabrication du sucre provenant de betterave sucrière *Béta Vulgaris* (Bernard et al., 1991). Sa teneur en matières sèches varie entre 70 et 76 %. Elle contient essentiellement des sucres totaux, saccharose, à hauteur de 59 à 70 % de la matière sèche. La moitié de la matière organique du « non sucre » de la mélasse correspond à des matières azotées totales solubles (8 à 15 % de la MS) dont une majeure partie se trouve sous forme de bétaine (5 à 7 % de la MS). On retrouve une faible teneur en cellulose brute et en matières grasses (Novak, 2004).

Selon Willay, (2010), neuf étapes principales permettent d'extraire le sucre contenu dans les betteraves : la récolte, le lavage, le découpage en fines cossettes, la diffusion, la filtration, la décoloration, l'évaporation, la cristallisation. Il convient que le coproduit résultant subisse une série d'épuisement jusqu'à l'obtention de la mélasse.

I.2.2. Mélasse de canne à sucre

Un coproduit issu de la fabrication ou du raffinage du sucre provenant de la canne à sucre *Saccharum officinarum*, où la teneur en sucre totaux est supérieur à 46%, l'humidité est de 27%, la densité est supérieure à 79,5°Brix, le pH varie entre 4 et 6 (Bernard et al., 1991).

I.3. Propriétés physico-chimique des mélasses

La composition chimique est influencée par divers facteurs comme le type de sol, la température, l'humidité, la saison de production, les procédés de production, la plante d'origine et les conditions de stockage. Par conséquent, des variations considérables

peuvent exister en nutriments, arômes, colorants, viscosité et sucres totaux (**Curtin et al., 1983**). La composition chimique de la mélasse est donnée dans le **tableau I, en annexe I**.

➤ **Le Brix**

Il représente le pourcentage de la matière sèche qui comprend les sucres (le saccharose, le glucose, le fructose, le raffinose) et les non-sucres (**Curtin et al., 1983**).

➤ **Les Sucres**

Tous les types de mélasses contiennent des quantités relativement élevées en sucres totaux qui constituent leurs principales valeurs nutritionnelles (**Curtin et al., 1983**).

➤ **Les protéines**

Les différentes mélasses contiennent des quantités significatives de produits azotés non protéiques tels que les amides, les albuminoïdes, les aminoacides et des composés azotés simples avec des quantités minimales de protéines (**Curtin et al., 1983**).

➤ **Les minéraux**

Les mélasses de canne ou betterave contiennent des minéraux comme le potassium, le magnésium, le sodium, les chlorures et les sulfures ainsi que des traces de fer, de manganèse, du zinc et du cuivre. En général, celle de canne est plus riche en calcium, phosphore et chlorures et celle de betterave en potassium et sodium (**Curtin et al., 1983**).

➤ **Les vitamines**

Les mélasses contiennent des ensembles de vitamines B fortement actives (**Bernard, 2014**). Par conséquent, les teneurs vitaminiques des mélasses finales dépendent étroitement des processus d'extraction de sucre (**Curtin et al., 1983**).

I.4. Les contaminants de la mélasse

Les contaminants de la mélasse sont très rares. Du fait de sa concentration et de sa forte pression osmotique, qui ne permet pas aux microorganismes de se développer. D'autre part les longs traitements thermiques et chimiques appliqués en sucrerie contribuent aussi dans la réduction de la population microbienne (**De Miniac, 1991**).

I.5. Domaines de revalorisation de la mélasse

Selon **Arzate, (2005)** ; **Visser et Frederiks, (2006)**, la mélasse est utilisée pour la culture des levures ainsi que, pour la production de divers produits, tels que l'acide acétique (vinaigre), le glycérol, l'acide aconitique, le glutamate, la dextrane, l'acide itaconique, la lysine et l'éthanol (distillation après fermentation).

L'acide citrique est produit par fermentation d'hydrates de carbones présent dans la mélasse, par *Aspergillus niger* (**Kessas et al., 2012**).

La mélasse est introduite dans l'alimentation de bétail. Tel que les ruminants et les chevaux, sous forme d'un mélange avec le son, ou comme liant dans les rations complétés, ou encore pour favoriser l'ingestion d'aliment peu appétibles (**Bernard et al., 1991**) Cité par (**Novak, 2004**).

II : Les haloarchées

II.1. Historique

Les premières bactéries rouges ont été décrites pour la première fois en 1879 par Poulsen et fortement étudiées jusqu'à 1915 en raison de leur importance économique (**Vreeland, 1992**). En 1977, **Woese** et ses collaborateurs caractérisent un groupe d'organismes éloigné des eucaryotes et des bactéries. D'abord prénommé archéobactéries, ce groupe fut ensuite appelé archée (**Woese et al., 1990**).

II.2. Définition des halophiles

Les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes « qui aime le sel », ils se retrouvent dans les trois domaines de vie **Archeae**, **Eukarya**, **Eubacteria**.

Les halophiles se distinguent par leur exigence de concentrations de sel pour se développer (**Ventosa et al., 1999**), la distinction entre les différents groupes de microorganismes halophiles est basée sur leur niveau d'exigence ou de tolérance au sel (**Kushner, 1992**) (Tableau II en annexe II).

II.3. Les archées halophiles extrêmes

Les archées halophiles extrêmes exigent la présence de concentration saline très élevées (1,5 à 5 M) en NaCl (Oren, 2006), avec un optimum de croissance entre 3,4 M à 4,2 M (20 à 25o/o NaCl) (Yachai, 2009). Les Archées halophiles qualifiés d'extrêmes occupent les écosystèmes à haute salinité, les lacs salés, les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau, conduisant à l'obtention de sel marin. Certaines espèces ont besoin pour croître d'un environnement dix fois plus salé que l'eau de mer (Noll, 1992). Leur paroi cellulaires, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

II.3.1. Caractéristiques générales des archées halophiles extrêmes

Les archées halophiles extrêmes sont représentées par deux familles, *Halobacteriaceae* et *Methanosarcinaceae*, cette dernière regroupe les halophiles extrêmes méthanogènes anaérobies représentés par deux genres, *Methanohalobium* et *Methanohalophile* (Kamekura, 1998). Les archées appartenant à l'ordre des *Halobacteriales*, famille de *Halobacteriaceae* sont considérées comme des halophiles par excellence (Oren, 2002).

II.3.2. Caractères cultureux

Les membres de la famille des *Halobacteriaceae* forment des colonies de couleur rouges, roses, ou pourpres, et très rarement incolores. La coloration est due à la présence de pigments caroténoïdes (pigments qui jouent un rôle de protection contre les rayons du soleil) (Hezayen et al., 2002).

II.3.3. Caractères morphologiques

Les Haloarchées sont des Gram négatifs. Elles peuvent avoir diverses formes (cocci, bacille, triangles, sphère, etc.) (Grant et al., 2001). Elles peuvent être immobiles ou mobiles grâce à des flagelles (Prescott et al., 2003). Ce sont des microorganismes caractérisés par leurs lipides uniques qui contiennent des groupes phytanyl liés au glycérol par une liaison éther plutôt que par des acides gras connectés par des liaisons esters. Les liaisons éthers sont plus résistantes que les liaisons esters à l'effet de la température,

l'oxydation, et la dégradation enzymatiques. De plus, les acides gras sont substitués, chez la plupart des archées par des chaînes latérales d'isoprénoïdes (Perry *et al.*, 2004).

II.3.4. demandes nutritionnelles

Le métabolisme des haloarchées est considérablement diversifié, certaines espèces utilisent des carbohydrates comme *Haloarcula marismortui* et *Haloracula saccharolyticus*, dont des hexoses (glucose et fructose), des pentoses (xylulose), saccharose et lactose, d'autres espèces sont incapables de dégrader des sucres. Dans ce cas, elles utilisent des acides aminés ou composés typiques d'habitats hyper salins (Falb *et al.*, 2008).

II.4. Les conditions de cultures des halophiles

II.4.1. La température de croissance

La température optimale de 63% des espèces archée halophiles extrême se situe entre 38- 40°C (Bowers *et Wiegel*, 2011). Les laboratoires utilisent des températures d'incubation de 35°C à 40°C (Torreblanca *etal.*, 1986).

Lors de l'incubation des souches sur milieux solides, il est préconisé de les maintenir dans des sachets ou des récipients en plastique, pour éviter le dessèchement de la gélose (Dyall-Smith, 2006).

II.4.2. Le pH optimal de croissance

Un pH neutre semble être le mieux pour la croissance des haloarchées non alcalophiles (pH de 7,2 à 7,5). Pour les halo-alcalophiles, leur pH optimal s'étend entre 8,5 et 9,5 (Dyall-Smith, 2006).

II.5. Intérêt des archées halophiles

II.5.1. Production de biosurfactants

Les Archées halophiles peuvent être utilisées pour la dépollution des environnements par la dégradation des polluants organiques, et dans le traitement des eaux résiduaires concentrées du textile. La production de biosurfactants par les halophiles peut jouer un rôle important dans la dépollution accélérée des environnements salins pollués par les huiles (Joo *et Kim*, 2005).

Les archées sont utilisées pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium) lorsque les concentrations initiales de minéraux sont faibles et les procédés chimiques conventionnels non rentables (**Querellou, 2010**).

II.5.2. Production d'enzymes

Plusieurs enzymes halophiles ont été testées pour des applications biotechnologiques potentielles à savoir des amylases, des nucléases, et des protéases (**Oren, 2002**). Ces enzymes sont fonctionnelles sous des concentrations de sel élevées où la plupart des protéines sont précipitées ou dénaturées (**Joo et Kim, 2005**).

II.5.3. Autres métabolites produits par les archées

La bactériorhodopsine est une protéine ayant une structure similaire à la rhodopsine de la rétine humaine d'où son utilisation dans la fabrication de rétines artificielles et de modulateurs de lumière spatiale. Cette protéine joue le rôle d'une pompe qui permet la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique (ATP). En effet, elle peut être incorporée dans des membranes synthétiques pour la génération de l'électricité à partir de la lumière solaire (**Oren et al., 1997**).

Certains solutés organiques, comme l'ectoïne, sont produits à des concentrations élevées à l'intérieur de beaucoup de micro-organismes halophiles en tant qu'osmorégulateurs. Ces substances sont utilisées comme des stabilisants des biomolécules (enzymes et ADN) (**Joo et Kim, 2005**).

Les halocines ont une application dans les domaines alimentaires, pharmaceutique et clinique. L'halocine H7 est utilisé pour protéger le myocarde contre l'effet néfaste des perfusions et le rejet d'organe transplantés (**O'connor et Shand, 2002**).

III : Plans d'expériences

III.1. Définition

Un plan d'expérience est une série d'essais sélectionnés qui offre une stratégie optimale, permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais (**Ozil, 1997**).

Selon (Goopy, 2005), la méthode des plans d'expériences a pour but de déterminer et d'établir les liens entre deux types de variables :

La réponse : Grandeur étudiée ou grandeur d'intérêt.

Les facteurs : Grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influencé sur les variations de la réponse.

III.2. Notion d'espace expérimental

La réponse dépend de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 1). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée **niveau**. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

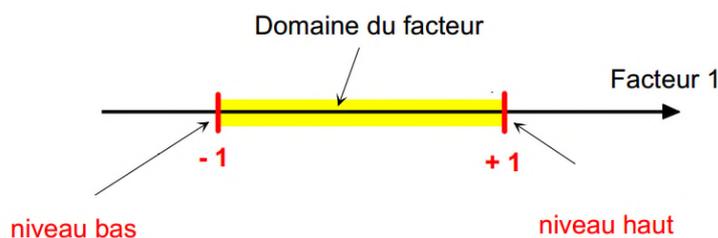


Figure 1: Domaine de variation du facteur (Goopy, 2006).

Lorsqu'un second facteur est mis en jeu, il est représenté lui aussi par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé **l'espace expérimental** (Figure 2) (Goopy, 2006).

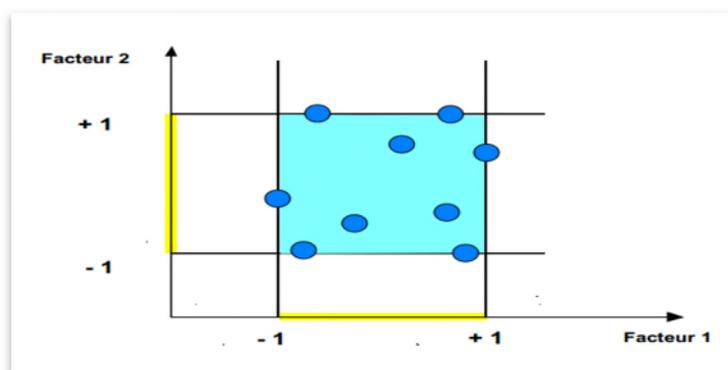


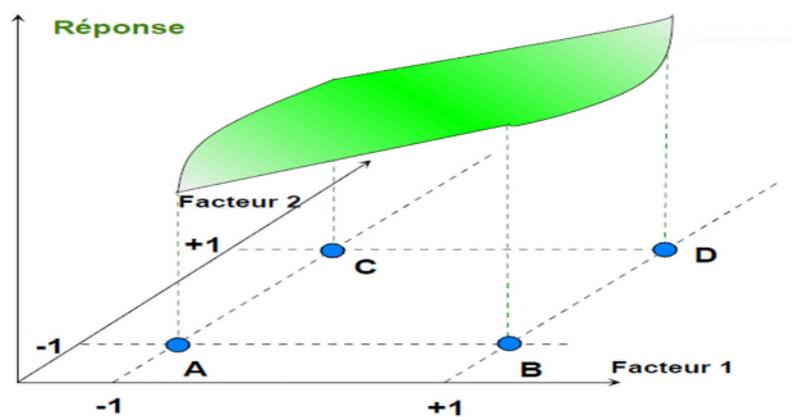
Figure 2: Domaine d'étude pour deux facteurs. Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur (Goopy, 2006).

III.3. Plans de Plackett et Burman

Les plans de Plackett et Burman sont des plans de criblage permettant la caractérisation des facteurs influençant les variations de la réponse. Ces plans utilisent le logiciel statistique Minitab 16.0 basé sur des matrices d'expériences dont les facteurs ne prennent que deux niveaux soit (-1) ou (+1) (Vimalashanmugam et Viruthagiri, 2013).

III.4. Notion de surface réponse (Réponse Surface Methodology)

La méthodologie de « surface réponse » est une collection de techniques mathématiques statistiques utilisée afin de construire des modèles statistiques, dans le but d'optimiser la production de composés importants à l'échelle industrielle comme les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques ... etc. Le modèle de « Box – Behnken, 1960 » est une approche très efficace pour l'optimisation statistique des facteurs influençant la réponse (Xianoyonget *al.*,2010). Les niveaux (x) représentent les coordonnées d'un point expérimental et (y) est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 3) (Goupy, 2006).



A, B, C et D : points du domaine d'étude.

Figure 3 : Représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse

(Goupy,2006).

Selon (**Rabier, 2007**), La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-après :

$$\eta = \alpha_0 + \sum_{i=1}^k \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^k \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \alpha_{ij} x_i x_j$$

k : désigne le nombre de facteurs x_i pris en considération dans le modèle.

η : représente la réponse donc le critère d'optimisation étudié.

α : représente les coefficients du modèle à identifier (**α_0** la constante, **α_i** les coefficients associés aux facteurs, **α_{ii}** les coefficients associés aux termes quadratiques et **α_{ij}** les coefficients associés aux interactions d'ordre 1).

I. Matériels

I.1. La mélasse

La mélasse utilisée provient de la raffinerie de sucre CEVITAL de Bejaïa. L'échantillon a été prélevé à partir du bac 35T3 et 35T4. Elle sera utilisée comme source de carbone et de certains minéraux tels que potassium, calcium et fer.

I.2. Matériel biologique

Huit isolats d'archées halophiles et une souche de référence *Halobacterium Salinarum* DSMZ 3754 ont été utilisés. Leurs caractéristiques et origine sont données dans le **tableau III** en **annexe III**.

I.3 Milieux de culture

Différents milieux à base de mélasse ont été utilisés pour le développement des haloarchées afin de déterminer la source d'azote et la source minérale optimale pour leur croissance.

I.4. Appareillage et réactifs

Voir **annexe IV**

Chapitre II. Méthodes

II.1. Analyse physico-chimiques de la mélasse

Les analyses physicochimique de la mélasse ont été réalisées au niveau du laboratoire de la raffinerie de sucre 3000 tonnes/jour.

II.1.1. le Brix (ICUMSA, 1998)

La détermination de la teneur en matière sèche des produits sucriers est réalisée par la mesure de l'indice de réfraction, l'appareil utilisé est un réfractomètre thermostaté à 20°C.

Mode opératoire :

Peser dans un pot 20g±5g de l'échantillon à analyser à l'aide d'une balance de précision, effectuer des dilutions de 10 (p/p) à l'aide d'un diluteur automatique et agiter jusqu'à homogénéisation complète.

Verser une quantité de la solution dans le refractomètre et lire la valeur affichée par l'appareil.

Expression des résultats :

$$\text{Brix } (^{\circ}\text{B}) = \text{lecture refractomètre} * \text{facteur de la dilution}$$

II.1.2. La polarisation (Méthode ICUMSA GS 2/3-1 (1994))

Principe :

La rotation optique d'une solution de sucre est la somme algébrique de l'effet majeur produit par sa teneur en saccharose et de celui produit par les traces d'autres constituants optiquement actifs.

Mode opératoire :

Après avoir filtré la solution précédemment préparer à l'aide d'un filtre wattman, verser un certain volume dans le polarimètre et lire la polarisation à l'échelle de 26g ; le résultat est exprimé en ($^{\circ}\text{Z}$).

Expression des résultats :

$$\text{Pol } (\%) = K * \text{lecture au polarimètre} * \text{Facteur de la dilution } (K=0.26)$$

II.1.3. Détermination de la pureté

La mesure est définie par le rapport entre la teneur en saccharose et la teneur en matière sèche.

$$\text{Pureté} = (\text{teneur en saccharose} / \text{teneur en matière sèche}) * 100 = (\text{Pol} / \text{brix}) * 100.$$

II.1.4. Détermination du pH (ICUMSA, 1994)

Principe :

C'est la mesure du potentiel d'hydrogène de la solution. L'électrode est normalisée avec des solutions tampon, rincée avec de l'eau distillée et immergé dans la solution de mélasse. La mesure est prise après 5 min quand le potentiel d'équilibre à travers l'électrode est atteint.

Mode opératoire :

Peser dans un pot 50g \pm 5g de l'échantillon à analyser à l'aide d'une balance de précision, effectuer des dilutions de 50 (p/p) à l'aide d'un diluteur automatique et agiter jusqu'à homogénéisation complète.

Introduire la sonde de pH-mètre à l'intérieur de la solution homogène et prendre la lecture affichée sur le pH mètre.

II.1.5. Test complémentaire

Une analyse de notre échantillon de mélasse sur HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) a été réalisée par le personnel du laboratoire de sucre liquide de la base de sucre 3000T de CEVITAL.

II.2. Culture des souches d'Haloarchées

II.2.1. Préparation de la pré-culture

Une colonie d'une culture fraîche d'haloarchées est transférée dans un milieu liquide MH, celui-ci est incubé à 40°C sous agitation (200rpm) pendant 24 à 48 h (**Dyall-Smith, 2006**). Deux à trois repiquages sont réalisés dans les mêmes conditions afin d'obtenir une culture jeune et synchrone.

II.2.2. Culture

2% de la pré-culture sont inoculés dans des tubes à essai contenant 2 ml de milieu ou dans des erlens de 100ml contenant 20 ml de milieu. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 7 à 14 jours.

II.2.3. Estimation de la croissance

II.2.3.1. Mesure de la densité optique (DO)

Les échantillons prélevés sont d'abord dilués $1/10^{\text{ème}}$ dans une solution saline (SS) à 15% (w/v) de NaCl. Les absorbances ont été mesurées à 600 nm.

II.2.3.2. Estimation des volumes des culots

Après la centrifugation des cultures à 5500 rpm pendant 15 min, le culot est récupéré et son volume a été mesuré.

II.2.3.3. Extraction et dosage des pigments membranaires

Après avoir récupéré les culots, les pigments membranaires sont extraits avec 2 ml d'une solution d'acétone méthanol (v/v). Après 4 heures à l'obscurité, les échantillons sont centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min (**Oren et Rodriguez-Valera ., 2001**).

Un spectre est réalisé entre 190 et 700 nm, dans le but de déterminer les pics et les absorbances correspondantes, dans le but de détecter les pigments membranaires.

II.2.4.Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des haloarchées

L'activité antimicrobienne est mise en évidence vis-à-vis d'une souche de référence *Halobacterium Salinarum* DSMZ 3754 cultivée sur milieu solide MH, sa composition est donnée en **annexe V**.

II.2.4.1. Préparation du germe cible.

La souche cible est cultivée de la même manière que précédemment par repiquage successif jusqu'à l'obtention des DO de 0.6-0.8 à une longueur d'onde de 600nm

Le milieu solide est d'abord coulé dans des boites de Petri. Après solidification de la gélose, le milieu semi-solide (en surfusion) inoculé par le germe (DO₆₀₀ de 0.001), est étalé en surface.

II.2.4.2.Dépôt des échantillons et expression des résultats

Les prélèvements sont centrifugés à 10000 rpm pendant 10min dans le but d'éliminer les cellules. 10µl du surnageant ont été déposés à la surface de la gélose préalablementensemencé par un germe cible. Les boites sont laissées près de la flamme du bec bunsen jusqu'à séchage complet des gouttes. Elles sont ensuite mises dans des sacs scellés, et incubées à 40°C.L'activité est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition.

II.3. Préparation d'un milieu de culture à base de mélasse

II.3.1.Détermination d'une source d'azote idéale pour la croissance des souches d'haloarchées

Dans le but de déterminer la source d'azote optimale pour la croissance des souches d'haloarchées sur mélasse, nous les avons cultivées sur des milieux à différentes concentrations de mélasse (2.5%, 5% et 10%) avec NH₄Cl ou NaNO₃ comme source d'azote et additionnés de NaCl, MgSO₄ et du Tris/HCl. Le pH a été ajusté à 7,2.

La croissance est estimée à l'œil nu (intensité du trouble), et par mesure de l'absorbance à 600nm. La composition des milieux est donnée dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Composition des milieux à base de mélasse avec le NaNO₃ ou le NH₄Cl

milieu	Mélasse(%)	NaCl(%)	MgSO ₄ (g/l)	NH ₄ Cl (g/l)	NaNO ₃ (g/l)	Tris/HCl (g/l)
M1	2,5	25	20	4	0	6
M2	2,5	25	20	0	4	6
M3	5	25	20	4	0	6
M4	5	25	20	0	4	6
M5	10	25	20	4	0	6
M6	10	25	20	0	4	6

II.4. Optimisation de la croissance par les plans factoriels

II.4.1. Plan fractionnaire de criblage

Afin de déterminer les facteurs ayant une influence sur la croissance des haloarchées et éventuellement d'accroître la production de l'halocine sur un milieu à base de mélasse. Nous avons réalisé un plan factoriel complet à deux niveaux et à cinq facteurs (mélasse, tris/HCl, NH₄Cl, MgSO₄ et le NaCl), soit un plan 2⁵. La matrice d'expériences est présentée dans le **tableau VI**. La réponse y est exprimée par la densité optique des cultures à 600 nm. La composition du plan complet est donnée dans le **Tableau V** en **annexe VI**.

Tableau VI : Facteurs et domaine expérimental du plan de criblage

facteur	niveau		
	-1	0	+1
Mélasse % (v/v)	2,5	5	7,5
NaCl% (w/v)	15	22,5	30
MgSO ₄ (g/l)	10	30	50
Tris/HCl (g/l)	2	4	6
NH ₄ Cl (g/l)	0	3	6

I. Analyse physico-chimique de la mélasse

I.1. Caractéristiques physico-chimiques de la mélasse :

L'étude réalisée au niveau de la raffinerie de sucre du complexe CEVITAL, a consisté à caractériser les paramètres physico-chimiques de l'échantillon de mélasse prélevé à partir des bacs terre 35T3 et 35T4.

Les résultats obtenus sont regroupés sur le tableau7 :

Tableau VII : Caractéristiques physico-chimiques de la mélasse prélevée au niveau des bacs 35T3 et 35T4

Caractéristique	Résultats obtenus	Normes
Brix (teneur en matière sèche)	76%	73% MIN
Polarisation (taux de saccharose)	54%	40% MIN
pureté	71%	50% MIN
pH	4,7	> 4,00

MIN : minimum, > : Supérieur

Les résultats obtenus montrent la conformité de l'échantillon de mélasse aux normes en vigueur au niveau de l'entreprise CEVITAL. Par ailleurs le taux élevé de saccharose (54%), confirme l'intérêt d'utiliser la mélasse comme source de carbone. Toute fois nous constatons un taux de pureté très élevé (71%), supérieur au taux de 65% rapporté par (Curtin *et al*, 1983). Cela peut s'expliquer par la bonne qualité de la matière première (peu de pigments et d'impuretés). La valeur du pH (4,7) est aussi conforme à la norme. Toute fois celle-ci est très inférieure au pH optimal de croissance des Haloarchées non alcalophiles qui est de 7,2 à 7,5 (Dyall-Smith, 2006).

I.2. Composition en sucre de la mélasse déterminée par HPLC

Le résultat de l'analyse par HPLC, montre que le saccharose est le constituant majeur des sucres de la mélasse (tableau8). La dégradation du saccharose au cours de processus de raffinage sous l'effet de la température et de la pression est à l'origine de la présence des sucres invertis (glucose, fructose).

Tableau VIII: Composition en sucre de la mélasse

sucre	Taux de sucre (%)
saccharose	90,60
glucose	5,20
fructose	4,20

II. Optimisation d'un milieu de culture à base de mélasse pour la production d'haloarchées

II.1. Culture en tubes de souches d'haloarchées sur milieux à base de mélasse additionnés de le NaNO_3 ou de NH_4Cl .

Huit (8) souches d'haloarchées ont été cultivées, en tube en présence du nitrate de sodium (NaNO_3) ou du chlorure d'ammonium (NH_4Cl), à trois (3) concentrations de mélasse (2,5 %, 5,0% et 10,0%). Les lectures ont été réalisées après 14 jours d'incubation sous agitation à 200 rpm.

II.1.1. Cultures sur milieux à 2,5% de mélasse avec le NaNO_3 ou le NH_4Cl

A la concentration de 2,5% de mélasse, en présence du NaNO_3 , toutes les souches présentent une bonne croissance (trouble et culot) avec pigmentation (**tableau 9**). Alors qu'avec le NH_4Cl , seules cinq (5) sur les huit (8) souches ont pu se développer.

En effet, pour les souches S1, S10 et S15 aucune croissance visible a l'œil nu n'a été constatée.

Tableau IX: Observations à l'œil nu des cultures en tubes sur des milieux à 2.5% de mélasse avec le NH_4Cl ou NaNO_3 .

Souches	Mélasse 2.5%+ NaNO_3			Mélasse 2.5%+ NH_4Cl		
	Observation à l'œil nu			Observation à l'œil nu		
	pigments	trouble	culot	Pigments	trouble	culot
S1	+	+	++	-	-	-
S2	+	+	++	++	++	++
S3	++	++	++	++	++	++
S4	+/-	+	+	++	+++	++
S5	++	++	++	++	++	++
S10	+/-	+	++	-	-	-
S11	+++	+++	++	+++	+++	+++
S15	++	++	++	-	-	-

+++ : Très bon ; ++ : Bon ; + : Moyen ; +/- : Début ; - : Absence

A 2,5% de mélasse, les souches S1, S2, S10 et S15 présentent une bonne croissance avec le NaNO_3 comme source d'azote. Pour les souches S3, S4, S5, et S11, de meilleurs résultats sont obtenus avec le NH_4Cl , alors que, les souches S1, S10 et S15 ne se développent quasiment pas (**figure 4**).

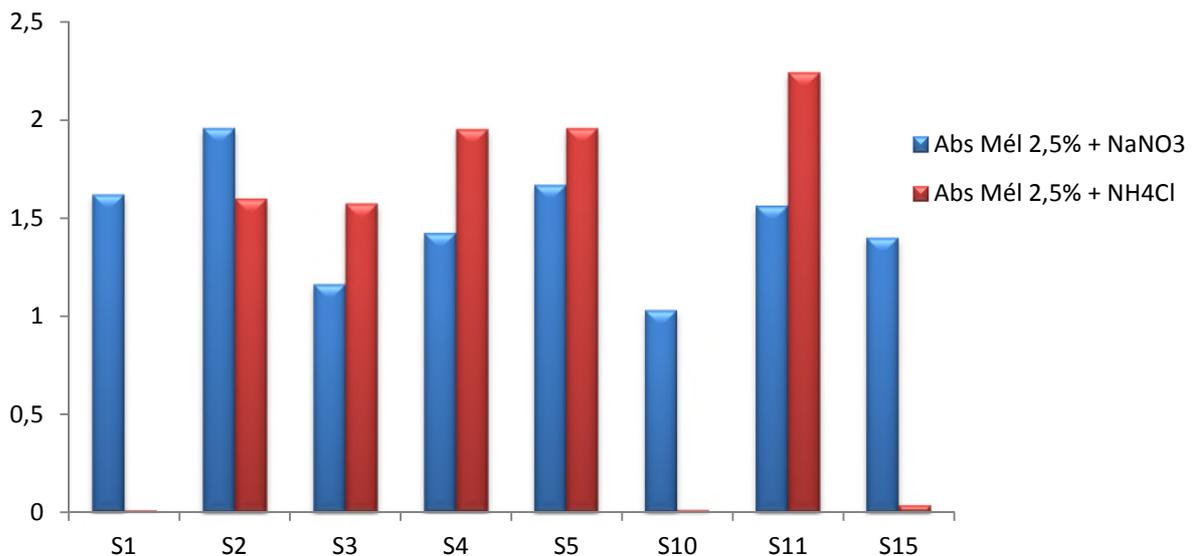


Figure 4 : Absorbances à 600nm des cultures d'Haloarchées sur milieux à 2.5% de mélasse avec le NaNO_3 ou NH_4Cl .

Les résultats des observations à l'œil nu sont en accord avec ceux des mesures de l'absorbance. Ils permettent de conclure que le NaNO_3 est plus adéquat pour le milieu avec 2,5% de mélasse, car il permet une croissance plus uniforme des souches d'haloarchées.

II.1.2.Cultures sur milieux à 5% de mélasse avec le NaNO_3 ou le NH_4Cl

A la concentration de 5% de mélasse, l'intensité du trouble et le volume des culots sont nettement meilleurs en présence du NH_4Cl . A l'exception de la souche S3, qui ne présente aucun signe de croissance ni avec le NaNO_3 ni avec NH_4Cl . On constate aussi une faible pigmentation par rapport aux cultures sur le milieu à 2,5% de mélasse (**tableau10**).

Tableau X : Observations à l'œil nu des cultures en tubesensemencées sur des milieux à 5% de mélasse avec le NH_4Cl ou NaNO_3

Souches	Mélasse5%+ NaNO_3			Mélasse 5%+ NH_4Cl		
	Observation à l'œil nu			Observation à l'œil nu		
	pigments	trouble	culot	pigments	trouble	culot
S1	-	++	+	+/-	+++	++
S2	-	++	+	+/-	++	++
S3	-	-	-	-	-	-
S4	+/-	++	++	+	+++	++
S5	-	-	-	+/-	+++	++
S10	+/-	++	++	+	+++	++
S11	-	-	-	+	+++	++
S15	-	-	-	-	+/-	+

+++ : Très bon ; ++ : Bon ; + : Moyen ; +/- : Début ; - : Absence

A la concentration de 5% de mélasse toutes les souches ont une meilleure absorbance sur le milieu à base de NH_4Cl à l'exception de la souche S3, qui pousse légèrement mieux avec le NaNO_3 (**figure 5**). Ce qui nous amène à dire qu'à la concentration de 5% de mélasse il est plus adéquat d'utiliser le NH_4Cl .

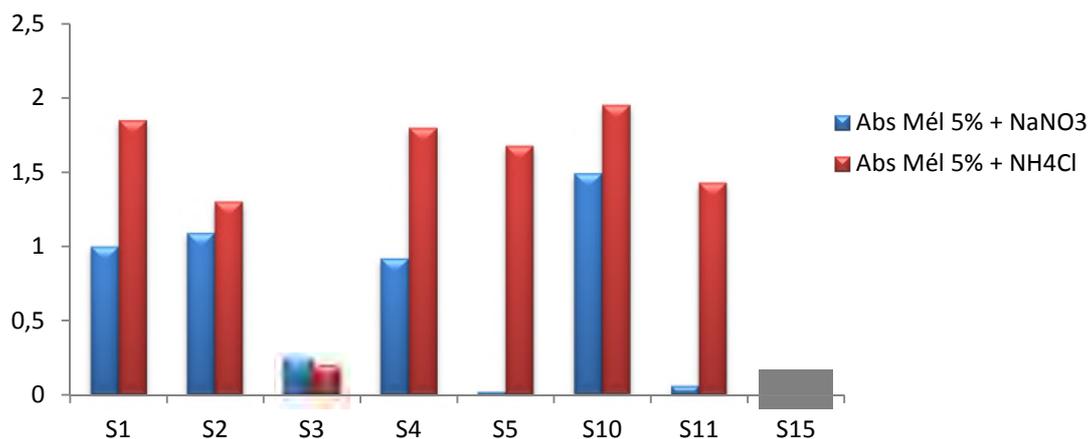


Figure 5 : Croissance des 08 souches d’haloarchées sur milieux à 5% de mélasse avec le NaNO₃ ou NH₄Cl

II.1.3. Cultures sur milieux à 10% de mélasse avec le NaNO₃ ou le NH₄Cl

Avec 10% de mélasse aucun trouble, culot ni pigmentation n’ont pu être observé et ce, avec le NaNO₃ et le NH₄Cl, cela peut être expliqué par l’intense coloration de la mélasse qui empêche toute observation à l’œil nu (**tableau 10**).

Tableau XI: Cultures des souches halophiles sur milieux à 10% de mélasse avec le NH₄Cl ou NaNO₃.

Souches	Mélasse 10%+ NaNO ₃			Mélasse 10%+ NH ₄ Cl		
	Observation à l’œil nu			Observation à l’œil nu		
	pigments	Croissance	culot	pigments	Croissance	culot
S1	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-

- : Absence

On constate des valeurs d'absorbances faible sur le milieu à 10% de mélasse par rapport aux autres concentrations (2.5% et 5%). A cette concentration, les cultures ont données des résultats similaires que ce soit avec le NaNO_3 ou le NH_4Cl (**figure 6**).

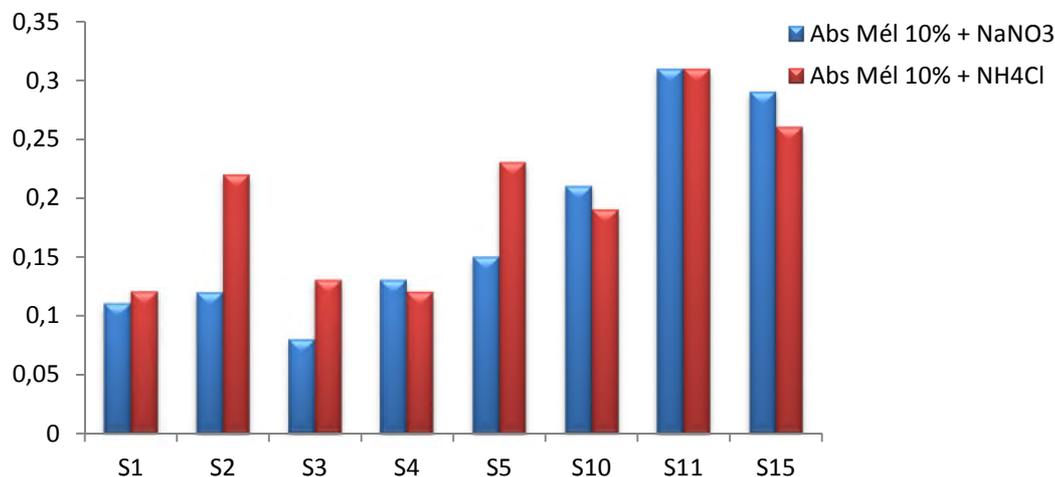


Figure 6 : Croissance des 08 souches d'haloarchées en tubes sur milieux à 10% de mélasse avec le NaNO_3 ou NH_4Cl

II.2. Détermination de l'activité antibiotique dans les surnageants de culture

Les cultures présentant une bonne croissance ont été centrifugées et l'activité antibiotique sur la souche cible *Halobacterium salinarum* DSMZ 3754 est recherchée dans les surnageants. Les résultats n'ont révélé aucune zone d'inhibition, ce qui signifie que les cultures d'haloarchées dans les milieux à base de mélasse n'ont produits aucune substance inhibitrice à l'encontre de la souche cible.

II.3. Extraction des pigments membranaires

L'extraction des pigments à partir des cellules d'haloarchées aux concentrations de mélasse de 2,5% et 5% et la réalisation d'un balayage de 190 à 700nm a donné des pics d'absorbances aux longueurs d'ondes entre 652nm et 366nm (**Tableau XII**).

Tableau XII: Pics et absorbances des pigments membranaires des cultures d'haloarchées cultivées sur mélasse.

Résultats et discussion

Souche	NaNO ₃						NH ₄ Cl					
	Mélasse 2.5%		Mélasse 5%		Mélasse 10%		Mélasse 2.5 %		Mélasse 5%		Mélasse 10%	
	Pic	Abs	Pic	Abs	Pic	Abs	Pic	Abs	Pic	Abs	Pic	Abs
S1	652	0.24	653	0.26					651	0.10		
	536	0.56	636	0.45	-	-	-	-	536	0.44	-	-
	446	0.72	446	0.49					445	0.46		
	366	0.55	366	0.13								
S2	651	0.27	652	0.15			652	0.12				
	536	0.38	536	0.36			536	0.30				
	445	0.42	446	0.45	-	-	446	0.27	-	-	-	-
	366	0.33	366	2.29			366	0.13				
S3	652	0.01	651	0.08			651	0.53				
	536	0.13	536	0.10	-	-	534	0.81	-	-	-	-
	446	0.10	444	0.10			446	0.84				
	366	0.13	366	0.11								
S4			651	0.10					653	0.35		
			536	0.26	-	-	-	-	536	0.27	-	-
			446	0.27					446	0.23		
			366	0.13								
S5	652	0.11	651	0.10			652	0.17	652	0.17		
	536	0.22	536	0.12	-	-	536	0.57	536	0.59	-	-
	445	0.18	446	0.15			446	0.46	445	0.64		
	366	0.22	366	0.17					366	0.40		
S10			651	0.20					652	0.28		
			536	0.53	-	-	-	-	536	0.76	-	-
			446	0.82					445	0.77		
			366	0.61					366	0.54		
S11	652	0.10	652	0.24			652	0.20	651	0.29		
	536	0.27	536	0.33	-	-	536	0.36	536	0.42	-	-
	446	0.28	445	0.43			445	0.31	445	0.42		
	366	0.33	366	0.19			366	0.13	366	0.13		
S15	652	0.08										
	536	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	444	0.26										

Les pigments membranaires de *Haloarcula japonica* et *Haloferax mediterranei* donnent les pics à 387, 466, 488 et 525nm (**figure 7**), qui correspondent à la bacterioruberine qui est un pigment caroténoïde produit par la plupart des haloarchées (Yatsunami et al., 2014 ; Montserrat et al., 2015).

A 10% de mélasse aucune production de pigments n'a été constatée, c'est probablement dû à la faible croissance des souches.

Peak ^a	Carotenoid	Retention time (min)	λ_{max} (nm) in methanol	[M] ⁺ (m/z)
1	BR	7.0	387, 466, 488, 525	741.0
2	MABR	9.6	369, 385, 465, 492, 524	722.8
3	BABR	12.5	370, 388, 460, 492, 524	704.5
4	IDR	15.3	375, 455, 480, 511	620.7
–	Lycopene	19.4	296, 363, 445, 472, 501 ^b	not done
–	Phytoene	19.4	277, 288, 298 ^b	not done

Figure 7 : caractéristique des caroténoïdes chez *Haloarcula japonica* (Yatsunami, 2014)

II.4.Détermination de la source d'azote pour la réalisation du plan d'optimisation

Pour le choix de la source d'azote pour la réalisation du plan d'optimisation, trois paramètres ont été pris en compte, à savoir :

- **Le facteur à optimiser** : Dans le cas de notre travail c'est la production de biomasse
- **La souche choisie pour la réalisation du plan** : nous avons choisi la souche S1, en raison de ses faibles exigences nutritionnelles, et sa capacité à produire des substances antimicrobiennes en l'occurrence les halocines
- **Les concentrations de mélasses qui vont être utilisées dans le plan d'optimisation** :

La source d'azote choisie est le **NH₄Cl**.

II.5. Détermination des facteurs influents par un plan fractionnaire de criblage

Huit (8) expériences ont été réalisées en duplicata suivant un plan fractionnaire avec trois (3) points au centre, et les résultats expérimentaux sont donnés dans le **tableau XIII**.

Tableau XIII : Matrice des expériences et les résultats expérimentaux.

StdOrder	Mélasses	NaCl	MgSO ₄	Tris	NH ₄ Cl	DO ₆₀₀ Experimental	DO ₆₀₀ Prédites	Résidus	Residus Standard
1	2,5	15,0	10	6	6	0.1550	0.1792	-0.0242	-1.43
2	7,5	15,0	10	2	0	0.2400	0.2272	0.128	0.75
3	2,5	30,0	10	2	6	0.0900	0.1072	-0.0172	-1.01
4	7,5	30,0	10	6	0	0.2050	0.2147	-0.0097	-0.57
5	2,5	15,0	50	6	0	0.0650	0.0847	-0.0197	-1.16
6	7,5	15,0	50	2	6	0.3050	0.3247	-0.0197	-1.16
7	2,5	30,0	50	2	0	0.1000	0.1097	-0.0097	-0.57
8	7,5	30,0	50	6	6	0.4400	0.4698	-0.0298	-1.53
9	2,5	15,0	10	6	6	0.2040	0.1792	0.0248	1.46
10	7,5	15,0	10	2	0	0.2150	0.2272	-0.0122	-0.72
11	2,5	30,0	10	2	6	0.1250	0.1072	0.0178	1.04
12	7,5	30,0	10	6	0	0.2250	0.2147	0.0103	0.60
13	2,5	15,0	50	6	0	0.1050	0.0847	0.0203	1.19
14	7,5	15,0	50	2	6	0.3450	0.3247	0.0203	1.19
15	2,5	30,0	50	2	0	0.1200	0.1097	0.0103	0.60
16	7,5	30,0	50	6	6	0.4800	0.4698	0.0102	0.52
17	5	22,5	30	4	3	0.2400	0.2147	0.0253	1.09
18	5	22,5	30	4	3	0.1900	0.2147	-0.0247	-1.06
19	5	22,5	30	4	3	0.2100	0.2147	-0.0047	-0.20

II.5.1. Elaboration d'un model pour la croissance

Le calcul des coefficients est effectué par le logiciel **Minitab 16.0** et les résultats sont donnés dans le **tableau XIII**. Une meilleure croissance est observée lorsque tous les facteurs sont aux valeurs maximales (+1). L'analyse de la Variance, a permis de vérifier la validité de notre modèle linéaire avec interaction. La régression a été trouvée très significative (la P-value < 0.05) et ce modèle choisi ne présente aucun biais (la p-value du manque d'ajustement > 0.05). En outre, on remarque que les valeurs prédites sont assez proches des valeurs expérimentales (**tableau XIII**).

II.5.2. Test de signification des coefficients

La signification des coefficients est vérifiée grâce au test de Student. Dans ce but, il est nécessaire de disposer de l'estimation de l'erreur aléatoire ou expérimentale.

Les valeurs calculées et la p-value correspondante du test de Student pour chaque coefficient sont représenté dans le **tableau XIV** avec un risque $\alpha = 0.05$.

Dans le cas du NaCl et de l'interaction NaCl*NH₄Cl qui lui est couplée ou 'aliasée', la p-value est supérieure au risque α , ce qui veut dire que ces deux facteurs ont un effet non significatif sur la croissance.

L'équation du modèle postulé peut s'écrire :

$$DO_{600} = 0,21469 + 0,09445 \text{ Mélasse} + 0,03257 \text{ MgSO}_4 + 0,02245 \text{ Tris} + 0,05557 \text{ NH}_4\text{Cl} + 0,03182 \text{ NaCl} * \text{MgSO}_4$$

Tableau XIV : ANOVA de la croissance

<u>Terme</u>	coefficient	T	P
Constant	0,21469	40,03	0,000
mélasse	0,09445	16,22	0,000
NaCl	0,01070	1,84	0,091
MgSO₄	0,03257	5,59	0,000
Tris	0,02245	3,85	0,002
NH₄Cl	0,05557	9,54	0,000
NaCl*MgSO₄	0,03182	5,46	0,000
NaCl*NH₄Cl	0,00757	1,30	0,218

Le diagramme en Pareto (**figure8**) permet de visualiser la signification de chaque effet. Les barres qui dépassent la valeur 2.16 correspondant à l'incertitude absolue sont significatives.

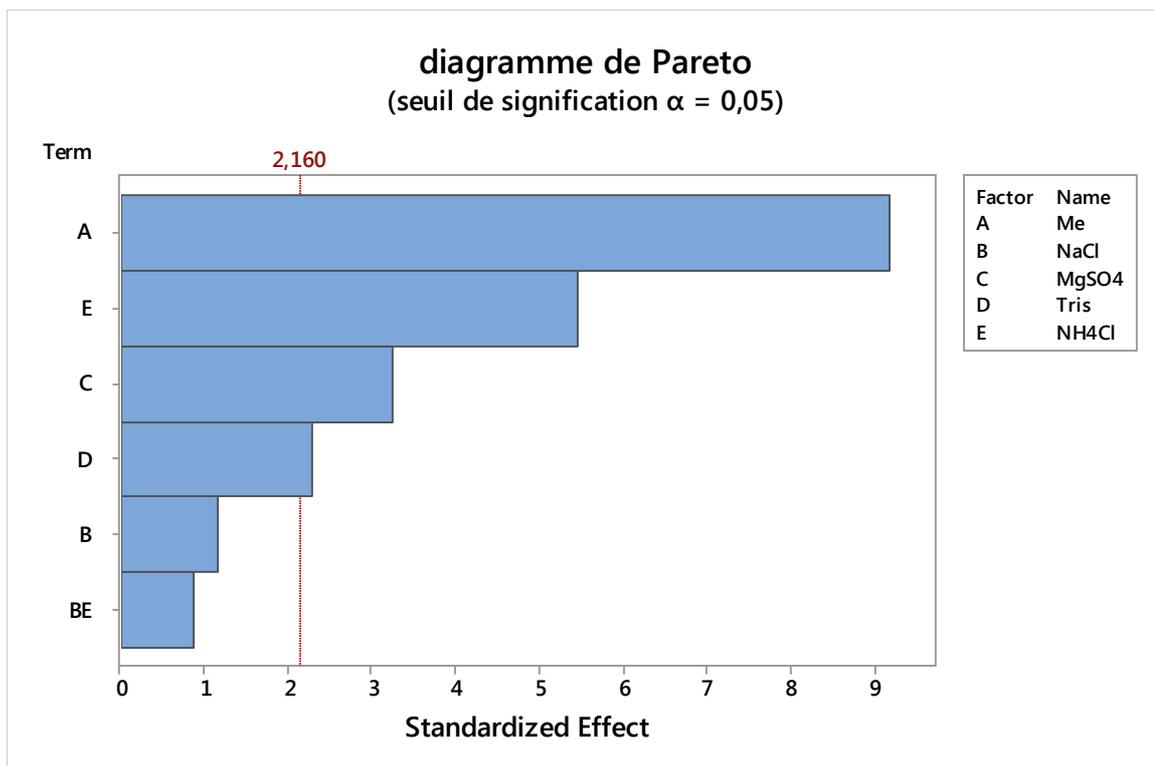


Figure 8 : Diagramme des effets en Pareto

On observe sur la (figure 9) donnant les valeurs moyennes de la réponse en fonction des effets principaux, que les facteurs ayant l'influence la plus significative sont la **mélasse** et le **NH₄Cl**.

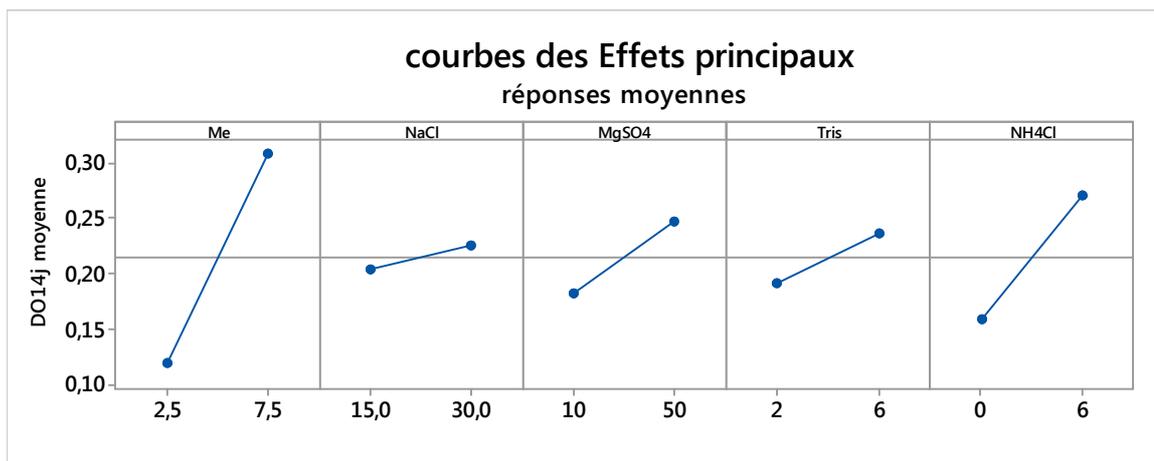


Figure 9 : courbes des effets principaux.

II.5.3. Validation du modèle

La figure 10 permet de vérifier que la part des variations non expliquées par le modèle est aléatoire. Le manque d'ajustement de ce modèle est non significatif, c'est à dire que la plus part des variations sont dues au hasard.

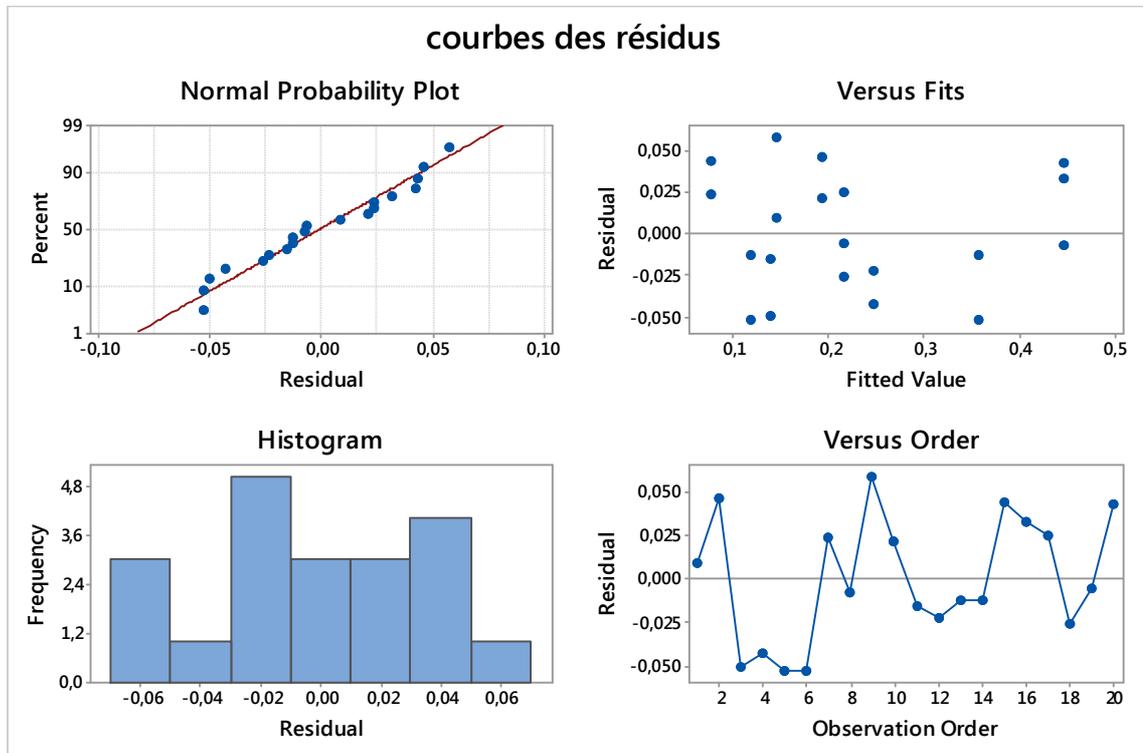


Figure 10 : courbe des résidus

Les valeurs des coefficients de corrélation permettent aussi d'estimer combien le modèle peut expliquer les variations de la réponse mesurée. On peut ainsi avancer que ce modèle peut expliquer approximativement 96,5% des variations de la réponse, et permet de prévoir plus de 93 % des réponses futures.

De l'examen de la table de l'ANOVA (tableau ci-dessous), on vérifie aussi que la régression est significative, c'est-à-dire que la part des variations expliquées par le modèle est significativement supérieure à la variance aléatoire.

On remarque que la régression est très significative ($p\text{-value} < 0.001$) et l'effet des cinq facteurs sur la réponse suit une relation linéaire de premier degré (la courbure n'est pas significative : $p\text{-value} > 0.001$).

Tableau XV : ANOVA Analyse de la variance.

Source	Df	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	0,297972	0,042567	75,13	0,000
Linear	5	0,258535	0,051707	91,26	0,000
Me	1	0,148976	0,148976	262,95	0,000
NaCl	1	0,001911	0,001911	3,37	0,091
MgSO4	1	0,017719	0,017719	31,28	0,000
Tris	1	0,008416	0,008416	14,85	0,002
NH4Cl	1	0,051577	0,051577	91,04	0,000
2-Way Interactions	2	0,018258	0,009129	16,11	0,000
NaCl*MgSO4	1	0,016913	0,016913	29,85	0,000
NaCl*NH4Cl	1	0,000958	0,000958	1,69	0,218
Error	12	0,006799	0,000567		
Curvature	1	0,000007	0,000007	0,01	0,920
Pure Error	11	0,006792	0,000617		
Total	19	0,304771			

$$R^2 = 97,77\% ; R^2 \text{ ajusté} = 96,47\% ; R^2 \text{ pred})= 93,31\%$$

II.5.4. Optimisation de la croissance

Les courbes iso-réponses ci-dessous, permettent de visualiser les zones de variation optimale de la croissance en fonction des différents facteurs. Les zones en vert représentent les lieux des maxima de cette réponse alors que les zones en bleu, les valeurs les plus faibles. On remarque de cette observation que la croissance maximale peut être obtenue avec les grandes concentrations de chacun des facteurs à savoir à :

6% de mélasse, 4g/l de NH₄Cl, 40g/l de MgSO₄ et 5.9g/l de Tris).

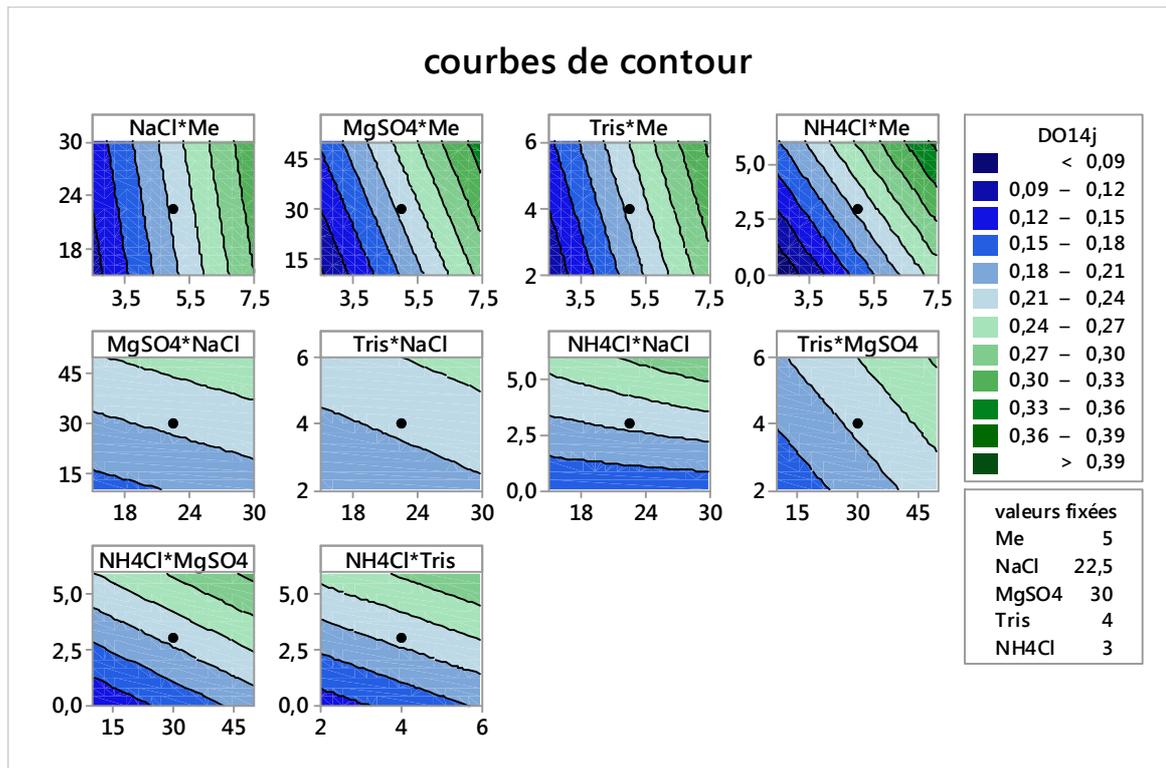


Figure 11: courbes iso-réponses.

Conclusion

Au terme de cette étude, il en ressort que la mélasse présente un intérêt en adéquation avec sa valeur nutritionnelle.

En effet, les analyses physicochimiques et l'HPLC de la mélasse, ont révélées une importante teneur en sucre, ce qui permet de la considérée comme une importante source de carbone pour la croissance de divers microorganismes.

L'essai de valorisation de la mélasse comme milieu de culture pour des haloarchées, a permis de constater que le **NH₄Cl** constitue une source d'azote plus adéquate pour la croissance.

Les cultures ayant une bonne croissance ont produit des pigments pouvant avoir un intérêt économique. Par contre, aucune n'a donné de substances antibiotiques.

Par ailleurs l'essai d'optimisation par plan fractionnaire de criblage a abouti à la modélisation de la croissance de la souche S1 en fonction des concentrations de la **mélasse, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄, et Tris/HCl**.

Les résultats nous ont amené à conclure que ces facteurs sont essentiels pour la croissance de la souche S1.

D'après les résultats, il parait évident que la mélasse constitue un milieu de culture favorable aux haloarchées à condition d'ajouter les sels nécessaires et un tampon, pour amener la mélasse à un pH adéquat et lutter contre l'acidification du milieu durant la croissance.

Comme perspectives, on suggère de

- Réduire le nombre de facteurs étudiés.
- Optimiser la croissance en optant pour un plan par méthodologie de surface de réponse.
- Etendre l'étude à d'autres souches d'haloarchées pour la recherche d'antibiotiques.

B

Bernard M., Chapoutot P., Chatelet M., Gueroult M., Jubert M., Morel d'Arleux F., Taccard M., Mariani M., Tierny M., 1991. Synthèse sur : la mélasse. Comité des sousproduits – RNED Bovins, Juillet : p19.

Bowers KJ etWiegel J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilicarchaea: a mini-review. *Extremophiles*.15, 119–128.

C

Cavicchioli R, Curmi P, Saunders N, Thomas T (2003). "Pathogenic Archaea: DoThey Exist?".*Bioessays*25 (11): 1119-28.

Curtin, L. V. (1983). Molasses-General considerations.In Molasses in animal nutrition.West des moines, IA : National Feed Ingredient Association. p 1-12.

D

De Miniac M. (1991). Contamination des fermentations alcoolique industrielles par des levures du genre *Brettanomyces*. *Industrie alimentaire et agricole*. 8 : 559-563.

Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:333–335. doi: 10.1128/AEM.01595-07.

Dyall-Smith ML. (2006). *The Halo handbook : Protocols for halobacterial genetics* Ver 6.01. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia .6 - 9.

E

Eckburg P, Lepp P, Relman D (2003). "Archaea and Their Potential Role in Human Disease".*InfectImm*71 (2): 591-6.

F

Falb Michaela, Muller Kerstin, Konigsmailer Lisa, Oberwinkler Tanja, Horn Patrick, Gronau Susanne von, Gonzalez Orland, Pfeiffer Friedhelm, Bornberg-Bauer Erich et Oesterhelt Dieter. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*. 12: 177–196.

G

Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris. p 501- 295.

GoupyJ. (2006). Les plans d'expériences. MODULAD. N°34. p80.

Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ et Ventosa A. (2001). Classe III. Halobacteria In Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York. 1, 294 - 334.

H

Hezayen FF, Tindall BJ, Steinbüchel Rehm BHA. (2002). Characterization of novel halophilic archaeon, Halobiformahaloterrestris gen. nov, Sp. nov, and transfer of Natronobacterium nitratireducens to Halobiformanitratreducens comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology .52 ,2271 -2280.

I

ICUMSA.(1994). International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis.

ICUMSA.(1998). International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis.

ICUMSA.(2009). International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis.

J

Joo WA et Kim CH. (2005). Proteomic of halophilic Archaea. Journal of Chromatography B. 815 , 237- 250.

K

Kamekura M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. Extremophiles. 2, 289-295.

Kanekar.P.P., S. P. Kanekar, A. S., Kelkar, P. K., et Dhakephalkar. (2012). Halophiles—Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications Microbial Sciences Division. MACS Agharkar Research Institute, G. G. Agarkar Road, Pune 411 004, Maharashtra, India.

Kushner DJ, (1992). Growth and nutrition of halophilic bacteria, In The biology of halophilic bacteria, CRC Press. 87-90.

M

Margesin R. et Shinner F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. **5**. (2): 73-83.

Montserrat R-B, Inés G, Carlos V, María JB, Rosa MME. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology. *Marine Drugs*, ISSN 1660-3397 www.mdpi.com/journal/marinedrugs. p5518.

N

Noll K.M. (1992). Archaeobacteria (Archaea). *Encyclopedia of microbiology*. 1,149-160.

Novak M.H., 2004. Valorisations non alimentaires des coproduits de la transformation de la Betterave sucrière. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux pour le compte de ValBiom. P 14.

O

Oren A, Ventosa A et Grant WD. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol*. 47, 233-238.

Oren A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**. (2): 923-925.

Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms : Environments, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28,56 - 63.

Oren A, Ventosa A et Grant WD. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol*. 47, 233-238.

Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms : Environments, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28,56 - 63.

Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de taguchi. e.n.s d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.

P

Perry JJ, Staley TJ et Lory S. (2004). *Microbiologie « Cours et questions de révision »* Ed. Dunod, pp .397- 403.

Prescott M, Hasley JP et Klein DA. (2003). *Biologie*. 2ème Ed. Boeck Université, Paris, pp.493-1015.

Q

Querellou J. (2010). Biotechnologie des archées, 45_48 Querellougauche_Gab dossier. **16**: 47. p45.

R

Rabier F. (2007). Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. *P* : 128.

Robinson Jessie L. ,Pyzyna Brandy , AtraszRachelle G. , Henderson Christine A.,MorrillKira L. ,Burd Anna Mae , DeSoucy Erik , Fogleman Rex E., III, Naylor John B. ,Steele Sarah M. , Elliott Dawn R. , Leyva Kathryn J. , and Shand Richard F. (2005). Growth Kinetics of extremely halophilic Archaea (Family Halobacteriaceae) as revealed by Arrhenius plots. *J. bacteria*. 185 (3): 923-925.

Rodrigo-Baños Montserrat, GarbayoInés ,Vílchez Carlos, BoneteMaría José andMartínez-Espinosa Rosa María.(2015). Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology.*marine drugs*.**13**. 5508-5532.

S

Shand RF etLeyva K. (2007).Peptid and protein antibiotics from the domain *Archaea*: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 93-109.
Seidali M., Tchobo F. P., Ayessou N. C., Maoudoumyae T., Ndoutamia G., Akissioe N., Duosso J.,2016 . Evaluation de la qualité physicochimique des residus du complexe agro-industriel de Panda Sarh (Tchad). *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n°25, pp. 203-218.

T

Torreblanca MF, Rodriguez-Valera G,Juez A,Ventosa A,Kamekura M et Kates M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of Haloarcula gen. nov.and Haloferax gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol* .8, 89–99.

V

Ventosa A, Gutierrez MC, Kamekura M et Dyall-Smith ML. (1999). Proposal to transfer Halococcus turkmenicus, Halobacterium trapanicum JCM 9743 and strain GSL-11 to Haloterrigena turkmenica gen. nov, comb. nov.*Int J Syst Bacteriol*. 49, 131-136.

Vimalashanmugam K et Viruthagiri T. (2013). Optimization of mineral nutrient supplements for the production of xylanase by *Aspergillus niger* under ssf using central composite design .IJPCBS. 3, 615-626.

Vreeland RH. (1992). Taxonomy of halophilic bacteria In *The biology of halophilic bacteria*,
CRC Press .105-109.

W

Willay A., 2010. L'essor de l'industrie sucrière à Béthune au 19 ème siècle. Exposition « Et la betterave devint sucrière ». Journées du patrimoine, 18-19 septembre .1-9.

Woese CR, Kandler O et Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 4576- 4579.

X

Xiaoyong Z, Jinyan Z, Wen F, Zhidong L, Juan Z, Jie Y, Liang X et Hong T. (2010). Response surface methodology used for statistical optimization of jean-peptide production by *Bacillus subtilis*. *Elect J Biotechnol*. 13, 1-7.

Y

Yachai M. (2009). Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. 173p.

Annexe I

Tableau I :Composition chimique de la mélasse (Curtin et *al.*, 1983).

Elément	Mélasse de canne	Mélasse de betterave
Brix	79.5	79.5
Densité	1.41	1.41
Solide total (%)	75.0	77.0
Sucre totaux (%)	46.0	48.0
Protéines brutes (%)	3.0	6.0
dont Composés azotés	63.0	62.0
Lipide (%)	0.0	0.0
Les fibres (%)	0.0	0.0
Les cendres (%)	8.1	8.7
Calcium (%)	0.8	0.2
Phosphore (%)	0.08	0.03
Potassium (%)	2.4	4.7
Sodium (%)	0.2	1.0
Chlorines (%)	1.4	0.9
Sulfures (%)	0.5	0.5
Cuivre, mg/kg	36	13
Fer, mg/kg	249	117
Manganese, mg/kg	35	10
Zinc, mg/kg	13	40
Biotine,mg/kg	0.36	0.46
Choline, mg/kg	745.0	716.0
Acide pantothenique, mg/kg	21.0	7.0
Riboflavine, mg/kg	1.8	1.4
Thiamine, mg/kg	0.9	-
Inositol, mg/kg	6.0	-
Niacine, mg/kg	800.0	-
pyridoxine , mg/kg	5.0	-

Annexe II

Tableau II: Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au sel(NaCl)(Kushner, 1992).

Groupe	Concentration en NaCl (M et %)	Exemples de microorganisme colonisateurs
Non halophile	Pas de développement en présence de sel ou, du moins dès que la concentration atteint 0,2M de sel (1,16%)	La plupart des Eubactéries
Faiblement halophile	Croissance sur des milieux contenant 0,2M à 0,5M de sel (1,16% - 2,9%)	Microorganismes marins
Modérément halophile	Développement dans des milieux contenant entre 3% et 15% de sel	<i>Vbriocosticola, Paracoccus, Halodenitrificans et Pseudomonas</i>
halotolérant	Pas besoin de sel pour la croissance, mais peuvent pousser en sa présence et supportent jusqu'à 1,8M (10,4%) de sel	<i>Staphylococcus epidermidis, Halomonaselongata, Fungi et algues</i>
Extrême halophile	Souches qui exigent pour leur croissance des concentrations entre 2,5 et 5,2M (14,5 – 30%) de sel	Halococcus, Halobacterium, (archées halophiles extreme)

Annexe III

Tableau III : Les souches d'Haloarchées utilisées

souches	Sources	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (gène ARNr 16S)
S1	Sabkha de Ouargla	1999	37°C,pH7	<i>Haloarculasp</i>
S2	Sabkha de Ouargla	1999	43°C,pH7	<i>Halorubrum tebenquichens</i>
S3	Sabkha de Ouargla	1999	43°C,pH7	<i>Haloarcula</i>
S4	Sabkha de Ouargla	2010	40°C,pH7	<i>Halorubrumchaoviator</i>
S5	Sabkha de Ouargla	2010	40°C,pH7	<i>Halorubrum ezzemoulens</i>
S10	Saline de Batna	2010	40°C,pH7	-
S11	Saline d'oran		40°C,pH7	<i>Haloarculasp</i>
S15	Saline de Batna		40°C,pH7	-

Annexe IV

Appareillages et réactifs

- Spectrophotomètre (SHIMADZU)
- Spectrophotomètre à Balayage (RAYLEIGH)
- Four Pasteur (RAYPA) Étuve (MEMMERT), (VENTRICELL)
- pH mètre combiné thermomètre pH700 (EUTECH Instruments)
- Bain marie agitateur (IKA Labortechnik)
- Bain marie (RAYPA et Julabo TW12)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-14)
- Vortex ZX3 (VELP Scientifica)
- Plaque chauffante agitatrice (RAYPA)
- Balance électronique CS200 (OHAUS)
- Réfrigérateur
- Bec Bunsen Portoirs
- Erlenmeyer
- Becher
- Éprouvettes graduées
- Flacons
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (ACCUMAX)
- Embouts jaunes ,bleus et blanc
- Eppendorfs
- Réfractomètre (RFM 340)
- Diluteur automatique mené d'une balance de précision (ACCULAB)
- Polarimètre (POLASER-S)
- PH-mètre (HANNA instruments)
- Ordinateur muni du logiciel « CLEOPATRE »
- Agitateur mécanique (Ficher scientifique)

Annexe V :

Composition du Milieu Halobacterium (MH)

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	5g
▪ CaCl ₂	0,2g
▪ MgSO ₄ , 7H ₂ O	10g
▪ Peptone pancréatique	2,5g
▪ Extrait de levure	10g

La stérilisation: autoclavage à 120°C /30min

Annexe VI :

Tableau V : Plan fractionnaire de criblage.

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	mélasse	NaCl	MgSO ₄	Tris/HCl	NH ₄ Cl
1	1	1	1	2,5	15,0	10	6	6
2	2	1	1	7,5	15,0	10	2	0
3	3	1	1	2,5	30,0	10	2	6
4	4	1	1	7,5	30,0	10	6	0
5	5	1	1	2,5	15,0	50	6	0
6	6	1	1	7,5	15,0	50	2	6
7	7	1	1	2,5	30,0	50	2	0
8	8	1	1	7,5	30,0	50	6	6
9	9	0	1	5,0	22,5	30	4	3
10	10	0	1	5,0	22,5	30	4	3
11	11	0	1	5,0	22,5	30	4	3

Annexe III

Halobacteria Medium (DSMZ Medium 372)

Composition par litre:

NaCl.....	200.0g
MgSO ₄ x7H ₂ O.....	20.0g
Extrait de levure.....	5.0g
Casamino acide.....	5.0g
Citrate trisodique.....	3.0g
KCl.....	2.0g
Na-glutamate.....	1.0g
FeCl ₂ x4H ₂ O.....	36.0mg
MnCl ₂ x4H ₂ O.....	0.36mg

pH 7.2 ± 0.2 à 25°C

Présentation du groupe CEVITAL

CEVITAL est parmi les entreprises algériennes qui ont vu le jour dès l'entrée de notre pays en économie de marché, elle a été créée par des fonds privés en 1998.

Son complexe de production se situe dans le port de BEJAIA et s'étend sur une superficie de 45000m².

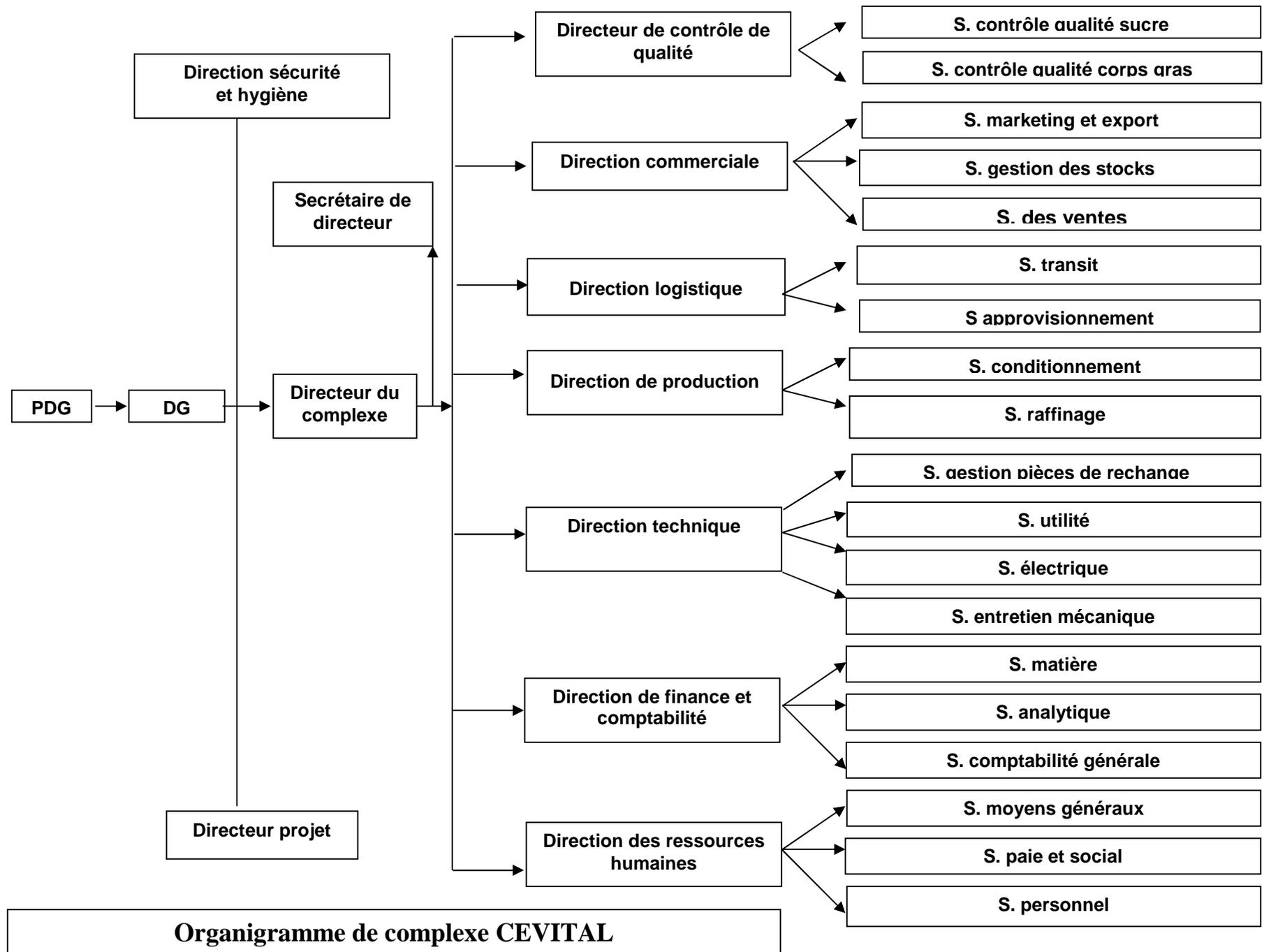
CEVITAL contribue largement au développement de l'industrie agroalimentaire nationale, et vise à s'imposer dans le marché national et international, en offrant une large gamme de produits de qualité.

CEVITAL, comble la demande alimentaire national, et s'étend à des marchés internationaux en négociant même avec les grandes sociétés commerciales telles que CARREFOUR et AUCHAN (en France), ROYAL (en Suisse), et autres sociétés spécialisées dans l'import-export en Ukraine, Russie, Libye, ses produits se vendent dans différentes villes africaines (Lagos, Niamey, Bamako, Tunis...).

L'ensemble des activités de CEVITAL à Béjaia, est concentré sur la production des huiles végétales, de margarine et le sucre et ses dérivés. Il se présente comme suit :

- Raffinage et conditionnement d'huile
- Production de margarine
- Fabrication d'emballage en P.E.T.
- Raffinerie de sucre blanc et sucres spéciaux
- Stockage céréales.

Le raffinage de sucre engendre environ 50 tonnes de mélasse par jour, ce qui équivaut à 18000 tonnes par an. Il exporte 5800 tonnes de mélasse chaque trois mois avec une autonomie de stockage de 7000 tonnes.



Résumé

L'objectif du présent travail est d'optimiser un milieu de culture à base de mélasse. Un coproduit généré par l'industrie de raffinage de sucre (CEVITAL), qui a été utilisé comme source de carbone et de quelques minéraux pour la production d'une souche d'haloarchée par la méthode des plans d'expériences.

Un travail préliminaire a permis de conclure que le NH_4Cl est la source d'azote adéquate pour le plan. Le choix s'est porté sur la souche S1 pour ses faibles besoins nutritionnels et pour sa faculté de produire des substances antimicrobiennes.

On a réalisé un plan de criblage à cinq facteurs (Mélasse, NaCl , MgSO_4 , Tris et le NH_4Cl), et il a été constaté que les facteurs ayant une influence significative sur la croissance sont : la mélasse, le MgSO_4 , NH_4Cl et le Tris. Les cultures ayant une bonne croissance ont permis la production de pigments.

Mots-clés : Mélasse, haloarchée, optimisation, plan d'expériences, croissance, pigments.

Abstract

The objective of this work is to optimize a molasses culture medium. A coproduct generated by the sugar refining industry (CEVITAL), which has been used as a source of carbon and a few minerals for the production of a haloarchaeae strain by the experimental design method.

Preliminary work allowed to conclude that NH_4Cl is the adequate source of nitrogen for the plan. The choice was based on the S1 strain for its low nutritional requirements and its ability to produce antimicrobial substances.

A five-screen screening plan (Molasses, NaCl , MgSO_4 , Tris/HCl and NH_4Cl) was performed, and it found that factors with a significant influence on growth were: molasses, MgSO_4 , NH_4Cl and Tris/HCl. Cultures with good growth have allowed the production of pigments.

Keywords: Molasses, haloarchaeae, optimization, design of experiments, screening, growth, pigments.