

Optimisation d'un milieu de culture à base de sirop de dattes pour la production d'un bio pesticide bactérien

Jemni Monia ^(a), Maaroufi Abderrazek ^(b), Mejri Slah ^(c)

^(a) jemnimonia@yahoo.fr

^(b) Institut Pasteur de Tunisie

^(c) Institut National Agronomique de Tunisie

Résumé :

La production en masse de deux bactéries dotées de propriétés biopesticides a fait l'objet de cette étude. Le choix d'un milieu de culture à base de sirop de sous produits de dattes a été dicté par la richesse de cette substance naturelle en sucres et en sels minéraux. Cela permet à la fois de minimiser les coûts de production des bactéries et de valoriser les sous-produits des dattes.

L'objectif de cette étude est donc d'optimiser la formulation d'un milieu de culture à base de sirop de dattes. L'effet des interactions entre les différentes concentrations de sirop de dattes, d'extrait de levure et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sur la croissance des bactéries a montré que ces trois facteurs ont une influence sur les paramètres de la croissance des bactéries cultivées. Les facteurs ayant les effets les plus importants sont la concentration de l'extrait de levure et l'interaction entre celle-ci et la concentration en sirop de dattes. La concentration en extrait de levure s'est avérée être un facteur limitant pour la croissance de *Bacillus subtilis*.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, fermentation, biopesticide, optimisation de milieu de culture, sirop de dattes.

Abstract:

This study is turned towards biomass production of two bacteria having biopesticide activities. The choice of date syrup as a growth medium is an important way to adapt bacteria to this natural substance rich in carbon hydrate sources and mineral salts. This medium could, also, solve the problem of date wastes and minimise the price of bacteria.

This study is focused on formulation of a new medium based on date syrup. The study of interaction effect between date syrup, yeast extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations shows that these three factors have an important influence on bacterial growth. The principal effects of these factors are the concentration of yeast extract and its interaction with date syrup. The concentration of yeast extract was a limiting factor of *Bacillus subtilis*'s growth.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation, biopesticide, optimization of growth medium, dates syrup.

1.Introduction

L'optimisation d'un procédé de fermentation se fait le plus souvent selon trois critères: maximisation des concentrations des produits de fermentation recherchés (biomasse microbienne, métabolites), minimisation du temps de fermentation et des coûts d'opérations (Leveau et Bouix, 1993).

Pour procéder à l'optimisation d'un milieu de culture, l'utilisation d'un plan d'expérience est nécessaire. Cette stratégie expérimentale met en œuvre un certain nombre d'essais, correctement choisis et dont les résultats sont analysés selon des lois statistiques (Goupy,2006).

Ce travail a été consacré aux essais de formulation et d'optimisation d'un milieu de culture à base de sirop de dattes pour la production en bioréacteur de 5 litres de deux bactéries biopesticides. Le sirop de dattes est un produit obtenu à partir de la transformation des écarts de triage de dattes. Ce produit a une richesse exceptionnelles en éléments nutritifs ce qui lui offre la possibilité d'être utilisés pour la production de milieux de culture pour les microorganismes (Mohamed et Khelif, 1997).

2. Matériel et méthodes

L'analyse de composition de sirop de dattes en sucres a été effectuée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC Agilent 1100), en azote par la technique de biuret (Gornall et al 1949) et en sels minéraux par la norme NFV 05-113,1972. L'optimisation de milieu de culture à base de sirop de dattes pour la production des biopesticides a été effectuée en suivant un plan composite centré qui est construit en ajoutant des points de mesures à un plan factoriel complet (Goupy,2006).

Dans ce travail, le glucose a été remplacé par le sirop de dattes qui est un source de sucres à faible coût. Le sirop de dattes est riche en calcium, en manganèse et en fer d'où on ne va pas les ajoutés en milieu. Dans ce cas on a un milieu composé de facteurs de concentrations constantes (KH_2PO_4 2g/l, K_2HPO_4 1g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g/l) et de trois facteurs à varier: X_S : Concentration du sirop de dattes [10, 30g/l], X_{EL} : Concentration d'extrait de levures [0, 5g/l] et X_N : Concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [0, 3g/l]. La concentration de ces facteurs a été variée selon un plan composite centré (tableau 1).

Tableau 1: plan d'expériences

Nexp	X _S	X _{EL}	X _N
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	- α	0	0
11	+ α	0	0
12	0	- α	0
13	0	+ α	0
14	0	0	- α
15	0	0	+ α

Nexp	Sirop	Extrait de levure	(NH ₄) ₂ SO ₄
1	10	0	0
2	30	0	0
3	10	5	0
4	30	5	0
5	10	0	3
6	30	0	3
7	10	5	3
8	30	5	3
9	20	2,5	1,5
10	7,85	2,5	1,5
11	32,15	2,5	1,5
12	20	0	1,5
13	20	5,53	1,5
14	20	2,5	0
15	20	2,5	3,32

Avec $\alpha = 1,215$ pour trois facteurs dans un plan orthogonal.....

La préculture est cultivée dans un erlenmeyers de 1 l contenant 200 ml de milieu de culture dans un incubateur agitateur à 200 tours/minute et à 30°C pendant 12 h. La préculture est ensuite inoculée au bioréacteur contenant 2 l du milieu de culture à un taux de 10 %. La fermentation a été effectuée dans un fermenteur de 5 l, type Labfors de marque Infors HT.

L'échantillonnage a été effectué toutes les heures. Un suivi de la cinétique de la croissance de biomasse (Densité optique), consommation des sucres (HPLC Agilent 1100), production des protéines (méthode de Biuret) est indispensable pour comparer entre les milieux.

3. Resultats et discussion

3.1. Analyse de la composition de sirop de dattes

La composition de sirop de dattes utilisé lors de cette étude est donnée par le tableau suivant (tableau 2).

Tableau 2: Composition du sirop de dattes

	Sirop de dattes analysées
Brix	74%
Sucres totaux	69,63 %
Saccharose	37,24%
Sucres invertis	32,39%
Glucose	16,70%
Fructose	15,69%
Protéines	2,5%
Matières sèches totales	74,431%
Cendre	2,417%

Ces résultats permettent de conclure que le sirop de dattes est un milieu riche en sucres et sels minéraux mais il est pauvre en protéines.

3.2. Suivi de la croissance de deux bactéries en bouillon nutritif ordinaire

Le suivi de la croissance de chaque culture préparée dans les deux erlenmeyers de bouillon nutritif (Peptone de gélatine 5g/l, Extrait de viande de bétail 3g/l et eau distillée 1l) etensemencées respectivement par des précultures des souches SB1 et SB2 a donné les résultats représentés par les figures 1 et 2:

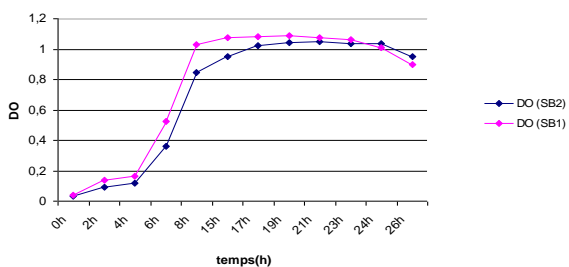


Figure 1: Suivi de densité de deux *bacilles* en fonction du temps

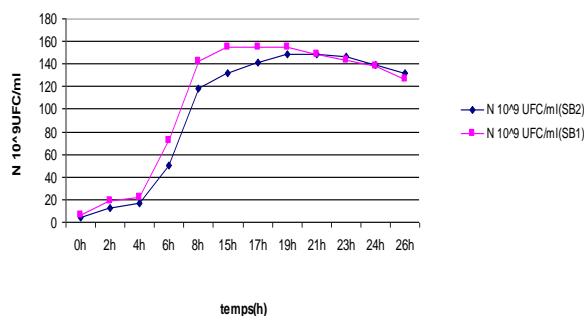


Figure 2: Suivi du nombre des microorganismes par ml de deux *bacilles* en fonction du temps

Ces cinétiques permettent de calculer les paramètres de croissance de ces bactéries (tableau 3).

Tableau 3: Paramètres de croissance de deux souches de *Bacillus* en erlenmeyers

	SB1	SB2	Valeurs (Perry et al., 2004)
μ_{max}	0,4 h ⁻¹	0,42 h ⁻¹	1,48 h ⁻¹
tg (temps de génération)	104 min	99 min	28 min
Nmax	155 × 10 ⁹ UFC/ ml	149 × 10 ⁹ UFC /ml	-

D'après Perry *et al.* (2004), le temps de génération des *Bacillus subtilis* est de l'ordre de 28 min. Nous remarquons que les temps de générations calculés sont supérieurs à celui donné par cet auteur car ce dernier a mesuré le temps de génération dans des conditions optimales de croissance de bactérie.

3.3. Application du plan composite centré

3.3.1. Optimisation du milieu au niveau des erlenmeyers

On a appliqué le plan d'expérience pour les deux souches au niveau des erlenmeyers dans une étuve agitée et réfrigérée. Le calcul de μ_{max} (h⁻¹) de différentes fermentations sont résumés en tableau 4:

Tableau 4 : Les valeurs de μ_{max} (h⁻¹)

N exp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SB1	0,036	0	0,35	0,268	0	0	0,477	0,243	0,478	0,553	0,17	0	0,214	0,343	0,303
SB2	0,031	0	0,319	0,25	0	0	0,46	0,21	0,44	0,52	0,153	0	0,191	0,339	0,289

En comparant entre les deux souches, on remarque une grande ressemblance dans les résultats. Ainsi, on va travailler sur une seule souche au niveau du fermenteur du laboratoire de capacité égale à 5 litres.

3.3.2. Optimisation du milieu de culture au niveau du fermenteur

La culture de la souche dans un fermenteur de 5 l, type Labfors de marque Infors HT a donné les résultats suivants:

3.3.2.1. Suivi de la cinétique de croissance de la biomasse

La plupart des courbes de fermentations passent par une phase de démarrage de deux heures, puis une phase exponentielle de six à huit heures et enfin une phase stationnaire qui commence après huit à dix heures de fermentation (figure 3).

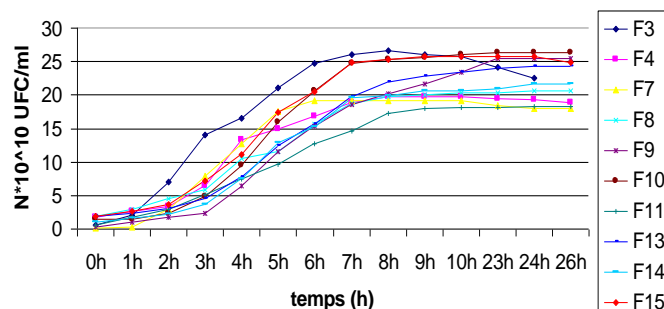


Figure 3: Suivi de la biomasse

On constate qu'il n'y a pas de croissance en fermentation 1, 2, 5, 6 et 12 vu l'absence d'extrait de levure dans ces milieux. Pour les autres fermentations, il y a croissance des bactéries mais reste à voir quel milieu permet une meilleure croissance. Pour ce faire, nous allons comparer les différents milieux sur la base de μ_{max} et la productivité maximale comme c'est montré dans le tableau 5:

Tableau 5: Les paramètres de fermentation

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15
μ_{max} (h ⁻¹)	0,036	0,11	1,45	0,45	0	0	1,215	0,35	0,6	0,475	0,46	0	0,472	0,5	0,447
P_{max} (g/l/h)	0	0	1,15	0,43	0	0	0,92	0,43	0,67	0,592	0,447	0	0,586	0,524	0,411

Le milieu de culture numéro trois est le milieu ayant μ_{max} et la productivité maximale les plus élevés.

3.3.2.2. Suivi de la consommation des sucres

La consommation des sucres est durant les dix premières heures de la fermentation, ensuite la consommation s'arrête. La consommation des sucres est nulle dans les milieux pauvres en extrait de levure (les fermentations 1, 2, 5, 6 et 12) (figure 4).

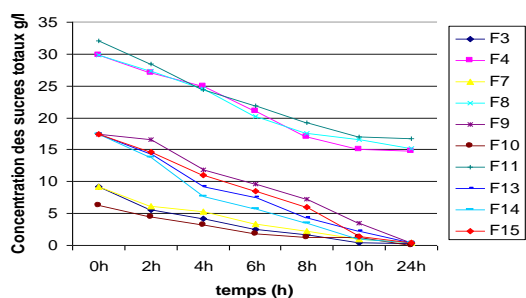


Figure 4: Suivi de la concentration des sucres

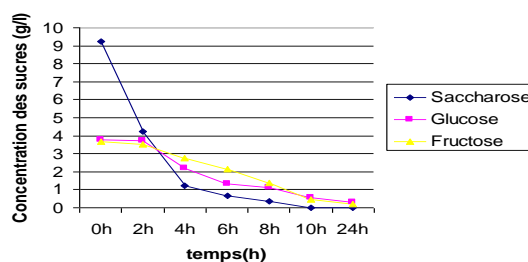


Figure 5: Suivi de la concentration du saccharose, du glucose et du fructose de fermentation 13

Le rendement de consommation des sucres est donné par le tableau 6:

Tableau 6: Rendement des sucres totaux en biomasse

N _{exp.}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Rendement (g/g)	0	0	0,237	0,077	0	0	0,22	0,1	0,152	0,21	0,101	0	0,111	0,097	0,117

On remarque que la bactérie a une affinité pour les trois types de sucres. Dans la première phase, seul le saccharose est utilisé et le glucose et le fructose sont constants. Après deux heures de la fermentation et dès que la concentration de ces trois sucres sont égales, on constate qu’il y’a une utilisation simultanée des trois sucres. Cette capacité de dégradation a été démontrée par la galerie API 50CH/B. D’après Yung *et al.* (2008), *Bacillus subtilis* consomme le saccharose et le glucose lors de sa croissance et généralement les concentrations en ces sucres sont totalement épuisées à la fin d’une fermentation (figure 5):

3.3.2.3. Suivi de la production des protéines

D’après Ling *et al* (2007), *Bacillus subtilis* est connu par sa production abondante de protéines. La concentration de la production des protéines augmente avec l’augmentation de la concentration d’extrait de levure introduite dans le milieu. L’extrait de levure est un facteur limitant pour la production des protéines. En effet, les extraits de levure contiennent des protéines mais, comme la concentration des protéines est entrain d’augmenter durant la fermentation donc ces protéines sont produites dans le milieu et non ajoutées en début des cultures.

Pour la même concentration d’extrait de levure, plus la concentration de sirop de dattes introduite dans le milieu de culture augmente plus la concentration de protéines produites est plus élevée (figure 6).

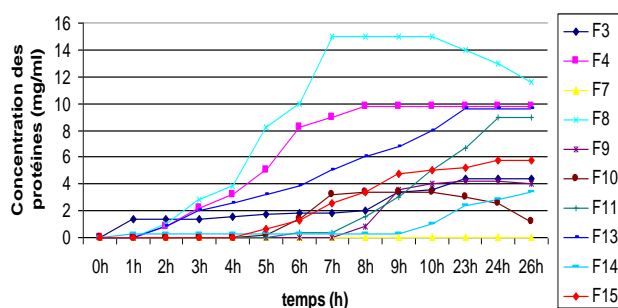


Figure 6: Suivi de protéines

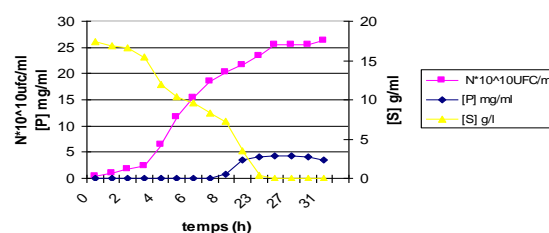


Figure 7: Courbe de suivi de la biomasse, de la concentration des protéines et de la concentration des sucres totaux de la fermentation 9

D’après la figure 7, la biomasse et la production des protéines sont entrain d’augmentées en parallèles. Par conséquent, les protéines sont des métabolites primaires. D’autre part, la consommation des sucres est parallèle à la croissance bactérienne. D’où le sucre est un substrat essentiel pour la croissance bactérienne.

3.3.2.4. Etude du plan composite centré

On a choisi d’appliquer ce plan pour trois facteurs ; facteur 1 (x_1): concentration du sirop de dattes en g/l, facteur 2 (x_2): concentration d’extrait de levure en g/l et facteur 3 (x_3): concentration de $(NH_4)_2SO_4$ en g/l.

Le modèle postulé est le suivant:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2$$

a. Modélisation et validité du modèle

En arrondissant et en négligeant les coefficients inférieurs aux écarts-types, on a résumé les résultats de ce plan dans les modèles mathématiques suivants:

$$Y_{\mu_{max}} = 0,453 - 0,16x_1 + 0,35x_2 - 0,24x_1x_2 - 0,114x_2^2$$

$$Y_{productivité} = 0,565 - 0,126x_1 + 0,332x_2 - 0,115x_1x_2 - 0,161x_2^2$$

$$Y_{\text{rendement}} = 0,14 - 0,04x_1 + 0,007x_2 - 0,035x_1x_2 - 0,053x_2^2$$

$$Y_{\text{protéines}} = 5,011 + 2,5x_1 + 3,42x_2 + 2,55x_1x_2 + 1,2x_1x_3 - 1,32x_2^2$$

Avec, x_1 est la concentration du sirop de dattes, x_2 est la concentration d'extrait de levure et x_3 est la concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

On vérifie la validité de ces modèles en comparant la moyenne des réponses mesurées au centre, à celle calculée avec le modèle (tableau 7).

Pour trouver l'intervalle de confiance des mesures au centre ($\text{IC}_{\text{centre}}$), il faut, d'abord, calculer l'écart type des 3 points au centre pour chaque réponse. Puis, en utilisant la loi Student Inverse (0,05 ; 2) = 4,3, on appliquera la

formule suivante :
$$\text{IC}_{\text{centre}} = M_{\text{centre}} \pm 4,3 \times \frac{ET}{\sqrt{n}}$$
, avec M_{centre} : moyenne des points au

centre ; ET : écart type des points au centre et n : nombre des répétitions. La réponse calculée au centre correspond au terme constant a_0 .

Tableau 7: Validité du modèle du second degré

Réponse	M_{centre}	ET	Variation	$\text{IC}_{\text{centre}}$	a_0
μmax	0,6	0,0321455	0,07980462	[0,52 ; 0,67]	0,453
Protéines	4,8	0,2	0,49652123	[4,30 ; 5,3]	5,011
Productivité	0,673	0,03605551	0,08951164	[0,58 ; 0,76]	0,565
Rendement	0,153	0,00655744	0,01627954	[0,137 ; 0,17]	0,14

La comparaison des moyennes au centre aux réponses calculées par les modèles a permis de considérer que les modèles sont valides. On peut par suite les adopter pour l'optimisation par le solveur et pour le tracé des surfaces de réponses. La résolution de ces équations à l'aide de solveur a donné les résultats suivants (tableau 8):

Tableau 8: Résultats de l'optimisation par le solveur

	Ycal	Ycible	$(Y_{\text{cal}} - Y_{\text{exp}})^2$
Vitesse de croissance spécifique	2,02661458	2	0,00070834
Productivité maximale	0,46964913	1	0,28127204
Production des protéines	19,9882114	20	0,00013897
Rendement	0,09921587	0,5	0,16062792
		SCE	0,44274727

La comparaison des réponses théoriques optimisées avec les réponses cibles comme la montre la figure suivante ne révèle pas une grande différence. Par suite, on peut adopter ces résultats et passer au calcul des valeurs réelles des facteurs.

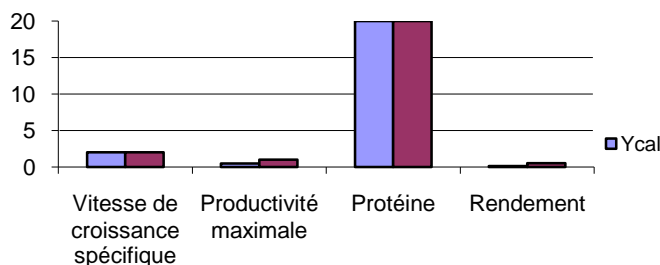


Figure 8: Comparaison des réponses théoriques optimisées par le solveur aux réponses cibles.

Les variables centrées réduites et les valeurs réelles des facteurs sont donnés dans le tableau 9:

Tableau 9: Variables centrées réduites et valeurs réelles des facteurs optimisés

Facteur	Variable centrée réduite	Valeur réelle
Concentration de sirop de dattes	1,0590405	30,59 g/l
Concentration d'extrait de levure	0,75229088	4,38 g/l
Concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,67801098	11,51 g/l

b. Conclusion de l'étude

La concentration de sirop de dattes et celle d'extrait de levure sont les deux facteurs les plus influents sur la plupart des réponses considérées. L'optimisation par le solveur a permis d'aboutir à des concentrations qui diminuent l'influence de ces deux facteurs. Les concentrations optimales selon le solveur sont 30,59 g/l de sirop de dattes, 4,38 g/l d'extrait de levure et 11,51 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4. Conclusion

L'étude de l'effet d'interaction entre les différentes concentrations de sirop de dattes, d'extrait de levure et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ montre que ces trois facteurs ont des effets sur la croissance des bactéries. Les facteurs à effets principaux sont la concentration d'extrait de levure et la concentration de sirop de dattes. L'interaction entre les concentrations d'extrait de levure et de sirop de dattes a aussi un effet important sur la croissance de bactérie. La concentration d'extrait de levure est un facteur limitant pour la croissance de *Bacillus subtilis* et pour la production des protéines.

L'optimisation du milieu de culture réalisée par le solveur sur la base de la vitesse spécifique de croissance de la biomasse, le rendement, la productivité maximale et la production des protéines donne le milieu optimisé suivant : concentration de sirop de dattes de 30,59 g/l, concentration d'extrait de levure de 4,38 g/l, $[\text{KH}_2\text{PO}_4]=2\text{g/l}$, $[\text{K}_2\text{HPO}_4]=1\text{g/l}$, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]=11,51\text{ g/l}$ et $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]=0,5\text{ g/l}$.

5. Remerciement

Je remercie M. Rhouma Ali, chercheur à l'Institut de l'Olivier de Sfax pour avoir mis à notre disposition deux souches bactériennes.

6. References bibliographiques

- ◆ Gornall, A. G.; Bardawill, C. J. and David, M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- ◆ Goupy J., 2006. Les plans d'expériences. Revue Modulad, n°34. 74-116. valable sur internet:<URL: <http://www-rocq.inria.fr/axis/modulad/archives/numero-34/Goupy-34.pdf>>.
- ◆ Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Bioingénierie, p. 211- 235. In. Scriban R. (coordinateur). Biotechnologie. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- ◆ Ling Lin F., Rong X., Wei Fen L., Jiang Bing S., Ping L. and Chun Xia H., 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances*. 25 (1): 1 – 12.
- ◆ Mohamed Ibrahim A. et Khelif M.N.H., 1997. Le palmier dattier : culture, surveillance et production dans les pays arabe (document en arabe). Elmaaref Alexandrie : 625- 658.
- ◆ NFV 05- 113, 1972. Minéralisation des matières organiques par incinération. Produits dérivés des fruits et légumes. 2^{ème} ed. Lavoisier Tec et Doc. Paris : 97 – 100.
- ◆ Perry J.J., Staley J.P. et Lory S., 2004. Microbiologie cours et questions de révision. Dunod, Paris : 103 – 165.
- ◆ Yun-Ping Zhu, Li-Jun Ying, Yong-Qiang Cheng, Kohji Yamaki, Yutaka Mori, Yi-Cheng Su and Li-Te Li, 2008. Effects of sources of carbon and nitrogen on production of α -glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *Food Chemistry* 109: 737 - 742.