

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

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



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

MASTER

Thème

**Valorisation de la mélasse du complexe
Cevital dans la production de métabolites et
de biomasse d'haloarchées**

Présenté par :

KACI Kamilia & OUALAH Yacine

Soutenu le : **18 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M. BOUKEROUI Abdelhamid	MCA	Président
Mme. IDRES Nacera	MAA	Encadreur
M. RAHAL Naïm	Invité	Co-Encadreur
Mme. BOUCHERBA Nawel	MCA	Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016



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 ; M^{me} BOUCHERBA, et M. BOUKEROUI pour le temps et l'intérêt qu'ils ont accordé à ce modeste travail.

Nous exprimons notre respect et notre gratitude à M^{me} IDRES, pour avoir accepté de nous encadrer et pour avoir suivi notre travail avec bienveillance.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à M. REHAL Naim pour nous avoir encadrés durant notre stage au niveau du complexe Cevital. Ainsi qu'à tous le personnel des laboratoires de la base sucre 3000, et de la base sucre 2000 pour leur suivi, leurs enseignements avisés et surtout leur modestie et simplicité, un grand merci.

Un remerciement particulier à M. BENABDELHAK Lamine pour son aide inestimable. Et l'ingénieur du laboratoire M^{lle} MENNAS Badria, avec qui nous avons passé des moments inoubliables.

Un merci sincère est adressé à nos enseignants, qui nous ont accompagnés 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 ma grand-mère.

*Mes très chers parents mes piliers, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont
toujours encouragé.*

Mes frères que j'adore Anis et Nacim

Mes grands parents.

Mes oncles et leurs épouses.

Tous mes cousins.

*Toute notre promo M2 BM. Des personnes superbes avec qui j'ai passé de très
beaux moments parmi eux; Wilou t'es juste exceptionnelle. Sissi, Mina, Salma,
Lila, Dihia, les deux tarées Nesrine et Nabila.*

A mes meilleures amies Nadine et Leila.

Ainsi qu'à tous mes autres amis sans exception.

*Mais également une petite dédicace à Samira la secrétaire de notre département,
une si bonne personne, joyeuse serviable et adorable.*

*A toute personne ayant un jour croisé mon chemin et m'ayant fait grandir et me
construire.*

Et enfin à mon binôme yacine sans qui j'aurais rien pu faire.

Kamilia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont toujours soutenu.

Mes frères et sœurs ainsi qu'à leurs épouses et époux respectifs.

Mes chers neveux et nièces.

Mes potes ; Yanis, Salah, Yacine et Malek.

Mes voisins ; Nadjim, Hichem et Ilyes.

Mes tous amis (es) sans exception.

A toute la promo M2 BM, avec qui j'ai passé une merveilleuse année.

A tout ceux qui m'ont aidé à avancé et qui m'ont toujours soutenu.

Et enfin à mon binôme Kamilia sans qui j'aurais rien pu faire.

Yacine

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Partie théorique

I. La mélasse.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. les différents types de mélasse.....	3
I.2.1. Mélasse de canne à sucre.....	3
I.2.2. Mélasse de betterave sucrière.....	3
I.3. La composition de la mélasse.....	3
I.4. Caractérisation physique et nutritionnelle.....	4
I.5. Contamination de la mélasse.....	4
I.6. Principales utilisations de la mélasse.....	5
II. Les archées.....	7
II.1. Généralités.....	7
II.2. Définition des archées halophiles extrêmes.....	8
II.3. Propriétés des archées halophiles extrêmes.....	8
II.4. <i>Haloarcula</i> et <i>Halorubrum</i>	9
II.5. Adaptation aux conditions hyper salées.....	10
II.6. Intérêt des archées halophiles.....	10
II.6.1. La biomasse.....	10
II.6.2. Les enzymes des archées halophiles.....	11
II.6.3. Les métabolites des archées halophiles.....	11
II.7. Métabolismes des haloarchées.....	12
III. Optimisation par plan factoriel.....	13
III.1. Modélisation par les plans d'expérience.....	13
III.2. Plan factoriel à deux niveaux.....	13

Partie pratique

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	14
I.1. La mélasse.....	14
I.2. Matériel biologique.....	14
I.3. Milieux de culture.....	14
I.4. Appareillages et réactifs.....	14
II. Méthodes.....	15
II.1. Analyse Physico-chimiques de la mélasse.....	15
II.1.1. Détermination du Brix.....	15
II.1.2. Détermination de la polarisation.....	15

II.1.3. Détermination de la pureté.....	15
II.1.4. Détermination du pH.....	16
II.1.5. Analyse sur HPLC de la mélasse.....	16
II.2. Culture des souches D'haloarchées.....	16
II.2.1. Préparation de la pré-culture.....	16
II.2.2. Culture.....	16
II.2.3. Estimation de la croissance.....	17
II.2.3.1. Mesure de la DO.....	17
II.2.3.2. Mesure du poids sec des cultures.....	17
II.2.3.3. Extraction et dosage des pigments membranaires.....	17
II.3. Mise en évidence de l'activité antibiotique produite par les souches d'haloarchées.....	17
II.4. Confection d'un milieu de culture à base de mélasse.....	18
II.4.1. Détermination d'une source d'azote idéale pour la croissance des souches haloarchées.....	18
II.4.2. Détermination d'une base saline adéquate.....	18
II.4.3. Culture des souches à différentes concentrations de mélasse.....	18
II.5. Optimisation par un plan factoriel étoilé.....	18
III. Présentation du complexe Cevital.....	21
III.1. Historique.....	21
III.2. Situation géographique.....	21
III.3. Activités de Cevital.....	21
III.4. Missions et objectifs.....	22

Résultats et Discussion

I. Analyse physico-chimique de la mélasse.....	23
I.1. Le Brix.....	23
I.2. L polarisation.....	24
I.3. La pureté.....	24
I.4. Le pH.....	25
I.5. Résultats d'analyse de la mélasse sur HPLC.....	25
II. Confection d'un milieu de culture à base de mélasse.....	26
II.1. détermination d'une source d'azote idéale pour la croissance des souches d'haloarchées.....	26
II.2. Détermination d'une base saline adéquate.....	29
II.3. Culture des souches à différentes concentration de mélasse.....	29
II.4. Élaboration de modèles pour la croissance et la production de métabolites par le plan factoriel.....	30
II.4.1 Élaboration du modèle pour la croissance.....	31
II.4.2. Test d'activité du surnageant.....	32
II.4.3. Élaboration du modèle pour la longueur d'onde du pigment.....	32
II.4.4. Élaboration du modèle de l'absorbance pigment extrait.....	33
II.5. Validation des modèles.....	34

II.6. optimisation par plan factoriel.....	34
II.6.1. Optimisation de la croissance (DO_{600}).....	34
II.6.2. Optimisation de la production des pigments.....	35
Conclusion.....	37

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Titres	Pages
Tableau I : La composition de la mélasse de canne et de betterave.	4
Tableau V : Facteur et domaine expérimental.	19
Tableau VI : Matrice d'expériences en unités centrées réduites.	20
Tableau VII : Résultats de l'analyse de la mélasse sur HPLC.	25
Tableau VIII : Résultats des 12 souchesensemencé dans le milieu DSMZ 372 à différentes sources d'azote.	27
Tableau X : mesure de la Do des 16 souches sur le milieu à base de mélasse à différentes concentrations.	30
Tableau XII : Matrice d'expérience et résultats expérimentaux.	31
Tableau XIII : ANOVA de la DO.	31
Tableau XIV : Matrice d'expérience et résultats de l'activité antibiotique.	32
Tableau XV : ANOVA de la longueur d'onde.	33
Tableau XVI : ANOVA de l'absorbance.	33

Liste des tableaux en annexes

Titres	Annexes
Tableau II : les souches d'Archaea utilisées	I
Tableau III : compositions des mieux de culture pour des souches halophiles extrêmes	III
Tableau IV : composition du milieu C1	III
Tableau IX : Croissance de 16 souches d'haloarchées sur différents milieux liquides	VI
Tableau XI : mesure du pH dans le milieu à différente concentration de mélasse	VII

Liste des figures

Titres	Pages
Figure (01) : Domaine de variation du « facteur », constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.	13
Figure (02) : représentation graphique de l'espace expérimentale et A, B, C et D représentent les points expérimentaux.	13
Figure (04) : Evolution du Brix en fonction des jours.	23
Figure (05) : Evolution de la polarisation en fonction des jours.	24
Figure (06) : Evolution de la pureté en fonction des jours.	24
Figure (07) : Evolution du pH en fonction des jours.	25
Figure (08) : Photo de la culture en Erlen avec NaNO ₃ .	26
Figure (09) : Croissance de 4 souches d'haloarchées en tube sur milieux à base de NaNO ₃ et de NH ₄ Cl.	28
Figure (10) : Poids des cellules après croissance sur milieu à base de NaNO ₃ ou NH ₄ Cl comme source d'azote	28
Figure (14) : Diagramme de contour dans le plan DO ₆₀₀ et concentration de mélasse et NaNO ₃ .	34
Figure (15) : Diagramme de contour dans le plan λ _{max} et concentration de mélasse et NaNO ₃ .	35
Figure (16) : diagramme de contour dans le plan absorbance et concentration de mélasse et NaNO ₃ .	35
Figure (17) : caractéristiques des caroténoïdes chez <i>Haloarcula japonica</i> .	36

Liste des figures en annexes

Titres	Annexes
Figure (03) : Organigramme du complexe CEVITAL	V
Figure (11) : ANOVA de la DO	VIII
Figure (12) : ANOVA de la longueur d'ondes	VIII
Figure (13) : ANOVA de l'absorbance	VIII

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADP: Adénosine Di-Phosphate.

ARN: Acide Ribo-Nucléique.

ATP: Adenosine Tri-Phosphate.

DO: Densité Optique.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen.

H7 : Halocine 7.

K: constante.

Kcal: kilo calories.

KCl: chlorure de potassium.

KDa : kilo Dalton.

KJ: kilo joule.

M+E.T : milieu + Extrait de levure.

M+NaNO₃ : milieu + NaNO₃.

M+NH₄Cl : milieu + NH₄Cl.

MA : milieu A.

MA+B: base A + NH₄Cl.

MA+C : base A + NaNO₃.

MB : milieu B.

MC : milieu C.

MC1 : milieu C1.

MFm : milieu F modifié.

MgSO₄ : sulfate de magnésium.

MH : milieu pour Halorubrum.

Mol : Mole.

MS : matière sèche.

Mt : milieu DSMZ 372 (temoin).

N: normal.

N₂: nitrogène.

N₂O: nitrite.

NaCl: Chlorure de sodium.

NaNO₃: nitrate de sodium.

NH₄Cl: chlorure d'ammonium.

NO: monoxide de nitrogène.

NO₃⁻: ion nitrate.

p/p: poids/poids.

Pol : polarisation.

Red/Ox : oxydoréduction.

rpm : rotation par minute.

S : souche.

T: tonne.

TGD: triglycosyldiéter.

V/V: volume/volume.

x_i : niveau attribué au facteur i.

Introduction

La technologie sucrière compte parmi les industries agroalimentaires les plus anciennement connues, et les plus répondues dans le monde. De nos jours, différents pays produisent du sucre à partir de la canne à sucre. La mélasse est le plus important coproduit de cette dernière (Jiranuntipon, 2009).

Cevital fait partie de ces complexes agroalimentaires qui contribuent à l'économie algérienne. Cevital a une capacité de production de 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 (Anonyme, 2008). Cette mélasse représente une véritable mine d'or en raison de sa composition riche (saccharose, sucres totaux, sels minéraux) (Curtin, 1983). D'où émanent des perspectives intéressantes quant à la valorisation de cette dernière.

C'est dans ce cadre qu'est basée notre étude. En effet, le travail que nous avons tenté de réaliser s'est porté sur, la possibilité de pouvoir valoriser la mélasse comme milieu de culture pour des souches d'haloarchées.

Les haloarchées qui sont des microorganismes halophiles extrêmes (Robinson et *al.*, 2005), qui exigent un minimum de 150 g/l de NaCl pour la croissance et La plupart des espèces lysent à des concentrations de sel en dessous de 100 g/l. Il sont non pathogènes (Eckburg et *al.*, 2003 ; Cavicchioli et *al.*, 2003) et commencent à être de plus en plus étudiés. Ils présentent un intérêt biotechnologique considérable (Oren, 2002), tant en production de biomasse, 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) .

L'objectif de ce mémoire étant de déterminer les caractéristiques physicochimiques de la mélasse ainsi que la confection d'un milieu de culture à base de mélasse, qui permettra éventuellement une croissance optimale de quelques souches d'haloarchées, ainsi que la production d'halocines et de pigments caroténoïdes.

Pour se faire, on a divisé ce travail en deux parties :

- ✓ Une partie théorique, qui consiste en une synthèse bibliographique concernant la mélasse et les haloarchées ;
- ✓ Et une partie pratique, dans laquelle nous avons essayé de confectionner un milieu de culture permettant la croissance de quelques souches d'haloarchées.
 - Dans une première étape, nous avons recherché les facteurs nutritionnels clés permettant la croissance de l'ensemble des souches d'haloarchées, qui doivent figurer dans le milieu de culture (Base saline et une source d'azote minérale)
 - Dans la deuxième étape nous avons optimisé les concentrations de mélasse et de la source d'azote permettant la croissance optimale d'une souche d'*Haloarcula* sp.

Partie théorique

I. La mélasse

I.1. Définition

La mélasse est le résidu final obtenu, lors de l'extraction du saccharose par évaporation, cristallisation et centrifugation du jus à partir de la canne à sucre ou de la betterave sucrière. La mélasse se présente sous forme d'un résidu sirupeux, pâteux et visqueux de couleur brune noirâtre, incristallisable, elle est obtenue après le turbinage de la cuite du dernier jet (Curtin, 1983).

I.2. Les différents types de mélasse

I.2.1. Mélasse de canne à sucre

C'est le co-produit de fabrication ou de raffinage du sucre à partir de la canne à sucre. Sa teneur en sucre totaux est supérieure à 46%. Elle présente une humidité de 27% et une densité supérieure à 79.5°Brix. Son pH varie entre 4 et 6 (Curtin, 1983).

I.2.2. Mélasse de betterave sucrière

C'est le co-produit de fabrication ou de raffinage du sucre à partir de la betterave sucrière. Sa teneur en sucres totaux est supérieure à 48%, sa densité est supérieure à 79°Brix, et son pH varie entre 5 et 6 (Curtin, 1983).

I.3. La composition de la mélasse

La composition des diverses formes de mélasse offre des différences importantes selon le pays d'origine, le processus de fabrication, la saison et les conditions de stockage.

Elle varie en fonction de la variété, la maturation de la canne à sucre et de la betterave sucrière, des conditions climatiques, du sol et de la nature du procédé de clarification (Wiley & Sons, 1963).

Par conséquent ces variations peuvent influencer sur la teneur de la mélasse en nutriments, la flaveur, la couleur, la viscosité et la teneur en sucres totaux (Curtin, 1983).

La composition de la mélasse de canne, et de betterave est représentée dans le **Tableau I** :

Tableau I : La composition de la mélasse de canne et de betterave (Larpent et Larpent, 1985 ; Olbrich, 2006)

Les composants (%)	Mélasse de canne		Mélasse de betterave	
	Selon Larpent	Selon Olbrich	Selon Larpent	Selon Olbrich
Matières sèches (°Brix)	80(78-86)	80	80(75-82)	83,5
Sucre totaux	54(45-60)	62	47(44-52)	53
Sucre réducteur	19	15	2	ND
Saccharose	35	32	45	51
Non sucre organique	14	10	20	19
Cendre	12	8	10	11,5
Azote	0,5	0,5	2	1,6
gomme	0,5 (0,4-5,0)	ND	Néant	ND

I.4. Caractéristiques physiques et nutritionnelles

La mélasse renferme certaines caractéristiques nutritionnelles qui font d'elle une source d'énergie considérable. Les critères moyens pour 100 g de mélasse sont comme suit:

Énergie.....	1212 kJ / 290 kcal
Matières grasses.....	0,1 g
Dont acides gras saturés.....	0 g
Glucides.....	74,7 g
Dont sucres.....	55,5 g
Fibres alimentaires.....	0 g
Protéines.....	0 g
Sel.....	0,09 g
Calcium	205 mg
Magnesium.....	242 mg
Fer.....	4,72 mg
pH.....	5,5 (MARKAL Produits Alimentaires, 2014)

I.5. Contamination de la mélasse

Dans la mélasse, les bactéries sont très rares (quelques germes par gramme) du fait de sa concentration et de sa forte pression osmotique, qui ne permettent pas aux micro-organismes de se développer. Cela est dû aux longs traitements thermiques appliqués en sucrerie (De Miniac, 1991).

En cas de la dilution, cette règle ne tient plus car une dilution par une eau qui elle-même contaminée, permet un développement de micro-organismes (Bernard et *al.*, 1991).

Une carence en air provoque une biosynthèse accrue d'acides organiques et l'acidité du milieu provoque la croissance des souches contaminants (De Miniac, 1991).

I.6. Principales utilisations de la mélasse

L'intérêt de la mélasse réside dans sa teneur en sucre résiduel et sa valeur énergétique ; elle est utilisée en alimentation animale, pour la production d'alcool, ou comme substrat nutritif pour la production de levures de boulangerie, d'acides aminés ou de protéines et d'acides organiques (Commission Européenne, 2004 ; Courteau, 2005).

La mélasse contient environ la moitié de son poids en sucre. Les principales utilisations sont :

- **Production d'alcool éthylique :** L'éthanol est un liquide inflammable, insipide, sans couleur et légèrement toxique. L'éthanol est généralement obtenu par conversion microbiologique des fermentations de la mélasse (Visser et Frederiks, 2006).

La production d'alcool dans les distilleries, basé sur la mélasse, (Fahrasmane et Parfait, 2011) constitue une industrie importante. Une tonne d'alcool éthylique peut être produite à partir d'environ 3.5 à 4 tonnes de mélasse (Sanogo, 2005).

- **Utilisation dans l'alimentation de bétail :** La mélasse est utilisée dans l'alimentation des ruminants et des chevaux, en mélange avec de la paille ou d'autres aliments cellulosiques, tels que le son de blé, à des ratios différentes afin d'évité l'effet laxatif. Mais quels que soient l'espèce animale et les produits, une forte complémentation azotée s'impose vu que la mélasse est pauvre en matière azotée (Archimède et *al.*, 2011).

- **Production de levures de boulangerie :** La mélasse est utilisée en levurerie comme milieu de culture, après un ensemble de traitements (Jiménez et *al.*, 2004). La levure de boulangerie, *Saccharomyces cerevisiae*, est multipliée en levurerie dans des cuves contenant de la mélasse de sucrerie, des éléments azotés et des minéraux, en milieu fortement oxygéné (Le blanc, 2008).

Les levures utilisent les sucres de la mélasse comme source principale de sucre et par conséquent d'énergie (Benaouida, 2008).

- **Production de vinasse :** Après fermentation, la mélasse de betterave donne naissance à un autre coproduit qui est la vinasse de mélasse. Les vinasses sont des résidus de la distillation de la mélasse lors de la fabrication d'alcool. Elles ont longtemps été considérées comme des déchets polluants à éliminer. Cependant, elles sont valorisables en agriculture surtout sous forme concentré (Courteau, 2005).

- **Production d'acide lactique :** Les bactéries lactiques exigent des aliments complexes, comme la mélasse, dont elles fermentent les sucres en acide lactique. La souche utilisée est homofermentaire : *Lactobacillus delbrukii* avec un rendement de 90% de sucre utilisé (Sauer, 2007).

- **Alimentation humaine :** Une petite fraction de mélasse se retrouve sur les tablettes des super marchés pour la consommation humaine. (Azrate, 2005)

II. Les haloarchées

II.1. Généralités

Historique

C'est en étudiant l'ARN ribosomal 16S de divers organismes que Carl Woese, en 1977, propose de séparer clairement les procaryotes en deux groupes ; les bactéries et les archaebactéries, mais aussi de considérer que le monde du vivant est composé de trois groupes et non pas seulement de deux : les bactéries, les archaebactéries et les eucaryotes.

L'analyse des séquences génétiques a indiqué que, les archées ont de nombreuses similitudes avec les procaryotes y compris leur morphologie, et avec les eucaryotes en enzymes impliquées dans la traduction, transcription, et la réplication d'ADN (Thorsten et *al.*, 2004).

Taxonomie

Aujourd'hui, le domaine archaea est subdivisé en trois phylums : les Crenarcheota, les Euryarcheota, et les Korarchaeota.

- ❖ Les Crenarchaeota qui regroupent les organismes les plus thermophiles, les *Thermoproteales*, les *Pyrodictiales* et les *Sulfolobales*, métabolisant le soufre comme source d'énergie.
- ❖ Les Korarchaeota renferment les organismes isolés de sources chaudes mais aucune souche n'a été isolée en culture pure.
- ❖ Les Euryarchaeota regroupent les phénotypes variés, *Thermococcales*, les *Methanococcales*, les *Methanobacterales* et les *Halobacterales*.

Les archées sont des microorganismes capables de se développer dans des conditions extrêmes, défavorables pour la plupart des microorganismes. On distingue :

- Les hyperthermophiles : croissance optimale à de haute températures (>80°C) (Lloyd et *al.*, 2005) ;
- Les méthanogènes : croissance à une température comprise entre 0°C et 100°C. Ce sont des anaérobies stricts producteurs de méthane (Allers et Mevarech, 2005) ;
- Les thermophiles-acidophiles métabolisant le soufre : sont des thermophiles et acidophiles dépendant de soufre (Schiraldi et *al.*, 2002 ; Allers et Mevarech, 2005) ;

- Les halophiles extrêmes : croissance optimale à une concentration élevée en sels (>20% de NaCl) (Pawel et *al.*, 2006).

II.2. Définition des Archées halophiles extrêmes

Le mot halophile est composé de deux parties « hals = sel », et « phil = aime ». De ce fait, les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (Ebel et *al.*, 2004).

Les archées halophiles extrêmes sont très fréquentes dans les lacs salés et les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau de mer conduisant à l'obtention de sel marin, dans les sédiments salés. Elles peuplent aussi les lacs hypersalés, les lacs alcalins, les sols salés et le sable marin. La plupart des haloarchées sont aérobies, chimio-organotrophes (Ochsenreiter et *al.*, 2002).

Par ailleurs on les retrouve dans certains produits alimentaires salés tels que les poissons salés.

II.3. Propriétés des archées halophiles extrêmes

- Ce sont des microorganismes mésophiles et thermophiles et thermotolérants (Robinson et *al.*, 2005). En ce qui concerne leur croissance, il est souhaitable de les incuber à 37°C pour la plupart des archées halophiles extrêmes. D'autre part, élever la température de 10°C peut améliorer considérablement le taux de croissance sur les milieux solides et liquides (Robinson et *al.*, 2005) ;
- ce sont des anaérobies facultatifs ou obligatoires. La plus part utilise les acides aminés, les hydrates de carbone ou les acides organiques comme principale source d'énergie (Oren, 2011) ;
- L'oxygène est l'accepteur final d'électrons pour la majorité des archées halophiles extrême. Certaines espèces se développent aussi, de façon anaérobie, par fermentation ou par dénitrification par exemple *Haloferax mediterranei* qui a été isolé dans des étangs salés Santa Pola (Alicante, Espagne) (Oren, 1999 ; Bonete et *al.*, 2008) ;
- Ce sont des microorganismes qui résistent à certains antibiotiques (Raghavan et Furtado, 2004). Un milieu à base d'ampicilline a permis de sélectionner des haloarchées (Burns et Dyall-Smith, 2006);

- Quelques archées halophiles sont capables de dégrader une variété de n-alcanes et d'hydrocarbures aromatiques en présence de NaCl (Nicholson et *al.*, 2003).

II.4. Haloarcula et Halorubrum:

► Haloracula :

Haloarcula est un genre d'archées halophiles de la famille des Halobacteriaceae. Les espèces d'Haloarcula se distinguent de celles des autres Halobacteriaceae par la présence de dérivés spécifiques de lipides polaires de type triglycosyldiéther TGD-2. Elles se développent de façon optimale à une température de 40 à 45 °C, sous forme de feuilletts d'environ 65 cellules de forme carrée ou triangulaire. On les trouve dans les environnements salés neutres tels que les lacs salés, les marais salants et les sols salins. Comme pour les autres Halobacteriaceae, leur croissance requiert une concentration d'au moins 1,5 mol·L⁻¹ de NaCl, mais elles se développent de façon optimale pour une concentration de NaCl de 2,0 à 4,5 mol·L⁻¹ (Torreblanca et *al.*, 1986 ; Oren et *al.*, 2009).

► Halorubrum :

Les membres des archées de l'ordre *Halobacteriales*, familles *Halobacteriaceae* (McGenity et Grant, 1995 ; Oren et *al.*, 2009).

Ce Sont des composants considérables de haute salinités, le genre *Halorubrum* est un membre de la famille et les espèces de ce genre sont distribuées largement dans les environnements hyper-salins, Le nom *halorubrum* a été proposé pour la première fois par Grant et Ross (1986) afin de distinguer entre les groupes des espèces du genre *Halobacterium*. Cependant le genre *Halorubrum* n'a pas été reconnu jusqu'au travail subséquent de McGenity et Grant, qui ont proposé un transfère de 4 espèces d'*Halobacterium* dans le nouveau genre *Halorubrum*. Le transfère a été basé sur la phylogénétique en groupant les différentes séquences d'ARNr 16s des 4 espèces avec *halorubrum saccharovororum* comme étant l'espèce type (Pesenti et *al.*, 2008).

Les espèces de ce genre sont des cocci Gram-, tolérant une concentration en NaCl supérieure à 30%, avec un optimum de 20%.

L'espèce type est *halorubrum saccharovorum* isolé à Saltern en Californie. Elle croît à une température optimale de 50°C et à un pH plus ou moins neutre. Les membres de ce genre produisent des pigments rouges/pourpres (Kanekar et *al.*, 2012).

II.5. Adaptation aux conditions hyper salées

Les haloarchées extrêmes utilisent deux stratégies pour équilibrer leurs osmolarités membranaires :

- La première implique une accumulation de la concentration en KCl, cette stratégie exige une adaptation de la machine enzymatique intracellulaire, comme les protéines devraient maintenir leurs conformations adéquates et leurs activités ;
- La deuxième stratégie est la plus répandue dans la nature, elle est basée sur la biosynthèse et/ou l'accumulation des composés organiques dissous ayant un potentiel osmotique. Les cellules qui utilisent cette stratégie excluent autant que possible le sel de leurs cytoplasme (Oren, 2008) ;

II.6. Intérêt des archées halophiles

II.6.1. La biomasse

- Les archées halophiles sont utilisées pour le traitement des effluents dans l'industrie textile et dans le traitement des écosystèmes salins souillés avec les produits pétroliers (Lefebvre, 2005) ;
- Les archées sont utilisées essentiellement 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) ;
- La dénitrification est la production biologique de gaz NO, N₂O et N₂ à partir de NO₃⁻. ce phénomène est retrouvé chez les archées halophiles et les hyper thermophiles qui utilisent le nitrate comme accepteur final d'électron dans la chaîne respiratoire ; la dénitrification occupe une place importante dans le domaine de l'agriculture où il en résulte la perte d'engrais (nitrate) (Bonete et *al.*, 2008).

II.6.2. Les enzymes des archées halophiles

Les archées halophiles produisent des enzymes stables et adaptés à des environnements extrêmes, d'où leur application dans les processus industriels ;

- Leurs hydrolases et isomérase sont utilisées dans la production de suppléments alimentaires.
- L'amylase produite par l'archéon Haloalkaliphilique est exploitée pour la dégradation de l'amidon à des concentrations élevées en NaCl (Margesin et Schinner, 2001).

II.6.3. Les métabolites des archées halophiles

- La bactériorhodopsine est une protéine de 25 kDa qui porte un groupe rétinol lié à la lysine-216. Elle sert de pompe à protons à lumière-dépendante (Oren, 2010) ; Cette protéine est utile dans la fabrication de biopuces pour la nouvelle génération des ordinateurs. La membrane artificielle capable de convertir la lumière du soleil en électricité, peut également être une possibilité technologique (Bullock, 2000) ;
- L'halorhodopsine permet à des microorganismes d'employer une faible énergie pour conduire des processus bioénergétique (Schiraldi et *al.*, 2002) ;
- Les lipides d'haloarchées jouent un rôle important dans l'adaptation aux conditions extrêmes des milieux où prolifèrent les archées. Ils ont également suscité un intérêt marqué pour leurs propriétés singulières et leurs applications biotechnologiques potentielles pour la réalisation de films lipidiques monocouches particuliers ou la production de liposomes d'archées (archaeosomes). L'utilisation de ces films lipidiques tétraéther monocouches permet la création de membranes artificielles dont les propriétés de (thermo)stabilité, d'isolation et de perméabilité sont intéressantes pour des traitements de surface et le développement de matériaux biomimétiques (Querellou, 2010);
- Solutés compatibles et extrêmolytes : Les extrêmolytes sont des composés organiques solubles synthétisés par les extrémophiles pour protéger leurs constituants cellulaires des conditions environnementales. Dont la stabilisation des enzymes, protection des protéines et des anticorps, protection contre les dommages congélation/ décongélation, etc. Le plus connu est l'ectoïne (Querellou, 2010) ;
- 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).

II.7. Métabolismes des haloarchées

➤ Métabolisme carboné

Les haloarchées sont étonnamment différents dans leurs demandes nutritionnelles et voies métaboliques. La diversité métabolique des archées halophiles a été étudiée au niveau génomique par la reconstruction métabolique systématique et analyse comparative, cette étude révèle des différences dans les gènes codant pour les enzymes ; par exemple les enzymes impliqués dans la dégradation du glycérol, du métabolisme du pentose et la synthèse de l'acide folique.

Le métabolisme des haloarchées est considérablement différent de l'un l'autre, Bien qu'il y ait des espèces qui utilisent des carbo-hydrate comme *Haloarcula marismortui* et *Halorcula 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 hypersalins (Falb et *al.*, 2008).

➤ Métabolisme azoté

Le cycle de l'azote, principalement soutenu par des procaryotes, implique différentes réactions Red/Ox. Les réactions ont porté principalement sur des fins d'assimilation ou de processus respiratoires.

La réduction du nitrate est une propriété chez beaucoup d'espèces de bactéries, moisissures, algues, plantes et Archées, La nitrification consiste en la conversion de l'oxydant de gaz ammoniac en nitrite par hydroxylamine, et oxydation du nitrite en nitrate (Costa et *al.*, 2006). L'assimilation de l'azote permet l'utilisation de NO_3^- comme seule source d'azote pour la croissance. Des études ont révélé que les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'assimilation du nitrate ont été trouvés dans les génomes des deux sous-groupes majeurs des Archées : Crenarchaeota et Euryarchaeota (Cabello et *al.*, 2004).

III. Optimisation par plan factoriel :

III.1. Modélisation par les plans d'expérience :

Afin de trouver un lien existant entre une grandeur d'intérêt « y » et des variables « xi » qui peuvent modifier la valeur de « y », il est souhaitable d'utiliser les plans d'expériences. Ces derniers servent à optimiser l'organisation des essais expérimentaux dans le but d'obtenir un maximum de renseignements, avec un minimum d'expériences et une meilleure précision possible sur les réponses calculées avec le modèle choisi (Goupy, 2000).

Dans une étude, une grandeur est mesurée à chaque essai. Cette grandeur est appelée réponse. Elle dépend de deux ou de plusieurs variables, dits : facteurs.

La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau **Figure (01)** (Hoinard, 2009).

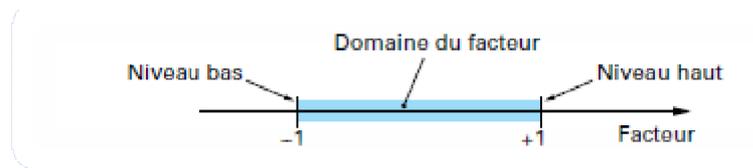


Figure (01) : Domaine de variation du « facteur », constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut (Goupy, 2000).

III.2. Plan factoriel à deux niveaux :

Pour deux facteurs, le domaine d'étude est un carré. **La Figure (02)** représente un plan factoriel complet à deux facteurs. Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur. Le modèle est : $y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + e$.

avec :

- y** : réponse,
- x_i** : niveau attribué au facteur i,
- a₀** : valeur de la réponse au centre du domaine d'étude,
- a₁** : effet du facteur 1,
- a₂** : effet du facteur 2,
- a₁₂** : interaction entre les facteurs 1 et 2,
- e** : résidu.

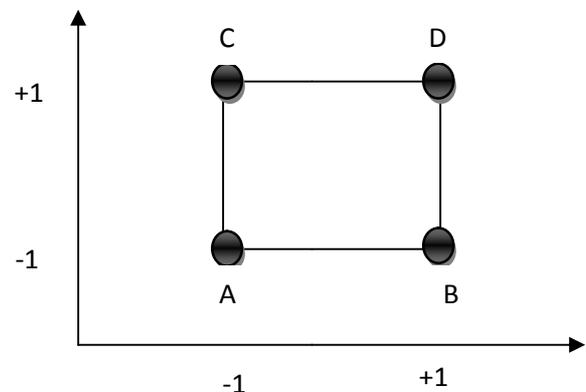


Figure (02) : représentation graphique de l'espace expérimental et A, B, C et D représentent les points expérimentaux

Partie pratique

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. la mélasse

La mélasse utilisée provient de la raffinerie de sucre roux, l'échantillon est prélevé à partir des bacs terre 35T3 et 35T4 au niveau du complexe CEVITAL Bejaia. Vu sa composition, elle sera utilisée comme source de carbone et de certains minéraux tels que le calcium et le fer.

I.2. Matériel biologique

16 isolats d'archées halophiles et une souche de référence *Halobacterium salinarum* ont été utilisées. Leurs caractéristiques et origines sont données dans le **Tableau II** en annexe (I).

I.4. Appareillages et réactifs

Voir annexe (II).

I.3. Milieux de cultures

Différents milieux ont été utilisés pour le développement des archées halophiles afin de déterminer la source d'azote et la source minérale optimale pour leur croissance à mettre dans le milieu à base de mélasse. Les milieux sont :

- DSMZ 372 ;
- Milieu A ;
- Milieu B ;
- Milieu C ;
- Milieu F ;
- Milieu C1.

Leurs compositions sont données en annexe (III).

II. Méthodes

II.1. Analyses physico-chimiques de la mélasse

II.1.1 Détermination du Brix (ICUMSA, 1998)

La détermination de la teneur massique en matière sèche des produits sucriers est réalisée par mesure de l'indice de réfraction au moyen d'un réfractomètre thermostaté à 20°C.

Elle se fait comme suit :

- Peser dans un pot 20g±5g de l'échantillon à analyser à l'aide d'une balance de précision ;
- Effectuer une dilution de 10 (p/p) à l'aide d'un diluteur automatique, et agiter jusqu'à dissolution et homogénéisation du produit ;
- Verser une quantité de la solution préparée dans le réfractomètre et lire la valeur chiffrée.

Les résultats s'expriment suivant la loi ci-dessous ;

$$\text{Brix (\%)} = \text{lecture au réfractomètre} \times \text{le facteur de la dilution}$$

II.1.2 Détermination de la polarisation (ICUMSA, 2009)

La rotation optique d'une solution de sucre déterminée par polarimètre, est l'effet produit par sa teneur en saccharose en déviant le faisceau lumineux.

Après avoir filtré la solution, précédemment préparée à l'aide d'un filtre Wattman, verser un certain volume dans le polarimètre et lire la polarisation à l'échelle de 26g.

Les résultats s'expriment comme suit :

$$\text{Pol (\%)} = K \times \text{Lecture au polarimètre} \times \text{le facteur de la dilution}$$

$$(K = 0.26)$$

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 (MS).

$$\text{Pureté} = (\text{Teneur en saccharose} / \text{Teneur en matière sèche}) \times 100 = (\text{pol} / \text{Brix}) \times 100$$

II.1.4 Détermination de pH (ICUMSA, 1994)

Le principe est la mesure du potentiel d'Hydrogène de la solution. L'électrode est neutralisée avec des solutions tampon, rincée avec de l'eau distillée et immergée dans la solution de mélasse. La lecture est prise après 5min quand le potentiel d'équilibre à travers l'électrode est atteint.

la mesure s'effectue comme suit :

- Peser dans un pot 50g±5g de l'échantillon à analyser à l'aide d'une balance de précision ;
- Effectuer une dilution de 50 (p/p) à l'aide d'un diluteur automatique et agiter jusqu'à dissociation et homogénéisation du produit ;
- Introduire la sonde du pH-mètre à l'intérieur de la solution homogène ;
- Prendre la lecture affichée sur le pH-mètre ;

II.1.5. Analyse sur HPLC de la mélasse

Une analyse sur HPLC (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) a été faite par le personnel du laboratoire de microbiologie 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 Brown liquide en tube, celui-ci est incubé à 40°C sous agitation (200 rpm) pendant 24 à 48h. Deux à trois repiquage successifs sont réalisés dans les mêmes conditions afin d'obtenir une culture jeune et synchrone.

II.2.2. Culture

1% de la pré-culture est inoculé dans des tubes à essai contenant 2 ml de milieu ou dans des Erlenmeyer de 100 ml contenant 15 ml de milieu. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 10 à 15 jours.

II.2.3. Estimation de la croissance

II.2.3.1. Mesure de la DO

Les échantillons prélevés, après 15 jours d'incubation, sont d'abord dilués au 1/10^{ème} dans une solution saline (la composition est donné en annexe III), puis leur absorbance est mesurée à 600nm.

II.2.3.2. Mesure du poids sec des cultures

Après la centrifugation des cultures à 14000 rpm pendant 10 min, le culot est récupéré et mis à sécher à 40°C pendant une nuit, puis mit dans un dessiccateur pendant 15 min, afin d'enlever toute l'humidité qui y reste, puis pesé.

II.2.3.3. Extraction et dosage des pigments membranaires

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

Un spectre à balayage est réalisé entre (300 et 700 nm), dans le but de déterminer les pics et leur absorbances correspondants aux pigments membranaires des haloarchées.

II.3. Mise en évidence de l'activité antibiotique produite par les souches d'haloarchées

L'activité antibiotique est mise en évidence vis-à-vis d'une souche de référence *Halobacterium salinarum* DSMZ 3754.

La souche cible DSMZ 3754 est cultivée de la même manière que précédemment par repiquage successif jusqu'à obtention d'une DO de 0,6-0,8 à une longueur d'onde λ de 600 nm.

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

Une fois la gélose solidifiée, des puits sont découpés à l'aide d'un emporte pièce.

Les prélèvements sont centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min, dans le but d'éliminer les cellules. A partir des surnageant de culture, 75 µl sont déposés à l'intérieur de chaque puits ayant eu le fond obturé par une goutte du même milieu, afin de limiter la diffusion du surnageant à testé, sous la gélose.

Les boîtes de Petri doivent être délicatement mises dans des sacs scellés, pour éviter la cristallisation des sels par évaporation, puis incubées à 40°C. L'activité est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition, visiblement une zone claire autour des puits.

II.4. Confection d'un milieu de culture à base de mélasse

II.4.1. Détermination d'une source d'azote idéale pour la croissance des souches haloarchées

Dans le but de déterminer la source d'azote optimale pour la croissance des souches d'haloarchées, nous avons cultivé ces souches sur un milieu de référence, DSMZ 372, favorable aux genres *Halorubrum* et *Haloarcuula* (Atlas, 2010), contenant l'extrait de levure comme source d'azote. Les souches sont ensuite incubées à 40°C pendant 13 jours. La croissance se traduit par un trouble et l'intensité du trouble, est estimée à l'œil nu.

II.4.2. Détermination d'une base saline adéquate

Le but de cette étape est de déterminer la base saline à mettre dans le milieu à base de mélasse. Pour ce fait, on a testé la croissance de 16 souches haloarchées dans 5 différents milieux ; MA, MB, MC, MC1 et MFm, (Schneegurt, 2012). Leur composition est citée en annexe III. La croissance est estimée, à l'œil nu.

II.4.3. Culture des souches à différentes concentration de mélasse

Pour la conception du milieu à base de mélasse, nous avons tenu compte de tous les résultats des tests mentionné précédemment, à savoir les résultats de la source d'azote optimale et la base saline adéquate. Pour la marche à suivre, nous avons opté pour 3 concentrations de la mélasse (2.5%, 5%, 10%).

II.5. Optimisation de la croissance par un plan factoriel étoilé

Afin de pouvoir optimiser la croissance bactérienne en fonction des deux paramètres choisis, une modélisation par la méthode des plans d'expériences a été réalisée. A cet effet, un plan composite centré est appliqué et les résultats expérimentaux sont utilisés pour calculer les

coefficients intervenant dans l'équation de régression, ainsi que les tests statistiques servant à valider les modèles.

Rappelons que les plans composites centrés se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première étape consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complétée par des points au centre du domaine d'étude. Quand les tests de validation du modèle sont positifs, l'étude s'achève, sinon, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle de second degré.

Les variables indépendantes choisies sont :

Mélasses (%)

NaNO₃ (g/l)

L'opté pour un plan iso-variant par rotation factoriel complet à deux niveaux et à deux facteurs, soit un plan 2² (**Tableau V**).

Tableau V : Facteur et domaine expérimental.

facteur	Niveau			Risque α	
	-1	0	+1	- α	+ α
mélasses (%)	7.1967	12,5	17.8033	0.05	0.05
NaNO ₃ (g/l)	4.33	8,75	13.1694	0.05	0.05

13 expériences sont réalisées en duplicata selon la matrice donnée dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Matrice d'expériences en unités centrées réduites.

N° de l'essai	grandeurs réelles		grandeurs réduites	
	Melasse (%)	NaNO ₃ (g l ⁻¹)	X1	X2
1	7,1967	4,3306	-1	-1
2	17,8033	4,3306	1	-1
3	7,1967	13,1694	-1	1
4	17,8033	13,1694	+1	1
5	5,0000	8,7500	-1.41	0
6	20,0000	8,7500	1.41	0
7	12,5000	2,5000	0	-1.41
8	12,5000	15,0000	0	1.41
9	12,5000	8,7500	0	0
10	12,5000	8,7500	0	0
11	12,5000	8,7500	0	0
12	12,5000	8,7500	0	0
13	12,5000	8,7500	0	0

III. Présentation du complexe Cevital

III.1. Historique

Cevital SPA, 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.

Le complexe contribue largement au développement de l'industrie agroalimentaire nationale, elle vise à satisfaire le marché national et exporter le surplus, en offrant une large gamme de produits de qualité.

III.2. Situation géographique

Cevital est implanté au niveau du nouveau quai du port de Bejaia, à 3 km du sud-ouest de cette ville, à proximité de la RN 26. Cette situation géographique de l'entreprise lui a beaucoup profité étant donné qu'elle lui confère l'avantage de proximité économique. En effet elle se trouve proche du port et de l'aéroport. (Voir annexe IV)

III.3. Activités de Cevital

Lancé en Mai 1998, le complexe Cevital a débuté son activité par le conditionnement d'huile en Décembre 1998.

En Février 1999, les travaux de génie civil de la raffinerie ont débuté, elle est devenue fonctionnelle en Août 1999.

L'ensemble des activités de CEVITAL est concentré sur la production et la commercialisation des huiles végétales, de margarine et de sucre, ainsi que la production de l'énergie électrique qu'elle est en cours d'études, elles se présentent comme suit :

- Raffinage des huiles (1800 tonnes/jour) ;
- Conditionnement d'huile (1400 tonnes/heure) ;
- Production de margarine (600 tonnes/jour) ;
- Fabrication d'emballage (PET) : Poly-Ethylène-Téréphtalate (9600 unités/heure) ;
- Raffinage du sucre (1600 tonnes/jour) et (3000 tonnes /jour) ;
- Stockage des céréales (120000 tonnes) ;
- Minoterie et savonnerie en cours d'étude ;

- Cogénération (production de l'énergie électrique avec une capacité de 64MW et de la vapeur).

III.4. Missions et objectifs

L'entreprise a pour mission principale de développer la production et d'assurer la qualité et le conditionnement des huiles, des margarines et du sucre à des prix nettement plus compétitifs et cela dans le but de satisfaire le client et le fidéliser.

Les objectifs visés par Cevital peuvent se présenter comme suit :

- L'extension de ses produits sur tout le territoire national ;
- L'importation de graines oléagineuses pour l'extraction directe des huiles brutes ;
- L'optimisation de ses offres d'emploi sur le marché du travail ;
- L'encouragement des agriculteurs par des aides financières pour la production locale de graines oléagineuses ;
- La modernisation de ses installations en termes de machine et technique pour augmenter le volume de sa production ;
- Le positionnement de ses produits sur le marché étranger par leurs exportations.

L'organisation du complexe Cevital est détaillée dans la **Figure 03** citée en annexe V.

Résultats et Discussion

I. Analyse physico-chimique 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 la mélasse au cours du raffinage.

Dans cette optique les résultats obtenus sont comme suit :

I.1. Le Brix

Les résultats obtenus après mesure du brix sont exprimés dans la **Figure (04)** suivante.

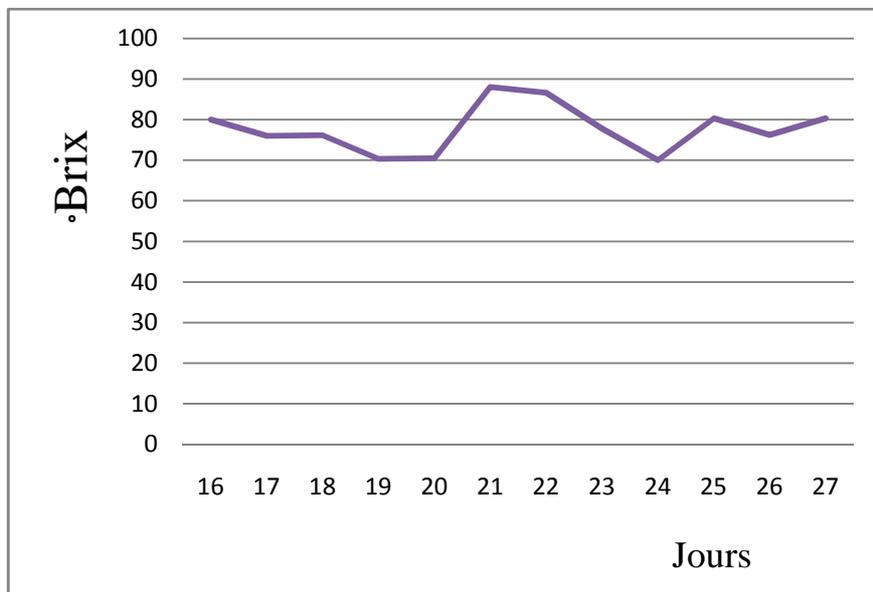


Figure (04) : Evolution du Brix en fonction des jours.

D'après la **Figure (04)**, les valeurs enregistrées varient autour de 80%, on peut constater qu'il y a quelques diminutions mais, sans que cela n'aie de grande influence sur la qualité de la mélasse. Cependant, la norme de Cevital est 73% au minimum.

I.2. La polarisation

Une fois l'analyse faite, les résultats observés sont comme suit (**Figure (05)**).

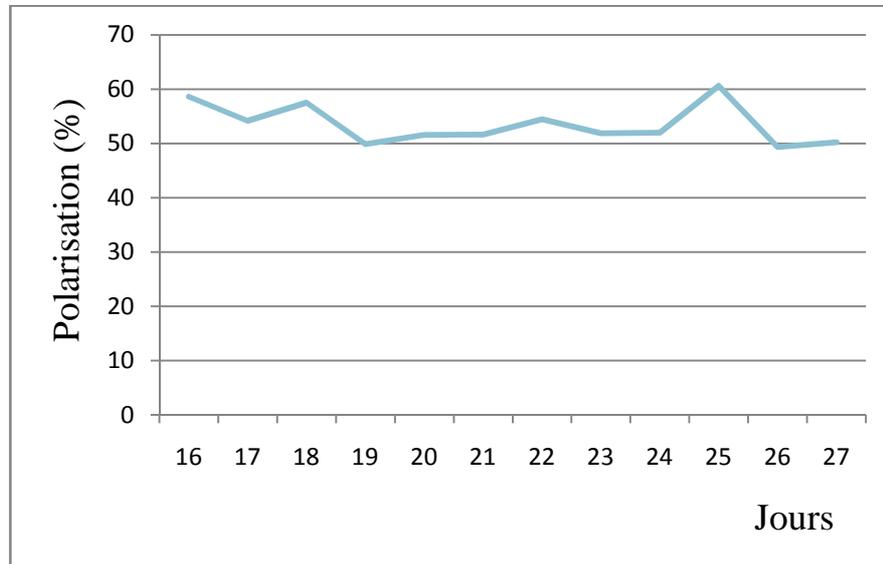


Figure (05): Evolution de la polarisation en fonction des jours.

On remarque que le taux de saccharose dans la solution, est assez régulier. Il varie entre 50% et 60% avec un léger pic à 60,64% et un léger déclin à 49,35% (**Figure 05**)

I.3. La pureté

Les valeurs enregistrées après l'analyse de la pureté de la mélasse sont groupées dans la **figure (06)** suivante :

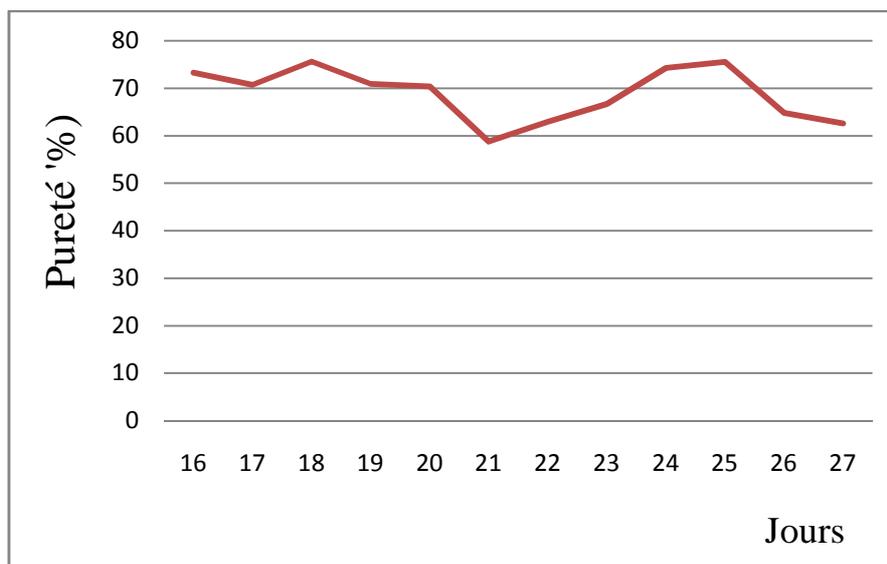


Figure (06): Evolution de la pureté en fonction des jours.

D'après (Curtin, 1983), Les normes disent que la pureté doit être inférieure à 65%, or la plupart des valeurs sont supérieures à 65% (**Figure 06**). Ce qui nous amène à dire que la mélasse, au delà des normes, contient un certain surplus d'impureté tels que les sucres invertis et les pigments.

I.4 Le pH

Les résultats de la mesure du pH sont présentés dans la **Figure (07)** :

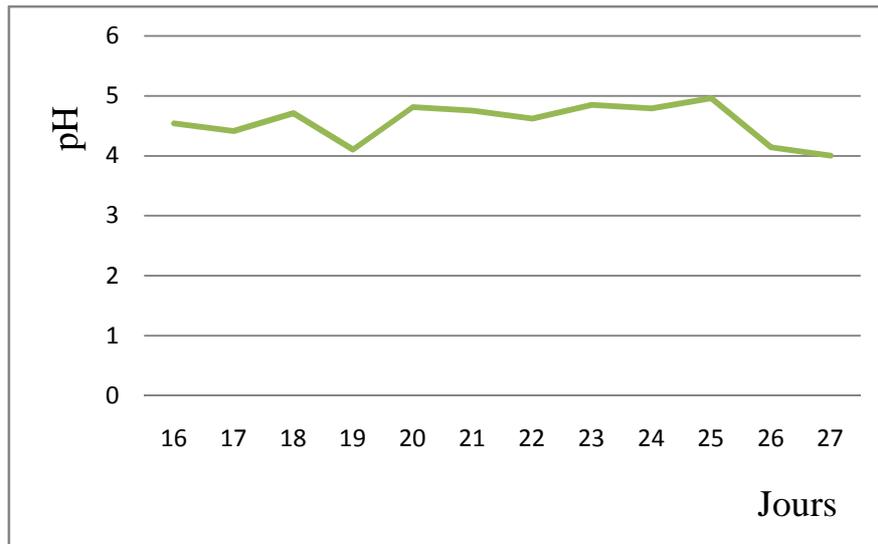


Figure (07) : Evolution du pH en fonction des jours.

Les valeurs du pH de la mélasse sont supérieures à 4 (**Figure 07**), ce qui est parfaitement en accord avec les normes exigées qui sont au minimum de 4.

I.5. Résultats d'analyse de la mélasse sur HPLC

Les résultats obtenus, sont comme suit :

Tableau VII : Résultats de l'analyse de la mélasse sur HPLC.

Sucres	Taux en sucres (%)
Saccharose	90,70
Glucose	5,10
Fructose	4,20

Les résultats montrent que la mélasse contient une quantité importante de saccharose, par contre des quantités infimes de sucres invertis (glucose et fructose). Ceci est sans doute dû à l'épuisement non poussé de la matière lors du raffinage.

II. Confection d'un milieu de culture à base de mélasse

II.1. détermination d'une source d'azote idéale pour la croissance des souches d'haloarchées

L'utilisation du milieu **DSMZ 372** pour les genres *Halorubrum* et *Haloarcula*, et de deux sources d'azote différentes nous a permis de choisir la source d'azote idéale avec laquelle la plupart des souches se développent le mieux.

D'après les résultats qui sont regroupés dans le **Tableau VIII**, la source d'azote à choisir est le NaNO_3 car, le milieu à base de cette source nous a donné une meilleure croissance avec pigmentation pour toutes les souches (**Figure (08)**).



Figure (08) : Photo de la culture en Erlen avec NaNO_3 .

Tableau VIII : Résultats des 12 souches ensemencé dans le milieu DSMZ 372 à différentes sources d'azote.

Nbre D'essais	Mt		M+E.L		M+NH ₄ Cl		M+NaNO ₃	
	1	2	1	2	1	2	1	2
S1	+++	++	+++	+	++	+	+++	+++
S3	++++	+++	+++	+++	+++	++	++++	++++
S5	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++
S6	++	+	++	+	++	++	+++	++
S7	++	+	+++	++	+++	++	++	++
S8	+++	+++	++	+	++	++	++	++
S9	+	+	+	+	+/-	+/-	++	++
S10	++	+	+	+	+	+	++	++
S11	++	+	+	+	++	+	+++	++
S12	++	+	+	+	+/-	+	++	++
S13	++	+	++	+	++	++	++	++
S14	++	+	+	+	+	+/-	++	++

Mt : milieu témoin (DSMZ 372) ; M+E.L : DSMZ 372 + extrait de levure ; M+NH₄Cl : DSMZ 372 + NH₄Cl ; M+NaNO₃ : DSMZ 372 + NaNO₃.

++++ : Excellente croissance.

+++ : Très bonne croissance.

++ : Bonne croissance.

+

+/- : Début de croissance.

➤ **Culture en tube en présence de NaNO₃ et NH₄Cl comme source d'azote**

Quatre souches ont été testées sur le milieu à différentes sources d'azote, après incubation la mesure de leur DO a été faite.

Le résultat montre, que la DO des cultures est meilleure en présence de NaNO₃ comme source d'azote, excepté dans le cas de la souche S13 qui pousse légèrement mieux avec NH₄Cl (**Figure 09**). Ce qui confirme les résultats précédents.

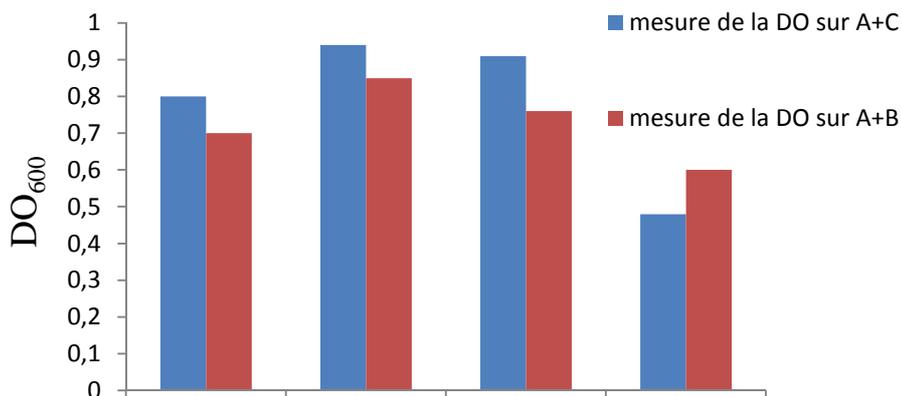


Figure (09) : Croissance de 4 souches d’haloarchées en tube sur milieux à base de NaNO_3 et de NH_4Cl .

A+B: base A + NH_4Cl ; **A+C:** base A + NaNO_3 .

➤ **Culture des souches S5 et S13 dans les Erlen-Meyer :**

Les souches S5 et S13 sontensemencées sur le milieu avec le NaNO_3 et le NH_4Cl , puis incubé à 40°C pendant 10 jours.

Les résultats montrent que la croissance dans des conditions d’agitation (optimale) est largement meilleure avec NaNO_3 (**Figure 10**).

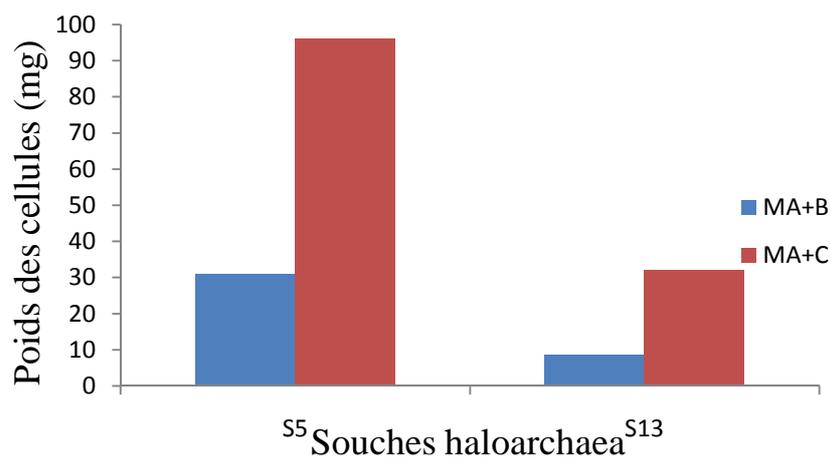


Figure (10) : Poids des cellules après croissance sur milieu à base da NaNO_3 ou NH_4CL comme source d’azote.

D'après l'analyse des résultats, le milieu à base de NaNO_3 semble répondre le mieux aux exigences des souches cultivées dans ce milieu ; c'est pour quoi nous avons choisi le NaNO_3 comme source d'azote.

II.2. Détermination d'une base saline adéquate

Cinq différents milieux ont été choisis dans le but de déterminer la base saline idéale à utiliser dans le milieu à base de mélasse. Les résultats (**Tableau IX** en annexe VI) montrent que toutes les souches se sont développées sur le milieu A (SG), qui présente une concentration en NaCl de 25% ; cette concentration est incluse dans la gamme (20-30%) optimale de la plupart des halophiles extrêmes (DasSarma et DasSarma, 2012).

La base adéquate qui sera, donc utilisée dans le milieu à base de mélasse, sera celle du milieu A. En prenant en considération la composition de la mélasse (présence de fer, calcium...) et la forte exigence des haloarchées en sels, nous avons pensé à ajouter le NaCl et le MgSO_4 , dans les mêmes proportions que dans le milieu retenu (SG).

II.3. Culture des souches à différentes concentration de mélasse

Nous avons préparé un milieu contenant la source d'azote et la base saline retenues précédemment avec la mélasse (source de carbone et quelques minéraux) à différentes concentrations (2.5%, 5% et 10%), 16 souches ont étéensemencées sur le milieu ainsi préparé.

Vu que la couleur de la mélasse ne permet pas de voir la croissance à l'œil nu, nous avons utilisé la DO pour estimer la croissance. Les résultats obtenus (**Tableau X**) montrent que pour l'ensemble des souches, la croissance est meilleure à 2,5% de mélasse. Cependant, dans les autres concentrations la croissance devait augmenter de façon linéaire en augmentant la concentration de mélasse. Ceci pourrait s'expliquer par la diminution du pH qui est plus importante dans les cultures à 5 et 10% de mélasse, comme l'indique le **Tableau XI** en annexe VII.

Tableau X : Mesure de la Do des 16 souches sur le milieu à base de mélasse à différentes concentrations.

	2,50%		moyenne 2,5%	5%		moyenne 5%	10%		moyenne 10%
S1	0,4494	0,496	0,4727	0,255	0,096	0,1755	0,36	0,296	0,328
S2	0,3724	0,51	0,4412	0,1293	0,393	0,26115	0,28	0,388	0,334
S3	0,9246	0,806	0,8653	0,4461	0,2073	0,3267	0,276	0,332	0,304
S4	0,4334	0,4846	0,459	0,459	0,294	0,3765	0,36	0,216	0,288
S5	0,4114	0,48	0,4457	0,3069	0,1761	0,2415	0,168	0,38	0,274
S6	0,3956	0,5	0,4478	0,3663	0,3495	0,3579	0,336	0,236	0,286
S7	0,424	0,3706	0,3973	0,1161	0,339	0,22755	0,248	0,316	0,282
S8	0,455	0,472	0,4635	0,3138	0,081	0,1974	0,384	0,2	0,292
S9	1,1354	0,992	1,0637	0,4155	0,2457	0,3306	0,504	0,624	0,564
S10	0,8516	1,11	0,9808	0,1878	0,39	0,2889	0,62	0,504	0,562
S11	1,346	0,8856	1,1158	0,3405	0,255	0,29775	0,484	0,656	0,57
S12	0,5586	0,487	0,5228	0,186	0,345	0,2655	0,428	0,328	0,378
S13	0,465	0,435	0,45	0,3564	0,2127	0,28455	0,372	0,396	0,384
S14	0,5194	0,5258	0,5226	0,1563	0,3921	0,2742	0,532	0,868	0,7
S15	0,6552	0,5592	0,6072	0,1647	0,2865	0,2256	0,448	0,416	0,432
S16	0,4748	0,4286	0,4517	0,4245	0,0552	0,23985	0,54	0,976	0,758

II.4. Élaboration de modèles pour la croissance et la production de métabolites par le plan factoriel

Afin d'examiner les effets combinés de la mélasse et du NaNO_3 , sur la production de biomasse et de certains métabolites, 13 expériences sont réalisées suivant un plan factoriel complet. Les résultats expérimentaux sont représentés dans le **Tableau XII**, dont les réponses sont représentées par 'Y', Y1 = la DO_{600} , Y2 = la longueur d'onde maximale et Y3 = l'absorbance à λ fixe.

Tableau XII : Matrice d'expérience et résultats expérimentaux.

OrdEssai	X1	X2	Y1 DO à 600nm	Y2 λ_{max}	Y3 Absorbance
1	-1	-1	0.333	338	1,666
2	+1	+1	0.975	357	2,914
3	-1	+1	0.496	338	2,172
4	+1	+1	0.728	357	2,984
5	-1.41	0	0.424	338	0,739
6	+1.41	0	0.894	351	2,831
7	0	-1.41	0.883	338	2,246
8	0	+1.41	0.736	344	2,687
9	0	0	0.14	351	2,965
10	0	0	0.393	358	3,053
11	0	0	0.338	352	2,847
12	0	0	0.395	348	2,86
13	0	0	0.435	339	2,748

II.4.1 Élaboration du modèle pour la croissance

- Le calcul des coefficients est effectué par le logiciel Minitab 16.0 et les résultats sont présentés dans le **Tableau XII**. Une DO optimale est observé lorsque la concentration en mélasse est maximale (+1) et la concentration en NaNO_3 est maximale.
- Le **Tableau XIII** représente la significativité des coefficients calculée avec le test de Student, dont le risque $\alpha = 0,05$. Dans le cas X2 et l'interaction X1X2, P-Val est supérieur au risque α , ce qui veut dire que ces deux coefficients ont un effet non significatif sur la croissance. Donc l'équation du modèle postulé s'écrit :

$$DO_{600} = 0,37556 + 0,22415 x_1 + 0,13959 x_1x_1 + 0,20334 x_2x_2$$

Tableau XIII : ANOVA de la DO

Terme	Coefficient	T	P
Constante	0,37556	9,048	0,000
X1	0,22415	6,894	0,000
X2	-0,06468	-1,989	0,062
X1X1	0,13959	4,064	0,001
X2X2	0,20334	5,92	0,000
X1X2	-0,09829	-2,054	0,055

II.4.2. Test d'activité du surnageant

Après avoir mesuré la DO, les cultures ont été récupérées puis centrifugées afin de tester l'activité antibiotique du surnageant. Les résultats obtenus (**Tableau XIV**) montrent les diamètres des zones d'inhibitions (mm).

Tableau XIV : Matrice d'expérience et résultats de l'activité

N° d'essais	X1	X2	mesure de l'activité (mm)
1	-1	-1	7
2	1	-1	6
3	-1	1	5
4	1	1	7
5	-1.41	0	0
6	1.41	0	0
7	0	-1.41	0
8	0	1.41	0
9	0	0	7
10	0	0	5
11	0	0	4
12	0	0	4
13	0	0	6

La mesure des diamètres des zones d'inhibition, indique la présence d'une activité dans le surnageant le la S3. D'après (Hal, 2003 ; BIRBIR et ERYILMAZ, 2005), la production d'halocines est une caractéristique universelle des haloarchaea. Confirmant ainsi la validité du résultat obtenu.

L'absence d'inhibition dans les essais 5 à 8, peut s'expliquer par la composition du milieu en lui-même, car ces 4 expériences ont été réalisées avec des valeurs extrêmes (niveau maximum+ α , ou niveau minimum- α) soit en source de carbone, ou en source d'azotes. Ce qui nous a permet de supposer que, afin d'avoir des activités intéressantes il faudrait varier ces concentrations sans l'addition du risque α .

II.4.3. Élaboration du modèle pour la longueur d'onde du pigment

- d'après le **Tableau XII**, Une longueur d'onde optimale est observé lorsque la concentration en mélasse est au centre (0) et la concentration en NaNO_3 est maximale (+1).

- Le **Tableau XV** représente la significativité des coefficients calculée avec le test de Student, dont le risque $\alpha = 0,05$. Dans le cas X2, X1X1 et l'interaction X1X2, P-Val est supérieur au risque α , ce qui veut dire que ces coefficients ont un effet non significatif sur la croissance. Donc l'équation du modèle postulé s'écrit :

$$\lambda_{max} = 348.33 + 9.533x_1 - 2.502x_2x_2.$$

Tableau XV : ANOVA de la longueur d'onde

terme	coefficient	T	p
constante	348,333	233,038	0,000
X1	9,533	9,58	0,000
X2	1,727	1,886	0,079
X1X1	1,466	1,258	0,228
X2X2	-2,502	-2,279	0,038
X1X2	0,625	0,483	0,636

II.4.4. Élaboration du modèle de l'absorbance pigment extrait

- D'après le **Tableau XII**, Une longueur d'onde optimale est observé lorsque la concentration en mélasse est au centre (0) et la concentration en NaNO₃ est maximale (+1).
- Le **Tableau XVI** représente la significativité des coefficients calculée avec le test de Student, dont le risque $\alpha = 0,05$. Dans le cas X2 et l'interaction X1X2, P-Val est supérieur au risque α , ce qui veut dire que ces coefficients ont un effet non significatif sur la croissance. Donc l'équation du modèle postulé s'écrit :

$$Abs = 2.9445 + 0.59591x_1 + 0.11081x_2 - 0.38926 x_1x_1 - 0.020526 x_2x_2.$$

Tableau XVI : ANOVA de l'absorbance

Terme	coefficient	T	P
constante	2,9445	52,762	0,000
X1	0,59591	11,634	0,000
X2	0,11081	2,163	0,045
X1X1	-0,38926	-7,351	0,000
X2X2	-0,020526	-3,876	0,001
X1X2	-0,08311	-1,216	0,241

II.5. Validation des modèles

Les **Figures (11, 12 et 13)**, en annexe VIII, représentent l'analyse de la Variance (ANOVA), on peut vérifier que les modèles ne présentent pas de biais en comparant l'erreur aléatoire estimée au centre du domaine avec l'erreur résiduelle. On vérifiera aussi l'adéquation des équations de régression en comparant la variance résiduelle avec la variance de régression. Les valeurs des coefficients de corrélations permettent aussi d'estimer 'combien' les modèles peuvent expliquer les variations de chacune des réponses mesurées.

Le manque d'ajustement de ces modèles est non significatif, c'est à dire que la part des variations non expliquées par ces modèles, est due au hasard.

On Remarque aussi que pour les trois modèles, la régression est significative, que l'effet des 2 paramètres sur les réponses suit une relation linéaire du 2^{ème} degré et que plus de 80% des variations de ces réponses sont bien expliquées par ces équations de régression.

II.6. optimisation par plan factoriel

II.6.1. Optimisation de la croissance (DO_{600})

Les résultats obtenus précédemment, montrent que le $NaNO_3$ n'a pas d'effet sur la DO (croissance) et cela peut s'expliquer par la composition de la mélasse qui contient certains minéraux qui seront utilisés comme source d'azote. (**Figure 14**).

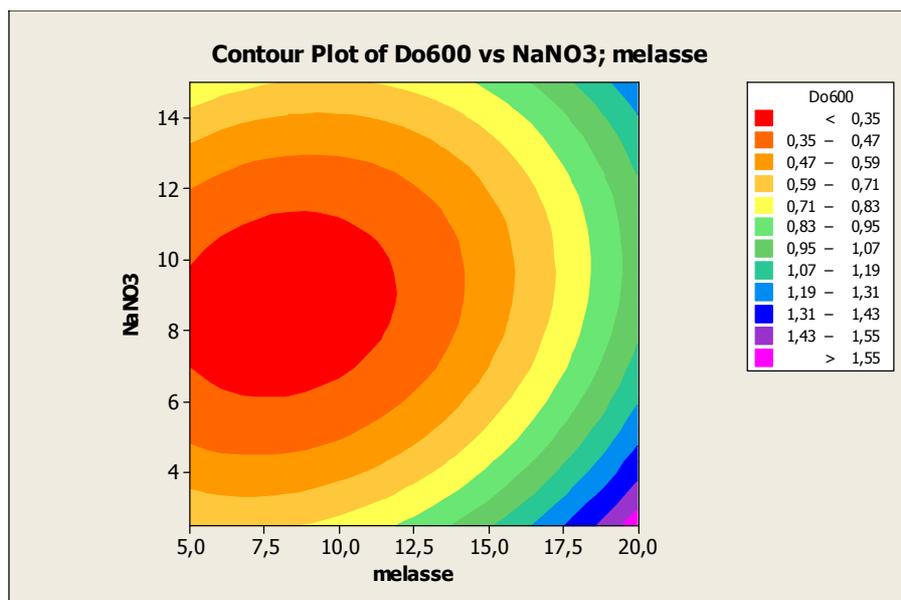


Figure (14) : Diagramme de contour dans le plan DO_{600} et concentration de mélasse et $NaNO_3$.

II.6.2. Optimisation de la production des pigments

Les résultats (**Figure 15**) montrent que les longueurs d'ondes maximales varient entre [7.5-15 g/l] de NaNO_3 , et à des valeurs supérieures à 19% de mélasse.

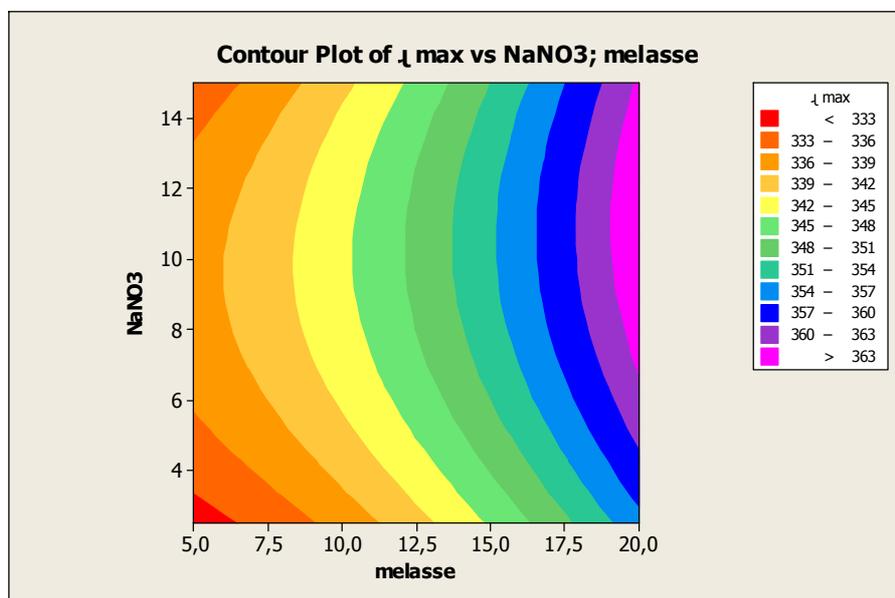


Figure (15) : Diagramme de contour dans le plan λ_{max} et concentration de mélasse et NaNO_3 .

Par ailleurs, les résultats de leurs absorbances (**Figure 16**) montrent une variation entre des concentrations de NaNO_3 allant de 6.5 à 12 g/l, et des valeurs de 13.75 à 18.75% de mélasse.

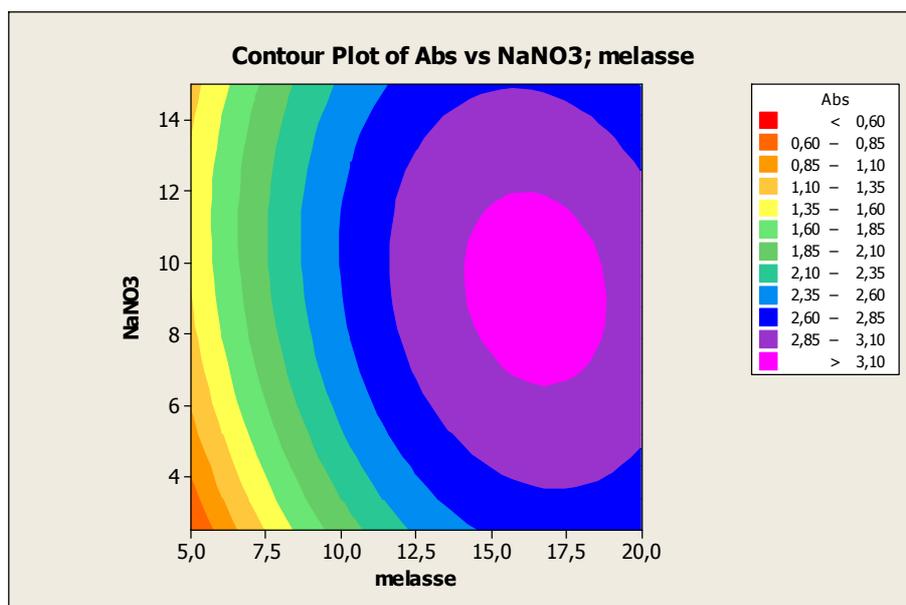


Figure (16) : diagramme de contour dans le plan absorbance et concentration de mélasse et NaNO_3 .

D'après (Yatsunami et *al.*, 2014), des longueurs d'ondes maximales ont été observé après extraction des pigments membranaires chez les haloarchées extrêmes, par exemple pour *Haloarcula japonica* comme le montre la (**figure 17**).

Pour le genre *Haloarcula*, sur un milieu à base de mélasse, les résultats obtenus montrent que les longueurs d'ondes varient de 338 à 358 nm. Et sur MC, le résultat indique que cette longueur d'onde est de 383 nm.

Cette différence est peut être dû à la mélasse qui provoque la diminution de l'absorbance de ces Bactriorhodopsines.

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, 386, 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 (17) : caractéristique des caroténoïdes chez *Haloarcula japonica* (Yatsunami, 2014).

Conclusion

Au terme de cette étude, il en ressort que la mélasse du complexe Cevital, présente des caractéristiques en adéquation avec sa valeur nutritionnelle.

En effet, l'analyse physicochimique et HPLC de la mélasse ont révélé une teneur en sucre très importante, ce qui permet de la considérer comme une source de carbone inestimable pour la croissance de divers microorganismes.

Les essais de valorisation de la mélasse comme milieu de culture pour des souches d'Haloarchées, ont montré que la source d'azote NaNO_3 a donné des résultats plus satisfaisants que le NH_4Cl . Et que toutes les souches testées se développent sur le substrat à base de mélasse.

Par ailleurs, l'optimisation par plan factoriel complet étoilé a permis d'aboutir à la modélisation de la croissance de la S3 et la production de métabolites, en fonction de la concentration de la mélasse et du NaNO_3 . Les résultats nous ont amené à déduire que, le NaNO_3 n'est pas très important pour la croissance de la souche, par contre il est essentiel dans la production de pigments membranaires. D'autre part, on a pu déduire que la souche présente une activité contre *Halobacterium salinarum* dans le milieu à base de mélasse.

D'après tous les résultats, il paraît évident que la mélasse constitue un milieu de culture favorable aux Haloarchées à condition d'ajouter les sels requis.

Et comme perspectives, on suggère :

- D'ajouter un tampon à ce milieu afin d'éviter l'acidification du milieu ;
- D'utiliser la mélasse avec d'autres microorganismes pour avoir de nouveaux produits ;
- Pour le plan factoriel, rétrécir le domaine du facteur afin d'avoir des interactions plus significatives ;
- Ouverture d'une branche visant à valoriser la mélasse au niveau industriel.

Références bibliographiques

A

- Ⓢ Allers T., et Mevarech M. (2005). Archaea genetics the third way. *Rev.* **6**: 58-60.
- Ⓢ Anonyme, (2008). MN-FAS-01, Manuel de connaissances générales.
- Ⓢ Archimède H., Xande X., Gourdine J.-L., Fanchone A., Alexandre G., Boval M., Coppry O., Arquet R., Fleury J., Regnier C., Renaudeau D. (2011). La canne à sucre et ses co-produits dans l'alimentation animale, *Innovations Agronomiques* **16** : 165-179.
- Ⓢ Atlas Ronald M. (2010). *Handbook of Microbiological Medium*. Fourth edition. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York. 783-784p.
- Ⓢ Azrate A. (2005). Extraction et raffinage du sucre de canne. *Revue de l'ACER (Centre de recherche, de développement en acériculture)*. Saint-Nobert-d'arthabaska. 22p.

B

- Ⓢ Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levure isolé d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées à base de lactosérum. Thèse de magister en Microbiologie Appliquée option Biotechnologie Microbienne. Université Mentouri Constantine. 6p.
- Ⓢ Bernard M., Chapoutol P., Chatelet M., Guerolt M., Jubert M., Morelarbreux F., Mananim M. et Tierny M. (1991). Mélasses de betterave et de canne : coproduit de betterave. *Comité National Des Coproduits* fiche **8**. P. 1-19.
- Ⓢ BIRBIR Meral and Selda ERYILMAZ. (2005). Prevention of halobacterial damage on hide caused by lipolytic halophilicarchaea with halocins. Department of biology, Science and Arts Faculty, Marmara University, 34722 Göztepe, Istanbul, Turkey.
- Ⓢ Bonete María José, Martínez-Espinosa Rosa María, Pire Carmen, Zafrilla Basilio and Richardson David J. (2008). Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline Systems*. **4**:9.
-

⊕ Bullock C. (2000). The Archaea a biochemical perspective *Biochem. Mol Biol Edu.* **28**: 186-193.

⊕ Burns David and Dyal-Smith Mike. (2006). Cultivation of Haloarchaea. Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Melbourne 3010, Australia.

C

⊕ Cabello P., Roldán MD., Moreno-Vivián. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology.* **150**, 3527-3546.

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

⊕ Commission Européenne. (2004). L'organisation commune de marche du sucre. 14p.

⊕ Costa E, Pérez J, Kreft JU. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol.* **14**: 213-219.

⊕ Courteau A. (2005). La canne à sucre et l'environnement à la réunion. 31p.

⊕ Curtin, L. V. (1983). Molasses-General considerations. In *Molasses in Animal Nutrition*. West Des Moines, IA: National Feed Ingredient Association. p 1-12.

D

⊕ DasSarma, Shiladitya; DasSarma, Priya. (March 2012) Halophiles. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. p1

⊕ De Miniac M. (1991). Contamination des fermentation alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. *Industries alimentaires et agricoles.* **8** : 559-563.

E

⊕ Ebel C., Madern D., et Zaccai G. (2004). Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles*. **2**: 1-7.

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

F

⊕ Fährasmane L., Parfait B. (2011). Trente ans de travaux en technologie rhumière à l'Inra-Antilles-Guyane : Trente ans de recherche en technologie des rhums. *Innovation Agronomique*. **16**: 153-164.

⊕ Falb Michaela, Muller Kerstin, Königsmaier 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. (2000). Modélisation par les plans d'expériences. *Techniques de l'Ingénieur*. R275, 1-23.

H

⊕ Hal V. B. (2003). Alternative sources of biologically active Substances. *Process Biochemistry*, **48**: 1252-1261.

⊕ Hoinard C, (2009). Les plans factoriels complets. Cours et énoncés d'exercices. Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours. Laboratoire de Biophysique et Mathématiques. p 10.

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

- Ⓢ Jiménez, A.M., Borja R., Martin A. (2004). A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. *Biochem. Eng. J.* **18**, 121-132.
- Ⓢ Jiranuntipon S. (2009). Décoloration d'effluents de distillerie par un consortium microbien. Thèse de Doctorat. Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. 1p.

K

- Ⓢ 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

L

- Ⓢ Larpent J.P., et Larpent M.G. (1985). *Elements de microbiologie*. Hermann. p 369.
 - Ⓢ Le blanc A. (2008). *La fermentation panaire*. 3p.
 - Ⓢ Lloyd Karen G., Edgcomb Virginia L., Molyneaux Stephen J., Böer Simone, Wirsén Carl O., Atkins Michael S., et Teske Andreas. (2005). Effect of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic archaea. *App. Anv. Microbial.* 71 (**10**): 6383-6387.
-

M

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

⊕ MARKAL Produits Alimentaires. (2014). Z.A. Les Plaines - B.P. 18 - 26 320 St Marcel-lès-Valence, Dernière Mise à Jour Le : 21-01-2014 Page 1 sur 3.

⊕ Martin Deana D., Ciulla Rose A., et Roberts Mary F.. (1999). Osmoadaptation in Archaea. *App. Anv. Microbial*. **65** (5): 1815-1825.

⊕ McGenity TJ, Grant WD. (1995). Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. **18**. p. 237–243.

N

⊕ Nicholson Carla A., Fathepure Babu Z. (2003). Biodegradation of benzene by halophilic and haloterant bacteria under aerobic condition. *App. Anv. Microbial*. **70** (2): 1222-1225.

O

⊕ O'connor E., Shand R. (2002). Halocins and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **28**: 23-39.

⊕ Ochsenreiter T., Pfeifer F. et Schleper C. (2002). Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*. **6**: 267-274.

⊕ Olbrich H. (2006). The molasses. *Biotechnologie-Kempe GmbH. Berlin*. pp. 6-14.

⊕ Lefebvre O. (2005). Application des microorganismes halophiles au traitements des effluents industriels hypersalines. These de Doctorat de sciences et procédés biologiques et industriels. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, FRA. **2**: 43-66p.

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

⊕ Oren A., et Rodriguez-Valera F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. FEMS MICROBIOLOGY Ecology. (**36**). P 125.

⊕ Oren A. (2001). Diversity of halophilic microorganisms: environements, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol. **28**(1): 56-63.

⊕ Oren A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity Saline Systems, **4**: 2.

⊕ Oren A, Arahal DR et Ventosa A. (2009). Emended description of genera of the family Halobacteriaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **59**, 637-642.

⊕ Oren A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology. **31**. (8, 9): 825–834.

⊕ Oren A. (2011). Diversity of Halophiles. Extremophiles Handbook. pp 309-325.

P

⊕ Pawel C., Woldzimierz G., Roman M., et Pawel K. (2006). Effect of marco/micro nutrient and carbon source over denetrification rate of *Haloferax denetrificans* Archaeo. Enz. Microbiol. Tech. **40**: 212-220.

⊕ Pesenti, Peter T., sikaroodi Masouh, Gilvet Patrick M., Sanchez-Porro Cristina, Ventosa Antonio and Litchfield Carol D. (2008). An extreme archaeal halophile isolated from a crystallizer ponds at a solar plant in California, USA.

Q

⊕ Querellou Joël. (2010). Biotechnologie des archées, 45_48 Querellougauche_Gab dossier. **16**: 47. p 45.

R

⊕ Raghavan T., et Furtado I. (2004). Occurrence of extremely halophilic Archaea in sediments from the continental shelf of west of India. Scientific correspondence. **86**. (8): 1065-1067.

⊕ Robinson Jessie L. , Pyzyna Brandy , Atrasz Rachelle G. , Henderson Christine A., Morrill Kira 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, Garbayo Inés , Vilchez Carlos, Bonete María José and Martínez-Espinosa Rosa María. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology. *marine drugs*. **13**. 5508-5532.

S

⊕ Sanogo O. (2005). Procédé et technologie mature pour la production d'énergie à partir de la biomasse. Atelier de formation BEPITA. Kamboise.

⊕ Sauer M., Porro D., Mattanovich D. et Branduardi P. (2007). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*. Vol. **26** N°2, pp. 100-101.

⊕ Schiraldi Chiara, Giuliano Mariateresa, et Mario De Rosa. (2002). Perspective on biotechnological application of Archaea. *Archaea*. **1** : 75-86.

⊕ Schneegurt Mark A. (2012). Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. *Advances in understanding the biology of halophilic microorganism*. Vreeland, R.H. (Ed), pp 39.

⊕ Shand RF. (2006). Detection, quantification and purification of halocins: Peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. *Methods in Microbiology*. **35**.

⊕ Shand RF et Leyva K. (2007). Peptid and protein antibiotics from the domain *Archaea*: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 93-109.

T

⊕ Thorsten A., Hien-Ping N., Moshe M., Robert G., et Lloyd G. (2004). Development of addition selectable markers for the halophilic archeon *haloferax volcanii* based on the LeuB and Trp genes. *App. Env. Microbiol.* **72** (2): 943-953.

⊕ Torreblanca M., Rodriquez-Valera F., Juez G, 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.*, vol. **8**, p. 89–99.

V

⊕ Visser P., Frederiks B. (2006). Etude de développement de la filière « Ethanol/GEL.fluel » comme énergie de cuisson dans l'espace "UEMOA". Rapport provisoire. 6 p.

W

⊕ Wiley John & Sons I.N.C., 1963. Cane sugar handbook. Ninth Eddition. p. 267-284.

Y

Φ Yatsunami Rie, Ando Ai, Yang Ying, Takaichi Shinichi, Kohno Masahiro, Matsumura Yuriko, Ikeda Hiroshi, Fukui Toshiaki, Nakasone Kaoru, Fujita Nobuyuki, Sekine Mitsuo, Takashina Tomonori and Nakamura Satoshi. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *frontiers in MICROBIOLOGY*. **5**. 100, 3

Annexes

Annexe I

Tableau II : les souches d'Archaea utilisées

souches	Source	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (Gène ARNr 16S)
S1	Sabkha de Ouargla	1999	37°C,pH7	<i>Haloarcula sp</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>Halorubrum chaoviator</i>
S5	Sabkha de Ouargla	2010	40°C,pH7	<i>Halorubrum ezzemoulens</i>
S6	Sabkha de Ouargla	1999	40°C,pH9	<i>Haloarchée</i>
S7	Saline d'Ichekaben	2003	40°C,pH9	<i>Haloarchée</i>
S8	Sel d'Ichekaben	2009	40°C,pH7	<i>Natrinema</i>
S9	Saline de Batna	2010	40°C,pH7	-
S10	Saline de Batna	2010	40°C,pH7	-
S11	Saline d'oran		40°C,pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S12	Saline d'oran		40°C,pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S13	Saline d'oran		40°C,pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S14	Saline d'oran		40°C,pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S15	Saline de Batna		40°C,pH7	-
S16	Saline de Batna		40°C,pH7	-

Annexe II

Appareillages et réactifs

Autoclave ALFA-10-PLUS (**PBI**International)
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
Tubes à essai (20ml)
Boîtes Petri
Erlenmeyer
Becher
Éprouvettes graduées
Flacons
Pipettes Pasteur
Micropipettes (ACCUMAX)
Embouts jaunes
Embouts bleus
Embouts 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)

Réactifs utilisés

Acétone/méthanol (V/V)
Chlorure d'hydrogène (HCl) (1N)
Hydroxyde de sodium (NaOH)

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 7.1 ± 0.2 à 25°C

Base A:

Composition par litre:

NaCl	200.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	36.0g
Tris[hydroxymethyl]aminomethane.....	6.0g
KCl.....	4.0g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	1.0g

Solution saline

Composition par litre

NaCl.....	250.0g
-----------	--------

Annexe III

Tableau III : compositions des milieux de culture pour des souches halophiles extrêmes

Ingrédients (g/l)	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu F
NaCl	250	125	234	200
KCl	2	-	6	4
MgSO ₄ x7H ₂ O	20	-	29	20
FeCl ₂	0,023	-	-	-
Na-Citrate	3	-	-	-
Extrait de viande caséique	7,5	-	-	-
Extrait de levure	10	5	5	-
MgCl ₂ x6H ₂ O	-	50	19,5	-
CaCl ₂ x6H ₂ O	-	0,12	1,1	-
Peptone	-	5	-	-
K ₂ SO ₄	-	5	-	-
NaBr	-	-	0,8	-
NaHCO ₃	-	-	0,2	-
Glycérol	-	-	-	2,5
Pyruvate	-	-	-	2,5

Tableau IV : composition du milieu C1

Composants g/l	MC1
NaCl	180
KCl	4
MgSO ₄	20
Extrait de levure	2
Peptone	10

Annexe IV



Plan de masse du complexe CEVITAL.

Annexe V

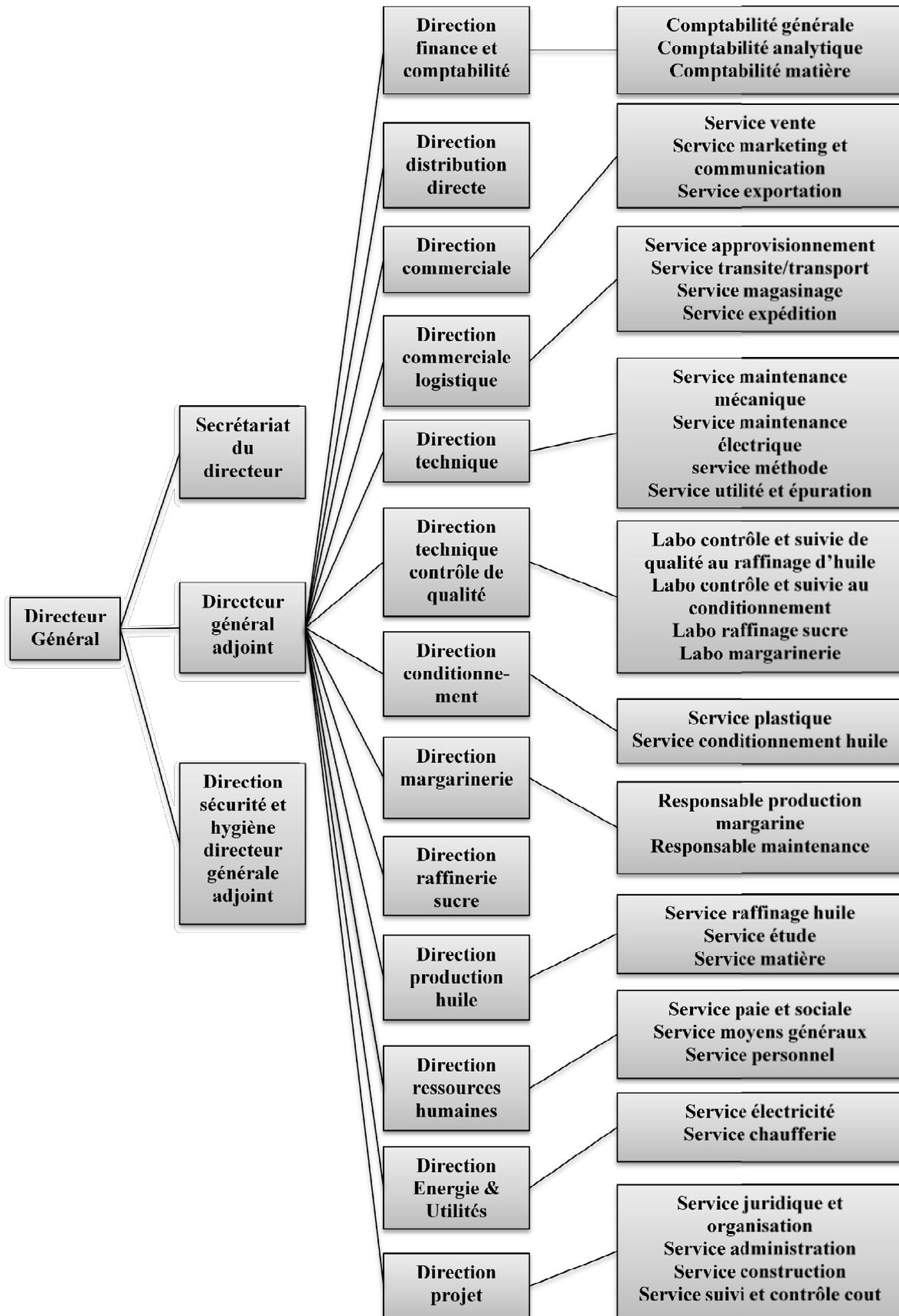
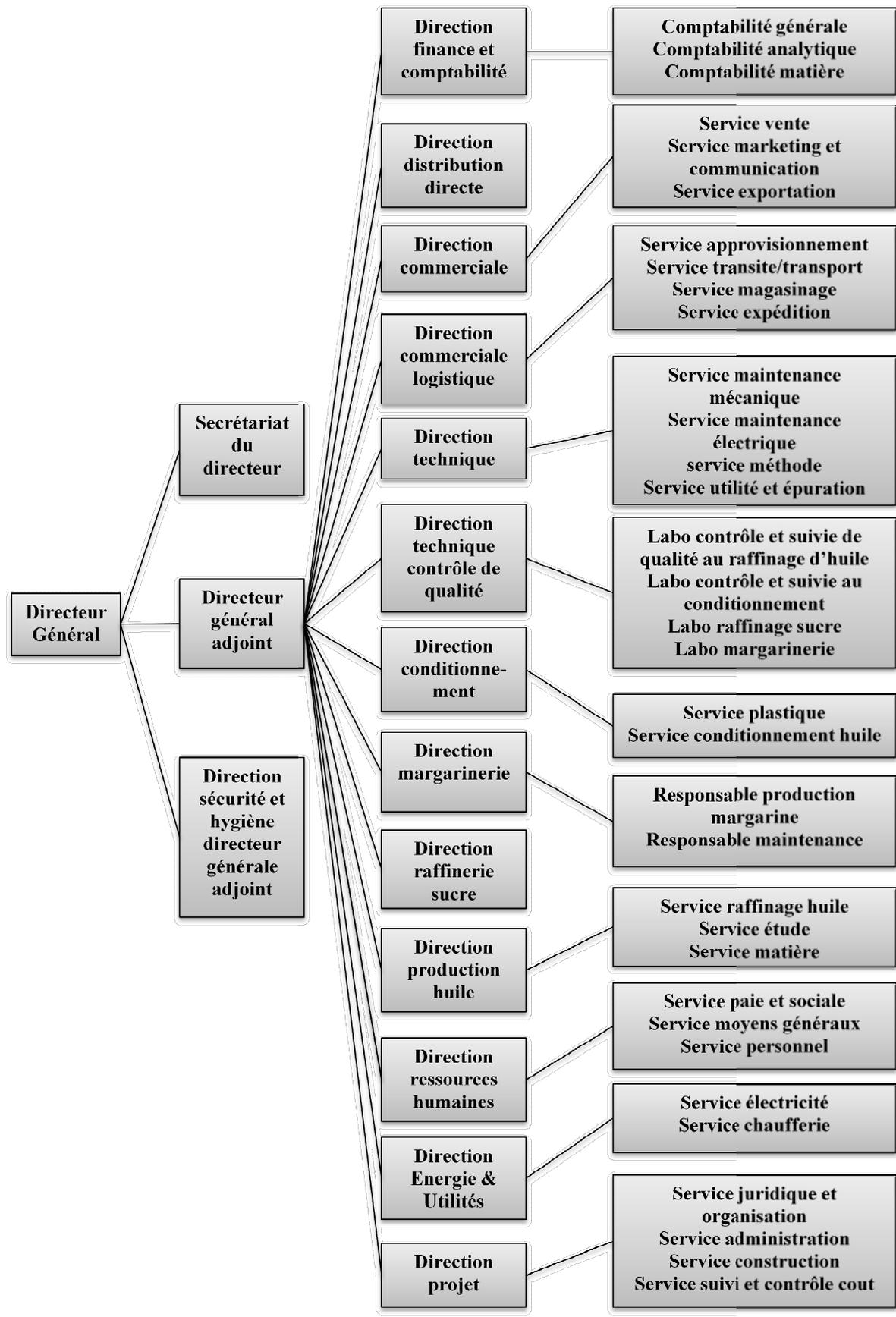


Figure 03 : Organigramme du complexe CEVITAL



Directeur Général

Secrétariat du directeur

Directeur général adjoint

Direction sécurité et hygiène directeur général adjoint

Direction finance et comptabilité

**Comptabilité générale
Comptabilité analytique
Comptabilité matière**

Direction distribution directe

**Service vente
Service marketing et communication
Service exportation**

Direction commerciale

**Service approvisionnement
Service transit/transport
Service magasinage
Service expédition**

Direction commerciale logistique

**Service maintenance mécanique
Service maintenance électrique
service méthode
Service utilité et épuration**

Direction technique

**Labo contrôle et suivie de qualité au raffinage d'huile
Labo contrôle et suivie au conditionnement
Labo raffinage sucre
Labo margarinerie**

Direction technique contrôle de qualité

Direction conditionnement

**Service plastique
Service conditionnement huile**

Direction margarinerie

**Responsable production margarine
Responsable maintenance**

Direction raffinerie sucre

**Service raffinage huile
Service étude
Service matière**

Direction production huile

**Service paie et sociale
Service moyens généraux
Service personnel**

Direction ressources humaines

**Service électricité
Service chaufferie**

Direction Energie & Utilités

**Service juridique et organisation
Service administration
Service construction
Service suivi et contrôle cout**

Direction projet

Annexe VI

Tableau IX : Croissance de 16 souches d'haloarchées sur différents milieux liquides

		MA	MB	MC	MFm	MC1
S1	croissance	+++	++	++	-	++
	Pigmentation	+/-	+/-	+	-	+
S2	Croissance	-	++	+++	+/-	+++
	Pigmentation	-	-	+++	-	+
S3	Croissance	+++	++	++	-	++
	Pigmentation	++	+	+/-	-	+
S5	Croissance	++	+	++	-	+++
	Pigmentation	+	-	+	-	+/-
S6	Croissance	++	+	+++	+/-	++
	Pigmentation	+	-	+	+/-	+/-
S7	Croissance	++	++	++	+/-	+++
	Pigmentation	++	+	+	-	+
S8	Croissance	++	++	+++	-	+
	Pigmentation	+	-	++	-	+/-
S9	Croissance	+++	+	++	+/-	++
	Pigmentation	+	+/-	+	+/-	+
S10	Croissance	+++	+	++	-	+
	Pigmentation	++	+/-	+	-	-
S11	Croissance	+++	++	+++	+	+
	Pigmentation	+	-	++	+/-	+/-
S12	Croissance	++	+	++	+/-	++
	Pigmentation	++	-	-	-	-
S13	Croissance	++	++	++	+/-	+
	Pigmentation	+	-	+	-	+/-
S14	Croissance	++	+	++	+/-	++
	Pigmentation	+	-	+	-	+/-
S15	Croissance	++	+	+	-	+
	Pigmentation	+	+/-	-	-	+/-
S16	Croissance	++	+	++	-	+/-
	Pigmentation	+	-	+	-	-

Annexe VII

Tableau XI : mesure du pH dans le milieu à différentes concentrations de mélasse.

souche	pH de 2,5%		pH de 5%		pH de 10%	
	essais 1	essais 2	essais 1	essais 2	essais 1	essais 2
1	6,7	6	5	5,4	4,6	4,6
2	6	5,8	4,8	5,2	4,8	4,8
3	5,2	5,4	5	4,8	4,5	4,5
4	6,3	5,9	4,6	4,6	4,5	4,6
5	5,8	5,6	4,9	4,8	4,7	4,8
6	5,6	5,4	4,8	4,7	4,7	4,6
7	5,7	5,4	4,8	5,7	4,5	4,6
8	5,3	5,4	5,5	4,8	4,5	4,4
9	5	5,9	4,7	4,9	4,5	4,4
10	5,9	5,7	5,1	4,8	4,6	4,5
11	5,3	5,3	4,8	4,7	4,5	4,5
12	5,2	5,1	4,8	5,3	4,6	4,6
13	5,5	5,3	4,9	4,7	4,7	4,6
14	5,8	5,6	4,6	4,6	4,4	4,3
15	5,4	5,6	4,6	4,6	4,5	4,5
16	5,7	5,5	6	5,8	4,5	4,3

Annexe VIII

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	1,62248	0,324496	20,93	0,000
Linear	2	0,83953	0,419766	27,07	0,000
melasse	1	0,73692	0,736916	47,53	0,000
NaNO ₃	1	0,06135	0,061349	3,96	0,062
Square	2	0,68840	0,344201	22,20	0,000
melasse*melasse	1	0,25613	0,256128	16,52	0,001
NaNO ₃ *NaNO ₃	1	0,54350	0,543500	35,05	0,000
Interaction	1	0,06540	0,065400	4,22	0,055
melasse*NaNO ₃	1	0,06540	0,065400	4,22	0,055
Residual Error	18	0,27910	0,015506		
Lack-of-Fit	3	0,02029	0,006765	0,39	0,760
Pure Error	15	0,25881	0,017254		

R² = 85,32% R²pred) = 76,76% R²adj) = 81,25%

Figure (11) : ANOVA de la DO

Source	DF	SC	SCM	F	P
Regression	5	1326,72	265,34	19,79	0,000
Linear	2	1277,98	638,99	47,67	0,000
melasse	1	1230,27	1230,27	91,77	0,000
NaNO ₃	1	47,70	47,70	3,56	0,079
Square	2	114,29	57,15	4,26	0,034
melasse*melasse	1	21,20	21,20	1,58	0,228
NaNO ₃ *NaNO ₃	1	69,61	69,61	5,19	0,038
Interaction	1	3,13	3,13	0,23	0,636
melasse*NaNO ₃	1	3,13	3,13	0,23	0,636
Residual Error	15	201,09	13,41		
Lack-of-Fit	3	83,25	27,75	2,83	0,084
Pure Error			12	117,83	9,82

R²= 86,84% R² pred) = 72,30% R²adj = 82,45%

Figure (12) : ANOVA de la longueur d'ondes

Annexe VIII

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	5,45909	1,09182	35,06	0,000
Linear	2	4,24016	2,12008	68,07	0,000
melasse	1	4,21535	4,21535	135,35	0,000
NaNO3	1	0,14576	0,14576	4,68	0,045
Square	2	2,10226	1,05113	33,75	0,000
melasse*melasse	1	1,68281	1,68281	54,03	0,000
NaNO3*NaNO3	1	0,46789	0,46789	15,02	0,001
Interaction	1	0,04607	0,04607	1,48	0,241
melasse*NaNO3	1	0,04607	0,04607	1,48	0,241
Residual Error	17	0,52945	0,03114		
Lack-of-Fit	3	0,06320	0,02107	0,63	0,606
Pure Error	14	0,46625	0,03330		
R² = 91,16% R²(pred) = 84,29% R²(adj) = 88,56%					

Figure (13) : ANOVA de l'absorbance

Résumé

L'industrie sucrière de Cevital génère de plus en plus de mélasse, un sous produit aux propriétés nutritionnelle, fonctionnelle et sensorielle incroyables. Cette mélasse devrait être valorisée et exploitée au mieux. Dans ce travail, nous avons choisi de lui donner une seconde vie, en l'utilisant comme milieu de culture pour des souches d'haloarchées.

La démarche suivie était de faire des analyses physicochimiques de la mélasse à savoir, le Brix, la polarisation, la pureté et le pH, et une analyse HPLC. Après caractérisation de la mélasse, nous avons d'abord déterminé les exigences nutritionnelles de quelques souches d'haloarchées, particulièrement une source d'azote et une base saline à ajouter à la mélasse afin de confectionner un milieu de culture. Dans le but d'optimiser la croissance de la souche S3 et de produire certains métabolites, nous avons opté pour un plan factoriel complet étoilé à deux facteurs.

Les résultats obtenus montrent que la source d'azote choisie (NaNO_3) n'influe pas sur la croissance de la souche S3, la mélasse en elle-même suffit. Cependant, le NaNO_3 présente une influence sur la production des pigments membranaires.

Considérant les résultats obtenus, la mélasse semble être un milieu de culture favorable pour la croissance et la production de métabolites d'haloarchées.

Mots-clés : Mélasse, haloarchées, *haloarcuala*, optimisation, plan factoriel, croissance, métabolites, NaNO_3 , milieu de culture.

Abstract

The Cevital's sugar industry generates increasingly molasses, a by-product with incredible nutritional, functional and sensory properties. This molasses should be valorized and exploited at best. In this work, we chose to give it a second life, using it as a culture medium for *haloarchaea*.

The approach was to make physicochemical analyzes of molasses ie, Brix, polarization, purity and pH. In addition to an HPLC analysis. After characterization of molasses, we determined the source of nitrogen and saline base; to add to molasses for making a culture medium for Haloarchées (*Haloarcuala*). In order to optimize the growth of the S3 strain and produce some metabolites, we opted for a starry full factorial design with two factors.

The results show that the chosen source of nitrogen (NaNO_3) does not influence the growth of the S3 as molasses in itself enough. However, NaNO_3 has an influence on the membrane pigments production.

Considering the results, molasses seems to be a favorable culture medium for growth and metabolites production of haloarchaea.

Key words: Molasse, haloarchaea, *haloarcuala*, optimization, factoriel design, growth, metabolites, NaNO_3 , culture medium.