

OPTIMISATION DES PARAMETRES DE PRODUCTION DE L'ACIDE CITRIQUE A PARTIR DE MELASSE DE CANNE DE SUCRE AVEC *ASPERGILLUS NIGER*

Rachid KESSAS^{*}, Linda BENABDI et Hadja BOUARFA

*Département de Chimie industrielle – Faculté des Sciences –
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran – M.Boudiaf
BP 1505 Oran El M'Naouer*

(Reçu le 21 Avril 2009, accepté le 16 Mars 2012)

RESUME : Le présent travail a porté sur l'optimisation de quelques facteurs déterminants affectant la fermentation de la mélasse de canne à sucre, le but visé étant la valorisation de ce "déchet" par bioconversion de ses sucres en acide citrique. Cette recherche des conditions optimales s'est appuyée sur plusieurs séries d'expériences où nous avons étudié, pour chacune d'entre elles, l'influence d'un paramètre donné (teneur initiale en sucre saccharose, pH, température et durée de la fermentation, volume de l'inoculum) sur la production d'acide citrique.

Mots clés : acide citrique, fermentation, *aspergillus niger*, mélasse, optimisation.

ABSTRACT : The present work consists in the optimization of some key factors affecting the fermentation of the molasse of sugar cane, the aim of the work is the valorization of this "waste" by bioconversion of its sugars into citric acid. This research of the optimal conditions was supported by several series of experiments where we have studied, for each of them, the influence of one given factor (initial composition of saccharose, pH, temperature and delay of the fermentation, inoculum volume, etc.) on the production of citric acid.

Key words: citric acid, fermentation, *aspergillus niger*, molasse, optimization.

INTRODUCTION

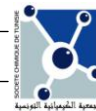
L'acide citrique n'a pas cessé de jouer un rôle primordial dans la vie quotidienne des gens depuis son isolement, à partir du citron, par Scheele en 1784. En effet, il est présent dans une multitude de produits aussi utiles et variés les uns que les autres. Nous devons cet intérêt à ses propriétés qui font de lui un acide unique en son genre. Il occupe actuellement la première place dans le marché mondial des acides organiques.

La découverte de la sécrétion de ce produit par certains micro-organismes a été le point de départ de recherches accrues visant une meilleure exploitation de cette nouvelle source en vue de satisfaire une demande de plus en plus grandissante.

La principale source industrielle de cet acide est la fermentation. En fait, 99% de la production mondiale se fait par voie microbiologique, le reste est extrait des agrumes.

Depuis la découverte de la production de l'acide citrique par voie microbiologique, un grand nombre de micro-organismes ont été utilisés aussi bien à l'échelle laboratoire qu'industrielle. Les plus importants sont les bactéries et les champignons filamenteux ; Le plus étudié des champignons est sans aucun doute *Aspergillus niger*, cultivé sur un milieu à base de glucose, saccharose ou mélasse. En fait, il s'agit principalement de mutants d'*Aspergillus niger* améliorées génétiquement qui sont employées dans l'industrie pour leur facilité de culture, leur constance génétique, leurs rendements élevés et leur absence de métabolites indésirables. Cette amélioration se fait par mutation ou par hybridation.

^{*} Correspondant, e-mail : kessas@univ-usto.dz ou rkessas@gmail.com



Les premiers essais de production de l'acide citrique furent peu encourageants, les rendements obtenus étant bien moins élevés. L'importance de ce problème entraîna de nombreuses recherches qui permirent de préciser le rôle des nombreuses variables affectant la production. Parmi celles-ci, on peut citer le choix des souches, la composition des milieux et le choix du substrat : le taux en sucre (voisin de 15 %) et celui des matières azotées (suffisamment faible pour éviter la formation d'oxalates), le pH (doit être bas et être contrôlé par addition de carbonate de calcium), la teneur en phosphate (< 0,01%), l'obligation du traitement préalable des constituants sucrés (en vue de limiter le taux de certains éléments métalliques, comme Fe, Mn, Zn et Cu), le contrôle de la température (qui peut varier, selon les souches, entre 25 et 31°C), l'importance de l'inoculum (en qualité et en quantité), l'aération (doit être très énergique et l'utilisation d'oxygène s'est révélée nécessaire pour certaines souches). A cela, il faudra ajouter l'influence de la morphologie et celui de la concentration du mycélium dans le milieu.

Le présent travail a porté sur l'optimisation de quelques facteurs déterminants affectant la fermentation du substrat utilisé, en l'occurrence la mélasse de canne à sucre, utilisée ici comme matière première ; le but visé étant la valorisation de la mélasse par bioconversion de ses sucres en acide citrique. Cette recherche des conditions optimales s'est appuyée sur plusieurs séries d'expériences où nous avons examiné, pour chacune d'entre elles, l'influence d'un paramètre donné sur la production d'acide citrique.

MATERIELS ET METHODE

La mélasse utilisée provient de l'usine Enasucre de Mostaganem (Algérie) et contient, entre autres, 62,4% de sucres totaux dont 38% de saccharose, 2% d'azote, 0,08% de phosphore et 70% environ de matières sèches ; elle a affiché une densité de 1,355. La teneur globale en métaux est de l'ordre de 180 ppm (Ca, Mg, Fe, Cu et Zn).

Champignon utilisé : La souche d'*Aspergillus niger* que nous avons utilisée dans cette étude a été conservée sur milieu gélosé incliné. Le pH est ajusté à 5,5 et le milieu est stérilisé dans un autoclave à 110°C pendant 20 minutes.

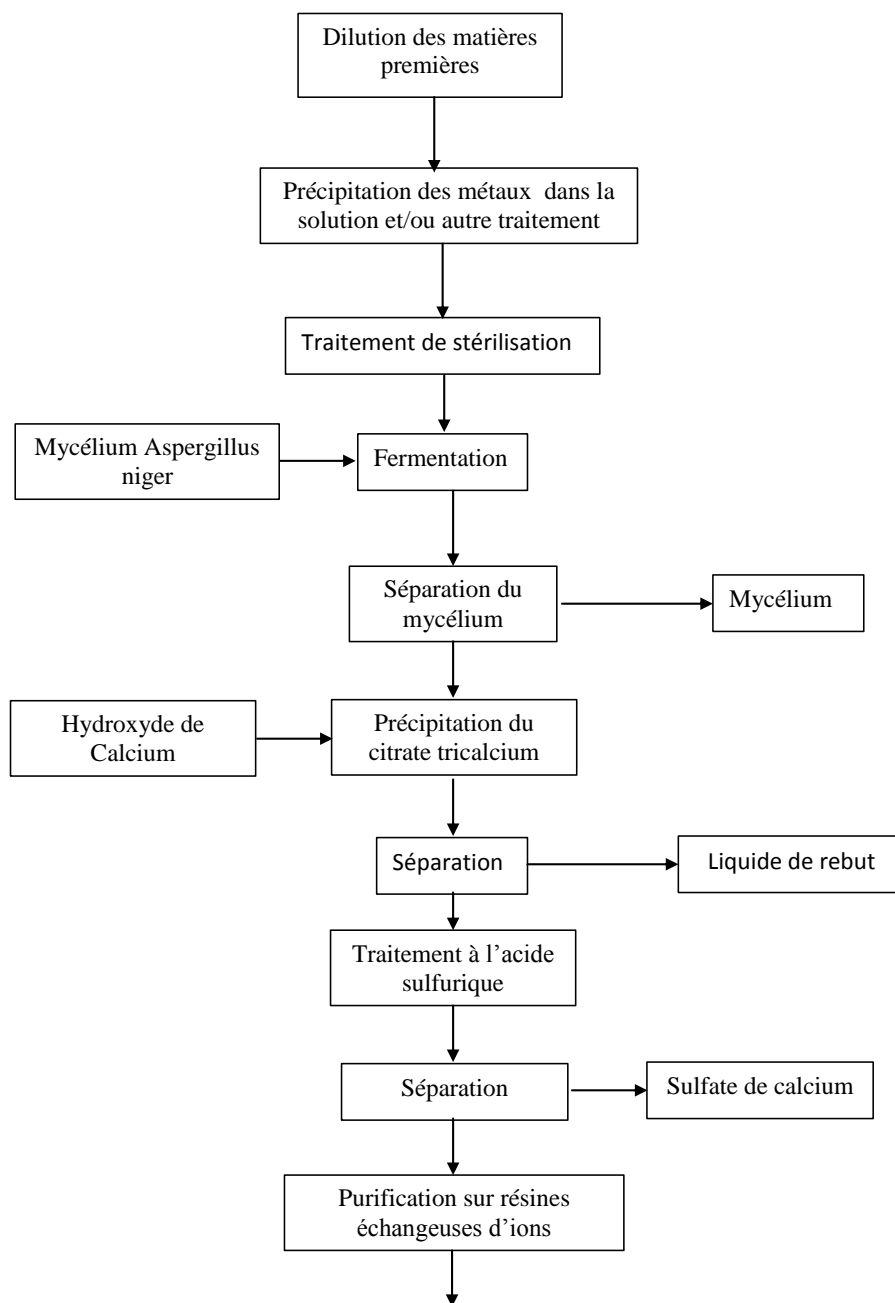
Préparation de l'inoculum : la première étape, de préparation du milieu P.D.A (Potato-Dextrose-Agar) pour la culture d'*Aspergillus niger*, a consisté à nettoyer puis à couper en petits cubes 200 g de pomme de terre. Ceux-ci sont mis dans un litre d'eau distillée et portés à l'ébullition pendant une heure. Après cuisson, on filtre puis on récupère le jus. On ajuste le volume à 1 litre avec l'eau distillée. On dissout l'agar à chaud dans le jus de pomme de terre puis on ajoute le dextrose. On ajuste le pH du milieu à 5,5. On stérilise le milieu dans l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. La souche d'*Aspergillus niger* est ensemencée stérilement sur plusieurs boîtes de Pétri coulées de milieu gélosé P.D.A. Au bout de trois jours d'incubation à 30°C, les spores apparaissent à la surface du tapis mycélien. Celles-ci sont récupérées, à l'aide d'une raclette, dans de l'eau distillée stérile puis sont dénombrées grâce à la cellule de Malassez. La suspension fongique de conodies est ensuite diluée de façon à obtenir une concentration de l'ordre de 10^7 spores/ml.

Préparation du milieu de fermentation : nous avons préparé un mélange homogène de mélasse brute et d'eau distillée selon des proportions bien déterminées dans le but d'obtenir une concentration en sucre désirée.

Traitement de la mélasse : La mélasse est traitée avec l'hexacyanoferrate de potassium pour complexer et précipiter la quantité en excès d'ions de fer et d'autres métaux lourds qui ont une influence négative sur la production d'acide citrique. Après dilution à la concentration en sucre désirée, on ajoute à la mélasse 2 g de ferrocyanure de potassium. On chauffe le mélange au moyen d'un bain marie fixé à une température de 80°C. Au bout d'une heure, on arrête le chauffage ; on observe la présence d'un précipité de couleur verte. Après décantation, une opération de filtration est nécessaire pour séparer le précipité du milieu de fermentation.

Addition des agents nutritifs : après filtration, 3,5 g de nitrate d'ammonium, 1 g de phosphate potassique et 0,25 g de sulfate de magnésium sont ajoutés à 1 litre de substrat. Ces substances sont nécessaires à la croissance du micro-organisme et au bon déroulement de la fermentation. Après addition des agents nutritifs,

le pH du milieu est ajusté à la valeur désirée avec une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le brassage du milieu est assurée à l'aide d'un agitateur mécanique assurant ainsi une répartition rapide des additifs (acide, agents nutritif).



Solution d'acide citrique vers la séparation par évaporation, cristallisation, etc...

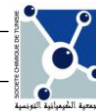
Figure 1 – Schéma simplifié du protocole suivi pour la production d'acide citrique.

Stérilisation du milieu :

Pour réaliser la stérilisation, nous avons utilisé un bain marie fixé à une température de 80°C. La stérilisation est habituellement pratiquée à 120°C mais notre milieu de culture est instable à cette température : les sucres caramélisent et donnent des substances toxiques en présence de phosphates. Les spores ayant échappé aux effets du premier chauffage germent et donnent des formes végétatives lors du séjour du produit à la température ambiante. Elles seront alors détruites lors du second chauffage. Des traitements thermiques répétés avec pause intercalaire devraient finalement entraîner une destruction totale des micro-organismes. Cette opération est appelée tyndallisation. L'opération est répétée 3 jours consécutifs à 24 heures d'intervalle.

La fermentation : elle a été réalisée selon un procédé discontinu (batch) par la technique submergée. Ce procédé est pratiquement le seul utilisé actuellement pour les champignons. Dans ce mode de fermentation, un même volume de milieu

sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation de l'acide citrique. La fermentation est réalisée dans les conditions suivantes : maintien de la vie du milieu en aérobiose, brassage continu du milieu (pour que la culture soit homogène et que l'oxygène se dissolve bien) et maintien de la température constante grâce à un système efficace et bien contrôlé.



Après avoir fixé la température du milieu à la valeur désirée, on ajoute l'inoculum préparé avec la quantité nécessaire de spores d'*Aspergillus niger* à partir de souches pures de laboratoire. L'air est injecté dans le milieu de fermentation grâce à un tuyau relié à un insufflateur d'air. L'homogénéisation du milieu est assurée par agitation au moyen d'un agitateur mécanique placé juste au-dessus du récipient. Cette agitation permet une meilleure dissolution de l'air et le maintien d'une culture homogène. La fermentation est ainsi initiée et elle se poursuit à température constante. Une fois la fermentation est terminée, une opération de filtration, réalisée à l'aide d'une pompe à vide, est nécessaire afin de séparer le mycélium du milieu de fermentation.

Récupération de l'acide citrique : L'extraction de l'acide citrique à partir des jus fermentés s'effectue selon le protocole suivant : séparation du mycélium par filtration, précipitation de l'acide citrique par la chaux à l'état de citrate de calcium puis séparation du précipité, traitement H_2SO_4 et séparation du précipité de sulfate de calcium, décoloration au charbon actif et, enfin, cristallisation (Fig. 1).

RESULTATS

Notre recherche des conditions opératoires optimales, favorisant la production d'acide citrique, a consisté à faire varier les paramètres déterminants suivants: la teneur initiale en sucre saccharose, le pH de fermentation, la température de fermentation, le volume de l'inoculum et la durée de la fermentation citrique. Notons, par ailleurs, que l'optimum mis en évidence au terme d'une série donnée est systématiquement retenu pour la série suivante, et ainsi de suite jusqu'à être en mesure de dégager le jeu de conditions opératoires idéales pour la production d'acide citrique par fermentation. Pour chacune des séries étudiées, nous avons veillé à ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois, tous les autres étant maintenus constants et ceci afin d'examiner l'influence intrinsèque au paramètre balayé.

Afin de caractériser notre produit, nous avons dû recourir à l'emploi de certaines méthodes d'analyses physico-chimiques (infrarouge et UV-visible) et chimique telles que le dosage des sucres.

1. Concentration initiale en sucre saccharose

Dans la littérature, il apparaît une assez grande dispersion des valeurs de la concentration initiale de la source de carbone (substrat) avec des valeurs préconisées allant de 12 à 26%. Néanmoins, d'autres essais réalisés que nous avons effectués en dehors de cet intervalle ont montré que les rendements en acide citrique restent très faibles.

Nos essais ont été réalisés en opérant à un pH égal à 3 et à une température de 29°C. Le volume de l'inoculum utilisé était de 1% vol. ; la durée de fermentation a été fixée à 8 jours.

Les résultats obtenus par UV-visible ont montré que la concentration de l'acide citrique augmente avec la concentration en sucre jusqu'à atteindre une valeur maximale de 67,2 g/l pour une teneur en sucre saccharose de 20%. Au delà de cette valeur, la concentration en acide citrique commence à diminuer. On remarque, par ailleurs, que la baisse de l'activité de fermentation citrique est peu accentuée dans l'intervalle de concentration en sucre compris entre 22 et 26%.

L'analyse élémentaire a révélé la même tendance, à savoir que la fermentation citrique est favorisée par l'élévation du taux de sucre, du moins jusqu'à 20%. Au delà de cette valeur, la conversion du sucre se met à diminuer. Pour les faibles teneurs en sucre, l'augmentation de cette teneur a un effet bénéfique sur la production d'acide. Ainsi, il semblerait qu'au-delà d'une concentration initiale de 20%, il y ait une perturbation métabolique se traduisant probablement par une inhibition des enzymes.

2. pH du milieu de fermentation

Cette série d'expériences a été réalisée en utilisant une mélasse dont le taux initial en sucre saccharose a été fixée à 20%, les autres paramètres étant toujours maintenus constants.

L'intervalle de pH étudié se situe entre les valeurs 2 et 6. Nous avons constaté que la concentration de l'acide citrique la plus élevée correspond à un pH de 4,5 et que la fermentation citrique reste importante dans l'intervalle 2-4,5. Une fois cet intervalle cerné, on constate que plus le pH augmente, plus la concentration en acide citrique formé augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale de 98,56 g/l. La concentration de l'acide citrique diminue ensuite brusquement pour un pH égal à 6. Il nous est apparu clairement qu'un pH égal à 4,5 constitue la valeur optimale qui se rapproche à celle que L. Majumder *et al.* [10] avaient choisie et qui est égale à 5. T. Roukas [11] avait travaillé dans un intervalle de pH compris entre 4 et 8 pour la production des acides citrique et gluconique à partir de figue fermentée par *Aspergillus niger*, avec un optimum de production observé pour un pH initial égal à 7.

3. Température de fermentation

Dans cette troisième série d'expériences, nous avons travaillé avec une mélasse dont la concentration initiale en saccharose et le pH du milieu correspondent aux optima dégagés lors des séries précédentes. L'intervalle de température étudié, relativement étroit, se situe entre 25 et 32°C.

Nous avons constaté que la concentration en acide citrique augmente avec la température jusqu'à atteindre une valeur maximale obtenue pour une température de 29°C. Au-delà de cette valeur, la concentration de l'acide citrique diminue. Cette température est pratiquement la même que celle dégagée par plusieurs auteurs [11-13, 16].

4. Volume de l'inoculum utilisé

Par la suite de notre recherche, nous avons examiné l'impact du volume de l'inoculum sur le rendement en acide citrique produit. Les valeurs étudiées sont successivement : 0,25 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8%, en fixant pour les autres paramètres clés les optima précédemment mis en évidence. De la même manière, nous avons mesuré la concentration de l'acide citrique dans le milieu, et ceci pour chaque volume d'inoculum étudié. Les valeurs trouvées sont indiquées dans le tableau I. La concentration en acide citrique la plus élevée correspond à un volume en inoculum de 1%.

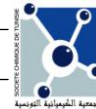
Tableau I : Concentration de l'acide citrique en fonction du volume d'inoculum.

Volume d'inoculum (%)	Concentration d'acide citrique (g/l)
0,25	63,21
0,4	80,95
0,6	84,72
0,8	90,00
1,0	98,56

5. Durée de la fermentation

La dernière série d'expériences que nous avons réalisée a consisté à examiner l'influence de la durée de la fermentation. Pour cela, nous avons fait varier cette durée en opérant à des périodes de temps égales successivement à 2 ; 4 ; 6 ; 10 ; 13 et 14 jours.

Les résultats obtenus indiquent que la production de l'acide citrique augmente au cours des six premiers jours passant de 76,8 g/l à 96 g/l. Le maximum n'est atteint qu'au bout du 10^{ème} jour avec une valeur de 100 g/l. Au-delà de cette période, la production d'acide citrique connaît une phase de stabilité qui dure jusqu'à la fin de l'incubation. Ceci est due à une diminution considérable, dans le milieu, de la quantité de sucre ainsi que d'autres nutriments essentiels pour la croissance du micro-organisme et pour la production d'acide citrique. Cette durée de 10 jours de fermentation a été déjà mise en évidence par d'autres auteurs [14, 15]. T. Roukas, qui a travaillé avec des figures comme matière première, a montré que la production d'acide citrique atteignait un maximum au bout de 9 jours se stabilisait jusqu'à 15 jours avant de décliner [11].



CONCLUSION

Le but assigné à notre travail était la production d'acide citrique à partir de mélasse de canne à sucre en utilisant le champignon *Aspergillus niger* comme agent principal de la fermentation. Le choix de la mélasse, produit agroalimentaire facilement assimilable par ce champignon se justifie par sa disponibilité relativement grande. Le choix de l'*Aspergillus niger* a été dicté par le haut degré d'adaptation de son équipement enzymatique à la bioconversion du sucre en acide citrique.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus ont montré que, pour qu'une fermentation citrique ait lieu avec le meilleur rendement possible, il est nécessaire de réunir les conditions opératoires optimales suivantes : une concentration initiale en sucre saccharose de 20%, un pH du milieu de fermentation de 4,5, une température de 29°C, un volume d'inoculum de 1% vol. et, enfin, une durée de fermentation de 10 jours. Ces conditions seront associées, néanmoins, à l'utilisation de mélasse de canne comme substrat et au champignon *Aspergillus niger* comme ferment.

REFERENCES

- [1] P. Simon and R. Meunier, "Microbiologie industrielle et génie biochimique", Ed. Masson, Paris (1970), pp. 424-427.
- [2] Ulmann, "Encyclopedia of industrial chemistry", vol. A7, pp. 103-108.
- [3] B. Botton and al., "Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle", Ed. Masson, Paris (1990).
- [4] E. Moretti and F. Felippone, "Acide citrique par fermentation", Techniques de l'Ingénieur, vol. J 6062.
- [5] F. Hamissa and al., "Citric acid production from beet molasses", Bioresource Technology (1992), pp.39 and 209.
- [6] K. Kirimura and al., "Production of cellulase and citric acid by intergeneric fusants obtained via protoplast fusion", Agri. Bio. Chem. (1990).
- [7] L. Hepner and C. Male, "Production de l'acide citrique par *Aspergillus* sur milieu à base de mélasse de canne à sucre", Ed. Gana et Hami (1992).
- [8] D.R. Berry and al., "Citric acid fermentation in genetics and physiology of *Aspergillus*", Ed. J.A. Pateman, Academic Press, London (1977) pp. 405-426.
- [9] R. Arnaud and J.-P. Guiraud, "Biochimie microbienne", Ed. Masson, Paris (1988).
- [10] L. Majumder, I. Khalil, K. Munshi, K. Alam, H. Rashid, R. Begum and N. Alam, "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrates", European Journal of Biological Sciences, 2 (1): 01-08, (2010).
- [11] T. Roukas, "Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation", Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, (2000) 25, 298-304.
- [12] Asad-ur-Rehman, A. Sikander and Ikram-ul-Haq, "Temperature optima for Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*" Biotechnology, volume 1 Number 2-4 : 108-110, (2002).
- [13] X. Gang and T.P. West, "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* on the Ethanol Dry Milling Coproduct Thin Stillage", Research Journal of Microbiology, Volume 2, Issue: 9 (2007).
- [14] O. Siboukeur, M.D. Ould El Hadj and F. Zargat "Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes de la Variété Ghars », Production et Valorisation – Biomasse, 93-96 (2001).
- [15] X. Gang and T.P. West "Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grains", Letters in Applied Microbiology, Volume 43, Issue 3 , (2006).
- [16] Y.D. Hang and E.E. Wooddams, "Utilization of grape pomace for citric acid production by solid-state fermentation", Am. J. Enol Vitic, 37:141-142 (1986).