

Chapitre I : Généralités et domaines d'activité

La microbiologie industrielle est née de méthodes ancestrales qui visaient à utiliser des ferments -en fait, les microbes inconnus alors- à des fins de transformation de matières premières agricoles. Les travaux de Pasteur qui ont mis en évidence la nature et le rôle des microorganismes dans ces transformations spontanées ont posé les bases de cette discipline. La microbiologie industrielle couvre l'ensemble des procédés de bioconversion ou biosynthèse réalisés par un microorganisme à des fins agricoles, médicales, alimentaires.... Elle concerne l'utilisation des microorganismes dans la production de substances organiques (éthanol, glycérol, acétate, propionate...), d'antibiotiques, de composés pharmaceutiques et additifs alimentaires....

Les principaux objectifs de cette discipline sont :

- l'obtention de microorganismes en quantités importantes ;
- l'obtention de produits d'intérêt sécrétés par des microorganismes ;
- l'obtention de produits métabolisés par des microorganismes.

Un procédé de fermentation industrielle consiste à assurer la mise en œuvre de tout un système de réaction biochimiques entre un substrat parfaitement adapté à ce but et des microorganismes en culture pure spécialement choisis pour leurs propriétés de décomposer ce substrat, d'une manière reproductible et ceci dans des conditions de culture bien contrôlées.

I-1. Domaines d'activité de la microbiologie industrielle

Les principaux domaines d'application de la microbiologie industrielle sont :

- Agroalimentaire (additifs alimentaires, fermentations alcoolique, lactique, ...)
- Production de substances organiques et production d'énergie (éthanol, méthane, bioéthanol, biogaz...)
- Production des solvants (butanol, acétone...)
- Agriculture (phytosanitaires, hormones végétales, insecticides, herbicides.....)
- Biologie moléculaire (production d'enzymes de restriction, *Taq* polymérase (PCR)...))
- Industries pharmaceutiques (antibiotiques, vitamines, acides aminés, hormones de croissances, insuline, antitumoraux, anti-inflammatoires ...)
- Environnement (traitements des eaux usées, bioremédiation des sols pollués, biolixiviation, forage pétroliers ...).

I-2. Intérêts de l'utilisation des microorganismes en microbiologie industrielle

La microbiologie industrielle utilise des microorganismes, cultivés à grande échelle soit pour élaborer des produits à valeur ajoutée, soit pour effectuer des étapes chimiques difficiles par des procédés qui sont en fait des améliorations de réactions métaboliques déjà accomplies par des microorganismes.

On peut citer quelques avantages qui rendent l'utilisation des microorganismes intéressante :

- Cout plus faible que les procédés chimiques (catalyse enzymatique).
- Synthèse et biotransformation de certaines molécules que par les microorganismes (ex : prostaglandines, stéroïdes ...).
- Production en grandes quantités.
- Sécurité sanitaire par production de certaines molécules (ex : absence de transmission de maladie à l'exemple de la maladie de Creutzfeldt Jacob par hormones de croissance extraite de l'hypophyse de cadavres contaminés) ...

Il est évident que le potentiel est immense et très vaste, il suffit simplement de connaître le microorganisme adapté, de contrôler son métabolisme et sa croissance et d'être en mesure de l'utiliser à grande échelle.

I-3. Produits microbiens d'intérêt industriel

Les produits microbiens d'intérêt industriel comprennent les cellules microbiennes elles-mêmes, par exemple les levures alimentaires destinées à la boulangerie, à la brasserie ou à la nourriture et les substances produites par ces cellules. Parmi ces dernières, on trouve des enzymes comme la glucose isomérase, enzyme importante dans la production de sirops à haute teneur en fructose, des agents pharmaceutiques actifs comme les antibiotiques, les stéroïdes et les alcaloïdes, des produits chimiques particuliers, des additifs alimentaires comme l'aspartame (un édulcorant pour les boissons et la nourriture) et des produits chimiques bon marché produits en grandes quantités comme l'éthanol, l'acide citrique et de nombreux autres.

Chapitre II : Les microorganismes d'intérêt industriel

Les agents utilisés en microbiologie industrielle étant toujours des microorganismes, il convient alors d'envisager les moyens de les isoler, de les conserver et éventuellement d'améliorer leurs propriétés biochimiques afin d'en augmenter le potentiel sécrétoire.

Les microorganismes les plus utilisés en microbiologie industrielle sont les champignons (levures et moisissures) et certains procaryotes tel le genre *Bacillus* et le groupe des actinobactéries en particulier le genre *Streptomyces*, ainsi que les archaebactéries.

Il est largement admis que les actinobactéries isolés à partir de milieux extrêmes seront une ressource précieuse pour de nouveaux produits d'intérêt industriel, notamment des enzymes et des agents antimicrobiens.

II-1. Propriétés des microorganismes d'intérêt industriel

Un microorganisme approprié à un procédé industriel doit posséder, outre la caractéristique de produire la substance d'intérêt, celle de croître et de sécréter cette substance dans des cultures à grande échelle. De plus, il est préférable qu'ils produisent des spores ou des cellules végétatives facilitant l'inoculation de grands fermenteurs.

Le microorganisme doit croître rapidement et produire le métabolite désiré sur une échelle de temps courte.

Une souche industrielle doit également pouvoir croître dans un milieu de culture relativement bon marché et disponible en grande quantités (microorganismes non exigeants).

Un microorganisme industriel ne doit pas être pathogène, en particulier à l'encontre des humains ou d'animaux et de plantes de grande importance économique (microorganismes également non toxiques ne produisant pas de toxines).

Enfin, un microorganisme doit pouvoir être manipulé génétiquement. L'augmentation des rendements a souvent été obtenue en jouant sur la génétique par mutation et sélection. Un microorganisme génétiquement stable est facilement manipulable possède donc un avantage indéniable.

II-2. Moyens d'obtention des microorganismes

Il y a essentiellement deux moyens d'obtention de microorganismes d'intérêt industriel ;

- Les obtenir déjà isolés en s'adressant aux grandes collections nationales de microorganismes, tel que l'*American Type Culture Collection* (ATCC) aux Etats unis, ou le centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur en France, ou encore le *Centraalbureau voor Schimmelcultures*

(CBS) aux Pays-Bas. Ces collections fournissent des souches pour l'enseignement, la recherche et l'industrie.

- Les isolés à partir de milieux naturels (eaux, sols, matières organiques...) : développement de techniques d'isolement en plus des techniques de la bactériologie classique. Les techniques modernes reposent sur la combinaison, en une seule étape, rapide et efficace, l'isolement et la sélection des microorganismes doués de propriétés recherchées, dites « screening technique », le criblage.

II-3. Isolement et sélection de souches à intérêt industriel

Plusieurs techniques et méthodes peuvent être mises en œuvre pour l'isolement et la sélection de souches d'intérêt. En effet, on adapte la technique selon l'activité biologique recherchée.

On va voir dans ce qui suit quelques exemples de techniques d'isolement et de sélection de souches productrices de produits (substances) d'intérêt industriel :

II-3-1. Isolement et sélection de souches productrices de facteurs de croissance

Un facteur de croissance est un composé nécessaire à la croissance d'une souche mais qui n'est pas synthétisé par cette dernière (microorganismes auxotrophes) :

Technique :

Réaliser des essais préalables de plusieurs dilutions de sorte à avoir des colonies bien isolées ;
Déposer au fond de la boîte de pétri un ruban de papier filtre de telle sorte que ses deux extrémités dépassent du bord de la boîte ;

Couler la gélose (milieu de culture), prise en masse ;

Étaler un volume donné d'une dilution de la terre qu'on désire étudier ;

Incuber à température et temps idéaux au germe recherché.

Dans une autre boîte pétri, on verse de la gélose nutritive (ne contenant pas le facteur de croissance en question, exemple lysine) ;

Ensemencer avec une souche indicatrice auxotrophe au facteur de croissance recherché (lysine dans ce cas) ;

A l'aide d'une spatule, on enlève la première couche de gélose (étape 1) et on la dépose sur la surface de la seconde.

Les substances que l'on cherche diffusent à travers la gélose et les souches intéressantes se manifestent par une zone de croissance de la souche auxotrophe.

Test de confirmation :

Inoculer une boîte de pétri avec la souche indicatrice et les souches sélectionnées en spots.

II-3-2. Isolement et sélection de souches productrices d'enzymes

Le choix du microorganisme producteur d'enzymes est primordial. Les enzymes sont produites essentiellement par des champignons et des bactéries. On peut citer :

Les enzymes bactériennes :

Bacillus : amylases, glucanase, protéases...

Actinobactéries : glucose invertase, cellulases, xylanases...

Archea : les enzymes thermostables, résistantes aux pH extrêmes (extrémozymes) ...

Les enzymes fongiques :

Moisissures :

Aspergillus oryzae : amylases, protéases acides...

Aspergillus niger : cellulases, glucanases...

Rhizopus : lipases...

Mucor : Protéases acides...

Levures :

Saccharomyces cerevisiae : invertase...

Kluyveromyces lactis, *Kuyveromyces fragilis* : lactases...

Le plus souvent les enzymes sont induites par la présence du substrat, de ce fait, les microorganismes producteurs d'enzymes sont recherchés là où les substances à hydrolyser sont abondantes (microorganismes producteurs de cellulases sont recherchés dans des sols forestiers riches en cellulose ; les producteurs de lactases dans les produits laitiers...).

Si l'on cherche également certaines propriétés chez l'enzyme (comme par exemple la thermostabilité) on cible des milieux appropriés (sources thermales...).

Le principe de la sélection repose sur l'utilisation de milieux de culture sélectifs (selon le microorganisme producteur ciblé : champignons, actinobactéries...). Le milieu de sélection doit contenir le substrat de l'enzyme comme seule source de carbone.

Recherche et confirmation de l'activité enzymatique des souches :

Il s'agit de chercher la synthèse de l'enzyme et sa quantification.

Principe :

Mettre en évidence l'activité enzymatique des souches isolées sur des milieux gélosés contenant des substrats spécifiques de l'enzyme.

Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, on peut utiliser directement la souche isolée ou bien extrait enzymatique obtenu après réalisation d'une culture sur milieu liquide. Le surnageant ou bien le filtrat de culture récupérés après centrifugation ou filtration, dans le cas où l'enzyme est exo-cellulaire c'est à dire sécrétée dans le milieu extérieur, ou bien on récupérant les cellules après leur destruction par des moyen physiques (broyage mécanique, sonication...) ou chimiques (détergents...) ou enzymatique (digestion enzymatique) dans le cas d'enzymes endo-cellulaires.

La mise en évidence de l'activité sur milieu gélosé, après incubation on peut visualiser l'activité enzymatique qui diffuse à travers la gélose sous forme d'un Halo qui est proportionnel généralement à l'activité enzymatique (mesure du diamètre de l'Halo peut être une indication préliminaire de mesure de l'activité enzymatique).

Exemple de mise en évidence de l'activité cellulasique :

Sur un milieu gélosé (15 g d'agar pour 1000ml d'eau distillée) contenant du CMC (Carboxyméthyl cellulose (5g/L), on ensemence la souche d'intérêt isolée à la surface. Après incubation à température et temps idéaux, on fait la révélation (pour visualiser l'activité enzymatique) en recouvrant toute la surface de la boîte avec une solution de rouge congo (1%) (accentueur de contraste) (figure 1).

L'apparition d'un Halo orange sur fond rouge indique la présence de cellulase (production de cellulase par la souche).

Dans le cas de l'utilisation de l'extrait enzymatique, on réalise la technique des puits (sur le milieu gélosé on creuse des puits de 4-6mm de diamètre et on dépose à l'intérieur une quantité (environ 50-100 μ L) de l'extrait enzymatique.

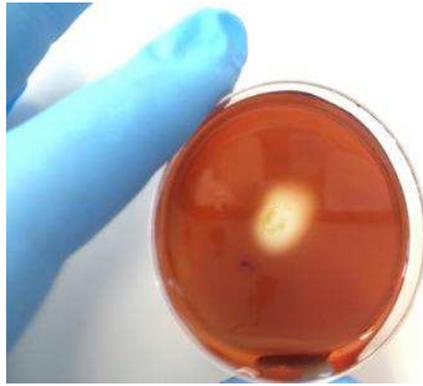


Figure 1 : Mise en évidence de l'activité cellulastique après révélation avec le rouge Congo (1%).

II-3-3. Isolement et sélection de souches productrices d'antibiotiques

Antibiotique : substance naturelle ou synthétique, chimiquement définie ayant la propriété d'inhiber la croissance ou même détruire des microorganismes et organismes vivants (cellules animales, végétales, microbiennes...).

Elle manifeste à des concentrations données des activités biologiques de nature : antibactérienne, antifongiques, antiparasitaires, anticancéreuses, antivirales...

Les antibiotiques d'origine naturelle sont produits en majorité par les microorganismes.

Parmi les micro-organismes, les actinobactéries continuent d'être l'un des groupes les plus étudiés pour le criblage de nouvelles molécules bioactives (environ 70% du totale des antibiotiques décrits), en particulier par les *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement ; les champignons (environ 20%), les bactéries (environ 10%), les algues (environ 0.8%).

II-3-3-1. Les Actinobactéries

Selon le **Bergey's Manual (2012)**, les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage de Guanine et Cytosine (G+C) supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique classés dans l'ordre des *Actinomycetales*. Ces microorganismes procaryotes sont classés actuellement dans le Phylum et la classe des *Actinobacteria*. Les *Actinobacteria* sont classées, depuis 2012, en 15 ordres, 43 familles et 203 genres.

Ce sont des bactéries aérobies mais certaines sont facultatives ou anaérobies strictes, d'autres sont micro-aérophiles, telles que les *Rhodococcus*, *Actinomyces* et *Agromyces*. Ils sont généralement hétérotrophes (certains sont chimiotrophes).

Ils sont saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes ou encore pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) et pour les animaux (*Actinomyces bovis*).

Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries.

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires, avec toutefois une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche où leur densité est de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFC par gramme de sol sec, soit 10 à 20% de la microflore tellurique totale. Parmi les actinobactéries telluriques, le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine le plus avec un pourcentage compris entre 80 et 95 %.

Taxonomie des actinobactéries :

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces.

a) Critères morphologiques :

Caractéristiques macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois à différencier les genres d'actinobactéries entre eux. Les caractères importants ont trait à la présence et la couleur du mycélium aérien (MA) et/ou du substrat (MS) (figure 2).

Parmi les formes mycéliennes, on distingue celles qui ne forment qu'un mycélium de base (mycélium de substrat ou végétatif) poussant à la surface et dans le milieu de culture et celles qui élaborent en plus un mycélium aérien issu du mycélium de substrat.



Figure 2 : Aspect macromorphologique d'une souche d'actinobactéries (genre *Streptomyces*).
Mycélium aérien (à gauche). Mycélium de substrat (à droite)

Caractéristiques micro morphologiques

Les caractéristiques micro-morphologiques englobent la production de spores, leurs formes, leurs mobilités, aspect de leurs surfaces, leur disposition sur les hyphes et leurs nombres etc. ; fragmentation ou non du MS ; la présence de sporanges sur le MA (*Streptosporangium*, *Spirillospora*, etc.) ou sur le MS (*Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, etc.), la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores (figure 3).

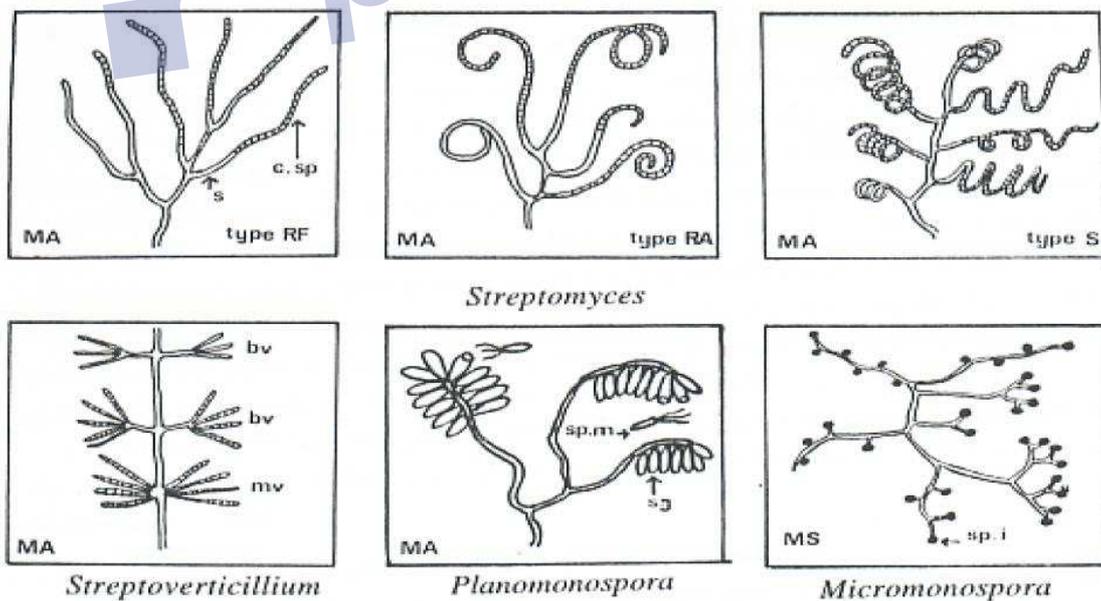


Figure 3 : Aspect micro-morphologique de quelques espèces d'actinobactéries (Sabaou, 1988).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, *Spira* (chaînes spiralées)

b) Critères chimiotaxonomiques

Les méthodes chimiotaxonomiques ont un grand impact sur la classification des actinobactéries et furent d'un apport essentiel pour distinguer de nombreux genres entre eux.

La Composition de la paroi en acides aminés, en sucres cellulaires et pariétaux, en lipides membranaires et pariétaux (acides gras à longue chaîne, les ménaquinones (composés lipidiques membranaires), les phospholipides et les acides mycoliques).

c) Critères moléculaires

Les études moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces.

Hybridation ADN-ADN

La réassociation ADN-ADN est utilisée pour l'identification des espèces en comparaison avec celles déjà décrites. Deux espèces ne sont différentes entre elles que si elles ont un taux de ressemblance inférieur à 70%.

Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Actuellement, le séquençage de l'ARNr 16S est la méthode la plus utilisée pour le groupement phylogénétique chez les actinobactéries.

Détermination du coefficient de Chargaff (G+C %)

Ce coefficient est considéré comme important dans l'identification des genres et des familles d'actinobactéries et doit être obligatoirement déterminé lors de la création d'un nouveau genre.

II-3-3-2. Tests d'activité (mise en évidence de l'activité antimicrobienne)

Les antibiotiques ont été découverts traditionnellement par criblage ou *screening*. Dans cette approche, un grand nombre de souches produisant potentiellement des antibiotiques de façon naturelle sont isolées en culture pure. Elles sont ensuite testées pour leur production de composés inhibiteurs de microorganismes témoins (germes cibles) choisis pour être représentatifs ou très proches de germes pathogènes (tests d'antagonisme), par plusieurs méthodes :

Nous tenons à rappeler que dans ce cas également, la technique adaptée dépend du fait d'utiliser directement la souche ou bien l'extrait après production sur milieu liquide. Dans le cas où on utilise directement la souche (l'isolat), il existe deux techniques très réalisées à savoir la technique des cylindres d'agar et la technique des stries croisées. Tandis que lors ce qu'on

utilise l'extrait (surnageant ou filtrat de culture), il existe également deux techniques bien adaptées, la technique des puits et celle des disques imprégnés.

Test des stries croisées

Ce test consiste à ensemencer le germe test (l'isolat) en un seul trait sur un milieu gélosé adéquat. Après incubation à température et temps idéaux au germe test, les germes sont ensemencés en stries perpendiculaires à celle du germe test (figure 4).

Les boîtes sont incubées (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition entre le bord de strie du germe test et celle des germes cibles sont mesurées avec « un pied à coulisse ».

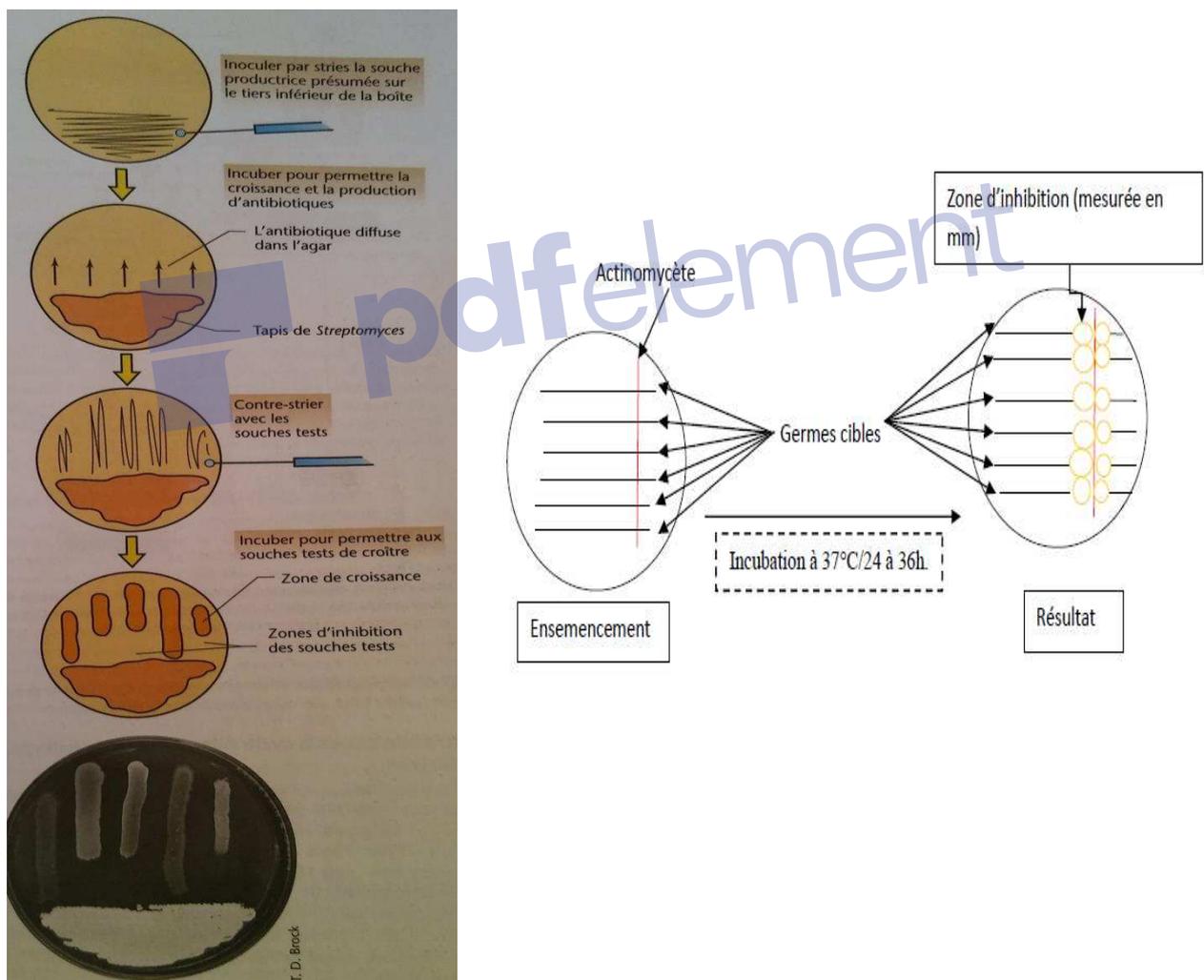


Figure 4 : Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des stries croisées

Technique des cylindres d'Agar

La souche test et ensemencée en stries serrées sur le milieu gélosé et incubée à température et temps idéaux à la souche.

Des cylindres d'agar de 6mm de diamètre environ, sont ensuite prélevés avec un emporte-pièce et déposés à la surface d'un milieu (Muller Hinton) préalablement ensemencé par les germes cibles. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles (figure 5).

Les zones d'inhibition sont mesurées avec « un pied à coulisse » après un temps d'incubation adéquat au germe cible (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons).

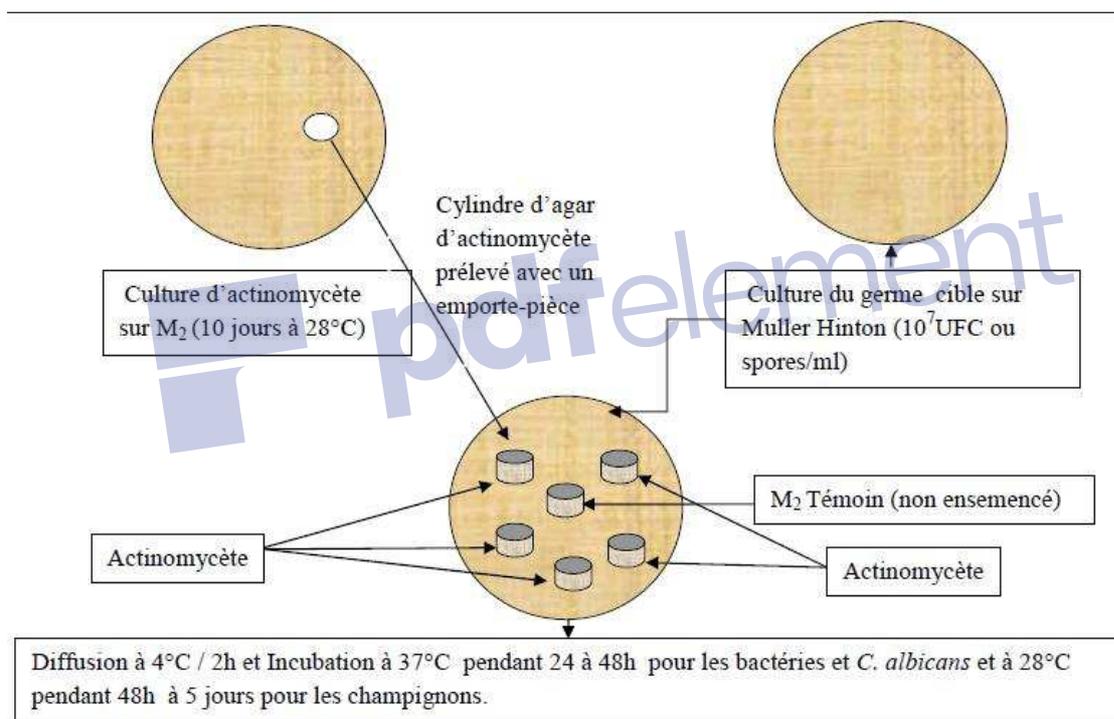


Figure 5 : Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar

➤ Les méthodes qui permettent de rechercher des activités dans des extraits

Méthode des puits :

C'est une méthode de diffusion sur boîte pétri (milieu gélosé) probablement ensemencée avec le germe cible et à la surface de laquelle on creuse (à l'aide d'un emporte-pièce) des puits de

6mm de diamètre environ. Les puis sont ensuite remplis avec (50-100 μ L) du surnageant ou filtrat de culture. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition sont mesurées par la suite avec « un pied à coulisse ».

Méthode des disques :

Des disques de papier Watman (N°1) (préalablement stérilisés) sont imbibés avec l'extrait à l'aide d'une micropipette, puis séchés avec un séchoir (éliminer le solvant dans lequel est dilué l'extrait). Déposer ensuite les disques chargés, aseptiquement, à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec le germe cible.

Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition sont mesurées par la suite avec « un pied à coulisse ».

II. 3-3-3. Recherche de nouveaux antibiotiques

Bien que les sociétés pharmaceutiques découvrent aujourd'hui leurs nouveaux produits par modélisation informatique, les antibiotiques ont été découverts traditionnellement par criblage ou *screening*. L'une des stratégies pour améliorer la probabilité d'obtenir des isolats particuliers (rares) adaptés à des niches écologiques extrêmes et des métabolites secondaires nouveaux est d'exploiter les écosystèmes peu communs qui existent dans des conditions extrêmes (pH, température, salinité, etc.).

Les isolats qui montrent une activité antibiotique sont ensuite testés afin de savoir si cet antibiotique est nouveau, ce qui réclame beaucoup de temps et de ressources, car la plupart des antibiotiques sont déjà connus. S'il est nouveau, l'antibiotique est produit en quantité suffisante pour des études de structure, de toxicité et d'activité clinique sur des animaux infectés.

Méthodes de purification

Les méthodes de purification choisies dépendent des caractéristiques physicochimiques prédéterminées du complexe actif et de sa concentration dans le milieu de production.

a) Extraction des antibiotiques

L'extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques non miscibles avec l'eau est considérée comme une étape de purification partielle (figure 6). A l'issue de la fermentation,

l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique (comprenant les cellules, des éléments du milieu et différents métabolites). Généralement, les molécules bioactives passent dans la phase aqueuse. Le choix du solvant d'extraction est primordial. Il doit non seulement avoir une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des molécules lors de l'extraction ainsi que leur concentration par distillation.

La localisation des antibiotiques peut être différente selon leur nature et le microorganisme producteur. C'est pour cette raison que les activités antibiotiques sont à rechercher aussi bien dans le surnageant de culture que dans les cellules.



Figure 6 : Extraction de molécules (antibiotiques) par des solvants dans des ampoules à décanter.

b) Purification des antibiotiques

Pour purifier les antibiotiques, de nombreuses techniques ont été décrites en littérature. Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Celles se rapportant à la chromatographie liquide restent les plus utilisées et permettent une purification totale des antibiotiques.

Après extraction, les produits bruts obtenus sont traités en chromatographie liquide. Deux types de chromatographie sont possibles.

- Sur plaque: ou sur couche mince (CCM).
- Sur colonne: à pression atmosphérique ou basse pression ou encore à haute pression (HPLC).

➤ **Purification des antibiotiques par chromatographie sur couche mince et sur Colonne**

Après extraction avec le meilleur solvant choisi, il est souvent indispensable d'effectuer une semi- purification par :

- Chromatographies préparatives qui permettent la séparation des molécules ayant des propriétés physicochimiques voisines. Elles peuvent être réalisées sur colonne ou sur plaques épaisses de gel de silice (figure 7);
- Filtration sur gel (séphadex, polyacrylamide, agarose, etc.), ce qui permet la séparation des molécules en fonction de leur poids moléculaire.



Figure 7 : Séparation des molécules par chromatographie sur plaque ou sur couche mince (CCM) et sur colonne.

➤ **Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

L'HPLC est une méthode d'analyse très sélective. Elle est utilisée comme dernière étape de purification car elle permet la séparation de nombreux produits, y compris des isomères d'un mélange complexe. Les composés sont détectés par la mesure de leur absorption en lumière UV à des longueurs d'ondes précises.

Les techniques de séparation sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (Chromo-géniques), spectroscopiques (UV-visible, infrarouge), et microbiologique (bio-autographie et anti-biographie) pour la détection des antibiotiques et pour avoir des informations sur leur nature, ce qui peut orienter la purification.

c) Identification des antibiotiques par méthodes spectrales

Les méthodes spectroscopiques sont utilisées pour rechercher la présence de certains groupements chimiques caractéristiques dans les molécules d'antibiotiques (liaison conjuguées, certains groupements fonctionnels ; etc.), ou encore pour détecter la présence de certains types d'antibiotiques comme les polyènes présentant des spectres d'absorption caractéristiques en UV-visibles.

➤ Spectroscopie en UV-visible

Cette étude est insuffisante pour identifier une structure, mais elle permet de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260 nm) et les systèmes insaturés dont certains (substances colorées) absorbent même dans le visible. Les polyènes qui absorbent entre 290 et 405nm sont aisément détectés par cette méthode.

➤ Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)

Elle permet de déterminer la présence de groupements et fonctions caractéristiques (CH₃, CH₂, CH, OH, NH₂, NH, CHO, COOH, etc.), et d'aromatiques, etc. et ce, à l'aide de tables de corrélation.

➤ Spectroscopie de masse

Par ces différentes techniques, la spectrométrie de masse, permet d'avoir les masses molaires et parfois même la structure des substances analysées avec une grande certitude et après examen très approfondi du pic moléculaire et de ces fragments. La technique de « nanospray » a permis la détection et l'analyse d'antibiotiques même à l'état de traces. Le couplage LC- MS (liquide chromatography- mass spectrometry) permet la détermination des masses moléculaires de tous les composants d'un profil chromatographique.

➤ Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Ce type de spectrométrie permet de localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié ainsi que sa conformation privilégiée (stable).

Un spectre RMN se présente sous forme de pics caractérisant les déplacements chimiques (exprimés en ppm) et les constantes de couplage des protons ou des carbones. Il existe des tables de corrélations qui aident à identifier chaque type de proton ou de carbone en fonction de leur déplacement chimique. L'intensité des signaux est proportionnelle au nombre de protons.

La RMN à double dimension (RMN 2D) permet d'analyser avec une haute résolution la structure des molécules complexes. Elle aide à interpréter les spectres 1D, car elle donne à la fois, les protons couplés entre eux (Cosy, spectre H-H homonucléaire) et les protons du carbone correspondant (spectre 2D hétéronucléaire ^{13}C - ^1H).

II-3-3-4. Les extrémophiles

Les microorganismes extrémophiles se rencontrent essentiellement parmi les bactéries (eubactéries) et surtout les archéobactéries, beaucoup plus rarement dans les autres groupes.

Les archéobactéries (*Archaea*) sont des procaryotes qui diffèrent des eubactéries par divers caractères : composition de l'enveloppe cellulaire (absence d'acide muramique, lipides à chaîne aliphatiques ramifiées et liaisons éther...), présence de méthionine et non de formyl méthionine sur l'ARNt initiateur...

Leur métabolisme est varié, allant de l'aérobiose à l'anaérobiose stricte, de la chimioautotrophie à l'organotrophie. Elles sont adaptées à des habitats terrestres et surtout aquatiques restreints et extrêmes. On classe les *Archaea* en 5 groupes principaux :

- Les méthanogènes qui réduisent souvent le S_0 en H_2S (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanomicrobium*, *Methanococcus*) et dont quelques espèces sont thermophiles ;
- Les réductrices de sulfate (*Archaeoglobus*) : il s'agit de thermophiles extrêmes de sources thermales marines (83°C), anaérobies stricts, produisant H_2S ou des sulfures à partir de sulfates, sulfites et thiosulfates, et pouvant utiliser une grande variété de donneurs d'électrons, H_2 , lactate, glucose...
- Les halophiles extrêmes (*Halobacterium*, *Halococcus*, *Natronbacterium*...) des marais salants et des lacs salés, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs, à métabolisme respiratoire : ces

chimio-organotrophes ont des exigences nutritives importantes, sont neutro ou alcalinophiles, méso ou thermophiles, et sont souvent pigmentés ;

- Les « sans paroi » qui sont aérobies et thermoacidophiles (*Thermoplasma*) ;
- Les thermophiles extrêmes métabolisant le S₀ (*Disulfococcus*, *Methanopyrus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermoproteus*) : elles sont aérobies ou anaérobies, acidophiles ou neutrophiles, auto ou hétérotrophes, thermophiles obligés issues le plus souvent de sources chaudes.

Les cyanobactéries (eubactéries aérobies réalisant une photosynthèse type plante) sont souvent tolérantes vis-à-vis de conditions extrêmes. Elles peuvent en particulier se développer à 75°C dans des sources chaudes neutres ou alcalines.

Les microorganismes extrémophiles sont intéressants car ils permettent de travailler dans des conditions physicochimiques habituellement incompatibles avec les agents biologiques. Par ailleurs, ils sont susceptibles de produire des métabolites originaux.

L'utilisation des thermophiles en biotechnologie présente plusieurs avantages :

Vitesse supérieure de réaction, risques de contamination (et de présence de pathogènes) réduits, réduction des coûts de refroidissement (après stérilisation du milieu), réduction de la viscosité de certains milieux, ...

Ces microorganismes sont employés pour le traitement des eaux usées et la production de méthane, la dégradation de la lignocellulose, la production d'éthanol (*Thermoanaerobium ethanolicus*), la production d'antibiotiques (granaticine par *Streptomyces thermoviolaceus*).

Les osmophiles et halophiles sont utilisables en milieu pauvre en eau ou à forte pression osmotique. Du glycérol est produit par *Dunaliella* (protecteur osmotique), de même que du β-carotène. Les halophiles possèdent des antibiotiques protéiques appelés halocine.

Le bio-raffinage des carburants diesel (par exemple la bio-désulfuration) peut être réalisé à l'aide de microorganismes résistants aux solvants.

Chapitre III : Les milieux de culture industriels

Lorsqu'on a obtenu une souche susceptible de donner le produit désiré avec un rendement élevé, il faut mettre au point un milieu de culture utilisable à l'échelle industrielle.

Un milieu de culture doit être complet (qu'il soit synthétique ou complexe). La majorité des microorganismes industriels est hétéro-chimiotrophe, il est nécessaire d'apporter dans le milieu de culture : une source d'énergie et de carbone; une source d'azote; des sels minéraux (K_2HPO_4 , $CaCl_2$, $MgSO_4$) ; des oligoéléments (Zn, Fe, Co, Cu, Mn...).

La sélection du substrat dépend de son coût et de sa disponibilité. Sur le plan économique, il faut considérer le prix du milieu de culture, le coût du fonctionnement de la fermentation et la valeur du produit final. Le plus économique est d'utiliser des substrats naturels comme les résidus de l'agriculture ou de l'agro-industrie.

Les déchets et sous produits d'industries agroalimentaires représentent une bonne alternative aux produits nobles qui coutent assez cher, ils sont utilisés comme milieux de culture dans les productions à l'échelle industrielle (valorisation et utilisation de ces produits au lieu de les déverser dans l'environnement).

Principaux constituants des milieux de culture utilisés dans les procédés industriels :

Source	Matière brute
Carbone et énergie	Mélasses, Petit-lait, Déchets agricoles
Azote	Farine de soja, Déchets d'abattoir, NH_3 et nitrate, Vinasse
Vitamines	Produits végétaux et animaux
Fer, oligo-éléments	Dérivés chimiques inorganiques
Anti-mousses	Alcools, Silicones, Huiles végétales

III-1. Source de carbone

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans les cellules microbiennes. C'est, en effet, la source qui représente la plus grande part du milieu de culture.

Les nutriments carbonés du milieu sont très variés et vont de l'amidon de pomme de terre aux mélasses de sucre de canne ou de betterave, en passant par les hydrolysats d'amidon, les sirops de glucose, l'amidon saccharifié, le saccharose ou le sirop de sucre de canne.

Les principaux substrats carbonés industriels

a) Le saccharose

Les mélasses (égouts) sous-produit de l'industrie sucrière, sont relativement concentrées, utilisées dans de nombreuses fermentations industrielles (riches en saccharose et autres sucres ainsi qu'en matières azotées...). Des risques de contamination relativement faibles.

- Les mélasses de betteraves contiennent 48-50% de saccharose (on y trouve également des vitamines, acides aminés...), 1% raffinose, 1% glucose+fructose.

- Les mélasses de cannes contiennent 32% de saccharose, 14% de glucose, 16% de fructose.

Il constitue le principal milieu de l'industrie de levurerie.

b) L'amidon

L'amidon peut être une source bon marché après avoir été hydrolysé à l'aide d'enzymes. Il provient de maïs, pomme de terre, céréales...

- Hydrolyse physicochimique : grillage à sec en présence d'acide, la viscosité diminue et l'amidon devient fluide.

- Hydrolyse enzymatique : dégradation de l'amidon en utilisant des enzymes spécifiques.

α -amylase : 20% de dégradation (on obtient des maltodextrines).

α -amylase + pullulanase + β -amylase : on obtient un produit riche en maltose.

β -amylase + glucoamylase : on obtient un produit riche en glucose.

La dégradation complète du glucose nécessite l'utilisation de toutes ces enzymes (on obtient des sucres liquides).

NB : La dégradation de l'amidon se fait à chaud, donc ces enzymes doivent être thermostables, à cet effet on doit utiliser des microorganismes thermophiles ou thermo-tolérants.

c) Lactose

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère, contient environ 50% de lactose. Il présente une composition bien équilibrée (lactose, protéines, matière azotée, lipides, sels minéraux...).

Les souches l'utilisant sont productrices d'une β -galactosidase (pour sa dégradation et utilisation). Le lactose est le substrat de production du galactose.

d) Méthanol

Utilisé à grande échelle pour la production de POU (Protéines d'organismes unicellulaires) et des produits pour les industries agroalimentaires (acides glutamique, vitamine B12...).

Néanmoins, un groupe restreint de microorganismes puisse utiliser ce composé.

- Les bactéries méthylophiles obligatoires : se développent sur le méthanol, méthylène, méthane... à l'exemple des genres : *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocystis*...

- Les bactéries méthylophiles facultatives : se développent sur des composés à un seul atome de carbone (méthanol, méthane...) mais aussi sur d'autres composés (sucres, acides organiques...). Les genres : *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Streptomyces*...

- Certaines levures et les moisissures sont plutôt méthylophiles facultatifs : *Fusarium*, *Penicillium*...

Ces composés ont l'inconvénient d'être toxiques pour la plupart des microorganismes.

Ils sont volatiles (perte du milieu au cours de la production) et ils sont également inflammables.

Ils ont comme avantage par contre d'être miscibles à l'eau, ce qui les rend facilement solubles et cela résout le problème de transfert de matière. Pas de résidus toxiques après culture et problème de contamination réduit (peu de microorganismes peuvent se développer sur ces milieux).

e) Les hydrocarbures

Constituent une importante source de carbone et d'énergie. Le gasoil est une fraction pétrolière contenant 20-25% d'hydrocarbures paraffiniques qui sont facilement assimilables par certains microorganismes : Les bactéries (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Klebsiella*...); les moisissures (*Fusarium*, *Aspergillus*) et les levures (*Candida*).

Les hydrocarbures aromatiques insaturés et cycliques (benzène, toluène), ont une biodégradation très difficile voire impossible (un nombre très restreint de microorganismes pouvant les dégradés).

Les microorganismes synthétisent des biosurfactants (de nature glycoprotéique) qui permettent un meilleur contact entre l'hydrocarbure et la cellule (pénétration et assimilation).

En effet, ces hydrocarbures représentent comme inconvénient majeur la faible solubilité dans l'eau (problème de transfert de matière), et ces molécules sont sans oxygène donc elles nécessitent beaucoup d'O₂ pour être métabolisées.

III-2. Source d'azote

Trois sources d'azote principales : azote inorganique ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 ...), organique : (urée, glutamate...) et complexe (peptone, farine de soja...).

En industrie on utilise les sels ammoniacaux (sulfite d'ammoniaque). Les microorganismes utilisent tous l'azote minéral sous forme d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux, les nitrates, pour être assimilés doivent être réduites en sels ammoniacaux.

Le *Corn Steep Liquor*, un sous-produit féculiers de maïs (le concentré d'eau de trempage des graines de maïs), utilisé dans l'industrie de production d'antibiotiques (8% azote et vitamine).

III-3. Les éléments minéraux

Il est difficile de déterminer les besoins exacts en sels minéraux d'une culture microbienne.

Le phosphore et le soufre sont assimilés sous forme de phosphate et sulfite en quantité relativement importante (0.5g/L). Les autres éléments sont nécessaires en quantités plus faibles (oligoéléments).



Chapitre IV. Les fermentations industrielles

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation fait référence à tout procédé de culture à grande échelle d'un microorganisme, que ce soit ou non une fermentation au sens biochimique.

IV-1. Le fermenteur

Le récipient dans lequel le procédé industriel a lieu est appelé un fermenteur d'une contenance allant de cinq à dix litres pour ceux de laboratoire et jusqu'à 500 000 litres pour les industriels (Tableau I) (figure 8 et 9).

Tableau I : Tailles des fermenteurs industriels

Taille des fermenteurs en (L)	Produit
1-20 000	Enzymes de diagnostic, substances pour la biologie moléculaire
40-80 000	Certaines enzymes, antibiotiques
100-150 000	Pénicillines, antibiotiques aminoglycosylés, protéases, amylases, stéroïdes transformés, acides aminés, vin, bière
200 000-500 000	Acides aminés (glutamate), vin, bière

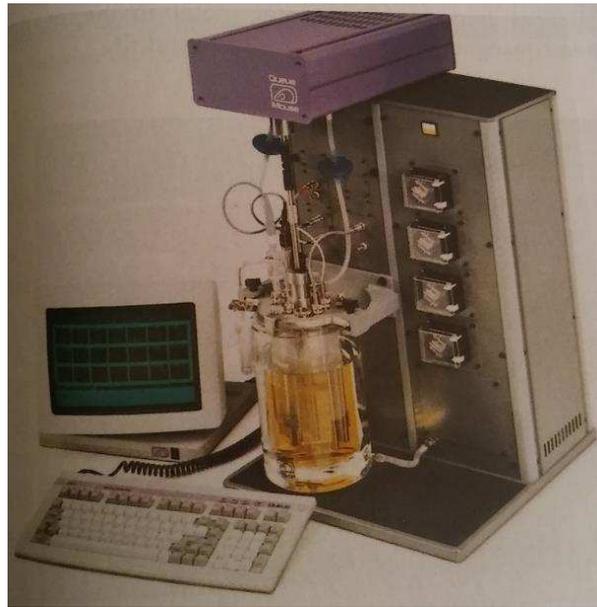


Figure 8 : Petit fermenteur de recherche (laboratoire) 5L.

Il y a deux grands types de fermenteurs industriels : l'un dédié aux fermentations anaérobies et l'autre aux fermentations aérobies. Les fermenteurs anaérobies nécessitent peu d'équipements spécifiques, sauf l'élimination de la chaleur générée pendant la croissance. Par contre les fermenteurs aérobies nécessitent un équipement beaucoup plus élaboré assurant un mélange et une aération optimaux. La plupart des fermentations sont aérobies.

Les fermenteurs industriels, presque toujours construits en acier inoxydable, sont des cylindres fermés auxquels sont reliées de nombreuses tuyauteries et vannes.

Comme la stérilisation du milieu de culture et l'élimination de l'excès de chaleur sont vitales, le fermenteur possède une double enveloppe de refroidissement dans laquelle on peut envoyer soit de l'eau froide soit de la vapeur (figure 9).

Ce système est insuffisant pour les grands fermenteurs, dans lesquels il est remplacé par un *serpentin de circulation d'eau* ou de vapeur intérieur.

Le système d'aération est un autre facteur critique pour les fermenteurs de grande taille, car la solubilité de l'oxygène dans l'eau est faible, tandis que la demande par les microorganismes est très forte.

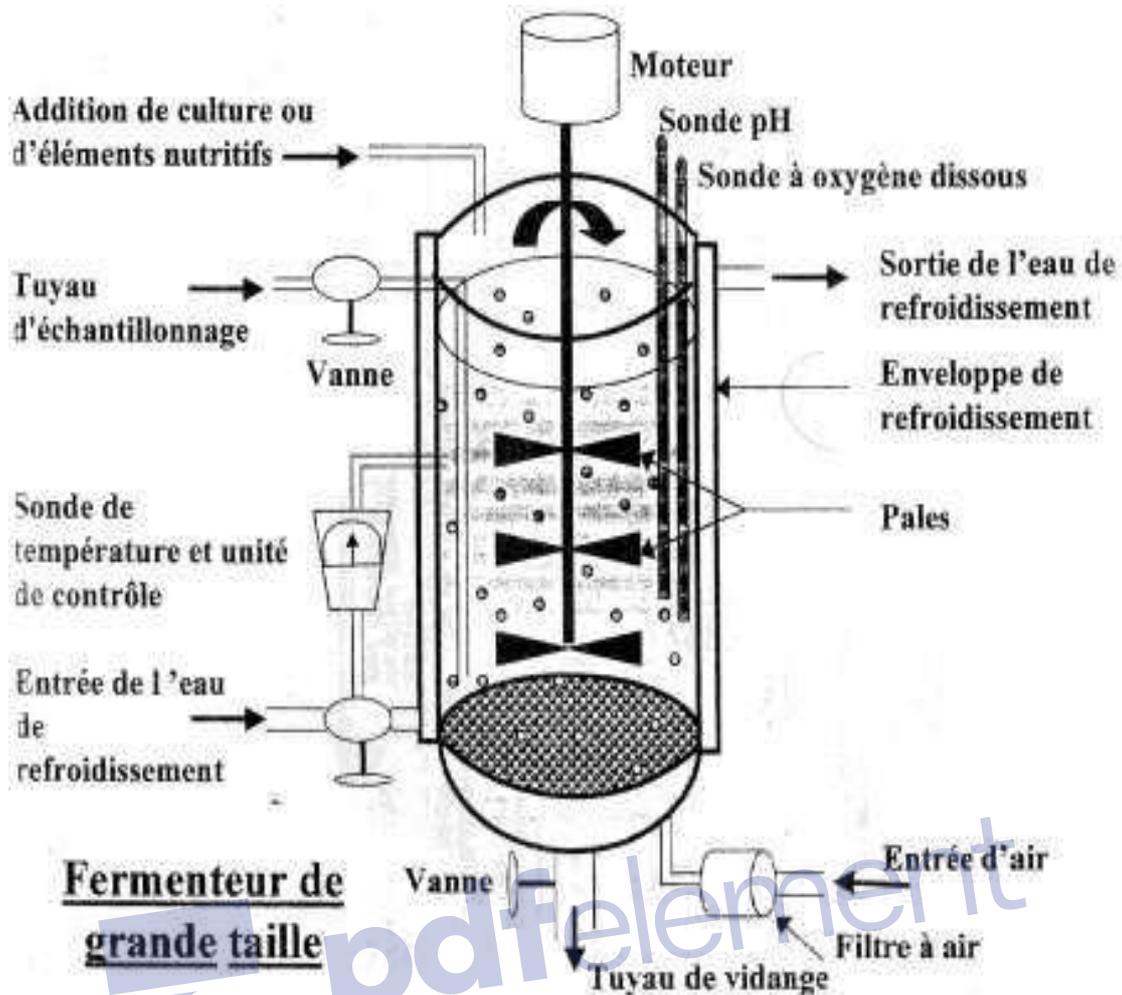


Figure 9 : Schéma de principe d'un grand fermenteur industriel.

IV-2. Procédés de fermentation

IV-2-1. En phase liquide

En milieu liquide (fermentation submergée), les fermenteurs peuvent réaliser des procédés en batch, fed-batch et en continu.

Batch (discontinu) : un même volume du milieu sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation des produits.

Elle consiste à cultiver les microorganismes dans un réacteur pour les récolter et extraire les produits formés après une période de temps déterminée.

Cinétique de croissance discontinue :

La croissance microbienne est une augmentation de la masse des cellules et du nombre de cellules :

Bactéries: par division binaire ;

Levures: croissance par bourgeonnement ;

Champignons: croissance du mycélium par allongement et ramification ;

La vitesse de croissance: $dX/dt = \mu X$

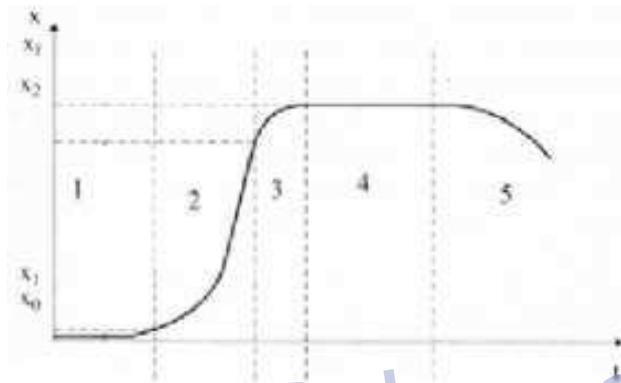


Figure 10 : Courbe de croissance bactérienne

- 1: Phase de latence: $\mu=0$, X_0 cte \Rightarrow adaptation des cellules et synthèse d'enzymes.
- 2: Phase exponentielle: $\mu=\max$, $\mu=cte$, G est court, $dX/dt = \mu X$
- 3: Phase de ralentissement: vitesse de croissance basse, début d'épuisement du milieu de culture.
- 4: Phase stationnaire: $\mu=0$, $n=0$
- 5: Phase de déclin: $\mu < 0$, épuisement total du milieu de culture, lyse cellulaire, accumulation de métabolites toxiques \Rightarrow mortalité cellulaire.

On utilise dans ce type de fermentation (*discontinue*) que de faibles volumes.

Après avoir rempli le fermenteur (le bioréacteur) du milieu de culture et l'avoir stérilisé, ou bien avoir stériliser le fermenteur vide et l'avoir rempli du milieu stérile. On introduit l'inoculum et on laisse dérouler la fermentation.

Durant le temps de la fermentation, on n'introduit pas du milieu de culture. De la même façon, on ne suture pas le produit quand la fermentation n'est pas encore terminée.

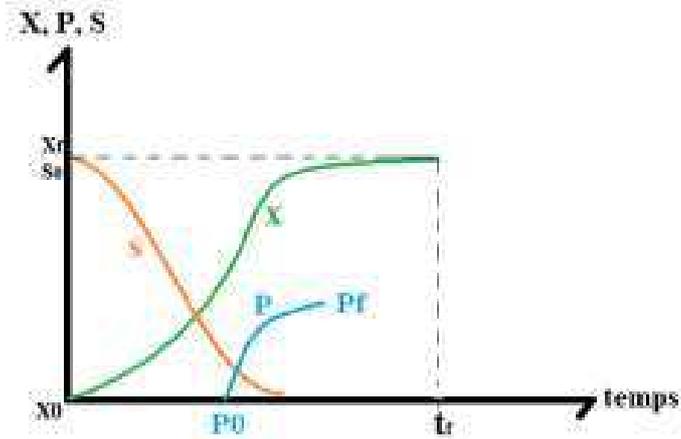


Figure 11 : Evolution des concentrations en biomasse, en produit et en substrat dans le fermenteur discontinu

Au cours de la fermentation et pour une bonne démarche, cette opération doit être contrôlée par une série de mesures : pH, O_2 , concentration cellulaire, ... Le seul contrôle valable est le dosage du métabolite formé (Pf).

Fed-batch : cette technique obéit aux mêmes principes que la précédente mais au cours de la fermentation, certains composants du milieu sont additionnés de façon contrôlée.

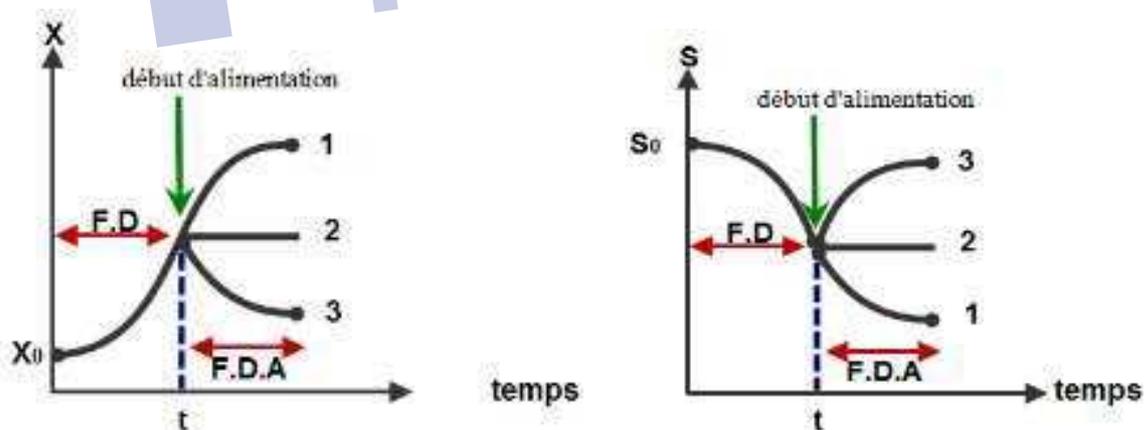


Figure 12 : Evolution des concentrations en biomasse et en substrat dans le fermenteur discontinu alimentée.

(1): débit d'alimentation faible.

(2): concentration constante.

(3): débit d'alimentation élevé.

F.D: fermentation discontinue

F.D.A: fermentation discontinue alimentée.

Ce mode de fermentation est très utilisé en pratique, il permet de gagner du temps et de ce fait d'améliorer la productivité du réacteur.

Continu : au cours de la phase exponentielle, le milieu s'appauvrit en substances nutritives, tandis que les produits du métabolisme microbien s'accumulent. Si l'on renouvelle le milieu dans le fermenteur en apportant le milieu neuf et en retirant le milieu utilisé contenant les cellules formées, la culture se maintient indéfiniment en phase exponentielle (la production se fera en continu).

L'alimentation du fermenteur est continue avec un volume égal du volume de soutirage du mélange biomasse-milieu liquide (produit final), de façon à maintenir le volume de fermenteur constant.

Contrairement à la fermentation discontinue, la fermentation continue permet de maintenir constants:

- La concentration cellulaire
- Le taux de croissance de la biomasse
- Les équilibres nutritifs du milieu
- La production en métabolites recherchés.

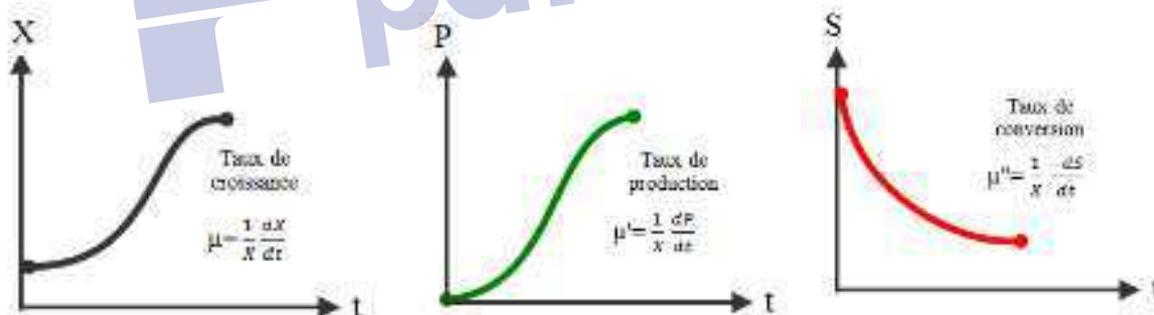


Figure 13 : Evolution de la masse cellulaire X, du produit P et de la consommation du substrat S en fonction du temps.

IV-2-2. En phase solide

Pour la valorisation des substrats agricoles et des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, les fermentations en milieu solide apparaissent comme une nouvelle voie biotechnologique peu exploitée mais prometteuse pour la fabrication d'enzymes, produits alimentaires, industriels ou pharmaceutiques

Ces fermentations impliquent le développement de micro-organismes, bactéries, levures et surtout moisissures sur des substrats agricoles en phase solide. La fermentation en milieu solide est particulièrement bien adaptée aux organismes mycéliens.

➤ *Les bases de la fermentation sur substrats solides*

Le terme fermentation en milieu solide est la traduction de "Solid State Fermentation" ou de "Solid Substrate Fermentation", expressions désignant toute fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide ; l'eau ne doit pas occuper la totalité des espaces libres et ne doit pas s'écouler librement.

Selon d'autres chercheurs la FMS est une culture microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice poreuse et en absence de tout écoulement liquide. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'adsorber les nutriments qui se trouvent à l'état dissous. Ces milieux peuvent être soit des graines ; de céréales, ou des produits végétaux, organiques ou minéraux granulés ou fragmentés.

Grâce à la FMS, de nombreuses recherches sont faites dans le but d'assurer une valorisation des sous-produits industriels pour différentes finalités telles que la détoxification, l'enrichissement en protéines microbiennes, ou la production de produits à forte valeur ajoutée.

➤ *Comparaison entre la FMS et la FML*

Les premières applications non alimentaires de la FMS sont pour la production d'enzymes, essentiellement pour la production des enzymes hydrolysant les polymères végétaux. En effet, ces enzymes ne sont produites que par un système inductible où l'inducteur naturel est le polymère naturel. Ces polymères sont très peu solubles en phase aqueuse, ce qui implique de très grands volumes pour pouvoir les utiliser en fermentation liquide « fermentation submergée ». Alors qu'en phase solide, le substrat de base est lui-même l'inducteur, ce qui entraîne des réacteurs beaucoup moins volumineux pour obtenir les mêmes niveaux de production.

L'insolubilité totale des coproduits agricoles lignocellulosiques font de la fermentation en milieu solide une technique potentiellement très intéressante.

Actuellement, les procédés en phase solide connaissent un regain d'intérêt avec la valorisation des coproduits agricoles pour la production d'enzymes, de nourriture animale et depuis peu pour la production de produits organiques. Le tableau II montre la différence entre la FML et la FMS.

Tableau II. Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002)

Facteur	Fermentation liquide	Fermentation solide
Substrats	Substrats solubles (sucres)	Substrats polymères insolubles
Conditions aseptiques	Stérilisation par la chaleur/ Asepsie contrôlée	Traitement à la vapeur, conditions non stériles
Eau	Grand volume d'eau utilisé et d'effluents pollués	Consommation limitée d'eau/ peu d'effluents
Chaleur métabolique	Contrôle de la température facile	Faible capacité de transfert thermique
Aération	Limitée à l'oxygène soluble, haut niveau d'air requis	Aération simple et haute (échange d'air/substrat)
Contrôle du pH	Facile	Substrat solide tamponné
Agitation mécanique	Bonne homogénéisation	Conditions statiques
Echelle	Equipements industriels disponibles	Besoin de conception de nouveaux équipements
Inoculation	Inoculation simple/ procédé continu	Par spores ou mycélium
Contamination	Risques de contamination par une seule souche de bactérie	Risque si le microorganisme pousse lentement
Consommation en énergie	Consommation élevée	Faible consommation
Volume de l'équipement	Grand volume et grand cout	Petit volume et petit cout
Effluents et pollution	Grands volumes d'effluents pollués	Absence d'effluents, moins de pollution
Concentration S/Produit	30-80 /L	100-300 /L

Le transfert du procédé d'un fermenteur de petite taille à un fermenteur de grande taille est un aspect important du procédé appelé **mise à l'échelle** ou *scale up*. En effet, les procédés biocatalytiques donnent rarement les mêmes résultats lorsqu'on passe du fermenteur de laboratoire (figure 8) au fermenteur industriel (figure 9).

IV-3. Processus de mise à l'échelle

Le transfert du procédé du laboratoire au fermenteur industriel, se fait en plusieurs étapes. La première étape est réalisée en *fiOLE de laboratoire* appelée *Erlenmeyer* opération classique à petite échelle indiquent si le procédé a un quelconque intérêt commercial. De là, on passe à l'étape du fermenteur de laboratoire, fermenteur de verre, d'une contenance d'un à dix litres pour les premiers pas de mise à l'échelle. A ce stade, il est possible de tester des variations de composition du milieu, de température, de pH, etc. à faible cout.

Quand les tests à ce stade sont prometteurs, on passe à l'étape de fermentation en *hall pilote* avec des fermenteurs de 300 à 3 000 litres, déjà plus proches de la taille commerciale, mais d'un cout encore raisonnable. Finalement on arrive au fermenteur industriel, d'une contenance de 10 000 à 500 000 litres. Lors de toutes ces étapes, on suit de très près l'aération et la façon dont le volume joue sur l'évolution de la concentration en oxygène de la culture.

Purification

Pour produire un antibiotique commercial, il faut d'abord le développer à grande échelle (*scale up*) et ensuite le purifier de façon efficace. Comme l'antibiotique est présent à faibles concentration dans le bouillon de fermentation, des méthodes d'extraction et de purification élaborées sont nécessaires (figure 14). Si l'antibiotique est soluble dans un solvant organique, il sera relativement simple à purifier dans un volume de solvant qui sera réduit par évaporation. S'il n'est pas soluble, il faudra faire appel à des techniques de chromatographie d'absorption, d'échange d'ion ou de précipitation chimique. Dans tous les cas, le but est d'obtenir un produit cristallisé de haute pureté.

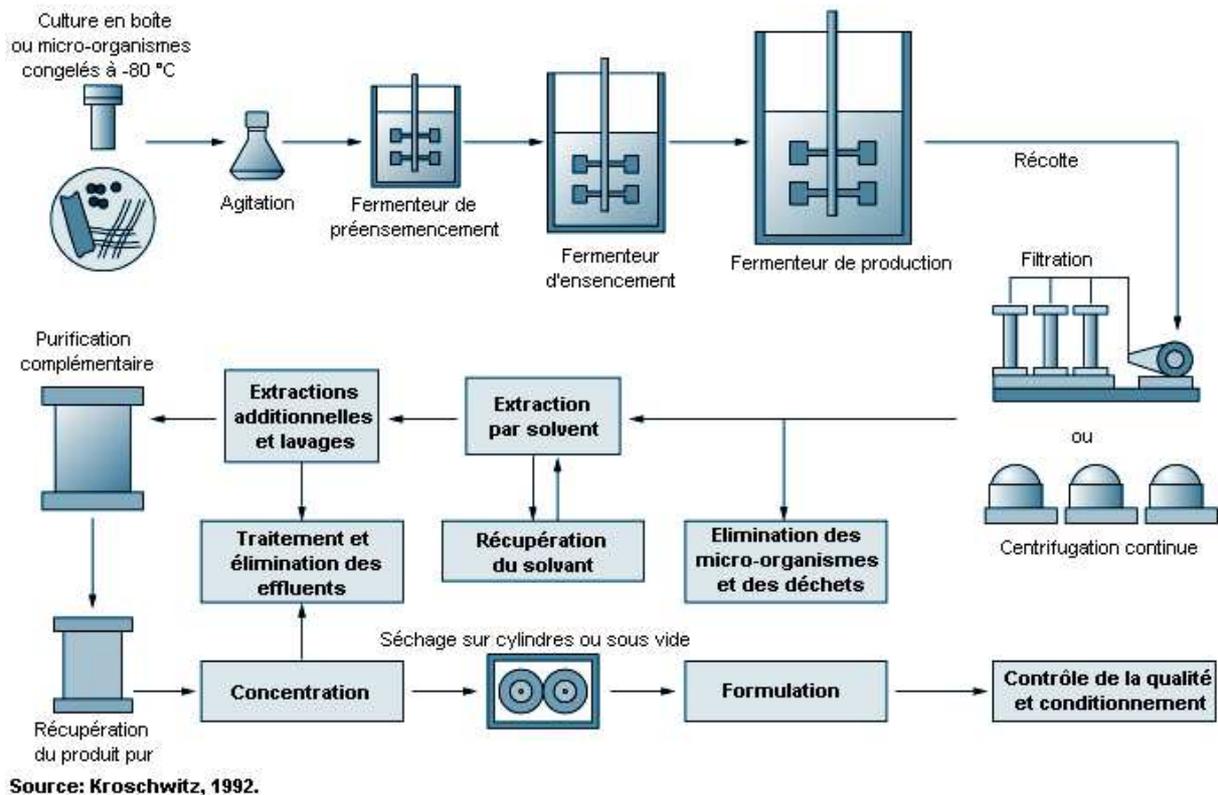


Figure 14 : Schéma général de mise à l'échelle suivie des étapes d'extraction et de purification des produits

IV-4 : Inocula et ensemencement

IV-4-1. Définition

L'inoculum est défini comme tout matériel vivant (spores, cellules, hyphes) servant à inoculer un milieu de propagation ou de production.

A l'échelle industrielle, il s'agit d'inoculer largement le milieu de culture afin que la souche ensemencée se développe suffisamment vite pour supplanter les contaminants éventuels d'où la nécessité de préparer un inoculum qui peut atteindre 5000 à 10000L pour ensemencer des fermenteurs 10 à 20 fois plus grand.

IV-4-2. Préparation de l'inoculum

On réalise une suspension de spores que l'on dilue et que l'on repique à la surface d'un tube de gélose inclinée.

Ensuite, on fait un pré-inoculum dans un milieu liquide (fioles, Erlenmeyer) incubé sur des agitateurs rotatifs. Il est indispensable que le milieu choisi donne une grande quantité de spores par fragmentation du mycélium. On passe ensuite à l'atelier dans un petit fermenteur de 300 à 500 L, puis dans un fermenteur plus grand (germinateur) de 3000 à 5000L qui sert de *pied de cuve*. Grâce à un récipient métallique mobile (Bazooka), on ensemence aseptiquement le fermenteur, à l'aide d'air comprimé stérile dont la pression chasse le contenu du récipient dans le fermenteur. Toute la tuyauterie est stérilisée à la vapeur.

IV-4-3. Propriétés des inocula

A chaque stade, des contrôles rigoureux décèlent les trois causes d'accidents toujours menaçants : les contaminations, les bactériophages et les mutations.

Pureté :

La présence de contaminants est détectée en effectuant des tests de stérilité à l'aide d'examen microscopiques et subcultures. Ces tests doivent se faire depuis l'inoculum jusqu'à la culture principale.

Qualité :

En ce qui concerne les mutations, les contrôles sont beaucoup plus difficiles, et l'on observe seulement des baisses de rendement qui ne sont pas toujours significatives. C'est pourquoi, dans la mesure du possible, il faut choisir des mutants stables comme souche mère.

Exp. : *Streptomyces griseus* après 58 subcultures (repiquages) a perdu son pouvoir de sporulation et de production de la streptomycine sur le milieu gélosé, glucosé à l'extrait de levure.

Enfin, la viabilité de l'inoculum doit être vérifiée par repiquage sur milieu solide.

Quantité :

Les cellules (ou spores) doivent être en quantité suffisante qui permet une inoculation maximale. Dans certains cas, (chez les microorganismes filamenteux), la quantité de l'inoculum influence les caractères morphologiques de la souche durant sa croissance.

IV-5. Les protéines d'organismes unicellulaires : les P.O.U. ou SCP, les organismes utilisés et les substrats bon marché les plus adaptés

Les protéines d'organismes unicellulaires (POU) sont une source non conventionnelle de protéines. Ces protéines sont obtenues à partir de culture de microorganismes (levures, champignons filamenteux, bactéries, cyanobactéries) utilisant le plus souvent des substrats qui sont des produits de l'industrie agroalimentaire et des produits agricoles afin de combler le déficit alimentaire (aussi bien humain qu'animal) en protéines au niveau mondial.

IV-4-1. Les levures

Les levures sont un groupe de microorganismes dont les taux de croissance sont moins élevés que ceux des bactéries, mais qui présentent une facilité de mise en œuvre (fermentation industrielle) et un taux en principes nutritifs fort intéressants (lysine, vitamines de groupe B). En effet, ces microorganismes ont une grande valeur nutritive et contiennent jusqu'à 60% de protéines. Elles contiennent, en outre, peu d'acides nucléiques (22.5% dont 4.8% pour le DNA et 17.7% pour le RNA). Leur culture se fait à pH acides, ce qui diminue les risques de contamination. Leur récolte est facile et le traitement de leur biomasse est aisé. Le taux d'incorporation de cette biomasse dans les régimes alimentaires peut atteindre 20%.

Procédés de production de POU :

Plusieurs procédés de production de P.O.U. sont opérationnels dans de nombreux pays (USA, Europe de l'est, Australie...) et les premières expériences concernant la culture à grande échelle de ces microorganismes eurent lieu pendant la première guerre mondiale en raison de problèmes de disette alimentaire. Parmi ces procédés on peut citer :

- Le procédé WHEAST PROCESS utilisant comme matière première le lactosérum et comme inoculum la souche *Kluyveromyces fragilis*,
- Le procédé SYMBA où il est question de cultiver des souches de levures du genre *Candida utilis* à partir d'hydrolysats d'amidon.

IV-4-2. Les champignons filamenteux

Les mycoprotéines exemple du Quorn :

L'un des rares survivants des programmes de protéines d'organismes unicellulaires des années 60 et qui connaît une véritable réussite.

C'est un assemblage de filaments mycéliens, produit à partir de la souche *Fusarium venenatum* présent à l'état naturel dans le sol. Il s'agit d'un produit riche en protéines, il contient un ratio masse/masse de 44%. Parmi les constituants de ces protéines figurent tous les acides aminés essentiels. Contient également des fibres, est pauvre en graisses saturées et ne contient pas de cholestérol.

IV-4-3. Les cyanobactéries

Le groupe des cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, compte parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur terre et constitue l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène. Parmi elle existe le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis* (ou *Arthrospira platensis*) plus connue sous le nom d'algue Spiruline (Tableau III).

Tableau III: Taxonomie récapitulative (Fox, 1999; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001)

Règne	Monera ou Bacteria
Sous-règne	Procaryota
Phylum ou Division	Cyanophyta ou Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Oscillatoriales
Famille	Oscillatoriaceae
Genre	<i>Arthrospira</i>
Espèce	<i>Arthrospira platensis</i>

Consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique, et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années. Riche en nutriments tel que protéines,

glucides, lipides, vitamines et minéraux, elle est à l'étude ou déjà utilisée sur tous les continents par des ONG pour lutter contre la malnutrition.

➤ *La spiruline*

Composition :

Il est bien établi que les variations de conditions de culture provoquent facilement de forts changements dans la composition biochimique des spirulines. Cependant en moyenne, la spiruline contient en poids sec jusqu'à 70% de protéines, 25 à 25% de glucides, jusqu'à 11% de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments), de la chlorophylle et des phycobiliprotéines.

Par sa composition protéique, la spiruline est un aliment très riche. Ainsi, la spiruline contient la plupart des acides aminés et notamment tous les acides aminés essentiels constituant près de 60% du poids total des protéines.

Milieu et conditions de croissance :

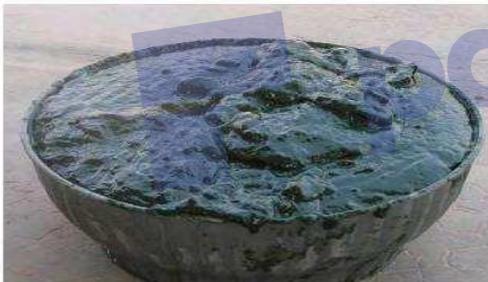
Pour se développer, la cyanobactérie a besoin de lumière, d'une eau alcaline, avec un pH allant de 8,5 à 11 (pH optimum = 9,5), riche en azote et en carbone, et d'une température comprise en 25 et 40°C. Elle est produite dans des bassins, dans une eau peu profonde, brassée en permanence pour assurer une répartition régulière des éléments nutritifs. Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduirait à la photolyse des micro-algues. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donnera la croissance optimale. A l'inverse, en lumière et agitation faibles, la croissance sera lente, mais la pigmentation plus marquée, c'est-à-dire que la couleur sera d'un vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaîtra.



Les bassins peuvent être nombreux sur un même site et se développent par phases successives. Ici sur la photo, 6 bassins exploités.



Après quelques semaines, la récolte commence. Un bassin peut être récolté tous les 2 ou 3 jours, pendant toute l'année



La spiruline récoltée est pressée, extrudée puis séchée au soleil.



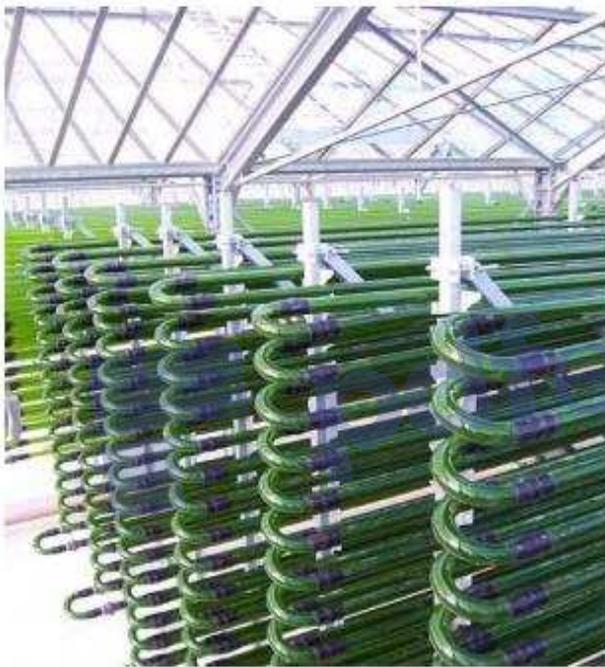
La spiruline est conditionnée en sachet, flacon ou gélules puis distribuée au famille dans les CREN (Centres de récupération et d'éducation nutritionnelle) pour nourrir leurs enfants et apprendre aux mamans comment l'utiliser.

Figure 15 : Culture et distribution de spiruline dans une ferme locale au Burkina Faso

Production Industrielle

On travaille dans des Photo-bioréacteurs contrôlés (fermenteurs en verre), ont comme avantages de maintenir la stérilité de la culture et la facilité du contrôle des différents paramètres de culture.

Ils contiennent des capteurs d'énergie solaire (thermorégulation), des carbonateurs, équipés de systèmes de circulation de la culture (transfert gaz-liquide-cellules) et doués également d'une agitation mécanique et un éclairage de l'extérieur par des lampes (la nuit en plus de la lumière du jour).



En 1999, une installation ultra moderne basée sur une culture de micro-algues en photo-bioréacteurs à été mise au point en Allemagne à Klotze par la société BPS. Reposant sur un système fermé de tubes de verres assurant un apport de lumière optimal aux algues. Long de 500kms sur une superficie de 1.2ha, le volume de culture, réparti en 20 unités, est d'environ 600000 litres.

Figure 16 : Photo d'une unité de production de micro-algues par photo-bioréacteur

Chapitre V : Les produits de fermentations industrielles

On distingue deux types principaux de métabolites microbiens : les primaires et les secondaires. Un métabolite primaire est formé durant la phase exponentielle de croissance alors qu'un métabolite secondaire l'est le plus souvent en fin de phase exponentielle ou lors de la phase stationnaire (figure 17).

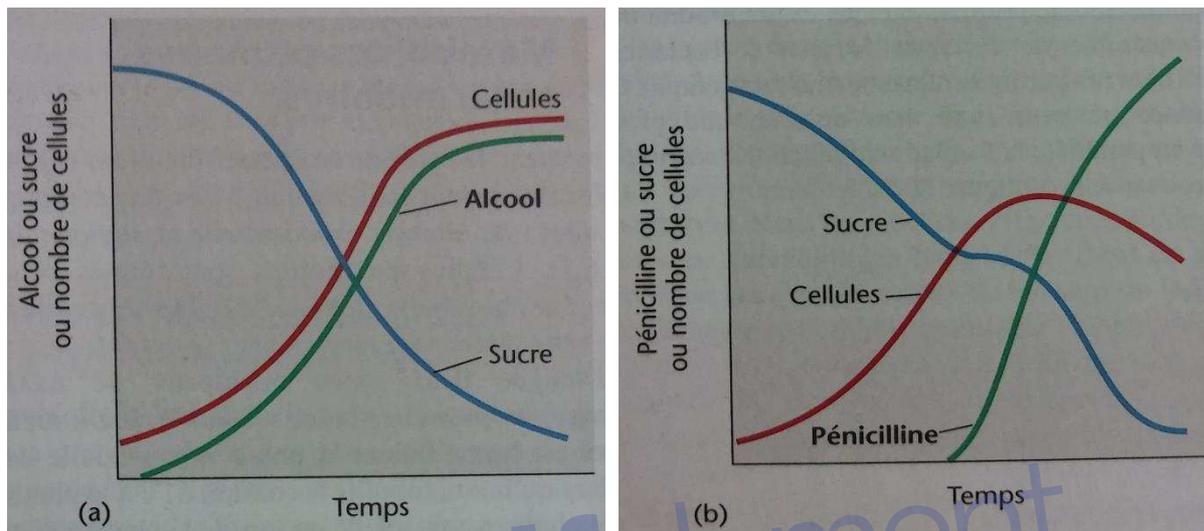


Figure 17 : Comparaison entre production de métabolites primaires et secondaires.

(a) Production d'alcool par une levure : métabolite primaire. **(b)** Production de pénicilline par le champignon *Penicillium chrysogenum* : métabolite secondaire. La pénicilline n'est produite qu'en fin de phase exponentielle.

Dans ce qui suit nous allons aborder ces deux types de métabolites en donnant quelques exemples de métabolites microbiens primaires et secondaires.

V-1. Les métabolites primaires obtenus par fermentation microbienne

- Les acides aminés
- Les acides organiques
- Les Biogaz (H₂, CH₄, ...)

V-1-1. Acides aminés

Les acides aminés sont très utilisés en industrie agroalimentaire en tant qu'additifs, en médecine et en industrie chimique comme molécules de base. L'acide aminé le plus produit est l'**acide glutamique**, utilisé en tant qu'exhausteur de goût (monoglutamate de sodium MGS). Deux autres acides aminés importants, l'*acide aspartique* et la *phénylalanine*, sont à la base de

l'édulcorant artificiel **aspartame**, un agent sucrant non calorique des boissons sans sucre. L'aspartame est un dipeptide du glutamate et du méthylester de la phénylalanine.

La *lysine*, acide aminé essentiel pour l'homme et certains animaux d'élevage, est utilisée en tant qu'additif alimentaire. Sa production à partir de la bactérie *Brevibacterium flavum* est un classique.

Comme les acides aminés sont les « briques » servant à construire les protéines des organismes vivants (dont les enzymes), la régulation de leur production est très stricte. Il faut donc court-circuiter ces mécanismes de régulation pour obtenir une *souche surproduisant* de façon rentable l'un de ces acides aminés.

Par exemple, la production de lysine par *Brevibacterium flavum* est contrôlée par l'aspartokinase ; un excès de lysine rétro-inhibe cette enzyme. On obtient une surproduction de lysine chez les mutants dont l'aspartokinase n'est plus sensible à cette rétro-inhibition. Ceci est réalisé en isolant des mutants résistants à un analogue de la lysine la S-aminoéthyl cystéine (AEC), qui se lie au site allostérique de l'aspartokinase et bloque son activité.

On obtient facilement par sélection positive des mutants résistants à l'AEC produisant une aspartokinase dont le site allostérique est modifié et ne reconnaît plus ni l'AEC, ni la *lysine*. La rétro-inhibition par la lysine est ainsi fortement diminuée. De tels mutants peuvent produire plus de 60g/L de lysine en fermenteurs industriels, ce qui rend la production commerciale viable.

V-1-2. Les acides organiques

Acide acétique (*Clostridium thermoaceticum*, 35g/L en Fed-batch), acide citrique (*Aspergillus niger*), acide lactique, acide gluconique...

➤ Acide citrique et autres composés organiques

L'acide citrique est très utilisé comme additif en industrie agroalimentaire dans les domaines des boissons, des confiseries, de la pharmacie et en tant qu'agent levant du pain et remplaçant des phosphates dans les détergents. Plusieurs autres acides sont produits par des champignons, dont l'acide itaconique, employé dans la production des résines acryliques, et l'acide gluconique, servant à la production de gluconate de calcium dans le traitement des déficiences humaines en calcium et comme agent de lavage adoucissant.

On compte, parmi d'autres produits chimiques importants produits par des bactéries, le sorbose, produit au moyen de l'oxydation du sorbitol par *Acetobacter* et utilisé dans la fabrication de l'acide ascorbique (vitamine C), et l'acide lactique, fabriqué par de nombreuses bactéries et employé comme acidifiant alimentaire.

La production de l'acide citrique par *Aspergillus niger*, est la fermentation industrielle aérobie en culture submergée pionnière, suivie plus tard des productions d'antibiotiques. Normalement la production d'acide citrique est liée au cycle de l'acide citrique. Toutefois, chez certains microorganismes comme *Aspergillus niger*, on peut obtenir de grandes quantités d'acide citrique en faisant pousser le champignon en aérobose sur un milieu carencé en fer. La déficience en fer oblige *Aspergillus niger* à surproduire de l'acide citrique pour séquestrer le fer dont elle a besoin dans le milieu par chélation avec l'acide citrique produit. Le milieu de production est donc traité pour être déficient en fer ainsi que les fermenteurs Inox, qui peuvent être recouverts d'une couche de verre interne pour éviter tout lessivage de fer des parois au pH acide généré par l'accumulation d'acide citrique durant la production.

➤ *Production d'acide citrique : milieu de croissance, conditions de culture et de purification*

Les nutriments carbonés du milieu sont très variés et vont de l'amidon de pomme de terre aux mélasses de sucre de canne ou de betterave, en passant par les hydrolysats d'amidon, les sirops de glucose, l'amidon saccharifié, le saccharose ou le sirop de sucre de canne. Les sucres sont catabolisés par le cycle glycolytique de Krebs et entrent dans le cycle de l'acide citrique pour produire cet acide.

De nos jours, l'acide citrique est élaboré principalement en culture submergée à grande échelle avec oxygénation importante, car *Aspergillus niger* est aérobie strict.

Après élimination de la biomasse, on purifie l'acide citrique en ajoutant de la chaux (CaO), qui le précipite sous forme de citrate de calcium. Après filtration, le précipité est traité avec de l'acide sulfurique pour donner une solution d'acide citrique et de sulfate de calcium qui cristallise (CaSO₄). Après une seconde filtration destinée à éliminer ces cristaux, l'acide citrique est concentré par évaporation et cristallisé.

V-1-3. Alcools et solvants, biocarburants et Biogaz

L'alcool, métabolite primaire typique est un produit du métabolisme anaérobie de certaines levures et bactéries et fait partie du métabolisme énergétique. Comme la croissance ne peut avoir lieu qu'avec une production d'énergie en parallèle, la formation d'éthanol s'accomplit pendant la croissance.

Acetone (*Clostridium acetobutylicum*), dihydroxyacétone, polyols, butanol, éthanol...

L'éthanol (80% de la production mondiale est produite par fermentation, à partir de cellulose, glucose, amidon...), le méthane par décomposition anaérobie de matière organique et d'autres hydrocarbures.

V-1-3-1. Production de Biogaz

La fermentation anaérobie de la « biomasse » (produits organiques d'origine végétale ou animale), avec production finale de méthane et de dioxyde de carbone, est connue est utilisée depuis longtemps : de nombreuses expériences de fermentation de fumier ont eu lieu au 19^{ème} siècle. A noter que c'est en 1895 que D. Cameron construisit pour la ville d'Exeter (Grande Bretagne) le premier digesteur de boues obtenu par décantation d'eaux résiduelles, le gaz produit servant à l'éclairage des rues de la ville. En 1900, la première installation utilisant les déchets d'une communauté fut réalisée dans une léproserie à Bombay.

Le domaine d'application de la méthanisation se restreint aux ressources humides (déjections animales, effluents agro-industriels), aux ordures ménagères et il semble que ce soit la voie d'avenir car inéluctable au vu des nuisances engendrées par tout autre traitement. Elle se développe à nouveau sur les stations de traitement des eaux résiduelles urbaines.

La méthanisation est l'étape ultime du processus de fermentation anaérobie des matières organiques. Cette décomposition bactérienne s'effectue en quatre phases essentielles :

L'hydrolyse : hydrolyse et solubilisation de la matière organique par une population bactérienne mixte ;

Acidogénèse et Acétogénèse : les molécules solubles obtenues après l'hydrolyse sont métabolisés par des bactéries acidogènes (*Clostridium* par exemple) en un mélange complexe riche en acides gras volatils, des alcools, aldéhydes, cétones, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène.

Méthanogénèse : Au cours de cette phase ultime, sous l'action de microorganismes spécifiques (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*...) l'acide acétique sera transformé en biogaz.

➤ Technologie de la méthanisation

La détermination de la technologie la mieux adaptée pour la méthanisation d'un substrat donné, dépend des caractéristiques de celui-ci et notamment de sa teneur en matières sèches.

Ce paramètre permet de distinguer deux types de procédés de méthanisation :

Méthanisation en discontinu et méthanisation en continu.

Méthanisation en discontinu

Le fonctionnement en discontinu s'applique à des produits de teneur en matière sèche généralement supérieure à 10% qui ne peuvent être pompés et doivent être manipulés à l'aide de moyens mécaniques de levage.

Les digesteurs ont la forme classique de cuves en béton ou en métal.

Méthanisation en continu

Lorsque la matière sèche est inférieure à 10%, les techniques en continu sont utilisées : introduction de matière organique fraîche et extraction de matière digérée à intervalles réguliers.

Cette technique a l'avantage de permettre une production régulière de biogaz avec un seul digesteur et de faciliter l'automatisation de la manutention.

De nombreux procédés peuvent être utilisés (infiniment mélangé ; contact ; à cultures fixées) en filtres anaérobies ou en lits fluidisés.

V-2. Les métabolites secondaires

-Les antibiotiques (pénicilline, streptomycine, tétracycline)

-Les vitamines (B12)

-Les polysaccharides

Parmi ces métabolites secondaires figurent quelques-uns des métabolites d'intérêt industriel les plus importants et les plus communs. Tous partagent les mêmes caractéristiques :

Les métabolites secondaires ne sont essentiels ni à la croissance ni à la reproduction.

Leur formation est très dépendante des conditions de culture et de la composition du milieu afin d'éviter la répression de leur production.

Ils font souvent partie d'un groupe de substances très proches. Par exemple, une souche de *Streptomyces* peut produire trente molécules riches d'antibiotique du type anthracycline.

Il est souvent possible d'en obtenir une forte surproduction, ce qui n'est pas le cas des métabolites primaires.

V-2-1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par les microorganismes pour tuer ou inhiber la croissance d'autres microorganismes. Ce sont des métabolites secondaires typiques. Ils sont produits principalement par des champignons filamenteux et des bactéries du groupe des actinomycètes (Tableau IV).

Tableau IV : Quelques antibiotiques produits industriellement

Antibiotique	Microorganisme producteur
Bacitracine	<i>Bacillus licheniformis</i>
Céphalosporine	<i>Cephalosporium spp.</i>
Cycloheximide	<i>Streptomyces griseus</i>
Cyclosérine	<i>Streptomyces orchidaceus</i>
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>
Griséofulvine	<i>Penicillium griseofulvium</i>
Kanamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Nystatine	<i>Streptomyces noursei</i>
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>

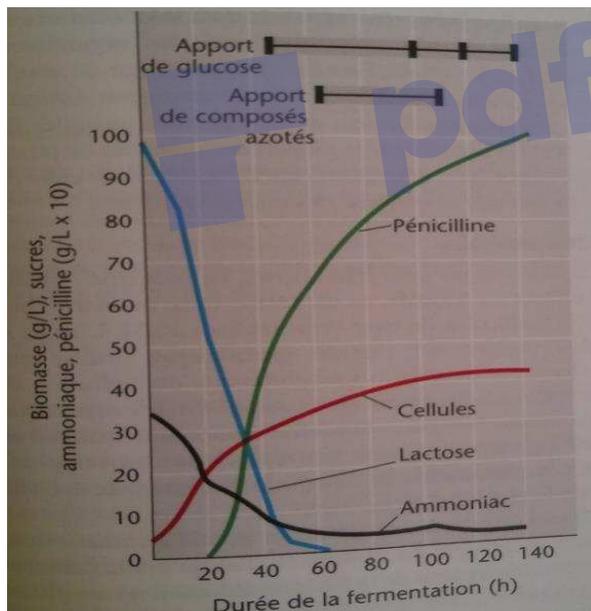
➤ *Production industrielle de pénicillines et tétracyclines*

Une fois que la structure d'un nouvel antibiotique a été caractérisée, que son efficacité et sa non toxicité ont été prouvées en expérimentation animale, ce qui peut prendre plusieurs années, il reste à effectuer les essais cliniques humains. Si ces derniers sont concluants, l'antibiotique est prêt pour la production commerciale.

➤ *Production d'antibiotiques à cycle B-lactame*

La pénicilline G est produite par *Penicillium chrysogenum* dans des fermenteurs de 40 000 à 200 000 litres. C'est un métabolite secondaire qui n'apparaît qu'une fois la source de carbone presque épuisée. En ajoutant du carbone et de l'azote au niveau adéquat, la production peut être poursuivie pendant plusieurs jours.

L'un des ingrédients majeurs des milieux de culture pour produire de la pénicilline est la liqueur de trempage de maïs, qui contient de l'azote et des facteurs de croissance. La source de carbone est le lactose, obtenu généralement à partir des sérums de fromagerie.



La production de pénicilline démarre quand les cellules entrent en phase stationnaire de croissance et lorsque carbone et azote sont épuisés. L'alimentation en nutriments permet de maintenir la production de la pénicilline à un niveau élevé.

Figure 18 : Cinétique de production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum*

Hormis la question de coût, des concentrations élevées en glucose réprimeraient la production de la pénicilline. Le glucose n'est donc ajouté quand le lactose devient limitant et que la biomasse est devenue importante afin d'obtenir un rendement maximal en pénicilline. La pénicilline est excrétée dans le milieu après élimination des cellules par filtration, on abaisse le pH pour faciliter son extraction dans un solvant organique. Après concentration dans le solvant,

l'antibiotique est ré-extrait dans une phase aqueuse basique, à nouveau concentré puis cristallisé.

➤ *Production des tétracyclines*

Streptomyces aureofaciens est le producteur de tetracycline.

Comme dans le cas de la production de la pénicilline, on utilise la liqueur de trempage de maïs pour la production à grande échelle et le saccharose à la place du lactose comme source de carbone. Le glucose est ici aussi un répresseur catabolique de la production d'antibiotique.

V-2-2. Les vitamines

Les vitamines sont utilisées comme complément alimentaire (humain et animal) et la vente de vitamines est au deuxième rang derrière celle des antibiotiques. La plupart des vitamines sont synthétisées par voie chimique. Toutefois, certaines, de structure complexe, sont produites pour un coût beaucoup moins important par biocatalyse : c'est le cas de la **vitamine B12** et de la riboflavine.

La vitamine B12 est exclusivement synthétisée par les microorganismes dans la nature. Chez l'homme, une carence forte en vitamine B12 est un des facteurs pouvant conduire à l'*anémie pernicieuse*, caractérisée par une faible production de globules rouges et des désordres du système nerveux. Les besoins des animaux en vitamine B12 sont satisfaits par ingestion de nourriture ou par absorption de la vitamine produite dans l'intestin de l'animal par des microorganismes intestinaux. Les plantes ne produisent pas et n'utilisent pas de vitamine B12.

Pour la production industrielle de vitamine, on utilise des souches des genres bactériens *Propionibacterium* et *Pseudomonas*. Il y a un atome de cobalt au centre de la vitamine B12, et les rendements en vitamine sont amplifiés par addition d'une petite quantité de cobalt au milieu de culture.

La riboflavine est apparentée aux coenzymes flaviniques FAD et FMN, qui jouent un rôle important dans les mécanismes oxydation-réduction de pratiquement tous les organismes. La riboflavine est synthétisée par de nombreuses bactéries, levures et moisissures. Le champignon *Ashbya gossypii* en produit naturellement de très grandes quantités (jusqu'à 7g/L !) et est utilisé dans la plupart des procédés de production.

Malgré ce bon rendement, la compétition est serrée entre procédé microbiologique et synthèse strictement chimique.

V-2-3. Les polysaccharides

Production spécifique par des microorganismes dont le polymère est extrait.

Peut nécessiter la culture en conditions spécifiques (induction de la synthèse par carence d'un élément, par culture anaérobie, en phase stationnaire...).

Xanthane, alginate, PHB polyhydroxybutyrate (dans les plastiques biodégradables), caraghénanes, et agar (algues rouges), cellulose, chitosane, dextrane, gellane, pullulane...

V-3 : Les enzymes

Sont les résultats de l'activité enzymatique des microorganismes. Mais il est parfois considéré à l'échelle industrielle que les enzymes sont des produits de fermentation. Elles sont exocellulaire. Un grand nombre de ces enzymes sont des hydrolases, elles sont souvent induites par le substrat (enzymes inductibles). (Exp. : β -galactosidase est induit par le lactose).

V-3-1. Protéases, amylases et sirops de fructose

Les enzymes sont produites commercialement à partir de champignons et de bactéries. Celles produites en masse sont les protéases bactériennes utilisées dans les détergents pour lessives, qui contiennent également des *amylases*, des *lipases*, des *réductases* et d'autres encore. Beaucoup de ces enzymes sont isolées de bactéries alcalinophiles, principalement des espèces du genre *Bacillus*, comme *Bacillus liqueniformis*.

Les amylases et les glucoamylases sont d'autres enzymes importantes commercialement, car utilisées dans la production de glucose à partir d'amidon. Le glucose ainsi produit peut-être converti par la *glucose isomérase* en fructose, qui a un pouvoir sucrant deux fois plus important que le glucose. Le *sirop de fructose*, obtenu à partir d'amidon de maïs, de blé ou de pomme de terre, à une importance majeure dans la production des boissons sucrées. On en produit dix million de tonnes par an.

V-3-2. Extrémozymes : des enzymes de procaryotes des environnements extrêmes

Certains procaryotes, appelés *hyperthermophiles*, croissent à des températures très élevées (figure 19b). Ceci n'est possible que parce qu'ils produisent des macromolécules stables à ces

températures, dont des enzymes. Le terme extrémozymes a été adapté aux enzymes fonctionnant dans des conditions extrêmes des températures ou de pH acides. Les microorganismes qui les produisent sont appelés des extrémophiles.

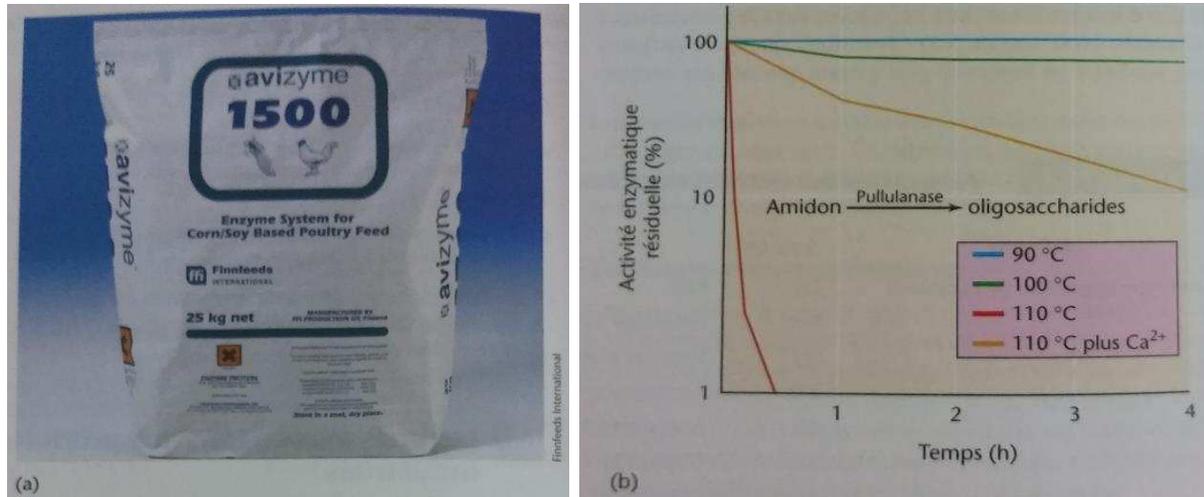


Figure 19 : Extrémozymes : enzymes fonctionnant dans des conditions extrêmes.

(a) Enzymes tolérant l'acidité. Ce mélange enzymatique est un additif alimentaire pour la volaille, destiné à digérer les fibres de l'aliment. (b) Enzymes thermostables : la pullulanase est extraite de *Pyrococcus woesei*, un hyper thermophile dont la température optimale de croissance est de 100°C. Le calcium améliore la stabilité à la chaleur de cette enzyme jusqu'à 110°C.

Comme beaucoup de processus chimiques fonctionnent mieux à température élevée, ces extrémozymes sont très utilisées en industrie et en recherche. C'est le cas des ADN polymérases *Taq* et *pfu*, utilisées en PCR (*polymérase chain réaction*) et des protéases, amylases, cellulases, pullulanases et xylanases thermostables dans le domaine des lessives. D'autres extrémozymes actives à faibles températures (provenant de psychrophiles), à fortes concentrations en sels (issues d'halophiles) ou à pH faible ou élevé (issues d'acidophiles ou alcalinophiles) sont connues et, pour certaines, commercialisées.

V-3-3. La production d'enzymes

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, en couche mince de milieu liquide ou de milieu semi-solide. Cette technique est encore utilisée pour quelques productions, en particulier d'enzymes d'origine fongique telle que les amylases d'*Aspergillus*, les protéases d'*Aspergillus* et de *Mucor* ou les pectinases de *Penicillium*. Mais

les contrôles de température, d'aération et d'humidité présentent des difficultés et, c'est pourquoi, les cultures submergées sont maintenant préférées aux cultures de surface. Les cultures en milieu liquide profond, agité, sont mieux adaptées aux différents contrôles par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination. De plus, elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation nécessaires pour le passage du fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel.

Les fermenteurs utilisés habituellement atteignent des volumes de 100 à 200 m³. Ils doivent être équipés d'un système d'agitation de puissance importante, capable d'agiter des milieux relativement visqueux puisqu'ils peuvent contenir jusqu'à 350g/L de matière sèche.

Les fermenteurs sont également équipés d'une couronne d'aération classique, la plupart des fermentations productrices d'enzymes présentant une forte demande en oxygène (figure 20).

Des équipements de mesure et de contrôle sur le fermenteur permettent de suivre et de réguler les paramètres de culture. Les contrôles s'exercent généralement sur le pH, la température, l'oxygène dissout, les mousses et l'évolution de la concentration en certains nutriments. De plus, la mesure de l'apparition de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers par le laboratoire de contrôle.

Des conditions aseptiques rigoureuses sont nécessaires en production d'enzymes, d'une part pour obtenir un bon rendement et, d'autre part, pour ne pas risquer la sécrétion de substances toxiques par des contaminants.

Il n'a pas encore été établi de modèle cinétique général de la synthèse des enzymes mais, la régulation de la formation de quelques enzymes a été étudiée. Quelques enzymes sont formées pendant la phase exponentielle de croissance mais la plupart apparaissent dans la phase post-exponentielle. Suivant les enzymes et les procédés, la fermentation dure de 30 à 150 heures.

La quantité de protéine-enzyme dans le milieu, en fin de fermentation représentent 1 à 5% de la matière sèche initiale, alors que la biomasse cellulaire peut atteindre de 2 à 10%.

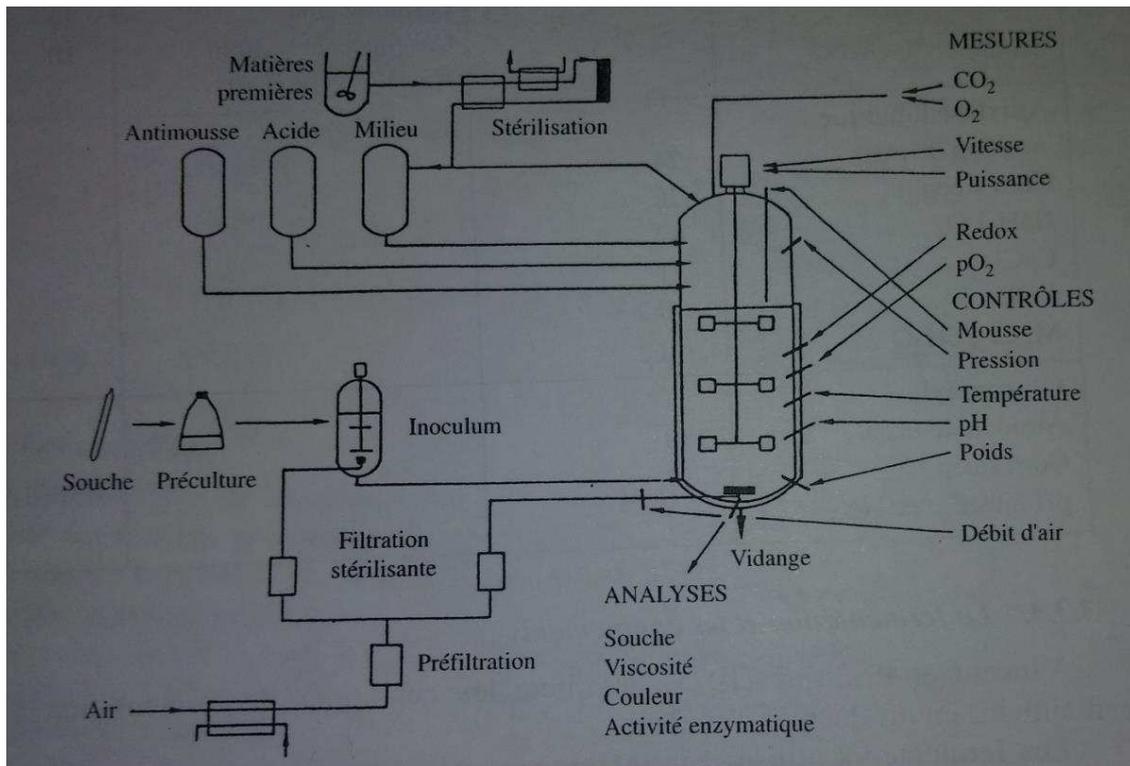


Figure 20 : Schéma d'une installation de fermentation en production d'enzyme

V-3-4. Extraction et purification

La fermentation terminée, les enzymes doivent être séparées des cellules et du milieu, et traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités.

Ces traitements sont des opérations unitaires simples telles que centrifugation, filtration, évaporation, précipitation, séchage... Les préparations enzymatiques peuvent être commercialisées sous différentes formes : liquides, concentrée, granulée, immobilisée, ...

Dans le cas des enzymes endo-cellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes. Après ce traitement, ces enzymes sont purifiées comme les enzymes cellulaires.

La (figure 21) représente cinq schémas possibles d'extraction et de purification conduisant à des préparations différentes :

A : enzyme exo-cellulaire conditionnée sous forme liquide concentrée ;

B : enzyme exo-cellulaire conditionnée sous forme de poudre ;

C : enzyme exo ou endo-cellulaire ayant subi une purification poussée, conditionnée sous forme lyophilisée ;

D : enzyme endo-cellulaire utilisée sous forme insoluble éventuellement après immobilisation.

Les formes liquides sont plus faciles à mettre en œuvre que les formes déshydratées mais ces dernières présentent généralement une meilleure stabilité à la conservation.

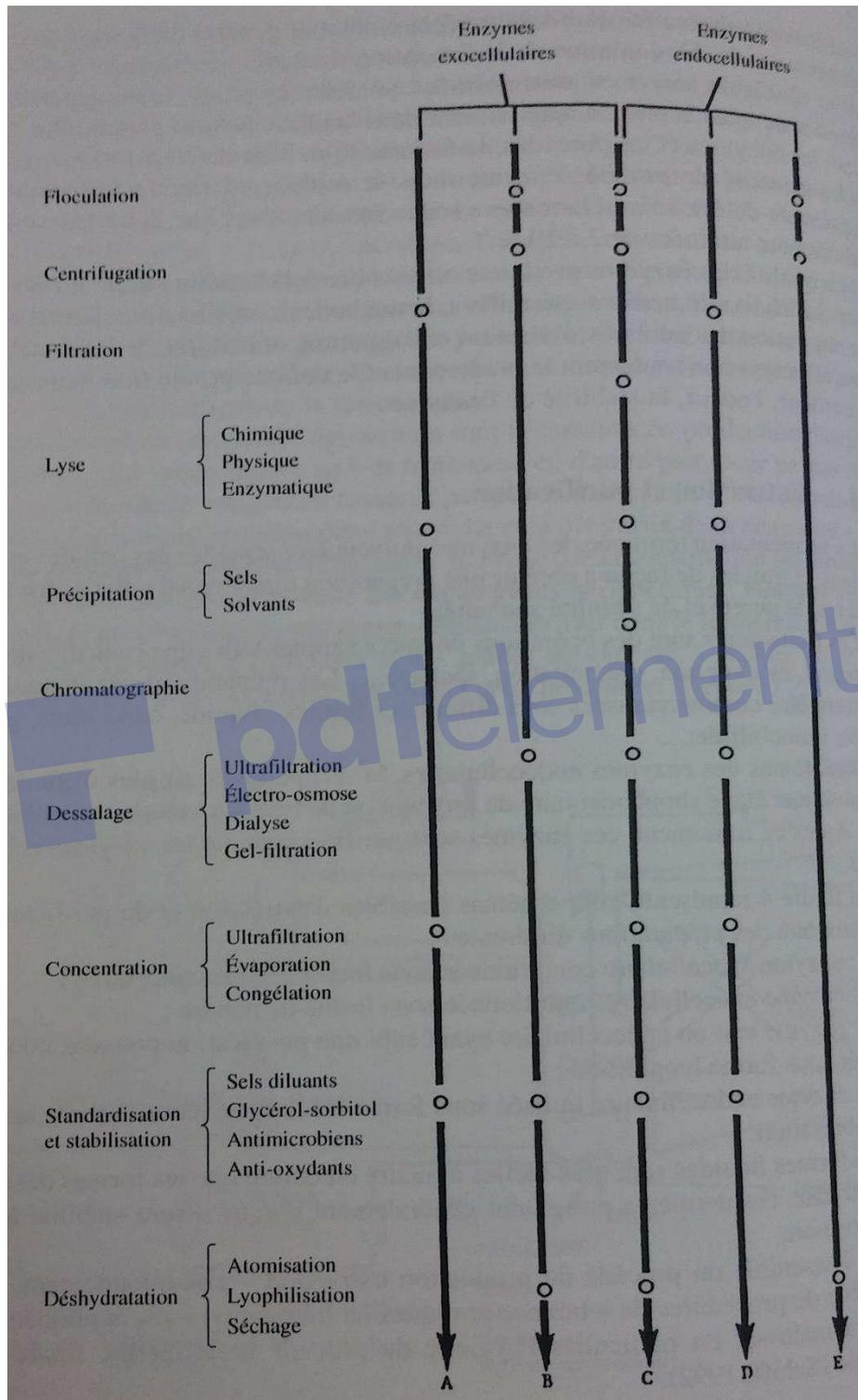


Figure 21 : Extraction et purification des enzymes

Sur l'ensemble du procédé de production extraction-conditionnement, un ensemble de procédures de « bonnes pratiques de fabrication » est appliqué de façon à maîtriser en particulier l'hygiène du procédé et la qualité finale de l'enzyme.



Références

Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J, Rapp BA, 2000. Wheeler DL GenBank; 28 (1): p. 15-18.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012. The *Actinobacteria*, Part A and B. Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig and William B. Whitman. Second Edition. Volume Five.

Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M., 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. In: Boone D.R & Castenholz R.W. (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag; 1.

Centre d'activités régionales pour la production propre (CAR/PP), 2003. Applications de la Biotechnologie dans l'industrie. E-08036 Barcelone (Espagne). Internet : <http://www.cema-sa.org>. Pp : 26-31.

Fox R.D., 1999. Spiruline, Technique pratique et promesse. Aix en provence: Edisud.

Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P, 1970. A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H.(Eds).G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.

Lechevalier M.P., De bievre C. and Lechevalier H.A., 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.

Madigan M. and Martinko J., 2007. Broc Biologie des microorganismes (11ème Edition) chap. 30 : pp 956-980.

Sabaou, 1988. Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat ES Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger. 92 p.

Scriban R., 1999. Biotechnologie. 5ème eddition. Paris.

Sguera S., 2008. *Spirulina platensis* et ses constituants. Intérêts nutritionnels et Activités thérapeutiques. Thèse doctorat en pharmacie; Nancy, France.

Sobal M. 2002. Physiologie de la croissance mycélienne de *Pleurotus ostreatus* et dégradation des polyphénols de la pulpe et des coques de café. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, 207 pages.

Strehaiano P., Salameh D., Maalouf M., 2013. Manuel de microbiologie industrielle : bases théoriques, exercices, manipulations de travaux pratiques. Vol 1, 226 P. Beyrouth : Faculté des sciences, université Saint-Joseph.

Zennouhi A.H., 2015. Cours de Microbiologie Industrielle. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès. Maroc.

