

Chapitre 1: Biotechnologie de la fermentation

Introduction : La biotechnologie

Depuis les années 50, le domaine de la biologie a beaucoup évolué. Grâce à la mise au point et à l'utilisation systématique de techniques comme la chromatographie, l'électrophorèse et les méthodes optiques, l'approche physico-chimique – le réductionnisme - s'est avérée particulièrement féconde. Ainsi a-t-on assisté à une explosion de connaissances concernant la structure et le fonctionnement de la cellule et du matériel biologique (enzymes, en particulier). Ainsi, il a été possible de justifier, d'expliquer, puis de rationaliser et donc d'améliorer des pratiques anciennes.

De plus, après 1973, année qui marque les débuts du génie génétique, il est devenu possible de re-programmer le génome des cellules, c'est à dire de créer ce qui sera appelé des organismes génétiquement modifiés (OGM). De tels organismes sont maintenant capables d'exprimer n'importe quelle séquence d'ADN.

De ce fait, ont été mises au point de nouvelles voies d'obtention de substances jusque là extraites de matériel biologique (insuline, hormone de croissance, interféron, interleukine ou autres). Les souhaits exprimés par certains, dans les années 20, de voir se mettre en place une biotechnologie, c'est à dire un mode de production plus efficace et fonctionnant dans des conditions plus douces, c'est à dire plus économes en énergie et moins polluantes que la production industrielle traditionnelle, peuvent alors être sérieusement envisagés comme réalité industrielle, économique et sociale.

Sous le vocable de "biotechnologie" sont rassemblées des techniques spécifiques "informées" par les progrès de la microbiologie, de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la génétique, du génie chimique, de l'informatique... Celles-ci ont en commun le fait qu'elles sont partie prenante dans un "procédé biotechnologique", c'est à dire la production à grande échelle d'un "produit d'intérêt" qui est susceptible d'être commercialisé.

1. Les biotechnologies :

Définitions

Bien évidemment, nombreuses sont les définitions qui sont données (et qui ont été données) des biotechnologies. Nous nous limiterons aux définitions modernes, schématiquement à celles qui correspondent aux biotechnologies depuis le début du XXe siècle. Le terme "biotechnologie" a été imaginé en 1913 par un ingénieur agricole hongrois, **Karl Ereky**, qui voulait transformer son pays natal, la Hongrie, en riche contrée exportatrice de produits agricoles à l'image du Danemark¹. Un des éléments de cette transformation était, selon lui, l'avènement d'un nouveau mode de production, un âge non plus basé sur le travail du fer, mais sur la biochimie et sur les transformations des diverses matières premières qu'elle permet. Cette idée restera très présente dans la vision allemande traditionnelle des biotechnologies.

Cette première définition amène à une remarque préliminaire: chacune de ces définitions, comme tout acte de nomination, renvoie à un contexte scientifique, institutionnel, politique, économique ou éthique particulier. Il est important de situer cet acte dans son contexte. Celui ci nous permettra de justifier le caractère plus ou moins restrictif des diverses définitions des biotechnologies.

1.1. "Mise en œuvre de matériel biologique pour une production de biens et de services" Cette définition a été donnée par l'OCDE au milieu des années 1980. Il s'agit de la période des premiers succès du génie génétique et de la prise de conscience des possibilités nouvelles offertes par cette nouvelle possibilité d'obtention de protéines jusque là obtenue par voie extractive. C'est le moment de la prise de conscience par les penseurs de l'économie mondiale de l'émergence d'un nouveau domaine. Il s'agit d'une définition générale prospective, centrée sur l'économie, proposée par une organisation internationale qui cherche à faire à la fois une synthèse de l'existant et à anticiper. Cette définition inclut tant des procédés nouveaux que l'amélioration de procédés existants Par production de biens, on entend la production de "choses" commercialisables, en fait de produits tels que médicaments, aliments et additifs alimentaires, produits d'usage courant.

1.2. "Utilisation des techniques de l'ADN recombinant" Cette définition est une définition qui est d'origine américaine. Elle est issue des espoirs suscités par le clonage de l'insuline, de

l'hormone de croissance, de l'interleukine et a présidé, à la fin des années 1970 et au début des années 1980 à la création aux USA de nombreuses start up, parmi celles-ci des sociétés comme Genentec

Cela met l'accent sur l'ADN et sur l'importance des techniques de transformation et d'amplification de cet ADN au sein de systèmes cellulaires procaryotes ou eucaryotes. Les autres aspects (cultures cellulaires, fermentation, développement et production industrielle) sont considérés, de fait, comme ne relevant pas de cette radicale nouveauté technique, c'est-à-dire comme secondaires. Témoins de cette évolution américaine, à savoir de cet accent mis sur l'ADN recombinant,

1.3. "Utilisation des techniques de fermentation et dérivées" Cette définition est une définition d'origine allemande, c'est-à-dire européenne. Elle est dans la tradition de l'industrie chimique de ce pays et de l'Europe centrale. Cette définition dérive d'une idée ancienne, qui est celle d'un type de production par une technologie différente de celle utilisée jusqu'à maintenant, à savoir plus propre et moins coûteuse en énergie. Il s'agit d'un vieux rêve émis par des industriels visionnaires dans les années 20 .

1.4. "Utilisation contrôlée à grande échelle de matériel biologique éventuellement génétiquement modifié" Cette définition, utilisée dans un contexte, par exemple, pédagogique, précise les divers éléments de ce que l'on peut actuellement appeler **biotechnologie** :

- l'utilisation de matériel biologique comme catalyseur, c'est-à-dire, pour employer le vocabulaire chimique, comme agent facilitant la transformation de substrats en produits;
- une production à grande échelle, c'est-à-dire l'obtention de produits obtenus en grande quantité qui seront, dans notre société marchande, commercialisés ; cette production regroupant celle de produits nouveaux (interleukine, interféron, tPA,) ou bien l'amélioration de celle de produits déjà obtenus par d'autres moyens ;
- le contrôle de cette transformation, c'est-à-dire son suivi quantitatif afin de pouvoir intervenir sur le procédé en cas de besoin ; il s'agit là, contrairement à ce qui pouvait se pratiquer antérieurement, d'un processus maîtrisé ;
- la modification génétique du matériel biologique utilisé, ceci afin d'en améliorer les propriétés. Compte tenu de nos objectifs et de notre situation institutionnelle de pédagogues, c'est cette définition qui nous semble plus intéressante et la plus

fonctionnelle. C'est elle qui nous servira de guide dans ce qui suit.

1.5. "Génomique et protéomique" Avec la possibilité du séquençage, puis avec son développement, les succès rencontrés et les ouvertures que la connaissance du génome promet, une nouvelle acception vient d'apparaître aux USA - leader en cette matière -, centrée sur l'étude du génome, de celle des protéines exprimées dans une cellule à un stade déterminé et celles des ORF3. Il s'agit d'un champ de recherche qui est en amont de tous ceux envisagés précédemment. C'est à partir des résultats obtenus (d'abord, identification d'une séquence d'ADN donnée, ensuite "amélioration" de cette séquence) que pourra se mettre en route le processus figurant dans la définition 1.4.

En conclusion, on voit que, pour ne prendre que les dernières décennies, plusieurs acceptions du terme "biotechnologie" ont émergé. Ces diverses acceptions sont liées, entre autres, aux traditions industrielles et aux développements des connaissances (et surtout, en amont, à celui des techniques) mais, on peut penser que ce sont maintenant les perspectives économiques qui ont un poids de plus en plus important avec cette définition donnant les biotechnologies comme "la manière de faire de l'argent avec la biologie". Ainsi, après avoir reconnu les possibilités ouvertes par la mise en culture de cellules recombinantes, les perspectives ouvertes par le séquençage des génomes est en train de faire émerger, à travers la génomique et les disciplines connexes, une acception nouvelle qui se situe en amont des précédentes. Dans la mesure où la génomique en est encore à ses balbutiements, **la définition que nous retiendrons fait la synthèse des divers aspects maintenant classiques : "utilisation contrôlée à grande échelle de matériel biologique éventuellement génétiquement modifié"**.

Chapitre 2 *Isolement, criblage et amélioration des microorganismes industriels*

Les microorganismes qui produisent un composé dans leurs conditions naturelles, sont susceptibles de le produire en quantité accrues dans des conditions de laboratoire. Aussi, une croissance non optimale en laboratoire peut également conduire à l'expression de l'information génétique spécifique, et à la production accrue de certains métabolites tels que les antibiotiques.

La sélection et l'emploi des microorganismes en microbiologie industrielle et en biotechnologie requièrent une bonne connaissance de la culture et de la manipulation des microorganismes ainsi que leurs interactions avec les autres microorganismes. Avant tout processus en microbiologie industrielle, il est nécessaire d'abord d'identifier ou de créer un microorganisme qui effectue le processus désiré de la façon la plus efficace. Pour obtenir ces microorganismes, plusieurs approches sont disponibles qui vont de l'isolement du microorganisme à partir de l'environnement, jusqu'aux techniques moléculaires sophistiquées pour modifier un microorganisme déjà existant.

1-Isoler les microorganismes industriels

Dans le but d'isoler des microorganismes possédant les caractéristiques voulues, des échantillons naturels sont analysés. Ainsi, des cultures de matières naturelles (sol, eau, etc.) provenant de toutes les parties du monde ont été analysées. Dans la plupart des milieux seulement une partie des microorganismes ont été isolés et cultivés. Ainsi, l'effort se poursuit à travers le monde pour trouver de nouveaux microorganismes même dans les milieux qui ont été explorés depuis des décennies.

1.1-Isolement et sélection des souches microbiennes productrices d'enzymes

Les microorganismes qui sont capables de produire des enzymes de dégradation de certains composés sont généralement localisés où ces substances sont abondantes. Par exemple, des microorganismes sécrétant des cellulases sont nombreux dans les sols des forêts. Les méthodes d'isolement sont des méthodes classiques avec des milieux sélectifs. Dans le milieu sélectif idéal, le substrat de l'enzyme est la seule source de l'un des éléments vitaux. Par exemple, L'amidon comme seule source de carbone pour isoler les microorganismes possédant une amylase. Les souches isolées pour être définitivement retenues doivent présenter un certain nombre de caractéristiques : - Se développer sur un milieu simple bon marché - Produire le moins possible de métabolites secondaires, comme les antibiotiques

- Excréter l'enzyme de façon à ce que celle-ci soit facilement séparée et purifiée et ne pas conduire à différents polluants
- Ne pas être pathogène ou produire des composés toxiques
- Si la préparation enzymatique va entrer en contact avec les aliments, la souche doit avoir le caractère d'alimentarité, c'est-à-dire faire partie des souches G.R.A.S. (*Generally Recognizer As Safe*).

La capacité de production de la souche doit être préservée et tout risque de contamination doit être éliminé. Pour cela, il faut éviter un trop grand nombre de cultures successives. Il est préférable d'ensemencer un flacon de milieu gélosé directement à partir de la souche lyophilisée puis, à partir de cette culture, d'ensemencer un seul fermenteur qui servira lui-même d'inoculum pour le fermenteur industriel. Le volume de l'inoculum représente généralement de 3 à 10 % du volume du milieu de production.

1.2-Isolement des microorganismes producteurs d'antibiotiques

Le sol est devenu le principal réservoir de microorganismes producteurs d'antibiotiques. La grande majorité de souches productrices d'antibiotiques a été isolée du sol. Cependant, d'autres niches écologiques contiennent des microorganismes potentiellement producteurs de métabolites secondaires : matériaux en décomposition, des sédiments, des excréments, des eaux marines ou douce, des lichens, des mousses et plantes. L'un des objectifs d'isolement est la recherche de nouvelles souches avec l'espoir qu'elles produisent de nouveaux métabolites secondaires. Les actinomycètes et surtout les *Streptomyces* sont de meilleurs producteurs d'antibiotiques. Cependant, les *Streptomyces* ont été très exploités. Il faut continuer à isoler des espèces de ce genre mais en essayant de trouver des espèces rares.

1.2.1-Isolement des souches d'actinomycètes

Certaines souches détectées par observation directes ne se développent pas en condition de laboratoire. Le choix du milieu est un point critique, trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide. Pour se débarrasser de ces germes envahisseurs et sélectionner d'autres espèces, un traitement des échantillons et le développement de milieux appropriés sont indispensables. Il n'existe pas une méthode universelle pour l'isolement de tous les types d'actinomycètes.

-Pour certain groupes d'actinomycètes l'isolement est parfois aisé : les actinomycètes acidophiles sont les seuls capables de se développer à pH 4,5. Il existe également des germes basophiles ou halophiles qui seront isolés sur des milieux appropriés par exemple à 4,5%

NaCl. Les actinomycètes carboxytrophes, capables d'utiliser le monoxyde de carbone comme seule source de carbone et d'énergie, peuvent être isolés en utilisant un milieu minimal en présence de monoxyde de carbone, qui agit comme agent sélectif idéal pour sa haute toxicité pour les autres microorganismes.

-Les contaminations par les champignons sont supprimées par l'addition d'antifongiques tels que l'actidione et la nystatine (50 µ/ml). Cependant les bactéries sont éliminées par les antibactériens tels que le chloramphénicol, la kanamycine et la tétracycline. -Dans certains cas l'objectif est de trouver des microorganismes producteurs d'une famille particulière d'antibiotiques, le procédé est basé sur le fait qu'un microorganisme producteur d'un antibiotique est plus résistant que les autres à cet antibiotique. Cette stratégie a été utilisée avec succès dans le cas des glycopeptides et des aminosides.

1.2.2-L'isolement des champignons

L'isolement des champignons est devenu plus facile après la découverte d'agents antifongiques spécifiques, ainsi des milieux spécifiques pour *Phytophthora* et *Fusarium* ont été créés. Pour l'isolement des champignons producteurs d'antibiotiques, l'addition d'agents surfactants ou de cyclosporine limite la taille des espèces à croissance rapide. Ainsi, la formation de colonies à dimension réduite permet d'obtenir une population plus variées et facilite la mise en culture pure.

2-Criblage de souches pour la recherche de nouveau antibiotiques

- Parmi les microorganismes du sol, la production de métabolites antimicrobiens est une propriété banale. Mais la question qui se pose aujourd'hui n'est plus savoir si l'on peut isoler des souches possédant une activité antimicrobienne mais comment faire pour découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques humaines.

- Si les nouveaux antibiotiques naturels ne sont pas directement utilisables en clinique, ils peuvent être utilisés comme structure de base dans la synthèse chimique. Par exemple en 1984, 60 molécules semi synthétiques à utilisation clinique en médecine humaine contre 11 molécules naturelles seulement. -Selon les méthodes de criblage et les objectifs, la

découverte d'un antibiotique nécessite l'examen de quelques centaines à plusieurs milliers de souches :

- Pour la recherche de nouveaux glycopeptides une souche positive a été détectée parmi 320 microorganismes testés.
- Les inavermectines ont été trouvés après l'examen *in vitro* de 2000 cultures *par contre, le criblage de plus de 20000 cultures était nécessaire pour la découverte de nouveaux aminosides.
- Plus d'un million de bactéries ont été analysées pour la découverte de nouveaux types de bêta-lactame.

Stratégie de criblage :

elle met en œuvre 3 étapes :

- Criblage primaire : consiste à tester les souches cultivées sur milieux solides en utilisant la technique des cylindres d'agar ;
- Criblage secondaire : a pour but la production en milieu liquide ;
- Criblage tertiaire : constitue une étape de caractérisation précoce des métabolites potentiellement originaux.

2.1-Recherche de nouveaux antibiotiques :

le critère indispensable pour la recherche de toute molécule nouvelle est le développement d'un système appelé tri, criblage ou *screening*. Que le criblage soit réalisé pour des inhibiteurs, de nouvelles enzymes ou des acides organiques ou aminés, un dosage efficace est indispensable. Une des procédures possibles pour la recherche d'antibiotiques est la suivante :

• Identification d'une source de producteurs potentiels.

dans la recherche d'antibiotiques, toutes les expériences passées indiquent que les actinomycètes constituent les microorganismes les plus intéressants à trier. Les meilleures sources pour en récolter sont les sols, composts ou boues à pH neutre ou légèrement alcalin.

• Isolement des organismes : l'isolement est généralement réalisé en étalant des dilutions convenables de sol sur la surface de boîtes de Pétri contenant de la caséine hydrolysée (origine animale), du soja (origine végétale) et des extraits de levures (origine microbienne). Le contenu en sucre doit être maintenu bas pour limiter la croissance rapide des *Pseudomonas*

et des *Bacillus* par rapport à la croissance lente des actinomycètes. Les colonies compactes d'actinomycètes sont apparentes et facilement identifiables pour un technicien expérimenté.

• **Le test préliminaire sur boîte** : la capacité des microorganismes isolés à produire une substance antibiotique est recherchée en utilisant un test sur boîte d'agar. *Streptomyces* et d'autres actinomycètes forment des colonies compactes lorsqu'elles sont « striées » sur une boîte. Après plusieurs jours, les organismes tests sont étalés à la perpendiculaire de l'actinomycète. Des bactéries Gram-positives et Gram-négatives sont généralement utilisées pour réaliser ce test. Une mycobactérie peut être utilisée pour sélectionner des antibiotiques antituberculeux et une levure pour les antifongiques. Si la zone d'inhibition est significative pour au moins un des quatre organismes testés, l'actinomycète est retenu pour l'étape suivante.

• **Essai pour une nouvelle activité** : compte tenu du vaste nombre d'antibiotiques connus, la très grande majorité des activités découvertes sont dues à un antibiotique déjà décrit. Il est ainsi primordial que les producteurs d'antibiotiques déjà décrits soient éliminés rapidement du tri.

• **Criblage avancé de cultures** :

à cette étape, si l'activité apparaît nouvelle, le microorganisme isolé est soumis à une série de procédures pour augmenter la production.

L'expérience nous indique que les microorganismes nouvellement isolés produisent seulement quelques microgrammes d'antibiotique par millilitre, et synthétisent généralement une série d'antimicrobiens apparentée de sorte qu'aucun d'entre eux n'est produit en quantité significative. Des paramètres variés sont testés pour leurs effets positifs sur la production d'antibiotique : pH, aération, substrat de croissance, durée de fermentation, et d'autres conditions. Ces efforts pour augmenter la quantité d'antibiotique produit sont suivis par des techniques de dosage pour s'assurer que l'activité antimicrobienne détectée est identique à celle de l'isolat original. Des résultats favorables vont conduire à la production dans des fermenteurs à l'échelle du laboratoire. Des chimistes sont alors mis à contribution pour identifier la substance antimicrobienne. Si le composé apparaît toujours nouveau, des tests sur animaux sont réalisés.

2.2-Tests sur animaux :

des tests sur des souris sont réalisés pour déterminer si le composé est toxique ou s'il est détruit par les enzymes de mammifères. De tels tests déterminent si l'antimicrobien est effectif *in vivo*. Si tout se déroule bien, l'antibiotique est testé sur des

animaux supérieurs puis sur des humains avant, en de rares cas, de se retrouver en pharmacie. Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de leur spectre antimicrobien, leur mécanisme d'action, la souche productrice, la voie de biosynthèse ou la structure chimique.

3-L'amélioration des microorganismes industriels

Quand une souche est isolée pour la première fois d'un environnement ou sélectionnée à partir d'un stock d'une collection de culture, ce producteur potentiel de produits d'intérêt industriel n'est pas très différent des espèces proches. Cependant, l'amélioration rigoureuse des souches à partir de la culture originale est nécessaire avant une exploitation commerciale rentable du produit synthétisé. Les microorganismes industriels utilisés pour la synthèse des produits commerciaux sont des spécialistes hautement sélectionnés qui ne survivraient pas probablement pas dans des conditions autres que les conditions de laboratoires. Choisis pour leur stabilité génétique au cours des processus de fermentation et leur efficacité de production, ils présentent une croissance rapide et produisent des molécules d'intérêt dans une période de temps relativement courte. De telles souches ne doivent généralement pas être nuisibles à l'homme ni à l'environnement.

Chapitre 3: Milieux de cultures dans les procédés industriels

Le milieu de culture industriel approprié doit : - favoriser la croissance de la souche à toutes les étapes de la production; - assure une production maximale : c-à-d la quantité de produit formé pendant la phase de production est plus ou moins proportionnelle à la biomasse formée pendant la phase de croissance (trophophase).

1-Le choix des matières premières

Le milieu de culture d'un microorganisme est critique parcequ'il peut influencer la compétitivité économique d'un procédé particulier. Fréquemment, des matières brutes peu coûteuses servent de sources de carbones, d'azote, de phosphore et de facteurs de croissance. C'est le cas des hydrolysats végétaux bruts. Les sous produits de brasseries sont aussi souvent employés car il ne coûtent pas cher et sont disponibles en quantité. Il ya d'autres sources de carbone, comme les melasses et le petit-lait obtenu lors de la fabrication du fromage.

-Les mélasses de betteraves et de canne à sucre :

riches en saccharose, permettent d'obtenir des biomasses protéiques ou des levures pour la panification.

-Le lactosérum : est un excellent milieu de culture permettant le développement des levures utilisant le lactose

-Les liqueurs sulfuriques : résidus de la fabrication de la pâte à papier, riche en pentose ainsi que les hydrolysats cellulosiques provenant de déchets forestiers.

-L'amidon : est utilisé comme matière première pour la production industrielle des protéines. Les cultures en fermenteurs utilisant des matières premières ne garantissent pas toujours une production maximale, leurs critères de choix sont :

- **Le prix d'acquisition et de stockage** : certains prix sont instables et dépendent des marchés internationaux, surtout les protéines (farine de soja...) qui peuvent varier au double. De 15 à 25% sont représentés par le milieu de culture.
- Leur disponibilité et la constance de leur qualité : dans le cas de qualité inconstante de matières premières, la même souche cultivée de la même manière peut donner des variations de production de plus de 20%.
- Leur stabilité au stockage.
- Le coût de stérilisation qui peut varier en fonction de la viscosité du milieu (présence d'amidon)
- Leurs caractéristiques rhéologiques et tensio-actives : une viscosité élevée est défavorable à l'aération et l'homogénéisation du milieu, et demande une plus forte

énergie d'agitation. La présence de mousses entraîne des débordements de la cuve et la consommation excessive de produits anti-mousses.

- Ces matières doivent être exemptes de substances toxiques
- Utilisation des procédés d'extractions aussi simples que possible.

2-Les éléments du milieu

2.1-L'eau

Les fermentations industrielles utilisent en général des eaux provenant des nappes phréatiques, ces eaux ne sont jamais pures et leur qualité est adaptée à chaque type de fermentation. L'eau adoucie, déminéralisée, déionisée sont obtenues par des techniques de filtrations sur membranes et la résine échangeuse d'ions. La qualité d'eau est déterminée par les traces de matières qu'elle contient. La qualité d'eau est un élément important pour obtenir des cultures optimales et reproductibles.

2.2-Les sources de carbone et d'énergie

On trouve dans cette catégorie, les oses, les polyholosides, les acides gras, les triglycérides.

2.2.1-Les oses et leurs dérivés

Le glucose est une excellente source de carbone très répondeuse pour stimuler la croissance microbienne. Mais le glucose peut avoir des effets indésirables sur la production de métabolites secondaires. Cet effet peut être réduit par :

- ❖ L'addition du glucose pendant la phase de croissance (technique d'alimentation en continue ou *Fed batch*), pour favoriser au maximum la croissance au début de la fermentation et ne fournir pendant la phase de production que des quantités minimales non inhibitrices.
- ❖ L'emploi de source lentement métabolisées, comme par exemple le lactose, pour la production de la pénicilline. Le lactose est d'abord hydrolysé en glucose et galactose, le glucose est hydrolysé en premier puis le galactose sera converti pour suivre la même voie que le glucose. Donc la concentration en glucose reste faible et n'inhibe pas la synthèse.
- ❖ D'autres sucres à consommation lente sont le saccharose et les polymères de glucose hydrolysables par la cellule tels que dextrines, amidon, etc. Les mélasses de sucres sont souvent préférées au saccharose à cause de leur prix moins élevé. Elles sont riches en saccharose mais elles contiennent aussi d'autres métabolites.

2.2.2-Les acides gras et leurs dérivés

Ils se trouvent dans les huiles sous forme de triglycérides. Les huiles les plus utilisées sont les huiles de soja, d'arachide, de maïs et de colza. Les acides gras peuvent remplir des fonctions multiples :

- Ils peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie.
- Ils exercent des actions physico-chimiques liées à leur propriété tensio-actives : formation d'émulsion, encapsulage de matériaux hydrophobes, réduction des mousses, etc.

2.3-Les sources d'azotes

Le microorganisme est normalement capable de synthétiser toutes ces molécules azotées à partir de l'ion (NH_4^+), cette synthèse demande de l'énergie et du temps. Il est possible que la souche ayant subi plusieurs traitements ait perdu quelques capacités prototrophiques. Dans les milieux synthétiques l'ion ammonium est apporté sous forme de chlorure d'ammonium, dans les cultures industrielles par contre on utilise des sources d'azotes naturelles comme les farines de soja ou d'arachide. Ces farines de soja sont riches en protéines et apportent en même temps des acides nucléiques, des vitamines, des oligo-éléments, des lipides, des sucres, du soufre et du phosphate.

NB : en plus de son rôle de fournisseur d'azote, l'ion ammonium a la capacité de réguler certaines étapes qui participent à la production d'antibiotiques. Il est important de maîtriser la concentration de l'ion ammonium dans le milieu de culture.

2.4-Les sels minéraux :

les rôles joués par les sels minéraux sont très divers :

- éléments constitutifs des antibiotiques (P, S, Cl...)
- éléments constitutifs de la biomasse (Mg, P, Cl, Ca, Fe,..)
- responsable de la pression osmotique (NaCl, KCl,...)
- modificateur de pH (NaH_2PO_4 , CaCO_3 ,...)
- intermédiaire d'oxydo-réduction (Cu^{++} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$)
- agent de complexation et de précipitation (SO_4^{-2} , HPO_4^{-2} , CO_3^{-2} ,...) -catalyseurs de réaction (Mg^{+2} , Mn^{+2} , CO^{+2} , $\text{Fe}^{+2/+3}$, Zn^{+2} , Mo^{++}).

2.5-Additifs

Le terme additif désigne les produits qui stimulent la synthèse par exp : les antibiotiques.

- **Les précurseurs** : c'est des molécules intermédiaires qui servent de substrats de départ aux réactions suivantes, au cours de la biosynthèse des antibiotiques par exemple.
 - Dans une production de pénicilline, l'acide phénylacétique est le précurseur.
 - La cystéine est un précurseur dans la synthèse de céphalosporines.
- **Les régulateurs de biosynthèse** : la biosynthèse des molécules peuvent être régulées par des activateurs, des inducteurs ou répresseurs. Par exemple le glutamate stimule la production de pénicillines.
- **Autres additifs** : il existe d'autres additifs qui agissent par exemple sur la perméabilité de la paroi ou qui complexe les molécules inhibitrices.

2.6-Les gaz dissous

Parmi les gaz dissous qui intervient dans le métabolisme des microorganismes producteurs de molécules, le seul important est l'oxygène. Dans les cultures du laboratoire l'oxygène est disponible à partir de l'air ambiant mais dans le fermenteur à partir de l'air comprimé et stériliser par filtration. La difficulté consiste à le dissoudre rapidement pour couvrir les besoins du microorganisme qui sont souvent élevés, surtout en période de croissance logarithmique. Le manque d'oxygène provoque non seulement la chute de croissance mais provoque aussi des modifications du métabolisme, qui peuvent être néfastes à la production. La capacité d'oxygénation d'un fermenteur est une caractéristique essentielle

3-L'élaboration du milieu

La formulation d'un milieu optimal est une tâche complexe parce que les facteurs influents sont nombreux. L'optimisation se fait d'abord au laboratoire ensuite à des échelles plus grandes, où elle peut s'effectuer avec des méthodes de planification expérimentale permettent d'analyser simultanément plusieurs facteurs et de déterminer la composition optimale.

4-Stérilisation

Un milieu doit être débarrassé de la présence de tout microorganisme avant d'êtreensemencé par la souche productrice. Le traitement thermique est le moyen le plus utilisé pour stériliser le milieu, il présente l'inconvénient d'altérer et de modifier les qualités du milieu à cause de :

- dégradation de polymères tels que : protéines, acide nucléiques -dégradation des vitamines et d'acide aminés comme le tryptophane et l'asparagine -formation de produits de dégradation toxiques ou inhibiteurs de croissance comme la dégradation des sucres et de la vitamine C en furfural et hydroxyfurfural.

- Réaction de Maillard entre sucre et protéine.

-Complexation d'ions métalliques telle que la précipitation de phosphore, de magnésium et de calcium.

Chapitre 3 : *Procédés des fermentations industrielles*

Le terme **fermentation** se réfère à la production à grande échelle de molécules biologiques dans des fermenteurs. Les fermentations se différencient en fermentation continue et discontinu. Dans la fermentation discontinu, les microorganismes sont cultivés dans une cuve (ou fermenteur) souvent de grand volume, pour récolter ou extraire les produits formés après une période de temps déterminé. Ces fermenteurs appartiennent au groupe des **bioréacteurs** : enceinte permettent la culture de tous type de cellules (animales, végétales, microorganismes), avec des paramètres physico-chimiques de cultures contrôlés et pilotés (pH, température, agitation, substrats, produits, etc.).

1-Les fermenteurs

Enceintes hermétiquement close, les fermenteurs doivent permettent une stérilisation facile et le maintien de l'asepsie pendant toute la durée de la culture. Ils doivent résister aux vibrations (lors de l'agitation), aux surpressions et à la corrosion. En général, le volume total ne représente que 4/5 du volume total de la cuve. Pour les petits volumes inférieurs à 10 litres la cuve est en général fabriquée en verre. Pour les volumes supérieurs, ce sont des enceintes en métal inoxydable avec des hublots permettent un contrôle visuel de la culture. Selon le mode d'agitation Il existe deux types de fermenteurs.

1.1-Fermenteur à agitation mécanique :

c'est le modèle le plus employé, parce que c'est le plus simple. Le fermenteur à agitation mécanique existe en volumes allant d'un litre à 500.000 litres, sa conception tient compte de toutes les tâches qui doivent être réalisées.

-Le conteneur : il doit pouvoir contenir le volume désiré, résister aux vibrations résultant de l'agitation, et résister aux surpressions de gaz lors de la stérilisation

-Le stérilisateur : avant l'ensemencement de la souche productrice le milieu doit être stérilisé.

Pour les petits bioréacteurs, la stérilisation de l'ensemble (cuve + milieu) peut être assurée par autoclavage sous pression 120-125° C. Les fermenteurs plus importants pourront être constitués d'une double enveloppe permettant une circulation de vapeur autour du corps ou être pourvus d'une simple résistance métallique plongeant dans le milieu (une tyndallisation

est réalisée pour éviter la détérioration du milieu). Le milieu peut être aussi stérilisé par injection directe de vapeurs sous forme de pression par le système d'aération. Toutes les sorties de prélèvement et les entrées (substrats, antimousse, inoculum, aération, bases ou acides, etc.) doivent être stérilisables et ne pas comporter d'espaces morts.

-L'aérateur : le fermenteur doit posséder un système d'aération qui injecte de l'air dans le milieu en formant des bulles qui montent à la surface. La dissolution de l'oxygène est aidée par le système d'agitation de la cuve.

-Homogénéisateur : le système d'agitation doit assurer le brassage du liquide en favorisant la dissolution de l'oxygène de l'air et les échanges de températures, il existe nombreux types d'agitation :

Agitateur de type radial : turbine à pales droites, turbines à pales incurvées (**Figure 1**)

Agitateur de type axial : hélice type marine, hélice à grande pale mince.

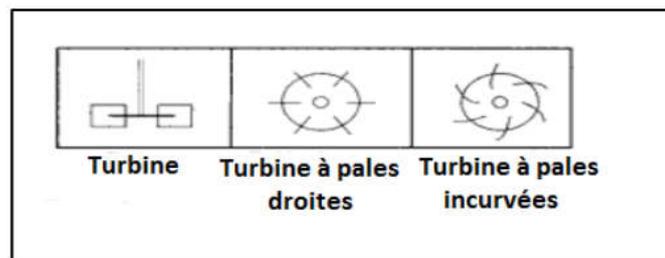


Figure 1: système d'agitation de type radiale

1.2-Les fermenteurs à agitation d'air :

l'injection d'air peut servir à agiter le milieu soit par effet siphon, soit par la force d'injection, sans autre dispositif mécanique.

-Les fermenteurs à jet d'air : utilisant des pompes centrifuges spéciales qui propulsent un mélange air-milieu à haute vitesse dans le réservoir principal, ce qui assure agitation et aération. Des essais pilotes avec des moisissures et des actinomycètes ont montré une capacité d'oxygénation de 150 mMoles d'O₂ par litre et par heure, contre 30 à 50 pour les fermenteurs à agitation mécanique.

-Les fermenteurs à effet siphon : l'effet siphon est obtenu par la diminution de densité provoquée par la présence de bulles d'air. Dans le fermenteur on provoque un effet de cheminé qui favorise la dispersion des bulles à l'aide de chicane.

1.3-Les fermenteurs à boucles : le principe est de faire circuler le milieu dans un circuit fermé soit par adjonction d'un tube latéral (pompage par le bas et réinjection par le haut), soit par une réalisation entièrement tubulaire.

2-Les critères de choix d'un procédé de fermentation

Il existe non seulement différents types de fermenteurs mais aussi différents procédés de fermentation selon que l'on travaille en milieu solide, en milieu liquide ou avec les systèmes immobilisés. Les caractéristiques de la souche productrice, le milieu utilisé et certaines considérations économiques déterminent le type de fermenteur idéal pour une production optimale. Les critères de choix sont :

- **La demande en oxygène du microorganisme:** le système doit être capable de satisfaire la consommation de la biomasse, certains microorganismes sont exigeants (*Bacillus*);
- **La fragilité du microorganisme :** beaucoup de fermenteurs sont équipés d'une agitation mécanique pour la mise en solution de l'oxygène et l'homogénéisation, si l'agitation est trop importante elle peut désintégrer les cellules. Le choix de l'agitation doit tenir compte du type de biomasse recherchée : cellules séparées ou agglomérées en flock ou pellets;
- **Les propriétés hydrauliques du milieu :** une mousse plus importante lors de l'injection d'air provoque des problèmes, la mousse peut colmater les filtres de sortie de gaz. Aussi, la viscosité du milieu conditionne également le type d'agitation et de bioréacteur : une viscosité excessive interdit les procédés basés sur l'immobilisation des enzymes;
- **Les propriétés du produit vis-à-vis de la cellule :** si le produit inhibe le microorganisme, il est préférable de choisir un réacteur qui permet d'éliminer l'antibiotique en même temps qu'il est produit (exp. utiliser un procédé continu).

3-Systèmes de fermentation

3.1-Systèmes en phase liquide :

trois procédés peuvent être utilisés :

3.1.1-Culture en discontinu (*batch* en anglais) :

le volume est constant sans renouvellement de milieu. Un même volume de milieu sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation du produit. Tout le bouillon obtenu est ensuite retiré du fermenteur. En fin de culture tout est traité et le bioréacteur doit être nettoyé pour une prochaine culture (**Figure 2**). Elle est pratiquement la seule technique utilisée en production d'antibiotique. Ce système doit assurer un brassage continu du milieu pour l'homogénéité de la culture et la dissolution de l'oxygène injecté sous forme d'air comprimé.

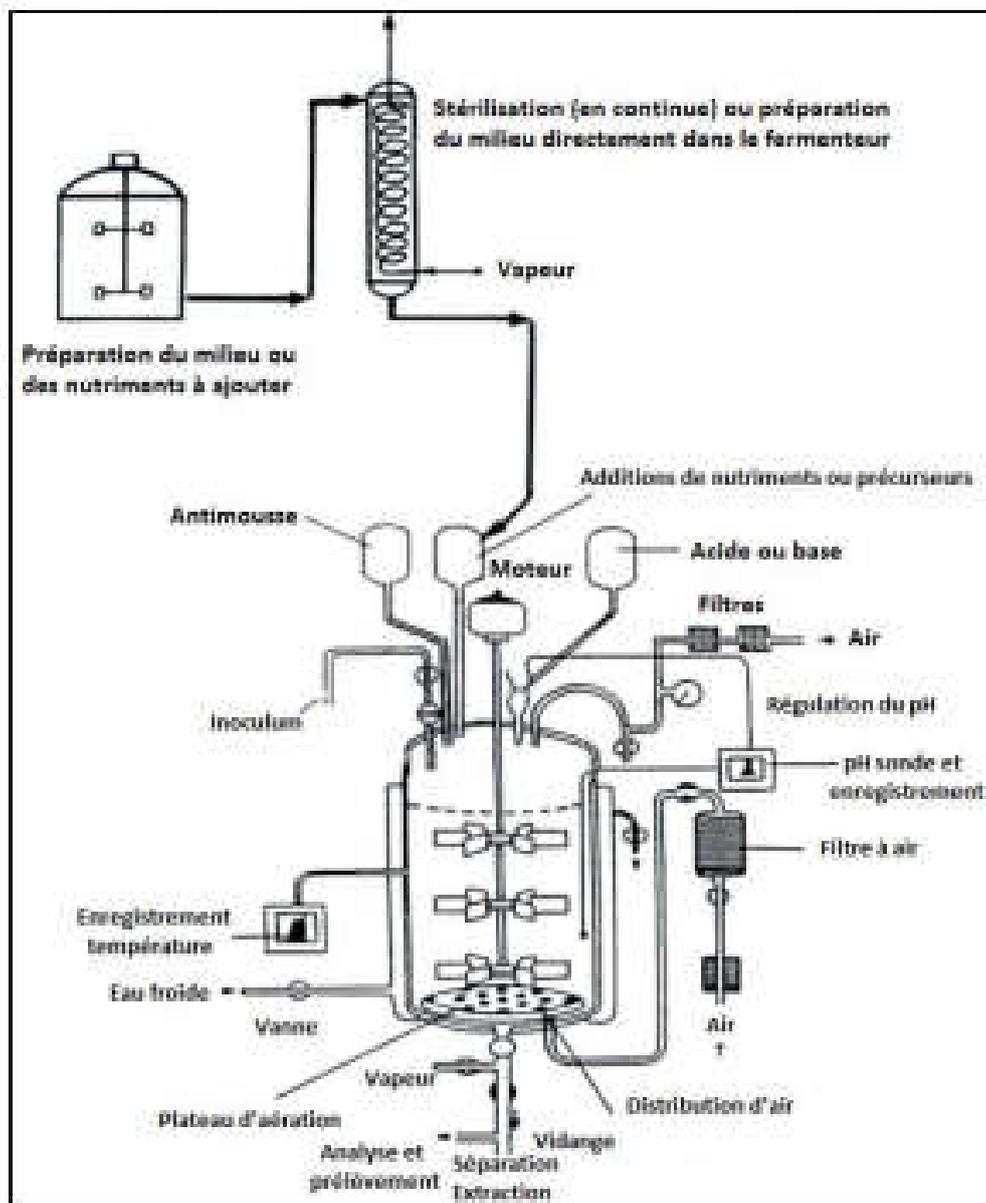


Figure 2: schéma d'un fermenteur en discontinu et de ses accessoires

3.1.2-Culture discontinue alimentée (*Fed-batch* en anglais) :

avec addition contrôlée de certains composants en cours de fermentation. Par exemple, lors de la production de la pénicilline, la concentration en glucose est maintenue à des valeurs précises au cours du temps.

3.1.3-Culture continue :

dans ce système continu, la culture microbienne reste sous un volume constant, tout en recevant un débit de milieu neuf. La concentration cellulaire varie en fonction de la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle ($\mu_{x \text{ expo}}$, taux de croissance) de l'espèce : $dX/dt = (\mu_{x \text{ expo}} - D) \cdot X$, où X = biomasse initiale; D = vitesse spécifique de dilution (rapport du débit d'entrée sur le volume du milieu h^{-1}); t = temps. Ce système consiste à maintenir le fermenteur et son contenu dans un même état le plus long possible, par prélèvement du milieu fermenté et apport de milieu frais en continu. Deux techniques sont possibles :

3.1.3.1-La technique du turbidostat :

ce dispositif assure une culture continue où la vitesse spécifique de croissance est maximale ($\mu_{x \text{ expo max}}$) et une biomasse constante X , qui sera choisie en phase exponentielle et restera constante grâce à une régulation de D c-à-d : $\mu_{x \text{ expo}} = D$. L'appareillage est très simple, comprend une cellule photoélectrique réglée, sur une valeur de X choisie, et reliée à la vanne d'entrée du milieu neuf. Il s'agit d'une autorégulation de D en fonction de la biomasse mesurée à la sortie (**Figure 3**).

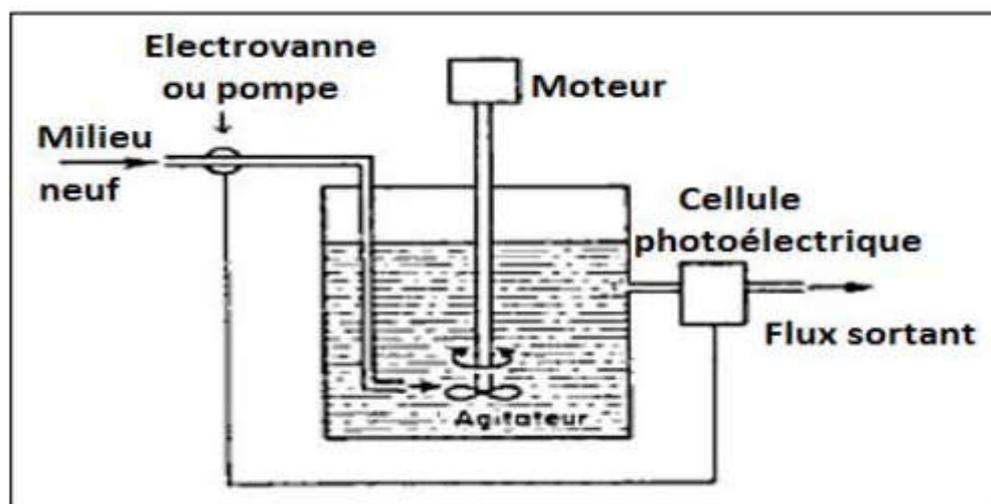


Figure 3 : Turbidostat

3.1.3.2-La technique du chémostat ou bactogène :

dans ces dispositifs $\mu_{X \text{ expo}} > D$: l'effet de dilution est moins important que celui de la croissance. La vitesse spécifique de croissance n'atteint jamais $\mu_{X \text{ expo max}}$, sa valeur est liée à la concentration d'un facteur limitant dans la chambre de croissance, tous les autres aliments étant en excès. Quand D augmente, la concentration en facteur limitant s'accroît et la biomasse, elle, diminue (on dilue le milieu) et donc $\mu_{X \text{ expo}}$ augmente (loi de Monod). Quand D diminue, c'est l'inverse (**Figure 4**).

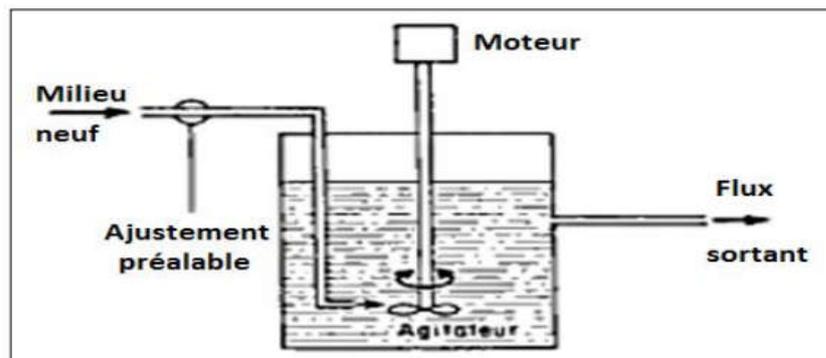


Figure 4 : Chémostat

La limitation du système provient de la dégénérescence de la souche souvent entre 5 et 20 jours. On peut dans le cas de production de métabolites secondaires, d'utiliser des systèmes multi-étages mettant en batterie des fermenteurs en continu (**Figure 5**).

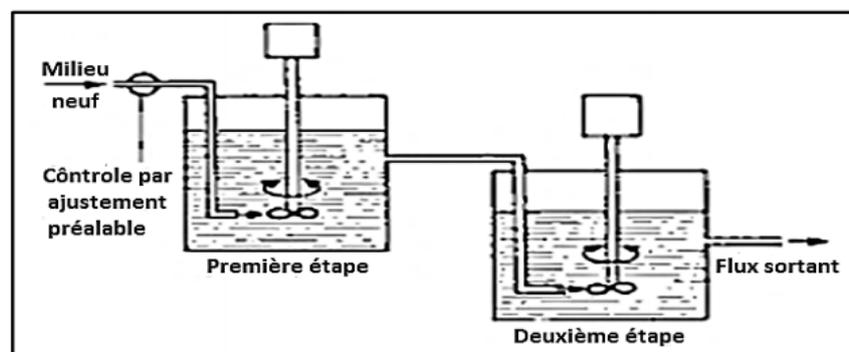


Figure 5 : Fermenteur en continu multi-étages

À l'heure actuelle, ce sont les systèmes en discontinus qui présente à la fois le plus de flexibilité, de simplicité de conception et de sécurité, mais ceci au détriment du cout pour lequel les systèmes en continus, surtout le chémostat, sont le plus rentables.

Dans ces trois systèmes, l'agitation est un facteur important de la réussite de la culture. Le choix de la vitesse et le type des pales est important. Pour les microorganismes dont les cellules sont relativement résistantes, on utilise des agitateurs de type radial et une vitesse importante.

Dans certains cas l'agitation peut présenter un gros inconvénient créant des forces de cisaillements trop importants. Les systèmes mécaniques peuvent être remplacés par l'agitation par air (*air-lift*): système d'injection d'air par le bas (*tower*) utilisé par exemple dans la production d'acide citrique par *A. niger* (**Figure 6**). Un autre système d'injection par le haut (*deep shaft reactors*) dans le cas des traitements des eaux usées. Le gros inconvénient de ces systèmes est leur cout élevé.

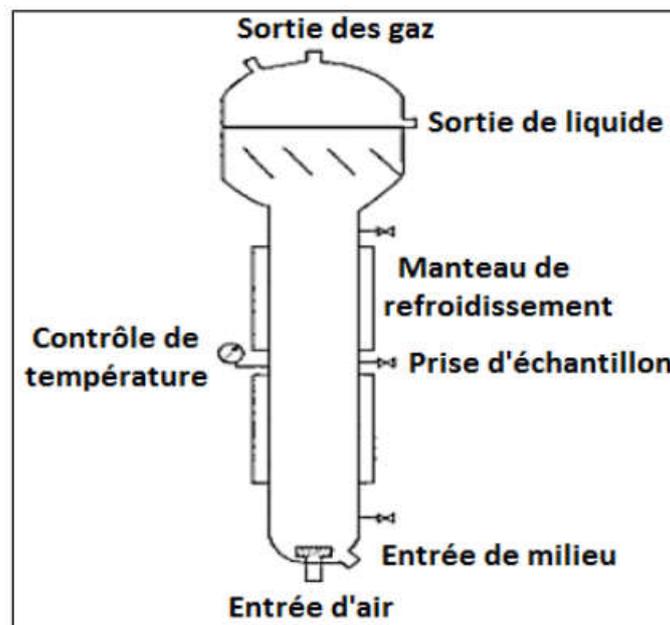


Figure 6: Agitation par air (*air lift*) de type tower