

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**Département de Biotechnologie**

**SAHLA MAHLA**

المصدر الأمل للطلاب الجزائري



**Matière : Génie Microbiologique**

**Master 2 BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE**

**Responsable de la Matière : Dr BENOUSSAID Nacera**

**Année universitaire 2020-2021**

## INTRODUCTION

Fromage, vinaigre, yogourt, pénicilline, acide lactique, biogaz, éthanol, glycérine, Bière ... quelle relation peut-il bien exister entre tous ces produits ?

De même, quel point commun pourrait-on trouver entre l'activité principale du boulanger - fabriqué du pain - et le fonctionnement d'une station d'épuration ?

En fait toutes ces productions, et bien d'autres, utilisent un **outil vivant**. Le processus de transformation mis en œuvre exploite des microorganismes – la **biomasse** - dont le développement modifie les caractéristiques de la matière – le **substrat** - sur ou dans laquelle ils se sont développés.

La microbiologie industrielle ou le "génie" microbiologique, dans la même acception que le "génie" civil ou le "génie" militaire, correspond à **l'ensemble des technologies qui permettent d'exploiter industriellement des microorganismes vivants**. Avec le "génie" enzymatique et le "génie" génétique, le "génie" microbiologique constitue un des éléments du domaine industriel des biotechnologies

Dans ce contexte précis, l'ensemble des éléments constituant une installation de fermentation a pour objectif général soit de favoriser au maximum la production de cellules ou de métabolites cellulaires directement utilisables (**bioproductions**), soit simplement de modifier un substrat par action biologique (**bioconversion**). Dans le premier cas, l'étape de fermentation proprement dite devra être suivie par des opérations de **séparation** en vue d'isoler, de purifier et de stabiliser les cellules ou les métabolites. Par contre on parlera de bioconversion quand aucune séparation n'intervient en aval de la fermentation (ex : fabrication de yogourt ou de fromage blanc, dans lesquels la flore active demeure dans le produit fini).

## I- Domaines d'activité de la microbiologie industrielle

SAHLA MAHLA

- Agro-alimentaire (agents de saveurs, émulsifiants, fermentations alcoolique, lactique...)
- Production d'énergie (éthanol, méthane, hydrogène,...)
- Production de solvants (acétone, butanol,...)
- Environnement (bioremédiation des sols pollués, épuration biologique de l'eau, forage pétrolier, extraction de minerais ou biolixiviation,...)

- Agriculture, horticulture... (vecteur pour la production d'OGM, herbicides, insecticides, hormone végétales - gibbérellines...)
- Biologie moléculaire (production d'enzymes de restriction,...)
- Industrie pharmaceutique (antibiotiques, vitamines, acides aminés, insuline, hormone de croissance, hydrocortisone, interféron beta-1b,...et de nombreux autres produits du groupes des antitumoraux, immunosuppresseurs, anti-inflammatoires,...)

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



## Intérêts de l'utilisation des microorganismes

SAHLA MAHLA  
المصدر الأول للطالب الجزائري

A- Coût plus faible que les procédés par voie chimique :

- Catalyse enzymatique,...

B- Faisabilité :

-Synthèse et biotransformations (ex : prostaglandines, stéroïdes) de certaines molécules ne peuvent se faire que par voie microbienne

- Spécificité de la réaction

- Stéréospécificité ...

C- Sécurité accrue :

-Absence de virus (sida, hépatite B) ou prion ex : cas de transmission de la maladie de Creutzfeldt Jacob par hormones de croissance extraites de l'hypophyse de cadavres contaminés

## Cellule bactérienne : produits microbien d'intérêt industriel

SAHLA MAHLA

المعهد العالي للعلوم التطبيقية والتكنولوجيا

Une fois le micro-organisme recherché obtenu, la formation des produits désirés dépend de la mise en culture du microorganisme. L'utilisation des microorganismes en biotechnologie moderne est donc basée sur les principes de la culture en masse. Implique alors :

- la gestion des procédés de culture microbienne
- la connaissance des facteurs limitant la croissance microbienne.

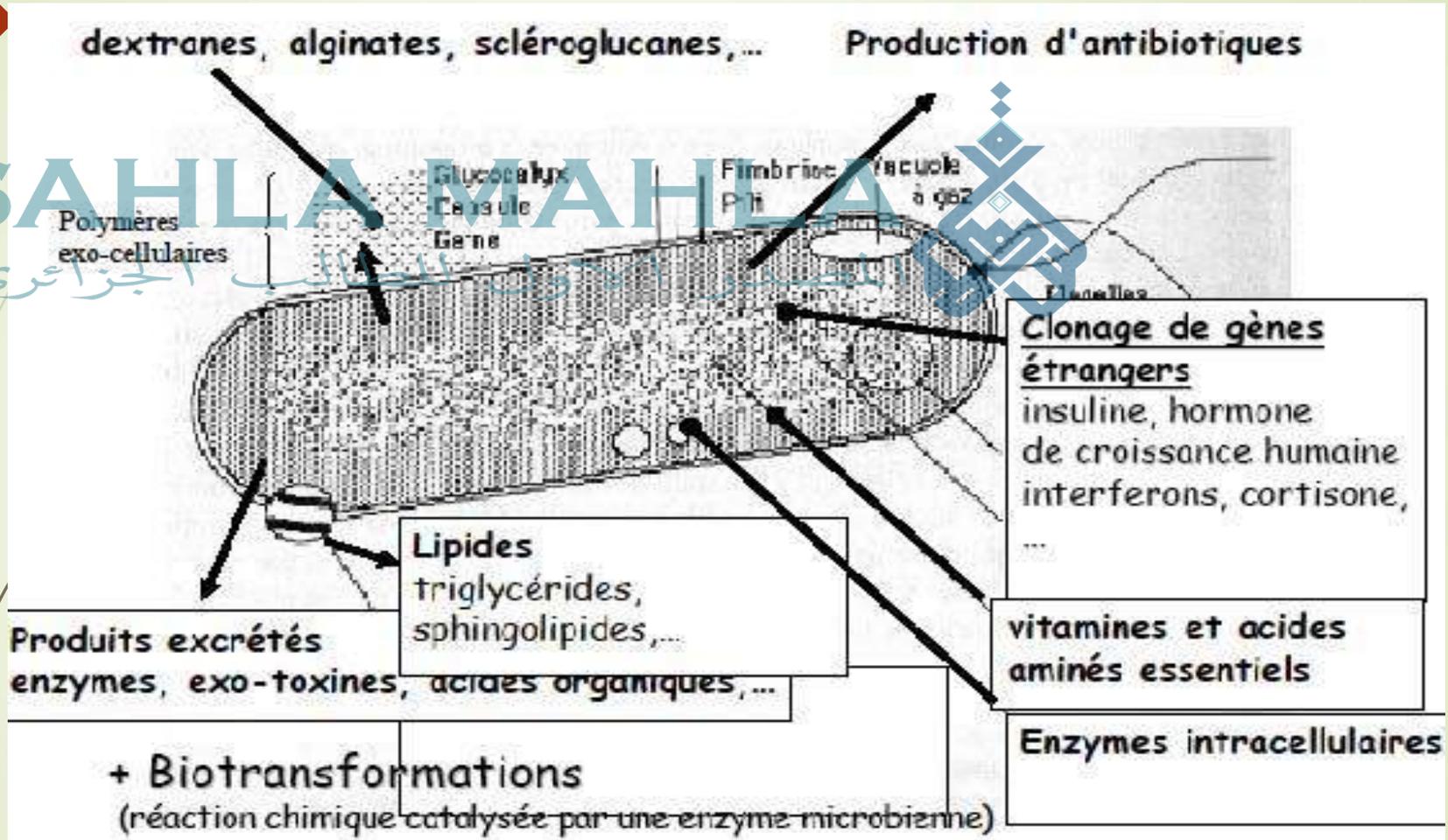


Fig. 01 – Représentation schématique des produits microbiens d'intérêt industriel

# Partie I. L'AMONT (up stream) Les fermentations industrielles

11

## 1 .Définitions

SAHLA MAHLA

Le mot fermentation présente deux significations différentes pour les biochimistes et les microbiologistes industriels.

- ❖ En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons, la synthèse d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat.

❖ En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes.

Ainsi, contrairement au sens biochimique, le terme de fermentation industrielle ne se réfère pas au métabolisme du micro-organisme. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobie et anaérobie.

## II- Conduite d'une fermentation

SAHLA MAHLA

### 2.1. Le bioréacteur

المصدر الاول للطالب الجزائري



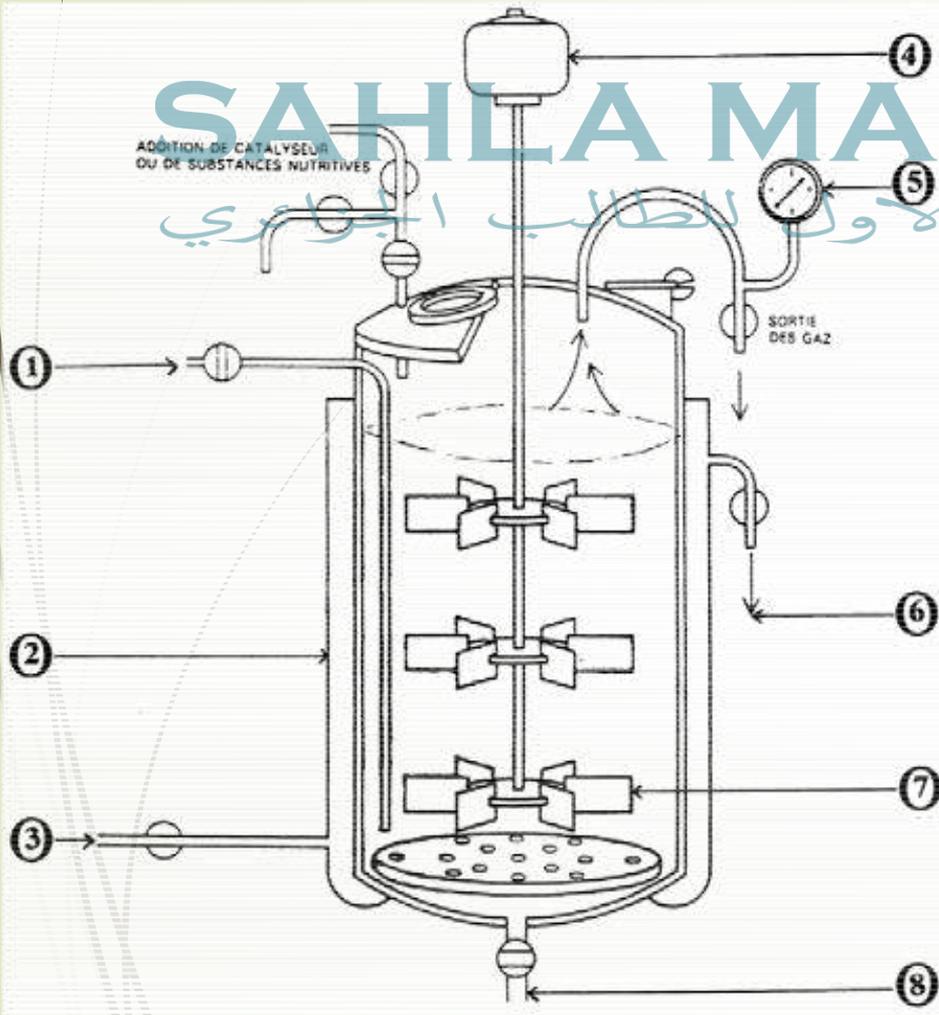
Le bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés.

### 2-1-1 Matériel de culture : bioréacteur

- 1- entrée d'air muni d'un filtre (ou tuyau d'échantillonnage)
- 2- enveloppe de refroidissement
- 3- entrée d'eau de refroidissement
- 4- moteur pour agitation
- 5- manomètre (pour vérifier la pression interne)
- 6- sortie de l'eau de refroidissement
- 7- pales pour agitation
- 8 – tuyau de vidange

# 1-1 Matériel de culture : bioréacteur (fermenteur)

15



- 1- entrée d'air muni d'un filtre (ou tuyau d'échantillonnage)
- 2- enveloppe de refroidissement
- 3- entrée d'eau de refroidissement
- 4- moteur pour agitation
- 5- manomètre (pour vérifier la pression interne)
- 6- sortie de l'eau de refroidissement
- 7- pales pour agitation
- 8 – tuyau de vidange

# Phases et mise à l'échelle d'une fermentation

16

## Les différentes étapes :

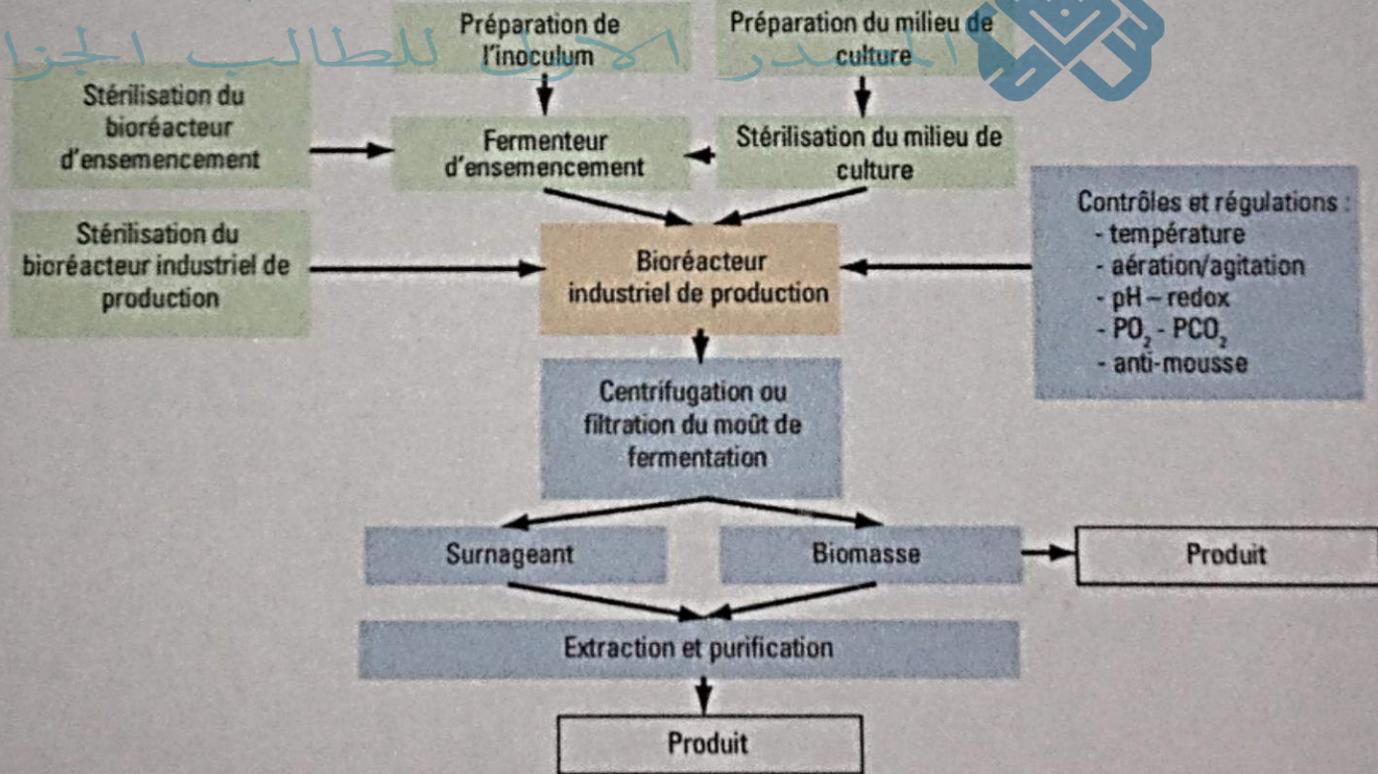
On distingue **cinq** étapes importantes dans tout procédé de fermentation

1. - La fabrication du milieu de culture ;
2. - La stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
3. - La préparation de l'inoculum ;
4. - La production en bioréacteur ;
5. - L'extraction du produit et sa purification.

# SAHLA MAHLA

الطلاب الجزائري

الدراسات



## B. Processus de mise à l'échelle (ou extrapolation) : *scale up*

SAHLA MAHLA

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal (figure 3) :

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ;
- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables *in situ* jusqu'à 30 L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500 000 L (500 m<sup>3</sup>).

## Processus de mise à l'échelle (ou extrapolation) : *scale up*

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal:

- Les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 l
- Les bioréacteurs de laboratoire stérilisables *in situ* jusqu'à 30 l
- Les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 l ;
- Les bioréacteurs industriels jusqu'à 500 000 l (500 m<sup>3</sup>).

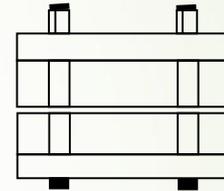
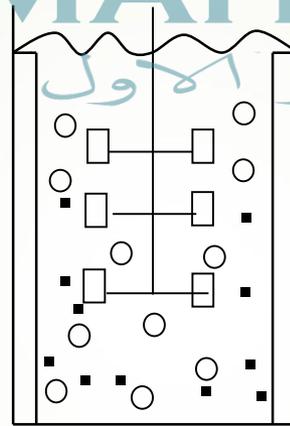
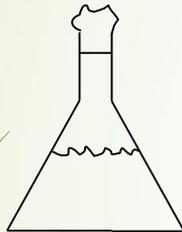
Le *scale up* (ou mise à l'échelle) est le transfert du procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle. Le *scale up* s'effectue en plusieurs étapes

De la fiole d'Erlenmeyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel

# De la cellule au produit fini

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



sélection de la  
souche

étude de la  
physiologie  
microbienne

technologie de la  
fermentation

récupération et  
conditionnement  
des cellules ou des  
métabolites



Isolement sur boîtes de Petri

SAHLA MAHLA  
المصدر الأول للطالب الجزائري



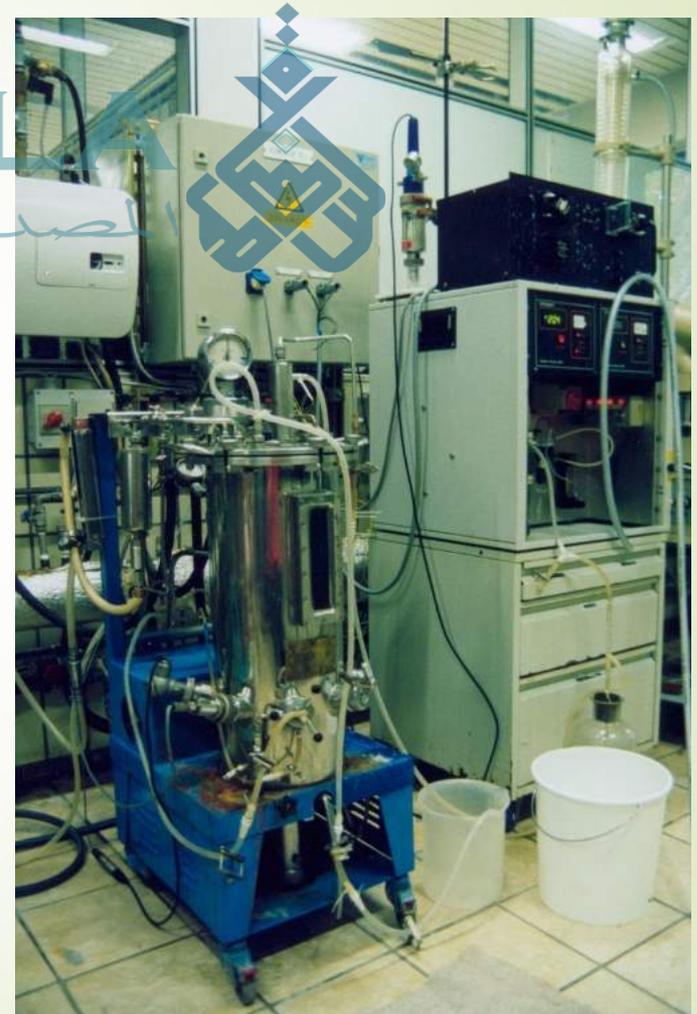
Fioles



Fermenteurs de 2 L



Fermenteur de 20 L



## Fermenteurs de 500 et 2000 L



## Fermenteur de 2000 L



SAHILA MAHLA  
الأولمبيدور الكتب الجزائرية

Il est impossible de conserver l'ensemble des paramètres identiques ou proportionnels au changement d'échelle. Chaque transfert à une plus grande échelle est complexe car divers paramètres tels que le barème de stérilisation, l'aération et l'agitation sont modifiés lorsqu'on augmente le volume, le diamètre et la hauteur du bioréacteur.

Des conditions physicochimiques similaires doivent être maintenues dans l'environnement de chaque cellule malgré l'augmentation du volume de culture.

À chaque étape du *scale up*, divers paramètres sont analysés puis modifiés car les réactions physicochimiques et enzymatiques se produisant à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé

## 2.2. La biomasse

### 2-2-1- Caractéristiques des souches utilisées en production industrielle

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Production industrielle nécessite une souche ayant les caractéristiques suivantes :

-**Innocuité** (non pathogène)

-**Bonne productivité** (fort rendement = capacité à synthétiser des quantités appréciables de produit attendu)

**-Stabilité génétique** (ne perdant pas ses caractéristiques après de nombreuses multiplications en bioréacteur et lors de sa conservation)

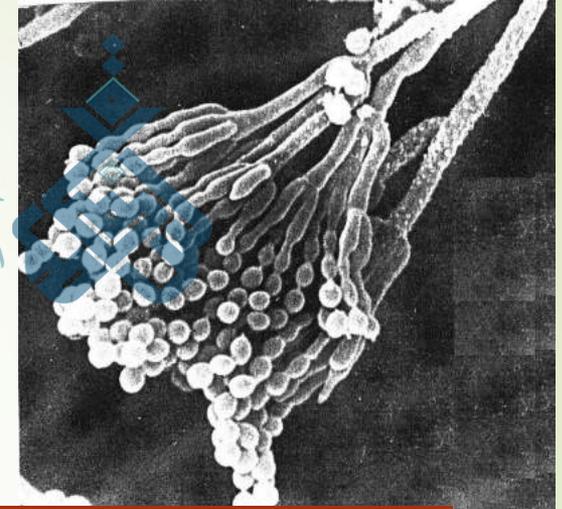
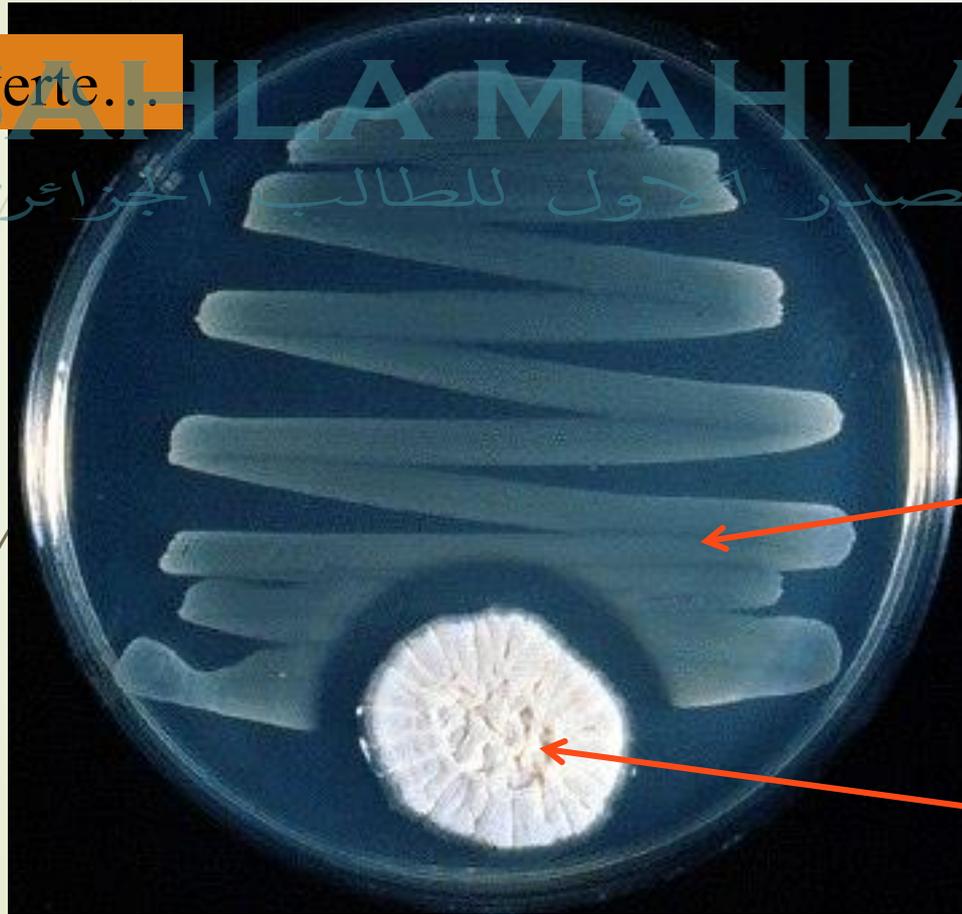
**-Croissance rapide** (de façon à donner très vite beaucoup de produit ou une biomasse importante)

**-Améliorabilité** (idéalement la souche doit pouvoir être capable d'évoluer sous la pression de l'industriel, dans le but d'améliorer ou de d'adapter la production)

## ➤ Démarche historique

28

Découverte...



Staphylococcus aureus

Penicillium



# Découverte de la pénicilline

# Découverte de la pénicilline

29

Fleming recherchait des molécules inhibant les contaminants des cultures.

Un jour ilensemence une boîte avec du *S. aureus* et oublie la boîte sur la paille.

Quelques jours plus tard, il constate l'apparition d'un champignon (*Penicillium notatum*). Il remarque une zone d'inhibition autour du *Staphylococcus*.

Il en déduit que le champignon produit une molécule inhibant (à distance) le *Staphylocoque*.



*Staphylococcus aureus*

*Penicillium*

*Penicillium notatum* espèce historique de la découverte de la pénicilline produisait de faible quantité de pénicilline.

Une souche de *Penicillium chrysogenum* fut isolé en 1943 et utilisée à la place car davantage productrice

## 2.2.2 Recherche, sélection et amélioration des souches utilisées en production industrielle

المصدر الأول للطالب الجزائري



Pour réaliser une bioproduction industrielle, il existe trois moyens de se procurer les souches microbiennes convenables :

- Les obtenir auprès d'un organisme de collection de type microbien ; on peut citer :

American Type Culture Collection (ATCC) et le Centre de Collection de Type Microbien(CCTM)

- Recherche de la meilleure souche productrice à partir de constituants naturels (aliments, sols.....)
- Sélection, suite à diverses mutations des clones ayant le meilleur rendement sans perte de leurs qualités
- Amélioration des souches grâce au progrès de la biologie moléculaire

- Introduction d'un DNA extérieur (ADN recombinant)

## 2-2-3-L'amélioration des microorganismes industriels

### 2-2-3-1-Mutagénèse

Cette technique a augmenté considérablement la production, le cas de la pénicilline est le plus connu.

Suite à l'amélioration, la production est passée de quelques milligrammes à 40 g/l. La production de la lancomycine produite par *Streptovercillium kitasatoensis* a été améliorée par la mutation – sélection

L'objectif principal de la mutation-sélection est l'augmentation de la production mais aussi d'autres types de mutants peuvent être recherchés :

- la synthèse d'un seul métabolite secondaire;
- la production de nouvelles molécules;
- la capacité de produire des métabolites sur des milieux bon marché.

L'homogénéité et la pureté de la souche sont d'abord contrôlées avant de passer à la mutation.

Les procédés utilisés pour l'amélioration de la souche sont :

- -les agents physiques,
- -les agents chimiques;
- la combinaison de traitement;

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



## A-Agents physiques:

La lumière ultra violette (254 nm) et les radiations ionisantes ont été couramment utilisées. Les UV sont facile à utilisés est sont peu dangereux. Le traitement s'effectue par la mise en suspension des cellules dans un tampon TES à pH7 dans une boite de Pétri en verre. La suspension est maintenu homogène par agitation. La lampe bactéricide est fixée à une distance de 20 à 30 cm.

- ❖ Les radiations ionisantes, rayons X ou gamma provoquent des dommages et des modifications très importantes du matériel génétique, sont à déconseillées dans un programme d'amélioration de souches.

## B-Agents chimiques

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



-L'éthyl-méthansulfonate (EMS) : dans le cas de traitement (EMS), les cellules en phase de croissance sont incubées dans un tampon potassium additionné de 0,5 à 3 % EMS et ceci durant 15 à 20 minutes.

-N-méthyl-N' -nitro-N nitrosoguanidine (NTG) : le NTG induit plusieurs changements de bases de l'ADN au niveau de la fourche de duplication.

SAHLA MAHLA



-1'hydroxylamine -4 nitroquinoline-oxyde (NQQ) ou  
1'acide nitreux.

-5-bromouracile (analogue de la thymine) -2 aminopurine  
(analogue de l'adénine)

acridine orange -bromure d'éthidium

**NB : tous ces agents mutagènes sont cancérigènes et  
doivent être manipulés avec une grande prudence.**

## C- Combinaison de traitements:

Il est possible de traiter les cellules avec un agent mutagène chimique puis avec la lumière UV. En plus, l'addition de certaines substances augmente le taux de mutation. La caféine par exemple inhibe les mécanismes de réparation de l'ADN et l'acide nalidixique augmente le taux de réparations erronées.

## 2-2-3-2-Manipulation du génie génétique:

### - Les protoplastes:

- Les protoplastes sont un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes. Débarrassées de leur paroi pectocellulosique, ces cellules ne présentent plus d'obstacle à l'intégration de l'ADN. Sur un mélange contenant les cellules végétales et l'ADN en solution, on modifie les conditions physico-chimiques du milieu pour provoquer une perméabilisation temporaire de la membrane plasmique.
- Les molécules d'ADN pénètrent dans les protoplastes, elles doivent atteindre ensuite le noyau et s'intégrer dans un chromosome de la cellule

## 2-2-3-3-L'insertion de courtes séquences d'ADN :

Courtes séquences d'ADN synthétisées chimiquement peuvent être insérées dans des microorganismes hôtes. Donc on peut créer de petites modifications génétiques qui induisent le changement d'un ou de plusieurs acides aminés dans la protéine cible. On a constaté que dans beaucoup de cas des changements mineurs entraînent des modifications inattendues dans les caractéristiques des protéines et donnent de nouveaux produits : enzymes plus résistantes aux conditions environnementales.

# SAHLA MAHLA



المصدر الأول للطالب الجزائري

Cette technique ou approche fait partie du domaine de l'ingénierie des protéines. Grâce à cette approche on peut construire des enzymes et des peptides biologiquement actifs avec des caractéristiques nettement différentes (stabilité, cinétique, activités, etc.).

## 2. 3. Milieu de culture industriel

### 1- Fonction

En microbiologie industrielle, le substrat désigne la matière sur ou dans laquelle se développe la biomasse. C'est du substrat que celle-ci tire tous les éléments nécessaires à sa croissance et/ou à ses productions. Dès lors, il s'agit de bien concevoir celui-ci afin que pendant toute la durée de la fermentation la biomasse dispose de tout ce dont elle a besoin. Tout en tenant compte de l'aspect économique vu que le substrat peut représenter de 25% à 70% du coût total d'un processus de fermentation

## 2-Critères de choix d'un milieu de culture

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Le choix d'un substrat en vue d'une bioproduction dépend avant tout de l'objectif de celle-ci.

- le cadre d'une "préculture de récupération" d'une souche mère stabilisée, on choisira un substrat parfait à tous points de vue, sans trop se soucier de son prix ;
- en production industrielle, c'est le coût qui sera pris en compte prioritairement, vu les quantités nécessaires.

- dans le cas de bioconversions, le substrat est imposé et la biomasse n'intervient que pour le modifier. Ainsi en est-il du compostage et/ou de la méthanisation de déchets organiques, de l'ensilage (substrat = végétaux divers), de l'épuration biologique des eaux (substrat = eaux d'égout), de la production de yogourt (substrat = lait), ...

### 3- Composition chimique

45

#### ➤ Aspect qualitatif

De par sa fonction - fournir les éléments nécessaires à la croissance et aux productions de la biomasse - c'est avant tout la composition chimique qui détermine les performances d'un substrat ou l'autre.

le substrat doit apporter:

- les éléments majeurs (vitaeux) que sont C, H, O, N, P et S
- des éléments mineurs (nécessaires pour un métabolisme dynamique, mais non vitaeux) tels que Ca, Mg, K, ... ;

La forme chimique sous laquelle tel ou tel élément est fourni revêt également une importance capitale. Ainsi, à titre d'exemple, la source de carbone organique la plus accessible est le glucose, alors que d'autres sucres ne peuvent être métabolisés que par certains organismes et pas par d'autres (ex : différence entre coliformes [capable de fermenter le lactose] et non coliformes chez les entérobactéries).

Plus fondamental encore, un être vivant hétérotrophe doit disposer de C sous forme organique alors qu'un autotrophe peut synthétiser ses molécules carbonées à partir de C minéral ( $\text{CO}_2$ ). Le même genre de considération peut être développé à propos des formes des autres éléments chimiques (ex : accès à N à partir de  $\text{NH}_4^+$  ou de  $\text{NO}_3$  ...).

Eléments divers pouvant être utilisés en industrie, seuls ou associés :

-des mélasses, résidus visqueux du raffinage de la betterave ou de la canne à sucre, riches en glucides,

SAHLA MAHLA

-des liquides biologiques : du plasma, du lactosérum (protéines)

-des farines : végétales (maïs riche en amidon ; riz riche en amidon et en protéines ; soja : riche en protéines)

-de viande (protéines, lipides), de poisson (méthionine, phosphore).

## ➤ Aspect quantitatif

Outre la nature des substances fournies à la biomasse, la concentration de chaque composant du substrat influence également le taux de croissance de la population. La relation entre cette concentration et le taux de croissance est exprimée par l'équation de de Monod :

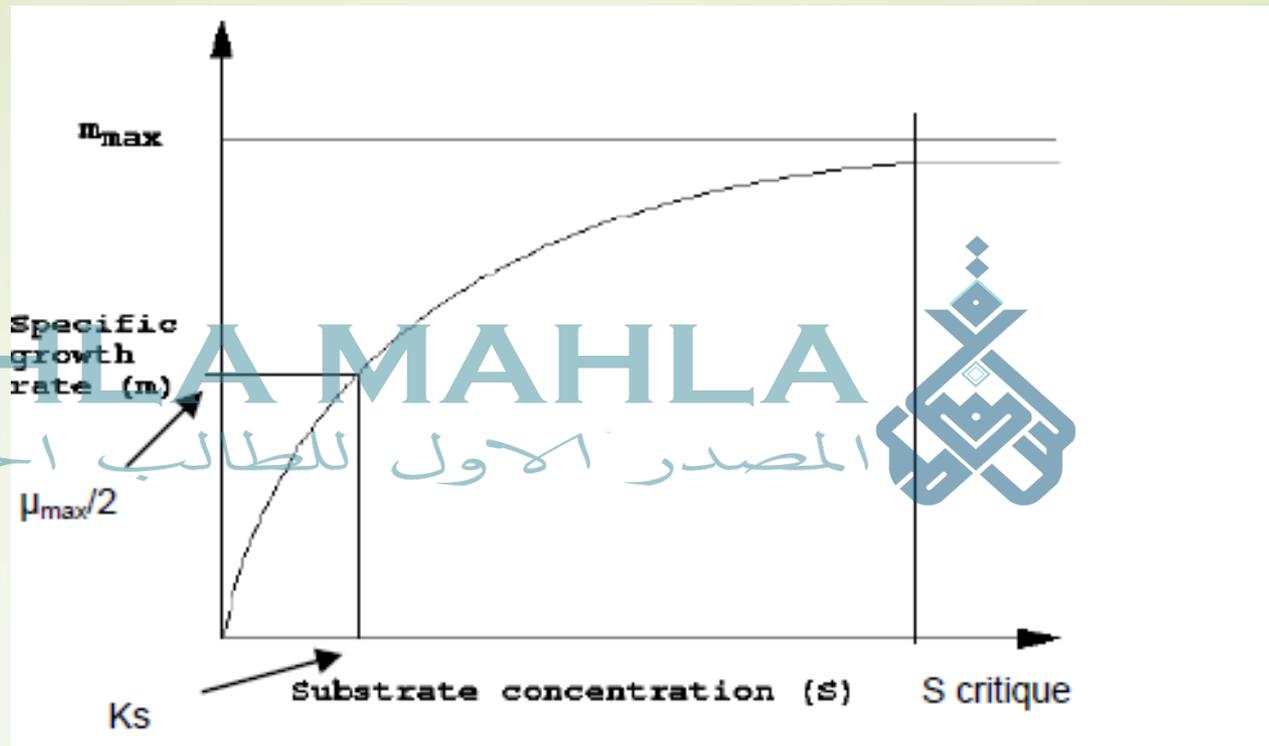
$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

$\mu$  = taux de croissance spécifique à un moment donné

$\mu_{\max}$  = taux de croissance maximum (atteint en phase exponentielle de croissance)

$S$  = concentration en substrat

$K_s$  = concentration en substrat au moment où  $\mu$  vaut la moitié de  $\mu_{\max}$



Cette équation se représente par la courbe ci-dessus. On voit qu'il existe une concentration critique en substrat en dessous de laquelle le taux de croissance maximum ne peut être atteint et au delà de laquelle un apport supplémentaire n'induit aucune augmentation de la vitesse de croissance

Par ailleurs, la **loi de Liebig** (ou loi du facteur limitant) stipule que c'est le facteur qui est le premier en quantité insuffisante qui limite les performances d'un système. Il n'y a donc pas de compensation d'une carence en un élément par l'abondance d'un autre. Il suffit qu'un élément soit carencé pour que le substrat ne permette pas un fonctionnement optimal de la biomasse

En outre, il est évident que le substrat ne doit pas apporter d'éléments inhibiteurs susceptibles d'empêcher une activité normale de la biomasse. C'est pourquoi il est parfois nécessaire de le corriger afin d'en extraire telle ou telle substance. Ex : précipitation des métaux lourds d'un effluent industriel liquide avant de l'introduire dans les bassins biologiques d'une station d'épuration

## 4- Coût

53

SAHLA MAHLA



Vu l'importance du coût du substrat dans le prix de revient des bioproductions (25 à 70%), au niveau industriel, on cherche à exploiter des produits **bon marché**, tels que des déchets agricoles (fumiers et lisiers pour la production de biogaz) ou des sous-produits de l'industrie alimentaire (mélasses, lactosérum, amidon, ...).

## 5- Stérilisation

Si on utilise une biomasse spécifique, il est absolument nécessaire de stériliser l'installation de fermentation et le milieu de culture. En effet, des contaminants différents de la souche normalement exploitée risquent de concurrencer celle-ci dans l'utilisation du substrat, voire de produire des métabolites non désirés.

- Habituellement ce sont les traitements thermiques qui sont employés ici. Ceux-ci peuvent cependant altérer certains constituants du substrat (sucres, acides aminés, protéines, vitamines, ...). Dans ce cas, on stérilisera, en vrac et par la chaleur, le substrat de base, et on lui ajoutera - aseptiquement - une solution des éléments thermosensibles stérilisés par filtration.

## 2-4- L'AIR

### 1- FONCTIONS

Dans certaines bioproductions, de l'air doit être apporté afin de répondre aux exigences métaboliques de la biomasse. En fait, l'air amène l'**oxygène** que les microorganismes utilisent comme accepteur final d'électrons dans leur métabolisme énergétique. Ceci concerne donc des cellules aérobies ou aérobies - anaérobies. Certaines de ces dernières pouvant adopter un comportement différent selon qu'elles disposent ou non d'O<sub>2</sub>. Par contre dans le cas où la biomasse est anaérobie stricte, il s'agit au contraire de veiller à empêcher tout apport d'oxygène

# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Quelle que soit sa fonction, il va de soi que cet apport gazeux ne peut en aucun cas perturber l'activité de la biomasse. En particulier, si nécessaire, il doit être stérilisé afin d'éviter toute introduction de microorganismes parasites. Cette stérilisation s'effectue soit par traitement thermique (coûteux en énergie), soit, plus couramment, par filtration,

### III- CONTRÔLE DES CONDITIONS DE CULTURES

58

Nécessite

- Une bonne agitation de la culture;
- Une régulation de la température par refroidissement car les réactions métaboliques lors de la croissance sont généralement exothermiques;
- Une régulation du pH car les réactions métaboliques microbiennes peuvent acidifier ou alcaliniser le milieu;
- Une régulation de la pression partielle en O<sub>2</sub> par insufflation d'air stérile.

## 1. Dispositifs d'agitation

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Ceux-ci ont pour but d'assurer les transferts de masse entre les trois phases en contact dans le fermenteur. En plus, la turbine d'agitation a pour rôle de fractionner les bulles d'air afin d'augmenter l'efficacité de l'aération.

L'agitation est assurée par des pales montées sur un axe verticale relié à un moteur situé au dessus de l'appareil. Le mouvement de la turbine fait tourner le milieu qui se creuse alors en entonnoir (vortex).

Pour éviter ce phénomène des contre-pales fixées sont montées le long des parois de la cuve.

## 2. Régulation de la température

La température est le principal facteur de développement d'une population microbienne.

La nature des sondes thermométriques est très diverse. Cela va du simple thermomètre, à des thermocouples plus ou moins sophistiqués selon la sensibilité de la biomasse, ... et les budgets.

Quant à la correction, elle s'opère selon deux techniques principalement : le serpentin ou les doubles parois. Le principe de base est toujours de faire circuler à l'intérieur de ceux-ci, et donc à proximité du substrat, une quantité d'eau froide ou chaude, voire de vapeur, destinée respectivement à prélever ou à fournir des calories.

### 3. Contrôle du PH

Pour rappel, les bactéries sont en général neutrophiles à légèrement acidophiles, avec, pour certaines espèces, une adaptation génétique à des niveaux d'acidité relativement élevé (certains *Lactobacillus* sont encore actifs à des pH proches de 5, *Thiobacillus ferrooxydans* a un optimum de pH aux alentours de 2).

Les moisissures et levures par contre sont en général plus franchement acidophiles

Le maintien d'une acidité constante aux cours du processus peut s'obtenir soit en utilisant un substrat préalablement tamponné, soit en apportant des correctifs (acide ou base) tout au long de la fermentation.

## 4. Contrôle des mousses

Un grand nombre de fermentations génèrent des gaz dont la solubilité dans la phase aqueuse est limitée (ex : f. alcoolique, f. hétérolactique CO<sub>2</sub>, f. méthanique CH<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub>, ...).

La respiration aérobie fournit également du CO<sub>2</sub>. Ces gaz forment des bulles et, selon la tension superficielle de la phase liquide, celles-ci peuvent provoquer la formation d'une mousse plus ou moins abondante. Cette mousse est constituée de petites bulles de gaz entourées d'une fine pellicule de liquide. Ces bulles vont remonter à la surface du substrat et s'y accumuler.

C'est pourquoi l'accumulation de mousse au sein d'un digesteur peut provoquer divers problèmes. On peut ainsi être confronté à des défauts de stérilité, essentiellement liés à l'imprégnation des filtres de sortie des gaz.

SAHLA MAHLA

La correction peut consister en une action mécanique ou physico-chimique.

المصدر الاول للحجاب الجزائري



- Dans le premier cas, un bras "brise-mousse" fixé perpendiculairement à l'axe de l'arbre d'agitation tourne rapidement et projette la mousse contre les parois du réacteur, où les bulles éclatent.
- Par contre l'intervention physico-chimique consiste à injecter un "anti-mousse" dans le réacteur. Il s'agit d'une substance tensio-active qui modifie la tension superficielle du liquide et diminue la cohésion entre les molécules de substrat à l'interface liquide-gaz. Dès lors, le film liquide qui "emballe" les bulles de gaz est moins solide et celles-ci éclatent dès leur sortie du substrat

## 5-Régulation de l'oxygène

L'aération du substrat, qui conditionne la disponibilité en oxygène pour les micro-organismes aérobies, exige aussi un système régulateur le transfert d'O<sub>2</sub> jusqu'aux sites d'utilisation au sein de la cellule est loin d'être aisé et la consommation peut parfois être extrêmement intense, selon la nature de la biomasse utilisée et son effectif.

L'enregistrement de la concentration en oxygène dissous dans le milieu est réalisé par une sonde à oxygène qui mesure la concentration en O<sub>2</sub> via une électrode.

Quant à la correction elle consistera, comme indiqué plus haut, soit à adapter le débit et/ou la concentration en O<sub>2</sub> de l'air, soit à moduler la vitesse de l'arbre d'agitation.

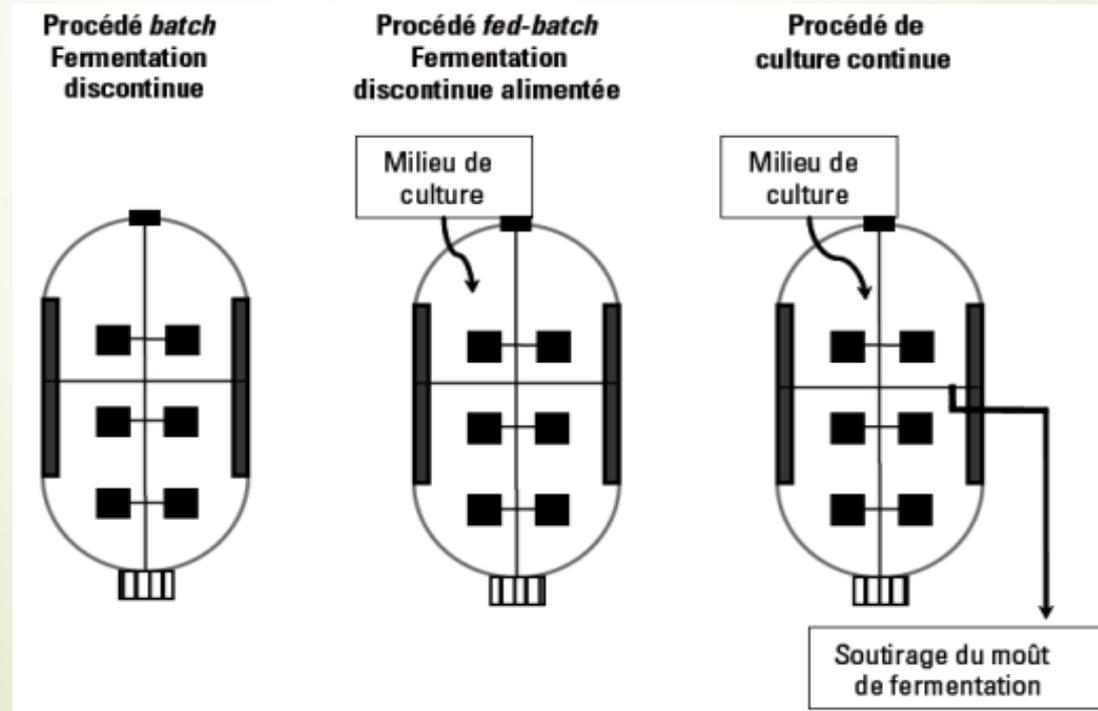
# IV-Différents procédés de fermentation

## IV-1 Systèmes en phase liquide :

On distingue trois types de procédés de fermentation

(figure :

- le procédé *batch* ou fermentation discontinue ;
- le procédé *fed-batch* ou fermentation discontinue alimentée ;
- le procédé de culture continue.



# SAHLA MAHLA



المصدر الاول للطالب الجزائري

## 1- Procédé discontinu (*batch*)

### A- Principe

Le procédé est réalisé dans un système clos dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée

### B -La croissance microbienne en milieu non renouvelé

Le phénomène de la croissance est l'augmentation de la population qui résulte de la reproduction qui peut se faire selon différents modes.

## C- Les différents modes de reproduction :

La reproduction peut être sexuée, mais elle est relativement peu fréquente, elle est généralement asexuée.

المصدر الأول للطالب الجزائري

Les synthèses permettent aux cellules microbiennes de croître en taille et en volume jusqu'à une dimension limite qui conduit généralement à la division cellulaire par scission binaire à (Fission binaire)(Bactéries) ou par bourgeonnement (levure). On assiste alors à une augmentation du nombre de cellules par unité de volume(c/v) .



Les cellules bactériennes issues de la fission binaire sont identiques alors que lors de la reproduction des levures par bougèment les 2 cellules ne sont pas identiques. L'une est en la mère et l'autre est la fille et l'on résulte qu'au cours de l'ensemble des phénomènes de croissance, il y a une évolution de la distribution d'âge des cellules de la population.

D'autre part, la reproduction des moisissures et les bactéries filamenteuses, se fait par allongement et ramification des filaments en fonction des conditions physico chimiques dans lesquelles se déroulera la croissance.

## ① Définition de la Croissance

Généralement c'est l'accroissement de tous les composants d'un organisme.

Chez les organismes pluricellulaires, il y a augmentation de taille.

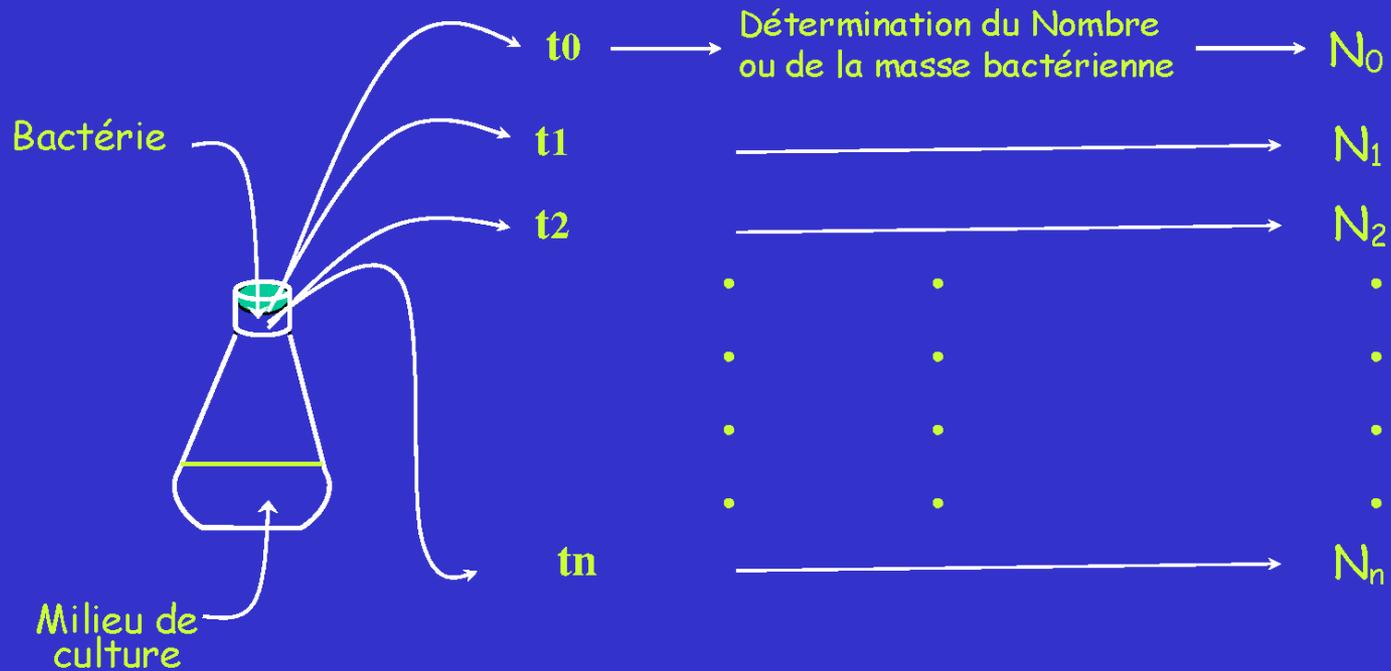
Chez les bactéries augmentation du nombre de cellules.

Cet accroissement est donc synonyme d'une multiplication bactérienne.

Chez *Escherichia coli*, toutes les 20 min environ, 1 bactérie donne naissance à 2 bactéries identiques

## ② Méthodes de mesure de la croissance

### 1- Principe



**N.B.** Durant la croissance la  $T^{\circ}C$  et l'aération doivent être respectées

## 2-1. Mesure du nombre de cellules

### ➤ Nombre de cellules totales

- ✓ Cellule de Thomas
- ✓ Dispositif électronique (Compteur Coulter)

### ➤ Nombre de cellules viables

- ✓ Sur milieu solide
- ✓ Sur milieu liquide

## 2-2. Mesure de la masse

- Mesure du poids sec: (P. frais d'1 bact.=  $1,5 \cdot 10^{-12}$  g)
- Dosage de l'azote total (14% du poids sec).
- La **turbidimétrie**: consiste à mesurer le trouble bactérien.

### ③ Constantes et expression de la croissance

La croissance d'une bactérie est définie par 2 constantes:

#### ➤ *Le temps de génération*

C'est le temps qui sépare 2 divisions successives (= temps nécessaire au doublement de la population).

$$G = t/n$$

$t$  = *temps de croissance* (connu) et  $n$  = nombre de divisions

Ex. chez *E. coli* :  $G = 20$  min

#### ➤ *Le taux de croissance*

C'est le nombre de divisions par unité de temps.

$$\mu = n/t \quad \text{donc} \quad \mu = 1/G$$

$\mu$  est exprimé en nombre de divisions/unité de temps

Ex. chez *E. coli* :  $\mu = 3$  div /h

#### ④ Expression mathématique de la croissance

<i>Temps</i>	→	<i>nombre de Bactéries</i>
$t_0$	→	$N_0 = 1N_0$ → $2^0 N_0$
$t_1$	→	$N_1 = 2N_0$ → $2^1 N_0$
$t_2$	→	$N_2 = 2 \times 2 \times N_0$ → $2^2 N_0$
$t_3$	→	$N_3 = 2 \times 2 \times 2 \times N_0$ → $2^3 N_0$
$t_4$	→	$N_4 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times N_0$ → $2^4 N_0$
⋮		
⋮		
$t_n$	→	$N_n = \underbrace{2 \times 2 \times 2 \times 2 \times \dots}_{n \text{ fois}} N_0$ → $2^n N_0$

(n = nombre divisions et  $N_0$  = nombre de bactéries à  $t_0$ )

$$N = 2^n N_0 \text{ (avec } \mu = n/t \text{ et } n = \mu t) \text{ donc } N = 2^{\mu t} N_0$$

## ⑤ Représentation graphique de la Courbe de croissance

La croissance bactérienne est représentée par un graphe :

$$N = f(t) \quad \text{ou} \quad DO = f(t) \quad \text{ou} \quad \text{autres}$$

☞ *Représentation arithmétique:*  $N = f(t)$

A  $t_0$  correspond  $N_0$  (ordre  $10^5$  à  $10^6$ )

A  $t_1$  correspond  $N_1 = 2N_0$  ( $2 \cdot 10^5$  à  $2 \cdot 10^6$ ) avec  $t_1 - t_0 = G$

A  $t_2$  correspond  $N_2 = 4N_0$  ( $4 \cdot 10^5$  à  $4 \cdot 10^6$ ) avec  $t_2 - t_1 = G$

Courbe:

Nombre élevés posent un problème pour une échelle arithmétique

## ☞ Expression logarithmique

$$N = 2^n N_0 \text{ (avec } \mu = n/t \text{ et } n = \mu t) \text{ donc } N = 2^{\mu t} N_0$$

$$\log N = \log 2^n N_0 \Rightarrow (n = \mu t) \Rightarrow \log N = \log 2^{\mu t} N_0$$

$$\Rightarrow \log N = \log 2^{\mu t} + \log N_0 \Rightarrow \log N = \boxed{\mu} t \boxed{\log 2} + \boxed{\log N_0}$$

$$y = a x + b \quad \leftarrow \text{Équation d'une droite} \quad \leftarrow \text{Constante}$$

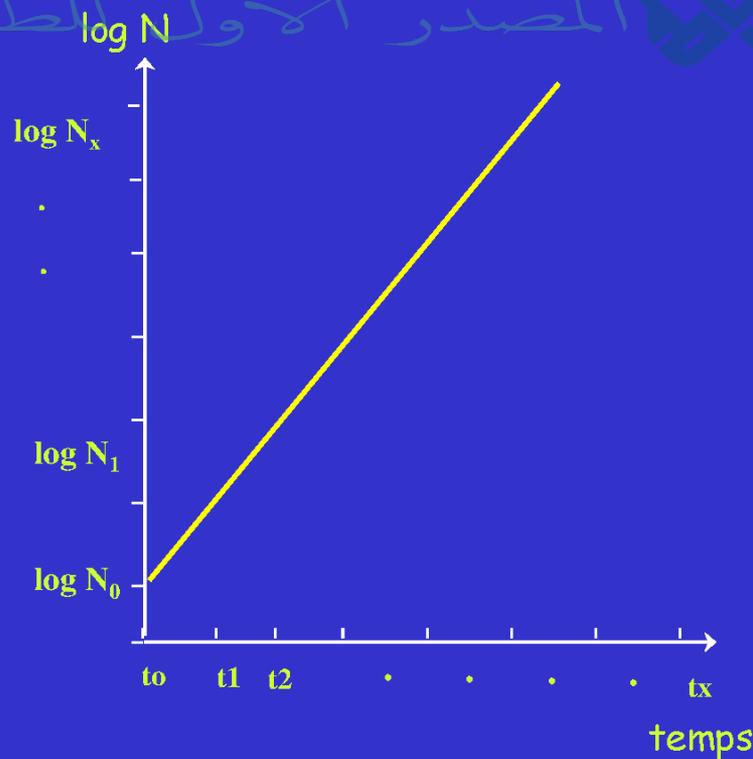
$$\text{Pente de la droite: } P = a = \mu \log 2 \Rightarrow \mu = P / \log 2$$

$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{t \log 2}$$

## Représentation logarithmique

Courbe:  $\log N = f(\text{temps})$

Echelle  
logarithmique



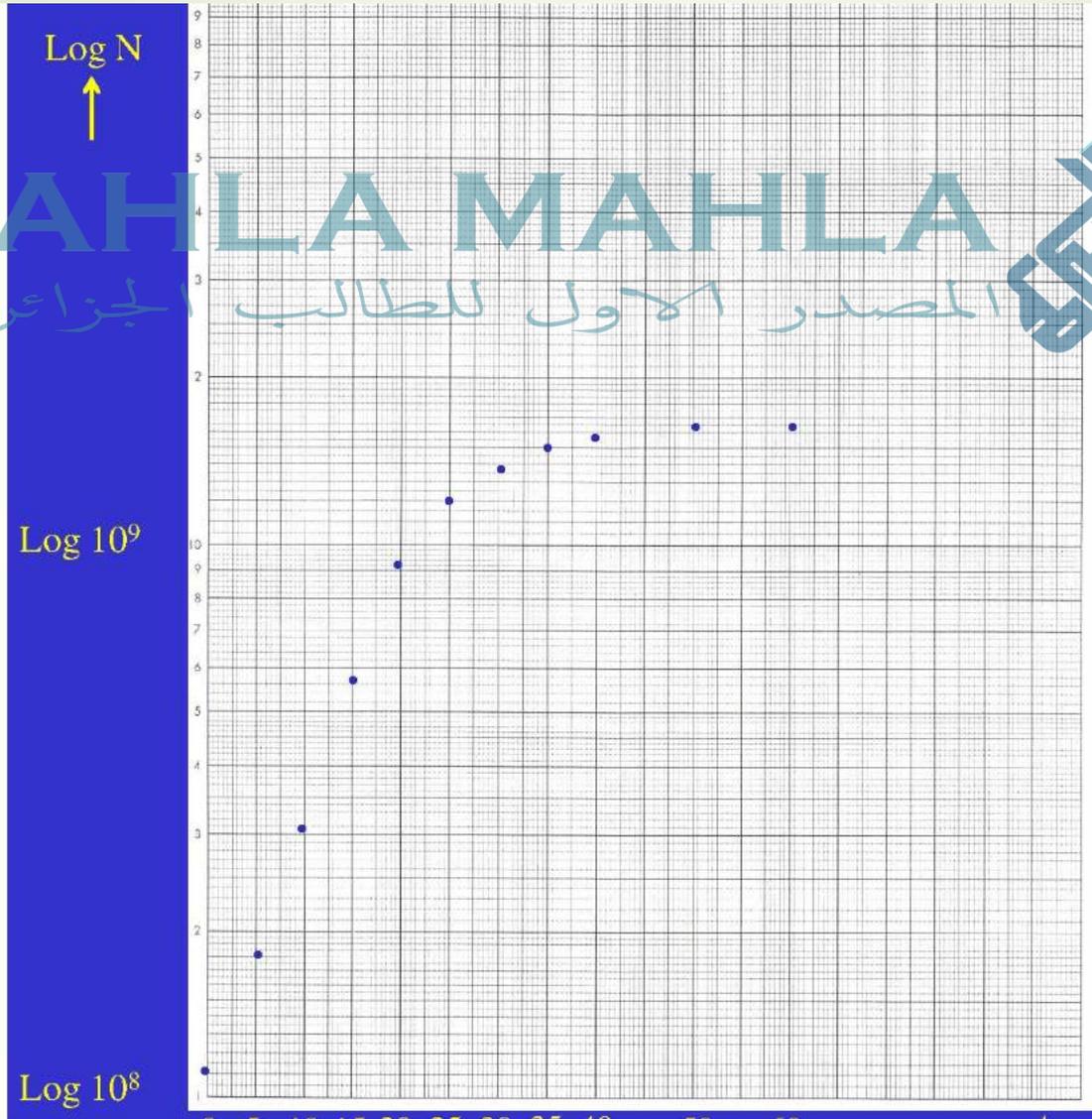
Echelle  
arithmétique



Tracer la courbe sur un papier semi-logarithmique

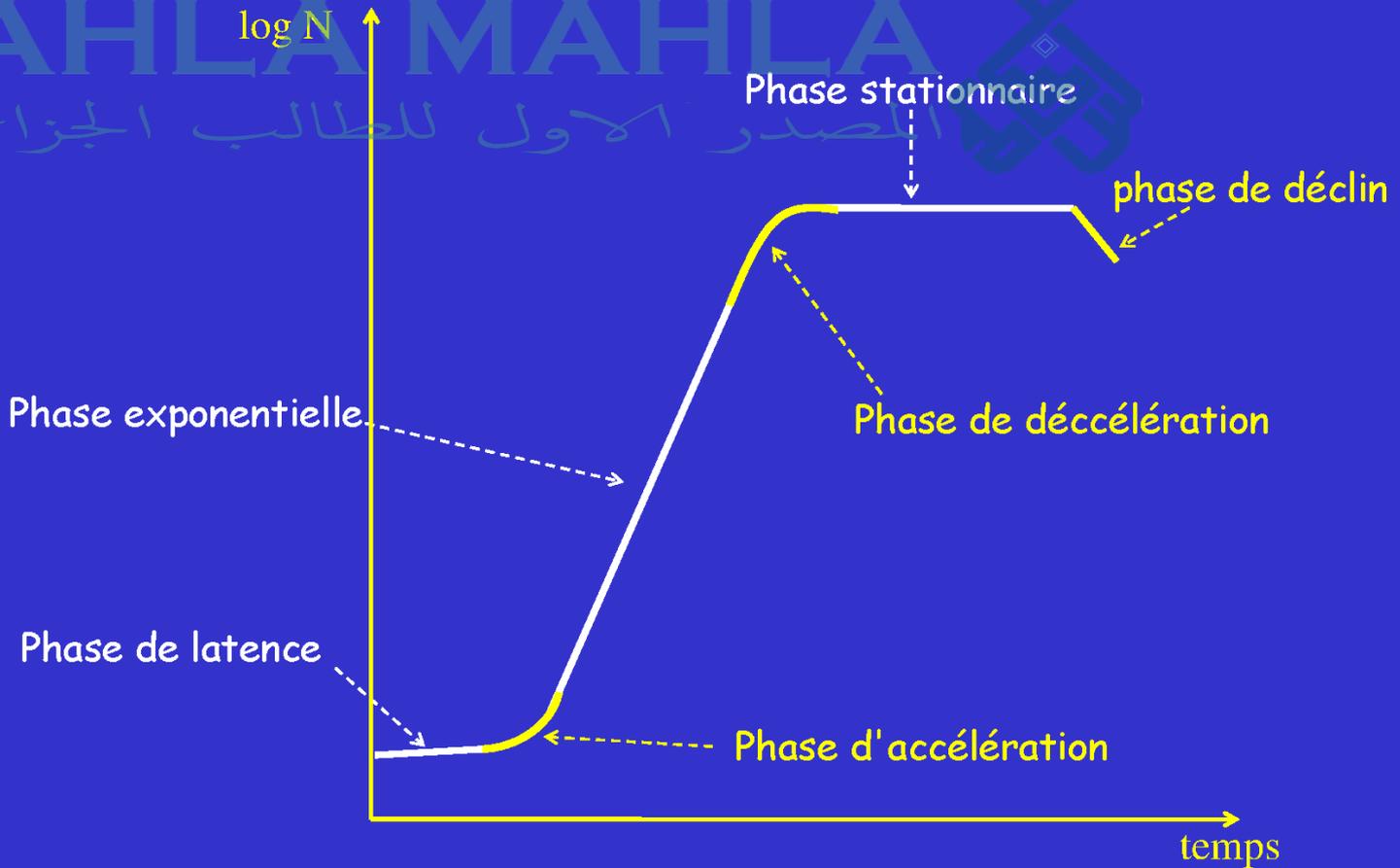
# SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Temps en heure (H)	Nombre bactéries ml
0	1,1 10 <sup>8</sup>
5	1,8 10 <sup>8</sup>
10	3,1 10 <sup>8</sup>
15	5,4 10 <sup>8</sup>
20	9,2 10 <sup>8</sup>
25	1,2 10 <sup>9</sup>
30	1,4 10 <sup>9</sup>
35	1,55 10 <sup>9</sup>
40	1,6 10 <sup>9</sup>
50	1,65 10 <sup>9</sup>
60	1,65 10 <sup>9</sup>

## ⑦ Les phases de croissance



## ☞ *La phase de latence*

➤ Pas de croissance,  $N_0 = \text{Constant}$  et donc :

$$\mu = 0$$

*Causes:*

- L'âge des bactéries
- La composition du milieu de culture

## ☞ *La phase d'accélération*

➤ Début de croissance, le nombre bactérien augmente

$$\mu > 0$$

*Causes:*

début d'adaptation des bactéries au milieu

## ☞ La phase exponentielle

➤ C'est la phase physiologique idéale pour la croissance

➤ Le temps de génération **G est minimal**

➤ Le taux de croissance  **$\mu > 0$ , maximal et constant**

➤ Sur papier semi logarithmique: **phase exponentielle = droite**  
(relation proportionnelle entre le log N et le temps).

$$\text{Log } N = \mu t \log 2 + \log N_0$$

(équation d'une droite:  $Y = ax + b$ )

➤ La phase exponentielle dure généralement quelques heures.

## ☞ *La phase de ralentissement*

➤ Taux de croissance  $\mu$  diminue

- L'augmentation de N dans le temps est plus faible que durant la phase exponentielle,
- Le milieu devient moins favorable à la croissance.

## ☞ *La phase stationnaire*

➤ Il n'y a plus de croissance:  $\mu = 0$

➤ Nombre de cellules viables est constant:

Equilibre entre cellules qui meurent et celles qui apparaissent ou même nombre de cellules viables sans division ni disparition.

*Causes:*

- ✓ l'épuisement du milieu de culture,
- ✓ l'accumulation de métabolites toxiques,
- ✓ l'évolution défavorable des conditions physico-chimiques



☞ *La phase de déclin*

SAHLA MAHLA

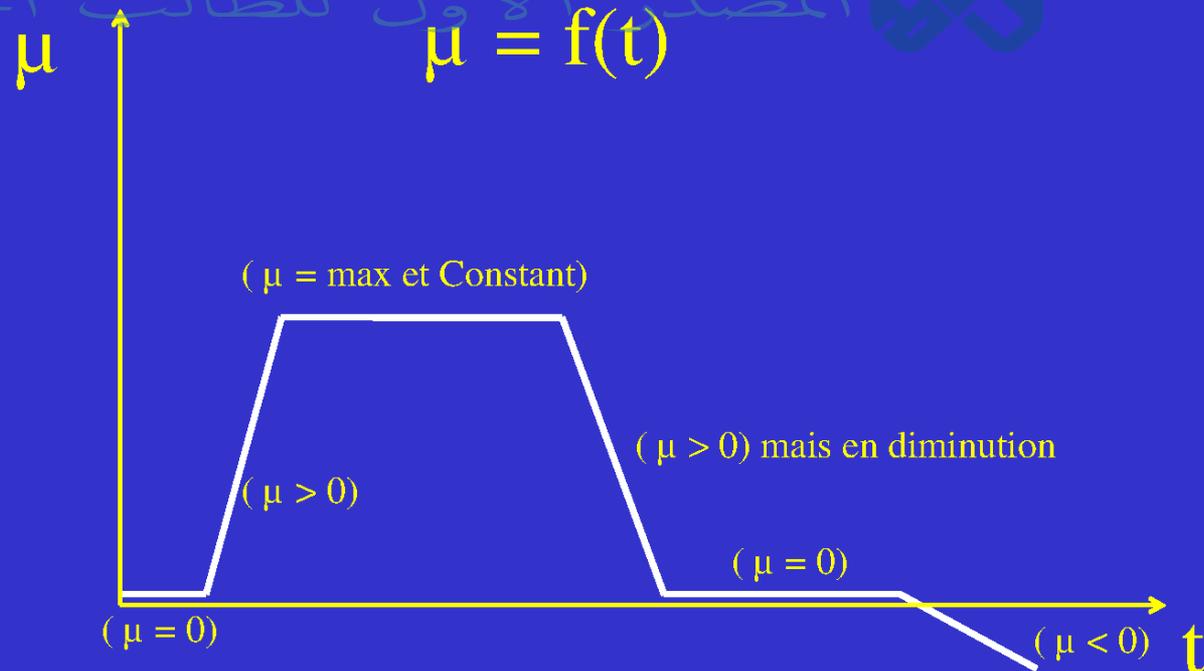


➤ Le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ).

➤ Les bactéries ne se divisent plus, beaucoup meurent et certaines sont lysées

➤ Cette phase est visible ou pas selon la méthode d'étude:  
nb bactéries viables (toujours) /turbidimétrie (si lyse)

## ⑧ Variation de $\mu$ pendant les phases de croissance

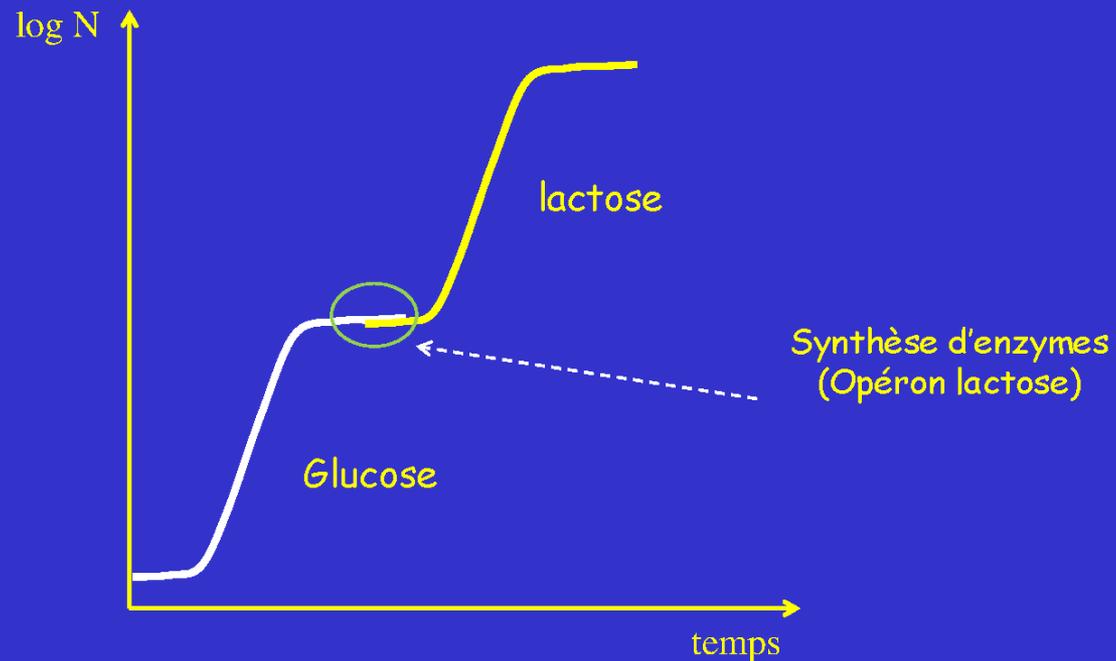


## ⑨ Cas particuliers de croissance

### 9.1. Cas de la diauxie

Croissance dans 1 milieu synthétique en présence de 2 substrats carbonés.

Exemple: croissance d'*E. coli* en présence de glucose et de lactose



Courbe de croissance diauxique (diauxie)

# Avantages et inconvénients de la culture en batch

## Avantages

- Pas de perte de microorganismes durant la culture
- Possibilité de recueil des produits synthétisés à tout moment, y compris durant la phase de déclin
- Peu de risques de contamination de la culture

## Inconvénients

- Existence d'une phase de latence impropre à la production
- Pas de maintien de la phase exponentielle : donc biomasse et produits recueillis en quantités faibles : **rendement limité**
- Difficulté de stériliser de grands volumes de milieu
- Préparation longue

### 9.3. Croissance continue

Dans les conditions habituelles de croissance, la phase exponentielle ne peut durer que quelques heures.

Expérimentalement, on peut maintenir une culture en croissance exponentielle pendant plusieurs heures voir plusieurs jours.

Pour cela, il faut renouveler constamment le milieu de culture tout en éliminant les produits résultant du métabolisme cellulaire.

C'est le principe des **fermenteurs industriels**.

## 2- le procédé de culture continue

### 2-1-Principe de la culture en milieu renouvelé

Culture du microorganisme en vase non clos de façon à maintenir **en permanence en phase exponentielle grâce à**

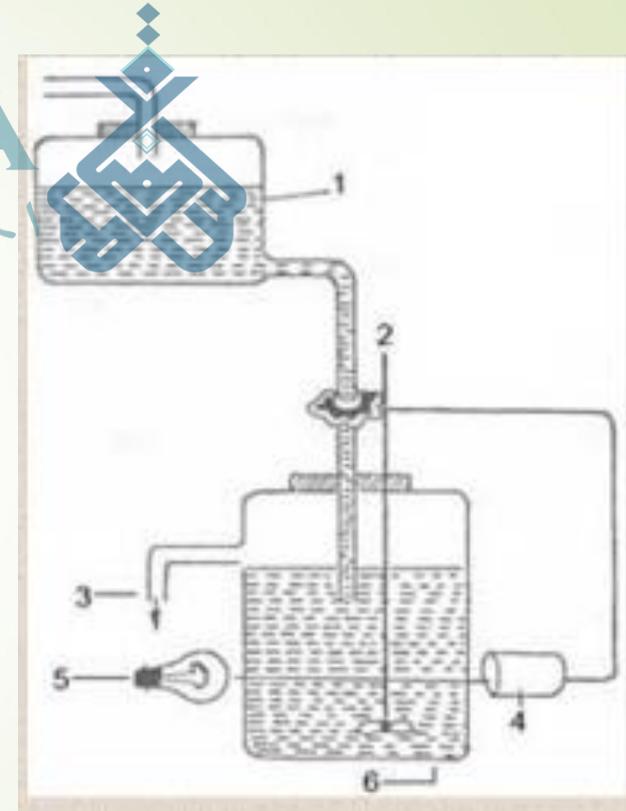
- une addition régulière de milieu neuf stérile pour réapprovisionner en nutriments et maintenir le pH
- un soutirage d'une quantité équivalente de milieu de culture permettant ainsi l'élimination régulière des déchets.

#### a) Matériels de culture

- Turbidostat
- Chemostat ou bactogène

## A 1) Le turbidostat

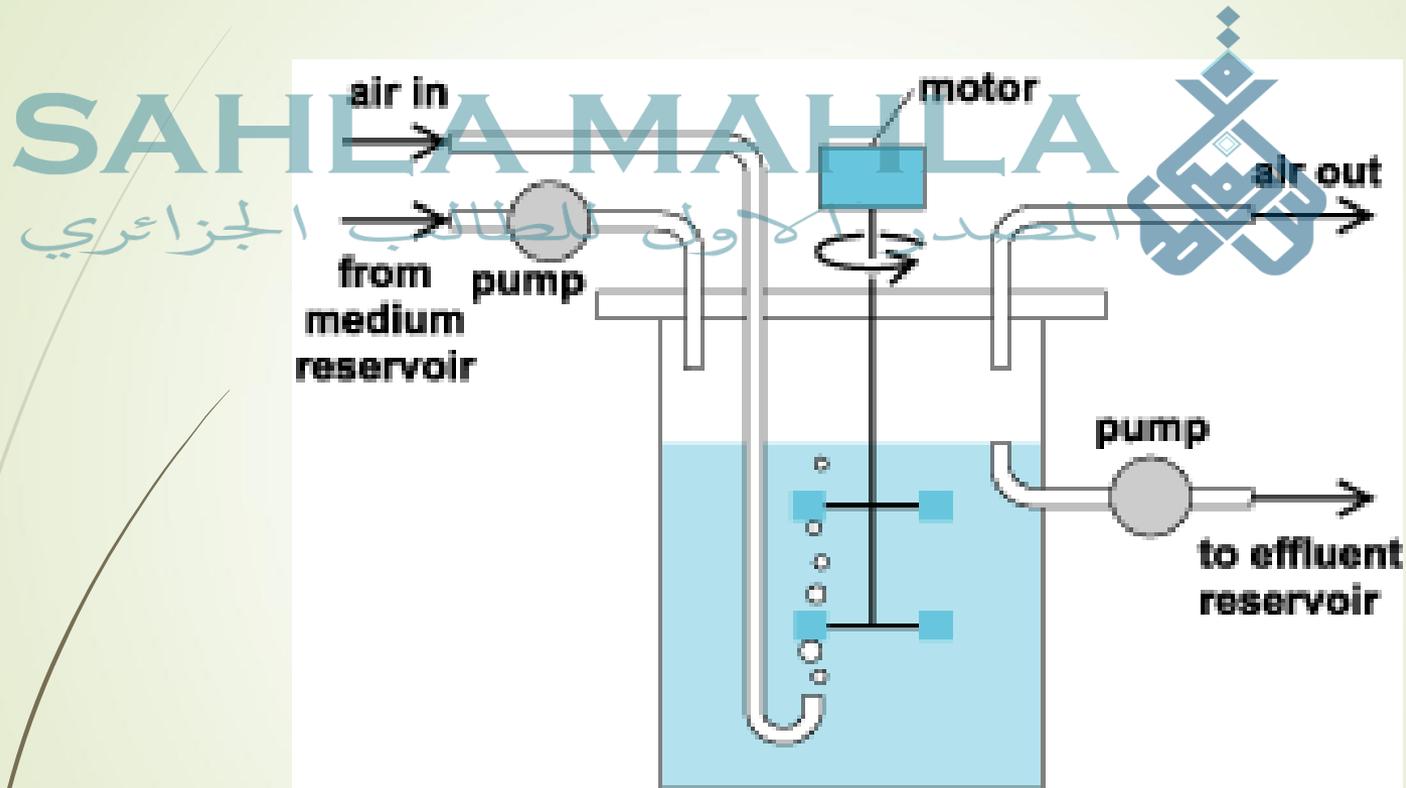
- 1- Réservoir de milieu stérile
- 2- Valve de contrôle du flux de milieu neuf
- 3- sortie de milieu de culture
- 4 – cellule photoélectrique reliée à la vanne d'entrée de milieu neuf ce qui permet via un système électronique une autorégulation du débit en fonction de la concentration de la biomasse mesurée en sortie.
- 5- Source lumineuse
- 6- Schéma d'un turbidostat



## ■ Principe de fonctionnement du turbidostat

- Un turbidostat est un dispositif de culture en continu. La concentration du milieu de culture est maintenue constante par un contrôle turbidimétrique.
- Si le trouble tend à trop augmenter il y a une augmentation d'apport de milieu neuf qui dilue et ramène le trouble à sa valeur initiale.
- Si le trouble tend à trop diminuer il y a diminution d'apport de milieu neuf jusqu'à ce que la croissance ait permis de retrouver la valeur initiale

## A -2 Le chémostat



## ■ Principe de fonctionnement du chemostat

Introduction de milieu neuf stérile dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes est éliminé (c'est le volume de milieu frais qui chasse par trop plein le volume de culture microbienne).

### Conséquences :

stabilité de concentration en substances nutritives limitantes

microorganismes soumis à une bonne aération, à une vigoureuse agitation et ayant toujours à leur disposition les éléments nutritifs dont ils ont besoin

## ■ Avantages et inconvénients de la culture en continu

### Avantages

- Maintenance de la phase exponentielle : rendement optimal
- Stérilisation facile du milieu
- Récupération des produits au fur et à mesure de leur production

### Inconvénients

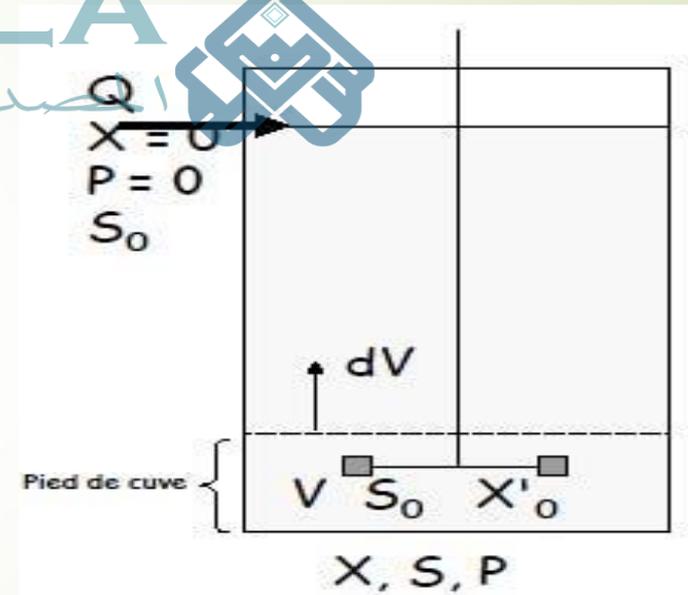
- Difficulté du contrôle du système de régulation
- Difficulté du maintien d'une culture pure
- Pas de possibilité de fabrication de produits libérés uniquement durant la phase de déclin.

### 3-Fermentation discontinue alimentée ("fed batch")

#### 3-1 Principe de la culture en milieu renouvelé

La fermentation est initiée dans un plus faible volume (ped de cuve). Donc pour une même taille d'inoculum, la fermentation va démarrer plus vite.

- Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance, le milieu stérile est introduit dans la cuve. Le débit est réglé de sorte à ce que, par exemple,  $[X]$  ou  $[S]$  soit constant dans la cuve



fermenteur alimenté discontinu  
(Fed batch)

- 
- Lorsque la cuve est remplie, on coupe l'alimentation, la culture évolue alors conformément à la courbe de croissance discontinue. المصدر: الألوغ والمجاهري

Permet d'orienter si nécessaire le métabolisme de la souche et de stimuler la production de métabolites après avoir favorisé la croissance

## ■ Avantages et inconvénients de la culture en discontinue alimentée

### Avantages

- Technique très utilisée en pratique:
- 1- gain de temps et de productivité
- 2-possibilité de travailler à  $\mu$  max.
- 3-possibilité de modifier la composition du milieu durant l'opération.
- 4-moins de risque d'inhibition.

### Inconvénients

- 1- Coûts d'installation supérieurs à ceux d'un batch.
- 2-Grande quantités de milieux nécessaire se qui implique sa stérilisation en continue.
- 3-La souche utilisée doit être totalement caractérisée.

## IV-2- Systèmes en phase solide

Dans ces systèmes, les substrats sont simplement humidifiés et non solubilisés ou en suspension. Les substrats les plus utilisés sont les grains céréales, les copeaux de bois, la paille, etc. Les microorganismes doivent avoir la particularité de présenter une tolérance à un AW faible : c'est le cas des levures et des champignons filamenteux. Plusieurs types de systèmes sont utilisés : colonnes à lits fixe, plateaux, fermenteur rotatif (Figure ). **Leurs principaux avantages résident dans leur simplicité, la forte productivité obtenue et le peu d'énergie exigée.**

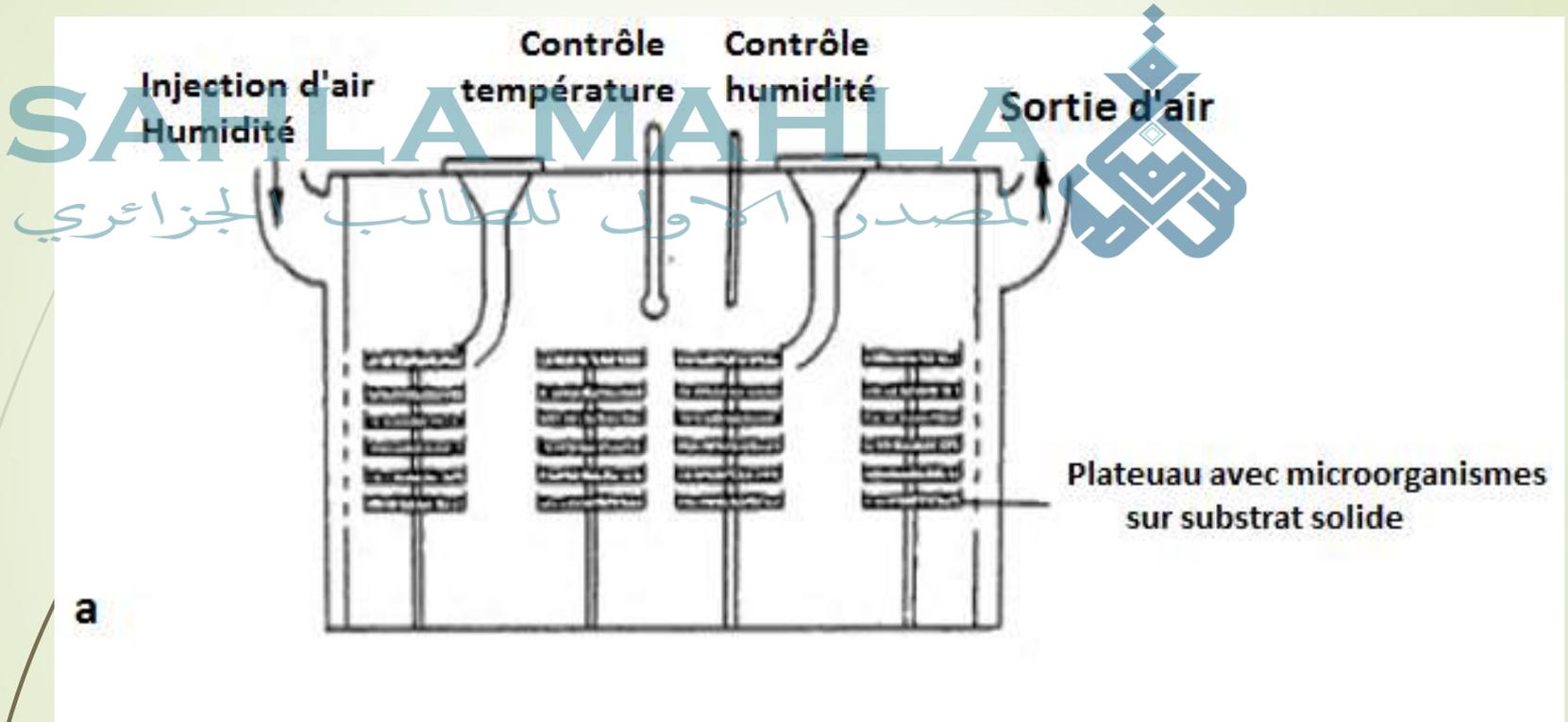


Figure: système en phase solide : (a) plateaux

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري

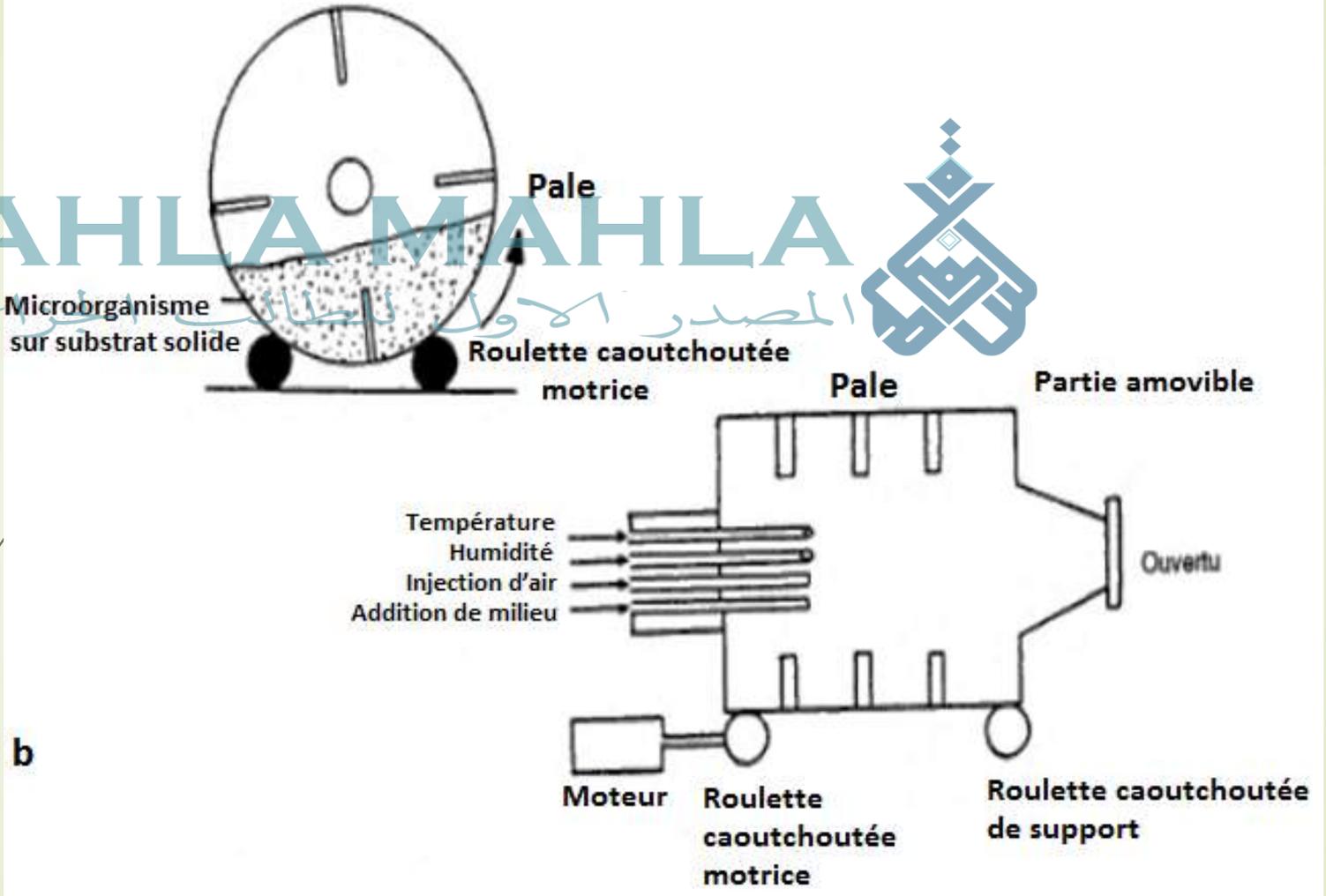


Figure: système en phase solide: (b) fermenteurs rotatifs

## Les avantages de la fermentation solide

Parmi les avantages des fermentations solides :

-C'est une technique simple à réaliser et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué;

-L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes;

-Elle assure une forte productivité en métabolites;

-Il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides;

.

## Inconvénients des fermentations solides:

- Les microorganismes utilisés sont limités, seuls les microorganismes se développant en faible  $A_w$  peuvent être utilisés;
- Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés;
- La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation;
- Le contrôle *on line* des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, est assez aléatoire;
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.

## SAHLA MAHLA

### IV.3-Systèmes immobilisés

المصدر الأول للطالب الجزائري



Dans ce type de procédé, les microorganismes producteurs n'évoluent pas librement dans le milieu, mais sont immobilisés sur un support ou une matrice. À l'entrée il y a introduction du milieu frais qui alimente la biomasse et à la sortie un milieu fermenté qui contient le produit désiré. La chlorotétracycline, la céphalosporine et la bacitracine ont été produites grâce aux cellules immobilisées.

## Les avantages des systèmes immobilisés :

-Conservation du matériel biologique en fin de culture qui est réutilisable pour d'autres cycles;

-Opération de récupération des produits facilités, la souche n'étant pas dispersées dans le milieu réactionnel;

-Accroissement de la densité cellulaire et des vitesses de réaction.

Quatre types d'immobilisation peuvent être utilisés:

**-L'adsorption:** qui est un processus ancien utilisé lors de la fabrication du vinaigre, dans lequel les *Acetobacter* sont adsorbés sur des copeaux d'hêtre. Maintenant, on utilise des billes de PVC, de DEAE cellulose (exp : *Nocardia erythropolis* : conversion des stéroïdes).

SAHILA MAHILA

المصدر الأول للطالب الجزائري



**-L'inclusion:** avec incorporation des microorganismes dans une matrice d'un polymère rigide tel que l'alginate de sodium (*Sc. cerevisiae* : production d'alcool, *Methanosarcina barkeri* : production de méthane, polyacrylamide (*Arthrobacter simplex* : production d'hydrocortisone, *B. subtilis* : production d'alpha-amylase, *Aspergillus niger* : production d'acide citrique).

Plusieurs réalisations sont possibles : le gel peut être mis dans une colonne, dans laquelle circule le milieu frais qui en ressort avec les produits de biosynthèse.

**-La liaison covalente:** qui est moins utilisée pour les microorganismes. Il s'agit d'une liaison covalente chimique irréversible qui met en jeu les groupements des chaînes latérales des acides aminés et un ligand fixé sur le support. Outre l'irréversibilité, ce système présente l'inconvénient d'utiliser comme ligand des réactifs souvent toxiques pour les microorganismes

**-La floculation:** système par lequel on provoque l'agrégation des cellules, par exemple par l'addition de polyélectrolytes (chitosane). Elle est notamment utilisée dans le traitement des eaux résiduaires en boues activées.

## Divers processus sont utilisés dans les systèmes immobilisés :

**\*Réacteurs à lit fixe** : entassement des billes dans une colonne, l'aération et les divers contrôles étant effectués par un système externe (**Figure a**).

**\*Réacteurs à lit fluidisé** : où l'on évite un colmatage des billes en ajustant leur densité et la vitesse d'écoulement, ceci permettant de meilleurs transferts de matière.

**\*Réacteurs à fibres creuses** : on fait circuler le milieu de culture au travers de fibres creuses où les cellules se développent (**Figure b**).

**\*Réacteurs à plaques semi perméables** : voisin du précédent, les fibres étant remplacées par des membranes semi-perméables



## Partie II- L'AVAL (DOWNSTREAM)

SAHLA MAHLA

المعهد العالي للدراسات والبحوث  
الطبيعية والبيئية

A l'issue de la fermentation, il s'agit bien sûr de récupérer le produit désiré et de le conditionner en vue d'une commercialisation. Toutefois, le contenu du réacteur est complexe puisqu'il comprend une phase solide, représentée par la biomasse et éventuellement d'autres particules, ainsi qu'une (ou deux, dans le cas des réacteurs biphasiques) phase(s) liquide(s) dans laquelle (lesquelles) se trouvent en solution divers métabolites et des résidus de substrat non métabolisés



A l'exception des cas de bioconversion pure où le produit correspond au substrat modifié et chargé de la biomasse (ex : yogourt, choucroute, ensilage, compost, bières non filtrées, ...), il est quasi toujours nécessaire de procéder à des opérations de séparation en vue de récupérer le produit d'intérêt.

Une difficulté supplémentaire concerne les endométabolites dont la récupération suppose d'avoir au préalable détruit les cellules afin d'en extraire le cytoplasme. Lequel devra ensuite être traité en vue de capter les molécules d'intérêt.



Il reste enfin à conditionner le produit afin de le rendre commercialisable. Cela implique une stabilisation en vue d'une conservation à long terme et à température ambiante s'il s'agit de ferments, ou une déshydratation plus ou moins poussée avec adjonction éventuelle de matières complémentaires (masse, protecteur, ...) lorsqu'on fabrique des molécules particulières.

## 3-1 TECHNIQUES DE SEPARATION

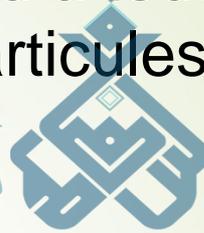
Dans le contexte des étapes relatives à la récupération du produit d'intérêt (downsteam process) différentes technologies peuvent être mises en oeuvre.

Aucune d'entre elle n'est spécifique du domaine de la microbiologie industrielle. On les retrouve donc dans de nombreux secteurs industriels tels que le traitement des fumées, l'industrie chimique, ...

# 1. SEPARATION PARTICULAIRE (SOLIDE / LIQUIDE)

La séparation solide / liquide correspond à toutes les techniques permettant d'extraire des particules d'un fluide liquide ou gazeux.

SAHILA MAHILA  
المصدر الأول للطالب الجزائري

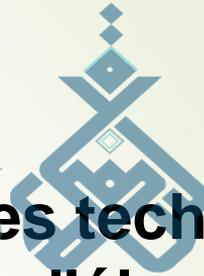


**Deux méthodes principales permettent de parvenir à l'objectif d'extraction :**

- leur conférer une force perpendiculaire à celle du fluide dans lequel elles se trouvent, d'une part,**
- ou placer un matériau perméable au fluide mais imperméable aux particules en travers du flux, d'autre part.**



# SAHLA MAHLA



- La première philosophie« : inclut les techniques de sédimentation, de centrifugation, et d'électrofiltration
- la seconde fait appel à tout ce qui concerne la filtration.

## A/ Sédimentation

# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



### Principe

La sédimentation consiste à profiter de l'attraction terrestre pour extraire les particules en suspension. Pour ce faire, afin de permettre aux particules de descendre vers le fond du bassin on introduit le fluide porteur dans une zone la plus calme possible. Il est clair, en effet, que toute turbulence risque de perturber cette chute.



En fait, les particules en suspension sont soumises à 3 forces :

- la gravité qui les attire vers le bas,
- la poussée d'Archimède qui s'exerce vers le haut
- et les forces de frottement qui s'opposent à tout mouvement.



SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري

Pour assurer l'extraction, le temps de séjour dans le bassin doit être supérieur ou égal au temps de chute de la plus petite particule que l'on désire éliminer.

Autrement dit, il faut que la vitesse de chute de la particule soit supérieure à la vitesse d'avancement du fluide porteur.

# B/Centrifugation

## Principes

Les principes de base de la centrifugation sont exactement les mêmes que pour la sédimentation.

La mise en rotation du fluide et de son contenu induit l'apparition d'une force centrifuge qui s'applique aux particules les plus denses et tend à les repousser vers la périphérie du système. Bien entendu, la gravité et les forces de frottement n'ont pas disparu, mais elles deviennent quasi négligeables par rapport à l'intensité de la force centrifuge, qui dépend de la vitesse de rotation.

# C/Filtration

المصدر الأول للطالب الجزائري



## Principes

Les techniques de filtration reposent sur un tout autre principe puisque ce n'est plus la densité des particules qui permet de les extraire mais bien leur **taille**. En effet, d'une manière générale, un filtre est un matériau poreux dont le diamètre des pores autorise ou non le passage des substances qui le traversent, exactement comme un tamis



il est possible actuellement de procéder à de la microfiltration voire de la nanofiltration, ce qui signifie que des particules de l'ordre respectivement du micromètre (cellules procaryotes) voire du nanomètre (taille de certains virus) peuvent être retenues. Les techniques d'osmose inverse, qui s'apparentent à de la filtration puisqu'elles sont toujours basées sur la taille des pores de la membrane qui sépare le liquide à filtrer du liquide filtré, permettent des séparations encore plus fines, au niveau moléculaire.

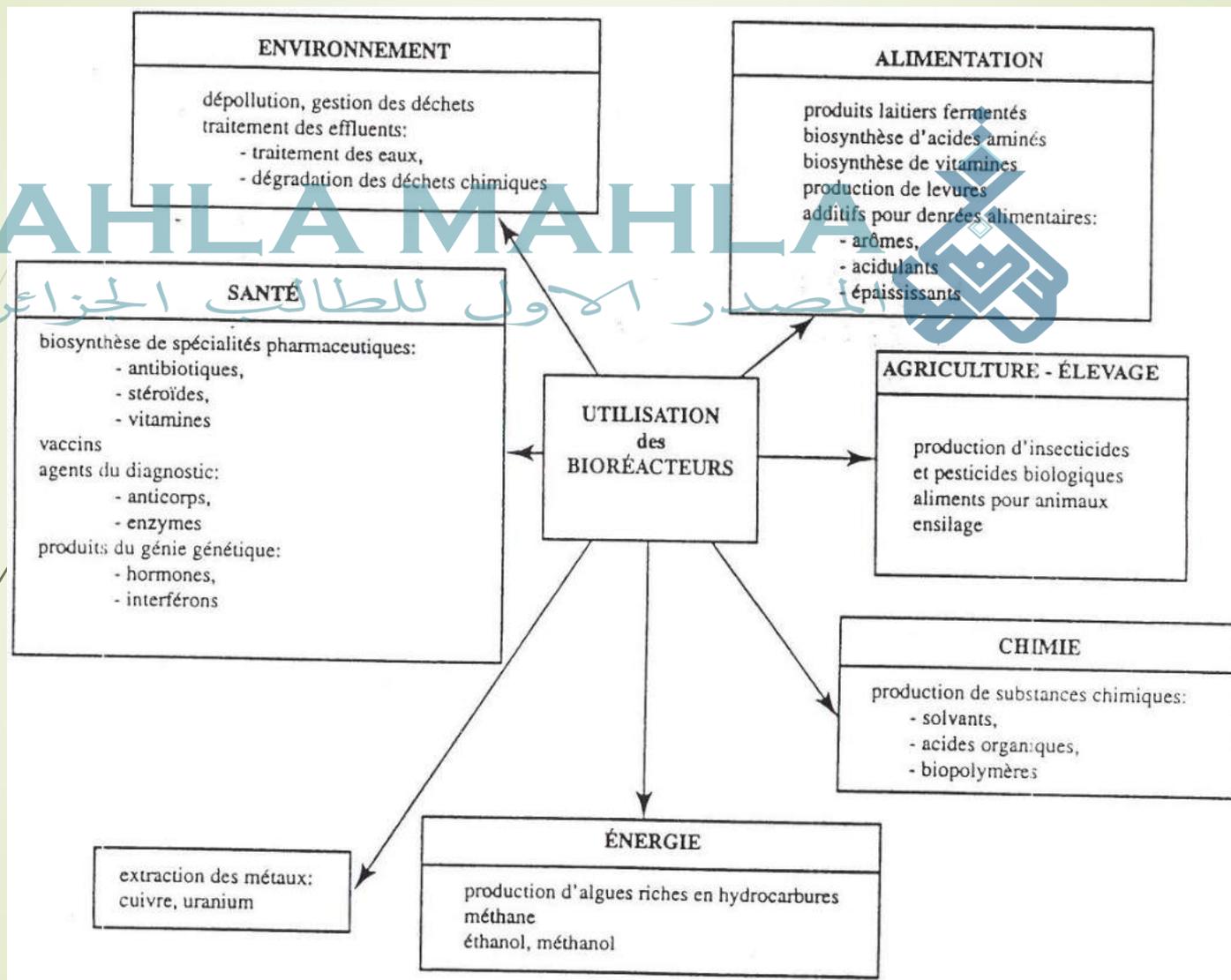


## 2-SEPARATION MOLECULAIRE

SAHLA MAHLA

Lorsqu'il s'agit de récupérer, à l'état pratiquement pur, une molécule d'intérêt (un métabolite) issue du métabolisme ou résultant de la transformation du substrat, de nombreuses techniques parfois extrêmement sophistiquées peuvent être mises en oeuvre. On parle alors de distillation, d'absorption dans un solvant, de chromatographie, d'électrophorèse .

# Partie III / Applications industrielles



# I/ Production des métabolites et molécules d'intérêt

## 1- Production de métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des composés associés aux synthèses cellulaires généralement produits **pendant la phase de croissance**.

Les cellules accumulent rarement un précurseur biochimique particulier : la synthèse est adaptée aux besoins suscités par la croissance.

Productions	Micro-organismes	Milieux de culture	Productions	Utilisations
<b>Biomasse :</b> Protéines alimentaires	<i>Methylophilus methylotrophus</i> <i>Ca. utilis</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Pe. cyclopium</i>	Méthanol Ethanol Amidon Lactosérum	10 000 t/an 100 t/an 300 t/an	Alimentation animale Additif alimentaire Alimentation humaine Alimentation animale
<b>Métabolites primaires :</b> Acides aminés Ac. glutamique Thréonine  Acides organiques Ac. acétique Ac. citrique  Ac. lactique Ac. gluconique	<i>C. glutamicum</i> <i>B. subtilis</i>  <i>Acetobacter aceti</i> <i>Aspergillus niger</i>  <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>A. Niger</i>	Mélasses Mélasses  Ethanol, vin Mélasses  Lactosérum	370 000 t/an 160 t/an  300 000 t/an 400 000 t/an  40 000 t/an 45 000 t/an	66 % Alim. humaine 33 % Alim. animale 1 % Domaine médical  Vinaigre 60 % Alimentation (acidulant, émulsifiant, anti-oxydant) 10 % Indus. pharmaceutique et cosmétique Acidifiant alimentaire Stabilisant produits carnés
<b>Biofuel :</b> Ethanol	<i>Sc. cereviseae</i>  <i>Cl. thermocellum</i>	Amidon de céréales Mélasses canne à sucre Cellulose	10 M t/an (Brésil)	Biocarburant, solvant

<b>Lipides :</b>	<i>A. fumigatus</i> <i>Mucor miehi</i> <i>Pe. spinulosum</i>	Maltose Glucose Mélasse	2 500 t/an 1 200 t/an 8 t/an	Alimentation
<b>Nucléotides :</b> 5' IMP 5' GMP ATP	<i>B. subtilis</i> <i>B. ammoniagenes</i> <i>B. ammoniagenes</i>	Caséine, extrait lev. Guanine, biotine Adénine, glucose		
<b>Polysaccharides :</b> Dextrane Xanthane Alginate	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	Saccharose 10-15 % Amidon Saccharose 8 g/l	191 t/an 610 t/an 60 000 t/an	Alimentation (gélifiants), Pétrochimie (émulsifiants), Adhésifs, immobilisation de cellules ou d'enzymes
<b>Vitamines :</b> B 12	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Ps. denitrificans</i>	« Corn steep », glucose Mélasse betterave, extrait de levure		36 % Pharmacie
B 2 Précurseur vit. C	<i>Eremothecium sahyii</i> <i>Acetobacter suboxydans</i>	Glucose, urée Sorbitol 20 %		64 % Additifs alimentaire

## 2- Production de métabolites secondaires : antibiotiques

Les métabolites secondaires sont produits habituellement **après la phase de croissance** : ils n'ont pas de relation directe avec la synthèse de matières cellulaires.

Productions	Micro-organismes	Milieux de culture	Utilisations
Métabolites secondaires : Antibiotiques			
Pénicillines	<i>Pe. chrysogenum</i>	« Corn steep », glucose, lactose	Thérapeutique
Rifamycine	<i>Amycolata mediterranei</i>	Farine de soja, glucose	
Produits pharmacologiquement actifs			
Ergotamine	<i>Claviceps purpurea</i>		Migraines
Valiomaline	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>		Diabète
Compactine	<i>Pe. citrinum</i>		Cholestérol
Cyclosporine	<i>Tolypocladium inflatum</i>		Immunosupresseur
Arômes			
Anisaldéhyde	<i>Trametes suavis</i>		Anis
Geraniol	<i>Ceratiocystis variispora</i>		Rose
Méthylphénylacétate	<i>Trametes odorata</i>		Miel
Insecticides			
Toxine	<i>B. thuringiensis</i>	Farine de coton, Glucose, peptone	Anti-lepidoptère, diptère
Hormones végétales			
Gibberellines	<i>Phaecosphaeria sp.</i>	Sirop de maltose, farine de soja	Suppression de la dormance, floraison

### 3-Production des métabolites primaires et secondaires au cours de la croissance

Les phases de la croissance doivent donc être parfaitement maîtrisées pour optimiser la production des métabolites d'intérêt

المصدر الاول للطالب الجزائري

