



## Chapitre 3: Les milieux de culture industriels



## **1. Généralités sur les milieux de culture industriels**

- Les milieux de culture industriels désignent les substances composées d'ingrédients spécifiques, qui sont utilisées pour cultiver des microorganismes dans un contexte industriel.
- Ces milieux sont formulés de manière à fournir les nutriments essentiels et les conditions optimales de croissance nécessaires à la multiplication et à la production des microorganismes cultivés.
- La composition des milieux de culture peut varier en fonction des besoins spécifiques des microorganismes visés et des produits finaux recherchés.
- Les milieux de culture sont souvent constitués de sources de carbone, d'azote et de sels minéraux, ainsi que de facteurs de croissance pour optimiser la croissance des microorganismes et la production des substances désirées.
- Les milieux de cultures utilisés dans les procédés industriels sont généralement faits à partir de matières brutes.
- Ils sont préparés en très grandes quantités dans des cuves dont le volume peut atteindre plusieurs mètres cubes
- De plus, un agent anti mousse et des produits chimiques tampons peuvent également être ajoutés dans le milieu.

- Lorsque la biomasse constitue le produit cible, le milieu de production doit permettre une croissance optimale du microorganisme.
- Pour la production de métabolites secondaires, (les antibiotiques, leur biosynthèse n'est pas liée à la croissance), les milieux sont conçus pour fournir une période initiale de croissance cellulaire, suivie de conditions optimisées pour la production de métabolites secondaires.
- le milieu de culture peut être: synthétique, semi-synthétique ou complexe.
- le milieu de culture peut être liquide ou solide.

## 2. Les composition des milieux industriels

- Source d'énergie, de carbone, d'azote, minéraux, facteurs de croissance et l'eau.
- Pas de substances inhibitrices de la croissance de la souche d'intérêt.

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

| Source              | Matière brute                                                           |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Carbone et énergie  | Mélasse, Petit-lait, Déchets agricoles                                  |
| Azote               | Farine de soja, Déchets d'abattoir, NH <sub>3</sub> et nitrate, Vinasse |
| Vitamines           | Produits végétaux et animaux.                                           |
| Fer, oligo-éléments | Dérivés chimiques inorganiques                                          |
| Anti-mousses        | Alcools, Silicones, Huiles végétales                                    |

## ✓ **Source de carbone**

- Les sources de carbone jouent un rôle crucial dans les milieux de culture industriels des microorganismes. Ces substances organiques fournissent aux microorganismes l'énergie et le carbone nécessaires à leur croissance. Parmi les sources de carbone les plus couramment utilisées, on trouve le glucose, le lactose, le saccharose, le dextrane et le glycérol.
- Chaque source de carbone a ses propres caractéristiques et peut avoir un impact sur la croissance et le rendement des microorganismes. Par exemple, le glucose est rapidement métabolisé par de nombreux microorganismes, ce qui peut conduire à une croissance rapide mais limitée.
- Le lactose peut être utilisé plus lentement, permettant une croissance prolongée. Le choix de la source de carbone dépend donc des besoins spécifiques du microorganisme et des objectifs de la culture industrielle.
- Pour la plupart des organismes, le poids de la biomasse produit à partir d'un poids donné de substrat carbonée, sous aérobiose, est de 0.5g poids sec par g (de glucose). Par conséquent la quantité de substrat doit être le double du poids de l'organisme.

✓ **Source d'azote:**

- le nitrogène est un élément essentiel parce qu'il représente le composé principale des protéines et des acides nucléiques.
- Pour les bactérie, la composition moyenne en nitrogène est de 12.5%. Pour produire 5g de biomasse par litre il faut utilisé 625 mg de nitrogène.
- L'azote est généralement utilisé sous forme organique ou inorganique:

**1- L'azote inorganique :**

sels d'ammonium de sulfate ( $\text{NH}_4^+\text{SO}_4^-$ ) et le phosphate de d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) ou l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ).

Ce denier est utilisé pour **ajuster le pH** de la fermentation

**2-Azote organiques :** les acides aminés, les protéines et l'urée

ex: le maïs, les extraits de levure, les peptones et la farine de soja (riches en protéines, des acides nucléiques, des vitamines, des oligoéléments, des lipides, des sucres, du soufre et du phosphate).

✓ **Les sels minéraux:** Les sels minéraux sont très essentiels ayant des rôles très divers :

- Eléments constitutifs des antibiotiques (P, S, Cl...). ; de la biomasse (Mg, P, Cl, Ca, Fe,..)
- Responsable de la pression osmotique (NaCl, KCl,...); Modificateur de pH ( $\text{CaCO}_3$ ....)
- Agents de précipitation ( $\text{NH}_4\text{-SO}_4\text{-}2$  ); Catalyseurs de réaction ( $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2/+3}$ , Zn)

- ✓ **Facteur de croissance:** vitamines, acides aminées, nucléotides doivent être ajoutés aux cultures si l'organisme est exigeant (de point de vue nutritionnel).

- ✓ **Les précurseurs**

Les précurseurs sont des molécules intermédiaires qui servent de substrats de départ des réactions au cours de la biosynthèse de métabolites secondaires tels que des antibiotiques.

Ils sont souvent ajoutés de manière contrôlée et sous une forme relativement pure. Par exemples :

- L'acide phénylacétique est ajouté pour la chaîne latérale dans la production de pénicilline.
- D-thréonine est utilisé comme précurseur dans la production de L-isoleucine par *Serratia marsecens*.

- ✓ **L'eau**

- L'eau est un composant majeur dans tous les milieux de culture et responsable de toutes les réactions métaboliques des processus de fermentation industrielle (sauf les fermentations sur substrat solide).

- Sa qualité est très importante pour obtenir des cultures optimales et reproductibles ( ex: L'eau déminéralisée, déionisée sont obtenues par des techniques de filtrations sur membranes)

### **3. Stérilisation du milieu de culture et des composés ajoutés**

La stérilisation du milieu de culture, du bioréacteur et des substrats ajoutés au cours de la fermentation doit être réalisée pour éviter les contaminations non désirées. En effet, les constituants des milieux de culture, l'eau et le matériel contiennent une certaine quantité de micro-organismes sous forme végétative ou de spores. Ils doivent être éliminés avant l'inoculation sans modifier les composants du milieu de culture.

Le traitement thermique est le moyen le plus utilisé pour stériliser le milieu, généralement par autoclavage ou vapeur d'eau chaude. La filtration est aussi utilisée.

#### **3.1. Stérilisation du milieu de culture**

On distingue deux types de procédés de stérilisation de milieu de culture :

le procédé de stérilisation en batch ;

le procédé de stérilisation en continu.

##### **➤ Problèmes liés à la stérilisation**

Le barème déterminé pour la stérilisation du milieu de culture doit permettre d'éliminer toutes formes végétatives et sporulées de micro-organisme et éviter une destruction des composants nutritifs du milieu de culture.

Deux problèmes peuvent se poser lors de la stérilisation du milieu de culture :

- Les composés thermolabiles qui se dénaturent par la chaleur
- Les groupements carbonyles des glucides réducteurs et les groupements aminés des acides aminés et protéines au cours des réactions de type Maillard

### 3.1.1. Stérilisation en batch :

- Elle est réalisée à une température de 121 °C.
- La durée de stérilisation dépend du volume et de la nature du milieu de culture.
- Deux méthodes principales :
  - Stérilisation *in situ* directement dans le bioréacteur.
  - Stérilisation dans un équipement séparé (stérilisateur en batch).
- **Avantages de la stérilisation en batch avec un stérilisateur séparé :**
  - Gain de temps : le milieu peut être stérilisé pendant que le bioréacteur est nettoyé.
  - Réduction de la corrosion du bioréacteur, car il n'est pas exposé à de hautes températures.
  - Possibilité de stériliser des milieux concentrés, utilisant des appareils plus petits.
- **Inconvénients :**
  - Coût plus élevé.
  - Risque accru de contamination lors du transfert aseptique du milieu stérilisé vers le bioréacteur.
- **Préférence industrielle :**
  - Malgré les avantages de la stérilisation en batch, les industriels préfèrent souvent la stérilisation en continu en raison de ses avantages supplémentaires.

### **3.1.2. Procédés de stérilisation en continu**

L'avantage majeur de la stérilisation en continu est qu'il est possible d'atteindre des températures plus élevées que 121 °C afin de diminuer le temps de stérilisation ; les nutriments thermo sensibles du milieu de culture (par exemple les facteurs de croissance) ne sont alors pas dénaturés car le temps de stérilisation est plus faible. De plus, ce temps bref limite la production de composés de la réaction de Maillard.

Il existe deux techniques de stérilisation en continu.

#### **A. Stérilisation en continu indirecte avec échangeurs de chaleur à spirale :**

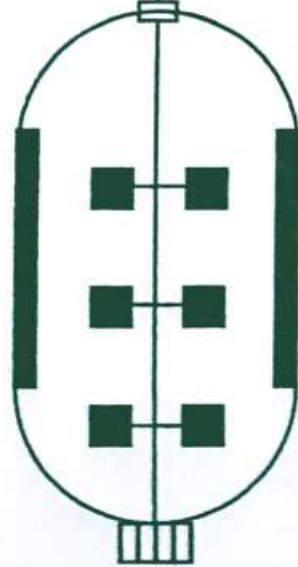
- Utilise des échangeurs de chaleur en spirale en acier inoxydable.
- Le milieu de culture est chauffé par un fluide thermique, puis refroidi.
- Evite l'encrassement causé par les particules en suspension.
- Le transfert vers le bioréacteur doit être aseptique.

#### **B. Stérilisation en continu par injection directe de vapeur :**

- La vapeur est injectée directement dans le milieu de culture.
- Le coût réduit, montée en température rapide, applicable aux milieux contenant des particules, maintenance facile.
- Risque de formation de mousse et dilution du milieu par la vapeur condensée.
- La qualité de la vapeur est cruciale pour éviter d'altérer la composition du milieu.

Stérilisation du milieu de culture *in situ*

Réserve de milieu non stérile



Bioréacteur

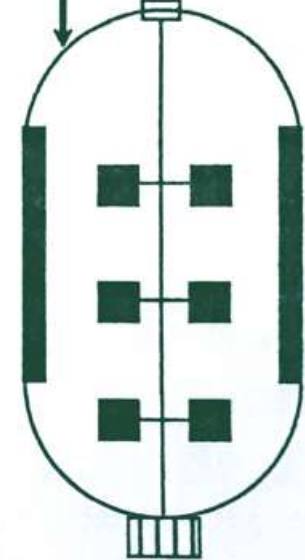
Stérilisation du milieu de culture dans un stérilisateur *en batch*

Réserve de milieu non stérile



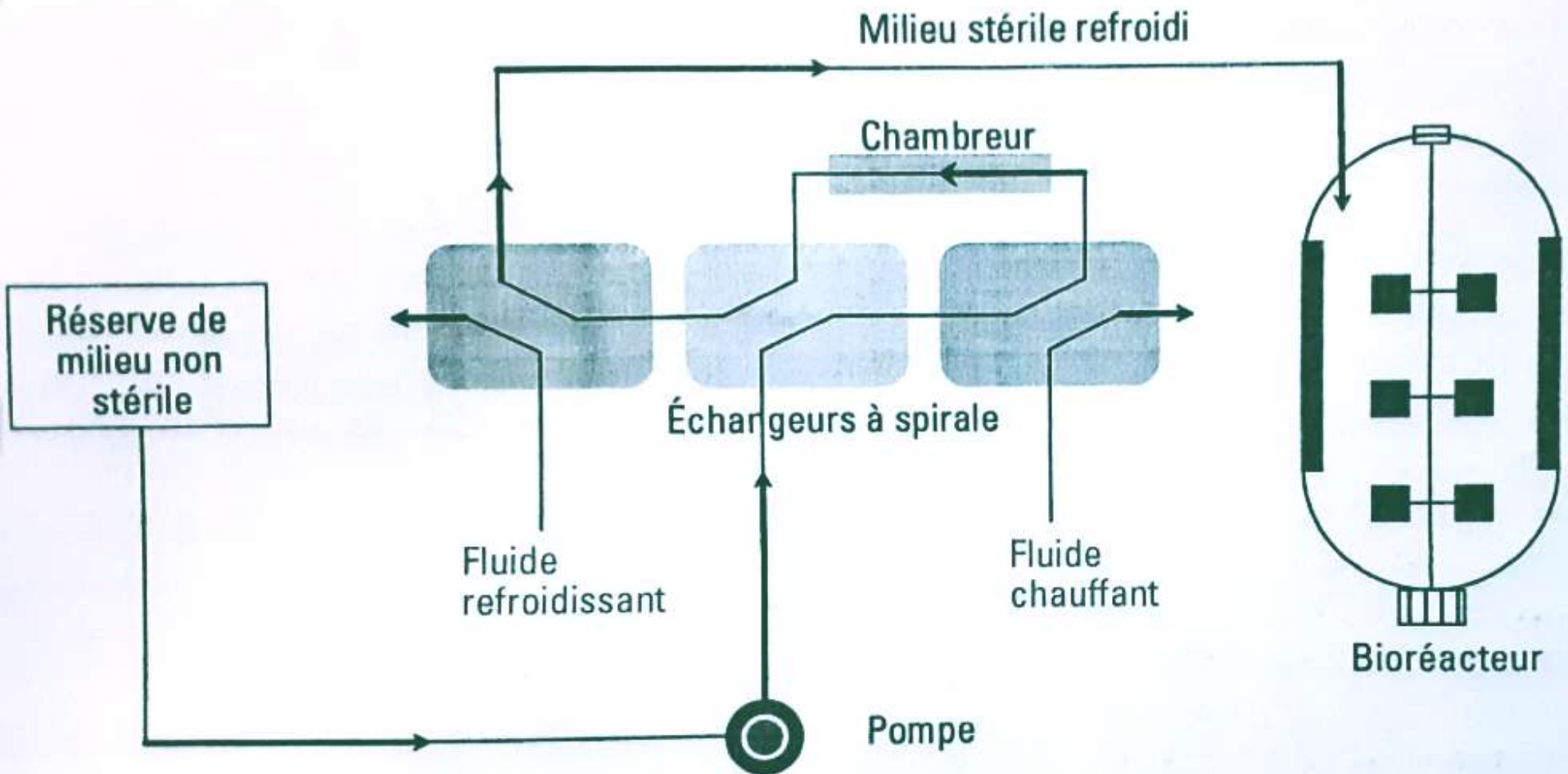
Stérilisateur *batch*

Milieu stérile

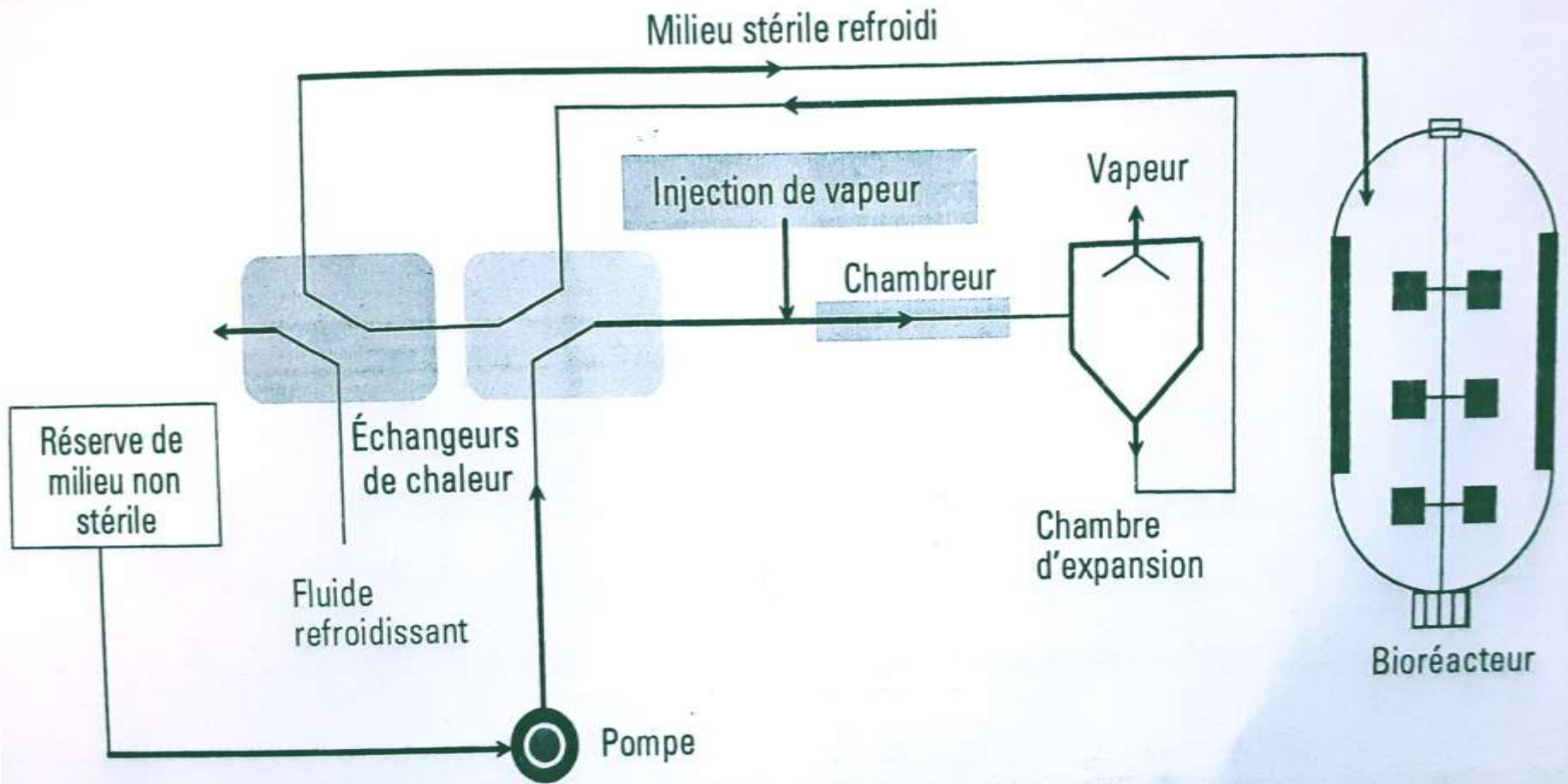


Bioréacteur stérile

*Schémas de principe de la stérilisation in situ et de la stérilisation en stérilisateur en batch*



*Stérilisation du milieu de culture en continu indirecte à l'aide d'échangeurs de chaleur à spirale*



**30** Stérilisation du milieu de culture en continu, directe par injection de vapeur

### **3.2. Stérilisation des composés ajoutés au cours de la fermentation**

Les méthodes utilisées dépendent du volume de solution à injecter au cours de la fermentation. Si le volume est faible, alors la filtration sera utilisée. Par contre, si le volume de supplément est important, on utilisera la méthode de stérilisation en continu.

### **3.3. Stérilisation du milieu contaminé après fermentation**

Après fermentation, la stérilisation du milieu contaminé peut être réalisée par les méthodes décrites ci-dessus : stérilisation en *batch* ou stérilisation en continu.

### **3.4. Nettoyage sur place et stérilisation du bioréacteur**

#### **3.4.1. Nettoyage sur place**

Les fermenteurs industriels nécessitent d'être nettoyés sur place après utilisation et avant une nouvelle stérilisation (méthode CIP, *Cleaning In Place*).

#### **3.4.2. Stérilisation du bioréacteur**

On distingue deux cas :

si le milieu de culture est stérilisé *in situ*, alors le bioréacteur est stérilisé en même temps que le milieu de culture ;

si le milieu de culture est stérilisé dans un stérilisateur en *batch* ou s'il est stérilisé par un procédé de stérilisation en continu (indirecte ou directe), alors le bioréacteur doit être stérilisé avant l'addition du milieu de culture stérile. Cette stérilisation est réalisée à la vapeur sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes.

#### **4. Critères de choix de la matière première**

Les principaux facteurs qui affectent le choix de milieux de culture industrielle sont les suivants:

- Le prix
- L'abondance et la disponibilité
- Coût du transport
- Facilité de traitement de ses rejet après utilisation
- Uniformité de la qualité de la matière première
- Avoir une composition chimique adéquate
- Facilité à manipuler et à stériliser

## 5. Optimisation de la composition

- **Objectif** : Favoriser la croissance et la productivité des microorganismes:
  - Identification des meilleures sources de carbone et d'azote.
  - Sélection des sels minéraux et oligo-éléments nécessaires.
  - Détermination des facteurs de croissance spécifiques pour chaque microorganisme.
- **Méthodes** :
  - Études approfondies pour explorer différentes combinaisons de nutriments.
  - Utilisation de techniques analytiques (spectroscopie, chromatographie) pour analyser et quantifier les composés.
- **Importance de l'équilibre** : Un excès ou un déficit de nutriments peut nuire à la croissance microbienne.
- **Résultat** : Formulation optimale des milieux de culture pour une croissance maximale des microorganismes.

## 6. Utilisation de milieux sélectifs

- **Définition** : Formulations spécifiques favorisant la croissance de certains microorganismes tout en inhibant celle des autres.
- **Applications** :
  - Isolation, identification et culture de microorganismes spécifiques dans des échantillons complexes.
  - Purification et enrichissement des cultures microbiennes.
- **Composition** :
  - Agents inhibiteurs (antibiotiques, colorants) pour empêcher la croissance de microorganismes indésirables.
  - Exemples : Milieux pour bactéries Gram-positives ou levures spécifiques.
- **Avantages** :
  - Facilite l'étude des microorganismes d'intérêt.
  - Optimise les processus de production en biotechnologie.
  - Contrôle la contamination et améliore les rendements de fermentation.
- **Importance** : Outil précieux en microbiologie industrielle pour des cultures ciblées et efficaces.

### **3. Stérilisation des milieux de culture**

- Un milieu doit être stérile avant d'êtreensemencé par la souche productrice.
- Le traitement thermique est le moyen le plus utilisé pour stériliser le milieu, généralement par autoclavage ou vapeur d'eau chaude. La filtration est aussi utilisée.

### **4. Critères de choix de la matière première**

Les principaux facteurs qui affectent le choix de milieux de culture industrielle sont les suivants:

- Le prix
- L'abondance et la disponibilité
- Coût du transport
- Facilité de traitement de ses rejet après utilisation
- Uniformité de la qualité de la matière première
- Avoir une composition chimique adéquate
- Facilité à manipuler et à stériliser