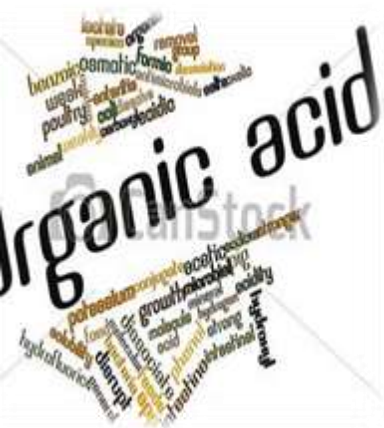




Chapitre 5: Les produits de fermentations industrielles



- Les produits microbiens sont souvent classés en tant que métabolites primaires et métabolites secondaires.
- Les métabolites primaires comprennent des composés liés à la synthèse des cellules microbiennes pendant la phase de croissance. Ils incluent les acides aminés, les nucléotides et les produits de fermentation tels que l'éthanol et les acides organiques. De plus, des enzymes industriellement utiles, soit associées aux cellules microbiennes, soit des exoenzymes, sont souvent synthétisées par les microorganismes pendant leur croissance. Ces enzymes trouvent de nombreuses utilisations dans la production alimentaire et la finition textile.
- Les métabolites secondaires s'accumulent généralement pendant la période de limitation des nutriments ou d'accumulation des produits de dégradation qui suit la phase de croissance active. Ces composés n'ont aucun lien direct avec la synthèse des matériaux cellulaires et la croissance normale. La plupart des antibiotiques et des mycotoxines relèvent de cette catégorie.

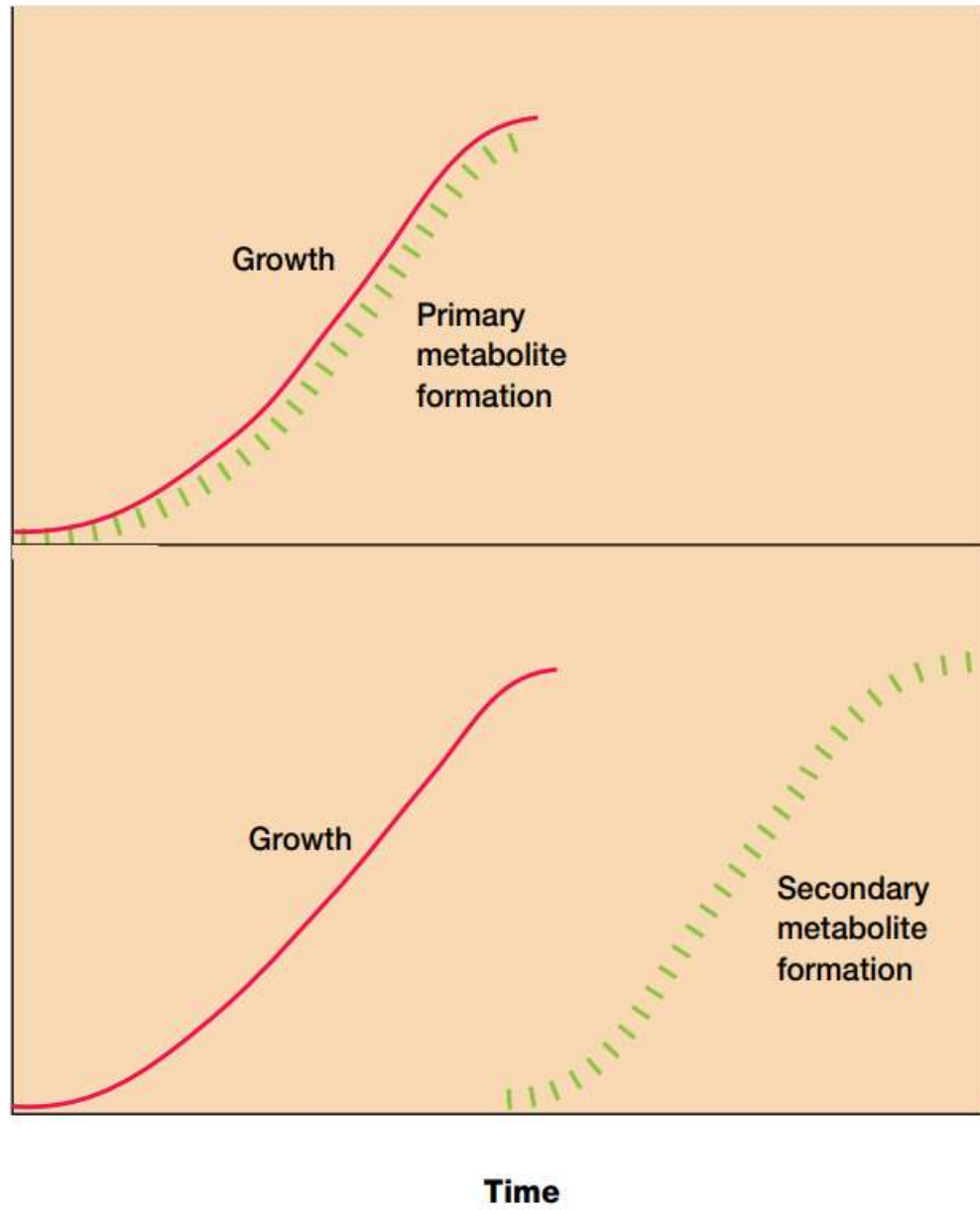


Table 42.9 Major Microbial Products and Processes of Interest in Industrial Microbiology and Biotechnology

Substances	Microorganisms
Industrial Products	
Ethanol (from glucose)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ethanol (from lactose)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Acetone and butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2,3-butanediol	<i>Enterobacter, Serratia</i>
Enzymes	<i>Aspergillus, Bacillus, Mucor, Trichoderma</i>
Agricultural Products	
Gibberellins	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Food Additives	
Amino acids (e.g., lysine)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Organic acids (citric acid)	<i>Aspergillus niger</i>
Nucleotides	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Vitamins	<i>Ashbya, Eremothecium, Blakeslea</i>
Polysaccharides	<i>Xanthomonas</i>
Medical Products	
Antibiotics	<i>Penicillium, Streptomyces, Bacillus</i>
Alkaloids	<i>Claviceps purpurea</i>
Steroid transformations	<i>Rhizopus, Arthrobacter</i>
Insulin, human growth hormone, somatostatin, interferons	<i>Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae</i> , and others (recombinant DNA technology)
Biofuels	
Hydrogen	Photosynthetic microorganisms
Methane	<i>Methanobacterium</i>
Ethanol	<i>Zymomonas, Thermoanaerobacter</i>

1. Les métabolites primaires obtenus par fermentations microbiennes

1- Les acides aminés

Acides aminés tels que la lysine et l'acide glutamique sont utilisés dans l'industrie alimentaire en tant que compléments nutritionnels dans les produits de boulangerie, ainsi que comme composés rehausseurs de saveur tels que le glutamate monosodique (GMS).

La production d'acides aminés est généralement réalisée à l'aide de mutants régulateurs. La production d'acide glutamique et de plusieurs autres acides aminés en quantités importantes est désormais réalisée en utilisant des mutants de *Corynebacterium glutamicum*. Un faible niveau de biotine contrôlé et l'ajout de dérivés d'acides gras entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire et l'excrétion de concentrations élevées d'acide glutamique. Les bactéries défectueuses utilisent la voie du glyoxylate pour répondre à leurs besoins en intermédiaires biochimiques essentiels, en particulier pendant la phase de croissance. Après que la croissance devient limitée en raison de la disponibilité des nutriments modifiée, une conversion quasi complète de l'isocitrate en glutamate se produit.

La lysine, un acide aminé essentiel utilisé pour compléter les céréales et les pains, était initialement produite dans un processus microbien en deux étapes. Cela a été remplacé par une fermentation en une seule étape dans laquelle la bactérie *Corynebacterium glutamicum*, bloquée dans la synthèse de l'homosérine, accumule de la lysine. Plus de 44 g par litre peuvent être produits lors d'une fermentation de 3 jours.

Les principales souches microbiennes utilisées

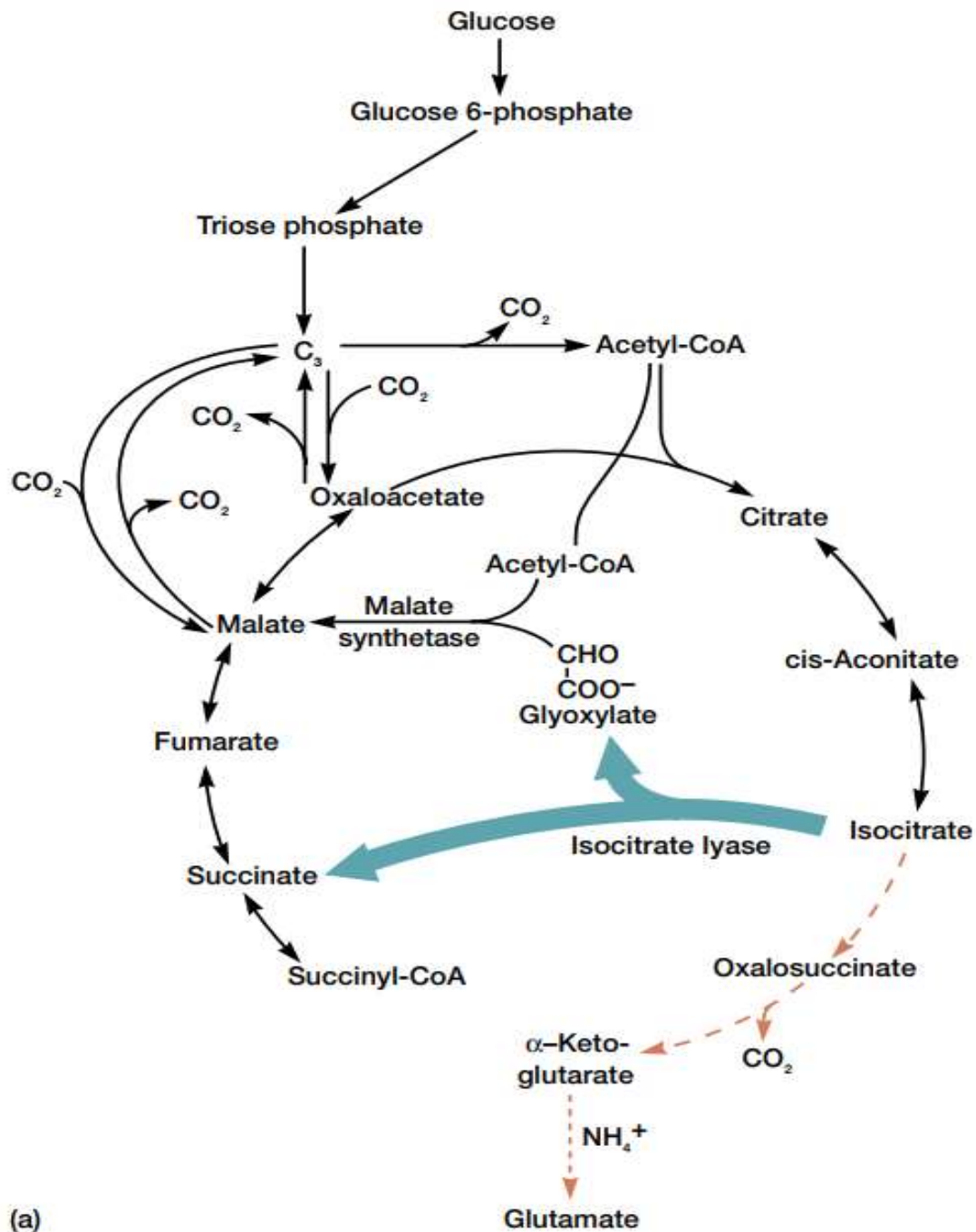
Les souches industrielles utilisées pour la production de l'acide glutamique, sont des mutants des espèces de, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Brevibacterium flavum* et *Brevibacterium lactofermentum*.

Les conditions de culture

La production industrielle d'acide glutamique par fermentation implique les étapes suivantes :

- 1. Préparation du milieu de fermentation :** Un milieu de fermentation contenant une source de carbone telle que le glucose ou le saccharose est préparé. Des sources d'azote telles que les sels d'ammonium, l'urée ou l'ammoniaque sont également ajoutées, mais de manière lente pour éviter l'inhibition de la production d'acide glutamique. La mélasse de canne à sucre ou de betterave peut également être utilisée comme source de carbone.
- 2. Fermentation :** La culture bactérienne, généralement *Corynebacterium glutamicum*, est inoculée dans le milieu de fermentation préparé. La fermentation a lieu dans des fermenteurs en acier inoxydable d'une capacité maximale de 450 mètres cubes. La culture est agitée et maintenue dans des conditions aérobies à une température spécifique (généralement entre 30 et 37 °C), en fonction du microorganisme utilisé. Le pH du milieu est maintenu entre 7 et 8 pour éviter une diminution excessive due à l'excrétion de l'acide glutamique.

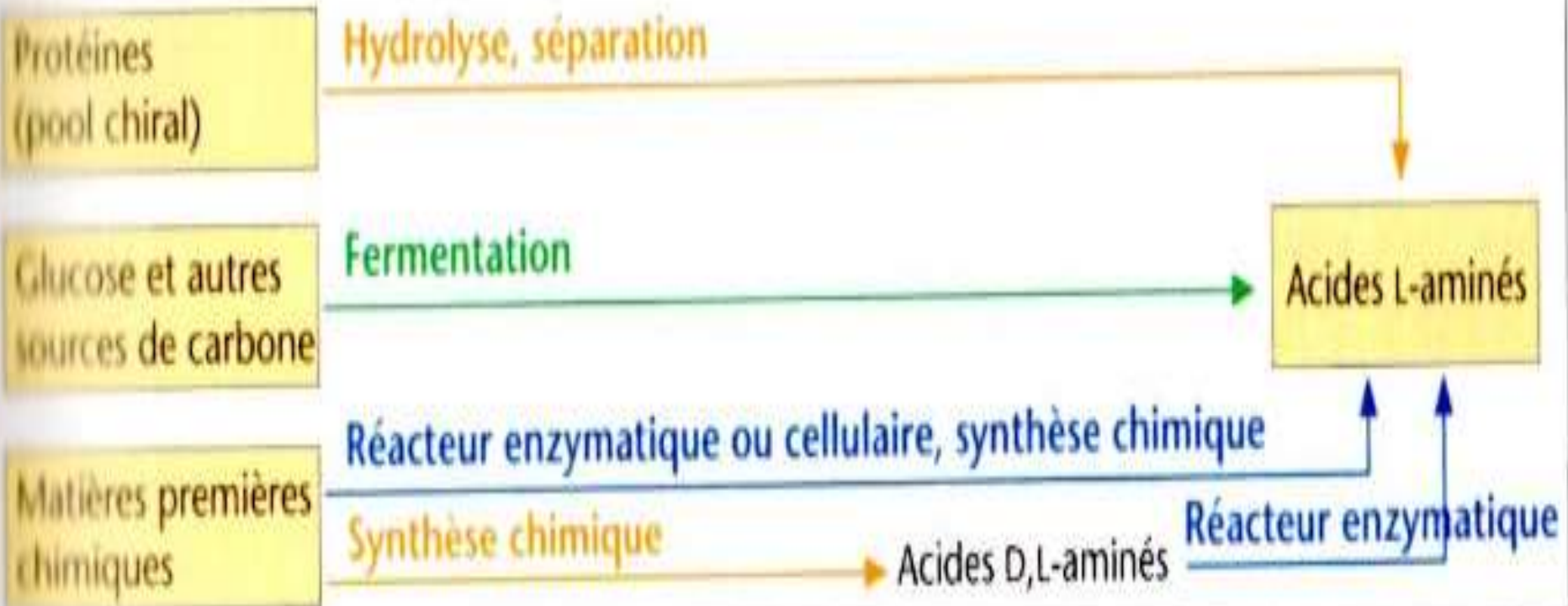
1. **Purification** : Une fois la fermentation terminée (généralement entre 35 et 40 heures), le milieu de fermentation contenant l'acide glutamique produit est soumis à une série d'étapes de purification. Tout d'abord, une centrifugation est effectuée pour séparer la biomasse microbienne du surnageant contenant l'acide glutamique. Ensuite, le pH du surnageant est progressivement abaissé en ajoutant de l'acide chlorhydrique jusqu'au point isoélectrique de l'acide L-glutamique (pH = 3,2). Cela permet la précipitation des cristaux d'acide L-glutamique.
 2. **Récupération des cristaux** : Les cristaux d'acide L-glutamique précipités sont récupérés par centrifugation. Ils sont ensuite lavés plusieurs fois pour éliminer les impuretés et obtenir un produit purifié.
- Il convient de noter que les détails spécifiques du processus de production peuvent varier en fonction des conditions et des protocoles utilisés dans chaque installation de production d'acide glutamique.



(a)

Procédés de fabrication des acides aminés

Procédés de fabrication



2- les acides organiques

La production d'acides organiques par les microorganismes est importante en microbiologie industrielle et illustre les effets des niveaux et des équilibres de métaux traces sur la synthèse et l'excrétion des acides organiques. Les acides citrique, acétique, lactique, fumarique et gluconique sont les principaux produits.

L'acide citrique, également connu sous le nom de citrate, est un acide organique présent en grande quantité dans les citrons, d'où son nom. Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif alimentaire pour ses propriétés acidifiantes et aromatisantes. On le retrouve dans les boissons, les confiseries, les bonbons acidulés et d'autres aliments. L'acide citrique trouve également d'autres applications en dehors de l'industrie alimentaire, notamment dans le domaine médical et pharmaceutique.

Avant le développement des processus microbiens, la principale source d'acide citrique était les agrumes. Aujourd'hui, la plupart de l'acide citrique est produit par des microorganismes. 5 % est utilisé dans l'industrie alimentaire et des boissons, 2 % dans les produits pharmaceutiques et le reste dans d'autres applications industrielles.

L'acide citrique peut être produit par de nombreux microorganismes, notamment :

1. Des bactéries : *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* .
2. Des moisissures : *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus* et *Penicillium restrictum*.
3. Des levures : *Candida lipolytica*, *Candida intermedia* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 42.10 Major Organic Acids Produced by Microbial Processes

Product	Microorganism Used	Representative Uses	Fermentation Conditions
Acetic acid	<i>Acetobacter</i> with ethanol solutions	Wide variety of food uses	Single-step oxidation, with 15% solutions produced; 95–99% yields
Citric acid	<i>Aspergillus niger</i> in molasses-based medium	Pharmaceuticals, as a food additive	High carbohydrate concentrations and controlled limitation of trace metals; 60–80% yields
Fumaric acid	<i>Rhizopus nigricans</i> in sugar-based medium	Resin manufacture, tanning, and sizing	Strongly aerobic fermentation; carbon-nitrogen ratio is critical; zinc should be limited; 60% yields
Gluconic acid	<i>Aspergillus niger</i> in glucose-mineral salts medium	A carrier for calcium and sodium	Uses agitation or stirred fermenters; 95% yields
Itaconic acid	<i>Aspergillus terreus</i> in molasses-salts medium	Esters can be polymerized to make plastics	Highly aerobic medium, below pH 2.2; 85% yields
Kojic acid	<i>Aspergillus flavus-oryzae</i> in carbohydrate-inorganic N medium	The manufacture of fungicides and insecticides when complexed with metals	Iron must be carefully controlled to avoid reaction with kojic acid after fermentation
Lactic acid	Homofermentative <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	As a carrier for calcium and as an acidifier	Purified medium used to facilitate extraction

L'essence de la fermentation de l'acide citrique implique de limiter les quantités de métaux traces tels que le manganèse et le fer pour arrêter la croissance d'*Aspergillus niger* à un moment spécifique de la fermentation. La fermentation de l'acide citrique, qui était auparavant réalisée par croissance en surface statique, se déroule maintenant dans des fermenteurs aérobies agités. Généralement, des concentrations élevées de sucre (de 40 à 60 %) sont utilisées.

Le succès de cette fermentation dépend de la régulation et du fonctionnement de la voie glycolytique et du cycle de l'acide tricarboxylique. Après la phase de croissance active, lorsque le niveau du substrat est élevé, l'activité de la citrate synthase augmente et les activités de l'aconitase et de l'isocitrate déshydrogénase diminuent. Cela entraîne l'accumulation et l'excrétion de l'acide citrique par le microorganisme stressé.

En comparaison, la production d'acide gluconique implique une seule enzyme microbienne, la glucose oxydase, présente dans *Aspergillus niger*. *A. niger* est cultivé dans des conditions optimales dans un milieu de liqueur de maïs. La croissance devient limitée par l'azote, et les cellules au repos transforment le glucose restant en acide gluconique dans une réaction en une seule étape. L'acide gluconique est utilisé comme vecteur pour le calcium et le fer, ainsi que comme composant des détergents.

Bioproduction de l'acide citrique

La bioproduction de l'acide citrique peut être décrite en trois grandes étapes (la préparation de l'inoculum, la fermentation et l'extraction). Deux types de fermentation sont les plus utilisées, à savoir la fermentation submergée ou fermentation en milieu liquide (FML) et la fermentation en milieu solide (FMS). Chacune des deux techniques présente des avantages et des inconvénients ; cependant la fermentation la plus utilisée est la fermentation en milieu liquide (FML).

1 Fermentation en milieu liquide (FML)

Actuellement, 99% de l'acide citrique total produit dans le monde est obtenu par fermentation. On estime qu'environ 80% de cette production est obtenue par la FML.

En effet, cette technique permet de réduire de 2,5 à 25% les coûts d'investissement total et de la main-d'œuvre. Elle a plusieurs avantages, comme une productivité et un rendement élevés, ainsi qu'un risque moindre de contamination. En général, elle est réalisée entre 5 et 12 jours.

Cependant, les inconvénients sont les coûts énergétiques plus élevés et la commande plus sophistiquée qui exige un personnel plus fortement qualifié.

Trois facteurs importants interviennent dans la maîtrise de cette technique de production, qui sont :

- la qualité de l'acier inoxydable pour la construction du bioréacteur,
- la structure de mycélium
- le transfert de l'oxygène dans le réacteur

-2 Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation en milieu solide (FMS) est généralement définie comme la croissance de microorganismes sur des substrats humides en absence d'eau libre. La production d'acide citrique par FMS (la méthode la plus simple est le procédé Koji) a été développée au Japon. Cette fermentation peut être effectuée en utilisant différentes matières premières.

Au cours des dernières années, la technique a fait l'objet d'un grand intérêt, car elle offre de nombreux avantages pour la production de l'acide citrique et des enzymes.

En effet, les procédés de fermentation à l'état solide ont de faibles besoins énergétiques, produisent beaucoup moins d'effluents et donc engendrent moins de préoccupations environnementales.

La capacité d'utiliser les résidus agro-industriels comme substrats pour la bioproduction de l'acide citrique contribue ainsi à leurs éliminations. En outre, la biotransformation des déchets agricoles tels que : la peau de banane.

D'autres exemples de procédés de fabrication

Production des acides organiques par fermentation en bioréacteur

Fermentation et purification

Acide L-lactique

Préculture

Lactobacillus

Bioréacteur

> 100 m³, dextrose,
solution de sucre à
50 °C, pH 5,5–6,0

Purification

Précipitation au sel
de Ca, reprécipitation,
échange d'ions

Productivité
2 à 3 kg m⁻³ h⁻¹

Acide D-gluconique

Préculture

Aspergillus niger

Bioréacteur

> 100 m³, dextrose,
solution de sucre
à 33 °C, pH 6,5,
1 vvm

Purification

Décantation
des cellules,
concentration, ajout
de NaOH, séchage

Productivité
> 13 kg m⁻³ h⁻¹

3- Le biogaz

Production du biogaz par le processus de méthanisation

La méthanisation, également appelée digestion anaérobie, est un processus biologique naturel de dégradation de la matière organique en l'absence d'oxygène (condition d'anaérobiose), qui conduit à la production de biogaz. Le biogaz est principalement composé de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2).

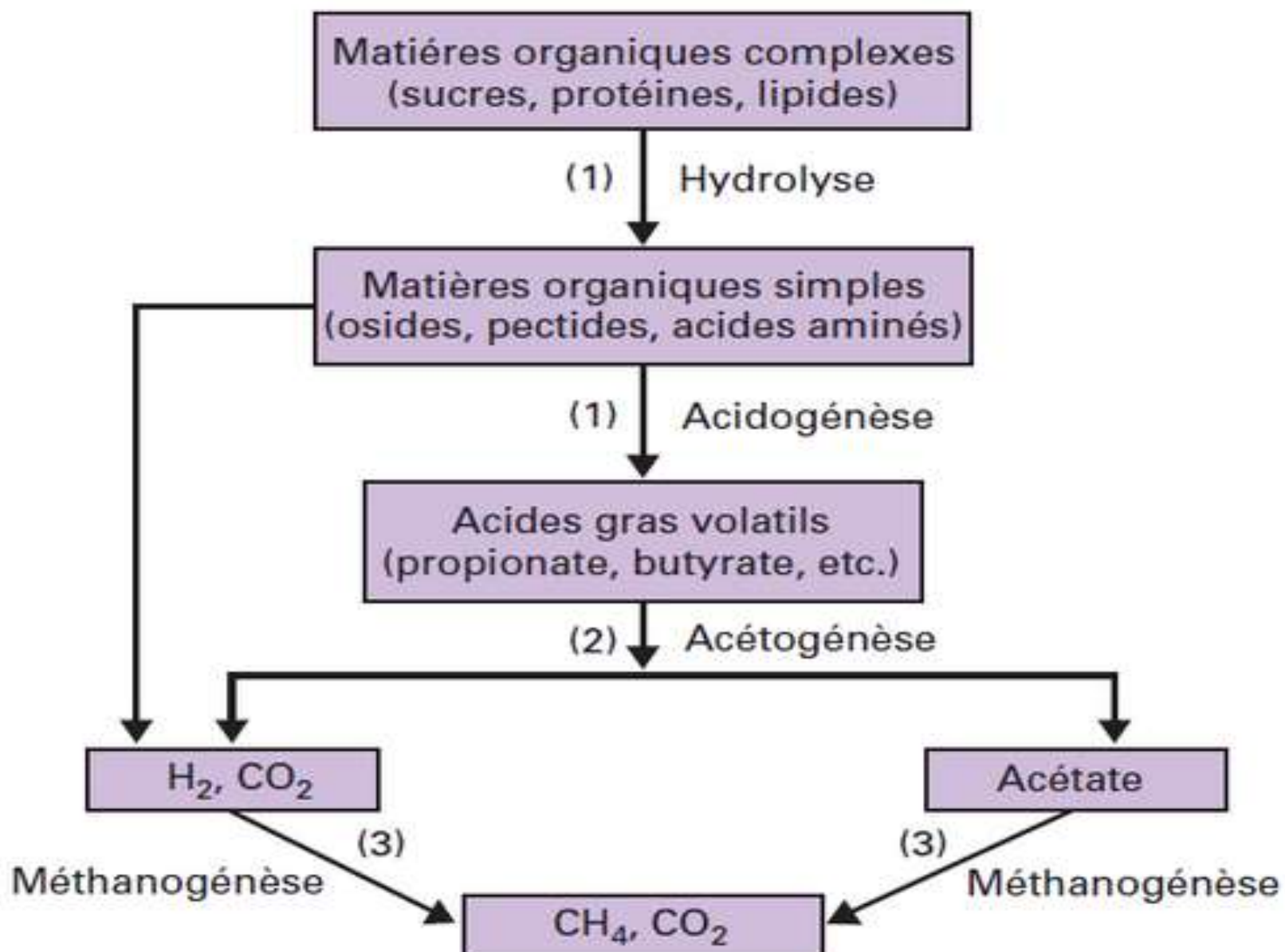
La méthanisation se déroule en plusieurs étapes grâce à l'intervention de différentes communautés microbiennes, dans des digesteurs anaérobies ou des méthaniseurs. Au cours de ce processus, les microorganismes dégradent la matière organique, telle que les déchets alimentaires, les boues d'épuration ou les résidus agricoles, en produisant du biogaz riche en méthane. Ce biogaz peut ensuite être utilisé comme source d'énergie renouvelable pour la production d'électricité, de chaleur ou comme carburant. La méthanisation est une méthode efficace de valorisation des déchets organiques et contribue à la réduction des émissions de gaz à effet de serre tout en produisant une source d'énergie verte.

- Les principales étapes de la méthanisation :
 1. Phase d'hydrolyse : Les molécules complexes de matière organique sont décomposées en composés plus simples grâce à l'action de bactéries hydrolytiques. Cela permet de rendre la matière organique plus accessible aux étapes suivantes.
 2. Phase d'acidogénèse : Les composés issus de l'hydrolyse sont métabolisés par des bactéries acidogènes, qui les fermentent pour produire des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide butyrique et l'acide propionique. Cette étape génère également des sous-produits tels que l'alcool et l'ammoniac.
 3. Phase d'acétogénèse : Les acides organiques produits lors de l'acidogénèse sont convertis en acétate par des bactéries acétogènes. L'acétate est un précurseur essentiel pour la production de méthane.
 4. Phase de méthanogénèse : Dans cette étape clé, les bactéries méthanogènes consomment l'acétate et d'autres composés organiques pour produire du méthane (CH_4) et du dioxyde de carbone (CO_2). C'est la formation du méthane qui donne au biogaz sa principale composante énergétique.

Purification du biogaz (méthane)

Pour son utilisation comme source d'énergie, le biogaz subit une:

- Élimination de particules solides et de la poussière,
- Déshydratation (pour éliminer l'eau).
- Élimination des composés soufrés (H_2S),
- Élimination du CO_2 .



2. Les métabolites secondaires obtenus par fermentation microbienne

1. Les antibiotiques



- ✓ Définition : Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des microorganismes, tels que des bactéries ou des champignons, qui ont la capacité d'inhiber la croissance ou de tuer d'autres microorganismes, généralement des bactéries.
- ✓ Modes d'action : Les antibiotiques peuvent agir de différentes manières sur les microorganismes cibles. Certains inhibent la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, perturbent la synthèse des protéines ou interfèrent avec le métabolisme cellulaire. D'autres peuvent altérer la membrane cellulaire ou inhiber la réplication de l'ADN bactérien.
- ✓ Classes d'antibiotiques : Il existe de nombreuses classes d'antibiotiques, chacune ayant un mode d'action spécifique et une activité contre certains types de bactéries. Parmi les classes d'antibiotiques courantes, on trouve les pénicillines, les céphalosporines, les macrolides, les quinolones, les tétracyclines et les sulfamides.
- ✓ Utilisations : Les antibiotiques sont utilisés pour traiter les infections bactériennes chez les humains et les animaux. Ils peuvent être administrés par voie orale, injectable ou topique, en fonction du type d'infection et de sa gravité. Certains antibiotiques sont également utilisés en prophylaxie pour prévenir les infections avant une intervention chirurgicale ou chez les personnes immunodéprimées.

Production industrielle des antibiotiques : Étapes et conditions de culture

La production industrielle des antibiotiques implique l'utilisation de microorganismes et suit différentes étapes à différents niveaux d'échelle, allant de la production en laboratoire pour les études préliminaires à la production dans des fermenteurs de grande capacité, pouvant atteindre 500 m³. Chaque étape nécessite un inoculum pour ensemençer le fermenteur de volume supérieur, généralement entre 1 et 15 % du volume de production.

La culture des microorganismes producteurs d'antibiotiques est généralement aérobie, et la production de l'antibiotique lui-même, considéré comme un métabolite secondaire ayant peu d'utilité pour le microorganisme, se produit en fin de croissance.

Des précurseurs peuvent être ajoutés au milieu de culture pour influencer la synthèse de l'antibiotique. Par exemple, l'ajout de phényl-acétate favorise la production d'ampicilline à partir du champignon producteur de pénicilline G.

Le milieu de production doit d'abord favoriser une croissance importante des cellules pour atteindre une concentration élevée au moment de la production de l'antibiotique. Ensuite, il doit maintenir la vitalité des cellules et optimiser la production de l'antibiotique en fournissant des sources d'énergie et en assurant les conditions physico-chimiques souhaitées (pH, température, oxygénation).

Pendant la phase de production des antibiotiques, les cellules utilisent des sources d'énergie et de carbone qui sont catabolisées lentement, telles que le lactose pour la production de la pénicilline ou la dextrine et l'amidon pour la production de macrolides.

Les acides gras et leurs dérivés sont souvent apportés sous forme de triglycérides provenant d'huiles telles que l'huile de soja, d'arachide, de maïs ou de colza. En plus de leur rôle en tant que source d'énergie et de précurseurs, les acides gras exercent des actions physico-chimiques bénéfiques, comme la formation d'émulsion, la réduction des mousses et la modification de la perméabilité membranaire.

L'ammonium est la meilleure source d'azote pour favoriser une croissance rapide des microorganismes. Des sels d'ammonium sont ajoutés pour stimuler cette phase, en surveillant attentivement la concentration pour éviter une baisse de production due à une concentration trop élevée. Si l'alimentation en sels d'ammonium est poursuivie, elle est généralement effectuée de manière semi-continue.

Les conditions de culture:

1 /-pH :

Le PH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires. De faibles variations de PH peuvent avoir des effets marqués sur la productivité de la souche.

2/-La température :

Si la plage de température permettant une croissance des microorganismes est de l'ordre de 25°C celle permettant une synthèse d'antibiotiques n'est que de 5 à 10°C. les températures optimales pour la production sont situées dans des zones souvent étroites et les optima souvent plus bas que pour la croissance.

3/-L'aération :

Toutes les productions des antibiotiques se déroulent dans les conditions aérobies. Comme pour les facteurs environnementaux, les optima de concentration en oxygène ne sont pas nécessairement les mêmes pour la croissance et pour la synthèse des métabolites secondaires par exemple la production de céphalosporine augmente alors que celle de la pénicilline N diminue si la concentration en oxygène est élevée.

Mode de culture :

Les procédés de production font appel au mode de culture discontinu ou au mode semi-continu.

- **En mode discontinu:** La production se poursuit jusqu'à épuisement du milieu en précurseur de biosynthèse ou jusqu'à l'apparition de conditions physiologiques défavorables.
- **En mode semi continu:** La production peut se poursuivre par apport progressif de ces sources de précurseurs ce qui impose un contrôle rigoureux de la concentration des éléments nécessaires.



Culture en boîte
ou micro-organismes
congelés à -80 °C



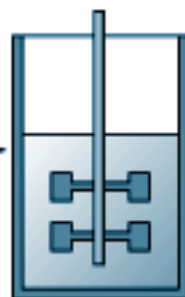
Agitation



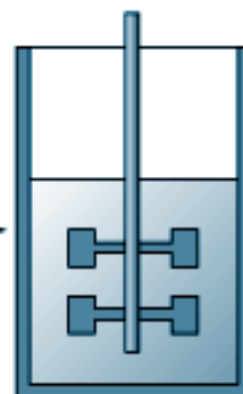
Fermenteur de
préensemencement



Fermenteur
d'ensemencement



Fermenteur de production



Récolte

Filtration

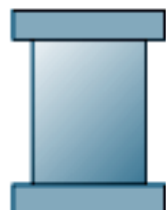


ou



Centrifugation continue

Purification
complémentaire



Extractions
additionnelles
et lavages

Extraction
par solvant

Traitement et
élimination des
effluents

Récupération
du solvant

Élimination des
micro-organismes
et des déchets

Séchage sur cylindres ou sous vide

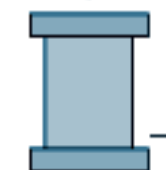
Concentration



Formulation

Contrôle de la qualité
et conditionnement

Récupération
du produit pur



Facteurs influençant la production des antibiotiques :

1. Régulation catabolique par la source carbonée : Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, l'utilisation d'une source de carbone rapidement assimilable, telle que le glucose, a un effet négatif sur la biosynthèse des antibiotiques. En revanche, l'utilisation de sources d'énergie lentement catabolisables, comme l'amidon ou les dextrines, favorise la production d'antibiotiques.
2. Régulation par les acides gras : Les acides gras jouent un rôle important dans la production d'antibiotiques. Ils peuvent être présents dans les huiles utilisées ou ajoutés directement sous forme pure. L'addition d'oléate de méthyle (1%) dans le milieu producteur améliore de plus de 700% la production de la nigéricine.
3. Régulation par la source azotée : Des concentrations élevées d'ammonium ou de composés azotés rapidement métabolisables dans le milieu de culture peuvent supprimer la biosynthèse de nombreux antibiotiques. Les ions ammonium favorisent une croissance rapide, ce qui réprime les gènes impliqués dans la biosynthèse des enzymes et inhibe certaines activités enzymatiques. Pendant les phases de production, les ions ammonium doivent être présents à des concentrations limitées ou remplacés par des sources d'azote à métabolisme lent.

4. Régulation par le phosphate : Des concentrations élevées de phosphate dans le milieu de culture peuvent supprimer la synthèse de nombreux antibiotiques en réprimant directement la biosynthèse des enzymes du métabolisme secondaire.

5. Les oligoéléments : Les oligoéléments, tels que le manganèse, le fer, le zinc, sont nécessaires en très faibles concentrations (environ 10^{-7}) pour la croissance des organismes et jouent un rôle important dans la biosynthèse des antibiotiques.

Extraction et purification :

A l'issue de la fermentation, l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules, les éléments du milieu et de nombreux métabolites.

Le processus d'extraction et de purification des antibiotiques comprend plusieurs étapes :

- Extraction et purification : Après la fermentation, les antibiotiques sont présents à de faibles concentrations dans un mélange complexe comprenant des cellules, des éléments du milieu et d'autres métabolites. Les étapes d'extraction et de purification sont nécessaires pour isoler et purifier l'antibiotique. En raison de la diversité des organismes producteurs, des milieux de production et des propriétés physicochimiques des antibiotiques, il n'existe pas de protocole d'extraction et de purification standard. Il est important de quantifier l'antibiotique et d'évaluer son activité pour évaluer le rendement de l'étape et la dégradation du produit.
- Séparation liquide-solide : Cette étape de séparation peut être réalisée par décantation, filtration ou centrifugation. Elle permet de séparer l'antibiotique associé aux cellules du milieu de fermentation, en récupérant l'antibiotique des fractions liquides et solides obtenues.

- Extraction primaire : Si les phases solide-liquide n'ont pas été séparées au préalable, une extraction par un solvant approprié est effectuée. Un traitement par un acide ou une base est souvent réalisé pour obtenir une forme ionique de l'antibiotique. Le choix du solvant se fait en fonction de sa capacité à solubiliser l'antibiotique, sa neutralité chimique, sa sélectivité pour l'antibiotique, son coût et ses propriétés facilitant son élimination ou sa réutilisation. L'extraction liquide-liquide nécessite un solvant non miscible avec l'eau, ce qui peut être difficile pour les molécules très hydrophiles.

- Purification : La purification vise à éliminer spécifiquement les impuretés par rapport à l'antibiotique en utilisant des techniques raffinées. Le degré de pureté recherché dépend de l'application de l'antibiotique. Des techniques telles que l'extraction liquide-liquide avec différents solvants, la filtration membranaire (ultra ou nanofiltration) ou la gel filtration peuvent être utilisées. Si ces méthodes ne suffisent pas, des techniques de chromatographie peuvent être nécessaires, bien qu'elles soient coûteuses.

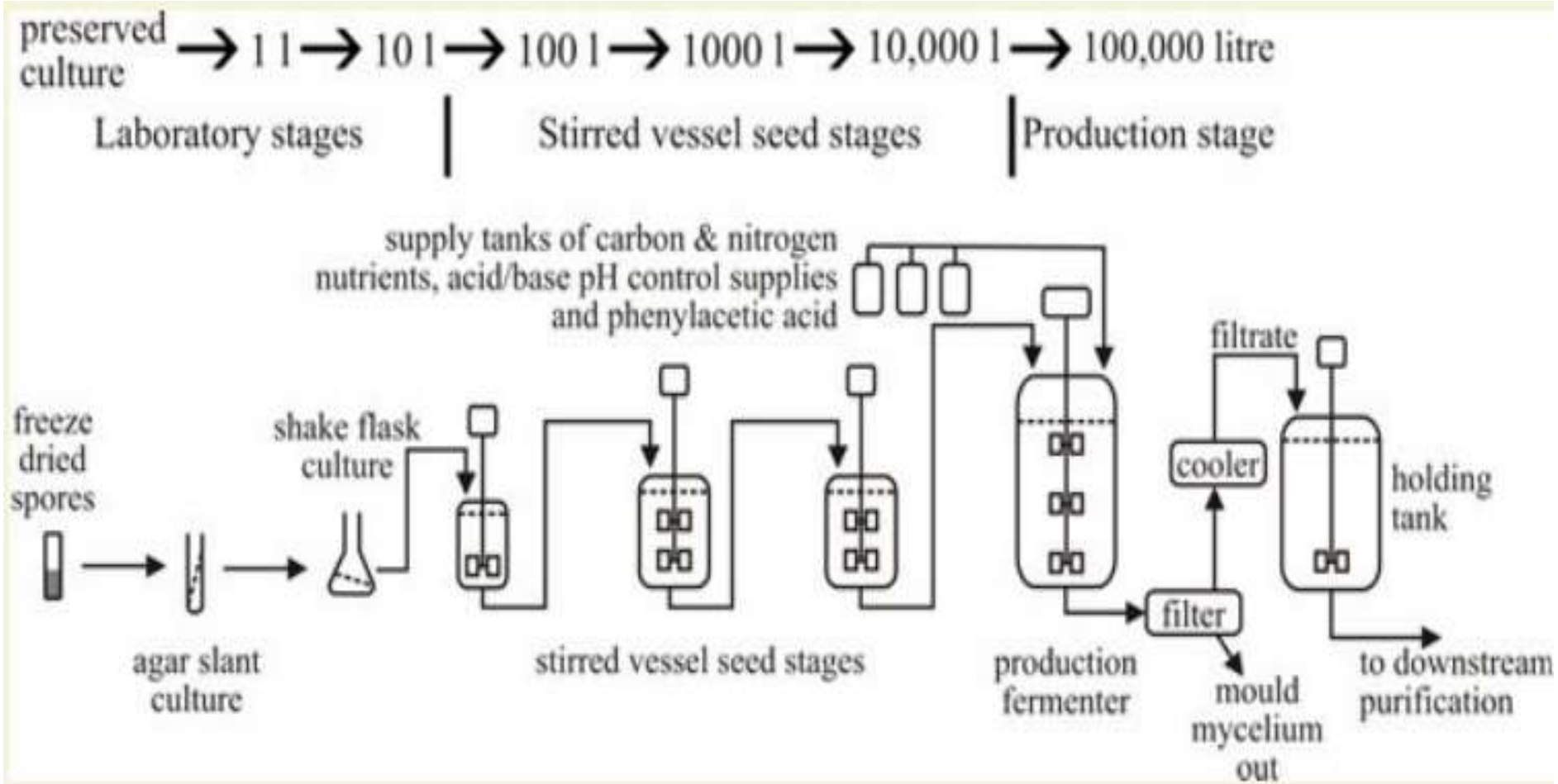
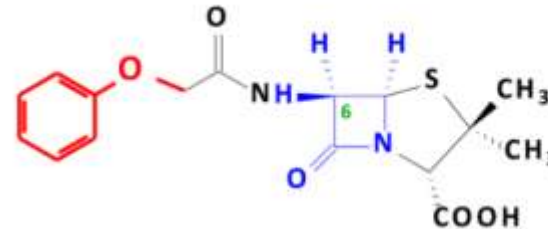


Diagramme schématique de la production de pénicilline par fermentation submergée en mode Fed batch.



Pénicillines G

= benzylpénicilline



Pénicillines V

= phénoxy méthylpénicilline

Ce processus de fermentation concerne la pénicilline G et implique les étapes suivantes :

1. 100 ml de milieu contenant des spores de souches de *P. chrysogenum* sont ensemencés dans un flacon Erlenmeyer et incubés dans une étuve en les plaçant sur un agitateur rotatif.
2. Après 4 jours d'incubation, le contenu ainsi que deux litres de milieu sont transférés dans un flacon contenant quatre litres et incubés pendant encore deux jours.
3. Ensuite, le contenu est transféré dans un réservoir en acier inoxydable contenant 500 ml de milieu qui offre des conditions favorables à la croissance fongique.
4. Après trois jours d'incubation, le contenu est utilisé pour l'inoculation et est conservé dans un fermentateur équipé de conditions optimales.
5. Le contenu est filtré après six jours d'incubation et contient de la pénicilline.
6. La pénicilline est extraite dans de l'acétate d'amyle ou de l'acétate de butyle, puis transférée dans une solution aqueuse avec un tampon de phosphate.
7. Acidifiez l'extrait et extrayez à nouveau la pénicilline dans de l'acétate de butyle.
8. Dans l'extrait de solvant, de l'acétate de potassium est ajouté dans un réservoir de cristallisation pour cristalliser sous forme de sel de potassium.
9. Les cristaux sont récupérés et le sel est ensuite stérilisé.

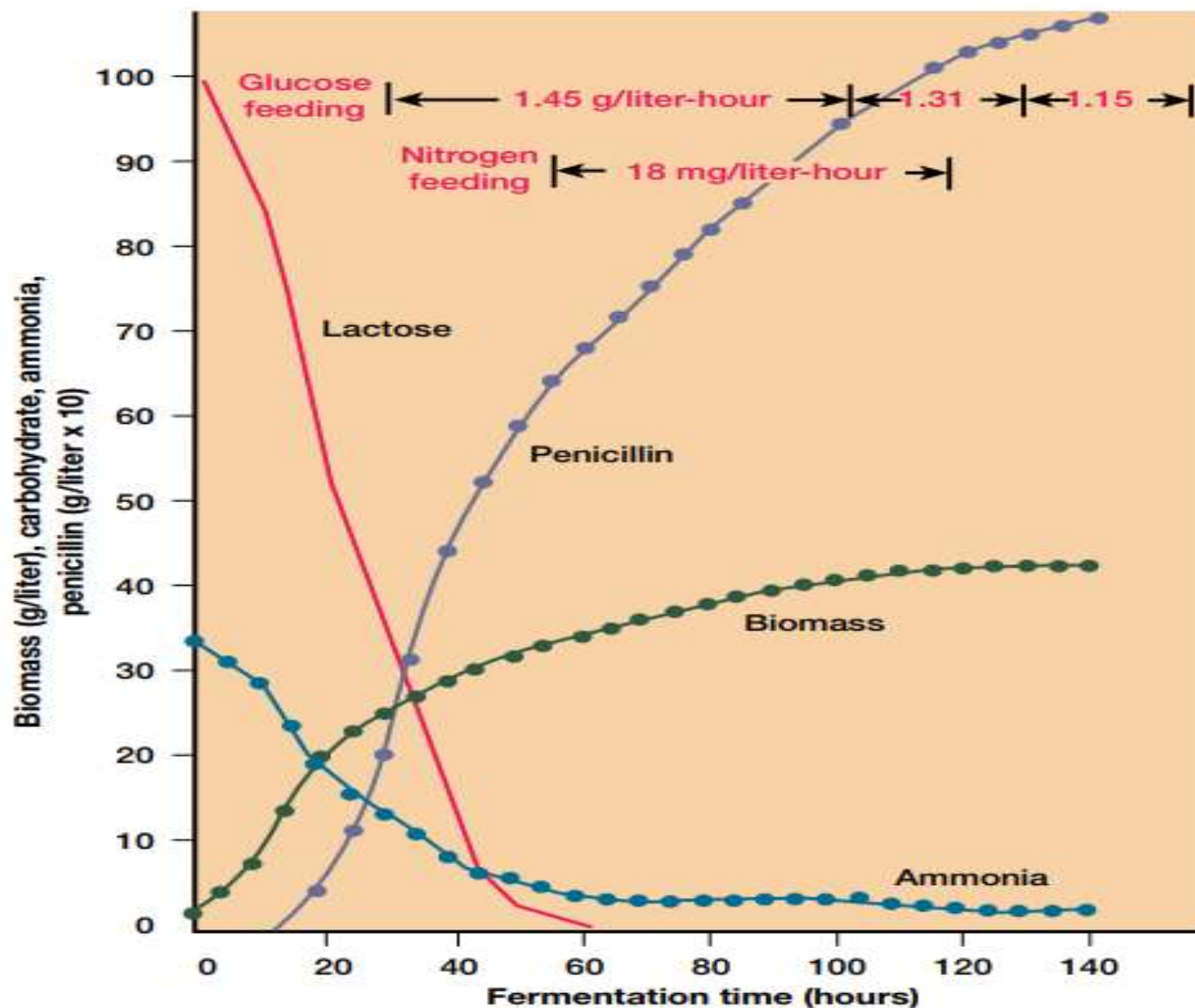


Figure 42.10 Penicillin Fermentation Involves Precise Control of Nutrients. The synthesis of penicillin begins when nitrogen from ammonia becomes limiting. After most of the lactose (a slowly catabolized disaccharide) has been degraded, glucose (a rapidly used monosaccharide) is added along with a low level of nitrogen. This stimulates maximum transformation of the carbon sources to penicillin.

2. Les vitamines

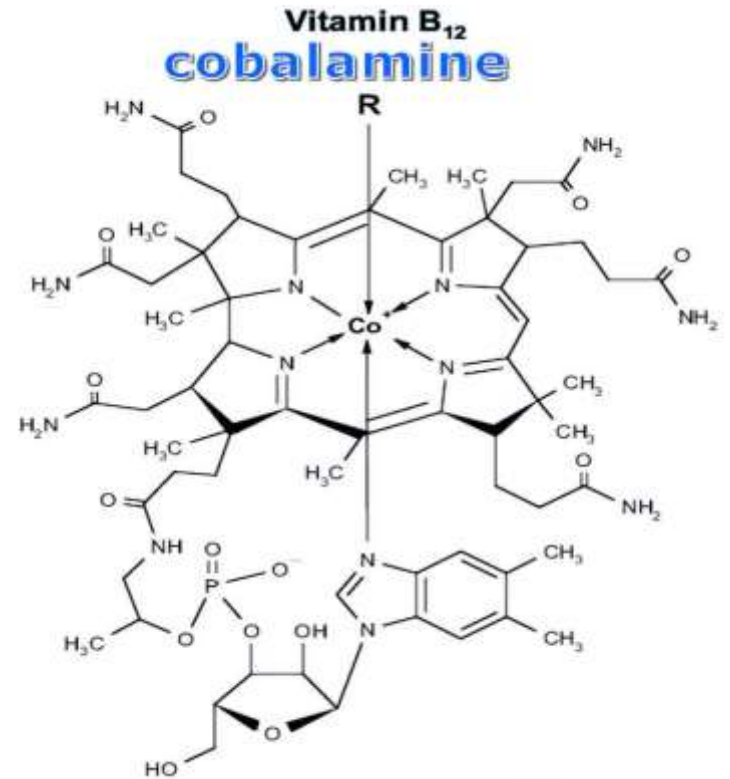
Les vitamines sont des substances organiques actives, vitales, indispensables en faible quantité au métabolisme d'un organisme vivant, qui ne peut être synthétisé en quantité suffisante par cet organisme. Les vitamines sont utilisées dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique. La vitamine la plus connue est la vitamine C, elle est souvent utilisée dans les formulations d'aspirine effervescente et dans des produits cuisinés. La vitamine B12 est une molécule complexe qui n'est synthétisée que par des microorganismes procaryotes. Nécessaire à l'être humain, elle est apportée par l'alimentation ou produite par la flore intestinale.

Tableau 4 – Principales vitamines produites par fermentation

Produit	Voies d'accès	Micro-organismes utilisés
Vitamine B2 (riboflavine)	F	<i>Ashbya gossypii</i> , <i>Candida famata</i> , <i>Pichia miso</i>
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	F	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i>
Vitamine C (acide ascorbique)	F + C	<i>Acetobacter suboxydans</i>
Vitamine D (calciférol)	F + C	<i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i>

Cas de la vitamine B12

La vitamine B12, ou cobalamine, fait partie de la famille des vitamines B. La molécule de cobalamine contient un ion cobalt, d'où son nom.



La vitamine B12 est actuellement produite industriellement par fermentation microbienne. La synthèse biotechnologique se fait par quelques étapes enzymatiques, suivies de la conversion de la vitamine B12 naturelle en forme cyanocobalamine stable à l'air par une réaction avec le cyanure.

La production commerciale de la vitamine B12 repose principalement sur l'utilisation de deux souches industrielles, *Propionobacterium shermanii* et *Pseudomonas denitrificans*. Ces microorganismes sont largement utilisés en raison de leur efficacité dans la production de la vitamine B12. Bien que d'autres microorganismes tels que *Bacillus megaterium* puissent être utilisés, ils sont généralement considérés comme moins performants que les deux premières espèces.

Production industrielle de vit B12 par *Pseudomonas denitrificans*

- Le processus industriel de production de la vitamine B12 utilise *Pseudomonas denitrificans* dans des fermenteurs de 120 m³, à une température de 30°C et à des valeurs de pH de 6,0 à 7,0. Le saccharose est la source de carbone et l'extrait de levure est utilisé comme source d'azote avec des sels minéraux. La durée du processus est d'environ 6 à 7 jours.
- Pendant la phase de croissance, la fermentation est aérée et contrôlée en ajustant les concentrations d'oxygène et de CO₂ dissous, ce qui permet d'obtenir un rendement en cobalamine supérieur à 150 mg/L.
- Des améliorations ont été apportées en utilisant une stratégie de contrôle de la concentration d'oxygène dissous (DOC) en plusieurs étapes, augmentant le rendement en vitamine B12 d'environ 20% (70 mg/L). La concentration d'oxygène dissous est réduite progressivement au cours de la fermentation.
- Une autre amélioration consiste à contrôler la fraction de CO₂, ce qui augmente la production de vitamine B12 d'environ 10%.
- Après la fermentation, un mélange d'adénosylcobalamine, de méthylcobalamine et d'hydroxocobalamine subit des processus chimiques, y compris la cyanuration.
- L'extraction de la vitamine B12 se fait en chauffant le bouillon ou la suspension cellulaire à 80-120 °C pendant 10-30 minutes à un pH de 6,5-8,5.

- La conversion en cyanocobalamine est réalisée en traitant le bouillon chauffé ou la suspension cellulaire avec du cyanure ou du thiocyanate de potassium.
- Après clarification de la solution, la vitamine B12 est précipitée en ajoutant des auxiliaires tels que l'acide tannique ou le crésol, atteignant une pureté d'environ 80%.
- Une purification supplémentaire est souvent effectuée en utilisant des solvants organiques tels que le crésol, le tétrachlorure de carbone et l'eau/butanol, ainsi que l'adsorption sur des échangeurs d'ions ou du charbon actif.
- Enfin, la vitamine B12 est cristallisée en ajoutant des solvants organiques, ce qui permet d'obtenir un produit de haute qualité recommandé pour les applications alimentaires et pharmaceutiques.

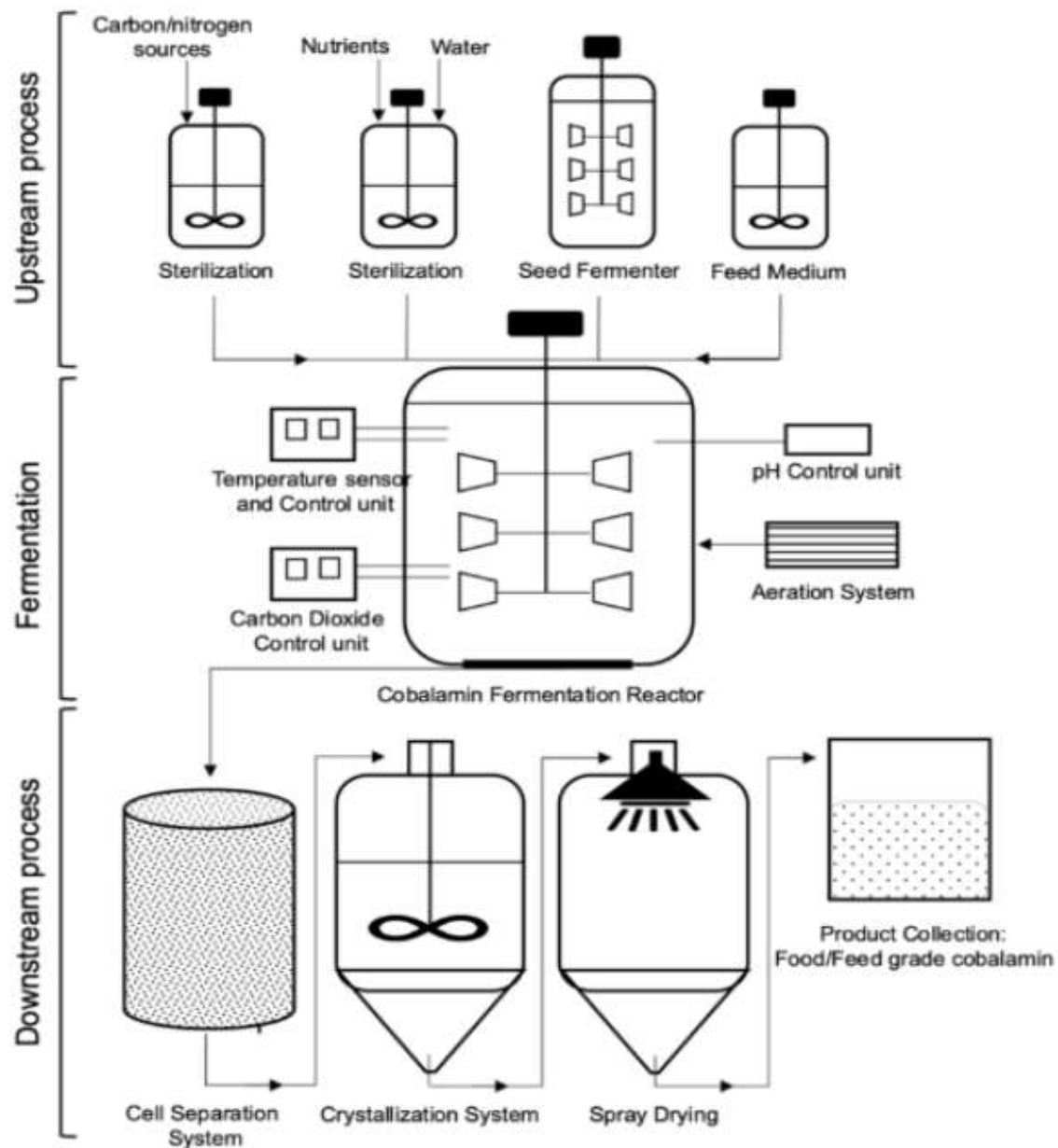


Figure . Organigramme général de la production industrielle de cobalamine applicable au procédé aérobie chez *P. denitrificans*.

3. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des molécules composées de multiples unités de sucre simple, appelées monosaccharides, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être formés par un seul type de monosaccharide, ce qui les classe comme homopolysaccharides. Alternativement, ils peuvent être composés de plusieurs types de monosaccharides différents, ce qui les qualifie de hétéropolysaccharides hétérogènes.

Les polysaccharides industriels sont des composés utilisés dans diverses applications et peuvent provenir de différentes sources. Certains sont extraits de plantes, tels que la cellulose, la pectine, la gomme arabique et l'amidon, tandis que d'autres sont dérivés d'algues, tels que l'agar-agar, l'alginate et la carraghénane. Les microorganismes, notamment les bactéries et les champignons, sont également capables de synthétiser des polysaccharides industriels.

Selon leur localisation dans la cellule microbienne, on distingue trois types de polysaccharides d'origine microbienne.

- Les polysaccharides intracellulaires sont difficiles à extraire car ils se trouvent à l'intérieur de la cellule.
- Les polysaccharides de la paroi, comme la chitine présente dans la paroi des champignons, sont également difficiles à extraire.
- Enfin, les polysaccharides extracellulaires, également appelés exopolysaccharides (EPS), ne sont pas liés de manière covalente à la paroi cellulaire. Ils peuvent être sécrétés à l'extérieur de la cellule sous forme de boue lâche ou former une capsule autour de la cellule, appelée slime ou "capsular polysaccharides" (CPS).

Les exopolysaccharides d'origine microbienne remplissent plusieurs fonctions physiologiques pour les microorganismes. Ils peuvent protéger le microorganisme contre la dessiccation, lui permettre d'échapper au système immunitaire, agir comme une barrière contre les virus et les agents chimiques, faciliter la fixation du microorganisme sur différentes surfaces et servir de réserve énergétique. Ces propriétés font des polysaccharides extracellulaires d'origine microbienne des matériaux d'intérêt dans de nombreux domaines industriels.

Biopolymères

Les biopolymères sont utilisés dans l'industrie alimentaire (xanthane, alginates) dans l'industrie des cosmétiques et la pharmacie (acide hyaluronique) ou dans la fabrication des plastiques (polyhydroxybutyrate).

Tableau 3 – Principaux biopolymères produits par fermentation

Produit	Voies d'accès	Micro-organismes utilisés
Alginate	F	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Levane	F	<i>Zymomonas mobilis</i>
Phosphomannane	F	<i>Hansenula holstii</i>
Polyhydroxybutyrate	F	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
Pullulane	F	<i>Aurebasidium pullulans</i>
Sclérogucane	F	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Xanthane	F	<i>Xantomonas campestris</i>
Acide hyaluronique	F	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>

- Les polysaccharides constituent la majorité des biopolymères utilisés comme stabilisants, agents filmogènes, etc. Ils sont utilisés pour modifier les caractéristiques d'écoulement des liquides et comme agents gélifiants.
- Les biopolymères comprennent les dextrans, les polysaccharides d'alginate et les polyesters dérivés de *Pseudomonas oleovorans*.
- Les celluloses microfibrilles, les scléroglycanes et les polymères de xanthane sont également utilisés dans différents domaines.
- Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques utilisés pour diverses applications. Elles peuvent augmenter la solubilité des médicaments, réduire l'amertume et masquer les odeurs chimiques. Les cyclodextrines peuvent également être utilisées comme adsorbants sélectifs pour éliminer le cholestérol ou protéger les épices de l'oxydation.

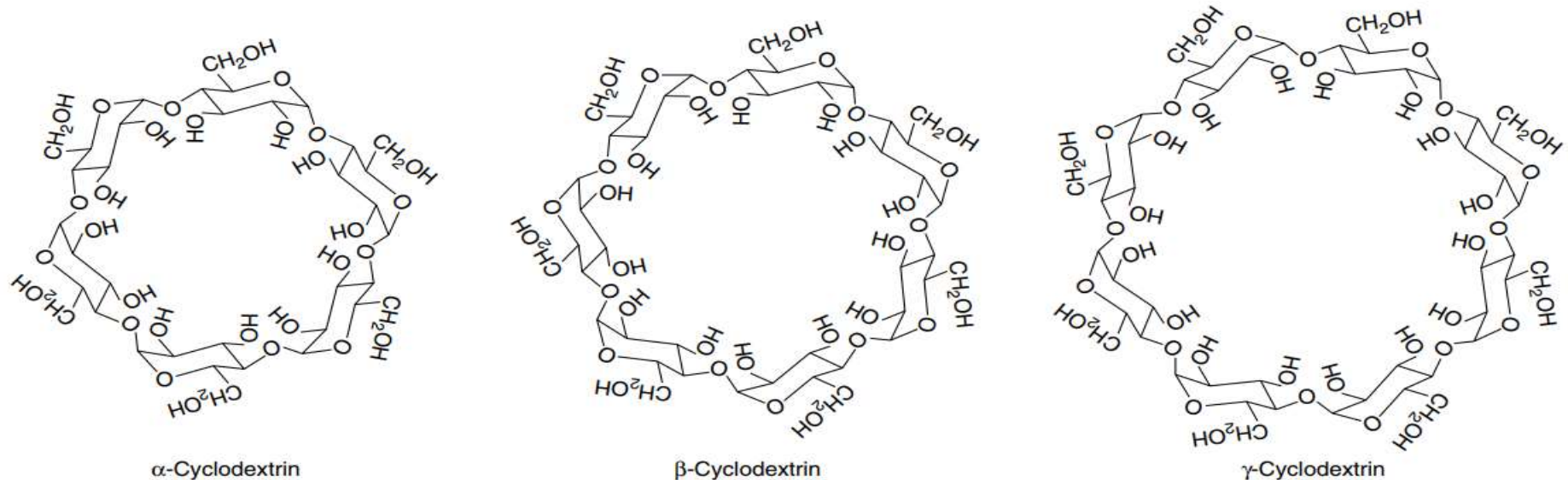


Figure 42.13 Cyclodextrins. The basic structures of cyclodextrins produced by *Thermoanaerobacter* are illustrated here. These unique oligopolysaccharides have many applications in medicine and industry.

❖ Exemple de production industrielle d'un polysaccharide: la xanthane

Généralités

La gomme xanthane est une hétéropolysaccharide obtenue par la fermentation aérobie des sucres par des bactéries du genre *Xanthomonas*, dont *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas carotae*, *Xanthomonas malvacearum* et *Xanthomonas phaseoli*. Beaucoup d'entre eux sont des phytopathogènes.

La gomme xanthane possède une structure complexe. Elle est constituée d'une chaîne principale d'unités de D-glucose liées en β (1 $\rightarrow$ 4). Cette chaîne présente des ramifications latérales tous les deux glucose, formées par un trisaccharide composé d'un α -D-mannose, d'un acide β -D-glucuronique et d'un β -D-mannose terminal.

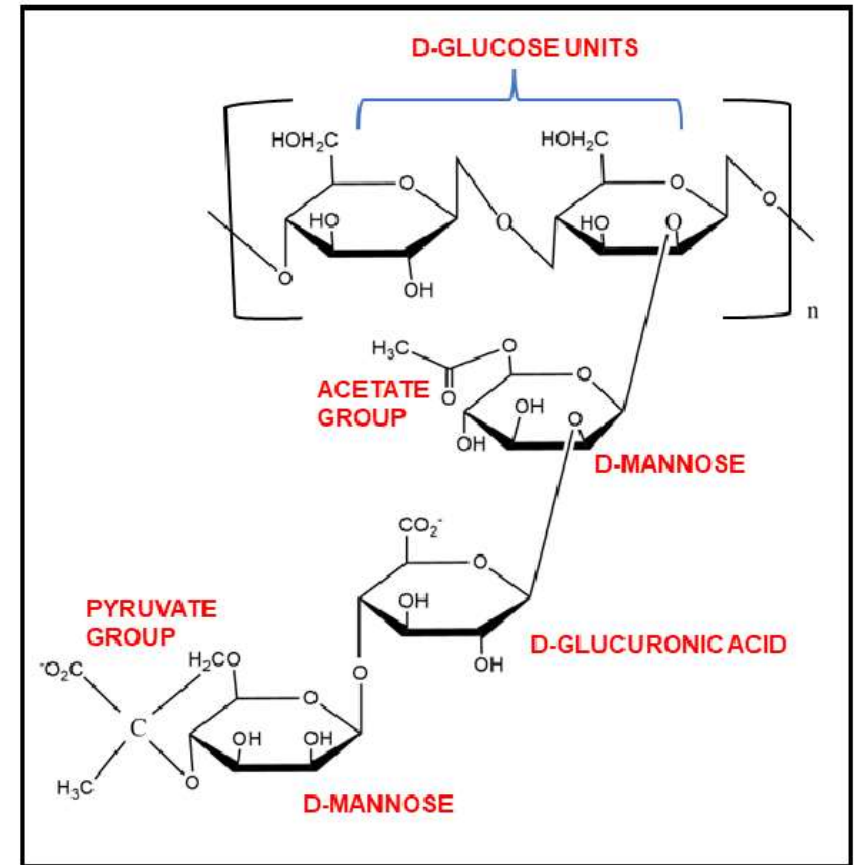


Figure 1. Chemical structure of xanthan gum and its functional groups.

Cette structure complexe confère à la gomme xanthane des propriétés rhéologiques uniques, notamment sa capacité à former des solutions viscoélastiques, à augmenter la viscosité et à stabiliser les émulsions. Ces propriétés en font un ingrédient précieux dans de nombreuses applications industrielles, telles que l'alimentation, les produits pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les revêtements.

Production

- Pour la production industrielle de la gomme xanthane, la première étape consiste à cultiver la bactérie *Xanthomonas campestris*. Cette culture est ensuite utilisée pour inoculer des fermenteurs à l'échelle pilote d'une capacité de 50 à 200 m³. Le milieu de culture utilisé comprend une source de carbone, telle que le D-glucose, le saccharose ou la mélasse, ajoutée à une concentration de 30 à 40 g/L. Une source d'azote est également ajoutée, avec un rapport carbone/azote d'environ 10:1, pour favoriser un rendement élevé de la gomme xanthane. Les sources courantes d'azote comprennent la caséine, l'hydrolysate de soja, les sels d'ammonium, la peptone, le Corn steep liquor et l'extrait de levure. Des traces de MgCl₂ et une solution tampon de phosphate sont également présentes dans le milieu de culture.
- La culture est agitée à une température comprise entre 28 et 30 °C et maintenue à un pH de 7,0. La bactérie commence à produire la gomme xanthane pendant la phase exponentielle de croissance, et la fermentation est généralement terminée après environ 3 jours d'incubation. À la fin de la fermentation, la culture est chauffée à 100-110 °C pendant 10 minutes pour éliminer les bactéries et améliorer les propriétés rhéologiques de la gomme xanthane.
- La purification de la gomme xanthane se fait par filtration, suivie d'une précipitation dans de l'isopropanol. Ensuite, une étape de centrifugation est réalisée pour obtenir la gomme xanthane sous forme de précipité. Après séchage, le précipité est broyé pour obtenir une poudre de gomme xanthane. Le rendement minimal attendu est d'environ 25 g/L à 50 g/L de milieu de culture utilisé.

3. Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui jouent un rôle essentiel dans la synthèse de nombreuses molécules. Leur propriété principale est de faciliter et d'accélérer les réactions chimiques spécifiques auxquelles elles sont associées.

Les enzymes peuvent être extraites à partir de tissus végétaux, animaux ou produites par certains microorganismes. Elles sont appréciées pour leur efficacité et leur spécificité remarquables, car elles ne réagissent qu'avec des composés moléculaires spécifiques. Cette spécificité permet de cibler précisément les réactions chimiques souhaitées, évitant ainsi les effets indésirables.

L'utilisation des enzymes présente de nombreux avantages. Leurs propriétés catalytiques permettent de réaliser des réactions chimiques de manière plus efficace, plus rapide et à des conditions de température et de pression moins sévères par rapport aux méthodes chimiques traditionnelles. Cela peut conduire à une réduction des coûts et à une économie d'énergie, tout en minimisant les déchets et en favorisant une approche plus respectueuse de l'environnement.

Les enzymes sont largement utilisées dans divers secteurs industriels, tels que l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique, l'industrie chimique, l'industrie du papier, l'industrie textile, etc. Leur utilisation croissante dans ces domaines contribue à la mise en œuvre de processus plus durables et respectueux de l'environnement, en remplaçant souvent des méthodes chimiques plus polluantes et moins efficaces.

➤ Production industrielle des enzymes par fermentation

- On distingue les enzymes d'extraction (à partir d'organismes végétaux ou animaux) ou les enzymes de fermentation (microorganismes).
- Le procédé industriel typique pour la production d'enzymes est la culture en profondeur en milieu aérobie utilisant un microorganisme produisant en grande quantité une enzyme extracellulaire. Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction :
 - Production en grande quantité en fermenteur,
 - Production indépendante des contraintes géographiques et saisonnières,
 - Matière première bon marché,
 - Manipulation génétique facile – mutants hyperproducteurs,
 - Purification plus facile en cas d'enzymes extracellulaires.
- Les microorganismes utilisés pour la production d'enzymes peuvent être des eucaryotes tels que les levures et les champignons, ou des procaryotes tels que les Gram-positifs ou les Gram-négatifs.

Enzymes	Microorganismes producteurs
α-amylase	<i>Aspergillus niger, Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae...</i>
Pectinases	<i>Aspergillus niger, Rhizopus</i>
cellulase	<i>Aspergillus niger, Penicillium, Trichoderma harzianum</i>
Protéases	<i>Aspergillus niger, Bacillus subtilis</i>
Lipases	<i>Trichoderma harzianum, Aspergillus niger, Penicillium, Mucor, Pseudomonas</i>
L-Asparaginase	<i>Cladosporium sp.</i>

- Les caractéristiques recherchées dans une souche produisant une enzyme industrielle sont : taux de croissance important, productivité en enzyme importante, activité spécifique de l'enzyme élevée, régulation réduite, résistance à la répression catabolique, peu de produits secondaires, sporulation limitée, nutrition réduite, enzyme extracellulaire, morphologie adaptée à la culture en réacteur. Comme il est difficile de trouver toutes ces caractéristiques chez le même organisme, la majorité des souches servant à la production d'enzymes industrielles ont été améliorées par :
 - mutagenèse (agents chimiques ou irradiation UV) permettant d'atteindre rapidement des caractéristiques utiles ou,
 - génie génétique permettant à des microorganismes de produire des enzymes d'organismes supérieurs par insertion du gène correspondant dans le microorganisme. La chymosine (E.C. 3.4.23.4) a été clonée par différents groupes dans plusieurs microorganismes faciles à cultiver comme la levure pour produire de manière industrielle des préparations enzymatiques coagulant le lait.
- Les milieux de productions doivent être riches (complets), apportant tous les éléments nutritifs (source de carbone, azote, phosphore, oligoéléments, vitamines...). De plus, il faut ajouter les substrats de l'enzyme recherchée par exemple: amidon pour la α -amylase et cellulose pour la cellulase.
- La fermentation en vue de produire une enzyme se fait à très grande échelle. Quand l'enzyme est extracellulaire, on peut utiliser un fermenteur jusqu'à 450 m³. Dans le cas d'enzymes intracellulaires, la nécessité de traitements pour l'extraction impose une limite du volume jusqu'à 30 m³.
- Dans un fermenteur la production d'enzyme est optimisée grâce à un contrôle rigoureux d'un maximum de paramètres.

❖ Extraction et de purification des enzymes

La localisation de l'enzyme, qu'elle soit exocellulaire ou endocellulaire, influence les méthodes de récupération et de purification utilisées. Ces étapes sont adaptées en fonction de la nature de l'enzyme et du degré de pureté souhaité, afin d'obtenir une enzyme fonctionnelle et pure pour les applications industrielles.

Dans le cas des enzymes exocellulaires, elles sont généralement plus facilement accessibles, car elles sont libérées dans le milieu de culture. Cela facilite la récupération de l'enzyme, car elle peut être séparée du milieu de culture par des techniques telles que la filtration, la centrifugation ou la précipitation.

Les enzymes endocellulaires sont encapsulées à l'intérieur des cellules, ce qui rend leur récupération plus complexe. Des méthodes de rupture cellulaire sont généralement utilisées pour libérer les enzymes, suivies de diverses étapes de purification pour isoler l'enzyme souhaitée des autres composants cellulaires. Les étapes de récupération et de purification peuvent inclure des techniques telles que la filtration tangentielle, la chromatographie, la précipitation sélective, la dialyse et l'électrophorèse, en fonction des propriétés spécifiques de l'enzyme et des impuretés présentes.

L'objectif final de ces étapes est d'obtenir une enzyme purifiée dans le but d'assurer sa stabilité, son activité et sa fonctionnalité optimales dans les applications industrielles, telles que l'utilisation en tant que catalyseur dans des processus de production spécifiques.

