

Cours Techniques des Fermentations et Bioprocédés

Master 1 Biotechnologies Alimentaires

Exemple d'évaluation de la performance d'une fermentation

(Section 2. Performance d'un bioprocédé)

Le tableau 3 fournit les mesures de biomasse, de glucose consommé et d'éthanol produit, au cours d'une fermentation alcoolique de 28 heures avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée en bioréacteur dans un milieu à base de sucre de maïs. Ces données permettent de calculer plusieurs variables attestant de la performance du procédé.

Tableau 3. Suivi de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* en bioréacteur ($T^\circ = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$, conditions d'anaérobies).

Temps de fermentation (h)	Biomasse (X en g/L)	$\ln X$	Concentration en glucose (S en g/L)	Concentration en éthanol (P en g/L)
0	1.5	0.41	250	6.25
5	2.0	0.69	237	10.2
9	3.5	1.25	208	32.9
13	6.2	1,82	152	52.0
16	8.2	2.10	108	65.0
20	9.4	2.24	65.0	76.0
24	9.8	2.28	43.0	84.5
28	9.9	2.29	20.0	90.0

1/ Le taux de croissance spécifique maximal de la levure (μ_{max}) correspond à la pente de la droite obtenue en phase exponentielle sur la courbe de croissance, soit entre 5 et 13 heures de fermentation.

Calculer le ?

2/ Le temps de génération (G) est calculé directement à partir de la valeur de μ_{max}

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$$

$$\ln 2 = 0.693$$

3/ Calculer le rendement en biomasse pour l'ensemble de la fermentation ?

4/ Calculer le rendement en éthanol ?

5/ Calculer le rendement en éthanol par rapport à la biomasse ?

6/ Calculer le taux de production spécifique ?

7 Calculer la productivité maximale en biomasse ?

8/ Calculer la productivité totale en biomasse ?

9/ Calculer la productivité en éthanol pour toute la fermentation ?

SOLUTION

μ_{max} est une vitesse constante pendant la phase exponentielle c'est la variation de la concentration du substrat en fonction du temps.

$$\mu_{max} = \ln X_2 - \ln X_1 / t_2 - t_1 = 1,82 - 0,69 / 13h - 5h = 0,14h^{-1}$$

2/ Le temps de génération (G) est calculé directement à partir de la valeur de μ_{max}

$$G = \ln 2 / \mu_{max} = 0,693 / 0,14h^{-1} = 4,95 h$$

$$\ln 2 = 0.693$$

3/ Calculer le rendement en biomasse pour l'ensemble de la fermentation ?

Le rendement en biomasse ($Y_{x/s}$) est calculé pour l'ensemble de la fermentation selon la formule suivante

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{9,9 - 1,5 \text{g/L}}{250 - 20 \text{g/L}} = 0,036 = 3,6\%$$

4/ Calculer le rendement en éthanol ?

le rendement en éthanol est calculé pour l'ensemble de la fermentation selon la formule suivante :

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{90 - 6,25 \text{g/L}}{250 - 20 \text{g/L}} = 0,36 = 36\%$$

5/ Calculer le rendement en éthanol par rapport à la biomasse ?

$$Y_{p/x} = \frac{0,36 \text{g/g}}{0,037 \text{g/g}} = 9,73 \text{g/g} = 973 \%$$

6/ Calculer le taux de production spécifique maximal ?

Le taux de production spécifique maximal d'éthanol Q_{pmax} peut être calculé à partir des valeurs de $Y_{p/x}$ et de μ_{max} puisque l'éthanol, un résidu catabolique, est un produit dépendant de la croissance.

$$Q_{pmax} = Y_{p/x} \cdot \mu_{max} = 9,73 \text{g/g} \cdot 0,14 \text{h}^{-1} = 1,36 \text{h}^{-1}$$

7 Calculer la productivité maximale en biomasse ?

La productivité maximale en biomasse ($P_x \text{ max}$) correspond à la quantité maximale de cellules qui peuvent être produites par litre de culture par heure de fermentation. Elle peut être déterminée graphiquement en traçant une tangente à partir de l'origine de la cinétique de croissance (X_0, t_0) jusqu'au point d'inflexion, en décélération, qui sépare la phase exponentielle et la phase stationnaire. En effet, au-delà de ce point (X_m, t_m), la croissance ralentit suffisamment pour entraîner vers la baisse de la productivité en biomasse.

Elle est calculée à partir des valeurs de X_m et t_m

$$P_x \text{ max} = \frac{X_m - X_0}{t_m - t_0}$$

Px max = productivité maximale en biomasse g/L/h

Xm= concentration en biomasse au temps tm (g/L)

X₀ = concentration initiale en biomasse (g/L)

tm c'est le temps où la productivité en biomasse est maximum est maximal (h)

t₀ temps au début de la fermentation (h)

8/ Calculer la productivité totale en biomasse ?

La productivité totale en biomasse (Px tot), elle est calculée pour toute la fermentation

$$P_x \text{ tot} = X_t - X_0 / t_t - t_0 = 9,9 - 1,5 \text{ g/l} / 28\text{h} - 0\text{h} = 0,3 \text{ g/L/h}$$

9/ Calculer la productivité en éthanol pour toute la fermentation ?

La productivité en éthanol (P_p) est aussi calculée pour toute la fermentation

$$P_p = P_t - P_0 / t_t - t_0 = 90 - 6,25 \text{ g/L} / 28\text{h} - 0\text{h} = 2,99 \text{ g/ L/ h}$$

CHAPITRE III

CONTROLE ET AMELIORATION DE LA FERMENTATION

I. Amélioration des souches industrielles

Les manipulations génétiques sont utilisées pour produire des microorganismes dotés de caractéristiques nouvelles ou souhaitées. On outre, les méthodes classiques de la génétique microbienne jouent un rôle vital dans le développement de culture pour la microbiologie industrielle.

1.1. La mutation

Dès la découverte d'une culture prometteuse, on peut utiliser pour l'améliorer une variété de techniques parmi lesquelles la mutagenèse chimique et l'irradiation UV. Exemple la souche de *Penicillium chrysogenum* – la souche NRRL 1951- isolée en 1943 qui fut améliorée par mutation (Figure 4). Aujourd'hui la plus grande partie de la pénicilline est produite par *P. chrysogenum*, cultivée dans des fermenteurs aérobies à agitation rotative, qui donnent des rendements en pénicilline 55 fois supérieur à celui des cultures statiques originales.

1.2. La fusion des protoplastes

Actuellement la fusion des protoplastes est largement utilisée avec les levures et les moisissures. Pour effectuer des études génétiques sur ces microorganismes, on prépare des protoplastes en cultivant des cellules dans des solutions isotoniques, tout en les traitants par des enzymes, dont la cellulase et le β -galacturonidase. Lorsqu'il y'a fusion et formation d'hybrides, on identifie les recombinants désirés par les technique sélectives d'étalement sur boîte. Après régénération de la paroi, le produit de la fusion des protoplastes peut servir à des études ultérieures.

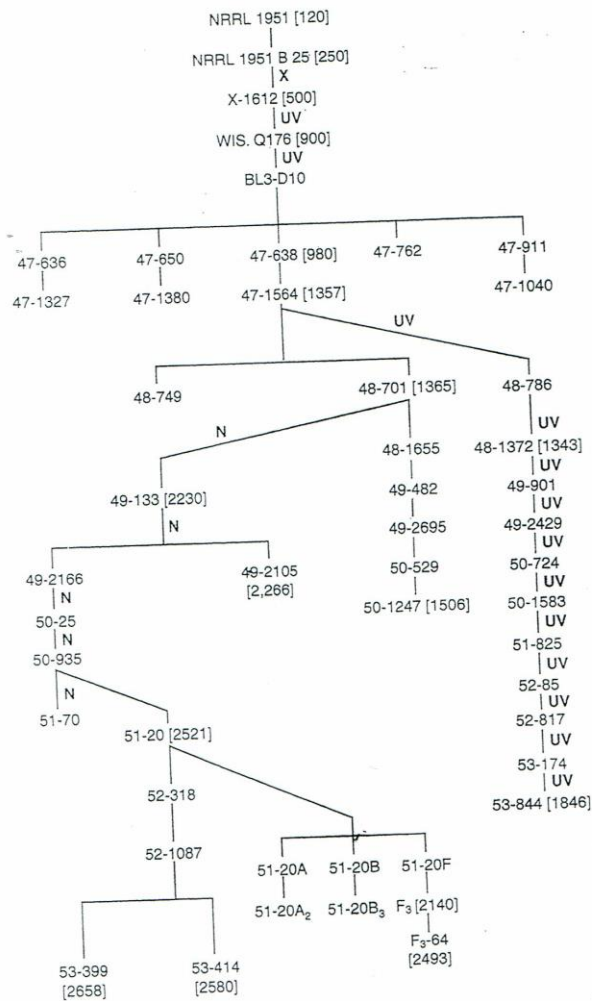


Figure . La mutation permet d'augmenter les rendements de la fermentation. Une « généalogie » des processus de mutation utilisés pour augmenter les rendements en pénicilline de *Penicillium chrysogenum* par traitements aux rayons X (X), aux UV (UV), ou au gaz moutarde (N). Grâce à ces procédés mutagènes, le rendement est passé de 120 à 2.580 unités internationales, soit une augmentation d'un facteur 20. Les transferts non marqués ont servi à cultiver et à isoler les mutants. Les rendements en unités internationales/ml figurent entre crochets.

Un grand nombre d'avantages de la technique de la fusion des protoplastes est de pouvoir fusionner des protoplastes de différentes espèces microbiennes, même si elles ne sont pas proches taxinomiquement. Par exemple, on a fusionné des protoplastes de *Penicillium roqueforti* et *P. chrysogenum*. Même des protoplastes de levures avec des érythrocytes peuvent être fusionnés.

1.3. L'insertion de courtes séquences d'ADN

De courts segments d'ADN synthétisés chimiquement peuvent être insérés dans des microorganismes hôtes par le processus de la mutagénèse dirigée. On peut ainsi créer de petites modifications génétiques qui induisent le changement d'un ou de plusieurs acides aminés dans la protéine cible. On s'est aperçu, que, dans beaucoup de cas, ces changements mineurs entraînent des modifications inattendues dans les caractéristiques de la protéine et donnent de nouveaux produits : enzymes capables de catalyser des réactions souhaitées. Ces approches relèvent du domaine de l'ingénierie des protéines.

On peut ainsi construire des enzymes et des peptides biologiquement actifs, dotés de caractéristiques nettement différentes (stabilité, cinétique, activité...). On peut aussi mieux comprendre la base moléculaire de fonctionnement de ces produits modifiés. Un des domaines les plus intéressants est la conception de sites actifs d'enzymes, qui pourraient modifier des « substrats non naturels ». Cette approche peut conduire à une meilleure transformation de matières récalcitrantes, ou même à la biodégradation de matière qui jusque-là n'y étaient pas sujettes.

1.4. Transfert de l'information génétique entre organismes différents

La biologie combinatoire est un domaine qui se développe rapidement ; c'est le transfert d'acides nucléiques entre organismes différents. Des gènes codant pour la synthèse d'un produit spécifique sont transférés d'un organisme dans un autre, ce qui donne au receveur des capacités variées, telles que le pouvoir de dégrader plus efficacement les hydrocarbures. Un des premiers exemples importants de cette approche fut la création d'un « super microbe » par A. M. Charkabarty 1974. Cet organisme était doté d'une capacité accrue de dégrader les hydrocarbures. On peut transférer les gènes de la production d'un

antibiotique dans un microorganisme qui produit un autre antibiotique, ou même dans un microorganisme qui n'en produit pas.

En exprimant l'ADN dans des organismes différents, on peut obtenir une production plus efficace et réduire les étapes de purification requises pour avoir un produit utilisable. Par exemple, on peut répliquer des baculovirus recombinants dans des larves d'insectes, pour obtenir rapidement une production à grande échelle des virus ou de la protéine désirée. On peut aussi insérer une large gamme d'informations génétiques dans des microorganismes, au moyen de vecteurs et des techniques de l'ADN recombinant. Les vecteurs incluent les chromosomes artificiels comme ceux de levures « YAC », de bactéries « BAC », de mammifères « MAC » et les chromosomes dérivés de bactériophages P1 (PAC). Les YAC sont particulièrement intéressants, parce qu'on peut maintenir dans la cellule de levure de longues séquences d'ADN (plus de 100 kb) sur un chromosome séparé.

Un bon exemple de l'emploi de vecteur est fourni par le virus qui provoque la fièvre aphteuse chez le bétail. On peut incorporer chez *Escherichia coli* l'information génétique pour un antigène de ce virus, cette information s'exprime, le produit du gène est synthétisé et sert à la production des vaccins (Figure 5).

Le transfert de l'information génétique permet de produire des protéines et des peptides spécifiques, sans qu'ils soient contaminés par des produits similaires que synthétiserait l'organisme d'origine. Cette approche peut diminuer le temps et le coût nécessaires à la récupération et la purification d'un produit. Un autre grand avantage de la production de peptides par la biotechnologie moderne est qu'il n'y a que les stéréoisomères biologiquement actifs qui soient synthétisés. Cette spécificité est requise pour éviter les possibles effets secondaires nocifs des stéréoisomères inactifs.

1.5. La modification de l'expression génétique

En plus d'insérer des gènes nouveaux dans certains organismes, il est possible de modifier la régulation génétique en touchant à la transcription, en fusionnant des protéines, en créant des promoteurs hybrides et en supprimant des contrôles de la rétro-régulation. Ces approches permettent de surproduire une large variété de produits. Exemple, les gènes de la synthèse de l'actinorhodine ont été transférés dans des souches produisant un autre antibiotique, avec pour résultat la production de deux antibiotiques par la même souche.

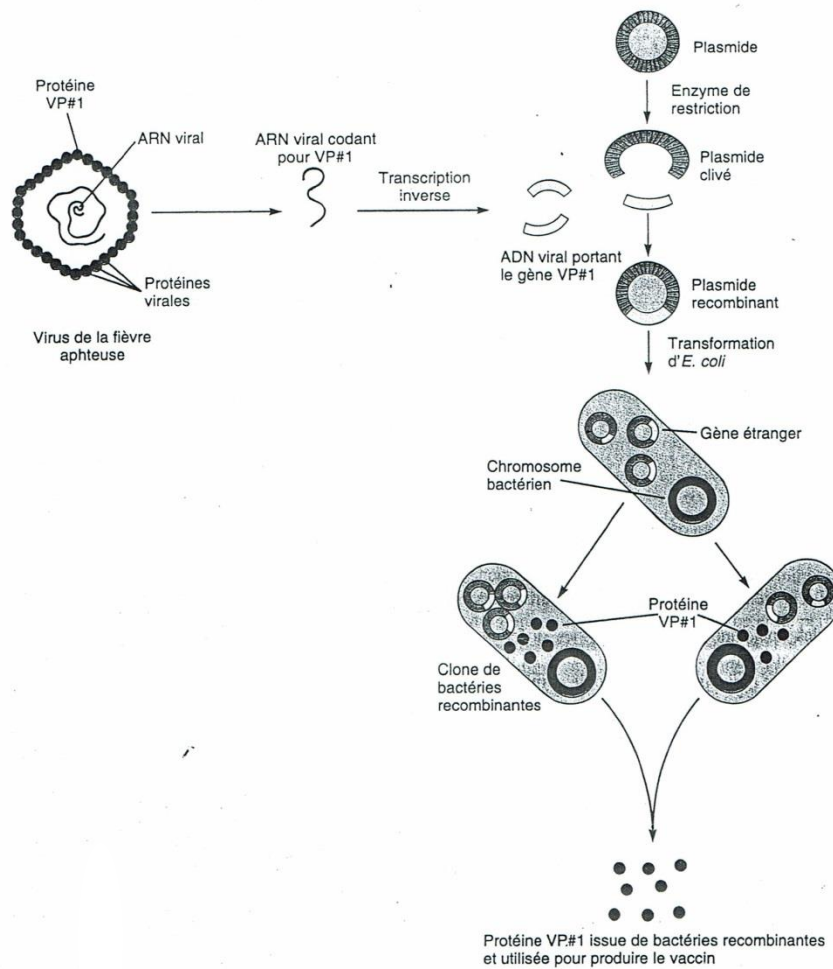


Figure . La production d'un vaccin recombinant. Les gènes codant pour les produits voulus peuvent être exprimés dans un organisme différent. En recourant aux techniques de l'ADN recombinant, on produit un vaccin contre la fièvre aphteuse, grâce au clonage des gènes du vaccin dans *Escherichia coli*.

Cette approche de modification de l'expression génétique peut aussi consister en un changement intentionnel de voies métaboliques, par inactivation ou dérégulation de gènes spécifiques. C'est le *domaine de l'architecture des voies métaboliques*.

On peut utiliser des voies alternatives pour ajouter trois groupes fonctionnels à une molécule. Il se peut que certains de ces voies soient plus efficaces que d'autres. La connaissance de l'architecture des voies métabolique permet de construire une voie plus efficace, en évitant des passages plus lents ou plus coûteux énergétiquement ; la production de pénicilline a ainsi été améliorée par *ingénierie des voies métaboliques*.

Une application récente de la modification de l'expression génétique illustre l'ingénierie du contrôle métabolique. Elle consiste à modifier les contrôles de synthèse de lycopène, un antioxydant important, normalement présent à fortes concentrations dans les tomates et les produits tomates. Ici un circuit régulateur a été construit par ingénierie, afin que la synthèse de la lycopène soit contrôlée en fonction de l'état métabolique interne d' *E.coli*.

Un autre développement récent est l'emploi d'une expression génétique modifiée pour produire des variations de l'érythromycine (Figure 6). Le blocage d'étapes biochimiques spécifiques. Dans les voies de biosynthèse d'un précurseur de l'antibiotique conduit à des produits finals modifiés. Ces produits modifiés, qui ont des structures légèrement différentes, sont testés pour leur éventuel effet antimicrobien. En outre, par cette approche, il est possible de préciser la relation structure-fonction des antibiotiques. On a aussi développé, par cette ingénierie des voies métabolique, des procédures d'utilisation de micro-organismes pour produire des aliments chimiques. En allumant ou en éteignant des gènes spécifiques, on peut produire des substances chimiques comme le 1, 2 – propanediol et 1, 3 – propanediol en très grande quantités. Ces produits chimiques particuliers sont ajoutés dans les aliments semi-humides pour chien.

1.6. L'ingénierie génétique naturelle

L'approche la plus neuve pour doter un micro-organisme donné de nouvelles capacités métaboliques est l'ingénierie génétique naturelle qui recourt à l'*évolution forcée* et aux mutations adaptatives. Ce processus tire parti des stress environnementaux spécifique pour « forcer » les micro-organismes à muter et s'adapter, ce qui crée des micro-organismes aux capacités biologiques nouvelles. Les mécanismes de ces mutations adaptatives incluent des

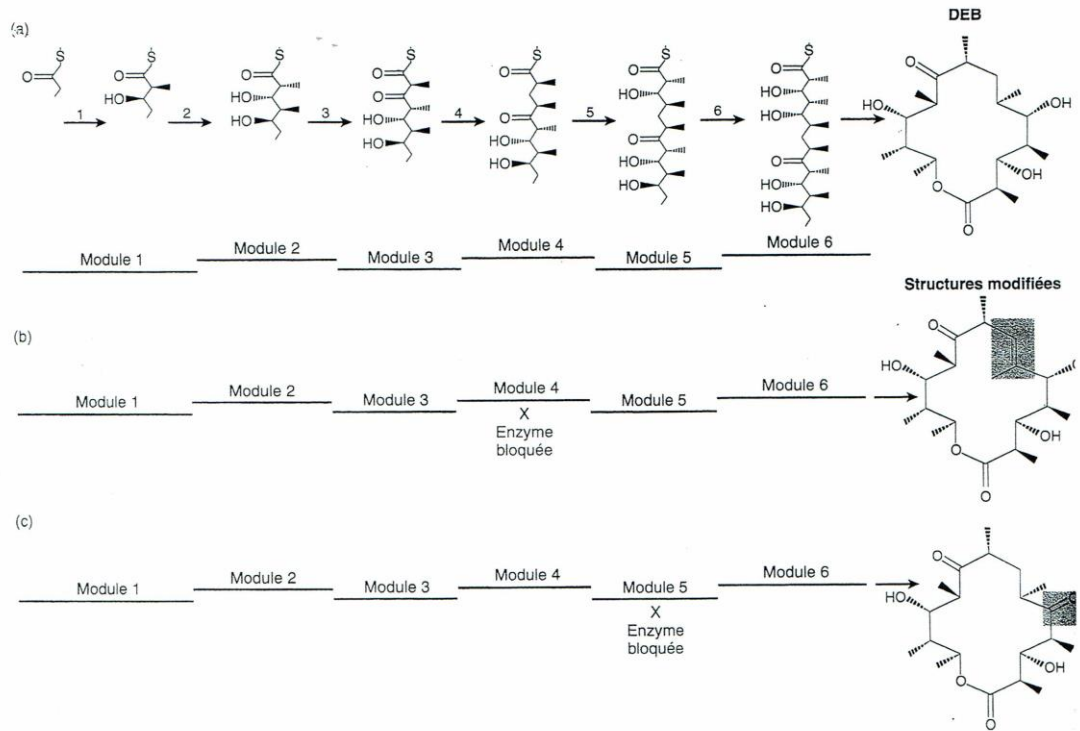


Figure Ingénierie métabolique en vue de créer un antibiotique modifié. (a) Modèle pour six cycles d'allongement (modules) dans la synthèse du 6-désoxyérythronolide B (DEB), précurseur de l'érythromycine, un antibiotique important. (b) Les changements de structure qui se produisent lorsque l'énoylréductase du module 4 est bloquée. (c) les changements de structure qui se produisent lorsque la cétoréductase du module 5 est bloquée. Ces structures différentes (les zones mises en évidence) peuvent conduire à la synthèse d'antibiotiques modifiés aux propriétés améliorées.

réarrangements d'ADN où les éléments transposables et divers types de recombinaisons jouent des rôles essentiels.

Les études sur l'ingénierie génétique naturelle sont en pleine évolution. Il se pourrait que les « processus d'évolution » soient, dans certains cas, plus efficaces que les conceptions rationnelles. De telles mutations « dirigées par l'environnement » peuvent produire des micro-organismes dotés de capacités nouvelles de dégradation ou de biosynthèse.

Bien qu'il ait beaucoup de controverse en ce domaine, les réponses des micro-organismes au stress offrent la possibilité de générer de nouvelles capacités microbiennes pour la microbiologie industrielle et la biotechnologie.