

***Croissance
industrielle des
microorganismes
L3MG 2020***

Raisons :

Obtention d'une biomasse servant

- soit d'aliment (levures comme complément nutritionnel)
- soit à la fabrication d'aliment (levures pour la fabrication de pain, de bière, de brioches, de vin..., moisissures pour fabrication de fromages, saké..., bactéries pour fabrication de yaourt....)

Synthèse de molécules d'intérêt alimentaire, médical ou industriel

acide citrique, pénicilline, cyclosporine.....

Plan

- 1- Les diverses techniques de culture
- 2- Caractéristiques des souches utilisées
- 3- Des exemples de cultures industrielles

1- Les diverses techniques de culture

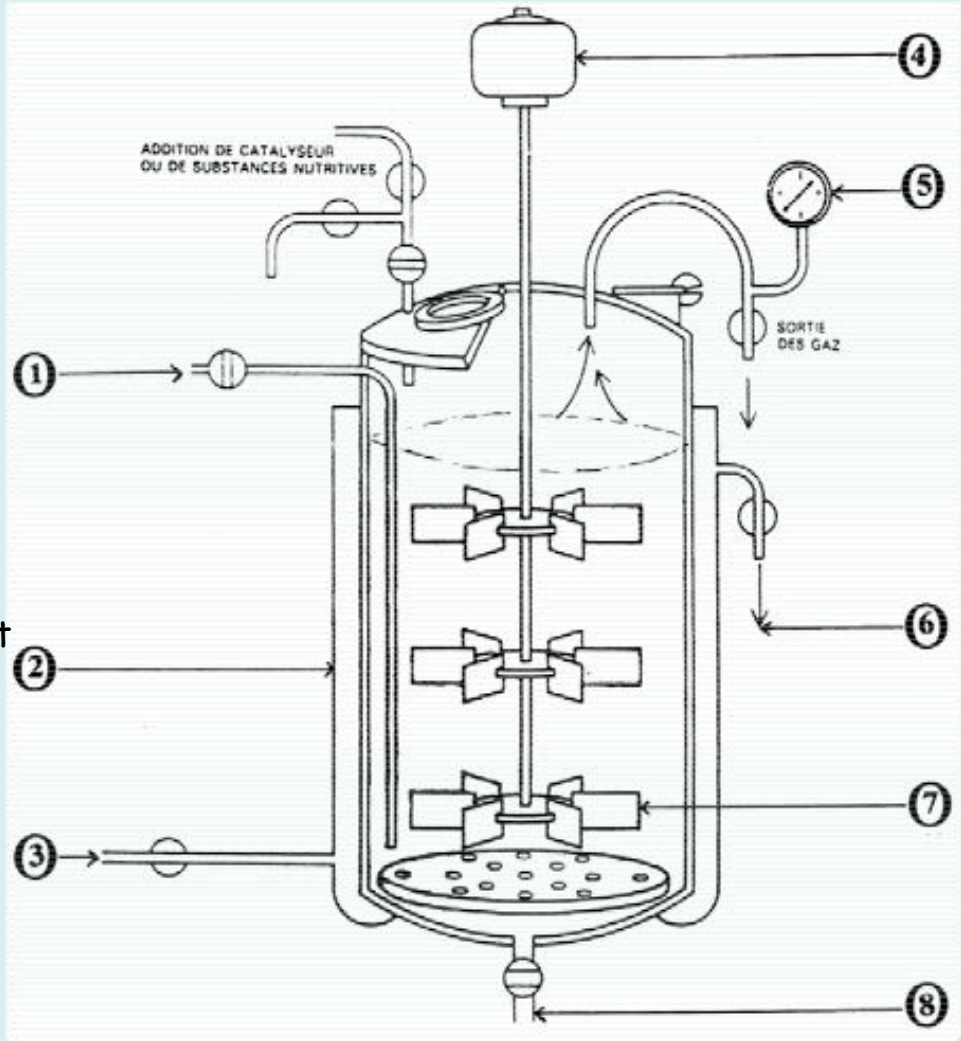
Deux grandes techniques de culture :

- Culture en discontinu = culture en batch
- Culture en semi-continu = culture en fed-batch
- Culture en continu = culture en milieu renouvelé

Remarque : existence d'un autre type de culture avec immobilisation des microorganismes

1-1- Culture en discontinu =
culture en batch = culture en
milieu non renouvelé

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



④ moteur pour agitation

⑤ manomètre (pour vérifier la pression interne)

⑥ sortie de l'eau de refroidissement

⑦ pales pour agitation

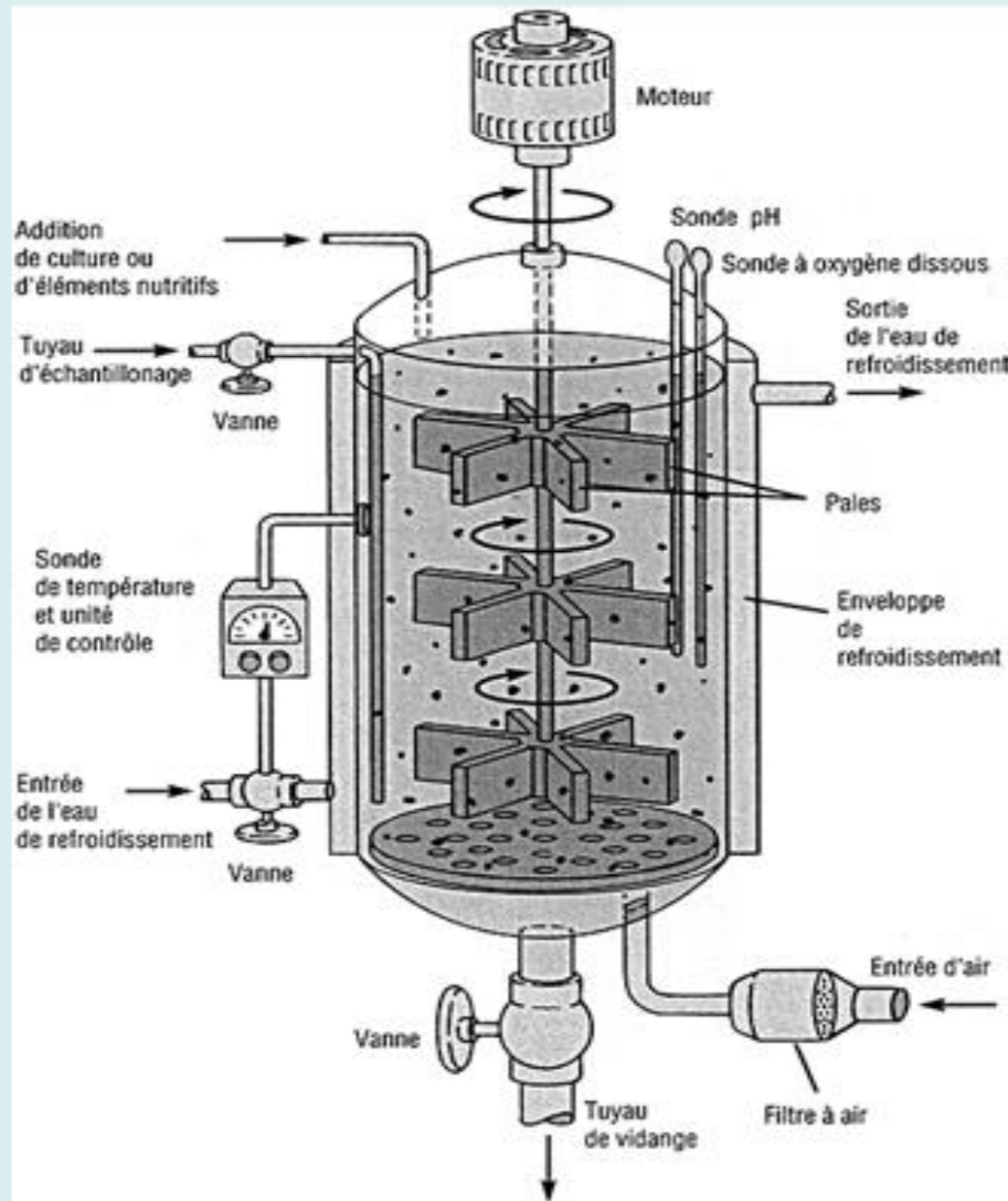
⑧ tuyau de vidange

entrée d'air muni d'un filtre (ou tuyau d'échantillonnage)

enveloppe de refroidissement

entrée d'eau de refroidissement

1-1-1- Matériel de culture : bioréacteur



Un bioréacteur de laboratoire est une cuve accueillant de 1 à 5 L en général, même moins.

Un bioréacteur pilote est une cuve accueillant de 10 à 200 L en général,

Un bioréacteur de production industrielle est un cuve accueillant de quelques centaines de L à plusieurs m³



Fermenteur 2L



Fermenteur 20L

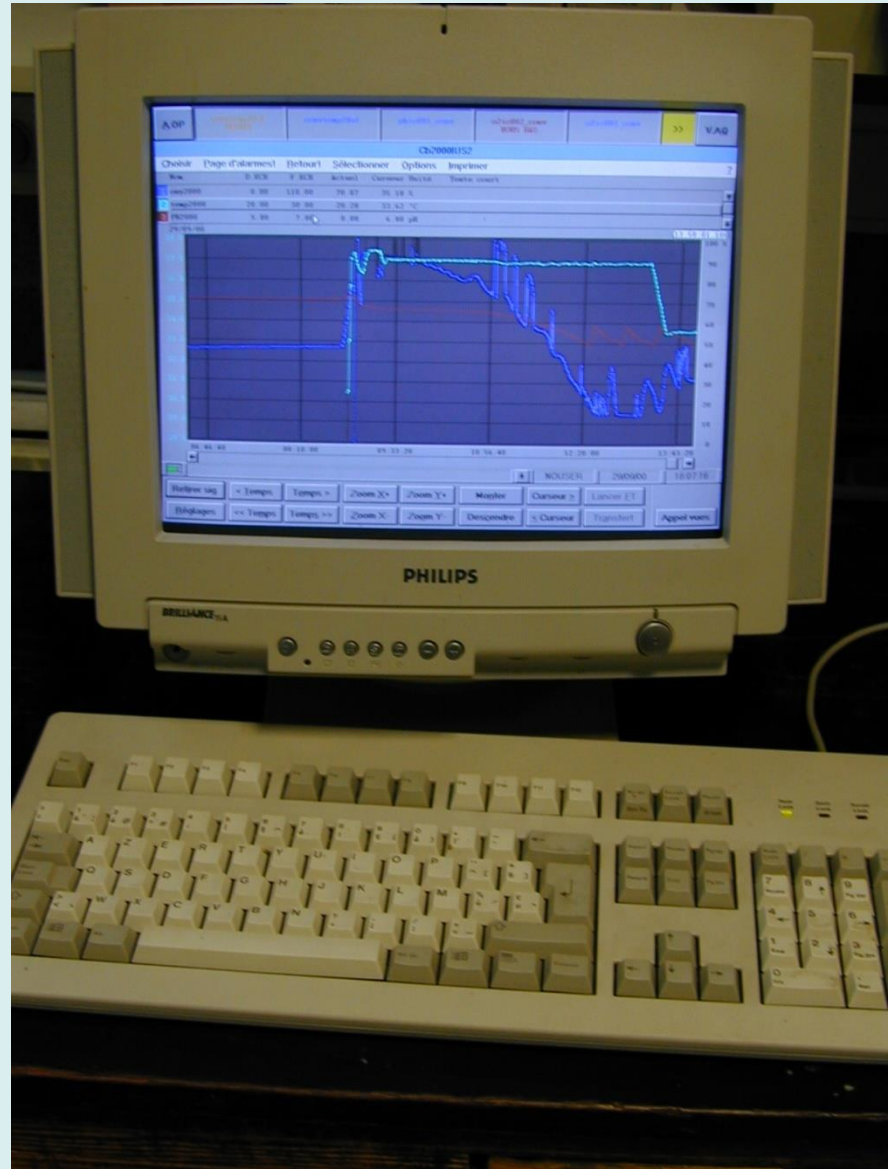


Fermenteur 500L



Fermenteur 2M³

Systeme de régulation



1-1-2- Principe de la culture en batch

Culture **en milieu clos** dans une cuve de taille variable

- stérilisée
- remplie d'un milieu de culture stérile
- ensemencée avec le microorganisme voulu
- permettant la croissance du microorganisme jusqu'à épuisement des substances nutritives

1-1-3- Caractéristiques du milieu de culture

- Doit apporter au minimum une source d'énergie, de carbone, d'azote, d'ions minéraux .
- Est souvent riche en glucose, en peptones, en phosphates, en sulfates, en magnésium, en vitamines, et en oligoéléments.
- Éléments divers pouvant être utilisés en industrie, seuls ou associés:
 - des mélasses, sous produits agricoles visqueux du raffinage de la betterave ou de la canne à sucre, riches en glucides,
 - 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).

1-1-3- Conditions d'une bonne culture en bioréacteur

Nécessité

- d'une bonne agitation de la culture
- d'une régulation de la température par refroidissement car les réactions métaboliques lors de la croissance sont généralement exothermiques
- d'une régulation du pH car les réactions métaboliques microbiennes peuvent acidifier ou alcaliniser le milieu
- d'une régulation de la pression partielle en O₂ par insufflation d'air stérile

1-1-4- 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

1-2- Culture en continu =
culture en milieu renouvelé

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

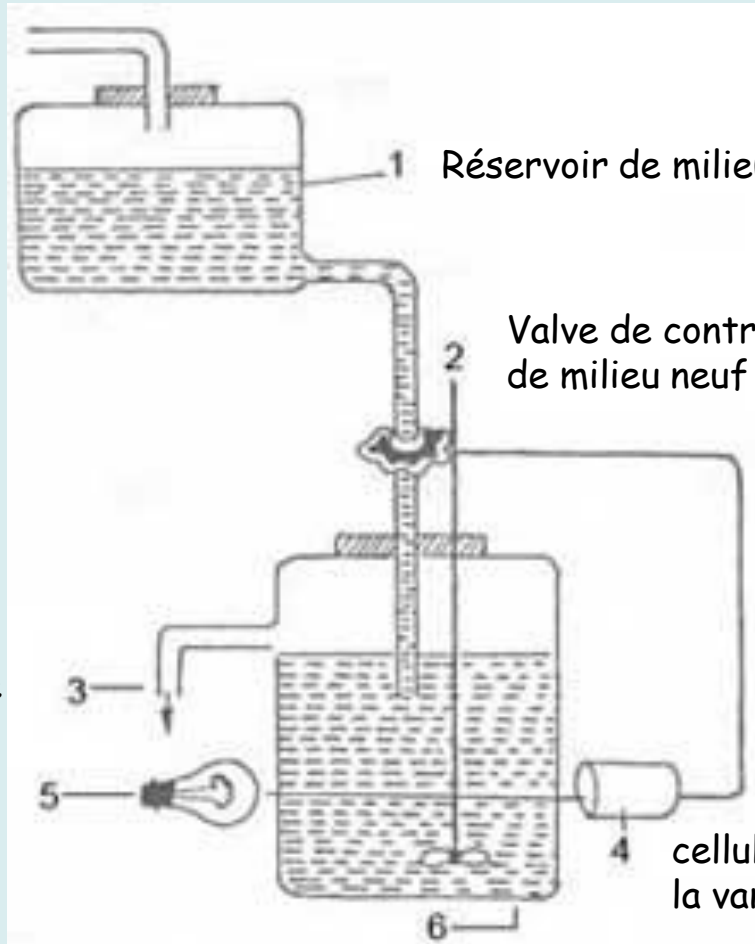
Culture du microorganisme en vase non clos de façon à maintenir **en permanence en phase exponentielle grâce à**

- 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.

1-2-2- Matériels de culture

- Turbidostat
- Chemostat ou bactogène

1-2-2-1- Le turbidostat



1 Réservoir de milieu stérile

2 Valve de contrôle du flux de milieu neuf

3 sortie de milieu de culture

5 Source lumineuse

4 cellule photoélectrique reliée à la vanne d'entrée de milieu neuf.

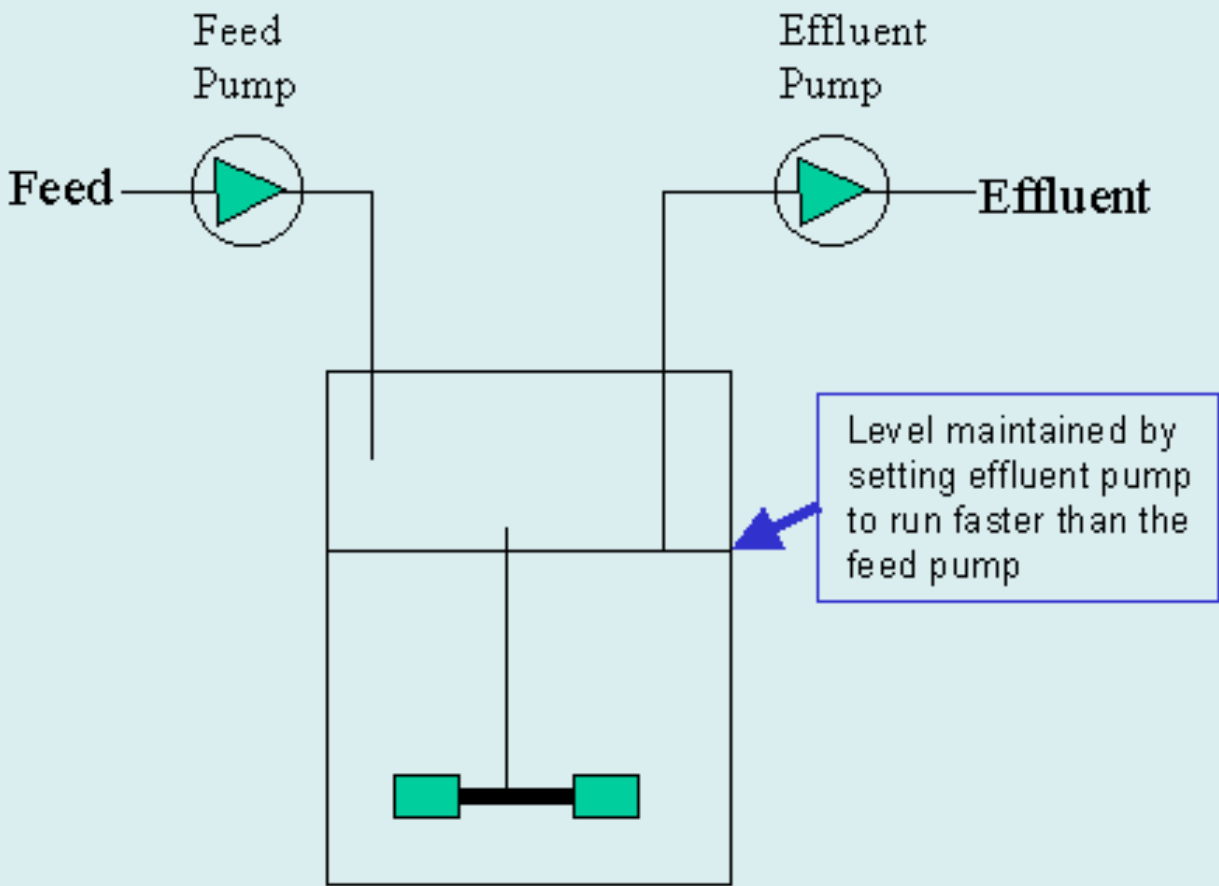
6 Cuve de fermentation

1-2-2- 1- Principe de fonctionnement du turbidostat

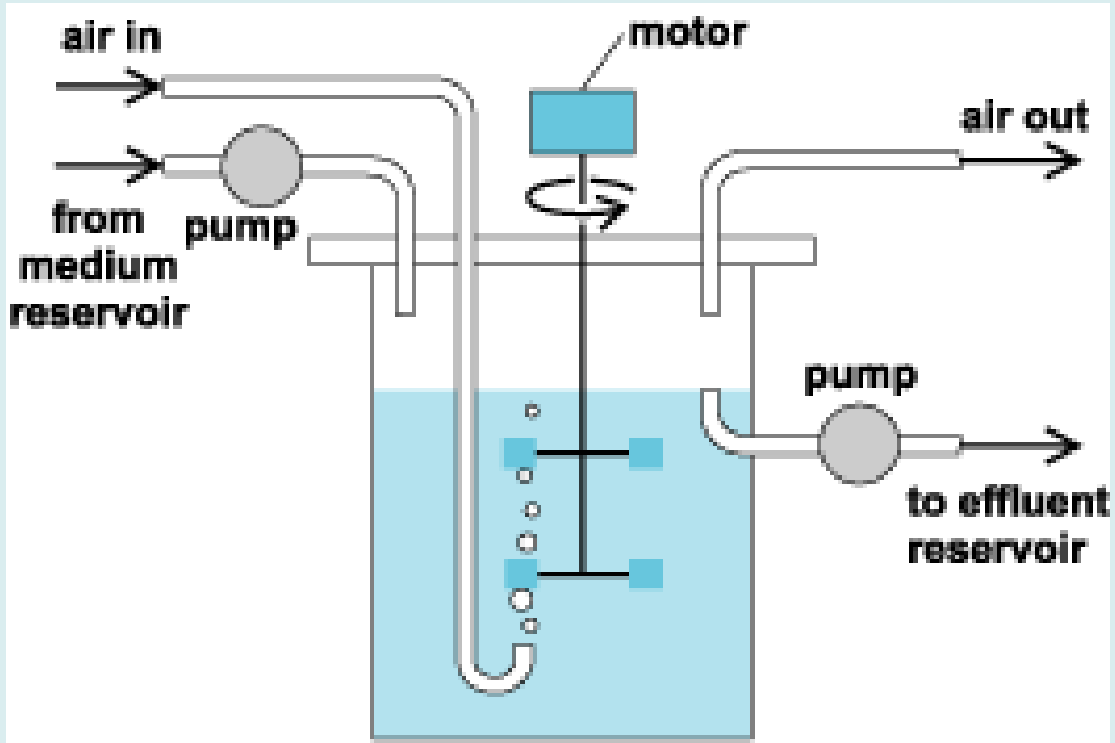
(vitesse de production = vitesse de consommation)

- 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 une diminution d'apport de milieu neuf jusqu'à ce que la croissance ait permis de retrouver la valeur initiale

1-2-2-2- Le chémostat



1-2-2-2- Le chémostat



1-2-2- 2- 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

Multiplication maintenue exponentielle à une vitesse spécifique de croissance rigoureusement contrôlée par l'apport de milieu neuf.

1-2-3- Avantages et inconvénients de la culture en continu

Avantages

- **Maintien 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.

2- Caractéristiques des souches utilisées en production industrielle

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)

3- Exemples de cultures et productions industrielles

3-1- Intérêt des cultures industrielles

Intérêt dans le domaine

- agroalimentaire
- industriel autre

3-1-1- Cultures industrielles en agroalimentaire

- Obtention de levains servant à la fabrication d'aliments
- Obtention de levains servant d'aliments
- Obtention de molécules participant à la fabrication d'aliments

3-1-1- 1- Obtention de levains servant à la fabrication d'aliments

- *Saccharomyces cerevisiae* pour la panification et l'oenologie
- *Saccharomyces cerevisiae* et *carlbergensis* pour la fabrication de la bière
- *Lactobacillus* pour les produits laitiers (yaourts...) carnés (saucissons) ou végétaux (choucroute....)
- *Penicillium roquefortii*, *Penicillium camembertii*... pour la fromagerie
- *Aspergillus flavus* pour certains produits asiatiques (saké)

Cas du vin : Levures oenologiques

- **Présence naturelle sur la peau des raisins**
avec des espèces variant selon l'environnement

- **Peuvent également être ajoutées au moût**

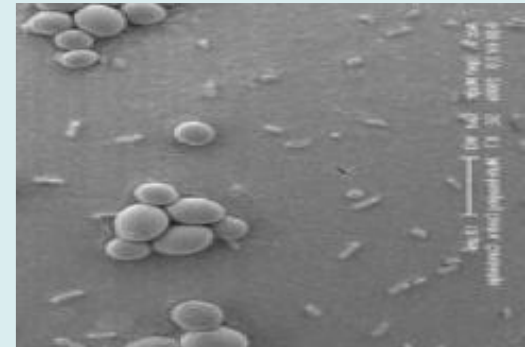
Saccharomyces : *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*,
S. cerevisiae

Torulospora rosei

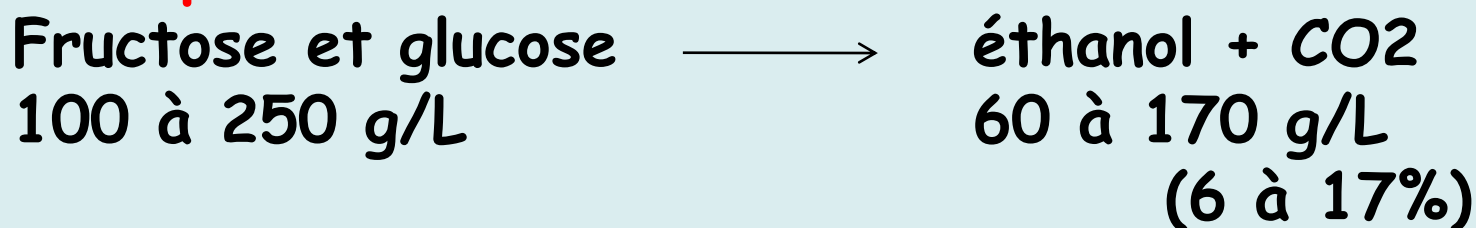
Kloeckera apiculata

- Evolution de la flore au cours de la
vinification :

S. ellipsoideus et *S. oviformis* sont les espèces
les plus alcoologènes



Principale réaction de fermentation :



Cas du pain

- Fermentation alcoolique également
- Levain ajouté à la pâte pendant le pétrissage :
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - d'autres levures ou des bactéries peuvent être ajoutées (pains spéciaux)
- Amidon sucres simples \longrightarrow alcool + CO_2
- Levée de la pâte grâce au CO_2
- Modification également du gluten et ainsi de la texture de la pâte
- Cuisson :
 - l'alcool s'évapore
 - les bulles de CO_2 persistent



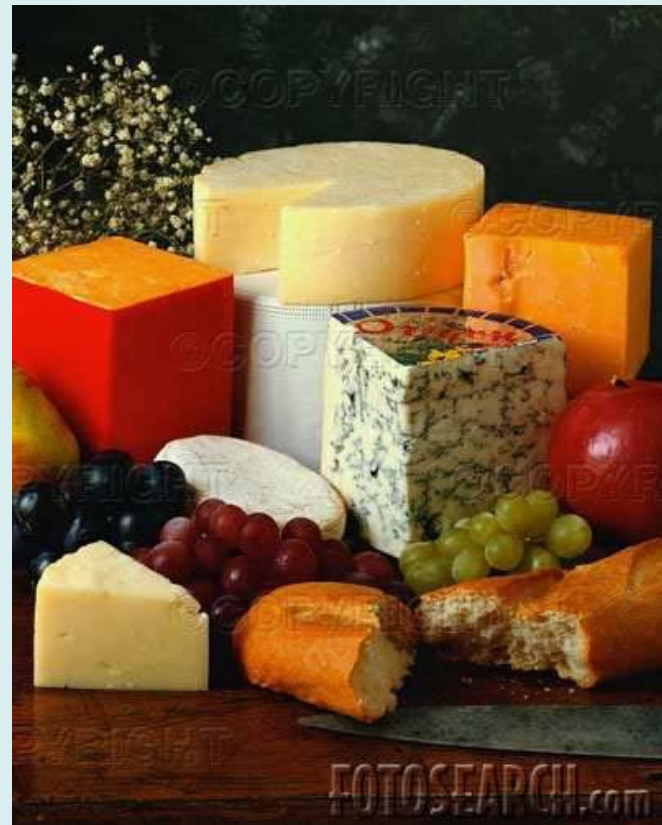
Cas du yaourt

Les réactions chimiques : la fermentation homolactique

- Lactose du lait \longrightarrow acide lactique
- Aliment « sucré » \longrightarrow aliment acide
- De plus modification des protéines (caséine) par les mêmes microorganismes
- Aliment liquide \longrightarrow aliment solide

Cas des fromages

Transformations complexes du lait de vache,
de chèvre, de brebis par les micro-
organismes



Les 3 étapes de la fabrication des fromages

- Production du caillé
 - Fermentation lactique par les bactéries lactiques(cf yaourts)

+ présure d'origine animale ou fongique

Le lait coagule à $\text{pH} < 4,6$: caséine gel + liquide (lactosérum = petit lait)
- Egouttage du caillé
 - Lent : fromages frais (ex: fr.blanc)
fromages à pâte molle (ex: camembert, Munster, roquefort)
 - Accéléré par pression pâtes pressées (ex: St Nectaire) ; fr à pâte ferme (ex: Cantal)
 - Accéléré par pression + cuisson pâtes fermes cuites (ex: gruyère, Comté)
- Salage et affinage (durée 1 à 8 mois)
 - Ajout d'une flore spécifique à chaque fromage. Développement de la flore.
 - Transformations microbiennes : Protéolyse, lipolyse, métabolisme des acides aminés, des composés soufrés...production d'arômes, de gaz, d'aldéhydes, d'alcools, d'ammoniac, diminution de l'acidité...

Exemples de micro-organismes participant à la formation des fromages

1- Des bactéries

Bactéries lactiques : groupe prédominant:

Streptococcus, *Lactobacillus*

Leuconostoc, *Lactococcus*

Propionibacterium (gruyères beaucoup de gaz)

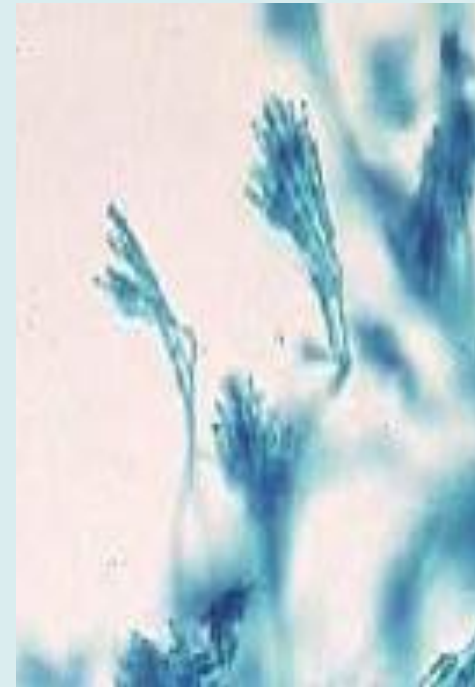
2- Des levures

Saccharomyces lactis

3- Des moisissures

Penicillium : brie, camembert
roquefort, bleus...

Geotrichum : camembert



Cas des produits végétaux

Fabrication de choucroute

- + NaCl 2 à 3% pour freiner le développement des Gram -
- Fermentation lactique du chou par *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (flore naturelle du chou)
- pH < 2

Fabrication d'olives, pickles (concombres, cornichons)

- Augmentation progressive du salage jusqu'à 16% (saumure)
- Fermentation lactique par *Lactobacillus plantarum* principalement

Fabrication de sauce soja

- Fermentation d'un mélange salé de graines de soja et de blé par *Aspergillus oryzae*

Fabrication de la choucroute



Incision dans la fabrique



Choucroute après le processus de fermentation



Contrôle qualité après le conditionnement

Cas des produits végétaux (suite)

Fabrication de vinaigre

Fermentation acétique par

Jus de raisin → vin → vinaigre

Sucres éthanol acide acétique

Bactéries responsables Acetobacter, Gluconobacter



Fabrication de divers végétaux fermentés

- Thé noir (feuilles fermentées), café (grains), cacao (fèves), manioc, maïs, soja

Cas des produits animaux

Fabrication de saucissons, jambons fumés

Fermentation lactique par *Pediococcus cerevisiae* ;
Lactobacillus plantarum

Fabrication de préparations asiatiques de poisson

Fermentations lactiques ou fermentations complexes par
bactéries et moisissures

Conclusion : intérêt des fermentations lors de la fabrication d'un aliment

Fermentation lactique : acidification du milieu empêchant ainsi la multiplication d'autres microorganismes (conservateur).

Autres fermentations : responsables des arômes et des goûts propres à chaque aliment

3-1-1- 2- Obtention de levains servant d'aliments

- *Levures*

3-1-1- 3- Obtention de molécules utiles à la fabrication d'aliments : quelques exemples

Production

- d'acides organiques

- * acide citrique (conservateur)

- * acide lactique (conservateur) abondamment utilisé en industrie alimentaire (laitière notamment) produit par *Lactobacillus delbrueckii* à partir de lactosérum (plusieurs dizaines de milliers de tonnes par an)

- * acide glutamique (exhausteur de goût)

- d'enzymes (ex : chymosine (présure), amylases, invertase, pectinase...) par des moisissures ou des bactéries

- de dextrane, xanthane ou alginate, utilisés comme gélifiants alimentaires produits à partir de *Leuconostoc*, *Xanthomonas* par exemple cultivés sur amidons.

3-1-2- Cultures industrielles utiles pour un domaine autre qu'agroalimentaire

Production

- de **bioéthanol** par des levures (*Saccharomyces* et / ou des bactéries) à partir de mélasses de canne ou de betterave à sucre ou de lactosérum utilisé dans l'industrie chimique ou pour les voitures
- de lipides utiles dans le domaine de la cosmétologie

3-1-2- Cultures industrielles utiles pour un domaine autre qu'agroalimentaire

- Production
 - de **protéines d'importance médicale** (hormones, anticorps, molécules antitumorales, enzymes...)
 - d'**antibiotiques**
 - Soit par des moisissures (pénicilline par *Penicillium*, céphalosporines par *Cephalosporium*)
 - Soit par des bactéries (streptomycine par *Streptomyces*.....)
 - de **molécules immunosuppressives**

3-2- Origine des molécules produites

Molécules produites pouvant être

- Des métabolites primaires
- Des métabolites secondaires
- Des métabolites issus d'une bioconversion

3-2-1- Molécules produites : métabolites primaires

- **Définition** : molécules fabriquées par le microorganisme pour ses besoins nutritifs et la croissance cellulaire.
- **Moment du recueil** : période de production = de la phase exponentielle de croissance.
- **Exemples** :
 - enzymes, acides aminés...
 - Alcools, acides organiques....

3-2-2- Molécules produites : métabolites secondaires

- **Définition** : molécules fabriquées après la phase de multiplication active, sans doute suite à un stress microbien lors de la phase stationnaire.
- **Moment du recueil** : fin de la croissance : phases stationnaire et de déclin.
- **Exemples** : antibiotiques, protéines....

3-2-3- Molécules issus d'une bioconversion d'un substrat

- **Définition d'une bioconversion** : transformation spécifique mineure d'un composé mis dans le milieu de culture , non utilisé normalement par le microorganisme
- **Exemples** : hydroxylation de progestérone par diverses moisissures