

## Chapitre III : Microorganismes et enzymes d'intérêt industriel

### Introduction

Les biotechnologies sont un ensemble de techniques faisant appel aux cellules vivantes dans le but de rendre possible ou de faciliter la synthèse ou la transformation d'un produit.

La biotechnologie est une discipline qui peut être examinée de deux façons différentes : d'un point de vue horizontal, qui distingue les techniques utilisées (domaines de la biotechnologie) ou d'un point de vue vertical, qui se concentre sur les secteurs d'application industrielle.

Les microorganismes au service de l'homme : des ouvriers qualifiés mis en œuvre selon des processus génie microbiologiques, en l'échelle industrielle, afin d'assurer une biosynthèse et/ou une bioconversion.

En effet, les microorganismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques qui se traduisent par la production de biomasse (corps cellulaire), et par la dégradation, la transformation ou la production de substances organiques ou minérales. En biotechnologie, il est courant d'employer le terme fermentation pour définir la plupart des cultures et réactions microbiennes, bien qu'il ne s'agisse pas dans certains cas d'une fermentation au sens biochimique.

Pour leur vie (entretien ou maintenance), pour l'expression de leurs propriétés (mobilité, luminescence), pour leur développement (croissance et multiplication) les microorganismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs.

### Domaines d'activité de la microbiologie industrielle

- Agro-alimentaire (agent de saveurs, émulsifiants, fermentation alcoolique, lactique,.....).
- Production de solvants (acétone, butanol,....).
- L'obtention biotechnologique de combustible et de matière première comme alternative au pétrole.
- Les biocatalyseurs c'est la production à grande échelle d'enzymes d'origines microbiennes.
- Le traitement et la réutilisation des produits résiduels via des méthodes biotechnologiques (biorémediation des sols pollués).
- Industrie pharmaceutique (antibiotiques, vitamines, acides aminés, insuline, hormone de croissance,.....et de nombreux autres produits du groupe des anti-tumoraux, anti-inflammatoires, ....).

## Intérêt de l'utilisation des microorganismes

- Coût plus faible, facile à manipuler.
- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques. Exemple : les enzymes extraites à partir d'animaux sont onéreuses donc la production industrielle s'est orientée vers le processus fermentaire.
- Sécurité accrue : absence de virus ou prion cas de transmission de Creutzfeldt Jacob par les hormones de croissance extraites de l'hypophyse de cadavres contaminés.

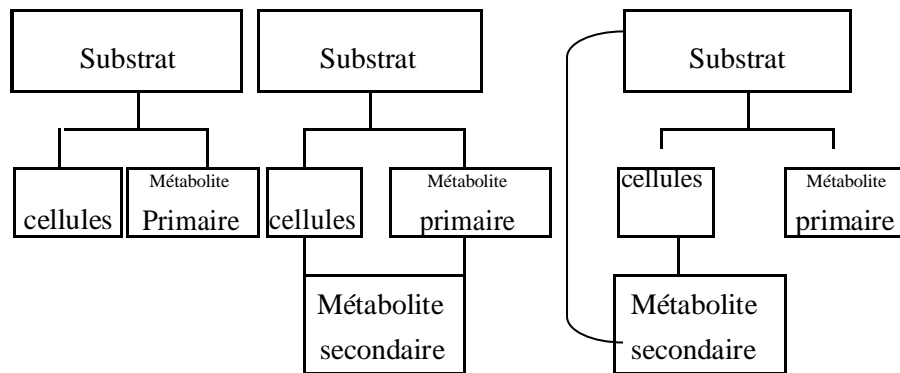
## 1. Microorganisme d'intérêt industriel : production industrielle de métabolites

Par définition les métabolites sont les produits intermédiaires du métabolisme. Il existe deux grandes classes de métabolites (primaires et secondaires).

Les produits microbiens qui intéressent l'industrie sont :

- Des métabolites primaires : associés parfois partiellement couplés à la synthèse des cellules microbiennes. Ils sont impliqués dans la phase de croissance en raison du métabolisme énergétique (glucides, lipides, acides aminés, nucléotides, produits de fermentation,...). Les voies de biosynthèse sont en général simples.  
Exemple : l'alcool (éthanol) produit pendant la fermentation avec la levure et les bactéries. La formation de l'éthanol est parallèle à la croissance.
- Des métabolites secondaires : ne sont pas indispensables au développement de l'organisme, synthétisés dans des conditions particulières, s'accumulent pendant la période suivant la phase de croissance active et n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale (antibiotiques, toxines, enzymes). Voies de biosynthèse complexes et longues, spécifiquement à une espèce voire à une souche microbienne.

## Croissance et formation de produit



Les métabolites primaires sont produits pendant la croissance primaire Les métabolites secondaires sont produits à la fin de la période de croissance

### 1.1. Caractéristiques d'un microorganisme industriel

- Disponible en culture
- Génétiquement stable
- Capable de croître à grande échelle
- Les cultures doivent être viables pour une grande période de temps
- Former des spores et être facilement transféré
- Croître rapidement et produire le métabolite rapidement
- Croître dans un milieu de culture peu dispendieux
- Non dangereux pour les humains, plantes et animaux
- Grosses cellules faciles à séparer du milieu de culture
- Facile à modifier par techniques génétiques

### 1.2. Facteurs nutritifs et environnementaux

Un milieu de culture doit être complet qu'il soit synthétique ou complexe. Il assure l'apport des éléments nutritifs de base pour le microorganisme (carbone, azote, éléments minéraux, métaux, facteurs de croissance et vitamines).

### 1.2.1. Source de carbone et d'énergie

Le milieu de culture doit contenir une source de carbone et d'énergie nécessaire à la croissance du microorganisme. Parmi les composés carbonés citons : pentoses, hexoses, disaccharides, polysaccharides, certains acides organiques, acides gras, glycérol,..... Parfois pour éviter un prix de revient élevé les oses purs comme le glucose ou le saccharose ne peuvent pas être utilisés.

Cependant, il serait intéressant d'employer un substrat carboné bon marché, d'où l'intérêt d'un certain nombre de sous-produits d'origine agricole ou industrielle et que l'on peut valoriser comme :

- Les mélasses qui sont des sous produits de sucrerie et de betteraves.
- Le lactosérum qui comporte environ 80% de lactose.
- Les déchets agricoles comme : le son de blé, les dattes déclassées.
- Les déchets industriels : déchets d'oranges, déchets de tomates, etc.

En effet, les matières premières sont choisies en fonction des critères suivants :

- ✚ Approvisionnement stable en qualité et en quantité tout au long de l'année.
- ✚ Coût aussi peu élevé que possible, y compris stockage et transport.
- ✚ Absence de substances toxiques (aflatoxine par exemple).

### 1.2.2. Source azotée

L'azote est l'élément indispensable à la constitution des molécules de protéines. Il peut être utilisé sous forme inorganique comme le sulfate d'ammonium, organique (asparagine, succinate d'ammonium, urée, etc,..) ou complexe (peptone, farine de soja).

Généralement, le CSL (corn steep liquor) sous produit de l'industrie de l'amidon est largement utilisé dans la croissance rapide des microorganismes par son apport en azote organique et en vitamines.

### 1.2.3. Facteurs de croissance et vitamines

Ce sont des métabolites essentiels que certains microorganismes sont incapables de synthétiser. Il s'agit de vitamines, en particulier thiamine (vitamine B1) et la biotine (vitamine B7). Les stérols jouent un rôle majeur dans la composition des membranes fongiques et leur perméabilité. Pour la production des enzymes, les facteurs de croissance et les oligo-éléments peuvent être apportés par l'extrait de levure, le CSL, les huiles végétales et les farines de graines oléagineuses.

#### 1.2.4. Les sels minéraux et les oligo-éléments

La présence des sels minéraux et des oligo-éléments dans les milieux de culture constitue un élément fondamental pour les microorganismes citons : le phosphore, le potassium, le magnésium, le fer, le calcium, etc,...

Les oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le cobalt, le molybdène sont nécessaires à la plupart des microorganismes pour la production des cytochromes, des pigments, d'acides organiques, d'enzymes, etc,... . A forte concentration ils peuvent devenir toxiques.

#### 1.2.5. Exigences écologiques

- Les microorganismes sont soit des aérobies (moisissures, levures, bactéries), soit des anaérobies (bactéries). En fonction de ça il existe deux mécanismes de base de formation de l'ATP :
  - Phosphorylation au niveau du substrat —————> Fermentation
  - Phosphorylation oxydative —————> Respiration

Selon les conditions environnementales la respiration ou la fermentation est empruntée :

- Levures, *E. coli*, possèdent les deux voies.
- Bacillus uniquement la fermentation.
- Les moisissures ont des exigences en humidité moins élevés que celles des bactéries.
- Chaque microorganisme exige une température déterminée pour sa croissance optimale. Une température de 30°C est généralement la température optimale pour un grand nombre de bactéries et de moisissures utilisés en microbiologie industrielle. A titre d'exemple les champignons se caractérisent par une croissance dans une gamme de températures cardinales bien définie (**Tableau 1**). Il existe des mésophiles qui se développent entre 10 – 40°C, des thermophiles plus que 60°C. certains peuvent se développer sous la neige soit – 5°C se sont des psychrophiles.
- Selon le pH du milieu de culture il existe des microorganismes acidophiles, mésophiles et alcalophiles. En général, la croissance et le métabolisme modifient le pH de la culture, soit par l'utilisation des anions ou des cations du milieu, soit par la production des acides organiques ou de l'ammoniaque.

**Tableau 1** : Classification des microorganismes en fonction des températures cardinales.

Températures cardinales (°C)			
Micro-organismes	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophiles	0	15	20
Psychrotolérants	0	25-30	35
Mésophiles	5	25-30	35
Thermo-tolérants	5	25-30	50
Thermophiles	20	45	> à 50

### 1.2.6. Milieux de cultures industriels

La bonne formulation du milieu repose sur le choix de la source de carbone, d'azote, de vitamine et d'oligo-élément mais surtout leur équilibre. La connaissance parfaite de ces interactions permet d'optimiser le procédé.

Aussi, la matière brute du milieu de culture, par son coût influence la compétitivité économique du procédé.

En effet, les entreprises utilisent la biotechnologie industrielle pour les raisons suivantes :

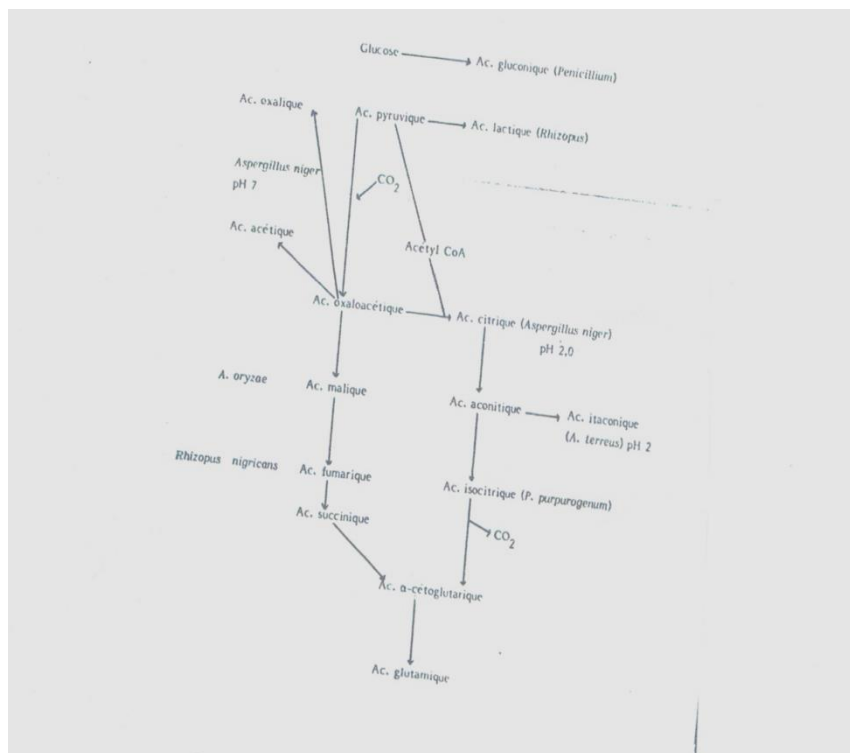
- Réduire leurs coûts,
- Augmenter leurs bénéfices,
- Augmenter la qualité de leurs produits,
- Optimiser leur procédé et son suivi,
- Améliorer la sécurité et l'hygiène de la technologie,
- Respecter la législation sur l'environnement.

## Principales familles de produits en Microbiologie Industrielle

### I. Métabolites primaires

#### 1. Les acides organiques

De nombreux acides organiques provenant soit de la dégradation anaérobie des sucres, soit de l'oxydation incomplète de ceux-ci sont produits industriellement à l'aide des microorganismes (bactéries, champignons). Ces derniers sont des producteurs importants d'acides organiques dont la synthèse est liée au cycle de Krebs (**Figure 1**). Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques : acide citrique, acide acétique, acide lactique, etc...



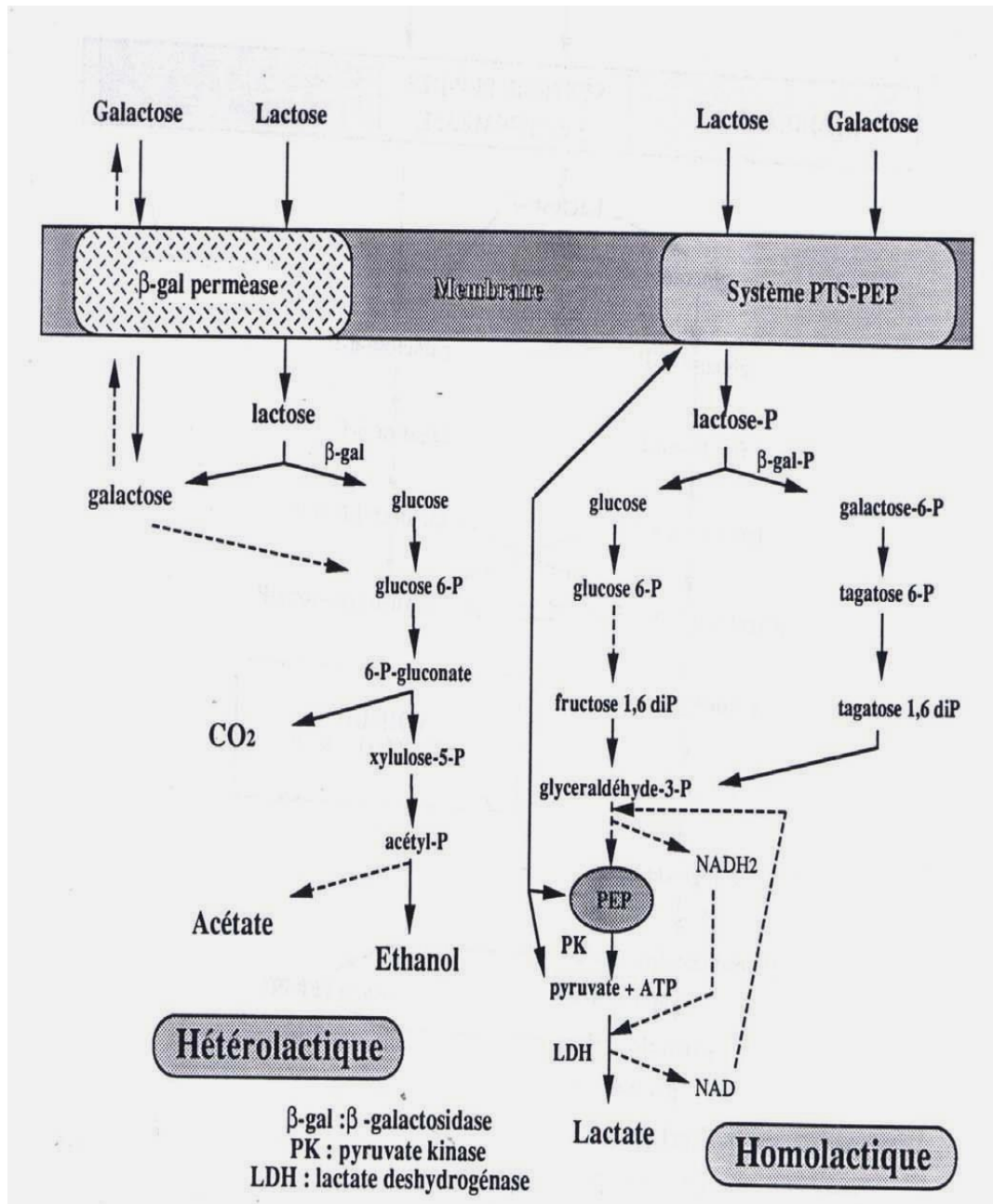
**Figure 1:** Synthèse des acides organiques.

- a) **Acide citrique** : Cette molécule est connue depuis le siècle dernier chez les végétaux. En 1923, démarra la première production microbiologique. Aujourd'hui 99% de la production se fait par voie microbiologique, le reste est extrait des agrumes. L'acide citrique, à cause de ses multiples utilisations alimentaires et industrielles, présente une importance économique considérable. L'acide citrique est formé par la condensation de l'acide oxaloacétique avec l'acétyl-COA, tous les deux dérivés du pyruvate (**Figure 1**). Un grand nombre de champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Penicillium*,

*Trichoderma, Mucor, ..*) de levure (*Candida, Saccharomyces*) et quelques bactéries (*Arthrobacter, Corynebacterium*) sont capables d'excréter l'acide citrique. Actuellement, ce sont principalement des mutants d'*Aspergillus niger* qui sont utilisés dans l'industrie pour leur facilité de culture, leur constance génétique, leur rendement élevé et leur absence de métabolites indésirables.

- b) **Acide acétique** : l'acide acétique est un métabolite microbien très répandu. Cette fermentation intervient dans la fabrication du vinaigre par la formation de l'acide acétique en présence de la bactérie *Acetobacter* et d'une grande quantité d'oxygène. Les bactéries acétiques n'interviennent que si la teneur en éthanol est faible. L'action est favorisée par l'intervention des levures qui oxydent l'éthanol pour baisser sa concentration.
- c) **Acide lactique** : l'acide lactique, secrété par de nombreux microorganismes, bactérie (*Lactococcus lactis*, organisme modèle des bactéries lactiques) ou champignon (*Rhizopus*) est l'objet d'une importante production industrielle. Selon le mode de fermentation il existe des bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires (**Figure 2**).
- Streptobacterium* produit par dégradation anaérobie des matières sucrées de l'acide lactique. Cette réaction finale s'effectue à partir de l'acide pyruvique, terme final de la glycolyse à l'aide d'une LDH.
  - Betabacterium*, organismes hétérofermentatifs qui produisent à partir du glucose, selon un mécanisme différent, un mélange d'acide lactique, d'éthanol, d'acide acétique, de CO<sub>2</sub> et d'autres métabolites. Les souches de bactéries lactiques homofermentatives sont en général, préférées pour la production industrielle de l'acide lactique.





**Figure 2:** Transport et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques.

## Microorganismes producteurs des acides organiques

Les espèces microbiennes impliquées dans la production des acides organiques se différencient selon le type de l'acide d'intérêt industriel (**Tableau 1**).

**Tableau 1 :** Les acides organiques produits par les microorganismes et leurs utilisations dans l'industrie alimentaire.

Acides organiques	Micro-organismes producteur	Exemples d'utilisation
Acide acétique	Acetobacter aceti (bactérie)	Agent de conservation dans les mayonnaises, pâtisseries...
Acide lactique	Lactobacillus (bactérie) Aspergillus griseus (moisissure) Rhizopus (moisissure)	Agent de conservation et acidulant pour confitures, boissons gazeuses, olives, poissons...
Acide citrique	Aspergillus niger (moisissure)	Acidulant et antioxydant dans les boissons gazeuses, produits laitiers, fruits congelés..
Acide gluconique	Aspergillus niger (moisissure) Pénicillium chrysogenum (moisissure)	Acidulant pour viandes, renforce le goût dans la margarine...
Acide fumarique	Rhizopus (moisissure) Mucor (moisissure)	Acidulant dans les jus de fruits...
Acide malique	Pénicillium brevicompartum (moisissure) Leuconostoc (bactérie) Aspergillus oryzae (moisissure)	Acidulant dans les jus de fruits, crème glacée...
Acide tartrique	Pénicillium notatum (moisissure)	Acidulant pour boissons...
Acide propionique	Propionibacterium spp	Agent de conservation de nombreux aliments, dont les pâtisseries...

## 2. Les acides aminés

Un grand nombre de microorganismes a la capacité d'élaborer à partir d'hydrates de carbone et de sels minéraux, les acides aminés nécessaires à la synthèse de leurs protéines et à leurs croissances. L'homme et les animaux supérieurs, ne pouvant effectuer la synthèse de ces acides aminés doivent donc les trouver dans leur nourriture.

Toutefois, les produits alimentaires d'origine végétale ne contiennent que des taux très faibles d'acides aminés essentiels comme la lysine, la méthionine ou le tryptophane.

La production d'acides aminés permet de suppléer à cette carence et présente du point de vue social une grande importance.

### Microorganismes producteurs des acides aminés

La culture microbienne est une méthode de production économique lorsqu'il existe une souche microbienne hyperproductrice de l'acide aminé désiré. Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*) ainsi que des souches génétiquement modifiées de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* sont les micro-organismes les plus souvent utilisés. Le tableau 2 donne quelques microorganismes producteurs des différents acides aminés.

**Tableau 2 :** Microorganismes producteurs des acides aminés.

Acide aminé	Microorganisme producteur
Acide aspartique	<i>Bacillus megaterium</i> - <i>Pseudomonas</i>
Alanine	<i>Pseudomonas</i> - <i>Corynebacterium</i>
Arginine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> – <i>Brevibacterium flavum</i>
Acide glutamique	<i>Brevibacterium</i> – <i>Micrococcus</i>
Lysine	<i>Corynebacterium sp</i> – <i>Saccharomyces candida</i>
Méthionine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> – <i>Candida</i> – <i>Rhodotorula</i>
Tryptophane	<i>Bacillus subtilis</i>

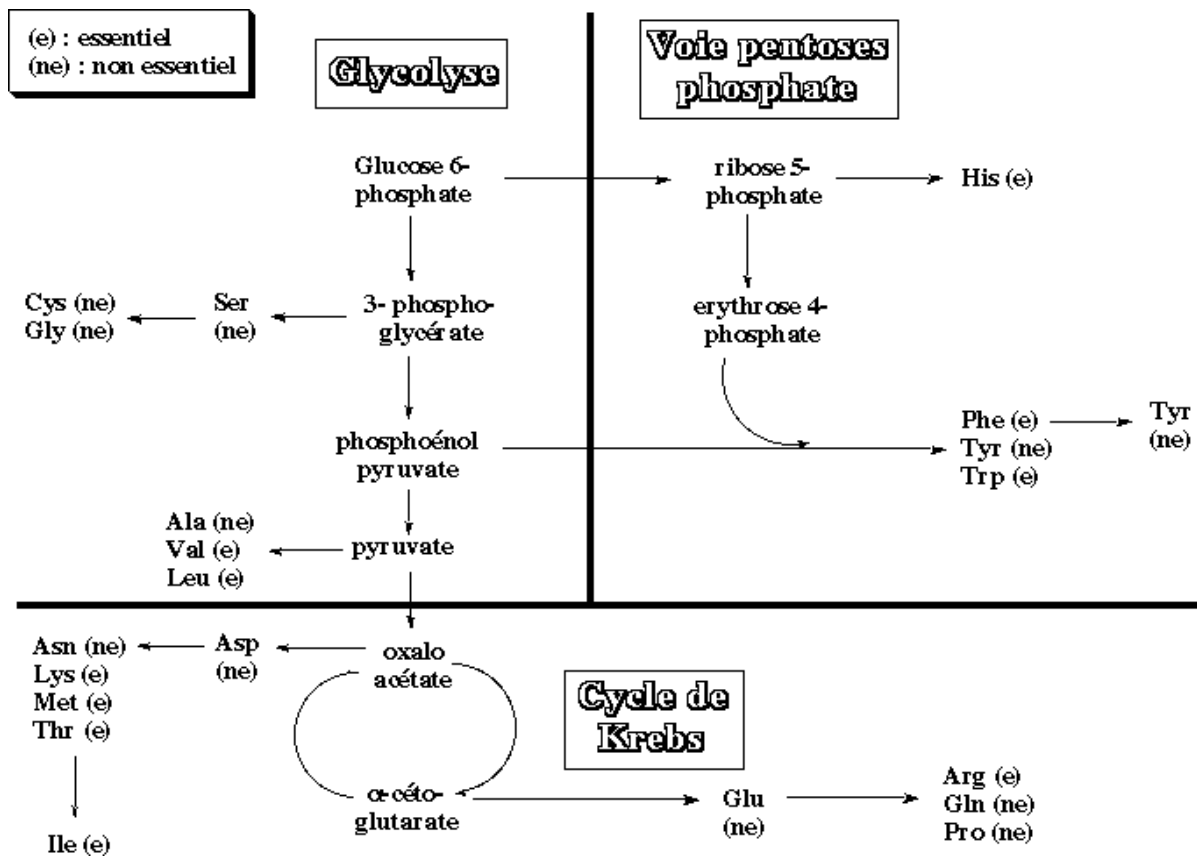
### Domaine d'utilisation des acides aminés

- ♦ Ils entrent dans les produits alimentaires. Ex: la glycine et l'alanine sont ajoutés à certains produits alimentaires pour améliorer leur saveur. L'acide glutamique sert, sous forme de sel (glutamate monosodique ou GMS), de renforçateur de goût "goût de bouillon".
- ♦ Agents édulcorant (pouvoir "de goût sucré") en nutrition humaine. Ex: l'aspartam = d'aspartate + phénylalanine.
- ♦ Augmentation de la valeur nutritive des produits végétaux par l'addition des acides aminés essentiels comme la lysine et la méthionine.
- ♦ Le glutamate est utilisé aussi par les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

### Les voies métaboliques de la synthèse des acides aminés

Pour la synthèse d'un acide aminé par un microorganisme, il nécessite la présence des intermédiaires pour former la chaîne carbonée et d'autres pour la fonction amine (NH<sub>2</sub>). La synthèse de la chaîne carbonée des acides aminés s'effectue à partir de produits intermédiaires du métabolisme des glucides (glycolyse, voies des pentoses phosphate et cycle de Krebs). Ces intermédiaires sont phosphoénolpyruvate, phosphoglycérate, pyruvate, acétyl-CoA, oxaloacétate et  $\alpha$ -cétoglutarate (**Figure 3**).

Le groupement amine provient d'un autre acide aminé par une réaction de transamination, ou il provient d'une molécule inorganique (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N<sub>2</sub>..) par le processus d'amination. En effet, Le glutamate va servir de donneur de groupement aminé à un grand nombre d'autres acides aminés par des réactions de transaminations.



**Figure 3:** Production des acides aminés chez les microorganismes.

### 3. 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. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire. Ce sont des cofacteurs des réactions intermédiaires successives. En effet, les coenzymes mis en jeu dans ces réactions sont généralement des dérivés de vitamines, qui en sont des précurseurs.

La vitamine B<sub>12</sub> 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.

**Classification des vitamines :** les vitamines se subdivisent en deux classes : les vitamines hydrosolubles (vitamine C et les vitamines du groupe B) et les vitamines liposolubles (ce sont les vitamines A, D, E et K).

#### Source de vitamines

Il existe plusieurs sources de vitamines naturelles : aliments végétaux et microorganismes.

#### Microorganismes producteurs de vitamines

Exemple de vitamines produites par les microorganismes (**Tableau 3**) :

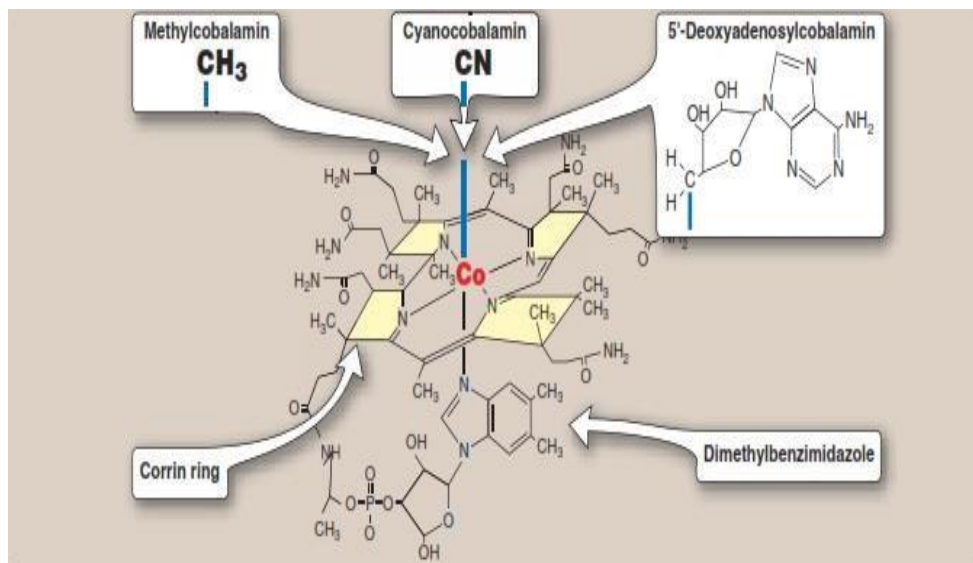
Vitamines	Microorganismes producteurs
A	<i>Blakeslea trispora</i> ; <i>Rhodotorula gracilis</i> ; <i>Dunaliella sp.</i>
B <sub>1</sub>	<i>Ashbya gossypii</i> ; <i>Torula utilis</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
B <sub>2</sub>	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ; <i>Ashbya gossypii</i> ; <i>Pichia miso</i>
B <sub>12</sub>	<i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Streptomyces olivaceus</i>
D	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Aspergillus niger</i>
E	<i>Euglena gracilllis</i>

## Vitamine B<sub>12</sub>

La vitamine B<sub>12</sub> (**Figure 4**), également appelée cobalamine, est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau (elle participe à la synthèse de neuromédiateurs), du système nerveux et à la formation du sang. Elle est impliquée comme cofacteur dans le métabolisme cellulaire, plus particulièrement dans la synthèse de l'ADN et sa régulation ainsi que dans la synthèse des acides gras et dans la production d'énergie.

Son rôle métabolique chez l'homme : synthèse de méthionine et des bases nucléiques, de la gaine de myéline des nerfs, des globules rouge.

Le besoin quotidien en vitamine B<sub>12</sub> est 1 à 2 µg couvert normalement par la nourriture. Cette vitamine est synthétisée uniquement par certaines espèces de bactéries et d'archées. Une récente découverte elle peut aussi être produite par des microalgues haptophytes. Elle ne se trouve que dans les aliments d'origine animale, comme la viande, le poisson, le lait, le fromage, les œufs. Les végétariens stricts doivent faire attention de ne pas développer une carence en vitamine B<sub>12</sub>.



**Figure 4:** Structure de la Vitamine B<sub>12</sub>.

## Composition du milieu de culture pour la production de la vitamine B<sub>12</sub>

Le milieu de culture utilisé pour la production industrielle de cette vitamine par la bactérie *Propionibacterium freudenreichii sp. shermanii* est composé de :

- , D'une source de carbone (glucose, mélasse de betterave, glycérol).
- , D'une source d'azote (hydrolysats de caséine, tryptone, corn steep liquor,...).
- , D'une source de cobalt (COCl<sub>2</sub>).
- , D'un précurseur 5',6-diméthylbenzimidazol.

La culture est maintenue à 30 °C avec un pH de 6.8, pendant 168 h. Les échantillons de culture sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min à 4 °C et remis en suspension. La vitamine est ensuite extraite par choc thermique pendant 15 min dans un tampon phosphate 0.1 M contenant 0.01% de cyanure de potassium à pH 6. Dans ces conditions, la vitamine B<sub>12</sub> est libérée. Un concentré de cette vitamine est préparé après filtration et séchage.

## II. Métabolites secondaires

### 1. Les antibiotiques

Du grec «anti» (contre) et «bios» (vie), le terme antibiotique désigne toute molécule capable de tuer ou d'inhiber la croissance des bactéries, et ce de façon sélective. Les antibiotiques constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinomycètes et principalement des *Streptomyces*. Ces molécules d'origine naturelle manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale ou antiparasitaire. Ils permettent de lutter activement contre de nombreuses pathologies autrefois souvent fatales (ex: tuberculose), et ont contribué de façon non négligeable à l'allongement de l'espérance de vie. De nombreuses familles d'antibiotiques ont été identifiées. On peut citer les β-lactames, les cyclines, les macrolides ou encore les aminoglycosides par exemple. La plupart de ces composés agissent sur une des trois cibles suivantes: la synthèse du peptidoglycane, la réplication de l'ADN ou la synthèse des protéines.

### Microorganismes producteurs des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être obtenus par fermentation ou alors par hémisynthèse. Exemple : l'ampicilline. L'hémisynthèse a pour but de fournir de nouveaux produits pour remplacer ceux qui sont devenus inactifs du fait des résistances opposées par certaines bactéries (suite à l'usage intempestif en thérapeutique humaine).



Antibiotiques	Microorganisme producteur
Pénicilline	<i>Penicillium sp.</i>
Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>
Aminosidine	<i>Streptomyces sp.</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>
Bacitracine	<i>Bacillus subtilis</i>

### Production industrielle des antibiotiques

Elle est identique à toutes les productions industrielles utilisant des microorganismes. Différents niveaux successifs (changements d'échelle) sont utilisés, depuis la production au laboratoire destinée aux études préalables, à la production dans des "fermenteurs" de 500 m<sup>3</sup>. Il faut en effet un inoculum à chaque étape permettant l'ensemencement du fermenteur de volume supérieur, qui est de 1 à 15 % du volume de production.

La culture est très généralement aérobie et l'antibiotique, métabolite secondaire d'utilité peu évidente pour le microorganisme, produit en fin de croissance.

Des précurseurs peuvent être ajoutés au milieu de culture pour orienter la synthèse. C'est le cas du phényl-acétate pour la production de l'ampicilline : le champignon producteur de Pénicilline G va alors produire l'Ampicilline.

Le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée de l'antibiotique. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et assurer les conditions physico-chimiques désirées (pH, T°, oxygénation).

- Pendant la phase de production des antibiotiques, les cellules utilisent des sources d'énergie et de carbone lentement catabolisables (lactose par exemple, pour la production de la pénicilline ; dextrine ou amidon pour la production de macrolides).
- Les acides gras et leurs dérivés sont souvent apportés par les huiles sous forme de triglycérides. Les huiles les plus utilisées sont : les huiles de soja, d'arachide, de maïs et de colza. Outre leur rôle de source d'énergie et de précurseurs éventuels, les acides gras exercent des actions physico-chimiques appropriées : formation d'émulsion, réduction des mousses, modification de la perméabilité membranaire.
- L'ammonium est la meilleure source d'azote pour assurer une croissance rapide. On ajoute

des sels d'ammonium pour favoriser cette phase tout en surveillant la concentration pour éviter la baisse de production liée à une concentration trop élevée. Si l'on choisit de poursuivre l'alimentation par des sels d'ammonium, ils seront apportés en mode semi-continu, généralement l'azote pour la production (3<sup>ème</sup> phase) sera apporté sous forme de sources complexes ; exemple : farines de soja ou d'arachide riches en protéines ; l'addition de ces éléments s'accompagne du contrôle de l'oxygénation.

Par ailleurs, les sources complexes remplissent de multiples fonctions. Ex: si les farines de soja servent de source d'azote, elles apportent en même temps des acides nucléiques, des vitamines, des oligo-éléments, des lipides, du soufre et du phosphore.

### **Extraction de l'antibiotique**

L'extraction et la purification des antibiotiques comme toutes molécules antimicrobiennes à partir de bouillon de fermentation ont nécessité la mise au point d'un protocole d'extraction et de purification qui exploite au mieux les propriétés des molécules bioactives.

En effet, un procédé d'extraction et de purification des antibiotiques est rentable si tous ces aspects y compris le traitement des effluents et la récupération des solvants ont été pris en considération et optimisés dès le début.

Un schéma général d'extraction des antibiotiques n'est pas applicable car au sein de la même famille, chaque antibiotique représente un cas lié à ses caractéristiques physicochimiques propres à la composition du milieu de culture en fin de fermentation.

Néanmoins, une démarche contenant des opérations de base doit être appliquée au début du protocole.

### **Les opérations de base**

La conduite d'un procédé d'extraction et de purification des molécules actives est ramenée à trois opérations de base (**Figure 5**):

1. Séparation des particules insolubles, telles que les composantes du milieu de culture, les cellules et le mycélium. Ceci se fait par filtration ou par centrifugation.
2. Extraction du produit se fait par fractionnement avec les solvants organiques.
3. Purification partielle des molécules est réalisée de façon très sélective grâce à l'application de la technique de chromatographie.

### **Extraction aux solvants organiques**

Le but de l'extraction à l'aide des solvants organiques est de faire passer l'antibiotique de la phase aqueuse à la phase organique. Cette opération permet déjà de purifier partiellement les molécules

présentes dans le surnageant. Le choix du solvant dépend de la stabilité des substances antimicrobiennes dans le solvant lors de l'extraction.

### **Purification partielle par CCM**

Les composés sont purifiés par des techniques chromatographiques ; ils sont adsorbés sur un support solide tel que le gel de silice et de cellulose. Ils sont ensuite élués par un système de solvant. La facilité d'éluion des composés va dépendre de leur polarité et du pouvoir éluant du solvant.

### **Conditionnement de l'antibiotique**

Le conditionnement, après addition des divers excipients peut être sous la forme de: poudre pour les préparations pédiatriques, des gélules, d'additifs de l'alimentation animale et des solutions pour les préparations injectables prêtes à l'emploi et les comprimés.

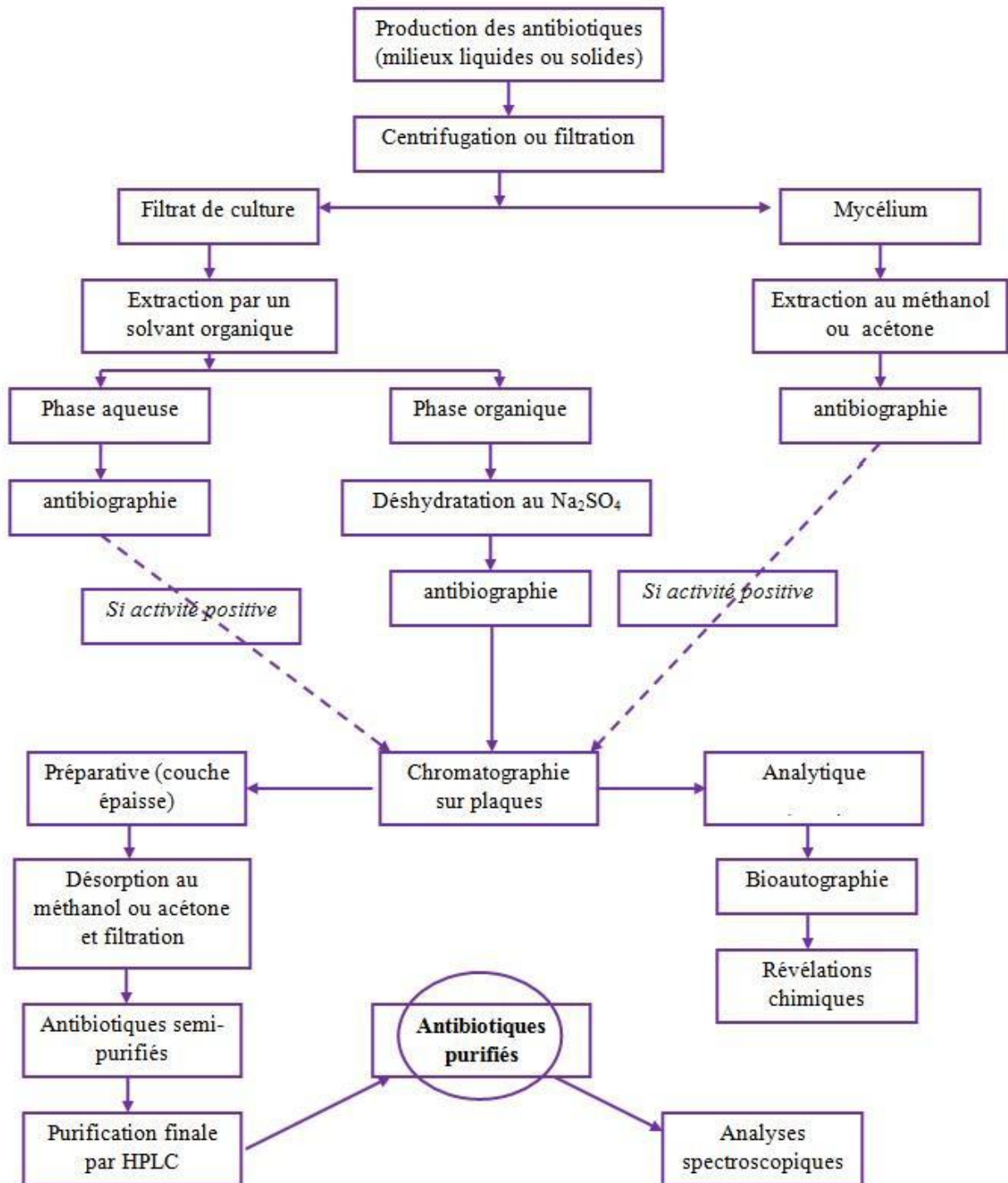
### **Exemple production de la pénicilline**

La pénicilline peut être produite par de nombreuses espèces de *Penicillium* (dont *P.notatum*), ainsi que par des espèces appartenant au genre *Aspergillus* (**Figure 6**).

Les milieux de culture industriels composés :

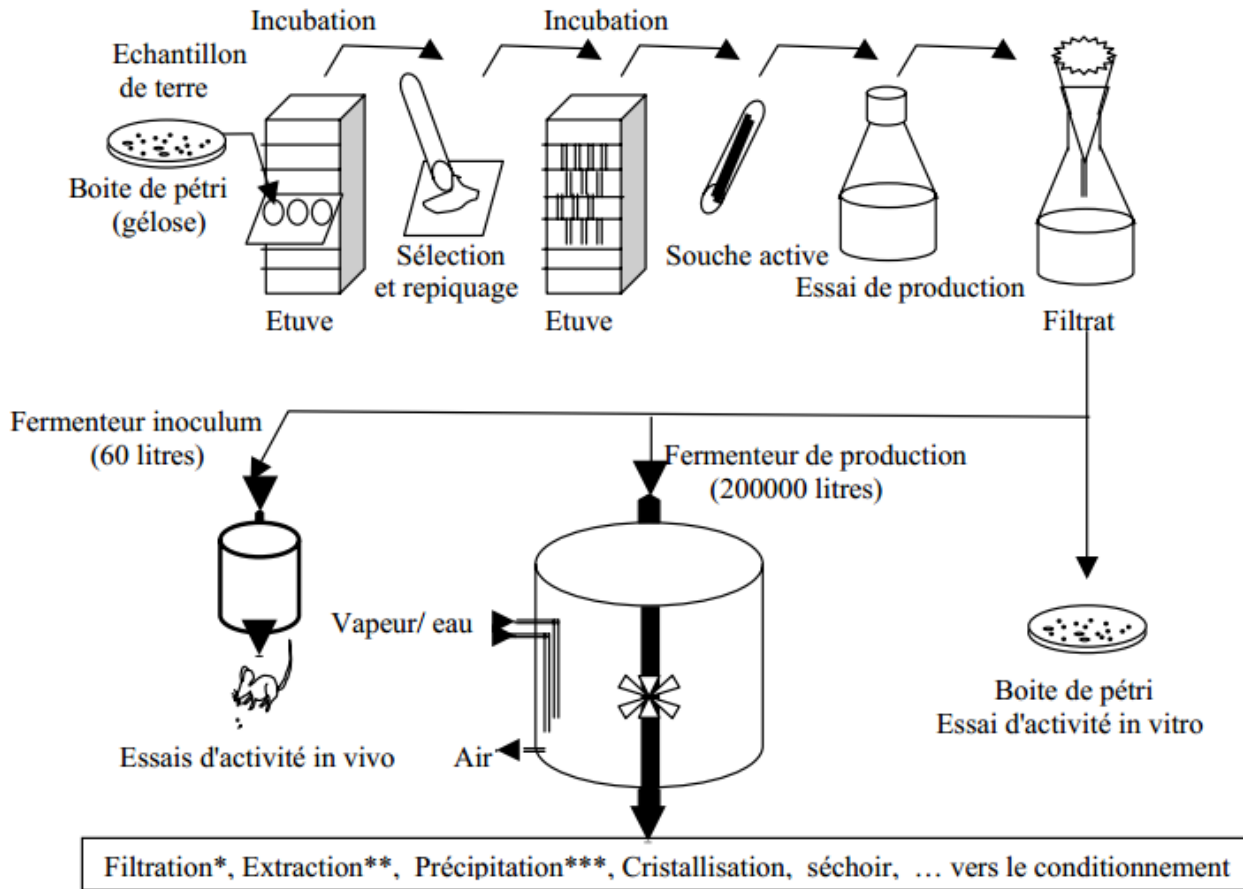
- ✓ Une source d'azote : Corn steep liquor (3.5%)
- ✓ Pour la croissance et la production : lactose (3.5%) et glucose (1%)
- ✓ Pour effet tampon : carbonate de calcium (1%) et phosphate monopotassique (0.4%)

Il est toujours rajouté à ce milieu, des silicones (huiles végétales) utilisés comme source d'énergie et surtout comme agents tensio-actifs anti-mousses.



**Figure 5:** Exemple de protocole général de purification des antibiotiques.

## Préparation industrielle d'un antibiotique d'origine fongique



**Figure 6:** Exemple production de la pénicilline.

### **Production de biomasse (SCP)**

Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture (animaux, végétaux ou microbiens). En effet, la biomasse microbienne est appelée aussi Single Cell Protein (SCP) ou protéines d'organismes unicellulaire (POU). Cette biomasse microbienne peut être une source de protéines, de vitamines, additifs alimentaires, .....

Exemples : Les probiotiques sont des bactéries ou des levures aident à la digestion ou à la défense immunitaire (organismes et substances qui contribuent à l'équilibre intestinal). Certains probiotiques peuvent être pris sous forme de compléments alimentaires. Les plus connus sont les levures de bière ou encore les bactéries lactiques que l'on trouve dans les yaourts. Lorsqu'ils sont absorbés, ils apportent des effets bénéfiques sur la santé, comme améliorer la digestion, lutter contre la diarrhée ou certaines infections de système digestif.

A l'heure actuelle, plusieurs microorganismes sont commercialisés en tant que probiotiques. Les plus courants sont des bactéries : *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* ou *bulgaricus* ; mais également des levures, la plus courante étant *Saccharomyces boulardi*. Ces prébiotiques doivent survivre au pH acide de l'estomac et à la bile produite par le foie sans que leur activité ne soit considérablement diminuée. De plus leur température de croissance doit être proche de celle du corps humain pour pouvoir proliférer dans le système digestif.

